



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Antioksidacinio, fermentinio ir antibakterinio aktyvumo
įvertinimas bei palyginimas vaistinės medetkos (lot. *Calendula
officinalis* L.) ir dažinio dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.)
kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose**

Baigiamasis magistro projektas

Laura Bernikaitė

Projekto autorė

Doc. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Antioksidacinio, fermentinio ir antibakterinio aktyvumo
įvertinimas bei palyginimas vaistinės medetkos (lot. *Calendula
officinalis* L.) ir dažinio dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.)
kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Laura Bernikaitė

Projekto autorė

Doc. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Neringa Petrašauskienė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Laura Bernikaitė

**Antioksidacinio, fermentinio ir antibakterinio aktyvumo
įvertinimas bei palyginimas vaistinės medetkos (lot. *Calendula
officinalis* L.) ir dažinio dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* 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.

Laura Bernikaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Bernikaitė, Laura. Antioksidacinio, fermentinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei palyginimas vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) ir dažinio dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: medetka, dygminas, bioaktyvumas, fermentai, antioksidantai.

Kaunas, 2021. 73 p.

Santrauka

Aplinkos poveikis, pavyzdžiui, toksinai, teršalai, mityba ar UV spinduliuotė, yra pagrindinės biomolekulinės oksidacijos ir oksidacinio streso priežastys, galinčios sukelti ligas ar sutrikimus bei pagreitinti žmogaus senėjimo procesą. Junginiai su antioksidacinėmis savybėmis ne tik apsaugo organizmą nuo kai kurių ligų, susijusių su senėjimu, bet ir sumažina oksidacinio streso poveikį. Biotechnologijos naudoja gyvuosius organizmus, kurie yra modifikuojami genų inžinerijos metodais tam, kad ląstelėje būtų gaminamos naujos, jai nebūdingos, medžiagos. Naudojant ląstelių kultūras, gaminami naudingi junginiai, gali tapti šaltiniu farmakologinių junginių gamybai. Dėl šių priežasčių tyrime buvo vertinama dviejų vaistinių augalų, t. y. medetkos ir dažinio dygmino, antioksidacinis ir antibakterinis aktyvumas.

Tyrimo metu siekiama išsiaiškinti stipriausias antioksidacines savybes turintį augalą, tarpusavyje palyginti kultūras, nustatyti antioksidacinius fermentus bei bioaktyviuosius junginius ir ištirti augalų antibakterinį aktyvumą prieš gramneigiamas bakterijas. Ištyrus medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) ir dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.) antioksidacinį aktyvumą, nustatyta, kad stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo dygminų stiebų kaliaus (TDZ 0,5 mg/l; NAR 0,2 mg/l) ekstraktas, kurio antioksidacinis aktyvumas siekė 24,06 μmol/l. Nustatyti antioksidaciniai fermentai medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) ir dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.) augalų ekstraktuose, kuriuose askorbatperoksidazės, superoksido dismutazės ir katalazės didžiausias aktyvumas buvo medetkų žiedų *in vivo* ekstrakto. Didžiausios fenolinių junginių koncentracijos nustatytos medetkų šaknų kaliaus su *N*-(1,3-dioksoizoidolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido junginiu ekstrakto, o didžiausia liuteino koncentracija buvo rasta medetkos žieduose *in vivo*.

Bernikaitė, Laura. Evaluation and Comparison of Antioxidative, Enzymatic and Antibacterial Activities of Calendula (*Calendula Officinalis* L.) and Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) Callus Culture *in Vitro* Extracts. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: calendula, safflower, bioactivity, enzymes, antioxidants.

Kaunas, 2021. 73.

Summary

Environmental exposure, such as toxins, pollutants, diet, or UV radiation, are major causes of biomolecular oxidation and oxidative stress that can cause disease or disorder and accelerate the aging process in human body. Compounds with antioxidant properties not only protect the body from some diseases associated with aging, but also reduce the effects of oxidative stress. Biotechnology uses living organisms that are modified by genetic engineering to produce new, non-specific substances. The use of cell cultures to produce useful compounds can become a source of pharmacological compounds. For these reasons, the study evaluated two medicinal plants (*Calendula officinalis* L. and *Carthamus tinctorius* L.) antioxidant and antibacterial activity.

The aim of the study is to find out the plant with the strongest antioxidant properties, to compare cultures, to determine antioxidant enzymes and bioactive compounds and to investigate the antibacterial activity of plants against gram-negative bacteria. Examination of the antioxidant activity of calendula (*Calendula officinalis* L.) and safflower (*Carthamus tinctorius* L.) showed that the strongest antioxidant properties were found in safflower stem callus culture (TDZ 0,5 mg/l; NAR 0,2 mg/l) extract with antioxidant activity 24,06 $\mu\text{mol/l}$. Antioxidant enzymes were detected in extracts of calendula (*Calendula officinalis* L.) and safflower (*Carthamus tinctorius* L.) plants, in which ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and catalase activity had the highest activity in *in vivo* extract of calendula flowers. The highest concentrations of phenolic compounds were found in the extract of calendula root callus culture with N-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-((4-methoxyphenyl)amino)propanamide compound, and the highest concentration of lutein was found in calendula flowers *in vivo*.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Augalų biotechnologija	10
1.1.1. Kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	10
1.1.2. Kaliaus kultūros <i>in vitro</i> sąlygos.....	11
1.1.3. Antriniai metabolitai kaliaus kultūroje.....	12
1.2. Augalų charakteristika	12
1.2.1. Medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) apibūdinimas	12
1.2.1.1. Antriniai metabolitai medetkoje.....	14
1.2.2. Dygmino (lot. <i>Carthamus tinctorius</i> L.) apibūdinimas.....	15
1.2.2.1. Sausros streso įtaka dygminui.....	16
1.3. Antioksidantai	17
1.3.1. Liuteinas	18
1.3.2. Antioksidaciniai fermentai	19
1.3.2.1. Superoksido dismutazės	19
1.3.2.2. Katalazė.....	20
1.3.2.3. Glutathiono peroksidazės	20
1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	20
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	21
2.1. Reagentai.....	21
2.2. Aparatūra.....	21
2.3. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas	21
2.4. Augalų ląstelių kultivavimo sąlygos	21
2.5. Augimo reguliatorių paruošimas.....	23
2.6. Augalų sėklų sterilinimas	24
2.7. Antioksidaciniai tyrimų metodai.....	25
2.7.1. Vaistinių augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	25
2.7.2. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną	25
2.7.3. Redukcinių savybių įvertinimas augaluose	26
2.7.4. Vaistinių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu.....	26
2.8. Pirminiai ir antriniai metabolitai	26
2.8.1. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų įvertinimas augaluose	26
2.8.2. <i>L</i> -Prolino įvertinimas	27
2.8.3. Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino- Kiokalto metodu	27
2.8.3.1. Kalibravimo kreivės parengimas.....	28
2.8.3.2. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas.....	28
2.8.4. Liuteino nustatymas augaluose	28
2.8.5. Flavonoidų nustatymas augaluose.....	28
2.8.5.1. Kvercetino kalibravimo kreivė.....	29

2.9. Fermentai ir antioksidaciniai fermentai	29
2.9.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas	29
2.9.2. Katalazės aktyvumo įvertinimas	30
2.9.3. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas	31
2.9.4. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas	31
2.9.5. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas	32
2.9.6. Vandensilio peroksido suardymas vaistinių augalų ekstraktais.....	32
2.10. Antibakterinis aktyvumas.....	32
2.10.1. Įvairių vaistinių augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo nustatymas agaro difuziniu metodu	32
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	34
3.1. Medetkos ir dygmino ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	34
3.2. Antioksidacinis aktyvumas medetkos ir dygmino augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną.....	36
3.3. Redukcinių savybių įvertinimas medetkos ir dygminių augaluose	38
3.4. Medetkos ir dygminių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	39
3.5. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų įvertinimas augaluose	40
3.6. <i>L</i> -Prolino įvertinimas	43
3.7. Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino- Kiokalto metodu	45
3.8. Liuteino įvertinimas vaistiniuose augaluose	47
3.9. Flavonoidų įvertinimas vaistiniuose augaluose	49
3.10. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas	50
3.11. Katalazės aktyvumo įvertinimas	52
3.12. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas	53
3.13. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas	54
3.14. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas	55
3.15. Vandensilio peroksido suardymas medetkų ir dygminių ekstraktais.....	57
3.16. Medetkų ir dygminių ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaro difuziniu metodu	57
3.17. Antioksidantų ir tiriamojo junginio tyrimai	60
3.17.1. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	60
3.17.2. Antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną	60
3.17.3. Redukcinių savybių įvertinimas	61
3.17.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	62
4. Rekomendacijų dalis	63
Išvados	66
Literatūros sąrašas	67
Priedai	71
1 priedas. Medetkos kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	71
2 priedas. Vaistinių augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas prieš gramneigiamas bakterijas.	72

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;
MDA – malondialdehidas;
FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia;
DTT – ditionitritolis;
PMSF – fenilmetilsufonilfluoridas;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
SOD – superoksido dismutazė;
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas.

Įvadas

Biotechnologija yra disciplina, kuri labai sparčiai vystosi ir yra vis labiau pritaikoma kasdieniame gyvenime: nuo farmacijos plėtros iki maisto gamybos ir teršiančių atliekų apdorojimo. Biotechnologija naudoja gyvas ląsteles kurti bioproduktus, skirtus specialioms tikslams. Ši mokslo sritis yra susijusi su genų inžinerija ir 20-ojo amžiaus pradžioje atsirado kaip savarankiška sritis maisto pramonėje, prie kurios vėliau prisijungė kiti sektoriai, tokie kaip medicina ir aplinka. Šiomis dienomis minimos penkios pagrindinės šiuolaikinės biotechnologijos šakos - žmogaus, aplinkos, pramonės, gyvūnų ir augalų, kurios padeda pasauliui kovoti su badu ir ligomis, gaminti saugiau, švariau ir efektyviau, sumažinti ekologinį pėdsaką ir taupyti energiją. Pastaruoju metu augalų biotechnologiniais metodais suformuojamos augalų pagrindu veikiančios *in vitro* sistemos.

Vaistinėse medetkose (lot. *Calendula officinalis* L.) yra veikliųjų medžiagų, tokių kaip flavonoidai, triterpenai, saponinai, salicilo rūgštis, kurios suteikia priešuždegiminių, antioksidacinių, nuskausminamųjų ir drėkinamųjų savybių. Jų eterinis aliejus pasižymi stipriomis antibakterinėmis savybėmis. Nustatyta, kad medetkų žieduose esantys flavonoidai turi priešuždegiminį ir slopinantį poveikį storosios žarnos vėžiui, leukemijai ir melanomos ląstelėms. Medetkos padeda organizmo detoksikacijos procesui pašalinti visas organizme susikaupusias nuodingas medžiagas. Šis detoksikavimas ne tik naudingas virškinimo sistemai, bet ir limfinei sistemai, nes palengvina limfmazgių uždegimą.

Dygminių aliejuje be vitamino E yra ir omega-6 riebalų rūgščių. Sėklų aliejuje yra mažai sočiųjų riebalų rūgščių, todėl jis yra sveikas pasirinkimas gaminant maistą. Dygminių sėklų aliejus naudojamas esant padidėjusiam cholesterolio kiekiui, širdies ligoms, insultui, diabetui, randų prevencijai ir daugeliui kitų ligų gydyti. Gamyboje dygminių žiedai naudojami kosmetikai ir audiniams dažyti. Dygminių sėklų aliejus naudojamas kaip dažų tirpiklis. Sėklų aliejuje esančios linoleno ir linolo rūgštys gali padėti išvengti „arterijų sukietėjimo“, sumažinti cholesterolio kiekį ir sumažinti širdies ligų riziką. Dygminuose yra cheminių junginių, kurie padeda skystinti kraują, išsiplečia kraujagysles, sumažina kraujospūdį.

Augalai svarbūs ir dėl savo terapinių savybių. Jų fenoliniai junginiai sukuria vieną iš pagrindinių molekulių grupių, apsaugančių nuo laisvųjų radikalų arba veikiančių kaip antioksidantai. Augalai sugeba sintezuoti skirtingus antrinius metabolitus, ir šie metabolitai turi reikšmingą biologinio aktyvumo potencialą. Naudojant šiuolaikines technologijas, mokslškai galima analizuoti tradicinį augalų naudojimą ir atskleisti perspektyvius junginius, kurie gali būti naudojami ligoms gydyti.

Darbo tikslas – įvertinti ir palyginti bioaktyvumą vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) ir dažinio dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose.

Tikslui įgyvendinti numatomi šie uždaviniai:

1. suformuoti tiriamųjų augalų kaliaus kultūras *in vitro*;
2. ištirti tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą;
3. nustatyti antioksidacinius fermentus ir bioaktyvius junginius tiriamųjų augalų ekstraktuose;
4. palyginti tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinį aktyvumą;
5. pateikti liuteino išskyrimo iš vaistinės medetkos žiedų aparatūrinę schemą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Augalų biotechnologija

Nuo neatmenamų laikų žmonės augalinius produktus naudojo kaip vaistų, agrochemikalų ir mitybos šaltinius. Net ir šiandien beveik visi pasaulio gyventojai priklauso nuo augalinės kilmės produktų. Pastaruoju metu biotechnologijos siūlo patrauklias galimybes auginti augalų pagrindu sukurtas *in vitro* sistemas (pvz., kaliaus kultūras, ląstelių suspensijos kultūras ir organų kultūras) bei atlikti genetines manipuliacijas, siekiant lengviau sukurti norimus augalus ir augalinius produktus. Kadangi vis daugiau natūralių buveinių yra naikinamos, biotechnologiniai *in vitro* metodai gali padėti užkirsti kelią visiškai išnykti nykstančioms rūšims [1].

Augalai prisitaiko prie abiotinių ir biotinių stresų, naudodamiesi savo plastiškumu, kad atsistatytų, ir sintetina antrinius metabolitus, kuriuos suaktyvina elicitoriai bei išskiria kaip gynybinius atsakus. Cheminių junginių susidarymą iš antrinio metabolizmo gali paskatinti išoriniai streso signalai (pvz., patogeniniai elicitoriai, oksidacinis stresas ir kt.), kurių biosintezėje dalyvauja žasmonatas, salicilo rūgštis ir jų dariniai kaip signalo keitikliai. Šios elicitoriaus molekulės augaluose stimuliuoja gynybos ar streso sukeltus atsakus. Jie gali būti gaunami iš pačių patogenų (egzogeniniai elicitoriai; pvz., chitinas, chitozanas ir gliukanas) arba augalų išskiriami veikiant patogenui (endogeniniai elicitoriai; pvz., pektinas, pektino rūgštis, celiuliozė ir kiti polisacharidai). Priešingai nei šie, biotiniai elicitoriai, taip pat yra abiotinių elicitorių, kurie veikia kaip fiziniai veiksniai (t. y. šaltis, karštis, UV spinduliuotė, osmosinis slėgis) ir cheminiai agentai (t. y. etilenas, fungicidai, antibiotikai, druskos ir sunkieji metalai). Elicitoriai reguliuoja genų ekspresiją reaguodami į cheminius ir fiziologinius dirgiklius. Jie taip pat skatina fermentų sintezę ir taip skatina daugybės antrinių metabolitų: flavonoidų, alkaloidų, terpenoidų, tioninų, fenilpropanoidų ir polipeptidų, susidarymą.

Daugelis antrinių metabolitų ne tik atlieka apsaugines funkcijas, bet ir turi medicininę vertę žmonėms, todėl augalų ląstelių *in vitro* yra patrauklūs šaltiniai jų gamybai. Sukurtos metodikos, siekiant optimizuoti auginimo sąlygas ir padidinti antrinių metabolitų gamybą augalų *in vitro* kultūrose. Be to, dėl genetinių manipuliacijų ekonominiais augalais, tokiais kaip kviečiai, ryžiai, kukurūzai ir kiti, atsirado veislių, atsparių stresui ir ligoms. Taigi augalų biotechnologijos gali papildyti tradicinį žemės ūkį pramoniniu mastu [2, 3].

1.1.1. Kaliaus kultūros *in vitro*

Augalų audinių kultūros yra svarbios mokslo tyrimams ir komerciniams tikslams. Visose pagrindinėse sausumos augalų šeimose sužeistas audinys yra išgaunamas nediferencijuotomis kaliaus ląstelėmis. Šias kaliaus ląsteles galima kultivuoti *in vitro* biotechnologinėms reikmėms. Beveik bet kuri augalo dalis gali būti naudojama auginti kaliaus kultūrą. Iš augalų audinių paimti eksplantai lėtai auga *in vitro* į ląstelių masę nuo amorfiškos ir bespalvės iki šviesiai rudos spalvos, bet jie turi būti gaunami steriliomis sąlygomis, išvengiant mikrobų infekcijos, ir auginami kietoje gelio terpėje, papildytoje augimo hormonais (t. y. auksinu, citokininu). Reguliariai perkelti ląsteles, kaliaus kultūras galima neribotą laiką laikyti *in vitro*. Diferencijuotos augalų ląstelės ir kultivuojamos kaliaus ląstelės labai skiriasi. Kaliaus ląstelės yra panašios į nediferencijuotas meristemines ląsteles - jos išsiskiria mažomis vakuolėmis ir, be kitų ypatybių, neturi chloroplastų fotosintezėi. Kaliaus kultūros gali išauginti į augalus, jei jos laikomos tinkamose auginimo terpėse, kurios skiriasi nuo standartinių kultūrinių terpių. Nors kai kurioms kaliaus kultūroms reikia augimo tamsoje, kitos auga tam tikromis dienos ir nakties sąlygomis (pvz., 16 val. šviesoje, 8 val. tamsoje). Kaliaus kultūros paprastai auga

(25 ± 2) °C temperatūroje. Jos gali būti kompaktiškos formos kultūros ir purios kultūros. Vienaląstės kultūros, laikomos lėtai sumaišytoje skystoje terpėje, gali būti naudojamos puriai kaliaus kultūrai gauti [4].

Pagrindiniai ląstelių kultūros sistemų privalumai, palyginti su įprastiniu viso augalo auginimu, yra šie: pasirinktus augalinius junginius galima išgauti nepriklausomai nuo išorinių veiksnių (pvz., dirvožemio sudėties ar klimato); auginamos ląstelės apsaugotos nuo mikroorganizmų ar vabzdžių; bet kurio augalo, netgi reto ar nykstančio, ląsteles galima lengvai prižiūrėti, kad susidarytų jų antriniai metabolitai; o robotų valdomi bioreaktoriai, reguliuoja antrinių metabolitų gamybą, sumažina sąnaudas ir pagerina produktyvumą [5].

1.1.2. Kaliaus kultūros *in vitro* sąlygos

Kaliaus kultūrų laikymo laboratorinėmis sąlygomis įvairioms rūšims yra skirtingos, todėl jos turi būti parengtos kiekvienu atskiru atveju. Išoriniai veiksniai, tokie kaip šviesa, temperatūra, terpės pH ir kultūrų aeracija, turi įtakos antrinei metabolitų biosintzei. Paprastai kaliaus kultūros palaikomos kietoje agarų terpėje, papildytoje specifinėmis maistinėmis medžiagomis, druskomis, vitaminais ir elementais (pvz., azotu, fosforu ir kaliumu). Apskritai, didelė amonio jonų koncentracija slopina antrinių metabolitų susidarymą, o mažėjant amonio azotui, susidarymas padidėja. Neorganinis fosfatas yra būtinas fotosintzei ir glikolizei. Didelis fosfatų kiekis dažnai skatina ląstelių augimą ir pirminį metabolizmą, o maža fosfatų koncentracija skatina antrinių metabolitų susidarymą. Daugelis antrinių metabolitų susidaro dėl fosforilintų tarpinių produktų, kurie vėliau išskiria fosfatą (pvz., fenilpropanoidus ir terpenoidus).

Pridėjus prekursorių, pagerėja produkto susidarymas. Antrinių metabolitų biosintzė augalų kultūrose paprastai yra nedidelė ir turi būti patobulinta siekiant komercinių tikslų. Prekursorių molekulių pridėjimas į terpę dažnai padidina produkto susidarymą. Daugumos antrinių metabolitų biosintzė sudaro kelių fermentų daugiapakopės reakcijos. Bet kuris reakcijos etapas fermentų biosintzėje gali būti stimuliuojamas, kad būtų sustiprintas produkto susidarymas.

Labiausiai yra naudojamos *Murashige ir Skoog (MS)*, *White* ir sumedėjusio augalo terpės. Auginimui stimuliuoti į terpę reikia įpilti specifinių fitohormonų. Antrinių metabolitų gamybai optimizuoti būtina atrinkti terpę augalų ląstelėms auginti ir svarbiems junginiams susidaryti.

Kaliaus formavimąsi arba somatinę embriogenezę lemia augalų hormonai, tokie kaip auksinai, citokininai ir giberelinai. Augalų išauginimas iš kaliaus audinio vadinamas organogeneze arba morfogeneze. Šiam procesui taip pat reikalingi specifiniai hormonai. Augimo faktoriai, tokie kaip metilglikoksalis ir askorbo rūgštis, sustiprina nepakankamą organogenezę *in vitro*.

Tiek embrioninės, tiek postembrioninės raidą reguliuoja totipotencija ir diferenciacija pagal paaiškinamų audinių genetinius ir epigenetinius mechanizmus bei kaliaus formavimąsi veikiant fitohormonams. Kaliaus kultūros gali būti embriogeninės arba neembriogeninės. Embriogeninėse kultūrose yra diferencijuotos embriogeniškai kompetentingos ląstelės, kurios regeneruoja išiskus augalus. Neembriogeninėse ląstelėse yra vienalytės, diferencijuotos ląstelės, kurios naudojamos antrinių metabolitų gamybai. Suspensinių ląstelių kultūros dažnai naudojamos masiniam auginimui specialiai sukurtuose bioreaktoriuose [4, 5].

1.1.3. Antriniai metabolitai kaliaus kultūroje

Kaliaus kultūros gali būti naudojamos antriniam metabolitams gaminti, kurie panaudojami kosmetikos, maisto ir susijusiose pramonės šakose. Iš vaistinių augalų kaliaus kultūrų gaminami bioaktyvūs fitochemikalai, kurie gali būti naudojami gydant įvairias ligas (pvz., vėžį, širdies ir kraujagyslių ligas, neurodegeneracines ligas, infekcines ligas ir kt.); be to, pagamintos cheminės medžiagos neapsiriboja tam tikromis cheminių klasių rūšimis, tačiau turi didelę cheminę įvairovę. Kadangi fitochemikalus galima tiesiogiai išgauti iš kaliaus neprarandant viso augalo, kaliaus technologija gali padėti apsaugoti retas ir nykstančias augalų rūšis, o *in vitro* gali būti pagamintas pakankamas kiekis antrinių metabolitų. Kaliaus kultūras taip pat galima paversti vienąląstelių suspensijų kultūromis, augančiomis kolbose ant purtyklių ar biofermentoriuose, antriniam metabolitams gauti. Kultūros auga kontroliuojamomis sąlygomis, neveikiant įvairiems aplinkos veiksniams, sezoninėms mikrobiologinėms ligoms, kenkėjams ir geografiniams apribojimams. Taigi, taip nuolat gali būti gaminami aukštos kokybės antriniai metabolitai [6].

Kadangi kaliaus ir suspensijos kultūrose yra sukaupta genetinė informacija apie ištisus augalus, jie turi visišką potencialą antrinių metabolitų biosintzei. Be to, audinių kultūros technologijos suteikia galimybę manipuliuoti augalų ląstelių biosintzės būdais, kad būtų galima gauti antrinių metabolitų darinius, pasižymintius patobulintomis rinkai savybėmis. Taip pat, biotransformacijos reakcijos gali būti naudojamos paversti specifinius substratus į norimus galutinius produktus.

Antriniam metabolitams išskirti ir išgryninti, naudojami cheminiai metodai yra vienodi augalų ląstelių kultūroms ir ištisuose augaluose. Jei susidarę produktai patenka į auginimo terpę, juos atskirti lengva. Jei jie laikomi vakuolėse, reikia suardyti augalų ląstelių membraną ir tonoplastą (pvz., permeabilizuojančiomis medžiagomis, tokiomis kaip dimetilsulfoksidas). Norint optimizuoti norimų fitochemikalų gamybą, reikia padidinti jų biosintzę ir kuo labiau sumažinti nepageidaujamų šalutinių produktų sintzę. Morfologinė diferenciacija ir brendimas skatina antrinių metabolitų biosintzę specializuotose ląstelėse [7].

1.2. Augalų charakteristika

1.2.1. Medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) apibūdinimas

Calendula officinalis L. (medetka) visame pasaulyje žinoma dėl savo medicininės svarbos, turinti įvairių fitochemikalų, įskaitant angliavandenius, aminorūgštis, lipidus, riebalų rūgštis, karotinoidus, terpenoidus, flavonoidus, chinonus, kumarinus ir kitas sudedamąsias dalis, rodančias svarbų biologinį aktyvumą, pavyzdžiui, žaizdų gijimą, imunostimuliatorinį, spazmogeninį ir spazmolitinį, genotoksinį ir antigenotoksinį, priešuždegiminį, antibakterinį, antigrybelinį, antioksidantinį, antidiabetinį ir priešvėžinį poveikį.

Pagrindinės aktyviosios augalų sudedamosios dalys yra triterpendiolio esteriai, saponinai ir flavonoidai, įskaitant rutiną ir hiperozidą. Medetkoje yra daug karotinoidų, įskaitant ir euroksantiną bei flavoksantiną.

Medetkų ekstraktai pasižymi plačiu farmakologiniu poveikiu ir yra naudojami kaip antiseptiniai, stimuliuojantys, antispazminiai ir antipiretiniai agentai. Augalų ekstraktai turi antivirusinį poveikį ŽIV. *In vitro* *Calendula officinalis* augalų ekstraktai rodo priešvėžinį poveikį įvairioms navikinių ląstelių linijoms, gautoms iš leukemijų, fibrosakomų, melanomų, krūties, gimdos kaklelio, prostatos,

kasos ir plaučių. Jis taip pat buvo naudojamas gastrito, kolito ir dvylikapirštės žarnos opų kraujavimui gydyti. Dėl žymaus *Calendula officinalis* ir jo komponentų biologinio aktyvumo, augalui buvo skiriamas didelis dėmesys ir yra naudojamas kaip vaistas [8].

Įvairūs fitocheminiai tyrimai atskleidė skirtingų cheminių junginių, įskaitant angliavandenius, aminorūgštis, lipidus, karotinoidus, terpenoidus, flavonoidus, lakiųjų aliejų, chininus, kumarinus ir kitas sudedamąsias dalis, egzistavimą:

- Angliavandeniai. Vandenyje tirpiuose polisachariduose iš *C. officinalis* žiedyno yra 9,25 % drėgmės, 25,77 % rūgštinio cukraus, 29,25 % pelenų, 31,25 % redukuojančių cukrų, 84,58 % pektino medžiagų ir įvairių monosacharidų, įskaitant gliukozę, arabinozę, ramnozę, ksilozę, galaktozę ir galakturono rūgštį. Taip pat, *C. officinalis* žiedyno etanoliniame ekstrakte yra monosacharidų kartu su polisacharidais.
- Aminorūgštys. *C. officinalis* ekstraktas parodė 15 laisvųjų aminorūgščių, įskaitant proliną, fenilalaniną, histidiną, liziną, leuciną, seriną, alaniną, valiną, argininą, tiroziną, asparginą, treoniną, glutamą, metioniną ir aspartatą bei aminorūgščių rūgščių kiekį, jų yra daugiausiai žiede – 4,5 %.
- Lipidai ir riebalų rūgštys. Riebalų rūgštys, esančios *C. officinalis* rūgštyje: oleino rūgštis, linolo rūgštis ir linolo rūgštis. *C. officinalis* sėklose esantys lipidai yra fosfolipidai, glikolipidai ir neutralūs lipidai. Sėklų sudėtyje yra 9-hidroksi- (trans-9, cis-11) rūgšties-dimorfenolio rūgšties ir konjuguotos trieninės rūgšties. Sėklų aliejuje yra D - (+) - 9-hidroksi-10, 12-oktadekadadieno rūgšties (deguonimi prisotintos riebalų rūgšties). Iš vienuolikos medetkos sėklų aliejų genotipų buvo nustatyta devyniolika riebiųjų rūgščių, kuriose vyraujančios riebiosios rūgštys yra kalendros acidadas ir linolo rūgštis (51,47–57,63 % ir 28,5–31,9 %), po jų seka oleino rūgštis (4,44–6,25 %) ir palmitino rūgštis (3,86–4,55 %). Riebalų rūgštys, randamos mažais kiekiais, yra lauro, stearino, miristino, palmitoleino, α -linoleno, arachidino, elaidino, gondoino, behenino, linoelaidino, pentadekanino, cis-7-heksadecenoino rūgštys. Kalendrinė rūgštis yra konjuguota trieno rūgštis, turintis konjuguotų trans-8-, trans-10- ir cis-12 dvigubų jungčių. Konjuguotos trans-8- ir trans-10-dvigubos jungtys kalendrinės rūgšties jungtys susidaro modifikuojant cino-12-dvigubą linolo rūgšties ryšį. Sėklų brendimo laikotarpiu nustatyta, kad kalendros rūgšties koncentracija tolygiai ir staigiai didėja, mažėjant linolo ir oleino rūgščių kiekiui, nes kalendros sėklose yra specifinė konjugazė, kuri linolo rūgštį paverčia kalendros rūgštimi.
- Karotinoidai. *C. officinalis* žiedyne gausu karotinoidų, kurie suteikia augalams geltonai oranžinę spalvą, o spalvos atspalvis priklauso nuo pigmento turinio ir pigmento profilio. Medetkos geltonuose žiedlapiuose yra 19 karotinoidų ir oranžinių gėlių žiedlapių, 10 unikalių karotinoidų. Šie 10 karotinoidų turi UV spinduliuose matomą absorbcijos maksimumą, esant bangos ilgiui, ilgesniam nei flavoksantinas, ir suteikia gėlių žiedlapiams oranžinę spalvą. Šeši karotinoidai, turintys cis formą C-5, gali būti izomerizuoti C-5 fermentais, nukrypstant nuo pagrindinio karotenoidbiosintezės kelio. Kai kurie iš karotinoidų, kurie buvo neseniai atpažinti, yra likopenas ir rubiksantinas. Pagrindiniai žiedlapiuose ir žiedadulkėse esantys karotinoidai yra flavoksantinas, liuteoksantinas, auroksantinas, 9Z-antraheksantinas, neoksantinas, liuteinas ir jo Z izomerai, mutatoksoantinas, violaksantinas, 9Z-neoksantinas, 9Z-violaksantinas, karotinas ir kriptoksantinas su dideliu likopeno kiekiu žiedlapiuose. Bendras žiedlapiuose ir žiedadulkėse esantis karotinoidas sudaro 7,71 % ir 1,61 %. Liuteinas, karotinas, neoksantinas, 9Z-neoksantinas, liuteino Z-izomerai, antheraksantinas ir

violaksantinas yra pagrindiniai karotinoidai, aptinkami lapuose ir stiebe. Bendras karotinoidų kiekis lapuose ir stiebuose yra atitinkamai 0,85 % ir 0,18 %. Vaistažolių arbatos (*Calendula flos*) karotinoidinis suskaidymas yra mažesnis dėl to, kad džiūsta augalinė medžiaga, be to, nedideli kiekiai buvo nustatyti mantakserheksantino ir 9Z-heteroksantino. Džiovinant augalinę medžiagą padidėjo liuteino Z-izomerų ir karotino santykis. Foto apsaugai reikalingas zeksantinas arba liuteinas, kaip ir slopinant lipidų peroksidaciją.

- Terpenoidai. Medetkų mišinyje yra įvairių terpenoidų, įskaitant tigmasterolius, sitosterolius, lupeolį, taraksasterolį, taraksasterolio 3-monoesterius, ursadiolį, diolių diesterius, eritrodiolį, kalendros miristatus, palmitatus, kalendros glikozidą A, kalendros glikozidą B, kalendros glikozidą C, gliukuronidai (daugiausia žaliosiose dalyse) ir oleanolio rūgšties gliukozidai (daugiausia būna augančiuose ir senesniuose augaluose). Pagrindiniai medetkų žieduose esantys triterpenoidų esteriai yra palmitatas, miristatetas ir faradiolis 3-O-lauratas. Triterpeno alkoholiai ir triterpeno saponinai randami liguliuose žieduose.
- Flavonoidai. *C. officinalis* žiedyne yra įvairių flavonoidų, įskaitant izorhamnetiną, kvercetiną, izorhamnetin-3-O-D-glikozidą, izokvercetiną, kalendoflavosidą, rutiną, kvercetin-3-O-rutinosidą, kvercetin-3-O-gliukozidą, kalendoflavobiozidą. Flavonoidų kiekis priklauso nuo augalų veislės, auginimo laiko ir vietos. Tarp florelės spalvos ir bendro *C. officinalis* flavonoidų kiekio visada randamas ryšys [9].

1.2.1.1. Antriniai metabolitai medetkoje

In vitro ūglių kultūras galima lengvai išauginti iš sterilių daigų. Meristemą turinčius ūglių galiukus galima kultivuoti *in vitro*, gaunant jų dalis iš atsitiktinių pumpurų. Ūgliai yra potencialios augalų regeneracijos metodų alternatyvos, nes jie mažiausiai priklauso nuo genotipo. Jų kultūros pasižymi genetiniu stabilumu ir geromis antrinio metabolito gamybos galimybėmis.

Augalų regeneracija iš ūglių ir stiebų meristemos buvo sėkminga daugelyje vaistinių ir aromatinių augalų. Ši kultūra dažnai gamina didesnę antrinių metabolitų kiekį nei kalniaus ir suspensijų kultūros. Pvz., kai kurie antriniai metabolitai (terpenoidai ir eteriniai aliejai) nebuvo reguliariai sintezuojami nediferencijuotose kultūrose, ir tai yra dėl to, kad *in vitro* kultūrose nėra specializuotų, tam skirtų, ląstelių. Dažnai nediferencijuotose ląstelių kultūrose, augančiose normaliomis sąlygomis, visame augale galima aptikti mažą antrinių metabolitų koncentraciją. Didžiausias antrinių metabolitų kiekis pastebimas, kai kultūra išskiria besikaupiančias struktūras, paprastai esančias visame augale.

Mokslininkų tyrimuose nustatyta, kad daug ląstelių augimo, ląstelių diferenciacijos ir organogenezės audinių kultūros aspektų kontroliuoja sąveika tarp citokininių ir auksinų. Auksino kontroliuojami šaknų tyrimai ir citokinino sukelti morfogenetiniai tyrimai grindžiami auksinų gebėjimu sukelti atsitiktinį šaknų susidarymą, o citokininių - atsitiktinius ūglius. Nors augimui ir morfogenezei paprastai reikia ir auksino, ir citokinino, auksinas gali slopinti citokinino kaupimąsi, tuo tarpu citokininai gali slopinti bent kai kuriuos auksino veiksmus [20].

Fitohormono koncentracija dažnai yra lemiamas antrinio metabolito kaupimosi *in vitro* kultūrose veiksnys. Auksino ar citokinino tipas ir koncentracija arba auksino ir citokinino santykis gali pakeisti auginamų augalų ląstelių augimą ir antrinio metabolito gamybą. Daugybė *in vitro* kultūrų, kultivuotų terpėje su fitohormonais, gamino specifinius vaistinius junginius, kurių greitis buvo panašus arba didesnis už nepažeistų augalų. Ląstelių, audinių ir organų atsakas *in vitro* į egzogeniškai taikomus fitohormonus gali skirtis priklausomai nuo kultūrinių sąlygų, eksplanto tipo ir genotipo. Todėl būtina

rasti optimalią fitohormonų koncentraciją skirtingų *in vitro* kultūrų augimui ir antrinio metabolito gamybai.

Cocu ir kt. (2004) pranešė apie sėkmingą atsitiktinį medetkų išauginimą iš hipokotilių ir skilčialapių auginamų MS terpėse, papildytose įvairiomis tidiazurono (TDZ), kinetino (KIN), NAR ir IBR koncentracijomis. Didžiausias atsitiktinio ūglio atsinaujinimo dažnis buvo pasiektas naudojant hipokotilo ir skilčialapių eksplantus MS terpėse, papildytose 0,75 mg L⁻¹ TDZ ir 0,25 arba 0,50 mg L⁻¹ IBR. Efektyvus dauginimasis *in vitro* taip pat buvo vykdomas iš sėkų įvairiose terpėse, papildytose 0,75 mg · L⁻¹ TDZ ir 0,05 mg · L⁻¹ NAR arba 2 mg L⁻¹ KIN ir 1 mg L⁻¹ NAR. Regeneruoti medetkų ūgliai buvo iššakniję MS terpėje, papildytoje 1 mg L⁻¹ NAR. Iššakniję lapeliai vėliau buvo perkelti į vazonus. Pakartotiniai tyrimų rezultatai parodė, kad fitohormonų koncentracijos dažnai yra lemiamas veiksnys norint sėkmingai regeneruoti *in vitro* kultūras. Aukso ar citokinino tipas ir koncentracija arba aukso ir citokinino santykis gali pakeisti auginamų augalų audinių augimą. Grzelak ir Janiszowska (2002) ištyrė apie kaliaus kultūros ir ląstelių suspensijos susiformavimą iš *Calendula officinalis* L. izoliuotų eksplantų dalyvaujant auksinams ir citokininams. Kaliaus kultūros buvo auginamos MS terpėje su skirtingomis auksinų koncentracijomis: 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi (2,4-D) arba IAR ir citokininais: kinetinu (KIN) arba [N⁶- (2-izopentil)adeninu] (2iP). Iš visų terpėje naudojamų hormonų derinių du efektyviausiai skatino kaliaus vystymąsi: 1,81 μM (0,4 mg L⁻¹) 2,4-D ir 1,85 μM (0,4 mg L⁻¹) kinetino arba 0,45 μM (0,1 mg L⁻¹) 2,4-D ir 2,02 μM (0,5 mg L⁻¹) 2iP. Šie deriniai buvo pasirinkti ląstelių suspensijai suformuoti. Suspensijos kultūros buvo laikomos šviesos arba tamsos sąlygomis. Šviesa stimuliuo ląstelių agregaciją kultūrose. Abiejose kultūrose ląstelės nebuvo diferencijuotos tamsoje, kur, kaip ir šviesoje, pastebėta riogenezė. Ląstelių biomasės gamyba buvo panaši ir šviesoje, ir tamsoje. Po 7–8 mėnesių ląstelių augimas šviesoje sumažėjo maždaug 30%. Taigi, iš medetkų gali būti suformuotos kaliaus ir suspensijos kultūros. Be to, keičiant aukso ir citokinino koncentracijų santykiu terpėje gali išauginti ūglius, iš kurių vėliau auginami didesni augalai [20, 21].

Išnagrinėtas optimizuotas citokininų ir antrinių metabolitų susidarymas medetkos *in vitro* augimo metu. Citokininas BA (0,5 mg L⁻¹) neturi įtakos antrinių metabolitų gamybai, tačiau medetkų ūglių augimas buvo nepakankamas. Citokininų poveikis antriniam metabolitų kaupimuisi *in vitro* kultūrose gali būti skirtingas, priklausomai nuo augalų rūšies [21].

Taigi, antrinio metabolito gamybą *in vitro* kultūrose galima iš dalies pakeisti papildant fitohormonais, o gerai kontroliuojamos *Calendula officinalis* kultūros *in vitro* gali būti naudojamos kaip šaltinis greitai ir padidėjusiai antrinių metabolitų ir susijusių farmakologinių junginių gamybai.

1.2.2. Dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.) apibūdinimas

Carthamus tinctorius L., plačiai pripažintas dygminu arba netikru šafranu, priklauso *Compositae* arba *Asteraceae* šeimai. Ši į usnį panaši rūšis paprastai klesti sausringame klimate, būtent Pietų Azijoje, Kinijoje, Indijoje, Irane ir Egipte. Iš dygminų žiedlapių galima išgauti įvairių spalvų įvairovę nuo oranžinės iki baltos. Šis augalas naudojamas kulinarijos ir tekstilės gaminiams gaminti. Atsiradus sintetiniams anilino dažams, jis daugiausia auginamas kaip aliejaus sėkla ir paukščių sėklos, kurias galima pritaikyti medicinos srityse. Dygminų aliejus turi didelę maistinę vertę ir susideda iš 70 % polinesočiųjų riebalų rūgščių (t. y. linolo rūgšties), 10 % mononesočiųjų riebalų rūgščių ir tik stearino rūgšties. Dygminai pasižymi nepaprastomis, nuskausminančiomis ir karščiavimą mažinančiomis savybėmis ir yra naudingi apsinuodijimams gydyti. Ši augalų rūšis kliniškai naudojama esant širdies

ir kraujagyslių, smegenų kraujagyslių ir ginekologinėms komplikacijoms. Kinijoje *Carthamus tinctorius* vandens ekstraktas buvo sukurtas kaip injekcija į veną, kuris yra plačiai taikomas kliniškai gydyti širdies ir kraujagyslių ligas. Jo dažai daugiausia naudojami kaip dažikliai. Dygminai gali būti naudojami kaip stiprus gyvsidabrio (Hg) ir seleno (Se) iš užteršto dirvožemio fitomediatorius. Fitoterapija yra biotechnologinis augalų naudojimas detoksikuojant teršalus, o tai yra moderni aplinkos valymo technika [18].

Iš *Carthamus tinctorius* buvo išskirta daugiau nei 200 junginių, o dažniausiai žinomi yra flavonoidai, feniletanoidiniai glikozidai, kumarinai, riebalų rūgštys, steroidai ir polisacharidai. Dygminių sėklų analizė parodė, kad baltymų koncentracija svyravo nuo 14,9 % iki 17 %, bendra cukraus koncentracija nuo 3,2 % iki 9,2 % ir ekstrahuojamų lipidų kiekis nuo 25 % iki 40 %. Aliejaus kiekis sėklose yra panašus į alyvuogių ir apima: linolo rūgštį (63–72 %), oleino rūgštį (16–25 %) ir linoleno rūgštį (1–6 %).

Septyni antioksidaciniai serotonino dariniai, ferulamidas, kumaramidas ir kt. buvo išskirti iš dygminių aliejaus. Serotomidas (trans-N-kofeoilserotonininas) ir saflomidas (trans-N-kofeoiltryptaminas), priklausantys serotonino daromiams amidams, taip pat buvo rasti *Carthamus tinctorius*.

Vandeninis ekstraktas pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Kadangi augaluose yra daug fenolio junginių, tai patvirtina, kad jos vaidina svarbų vaidmenį antioksidacinėje veikloje.

Flavonoidiniai glikozidai, kartaminas, flavonoidinio tipo geltoni dažai yra pagrindinės *Carthamus tinctorius* žiedo sudedamosios dalys. Žieduose taip pat yra kartamidino, izokartamidino, kvercetino, kaempferolio, 6-hidroksikaempferolio ir jo glikozidų.

Carthamus tinctorius polisacharidus sudaro ksilozės, fruktozės, galaktozės, gliukozės, arabinozės, ramnozės ir urono rūgšties liekanos.

Iš *Carthamus tinctorius* žiedlapių išskiriamas kartaminas, safloras A ir B, saflominas A ir C, izokartaminas, izokartamidinas, geltonasis hidroksisafloras, tinktorminas, puerarinas, 3'-metoksilpuerarinas ir puerarinapiozido pigmentai [16].

Literatūros duomenys parodė, kad *Carthamus tinctorius* atlieka farmakologines funkcijas, įskaitant antioksidantinę, priešuždegiminę, analgetiką, antidiabetinę, hepatoprotekcinę ir antihiperlipideminę veiklą. Taip pat, yra galimybė, kad serotonino dariniai ir flavonoidai gali būti toliau naudojami kaip vaistai nuo ligų [19].

1.2.2.1. Sausros streso įtaka dygminui

Sausros stresas yra abiotinis augalų stresas, todėl jis neigiamai veikia dygminą. Stresas uždaro žioteles, sumažina CO₂ redukciją, slopina Kalvino ciklą, stabdo elektronų pernašą ir sukuria laisvuosius radikalus chloroplaste, kartu sumažėja augalų augimas ir augalininkystės derlius. Lapų paviršiaus ploto augimas ir sausųjų medžiagų susidarymas fotosintezės būdu yra svarbios ląstelinės funkcijos vegetatyvinio augalo augimo metu. Sausros stresas sumažina ląstelių dalijimąsi ir užkerta kelią ląstelių dauginimuisi, veikdamas fotosintezę, atsinaujinimą, medžiagų absorbciją ir perdavimą, taip pat mažindamas turgorinį slėgį. Tai parodo fotosintetinių pigmentų (Chl *a*, *b*) sumažėjimas maždaug trečdaliu. Tačiau sausros stresas teigiamai veikia šaknų augimą, todėl šaknies ilgis ir svoris padidėja apie 45 %. Tai siejama su vandens trūkumu, kuris lemia šaknies išsiplėtimą ir augimą, kad dirvožemis būtų efektyviai absorbuotas [23].

Chl *a*, ir Chl *b* yra jautrūs dirvožemio vandens potencialo sumažėjimui. Chlorofilas yra vienas iš svarbiausių fotosintezės dalių. Jo kiekio sumažėjimas, esant sausros stresui, parodė galimą jo visišką suskaidymą. Sausros stresas padidina chlorofilazės fermento aktyvumą, pakeičia chlorofilo struktūrą ir lipidų-baltymų kompleksą membranoje bei sumažina šviesos fazės pigmento baltymo kiekį, susijusį su II fotosistema ir neaktyviu Kalvino ciklo fermentu. Karotinoidai svarbūs fotosintezėje ir atsparume sausros stresui. Šios molekulės dalyvauja šviesos fazėje fotosintezės metu, yra antioksidantai ir pavieniai deguonies surinkėjai, apsaugo nuo lipidų peroksidacijos ir stabilizuoja membranas.

Sausros stresas kartu su osmosiniu šoku augalams sukelia antrinių metabolitų kiekio pakitimus. Fenilalanino amoniako liazė (PAL) yra pagrindinis fenolinių junginių, pvz., flavonoidų ir antocianino, biosintezės fermentas, dėl kurio padidėja fenolio ir flavonoidų reakcija į kai kuriuos biotinius ir abiotinius stresus. Fenoliniai junginiai turi ypatingą cheminę struktūrą augaluose, apsaugančiuose ląsteles nuo oksidacinio streso, sudarant metalų chelatus ir jungiantis su laisvaisiais radikalais bei mažinant lipidų peroksidaciją. Flavonoidai taip pat slopina lipidų peroksidaciją ir padidina membranos stabilumą bei membranos laidumą.

Antrinių metabolitų, tokių kaip antocianino ir fenolio, koncentracija dygmine sumažėja, kai salicilo rūgštis (SA) ir natrio nitroprusidas (SNP) kartu yra naudojami augalams, patyrusiems sausrą. NO pašalina ROS ir dėl to sumažina laisvųjų radikalų sausrą patyrusiame dygmine. SA ir SNP apdorojimas esant dideliame druskingumui padidina flavonoidų ir antocianinų koncentraciją dėl padidėjusių laisvųjų radikalų. Tačiau pridėjus SA ir SNP, antocianino, fenolio, kvercetino ir liuteloino koncentracija sumažėja dėl kitų augalo gynybinių funkcijų suaktyvėjimo. Dėl to sausros streso sąlygomis ROS yra efektyviai pašalinama nefermentiniais ir fermentiniais antioksidantais. Be to, SNP gali apsaugoti membraną pašalindamas laisvuosius radikalus ir slopindamas membranos peroksidacinius fermentus. SNP vaidina apsauginį vaidmenį, reaguodamas su lipidų radikalais ir slopindamas jų vystymosi ar dauginimosi fazėje ir taip užkirsdamas kelią lipidų peroksidacijai. Dėl sausros streso dygminuose padidėja fermentinių antioksidantų kiekiai, tokių kaip katalazė, ir nefermentinių, tokių kaip rutinas ir apigeninas. Pastarieji gali sumažinti laisvųjų ląstelių radikalus ir padidinti augalo atsparumą sausros stresui.

Sausros stresas neigiamai paveikia dygminų augimą. Tačiau tiek šviežios, tiek sausos šaknies masė padidėja tam, kad šaknų prailginimo būdu būtų išvengta vandens trūkumo ir taip efektyviai įsisavinama dirvožemio drėgmė. SA sumažina sausros stresą, pagerindamas fotosintezę ir aktyvindamas fermentinius bei nefermentinius antioksidantus (karotinoidus, tocianiną ir PAL aktyvumą). SNP apdorojimas pagerina atskirų augalo dalių augimą, apsaugodamas fotosintetinius pigmentus, pašalindamas laisvuosius radikalus. Jis sumažina šaknų augimą, reguliuodamas ląstelių ciklą ir šaknų vystymosi genus. Dėl sausros streso padidėja antrinių metabolitų (flavonoidų, antocianinų, fenolinių junginių) ir PAL aktyvumas bei sumažėja fotosintetinių pigmentų (karotinoidų ir Chl *a*, *b*). Taigi, vienalaikis SA ir SNP taikymas sumažina sausros streso daromą žalą dėl sustiprintos fotosintetinių pigmentų gamybos ir apsaugos, laisvųjų radikalų pašalinimo ir antioksidacinių sistemų suaktyvinimo [23].

1.3. Antioksidantai

Antioksidantai yra žmogaus sukurtos ar natūralios medžiagos, kurios gali užkirsti kelią tam tikriems ląstelių pažeidimams. Nustatyta, kad dietos, kuriose yra daug daržovių ir vaisių, kurie yra geri

antioksidantų šaltiniai, yra sveika; tačiau tyrimai neparodė, kad antioksidantai yra naudingi ligų prevencijai. Antioksidantų pavyzdžiai yra vitaminai C ir E, selenas ir karotinoidai, tokie kaip beta-karotinas, likopenas, liuteinas ir zeaksantinas.

Laisvieji radikalai gali sukelti oksidacinį stresą, kuris gali sukelti ląstelių pažeidimą. Manoma, kad oksidacinis stresas turi įtakos daugybei ligų, įskaitant vėžį, širdies ir kraujagyslių ligas, diabetą, Alzheimerio ligą, Parkinsono ligą ir akių ligas, tokias kaip katarakta ir su amžiumi susijusi geltonosios dėmės degeneracija [15, 11].

1.3.1. Liuteinas

Karotinoidai yra organiniai pigmentai, esantys augalų chloroplastuose/chromoplastuose ir fotosintetiniuose organizmuose, ir yra poliizopreniniai junginiai, sudaryti iš izopreno vienetų (aštuoni vienetai, keturiasdešimt anglies atomų).

Karotinoidiniai pigmentai vaidina svarbų vaidmenį fotosintezėje ir apsaugo chlorofilo molekules bei kitas veiklias medžiagas nuo fotodestrukcijos. Ši foto apsaugos procesą galima pasiekti karotinoidiniais junginiais, kurie susiję su chlorofilais, nes oksidoredukcijos procesais jie gali fiksuoti deguonį ir sudaryti nestabilius deguonies turinčius junginius. Karotinoidai taip pat gali sudaryti tarpinius metabolitus, kurie stimuliuoja arba slopina augalų vystymąsi, o tai svarbu jų aktyvumui.

Liuteinas yra vienas iš vertingiausių antioksidantų: jo antioksidacinis aktyvumas yra didesnis už tokoferolio, askorbo rūgšties, karotino, likopeno. Liuteinas turi tą patį chromoforą ir tą patį spektrą kaip ir jo pagrindinis karotinoidas β -karotinas. Liuteinas skiriasi nuo zeaksantino tik tuo, kad yra vienas iš galinių konjuguotų dvigubų ryšių, tačiau chromatografinis šių junginių atskyrimas, nors ir sudėtingas, apsaugo oksidacijos fotosintezės aparatą. Organiniuose tirpaluose liuteinas yra pavienio deguonies gaudyklė - peroksilo radikalų, atsirandančių oksiduojant lipidus, inhibitorius [11].

Liuteinas ir jo stereoizomeras zeaksantinas yra ksantofiliniai karotinoidai, jų gausu kiaušinio tryniuose ir žalumynų daržovėse, tokiose kaip špinatai ir lapiniai kopūstai. Nors šių karotinoidų struktūra panaši į α - ir β -karotino, jie neturi provitamino A aktyvumo.

Šių dviejų karotinoidų absorbcijai turi įtakos tie patys veiksniai, kurie veikia maisto riebalus. Liuteinas ir zeaksantinas, palyginti su kitais dietiniais karotinoidais, yra pagrindiniai. Jie yra vieninteliai karotinoidai, esantys tinklainės lęšiuje ir geltonojoje dėmėje, o tai rodo, kad šie junginiai gali atlikti apsauginį vaidmenį dviejuose gyvybiškai svarbiuose akių audiniuose.

Nors liuteinas nėra būtina maistinė medžiaga žmogaus sveikatai, jis pasižymi biologiniu aktyvumu, sunkių akių ligų prevencijos ir panaikinimo tyrimams. Daugybė epidemiologinių tyrimų teigia, kad didelis ksantofilų suvartojimas su maistu yra stipriai susijęs su sumažėjusia tinklainės degeneracinių ligų, ypač AMD (su amžiumi susijusi geltonosios dėmės degeneracija) ir kataraktos, rizika. Keli tyrimai taip pat parodė galimą liuteino indėlį į koronarinės širdies ligos ir tam tikrų vėžio rūšių prevenciją.

Liuteinas yra deguonimi prisotintas karotinoidas, susidedantis iš 40 anglies junginių su devyniais konjuguotais dvigubais ryšiais polieno grandinėje. Jų struktūroms būdinga tai, kad ant molekulės galinių žiedų, ant pagrindinės $C_{40}H_{56}$ karotino struktūros, yra dvi hidroksilo grupės, todėl jos vadinamos ksantofilais. Manoma, kad hidroksilo grupės suteikia unikalią ksantofilų biologinę funkciją. Liuteinas, palyginti su angliavandenilių karotinoidais, yra labiau hidrofiliškas ir poliškas

kraujyje bei audiniuose. Hidrofilinės savybės leidžia efektyviau reaguoti su vandens fazėje susidarančiu deguonimi nei nepoliniai karotinoidai.

Be to, santykinai didesnis poliškumas lemia skiriamąsias charakteristikas liuteino metabolizmo metu. Jis turi absorbcijos juostą nuo mėlynos iki violetinės spalvų spektro, todėl yra idealus mėlynos šviesos filtras. Liuteinas apytiksliai statmenai orientuotas į membranos plokštumą. Jis apima ląstelių membranas su lipofiline angliavandenilių grandine lipidų dvisluoksnyje, o hidrofilinės hidroksilo grupės skatina membranos išplitimą. Ši padėtis optimizuoja kontaktą su labai oksiduojamais ląstelių membranos lipidais, taip pat padidina membranos stabilumą.

Skirtingai nuo kai kurių karotinoidų, tokių kaip α - ir β -karotinas, liuteiną negalima atskirti ties 15–15' ryšiu specifiniu skilimo fermentu, kad būtų sudarytas vitamino A aldehidas.

Ksantofilai, liuteinas ir zeaksantinas, pasižymi specifiniais pasiskirstymo būdais žmogaus audiniuose, ypač geltonojoje dėmėje ir lęšiuje. Manoma, kad šių ksantofilų buvimas suteikia unikalią gyvybiškai svarbių akių audinių funkciją. Atliekama vis daugiau epidemiologinių ir klinikinių tyrimų, tačiau ne visi parodė, kad didesnis liuteino kiekis maiste, susijęs su mažesne akių ligų rizika. Laboratoriniai duomenys taip pat rodo svarbų karotinoidų vaidmenį apsaugant nervinę tinklainę nuo fotooksidacinių pažeidimų ir įprastą regėjimo negalią sukeliančius sutrikimus, absorbuojant mėlyną šviesą ir gesinant ROS (reaktyviosios deguonies rūšys) per galingą antioksidacinį aktyvumą. Literatūroje randama tyrimų, aprašančių, kad liuteinas ir zeaksantinas gali padėti atitolinti tinklainės ir lęšiuo ligas, atsirandančias dėl amžiaus [12].

1.3.2. Antioksidaciniai fermentai

Reaktyviosios deguonies rūšys (ROS) natūraliai susidaro daugelio medžiagų apykaitos procesų metu, todėl ląstelės sukūrė įvairius mechanizmus, kad sumažintų žalingas ROS pasekmes. Norėdamos apsaugoti nuo ROS, ląstelės sukūrė antioksidacinę apsaugą, apimančią fermentinius ir neenziminius mechanizmus. ROS ir antioksidantų gynyba turi būti visiškai subalansuota, kad būtų išvengta pusiausvyros tarp ROS susidarymo ir išvalymo. Fermentai, dalyvaujantys ROS eliminacijoje, yra superoksido dismutazės (SOD), katalazė ir glutationo peroksidazė.

Be fermentinės antioksidantų sistemos, yra neenziminių antioksidantų arba laisvųjų radikalų šalintojų, kurie tiesiogiai pašalina ROS dėl jų elektronų donorystės galimybių ir taip neutralizuoja galimą ROS toksiškumą. Geriausiai žinomi neenziminiai antioksidantai yra vitaminas E (α -tokoferolis), vitaminas C (askorbatas), glutationas (GSH), β -karotinas ir pastaruoju metu melatoninas [25].

Antioksidaciniai fermentai yra baltymų grupė, atsakinga už ROS transformaciją į stabilesnę ir mažiau reaktyvią molekulinę struktūrą. Jų vystymasis ankstyvosiose protocelėse buvo kritinis organizmų evoliucijos žingsnis. Filogenetiškai konservuoti antioksidaciniai fermentai sudaro pirmąją gynybos nuo ROS liniją, jie plačiai paplitę gyvuose organizmuose, pasižyminčiuose skirtingoms ląstelėms ir audiniams būdingomis izoformomis, ir lokalizuoti skirtingose ląstelių vietose. Antioksidaciniai fermentai daugiausia katalizuoja tris skirtingus reakcijos mechanizmus: dismutaciją, peroksidavimo reakcijas ir tiolio redukciją [26].

1.3.2.1. Superoksido dismutazės

Skilimo reakcijos pasiekiamos superoksido dismutazėmis (SOD) (EC 1.15.1.1), o katalizinė reakcija susideda iš labai reaktyvaus superoksido jono transformavimo į vandenilio peroksidą, kuriame nėra

nesuporuotų elektronų, bet tai vis tiek labai reaktyvi molekulė. Žmogaus ląstelėse buvo nustatytos trys skirtingos šio fermento izoformos: vario-cinko superoksido dismutazė, mangano superoksido dismutazė, tarpląstelinė superoksido dismutazė [26, 27].

1.3.2.2. Katalazė

Katalazė (EC 1.11.1.6) yra homotetramerinis fermentas, kurio molekulinė masė yra 240 kDa; jo gynybos mechanizmai susidaro iš H_2O_2 skaidymo į vandenį ir deguonį. Katalazė taip pat turi įtakos fenolių, skruzdžių rūgšties, metanolio ir etanolio detoksikacijai. Daugiausia ji yra lokalizuota peroksisomose ir, tam tikru mastu, citozolinėje frakcijoje. Aminotiazolas slopina katalazę *in vivo*, trukdydamas histidino prisijungimui prie hemo prostetinės grupės. Žinduolių ląstelėse katalazė taip pat gali pasiekti peroksidacijos reakciją. Acatalazemija yra reta įgimta būklė, kai eritrocituose ir kituose audiniuose trūksta katalazės. Katalazė yra svarbi toleruojant ląstelių adaptacinį atsaką į didelę deguonies įtampą [26, 28].

1.3.2.3. Glutationo peroksidazės

Glutationo peroksidazės (GPxs) (EC 1.11.1.19) yra fermentai, kurie katalizuoja hidroperoksidų (-ROOH) redukciją į alkoholines grupes ir vandenį, naudojant kosubstratą redukuotą glutationą (GSH). GPx fermentai yra suskirstyti į dvi grupes, atsižvelgiant į seleno buvimą jo aktyviose vietose. Tie, kurių sudėtyje yra seleno (nuo seleno priklausomas GPx), taip pat gali suskaidyti H_2O_2 iki vandens ir deguonies. Oksiduotą glutationą (GSSG) fermentu GSH reduktaze (GR) galima redukuoti atgal į GSH, naudojant reduktorių substratą NADPH. Gebėjimas perdirbti GSH padeda užkirsti kelią ląstelių tiolių išsekimui ir turi daug reikšmės kaip antioksidacinis mechanizmas aerobinėms ląstelėms. Žinduolių ląstelėse yra genetiškai skirtingų ląstelių GPx formų. GPx šeimą sudaro mažiausiai aštuoni izofermentai (GPx1–GPx8). GPx1 yra labiausiai paplitęs ir gausiausias izofermentas, esantis tarpląstelinėje frakcijoje. GPx2 yra virškinimo trakto fermentas. GPx3 cirkuliuojamas kraujyje, gaminamas ir išskiriamas iš inkstų. GPx buvo susiję su skirtingomis kardiometabolinėmis ligomis, o hipertenzija sergančių asmenų cirkuliuojančiose mononukleatinėse ląstelėse jo aktyvumas yra sumažėjęs. Mažas raudonųjų ląstelių glutathiono peroksidazės 1 aktyvumas yra nepriklausomai susijęs su padidėjusia širdies ir kraujagyslių ligų rizika.

SOD, katalazės ir GPx fermentų koordinavimas ir sinchronizuota veikla užtikrina antioksidacinę strategiją, kurios pagrindinė funkcija yra išvengti labai reaktyvaus hidroksilo radikalo ir peroksinitrito (ONOO-) susidarymo, todėl išvengiama ląstelių pažeidimo [26, 29].

1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Vaistinė medetka (*Calendula officinalis* L.) ir dygminas (*Carthamus tinctorius* L.) žinomi dėl medicininės svarbos, turi įvairių fitochemikalų, įskaitant angliavandenius, aminorūgštis, lipidus, riebalų rūgštis, karotinoidus, flavonoidus ir kitas sudedamąsias dalis, rodančių svarbų biologinį aktyvumą. Augaluose esantys antioksidaciniai fermentai (katalazė, superoksido dismutazė) sumažina žalingas ROS pasekmes ir apsaugo ląsteles. Šių augalų audinių kultūros yra svarbios mokslo tyrimams ir komerciniams tikslams, nes ląsteles galima lengvai prižiūrėti, valdyti jų antrinių metabolitų susidarymą, reguliuoti gamybą, sumažinti sąnaudas ir pagerinti produktyvumą. Antrinių metabolitų gamybą *in vitro* kultūrose galima iš dalies pakeisti papildant fitohormonais, o tai yra šaltinis farmakologinių junginių gamybai. Medetkos žieduose esantis liuteinas yra svarbus fotosintezės procesuose ir apsaugo molekules nuo fotodestrukcijos. Jis gali padėti atitolinti tinklainės ir lęšiuko ligas, atsirandančias dėl amžiaus.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Reagentai

Natrio fosfatinis buferis 0,2 M (pH=6,6); 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$; 10 % Trichloracto rūgštis; 0,1 % $FeCl_3$; 300 mM acetato buferis (pH=3,6); 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl, $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/l); FRAP reagentas ruošiamas su 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 2,5 ml $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/l); etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje; ledinė acto rūgštis; ninhidrinai; H_3PO_4 ; prolinas; 80 % metanolis; 2 mM natrio tetrachlorpaladatas; konc. HCl; acetonas (70 %); albumino tirpalas; 28 % HCl; etilo acetatas; aliuminio chloridas; acto rūgštis; metanolis; 0,066 M K/Na fosfatinis buferis; 1 mM ditiotritolis (DTT); 0,5 mM fenilmetilsufonilfluoridas (PMSF); DMSO; polivinilpirolidonas; 40 mM Tris-HCl buferis; 10 mM L-metioninas; 54 μ M nitromėlynasis tetrazolis; 0,025% Tritonas X- 100; 3 μ M riboflavinai; 0,05 M K/Na fosfatinis buferis; 0,1 M vandenilio peroksidas; 0,1 M fosfatinis buferis (pH=7); 0,5 mM askorbo rūgštis; 0,1 mM EDTA; 20 % trichloracto rūgštis; 0,5 % tiobarbitūrinė rūgštis.

2.2. Aparatūra

- Horizontalaus srauto laminaras;
- spektrofotometras;
- pH-metras;
- centrifūga;
- centrifūga Epindorfo mėgintuvėliams;
- termostatas;
- termostatuojamas kratytuvas;
- svarstyklės;
- Petri lėkštelės;
- keičiamo tūrio automatinės pipetės;
- mėgintuvėliai.

2.3. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas

Augalų ląstelių kultūros kultivavimui būtina maitinamoji terpė ir išorinės aplinkos veiksniai (šviesa, temperatūra). Kultivuojant augalų ląsteles *in vitro* maitinamoji terpė sudaroma iš šių komponentų: makroelementai, mikroelementai, geležies šaltinis, organiniai priedai, anglies šaltinis, augimo hormonai.

MS (*Murashige & Skoog*) terpė - tai viena iš plačiausiai naudojamų audinių kultūroms skirtų maitinamųjų terpių. Svarbus šios terpės bruožas yra aukštos nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracijos. Į jos sudėtį įeina mioinozitolis, nikotininė rūgštis, piridoksino hidrochloridas (B6) ir tiamino hidrochloridas (B1).

2.4. Augalų ląstelių kultivavimo sąlygos

Eksperimento metu optimali kultivavimo temperatūra yra 20 – 22 °C, fotoperiodas – 24 valandos, eksperimento metu naudojama MS terpė, kurios pH = 5,7 – 5,8. Eksplantai reguliariai kas 3 savaites perkeliama į šviežią maitinamąją terpę.

2.1 lentelė. Maitinamosios *Murashige & Skoog (MS)* terpės sudėtis (b – 50 ml tirpalo pilame į terpę; c – 5 ml tirpalo į terpę)

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

2.2 lentelė. MS terpės reagentų kiekis, paimamas iš pradinių tirpalų

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

Išmatuotas terpės pH naudojant pH-metrą. Terpės pH turi būti 5,7. Terpę, kuri naudojama kaliaus auginimui (kaliaus auginimo terpė) papildoma augimo reguliatoriais: 1 mg/l 2,4–dichlorfenoksiacto rūgšties (2,4-D). Maitinamoji terpė sterilinama autoklave 120 °C, esant 0,75 – 1 atm. slėgiui, 15 min.

2.5. Augimo reguliatorių paruošimas

Pradinio tiriamosios medžiagos tirpalo (0,1 mg/ml) paruošimas. Pasverta 10 mg tiriamojo junginio ir suberta į matavimo kolbą. Įpilta 2 – 5 ml tirpiklio (distiliuoto vandens), kad ištirptų milteliai. Visiškai ištirpdžius tiriamą junginį, buvo įpiltas dvigubas kiekis distiliuoto vandens. Tirpalą išmaišius, pripilta distiliuoto vandens iki reikiamo lygio, t. y. iki 100 ml.

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

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

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

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

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

Šis tūris praskiedžiamas iki 100 ml, kad gauti reikiama koncentracija (mg/l):

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

2.3 lentelė. Auksinai

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

2.4 lentelė. Citokininai

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

^a sintetiniai analogai

^b natūralūs citokininai

^c pakeistos fenilurėjos tipo citokininai

2.5 lentelė. Auksinų molekulinės masės ir tirpalų paruošimas

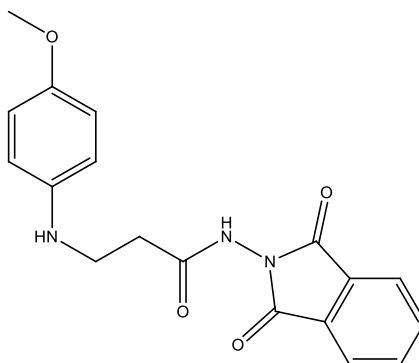
Augimo reguliatorius	Molekulinė masė	Tirpalo paruošimas
2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D)	221	-
3-indolilacto rūgštis (IAR)	197,2	Vanduo
1-naftilacto rūgštis	186,2	1N NaOH ir praskiedžiama vandeniu
3-indolilbutano rūgštis	241,3	Vanduo
2,4,5-trichlorfenoksiacto rūgštis	255,5	Etanolis

2.6 lentelė. Citokininų molekulinės masės ir tirpalų paruošimas

Augimo reguliatorius	Molekulinė masė	Tirpalo paruošimas
6-benzilaminopurinas	225,3	1 N NaOH ir vanduo
Kinetinas	215,2	1 N NaOH ir vanduo
Zeatinas	219,2	1 N NaOH ir vanduo

2.7 lentelė. Giberelinų ir kitų augimo reguliatorių molekulinės masės ir tirpalų paruošimas.

Augimo reguliatorius	Molekulinė masė	Tirpalo paruošimas
Giberelino rūgštis	346,4	Etanolis
Žasmino rūgštis	210,3	Etanolis



2.1 pav. N-(1,3-dioksoizoidolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido formulė

2.6. Augalų sėklų sterilinimas

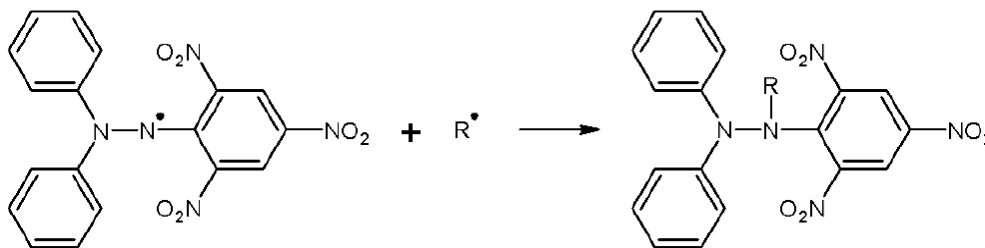
Medetkos sėklos sterilinamos 70 % C₂H₅OH – 1 min, 1,5 % NaOCl – 10 min, 3 kartus plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu. Sėklų sodinimas į *Petri* lėkštes ir į mėgintuvėlius vykdomas sąlygomis laminare. Laminaras sterilinamas ultravioletiniais spinduliais bei etanolium (70 %).

Dažinio dygmino sėklos sterilinamos vandeniu su *Tween* detergentu – 10min, 70 % C₂H₅OH – 3 min, 1 % AgNO₃ 10 min, 0,1 % HgCl₂ – 5 min, 3 kartus plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu. Sėklų sodinimas į *Petri* lėkštes ir į mėgintuvėlius vykdomas sąlygomis laminare. Laminaras sterilinamas ultravioletiniais spinduliais bei etanolium (70 %).

2.7. Antioksidaciniai tyrimų metodai

2.7.1. Vaistinių augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

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



2.2 pav. Radikalo DPPH redukcijos reakcija su antioksidantu

Fenoliniams junginiams būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu (2.2 pav.) antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip išaktyvina laisvuosius radikalus ir jie tampa stabiliai DHHP – H tipo junginiais.

1 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilama 10 ml metanoliu ir homogenizuojama 10 min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps./min 10 minučių ir supernatantas surenkamas.

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

Palyginamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml metanolio, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

Etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje.

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

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.7.2. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

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

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C, 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams.

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

Mėginiai 100 µl yra sumaišomi su 3 ml FRAP reagentu. Reakcijos mišinys matuojamas esant 593 nm spektrofotometriškai pradžioje ir po 6 minučių. Kalibravimo kreivė ruošama $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (5, 10, 15, 20; 25 µmol/l). Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibravimo kreivę µmol/l Fe(II) /l. Į $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ taip pat įpilama FRAP reagento.

2.7.3. Redukcinių savybių įvertinimas augaluose

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas ir naudojamas tyrimams.

Į 0,5 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginius, supilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Centrifuguojama 10 min.

Nucentrifuguoto tirpalo (1,25 ml) sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % FeCl_3 . Mėginiai išmatuojami 700 nm bangos ilgyje. Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes.

2.7.4. Vaistinių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

ABTS metodas paremtas radikalo anijono slopinimu. ABTS yra gaunamas pridedant į jį kalio persulfato tirpalą. Radikalo anijonas turi mėlynai-žalią spalvą ir šviesos sugertis matuojama 734 nm bangos ilgyje. ABTS tirpalas praskiedžiamas, kad šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje būtų 0,9–1. Praskiesto ABTS reikšmė užrašoma, nes reikšmė įeina į formulę.

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C, 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams. Į 0,5 ml ekstraktą įpilama 1,7 ml fosfato buferio (20 mM) ir 0,3 ml praskiesto ABTS tirpalo. Nustatoma ABTS šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje. Tuščias bandinys bus fosfato buferis (20 mM).

$$\% \text{ slopinimas} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100; \quad (2.3)$$

A_B – praskiesto ABTS tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo augalų ekstrakto šviesos sugerties dydis.

2.8. Pirminiai ir antriniai metabolitai

2.8.1. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimas augaluose

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas vaistinių augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru esant bangos ilgiams:

- chlorofilui *a* (662 nm);
- chlorofilui *b* (644 nm);
- karotinoidams (441 nm).

Chlorofilo *a* ir *b* koncentracijos nustatymui 0,1–0,2 g augalų lapų susmulkinama grūstuvėje. Įpilama 20 ml 96 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, po to viskas susmulkinama iki vientisos masės ir filtruojama. Nufiltruoto ekstrakto tūris išmatuojamas cilindru. Vėliau ekstraktai praskiedžiami etanoliu tol, kol optinis tankis praskiestų tirpalų būtų nuo 0,1 iki 0,8. Filtratas supilamas į matavimo kiuvetę ir matavimai

atliekami spektrofotometru esant 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidai) bangų ilgiams.

Pigmentų koncentracija apskaičiuojama pagal formules:

$$\text{chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg/l): } C_a = 9,784 D_{662} - 0,99 D_{644}; \quad (2.4.1)$$

$$\text{chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg/l): } C_b = 21,426 D_{644} - 4,65 D_{662}; \quad (2.4.2)$$

$$C_a + C_b = 5,134 D_{662} + 20,436 D_{644}; \quad (2.4.3)$$

$$\text{karotinoidų koncentracija (mg/l) } C_{\text{karotinoidai}} = 4,695 D_{441} - 0,268 (C_a + C_b); \quad (2.4.4)$$

pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojama:

$$X = C V V_2 \cdot 100 / n V_1 \cdot 1000; \quad (2.4.5)$$

C – pigmentų koncentracija mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris;

V_1 – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V_2 – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g.

2.8.2. *L*-Prolino įvertinimas

100 mg vaistinės augalinės žaliavos susmulkinama ir užpilama 4 ml distiliuotu vandeniu stiklinėje. Stiklinė su augaline žaliava 3 kartus užverdama iki virimo ir atšaldoma. Ekstraktas filtruojamas. Gautas ekstraktas praskiedžiamas iki 6-7 ml ir toliau naudojamas tyrimams.

Mėgintuvėliai su 1 ml ekstraktu, 1 ml ledine acto rūgštimi, 1 ml ninhidrininiu reagentu (1,25 g ninhidrinas, 20 ml H_3PO_4 , 30 ml ledinė acto rūgštis) verdami 1 val verdančioje vandens vonelėje. Į kontrolinį mėginį vietoj ekstrakto įpilamas 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje.

Prolino kiekis apskaičiuojamas naudojantis kalibravimo kreive pagal formulę:

$$C_X = \frac{E \cdot V_{\text{bendr.}}}{V_{\text{paimta}} \cdot m}; \quad (2.5)$$

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

E – tirpalo šviesos sugertis;

$V_{\text{bendr.}}$ – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.

2.8.3. Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino- Kiokalto metodu

Sausa, susmulkinta augalinė medžiaga yra įpilama į 10 ml acetono (70 %) tirpalą ir maišoma kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Vėliau mėgintuvėlis centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min 4 °C. Supernatantas surenkamas ir laikomas ant ledo.

2.8.3.1. Kalibravimo kreivės parengimas

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

2.8.3.2. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas

Paimamas atitinkamas kiekis paruošto ekstrakto ir praskiedžiama vandeniu iki 500 µl. Pridedama į jį 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir įpilama 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir matuojama absorbcija tirpalo 725 nm bangos ilgyje po 40 min laikyto tamsoje. Apskaičiuojamas bendras fenolinių junginių kiekis pagal formulę:

$$x = aV \cdot 100 / (nV_1); \quad (2.6)$$

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg.

2.8.4. Liuteino nustatymas augaluose

Į augalinę žaliavą (100 mg) įpilama 20 ml acetono ir maišoma 3 val. 250 rpm. Suspensija yra paliekama stovėti 5 min ir centrifuguojama 10 min 9000 aps/min. Supernatantas yra surenkamas, nuosėdos maišomos 1 valandą su acetonu (10 ml). Nuosėdos su acetonu yra centrifuguojamos 15 min 9000 aps./min ir šviesos sugertis išmatuojama pagal acetoną 446 nm bangos ilgyje. Liuteino koncentracija apskaičiuojamas pagal formulę:

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

X – liuteino koncentracija, mg/l;

A₄₄₆ – absorbcija 446 nm bangos ilgyje;

b – bangos ilgis;

V – ekstrakto tūris, ml;

M – augalinės žaliavos kiekis, kg.

2.8.5. Flavonoidų nustatymas augaluose

0,5 g susmulkintos augalinės žaliavos maišoma su 5 ml 80 % metanoliu parą 150 rpm. Homogenatas nucentrifuguojamas 9000 rpm 10 min ir supernatantas naudojamas.

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

Flavonoidų koncentracija mg/g pagal kvercetiną apskaičiuojama pagal formulę:

$$C = \frac{C_1 \cdot V}{g}; \quad (2.8)$$

C_1 – kvercetino koncentracija, mg/ml, pagal kalibravimo kreivę;

V – ekstrakto pradinis tūris, ml;

g – augalinė masė, g.

2.8.5.1. Kvercetino kalibravimo kreivė

Kvercetinas (1 mg/ml) ištirpinamas metanolyje.

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

1. į pirmą mėgintuvėlį įpilama 0,1 ml kvercetino ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;
2. į antra mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml kvercetino ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;
3. į trečią mėgintuvėlį įpilama 0,3 ml kvercetino ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;
4. į ketvirtą mėgintuvėlį įpilama 0,4 ml kvercetino ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu;
5. į penktą mėgintuvėlį įpilama 0,5 ml kvercetino ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido bei praskiedžiama iki 10 ml su metanoliu.

Išmatuojama šviesos sugertis 415 nm bangos ilgyje. Tuščias bandinys – metanolis. Braižoma kvercetino kalibravimo kreivė.

2.9. Fermentai ir antioksidaciniai fermentai

2.9.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Paruošiama kalibravimo kreivė pagal albuminą. Albumino tirpalas ruošiamas taip: 25 mg albumino ištirpinama 25 ml vandens. Iš pradinio tirpalo imami žinomo tūrio mėginiai ir iki 25 ml skiedžiami distiliuotu vandeniu.

2.8 lentelė. Kalibravimo kreivės pagal albuminą sudarymas

Eil. Nr.	Albumino pradinio tirpalo tūris	Iki 25 ml skiesto tirpalo koncentracija, mg/ml
1	0,2	0,02
2	0,4	0,04
3	0,6	0,06
4	0,8	0,08
5	1,0	0,1
6	1,2	0,12
7	1,4	0,14
8	1,6	0,16
9	1,8	0,18

Kalibravimo kreivei į pirmą mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml distiliuoto vandens, o į 2-6 mėgintuvėlius po 0,2 ml skiesto albumino tirpalo. Į visus mėgintuvėlius įpilama 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišomi ir matuojami spektrofotometru, esant bangos ilgiui 595 nm. Pirmasis mėgintuvėlis bus nulinis. Braižoma kalibravimo kreivė.

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinama ir tirpių baltymų ekstrakcija vyksta 0,066 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH=7,4) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditionitolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono. Mėginys centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir supernatantas dar kartą centrifuguojamas Eppendorf mėgintuvėliuose.

Baltymų nustatymui paimama 200 µl mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento.

Reakcijos mišinys 2 ml tūrio turi 40 µl fermentinio preparato, 400 µl 40 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200 µl 10 mM *L*-metionino; 200 µl 54 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,025% Tritono X-100 ir 20 µl 3 µM riboflavino ir 620 µl distiliuoto vandens. Paruošiamas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato.

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

Fermento aktyvumas apskaičiuojamas:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \cdot m}, \quad (2.9)$$

A – SOD aktyvumas, vnt/mg;

E_K – šviesos sugertis kontrolinio bandinio;

E_T – šviesos sugertis tiriamojo bandinio;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordo metodą).

2.9.2. Katalazės aktyvumo įvertinimas

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

Reakcijos mišinys 4 ml tūrio turi 100 µl fermentinio preparato, 3900 µl 0,05 M K/Na fosfatinio buferio. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilama 0,1 M 0,2 ml vandenilio peroksido. Šviesos sugerties matavimo dinamika registruojama 3 minutes 240 nm bangos ilgyje. Matavimo rodmenys nuimami kas 2 sekundes.

Fermento aktyvumas apskaičiuojamas:

$$A = \frac{1000 \cdot \Delta \bar{E} \cdot V}{k \cdot m}, \quad (2.10)$$

A – sunaudoto vandenilio peroksido kiekis per 1 minutę/1 mg baltyminio preparato;

$\Delta\bar{E}$ – vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;

V – bendras mišinio tūris, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 32,57;

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

2.9.3. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

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

Reakcijos mišinys (6 ml) turi 50 mM (3ml 0,1M) fosfatinio buferio (pH=7), 0,5 mM (0,6ml) askorbo rūgšties, 0,1 mM (0,06ml) EDTA, 0,1 mM (0,06ml) vandenilio peroksido ir 0,2 ml fermentinio preparato. Reakcija prasideda pridėjus vandenilio peroksido ir matuojama šviesos sugertis 290 nm bangos ilgyje 3 min.

Askorbatperoksidazės aktyvumas nustatomas pagal formulę:

$$A = \frac{\Delta\bar{E}_{\min} \cdot \left(\frac{V}{1000} \cdot V_{Buf.} \cdot V_{peroks.}\right)}{k \cdot m}; \quad (2.11)$$

A – fermento aktyvumas, mmol/mg;

$\Delta\bar{E}_{\min}$ – vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;

V – pavyzdžio tūris, μ l;

$V_{Buf.}$ – buferio tūris, ml;

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

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

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

2.9.4. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinama ir vykdoma ekstrakcija ekstrakcijos buferyje (pH=7,8) 4 ml tūryje, turinčiame 0,05 M Tris-HCl; pH=7,8; 1 mM EDTA; 0,5 % Tritono X-100. Mėginys maišomas kratytuve 10 min ir 25 °C temperatūroje. Mėginys centrifuguojamas 9000 aps./min 10min ir supernatantas (800 μ l) dar kartą centrifuguojamas Eppendorf mėgintuvėlyje.

Baltymų nustatymui paimama 20 μ l mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošiama baltymų kiekio kalibravimo kreivė pagal albuminą.

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

Fermento prolindehidrogenazės aktyvumas apskaičiuojamas:

$$A = \frac{1000 \cdot \Delta\bar{E} \cdot V}{k \cdot m}; \quad (2.12)$$

A – prolindehidrogenazės aktyvumas μ mol NAD/mg baltymo · min;

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

V – bendras mišinio tūris, ml;
 k – molinės ekstincijos koeficientas $6,22 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
 m – baltymo masė preparato tūryje, mg.

2.9.5. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

Augalinė žaliava (100 mg) homogenizuojama su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi ir tirpalas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min 4 °C. Supernatantas (0,3 ml) sumaišomas su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) ir inkubuojamas 95 °C temperatūroje 30 min, atšaldomas ir centrifuguojamas 15 min 9000 aps/min. Šviesos sugertis išmatuojama 532, 600 nm bangos ilgiuose.

MDA koncentracija apskaičiuojama:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \cdot V_e \cdot 2}{k \cdot m_s \cdot V_a}, \quad (2.13)$$

C_x – MDA kiekis, $\mu\text{mol/g}$;
 E – tirpalo šviesos sugertis;
 V_e – ekstrakto tūris, ml;
 V_a – ekstrakto tūris analizei, ml;
 k – molinės ekstincijos koeficientas $156 \text{ Mm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
 m_s – bandinio masė ekstrakcijai, g.

2.9.6. Vandenilio peroksido suardymas vaistinių augalų ekstraktais

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama fosfatiname buferyje (5 ml) 45 °C, 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams. Į 2 ml ekstraktą (įvairių koncentracijų) įpilama 1,2 ml 20 mM vandenilio peroksido tirpalo, paruošto fosfatiname buferyje (pH=7,4). Mišinys laikomas 30 min. Suardymas nustatomas 230 nm bangos ilgyje. Palyginimui naudojamas 40 mM vandenilio peroksido tirpalas, paruoštas fosfatiname buferyje (pH=7,4), kaip nulinis – fosfato buferis (pH=7,4). Naudojamos kvarcinės kiuvetės.

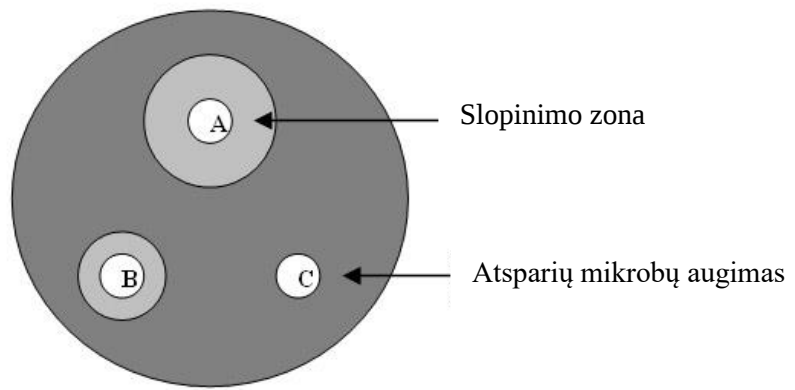
$$\% \text{ slopinimas} = [(A_B - A_A) / A_B] \cdot 100; \quad (2.14)$$

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;
 A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.10. Antibakterinis aktyvumas

2.10.1. Įvairių vaistinių augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo nustatymas agaro difuziniu metodu

Ant LB terpės Petri lėkštelėse užpilti *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ir *Escherichia coli* bakterijų suspensijos 50 μl ir uždėti popierinį diską, suvilgytą 25 μl vaistinių augalų ekstraktu. Petri lėkštelės sudėti į termostatą 37 °C. Po vienos ar dviejų parų stebėti bakterijų augimą ir vaistinių augalų ekstraktų antibakterinį poveikį.



2.3 pav. Vaistinių augalų ekstraktų antibakterinis poveikis

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Tyrimams buvo naudoti medetkų ir dygminių augalai užauginti skirtingose terpėse (3.1. lentelė). Taip pat buvo tiriamas *N*-(1,3-dioksoizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino)propanamido („39“) junginio poveikis augalų antioksidaciniam ir antibakteriniam aktyvumui bei antrinių metabolitų susidarymui.

3.1 lentelė. Tyrimams naudoti vaistiniai augalai ir auginimo terpės

Vaistinis augalas	Auginimo terpė
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	-
Medetkų kalius	BAP 2,5 mg/l; NAR 0,5 mg/l
Medetkų stiebų kalius (1)	IAR 0,1 mg/l; TDZ 0,5 mg/l
Medetkų lapų kalius	IAR 0,1 mg/l; BAP 1 mg/l
Medetkų stiebų kalius (2)	IAR 0,1 mg/l; BAP 1 mg/l
Dygminių lapų kalius (1)	BAP 1,8 mg/l; 2,4 D 0,3 mg/l; Kazeinas 0,1%
Dygminių stiebų kalius (1)	BAP 1,8 mg/l; 2,4 D 0,3 mg/l; Kazeinas 0,1%
Dygminių kalius	TDZ 0,5 mg/l; IAR 0,1 mg/l
Dygminių lapų kalius (2)	TDZ 0,5 mg/l; NAR 0,2 mg/l
Dygminių stiebų kalius (2)	TDZ 0,5 mg/l; NAR 0,2 mg/l
Medetkų šaknų kalius + "39"	TDZ 0,5 mg/l; IAR 0,1 mg/l; "39" 0,1 mg/ml
Medetkų stiebų ir lapų kalius + "39"	TDZ 0,5 mg/l; IAR 0,1 mg/l; "39" 0,1 mg/ml

3.1. Medetkos ir dygmino ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

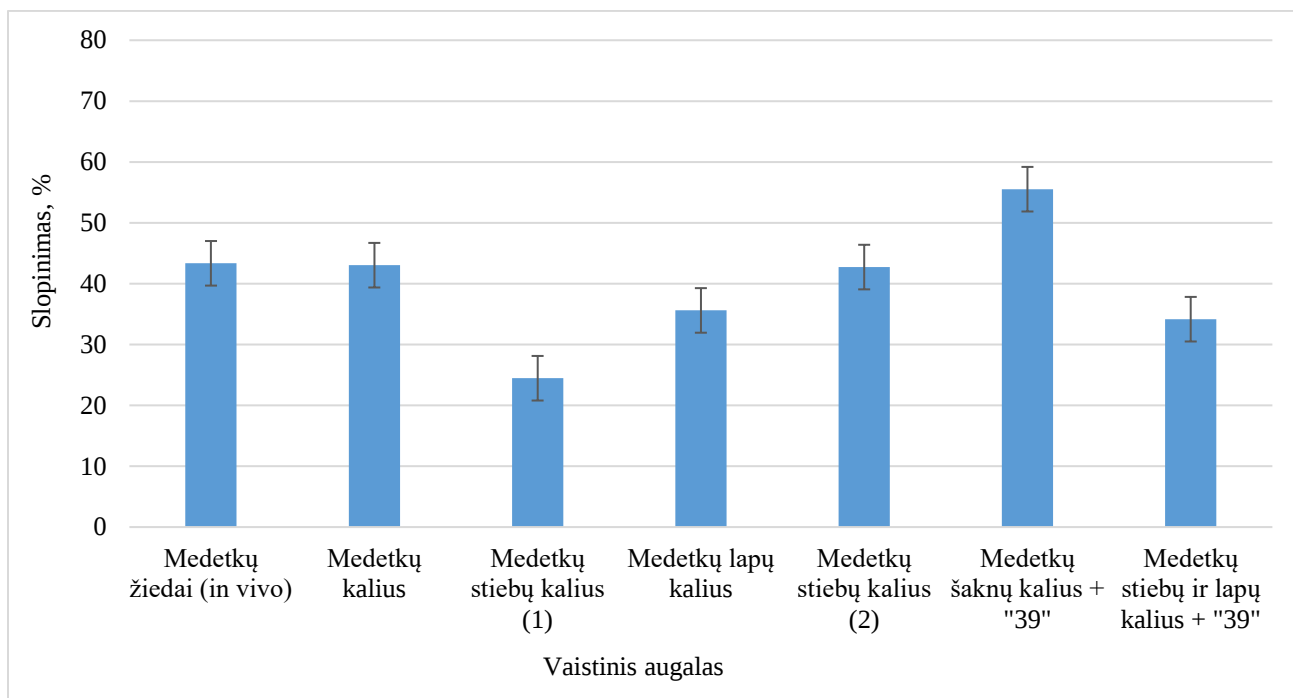
Augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai.

Paruoštų medetkos ir dygmino ekstraktų tirpalų šviesos sugertis išmatuojama 515 nm bangos ilgyje (3.2 lentelė). Gauti rezultatai toliau naudojami skaičiavimams.

3.2 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 515 nm bangos ilgyje

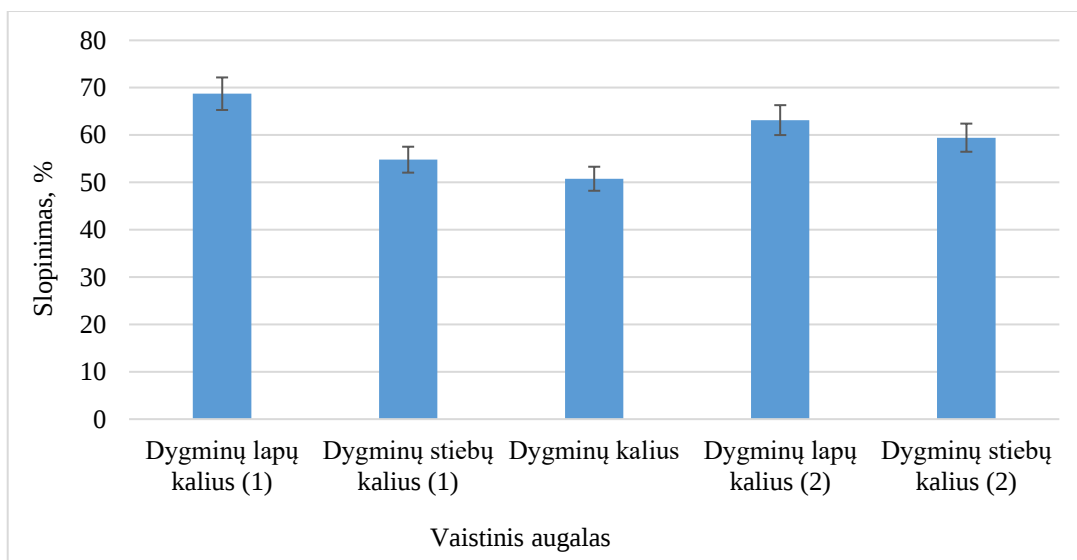
Vaistinis augalas	Šviesos sugertis 515 nm
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	0,183
Medetkų kalius	0,184
Medetkų stiebų kalius (1)	0,244
Medetkų lapų kalius	0,208
Medetkų stiebų kalius (2)	0,185
Dygminių lapų kalius (1)	0,101
Dygminių stiebų kalius (1)	0,146
Dygminių kalius	0,159
Dygminių lapų kalius (2)	0,119
Dygminių stiebų kalius (2)	0,131
Medetkų šaknų kalius + "39"	0,144
Medetkų stiebų ir lapų kalius + "39"	0,213

Ištačius gautus rezultatus į formulę (2.2) apskaičiuotas vaistinių augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas. Nustatyta kiek procentų stabilaus DPPH radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai (3.1 pav. ir 3.2 pav.).



3.1 pav. Medetkų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas

Atlikus vaistinių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimą DPPH metodu, nustatyta, kad medetkų šaknų kaliaus + „39“ ekstrakto esantys fenoliniai junginiai neutralizuoja didžiausią kiekį (55 %) stabilaus DPPH radikalo, medetkų žiedų (*in vivo*), medetkų kaliaus ir medetkų stiebų kaliaus (2) ekstraktai slopina atitinkamai 43 %, 43 % ir 42 %, o medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ ekstraktas – 34 %. Medetkų stiebų kaliaus (1) ekstraktas turi mažiausią antioksidacinį aktyvumą – 24 %.



3.2 pav. Dygminių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas

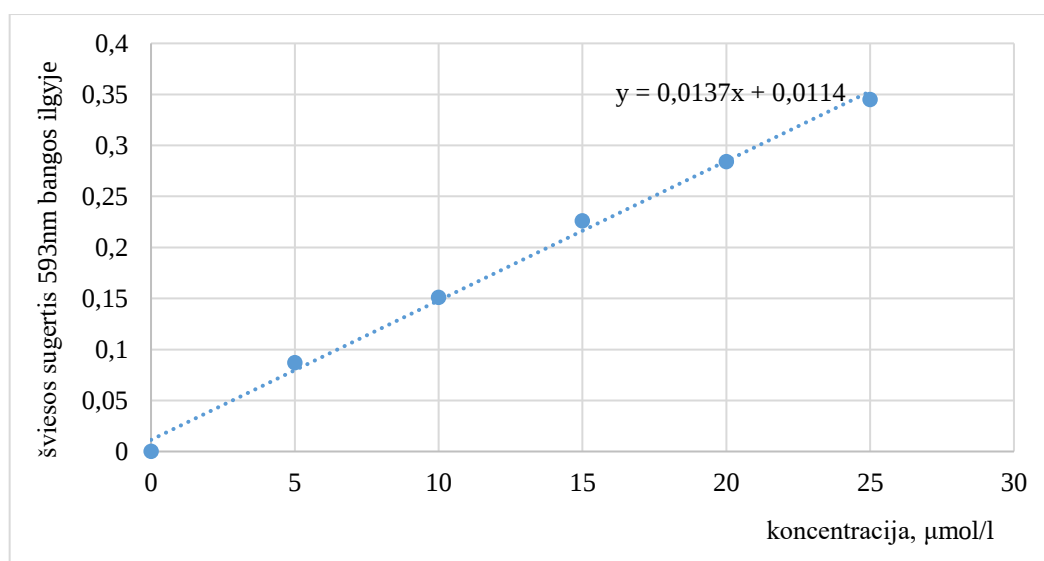
Dygminių ekstraktuose esantys fenoliniai junginiai pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei medetkoje. Dygminių lapų kaliaus (1) ekstrakto esantys fenoliniai junginiai neutralizuoja didžiausią

kiekį (69 %) stabilaus DPPH radikalo, dygminių lapų kaliaus (2) ir dygminių stiebų kaliaus (2) ekstraktai slopina 63 % ir 59 %. Mažiausią antioksidacinį aktyvumą turi dygminių stiebų kaliaus (1) ir dygminių kaliaus – 54 % ir 50 %.

3.2. Antioksidacinis aktyvumas medetkos ir dygmino augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

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

Paruošiama $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė (3.3 pav.), kuri bus naudojama tolimesniems skaičiavimams.



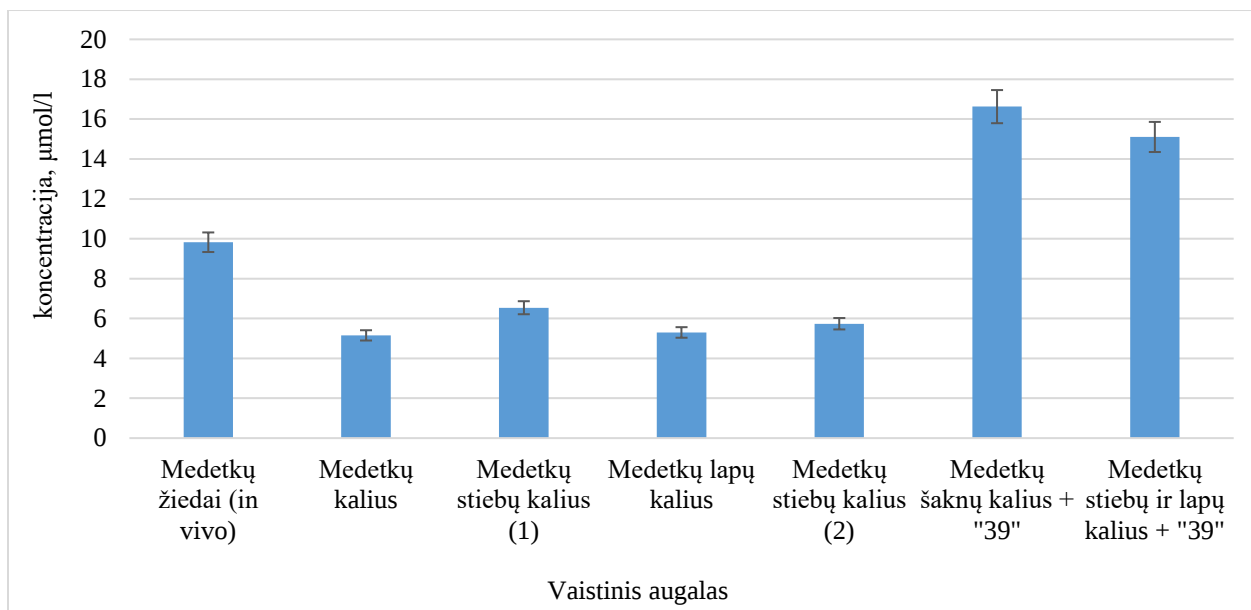
3.3 pav. $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė

Paruošti medetkos ir dygmino ekstraktų tirpalai. Išmatuota jų šviesos sugertis 593 nm bangos ilgyje pateikta 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 593 nm bangos ilgyje

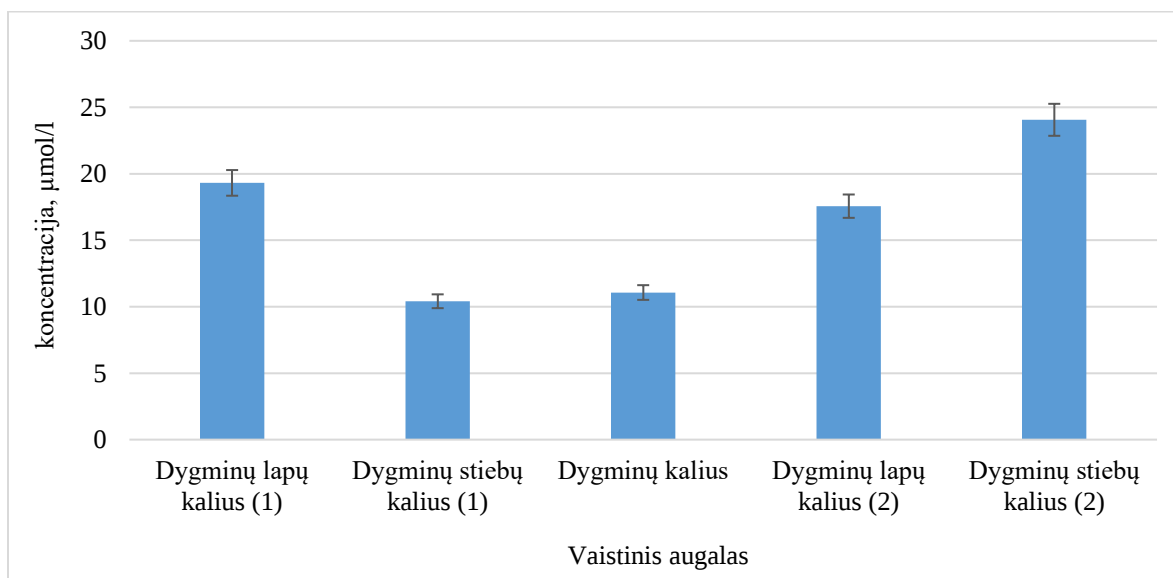
Vaistinis augalas	Šviesos sugertis 593 nm
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	0,146
Medetkų kaliaus	0,082
Medetkų stiebų kaliaus (1)	0,101
Medetkų lapų kaliaus	0,084
Medetkų stiebų kaliaus (2)	0,090
Dygminių lapų kaliaus (1)	0,276
Dygminių stiebų kaliaus (1)	0,154
Dygminių kaliaus	0,163
Dygminių lapų kaliaus (2)	0,252
Dygminių stiebų kaliaus (2)	0,341
Medetkų šaknų kaliaus + "39"	0,239
Medetkų stiebų ir lapų kaliaus + "39"	0,218

Naudojantis sudaryta $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ kalibravimo kreive ir išmatuotais duomenimis apskaičiuojamas tiriamų vaistinių augalų antioksidacinis aktyvumas (3.4 pav. ir 3.5 pav).



3.4 pav. Medetkų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas

Atlikus antioksidacinio aktyvumo tyrimą medetkos ir dygmino augalams pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną, nustatyta, kad medetkų šaknų kaliaus + „39“ (17 $\mu\text{mol/l}$), medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ (15 $\mu\text{mol/l}$) ekstraktai turi stipriausias redukuojančias savybes. Medetkų žiedai (*in vivo*), medetkų stiebų kaliaus kultūroje (1) ir medetkų stiebų kaliaus kultūroje (2) apskaičiuota ekstraktų koncentracija atitinkamai 9,8, 6,5, 5,7 $\mu\text{mol/l}$, o medetkų lapų kaliaus ir medetkų kaliaus ekstraktai turi silpniausias redukuojančias savybes tik 5,2 ir 5,1 $\mu\text{mol/l}$.

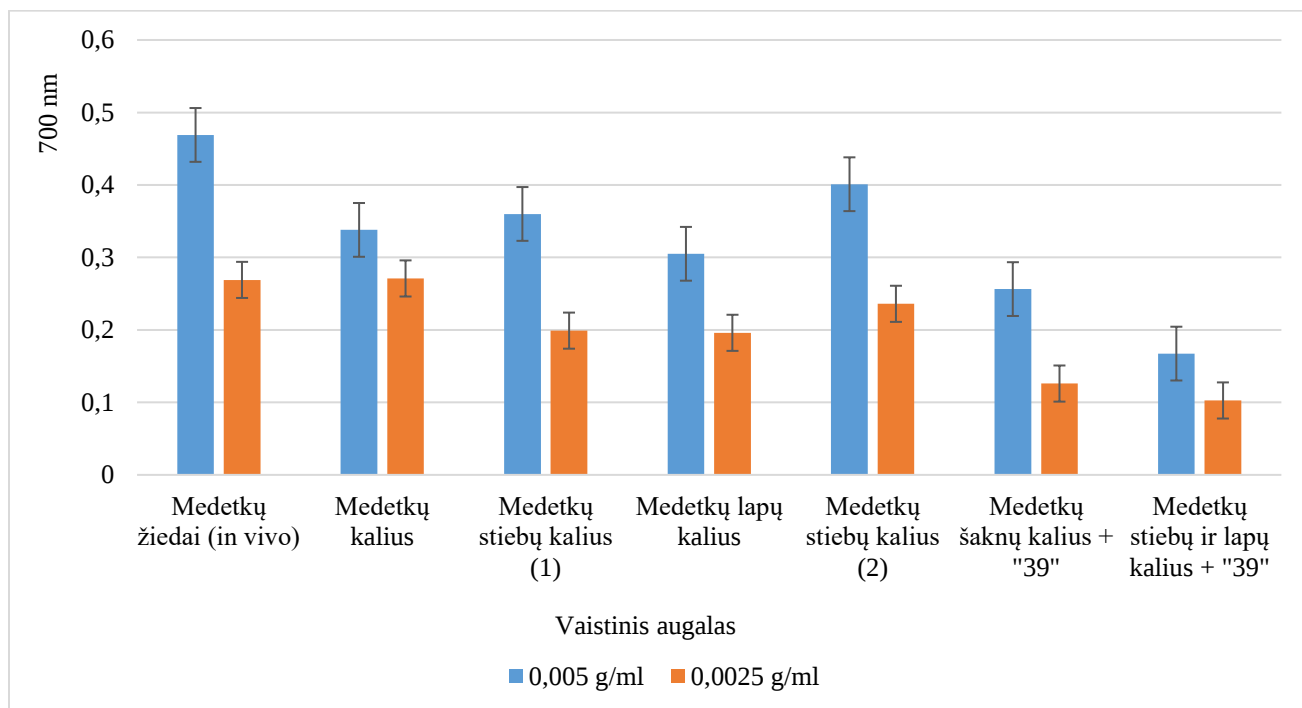


3.5 pav. Dygminių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas

Dygminių ekstraktai pasižymėjo šiek tiek stipresnėmis redukuojančiomis savybėmis nei medetkos. Dygminių stiebų kaliaus (2) ir dygminių lapų kaliaus (1) ekstraktai 24 ir 19 $\mu\text{mol/l}$, dygminių lapų kaliaus – 17,5 $\mu\text{mol/l}$. Silpniausias redukuojančias savybes parodė dygminių kaliaus ir dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktai (atitinkamai 11 ir 10,5 $\mu\text{mol/l}$).

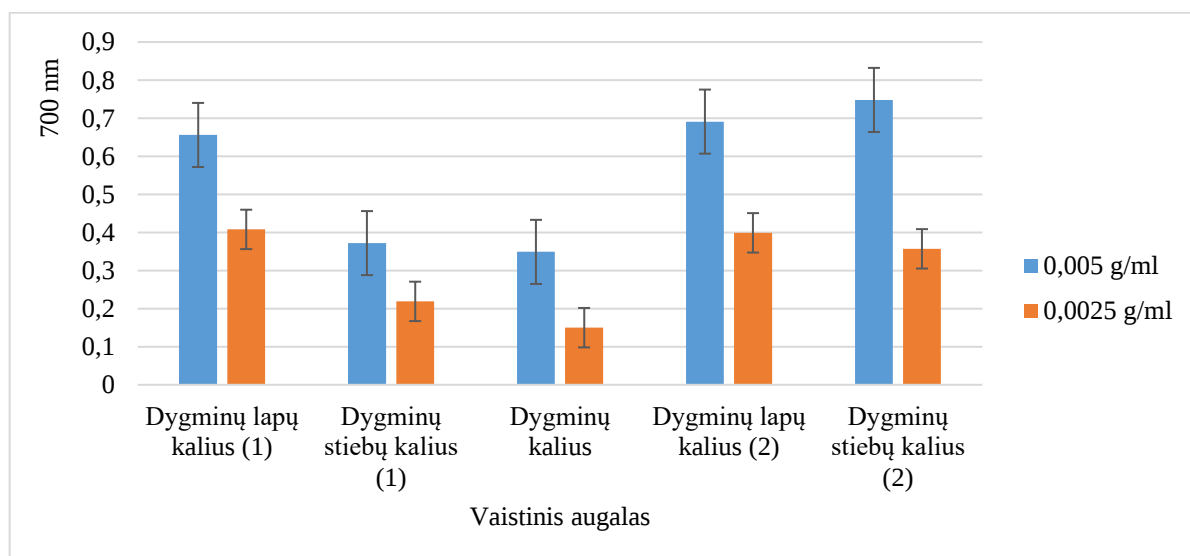
3.3. Redukcinių savybių įvertinimas medetkos ir dygminių augaluose

Išmatuojama paruoštų skirtingų koncentracijų medetkos ir dygminių ekstraktų tirpalų šviesos sugertis 700 nm bangos ilgyje (3.6 pav. ir 3.7 pav.). Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes.



3.6 pav. Redukcinių savybių įvertinimas skirtingų koncentracijų medetkos ekstraktuose

Atlikus redukcinių savybių įvertinimą medetkos ekstraktuose, nustatyta, kad medetkų žiedų (*in vivo*) ekstraktas turi stipriausias redukcines savybes (šviesos sugertis 0,005 g/ml – 0,469, o 0,0025 g/ml – 0,269). Šiek tiek silpnesnėmis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo medetkų stiebų kaliaus (2) ekstraktas (0,005 g/ml – 0,401, o 0,0025 g/ml – 0,236). Silpniausias redukcinės savybes šiame tyrime turėjo medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ ekstraktas.



3.7 pav. Redukcinių savybių įvertinimas skirtingų koncentracijų dygminių ekstraktuose

Dygminių ekstraktai taip pat pasižymėjo ir stipresnėmis redukcinėmis savybėmis nei medetkos ekstraktai. Dygminių stiebų kaliaus (2) ekstrakto šviesos sugertis 0,005 g/ml – 0,748 , o 0,0025 g/ml – 0,356, dygminių lapų kaliaus (2) ekstrakto šviesos sugertis 0,005 g/ml – 0,691 , o 0,0025 g/ml – 0,399. Silpniausias redukcinės savybės šiame tyrime parodė dygminių kaliaus ekstraktas.

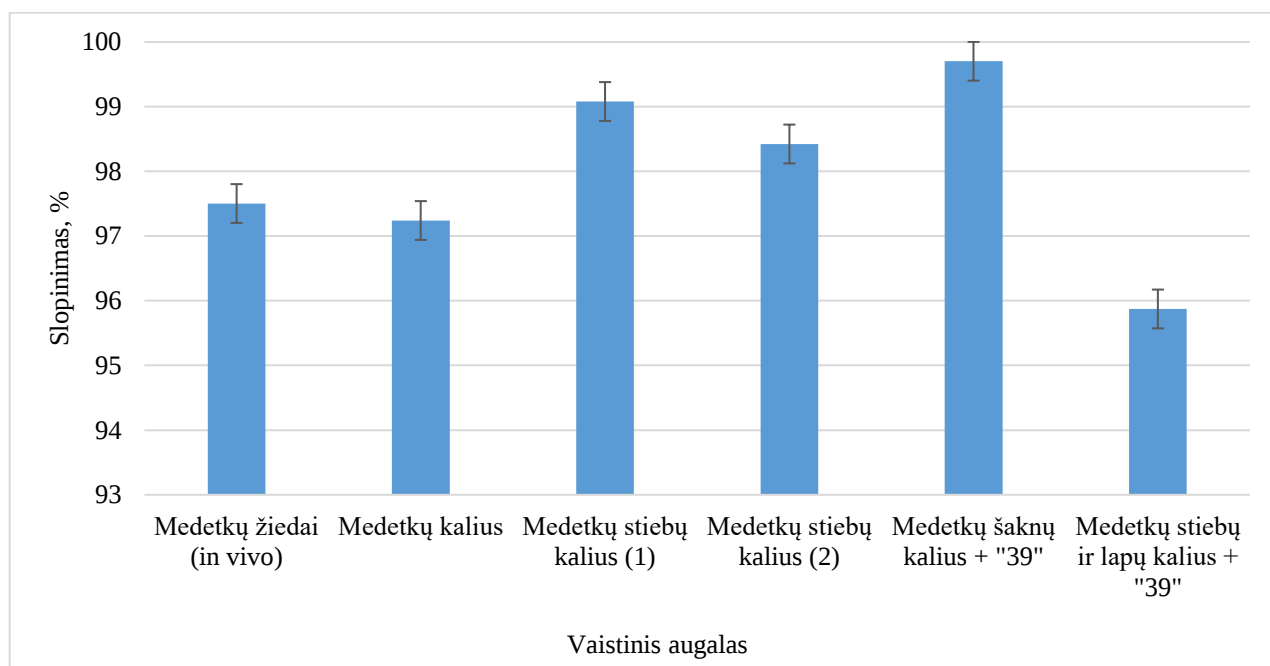
3.4. Medetkos ir dygminių augalų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

ABTS metodas paremtas radikalo anijono slopinimu, kuris turi mėlynai- žalią spalvą. Vaistinių augalų šviesos sugertis buvo matuojama 734 nm bangos ilgyje (3.4 lentelė):

3.4 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 734 nm bangos ilgyje

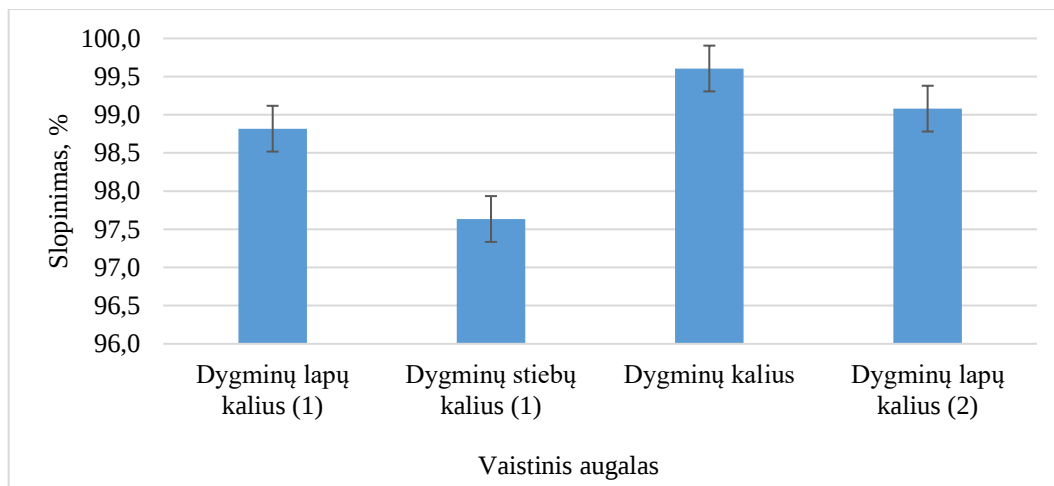
Vaistinis augalas	Šviesos sugertis 734 nm
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	0,019
Medetkų kalius	0,021
Medetkų stiebų kalius (1)	0,007
Medetkų stiebų kalius (2)	0,012
Dygminių lapų kalius (1)	0,009
Dygminių stiebų kalius (1)	0,018
Dygminių kalius	0,003
Dygminių lapų kalius (2)	0,007
Medetkų šaknų kalius + "39"	0,005
Medetkų stiebų ir lapų kalius + "39"	0,074

Ištačius gautus rezultatus į formulę (2.3) apskaičiuotas vaistinių augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas. Nustatyta kiek procentų radikalo anijono yra slopinama medetkos ir dygminių ekstraktuose (3.8 pav. ir 3.9 pav.).



3.8 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas medetkos ekstraktuose

Atlikus medetkos antioksidacinio aktyvumo įvertinimą ABTS metodu, nustatyta, kad stipriausią slopinamą poveikį radikalo anijonui turi medetkų šaknų kaliaus + „39“ ekstraktas – 99,7 % ir medetkų stiebų kaliaus (1) ekstraktas – 99 %. Mažesniu slopinimu pasižymėjo medetkų stiebų kaliaus (2), medetkų žiedų (*in vivo*) ir medetkų kaliaus kultūros ekstraktai (atitinkamai 98,4 %, 97,5 %, 97,2 %). Silpniausią slopinimą turėjo medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ ekstraktas – 95,8 %.

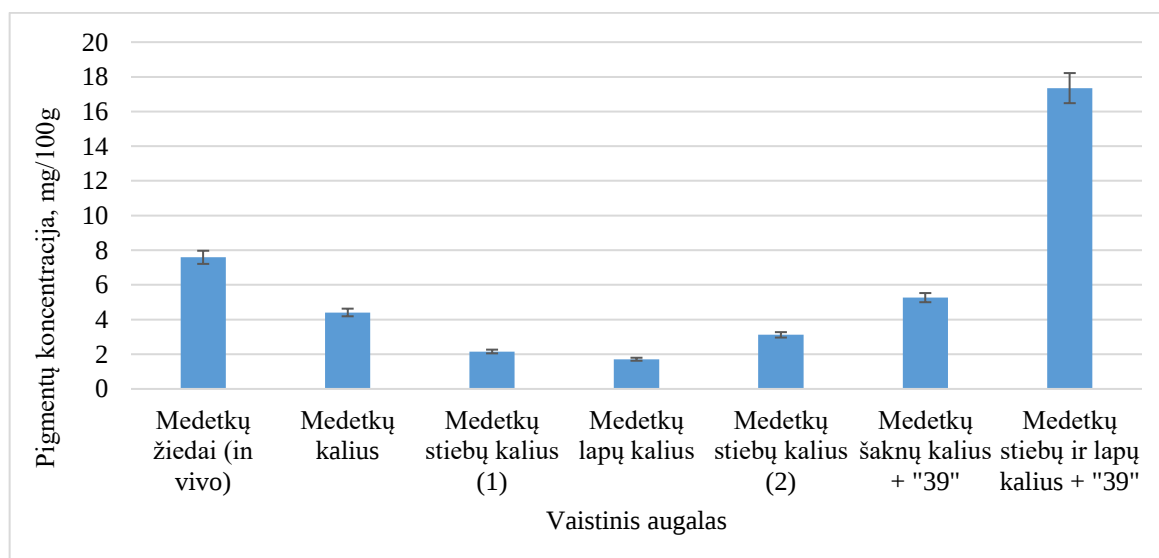


3.9 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas medetkos ekstraktuose

Dygminių ekstraktai pasižymėjo labai panašiomis antioksidacinėmis savybėmis kaip ir medetkos ekstraktai. Stipriausias savybes turėjo dygminių kaliaus ir dygminių lapų (2) ekstraktai – 99,6 % ir 99 %. Silpnėsnes savybes rodė dygminių lapų kaliaus (1) ekstraktas – 98,8 % ir dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktas – 97,6 %.

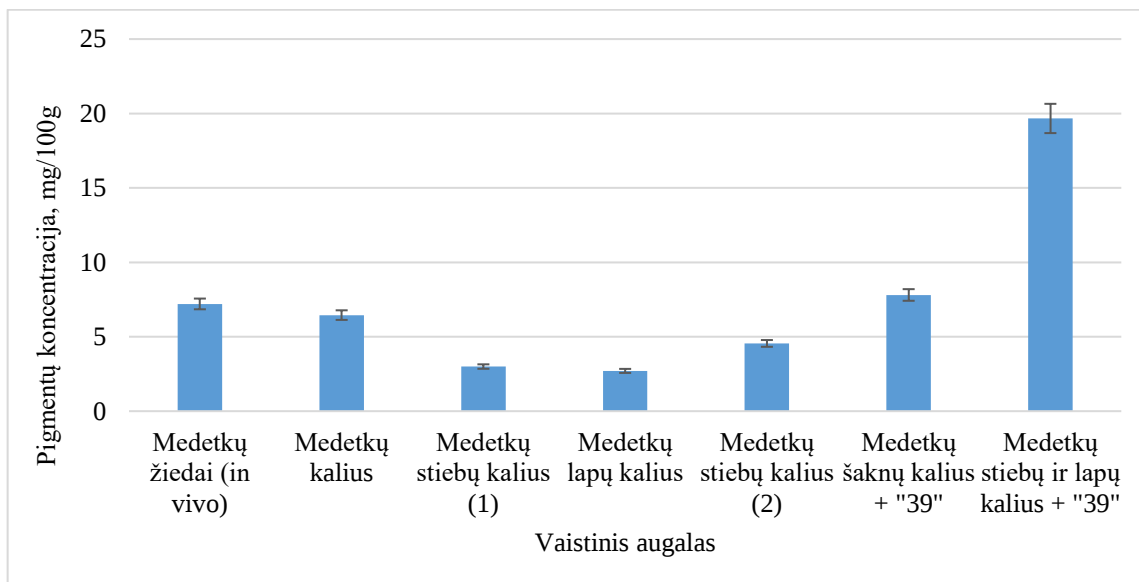
3.5. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimas augaluose

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas vaistinių augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru esant skirtingiems bangos ilgiams. Pigmentų koncentracija apskaičiuojama pagal formules nurodytas metodinėje dalyje (2.4.1 – 2.4.4). Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojama pagal formulę 2.4.5 ir pateikiama diagramose išskiriant chlorofilo *a*, chlorofilo *b* ir karotinoidų koncentracijas.



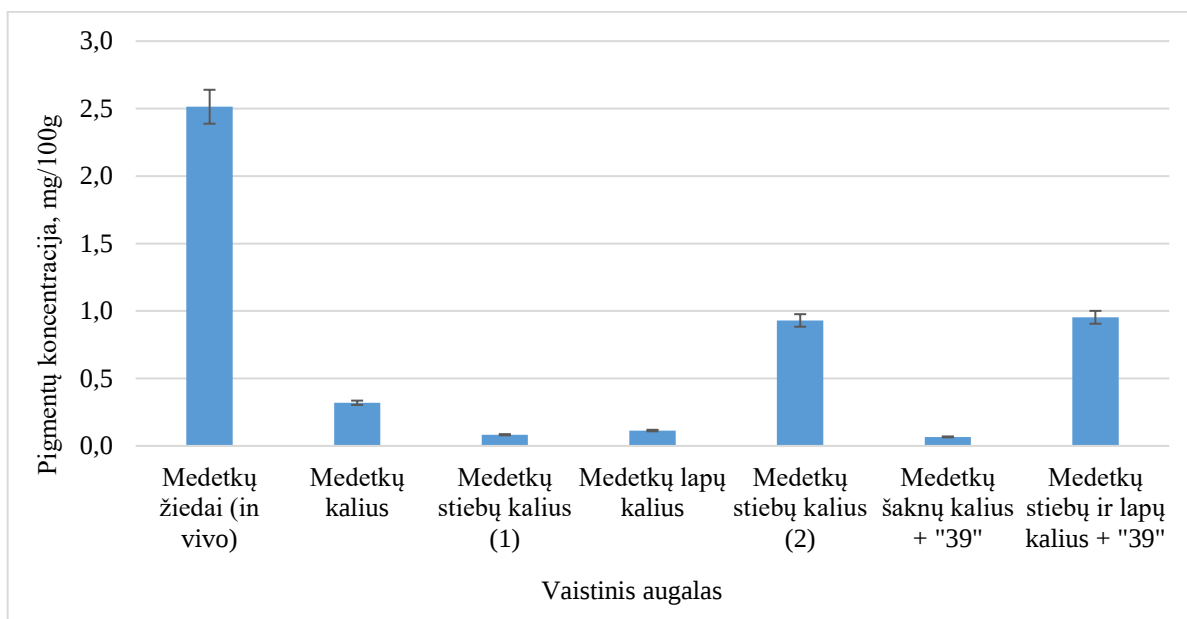
3.10 pav. Chlorofilo *a* koncentracija mg/100g medetkos ekstraktuose

Atlikus chlorofilo *a* įvertinimą medetkos ekstraktuose, nustatyta, kad chlorofilo *a* koncentracija yra didžiausia medetkos stiebų ir lapų kaliaus + „39“ ekstrakto ir siekia 17,35 mg/100g, mažesne pigmentų koncentracija pasižymėjo medetkos žiedų (*in vivo*), medetkos šaknų kaliaus + „39“, medetkų kaliaus ekstraktai. Mažiausią chlorofilo *a* koncentraciją turėjo medetkų stiebų kaliaus (1) ir medetkų lapų kaliaus ekstraktai – 2,16 mg/100g ir 1,71 mg/100g.



3.11 pav. Chlorofilo *b* koncentracija mg/100g medetkos ekstraktuose

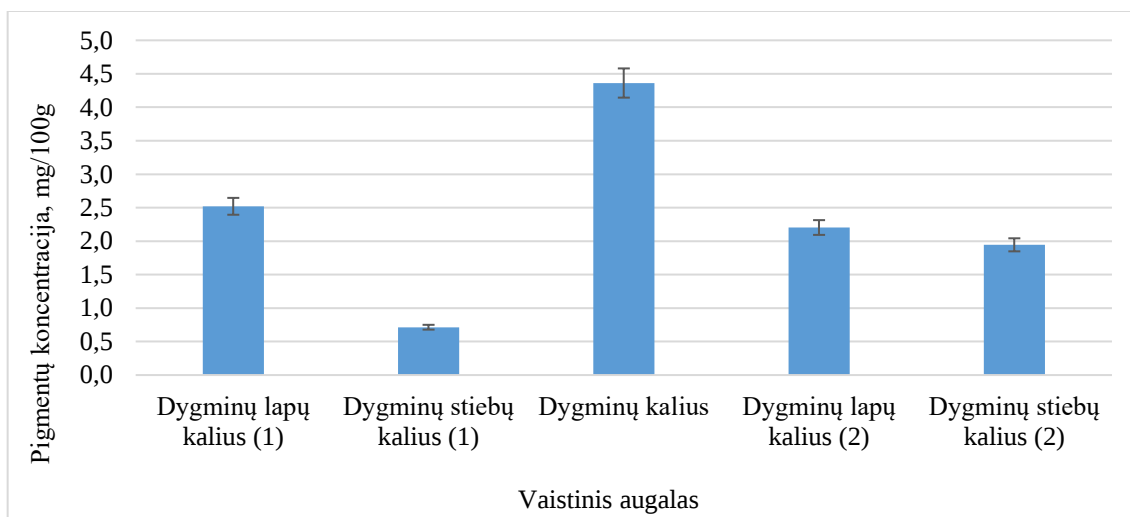
Chlorofilo *b* koncentracijos įvertinime labiausiai išsiskyrė medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ ekstraktas, kuris turėjo 19,67 mg/100g pigmento. Medetkų šaknų kaliaus + „39“, medetkų žiedų (*in vivo*), medetkų kaliaus ekstraktai pasižymėjo mažesne chlorofilo *b* koncentracija. Medetkų stiebų kaliaus (1) ir medetkų lapų kaliaus ekstraktai turėjo mažiausią ne tik chlorofilo *a*, bet ir chlorofilo *b* koncentraciją (atitinkamai 2,99 mg/100g, 2,71 mg/100g).



3.12 pav. Karotinoidų koncentracija mg/100g medetkos ekstraktuose

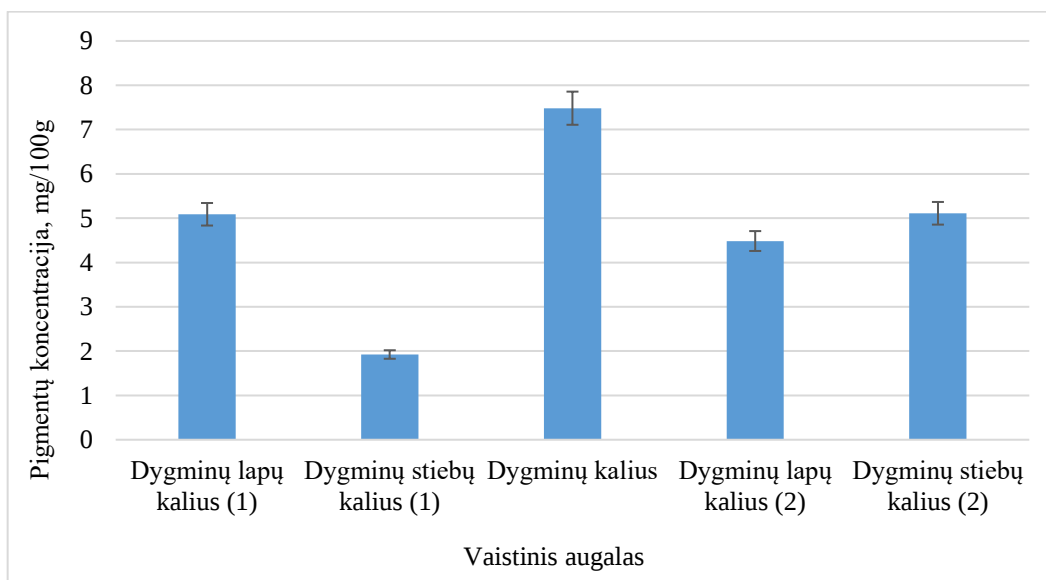
Atlikus karotinoidų įvertinimą medetkos ekstraktuose, nustatyta, kad didžiausia jų koncentracija yra medetkų žiedų (*in vivo*) ekstrakto – 2,51 mg/100g. Mažesnę karotinoidų koncentraciją rasta medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ bei medetkų stiebų kaliaus (2) ekstraktuose (0,95 mg/100g ir 0,93 mg/100g). Medetkų lapų kaliaus, medetkų stiebų kaliaus (1) ir medetkų šaknų kaliaus + „39“ ekstraktuose karotinoidų koncentracija buvo mažiausia – 0,11 mg/100g, 0,08 mg/100g, 0,06 mg/100g.

Įvertinus dygminių ekstraktų pigmentų koncentraciją, buvo nustatyta, kad dygminių ekstraktai pasižymėjo mažesne chlorofilo *a*, chlorofilo *b* ir karotinoidų koncentracija.



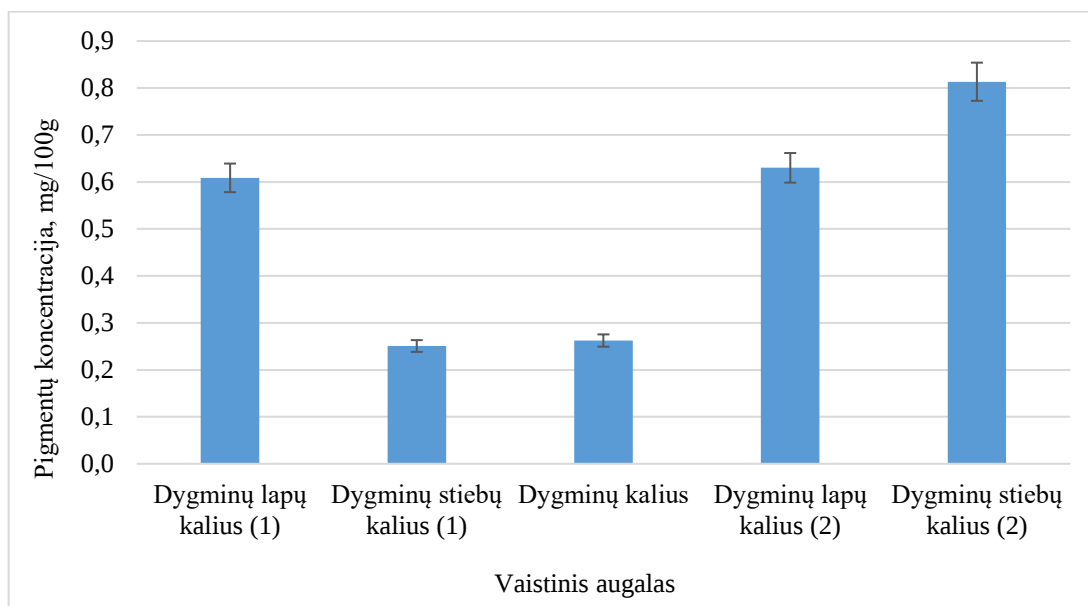
3.13 pav. Chlorofilo *a* koncentracija mg/100g dygminių ekstraktuose

Chlorofilo *a* koncentracijos įvertinime, buvo nustatyta, kad didžiausią koncentraciją pigmento turi dygminių kaliaus ekstraktas – 4,36 mg/100g. Šiek tiek mažesnę pigmento koncentraciją turėjo dygminių lapų kaliaus (1), dygminių lapų kaliaus (2) ir dygminių stiebų kaliaus ekstraktai. Mažiausią chlorofilo *a* koncentraciją turėjo dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktas – 0,71 mg/100g.



3.14 pav. Chlorofilo *b* koncentracija mg/100g dygminių ekstraktuose

Atlikus chlorofilo *b* koncentracijos įvertinimą, labiausiai išsiskyrė dygminių kaliaus ekstraktas, kuriame pigmento koncentracija siekė 7,48 mg/100g. Mažiau pigmento turėjo dygminių stiebų kaliaus (2), dygminių lapų kaliaus (1) ir dygminių lapų kaliaus (2) ekstraktai. Dygminių stiebų kaliaus (1) ekstrakto buvo tik 1,92 mg/100g pigmento.



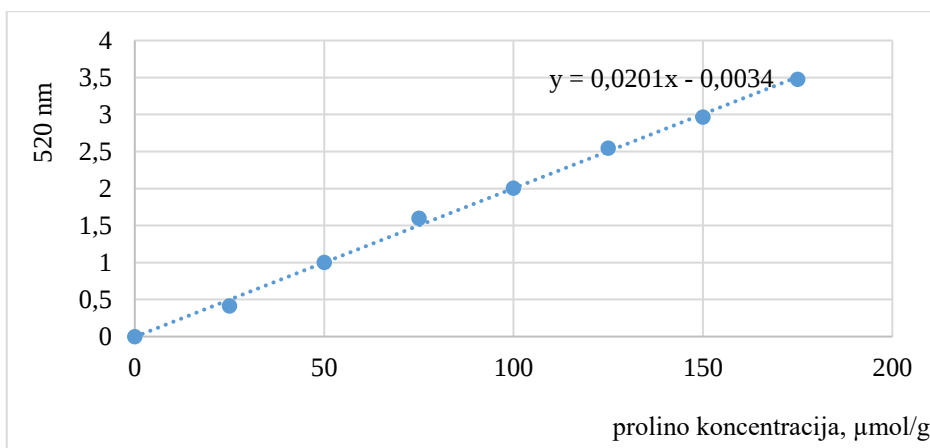
3.15 pav. Karotinoidų koncentracija mg/100g dygminių ekstraktuose

Dygminių ekstraktai taip pat pasižymėjo labai maža karotinoidų koncentracija lyginant su medetka. Daugiausia jų turėjo dygminių stiebų (2) ekstraktas – 0,81 mg/100g, šiek tiek mažiau dygminių lapų kaliaus (2) ir dygminių lapų kaliaus (1) ekstraktai (0,63 mg/100g ir 0,61 mg/100g). Mažiausią karotinoidų koncentraciją turėjo dygminių kaliaus ir dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktai (atitinkamai 0,26 mg/100g ir 0,25 mg/100g).

3.6. *L*-Prolino įvertinimas

Aminorūgštys reguliuoja vandens balansą ląstelėse bei duoda didžiausią antistresinį poveikį kritinėse situacijose, didina augalų atsparumą ekstremalioms augimo sąlygoms (šalčiui, šalnoms, sausrui).

Pradedant skaičiavimus ir matavimus paruošiama *L*-proline kalibracinė kreivė (3.16 pav.), kuri bus naudojama norint apskaičiuoti *L*-proline koncentraciją medetkų ir dygminių ekstraktuose.



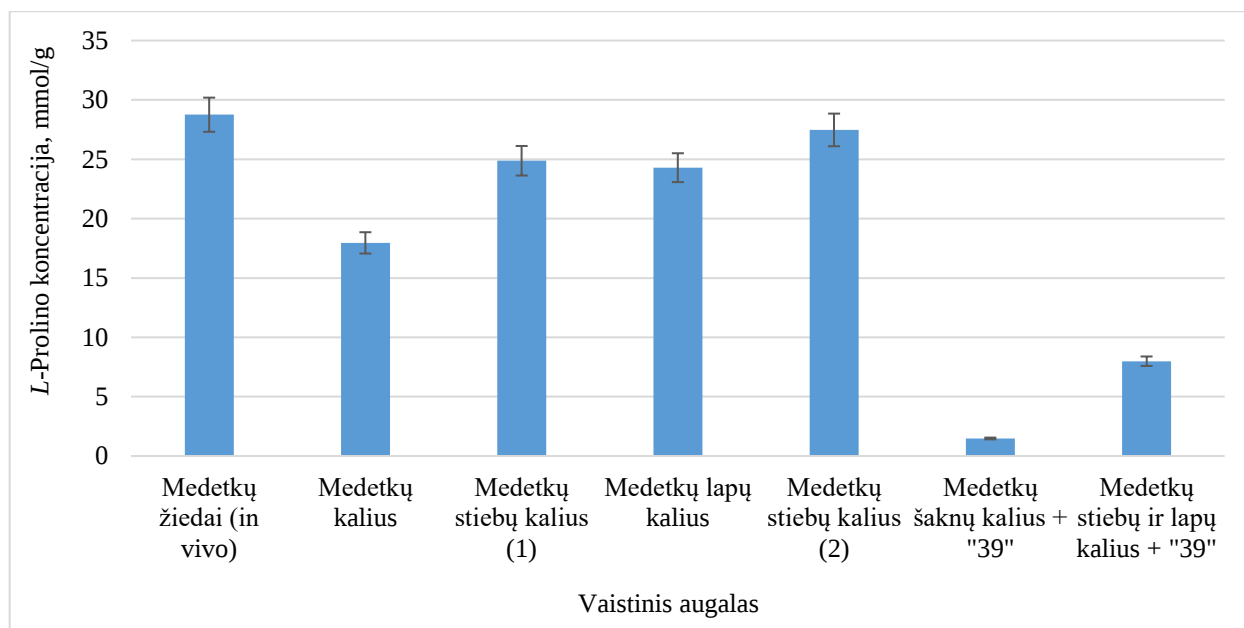
3.16 pav. *L*- Prolino kalibracinė kreivė

Paruošti vaistinių augalų ekstraktų tirpalai ir išmatuota jų šviesos sugertis 520 nm bangos ilgyje. Rezultatai pateikti 3.5 lentelėje ir toliau naudojami skaičiavimams.

3.5 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 520 nm bangos ilgyje

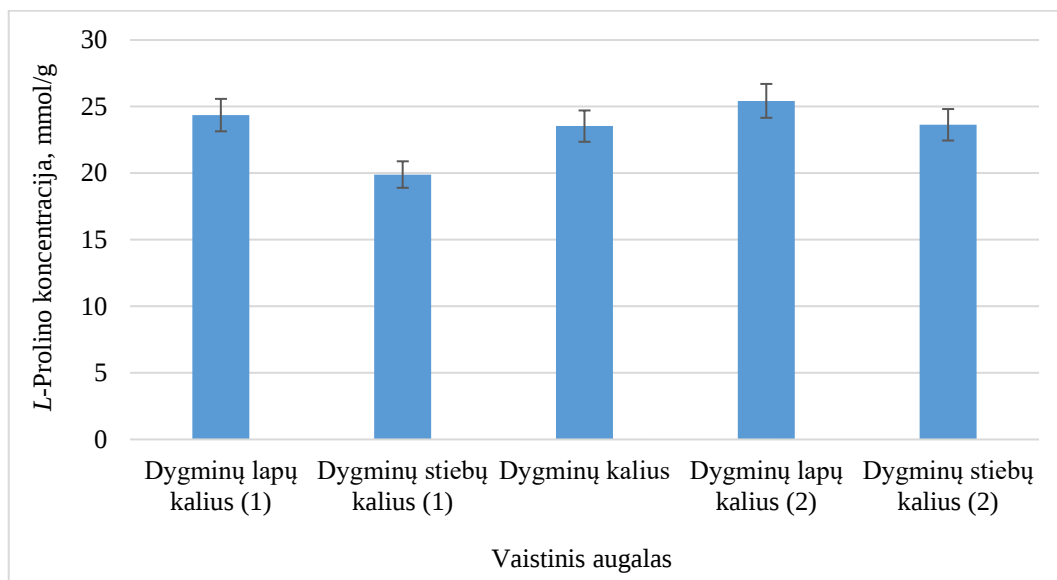
Vaistinis augalas	Šviesos sugertis 520 nm
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	3,102
Medetkų kaliaus	2,451
Medetkų stiebų kaliaus (1)	2,885
Medetkų lapų kaliaus	2,851
Medetkų stiebų kaliaus (2)	3,032
Dygminių lapų kaliaus (1)	2,855
Dygminių stiebų kaliaus (1)	2,580
Dygminių kaliaus	2,806
Dygminių lapų kaliaus (2)	2,917
Dygminių stiebų kaliaus (2)	2,812
Medetkų šaknų kaliaus + "39"	0,702
Medetkų stiebų ir lapų kaliaus + "39"	1,634

L-Prolino koncentracija apskaičiuojama naudojantis kalibravimo kreive pagal formulę (2.5), gauti rezultatai grafiškai pavaizduoti 3.17 ir 3.18 pav.



3.17 pav. *L*-Prolino koncentracija μmol/g medetkų ekstraktuose

Atlikus *L*-proline įvertinimą medetkos ekstraktuose, nustatyta, kad medetkų žiedų (*in vivo*) ir medetkų stiebų kaliaus ekstraktai turėjo didžiausią *L*-proline koncentraciją (28,75 ir 27,47 μmol/g). Medetkų stiebų kaliaus kultūroje (1) ekstraktas *L*-proline turėjo 24,87 μmol/g, medetkų lapų kaliaus kultūroje ekstraktas 24,29 μmol/g, o medetkų kaliaus ekstraktas 17,96 μmol/g. Mažiausią *L*-proline koncentraciją turėjo medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ (7,9 μmol/g) ir medetkų šaknų kaliaus + „39“ (1,48 μmol/g) ekstraktai.

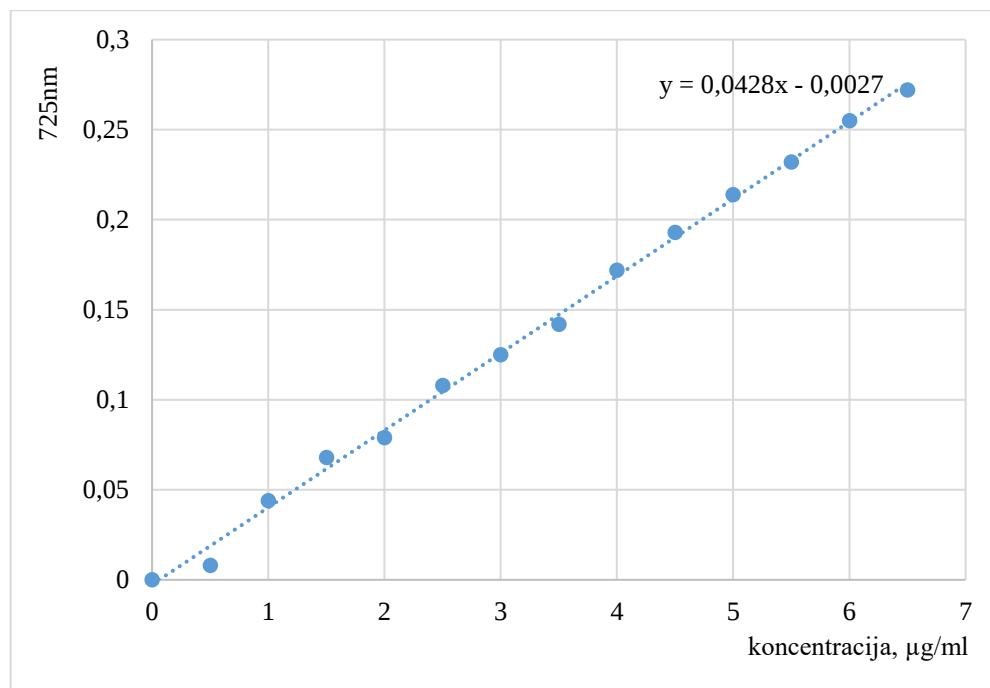


3.18 pav. *L*-Prolino koncentracija μmol/g dygminių ekstraktuose

Atlikus *L*-proline įvertinimą dygminių ekstraktuose, nustatyta, kad dygminių ekstraktai turi labai panašią *L*-proline koncentraciją, tačiau šiek tiek mažesnę nei medetkų ekstraktai. Dygminių lapų kaliaus ekstrakto buvo rasta 25,43 μmol/g, dygminių lapų kaliaus (1) ekstrakto 24,36 μmol/g, dygminių kaliaus ekstrakto 23,53 μmol/g, dygminių stiebų kaliaus (2) ekstrakto 23,63 μmol/g *L*-proline. Mažiausią jo koncentraciją turėjo dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktas – 19,89 μmol/g.

3.7. Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino- Kiokalto metodu

Paruošiama kalibravimo kreivė pagal tanino rūgštį (3.19 pav.), kuri bus naudojama norint apskaičiuoti fenolinių junginių koncentraciją tiriamuosiuose vaistiniuose augaluose.



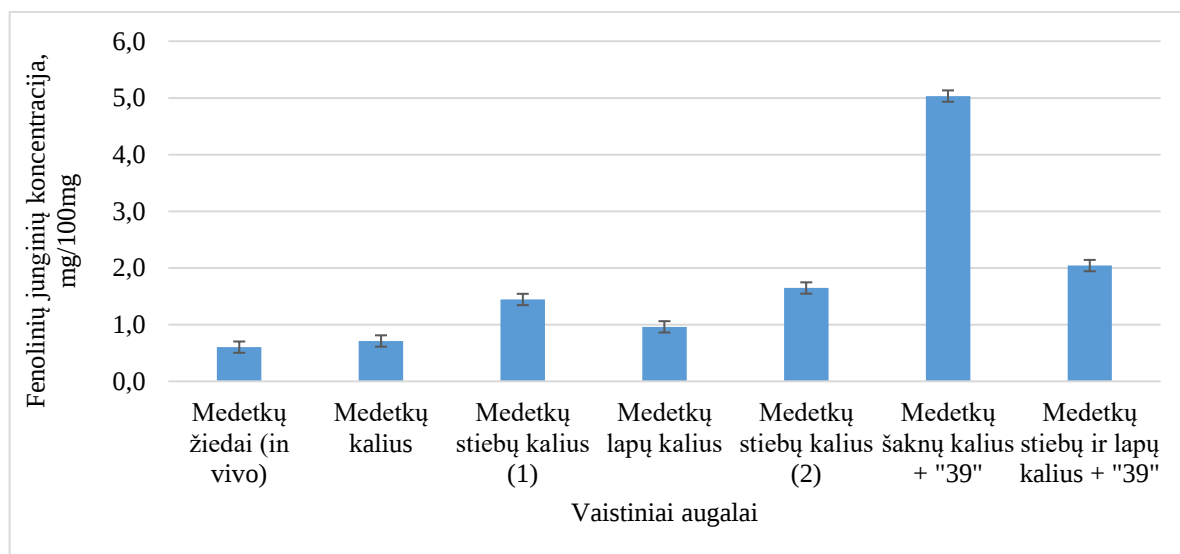
3.19 pav. Kalibravimo kreivė pagal tanino rūgštį

Paruošti vaistinių augalų ekstraktų tirpalai ir išmatuota jų šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje. Rezultatai pateikti 3.6 lentelėje ir toliau naudoti skaičiavimams.

3.6 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 725 nm bangos ilgyje

Vaistinis augalas	Šviesos sugertis 725 nm
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	0,603
Medetkų kaliaus	0,712
Medetkų stiebų kaliaus (1)	1,444
Medetkų lapų kaliaus	0,961
Medetkų stiebų kaliaus (2)	1,646
Dygminių lapų kaliaus (1)	1,132
Dygminių stiebų kaliaus (1)	0,213
Dygminių kaliaus	0,836
Dygminių lapų kaliaus (2)	0,696
Dygminių stiebų kaliaus (2)	1,974
Medetkų šaknų kaliaus + "39"	14,379
Medetkų stiebų ir lapų kaliaus + "39"	2,042

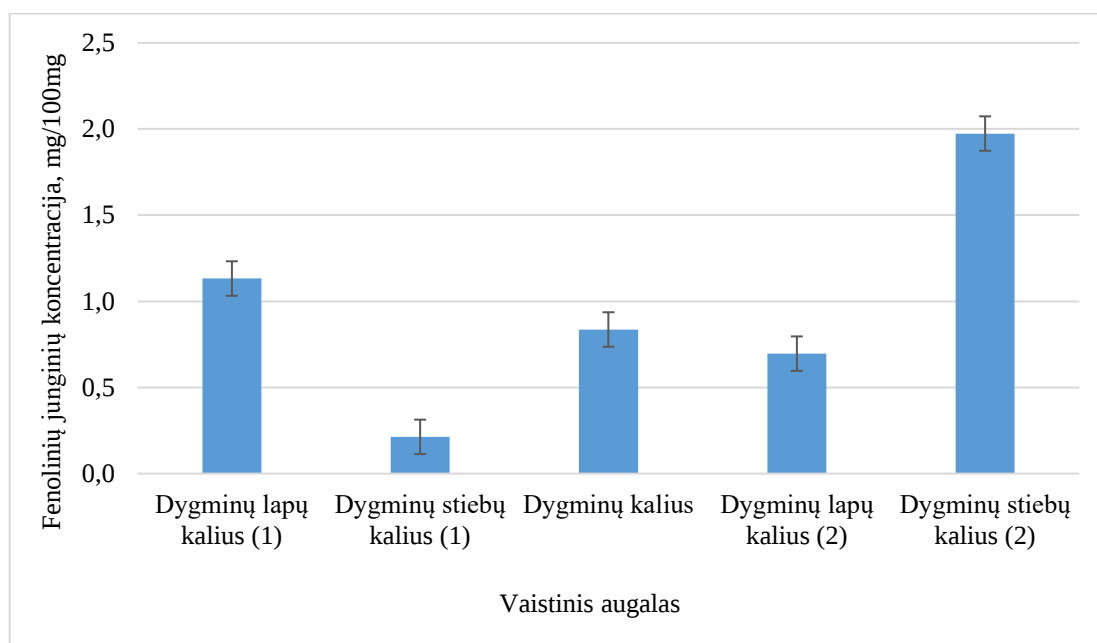
Fenolinių junginių koncentracijai medetkų ir dygminių ekstraktuose apskaičiuoti naudota formulė (2.6) ir kalibracinė kreivė pagal tanino rūgštį. Gauti skaičiavimo rezultatai pateikti 3.20 pav.



3.20 pav. Bendra fenolinių junginių koncentracija medetkų ekstraktuose

Fenoliniai junginiai yra augalų metabolitai. Šie junginiai yra labai svarbūs augalų augimui bei reprodukcijai. Pažeidus augalus, pakeitus aplinkos sąlygas. Norėdami apsisaugoti, jie pradeda sintezuoti fenolinius junginius, kaip atsaką į nepalankias sąlygas ar patogenus. Jie kaip cheminiai signalai dalyvauja ląsteliniuose ir tarpląsteliniuose procesuose. Taip pat yra svarbūs priviliojant vabzdžius, kurie apdulkina augalus. Atlikus bendrą fenolinių junginių įvertinimą Folino-Kiokalto metodu, gauti duomenys rodo, kad didžiausią fenolinių junginių koncentraciją turėjo medetkų šaknų kaliaus + „39“ ekstraktas (5,03 mg/100mg). Mažesnę fenolinių junginių koncentraciją pasižymėjo medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“, medetkų stiebų kaliaus (2), medetkų stiebų kaliaus (1)

ekstraktai. Mažiausiai fenolinių junginių turėjo medetkų kaliaus ir medetkų žiedų (*in vivo*) ekstraktai (0,71 ir 0,6 mg/100mg).



3.21 pav. Bendra fenolinių junginių koncentracija dygminų ekstraktuose

Dygminų ekstraktuose labiausiai išsiskyrė dygminų stiebų kaliaus (2) ekstraktas, kuriame fenolinių junginių koncentracija siekė 1,97 mg/100mg. Mažesnę jų koncentraciją turėjo dygminų lapų kaliaus (1), dygminų kaliaus, ir dygminų lapų kaliaus (2) ekstraktai. Mažiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta dygminų stiebų kaliaus (1) ekstrakto – 0,21 mg/100mg.

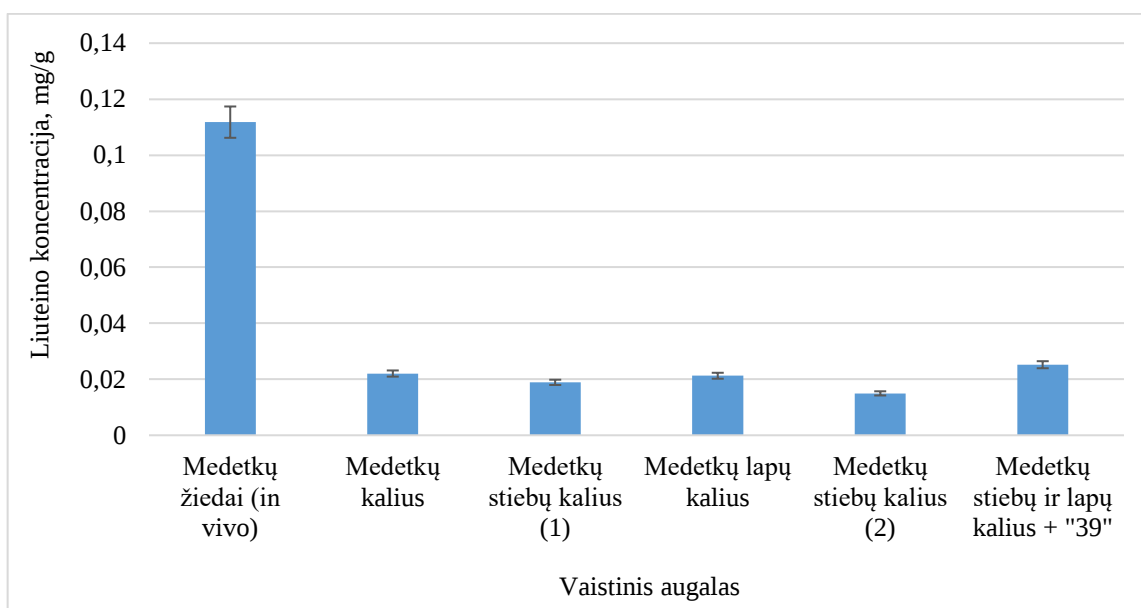
3.8. Liuteino įvertinimas vaistiniuose augaluose

Atliekant liuteino įvertinimą medetkų ir dygmino ekstraktuose, buvo matuojama augalų tirpalų šviesos sugertis 446 nm bangos ilgyje (3.7 lentelė).

3.7 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 446 nm bangos ilgyje

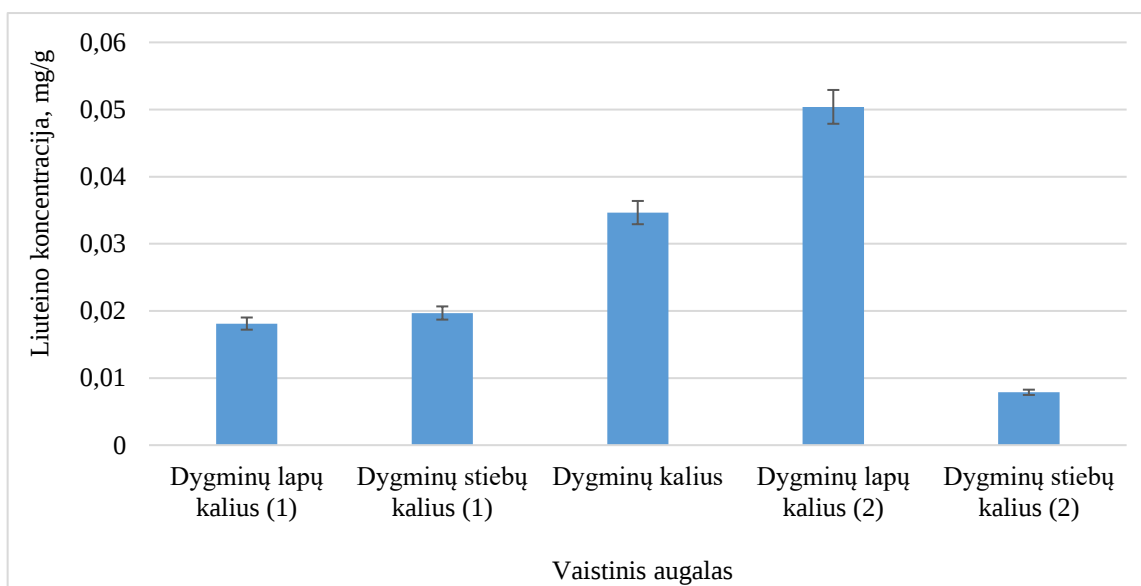
Vaistinis augalas	Šviesos sugertis 446 nm
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	0,142
Medetkų kalius	0,028
Medetkų stiebų kalius (1)	0,024
Medetkų lapų kalius	0,027
Medetkų stiebų kalius (2)	0,019
Dygminų lapų kalius (1)	0,023
Dygminų stiebų kalius (1)	0,025
Dygminų kalius	0,044
Dygminų lapų kalius (2)	0,064
Dygminų stiebų kalius (2)	0,010
Medetkų stiebų ir lapų kalius + "39"	0,025

Gauti rezultatai naudoti liuteino koncentracijos augaluose skaičiavimui pagal formulę (2.7), o gauta liuteino koncentracija, medetkų ir dygminių ekstraktuose, vaizduojama 3.22 ir 3.23 pav.



3.22 pav. Liuteino koncentracija medetkų ekstraktuose

Liuteino randama augalų lapuose, vaisiuose bei žieduose. Čia jis atlieka pagrindinę savo funkciją – sugeria šviesos spindulius bei apsaugo nuo per didelio saulės poveikio augalams. Todėl didžiausia liuteino koncentracija buvo rasta medetkų žiedų (*in vivo*) ekstrakto – 0,112 mg/g. Mažesne šio pigmento koncentracija pasižymėjo medetkų kaliaus, medetkų stiebų ir lapų kaliaus + “39” bei medetkų lapų kaliaus ekstraktai. Mažiausia liuteino koncentracija buvo rasta medetkų stiebų kaliaus (2) ekstrakto – 0,015 mg/g.



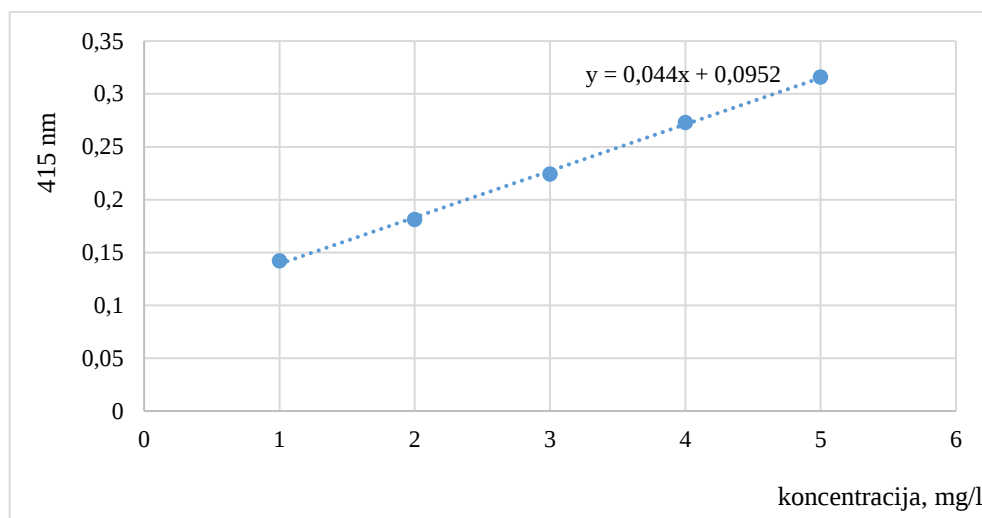
3.23 pav. Liuteino koncentracija dygminių ekstraktuose

Dygminių ekstraktuose didžiausia liuteino koncentracija buvo nustatyta dygminių lapų kaliaus (2) ekstrakto ir dygminių kaliaus ekstrakto (0,051 ir 0,034 mg/g). Šiek tiek mažesnė liuteino koncentracija buvo rasta dygminių stiebų kaliaus (1) ir dygminių lapų kaliaus (1) ekstraktuose – atitinkamai 0,019

mg/g ir 0,018 mg/g. Mažiausia liuteino koncentracija rasta dygminių stiebų kaliaus (2) ekstrakte – 0,008 mg/g.

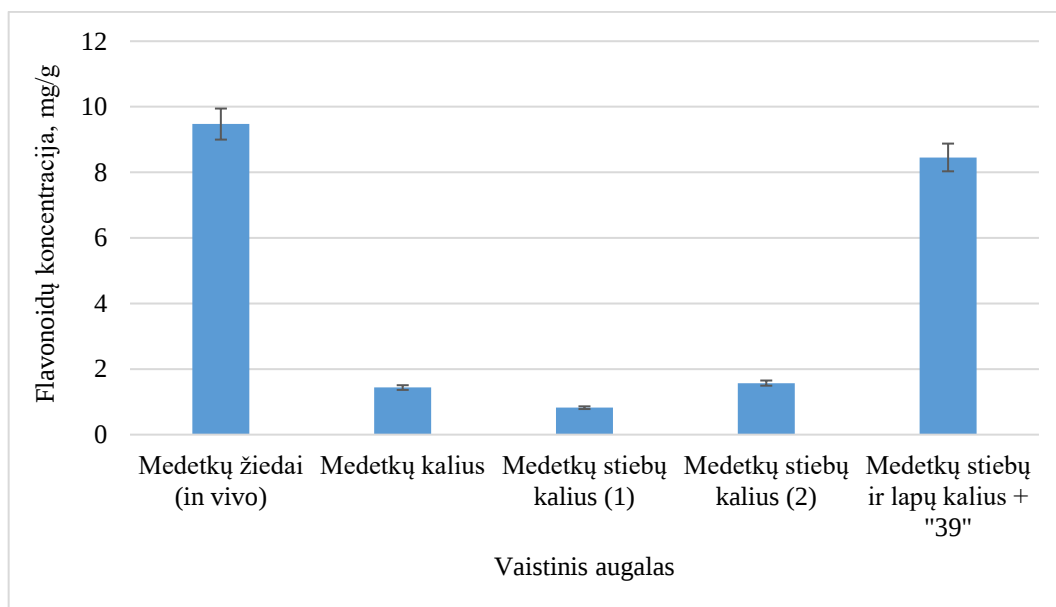
3.9. Flavonoidų įvertinimas vaistiniuose augaluose

Flavonoidų koncentracijos įvertinimui medetkų ir dygminių ekstraktuose, išmatuota augalų tirpalų šviesos sugertis 415 nm bangos ilgyje ir paruošta kalibravimo kreivė pagal kvercetiną (3.24 pav.).



3.24 pav. Kalibravimo kreivė pagal kvercetiną

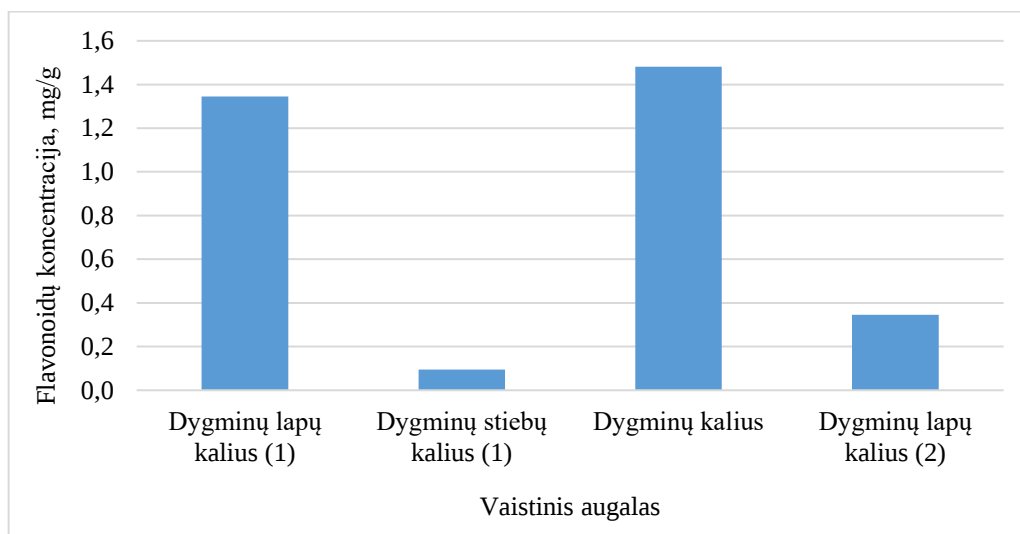
Flavonoidų koncentracija medetkų ir dygminių augaluose buvo apskaičiuotas pagal kvercetiną mg/g sausos masės. Gauti rezultatai vaizduojami 3.25 ir 3.26 pav.



3.25 pav. Flavonoidų koncentracija medetkų ekstraktuose

Flavonoidai atlieka pirmines antioksidacines funkcijas atsakydami į įvairius abiotinius stresus augaluose, jie yra veiksmingi endogeninio auksino judėjimo reguliatoriai, todėl gali atlikti augalų vystymosi reguliatorių vaidmenį. Atlikus flavonoidų koncentracijos įvertinimą medetkos ekstraktuose, gauti rezultatai rodo, kad didžiausia flavonoidų koncentracija buvo medetkų žiedų (*in vivo*) (9,47 mg/g) ir medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ (8,45 mg/g) ekstraktuose. Labai maža

flavonoidų koncentracija buvo rasta medetkų stiebų kaliaus (2) ekstrakte (1,57 mg/g), medetkų kaliaus ekstrakte (1,43 mg/g) ir medetkų stiebų kaliaus (1) ekstrakte (0,82 mg/g).

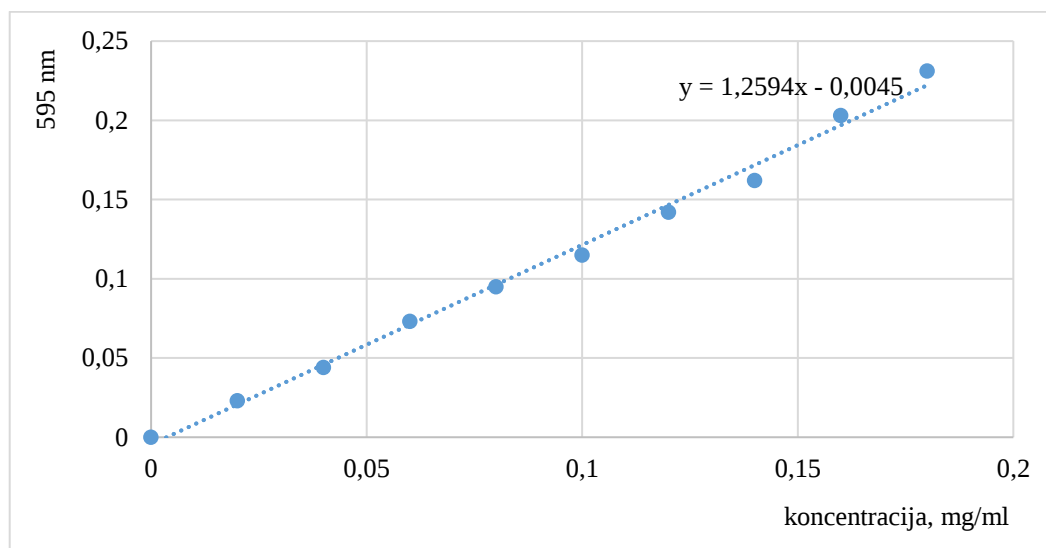


3.26 pav. Flavonoidų koncentracija dygminių ekstraktuose

Dygminių ekstraktuose flavonoidų koncentracija buvo rasta daug mažesnė nei medetkos ekstraktuose. Dygminių kaliaus ekstrakte – 1,48 mg/g ir dygminių lapų kaliaus (1) ekstrakte – 1,34 mg/g. Mažiausią flavonoidų koncentraciją turėjo dygminių lapų kaliaus (2) ir dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktai – 0,34 ir 0,09 mg/g.

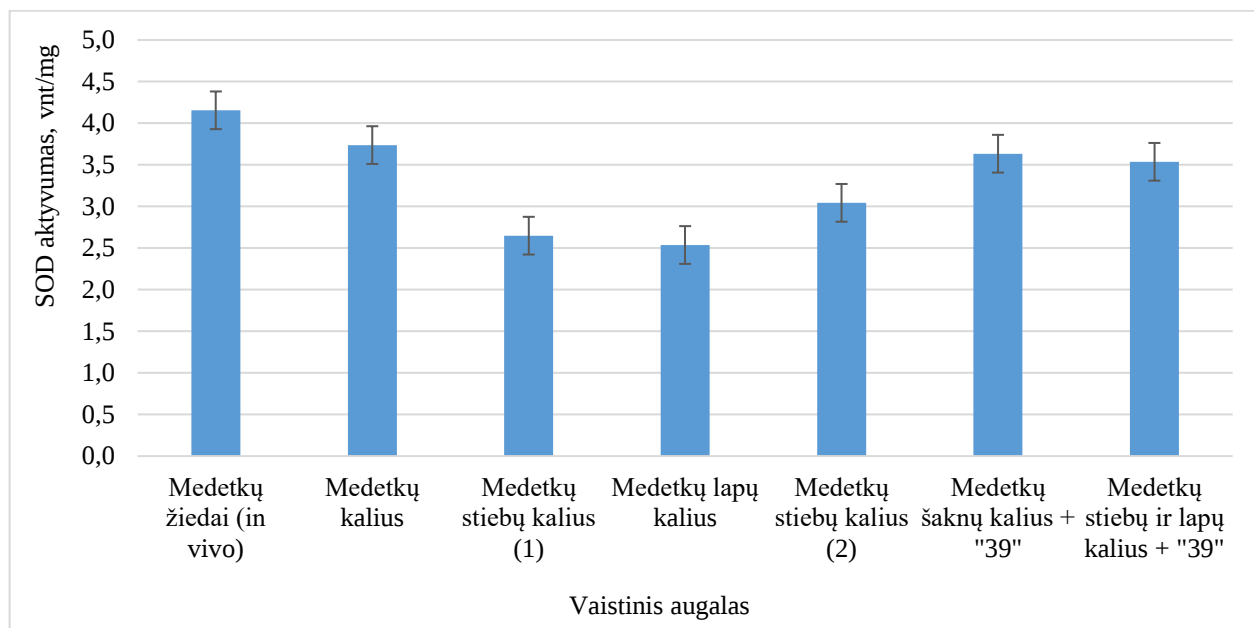
3.10. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Paruošiama baltymų kiekio nustatymo kalibravimo kreivė pagal albuminą.



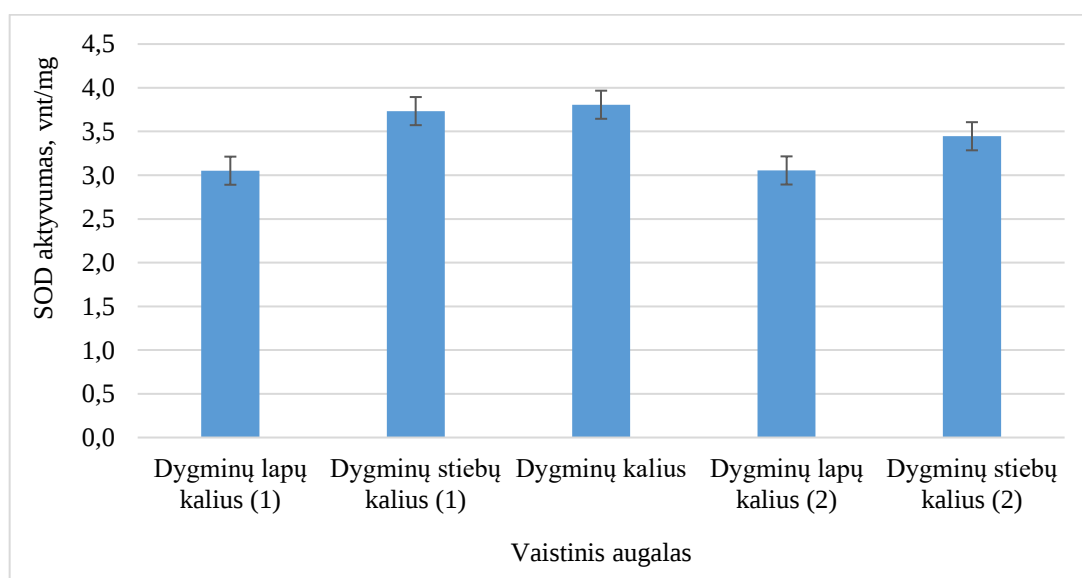
3.27 pav. Kalibravimo kreivė pagal albuminą

Išmatuojami paruoštų medetkų ir dygminių ekstraktų tirpalų šviesos sugertis skirtinguose bangos ilgiuose (595 ir 560 nm). Gauti duomenys naudojami baltymo kiekiui apskaičiuoti pagal Bradfordo metodą ir fermento aktyvumo skaičiavimams (2.9 formulė).



3.28 pav. Superoksido dismutazės aktyvumas medetkų ekstraktuose

Superoksido dismutazė yra antioksidacinis fermentas, apsaugantis ląsteles ir audinius nuo laisvųjų radikalų žalos. SOD dažnai vadinama pirmąja antioksidacine apsauga. Ji katalizuoja superoksido virsmą vandenilio peroksidu. Taigi, atlikus fermento įvertinimą medetkų ekstraktuose, daugiausia jo buvo rasta medetkų žiedų (*in vivo*) ekstrakto – 4,15 vnt/mg. Mažesniu SOD kiekiu pasižymėjo medetkų kaliaus, medetkų šaknų kaliaus + „39“, medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ ekstraktai. Medetkų stiebų kaliaus (1) ir medetkų lapų kaliaus ekstraktai turėjo mažiausią fermento kiekį (2,67 ir 2,54 vnt/mg).



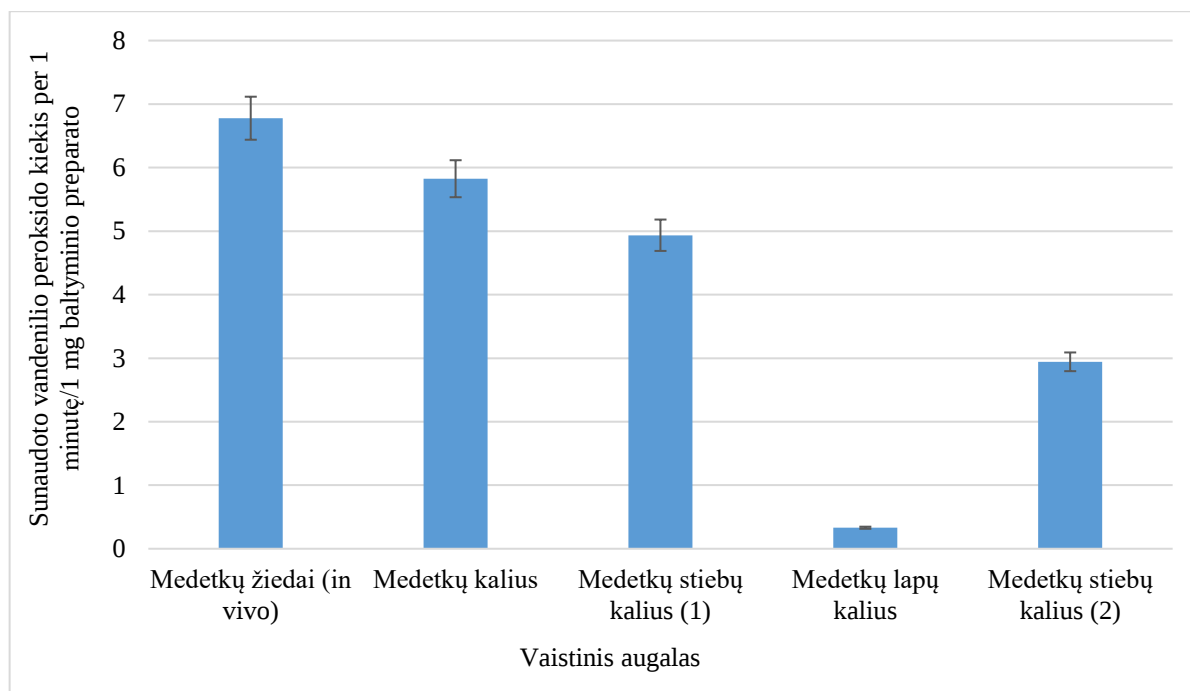
3.29 pav. Superoksido dismutazės aktyvumas dygminių ekstraktuose

Dygminių ekstraktuose buvo rastas labai panašus fermento aktyvumas kaip ir medetkos ekstraktuose. Dygminių kaliaus ekstrakto – 3,81 vnt/mg, dygminių stiebų kaliaus (1) ekstrakto – 3,73 vnt/mg ir dygminių stiebų kaliaus (2) ekstrakto buvo 3,45 vnt/mg. Šiek tiek mažesnis fermento aktyvumas nustatytas dygminių lapų kaliaus (2) ekstrakto – 3,06 vnt/mg ir dygminių lapų kaliaus (1) ekstrakto – 3,05 vnt/mg.

3.11. Katalazės aktyvumo įvertinimas

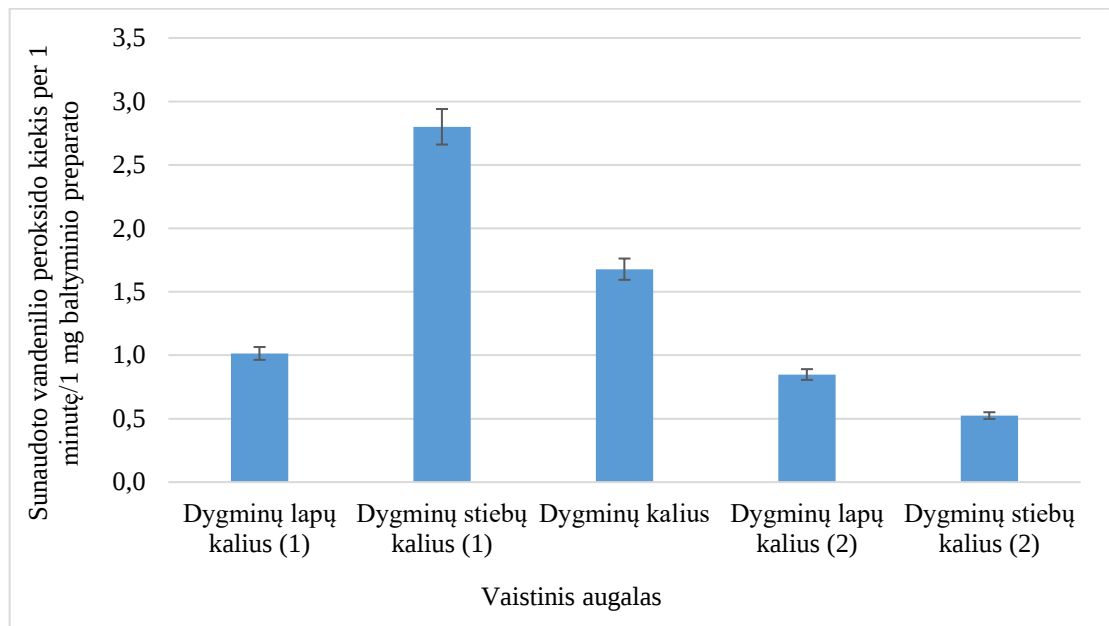
Katalazės aktyvumo įvertinime medetkų ir dygminių ekstraktuose buvo išmatuota vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugertis skirtinguose bangos ilgiuose (595 ir 240 nm). Gauti duomenys naudoti tolimesniuose fermento aktyvumo skaičiavimuose.

Naudojantis kalibravimo kreive pagal albuminą ir formule 2.10, apskaičiuotas fermento katalazės aktyvumas tiriamuosiuose vaistiniuose augaluose (3.30 ir 3.31 pav.).



3.30 pav. Katalazės aktyvumas medetkų ekstraktuose

Labai svarbi peroksisomose vykstanti vandenilio peroksido (H_2O_2) skaidymo reakcija, katalizuojama fermento katalazės. Katalazė peroksidiniu keliu oksiduoja ir taip detoksikuoja kai kurias kitas nuodingas medžiagas, pvz., etanolį, metanolį, formaldehidą, fenolį, nitritus ir kt. Taigi, atlikus katalazės įvertinimą medetkų ekstraktuose, nustatyta, kad didžiausią jos aktyvumą turėjo medetkų žiedų (*in vivo*) ekstraktas – 6,78 sunaudoto vandenilio peroksido kiekis per 1 minutę/1 mg baltyminio preparato. Mažesniu fermento aktyvumu pasižymėjo medetkų kaliaus, medetkų stiebų kaliaus (1) ir medetkų stiebų kaliaus (2) ekstraktai (5,83, 4,94 ir 2,94 sunaudoto vandenilio peroksido kiekis per 1 minutę/1 mg baltyminio preparato). Mažiausią fermento aktyvumą turėjo medetkų lapų kaliaus ekstraktas – 0,33 sunaudoto vandenilio peroksido kiekis per 1 minutę/1 mg baltyminio preparato.

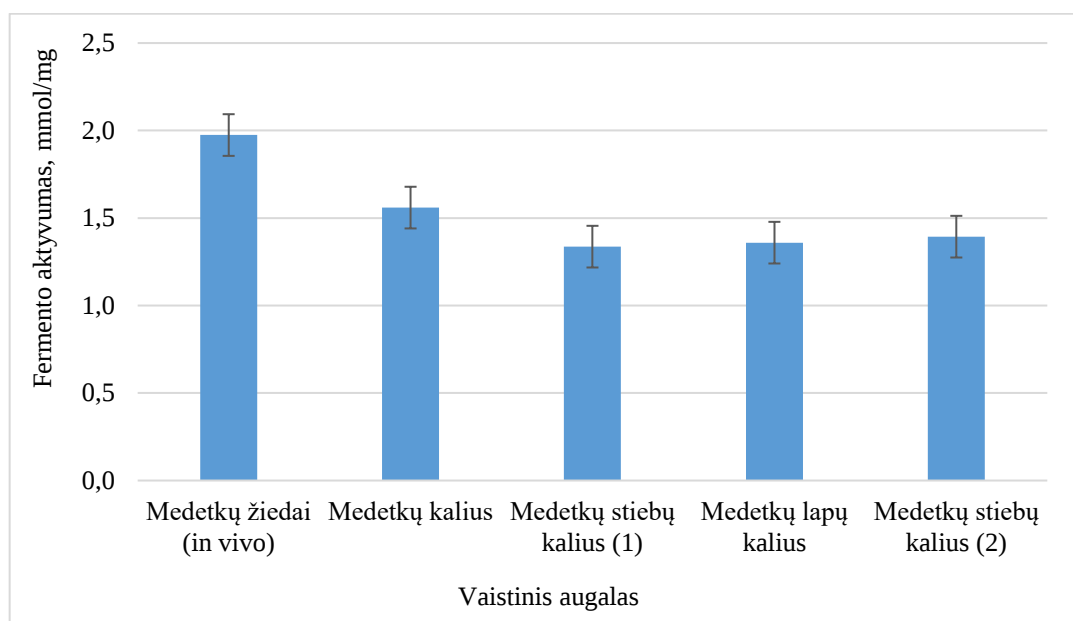


3.31 pav. Katalazės aktyvumas dygminų ekstraktuose

Atlikus katalazės įvertinimą dygminų ekstraktuose, gauti rezultatai rodo, kad dygminų stiebų kaliaus (1) ekstraktas turėjo didžiausią fermento aktyvumą – 2,8 sunaudoto vandenilio peroksido kiekis per 1 minutę/1 mg baltyminio preparato. Mažesnę fermento aktyvumą turėjo dygminų kaliaus, dygminų lapų kaliaus (1), dygminų lapų kaliaus (2) ekstraktai. Mažiausiai fermento buvo rasta dygminų stiebų kaliaus (2) ekstrakto – 0,52 sunaudoto vandenilio peroksido kiekis per 1 minutę/1 mg baltyminio preparato.

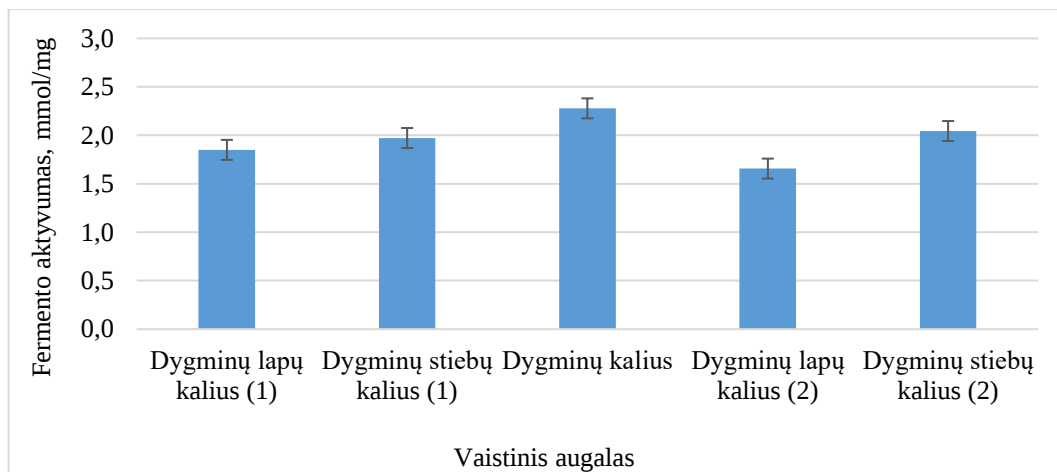
3.12. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

Reakcija prasideda pridėjus vandenilio peroksido ir matuojama šviesos sugertis 290 nm bangos ilgyje pradžioje ir po 30 min. Askorbatperoksidazės aktyvumas nustatomas naudojantis kalibravimo kreive pagal albuminą ir iš formulės (2.11).



3.32 pav. Askorbatperoksidazės aktyvumas medetkų ekstraktuose

Atlikus askorbatperoksidazės įvertinimą medetkų ekstraktuose, nustatyta, kad didžiausias aktyvumas vandenilio peroksidad detoksikuojančio fermento buvo rastas medetkų žiedų (*in vivo*) ekstrakto – 1,97 mmol/mg. Mažesniu kiekiu pasižymėjo medetkų kaliaus ekstraktas (1,56 mmol/mg), medetkų stiebų kaliaus (2) ekstraktas (1,39 mmol/mg), medetkų lapų kaliaus ekstraktas (1,36 mmol/mg) ir medetkų stiebų kaliaus (1) ekstraktas (1,34 mmol/mg).



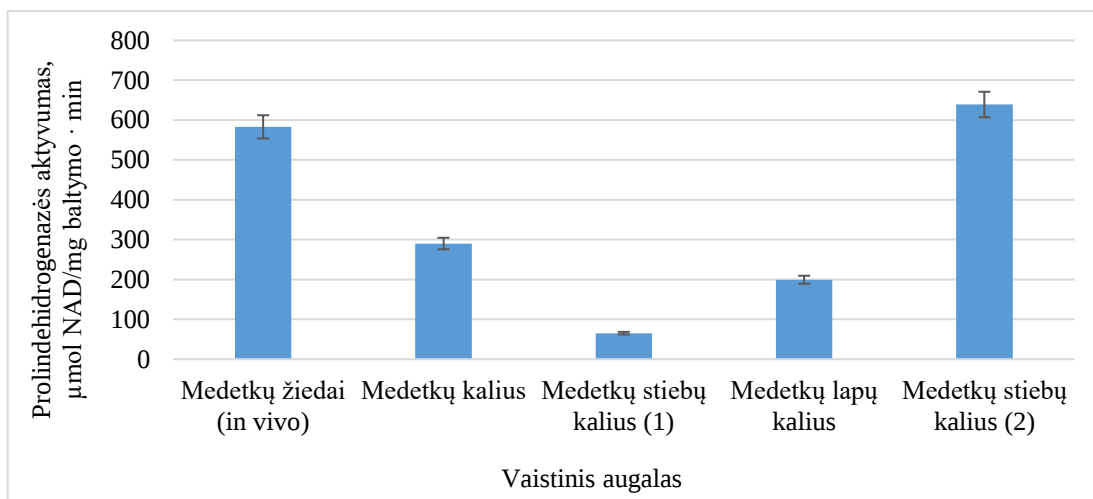
3.33 pav. Askorbatperoksidazės aktyvumas dygminių ekstraktuose

Dygminių kaliaus ir dygminių stiebų kaliaus (2) ekstraktuose buvo rastas didesnis askorbatperoksidazės aktyvumas, nei bet kuriame medetkos ekstrakto – atitinkamai 2,28 ir 2,04 mmol/mg. Šiek tiek mažesnis fermento aktyvumas buvo nustatytas dygminių stiebų kaliaus (1) ekstrakto (1,97 mmol/mg) ir dygminių lapų kaliaus (1) ekstrakto (1,85 mmol/mg). Mažiausias fermento aktyvumas buvo dygminių lapų kaliaus (2) ekstrakto – 1,66 mmol/mg.

3.13. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas

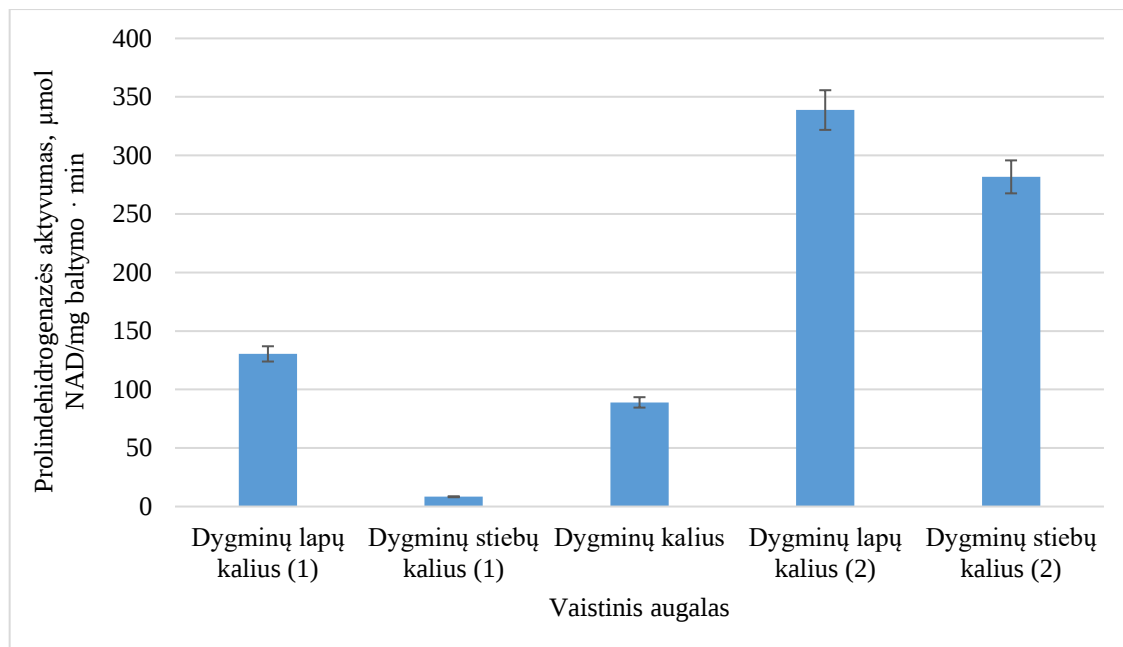
Išmatuota medetkų ir dygminių ekstraktų šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošta baltymų koncentracijos kalibravimo kreivė pagal albuminą.

Šviesos sugerties matavimo dinamika registruota pradžioje ir po 3 min 340 nm bangos ilgyje. Fermento prolindehidrogenazės aktyvumas apskaičiuotas pagal formulę, o gauti rezultatai vaizduojami 3.34 ir 3.35 pav.



3.34 pav. Prolindehidrogenazės aktyvumas medetkų ekstraktuose

Prolindehidrogenazės įvertinimo metu, nustatyta, kad daugiausia šio fermento turėjo medetkų stiebų kaliaus (2) ir medetkų žiedų (*in vivo*) ekstraktai (639 ir 583 $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$). Mažesne fermento koncentracija pasižymėjo medetkų kaliaus ir medetkų lapų kaliaus ekstraktai – 290 ir 199 $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$. Mažiausią koncentraciją prolindehidrogenazės turėjo medetkų stiebų kaliaus (1) ekstraktas – 65 $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$.

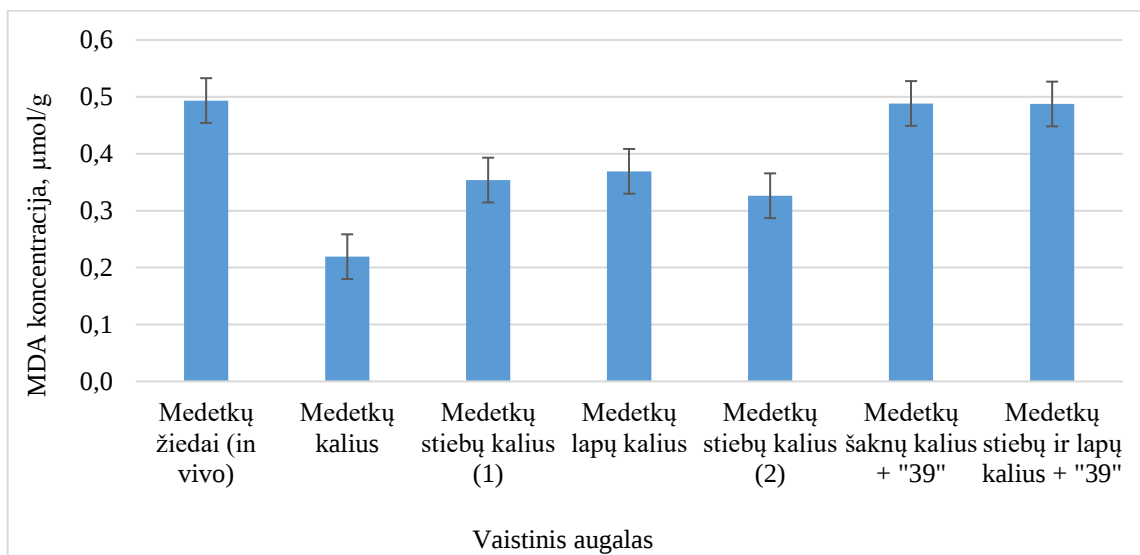


3.35 pav. Prolindehidrogenazės aktyvumas dygminių ekstraktuose

Dygminių lapų kaliaus (2) ir dygminių stiebų kaliaus (2) ekstraktų rezultatai parodė didžiausias fermento koncentracijas – 338 ir 281 $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$. Mažiau prolindehidrogenazės buvo rasta dygminių lapų kaliaus (1) ir dygminių kaliaus ekstraktuose (130 ir 89 $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$). Dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktas parodė mažiausią fermento koncentraciją – 8,37 $\mu\text{mol NAD/mg baltymo} \cdot \text{min}$.

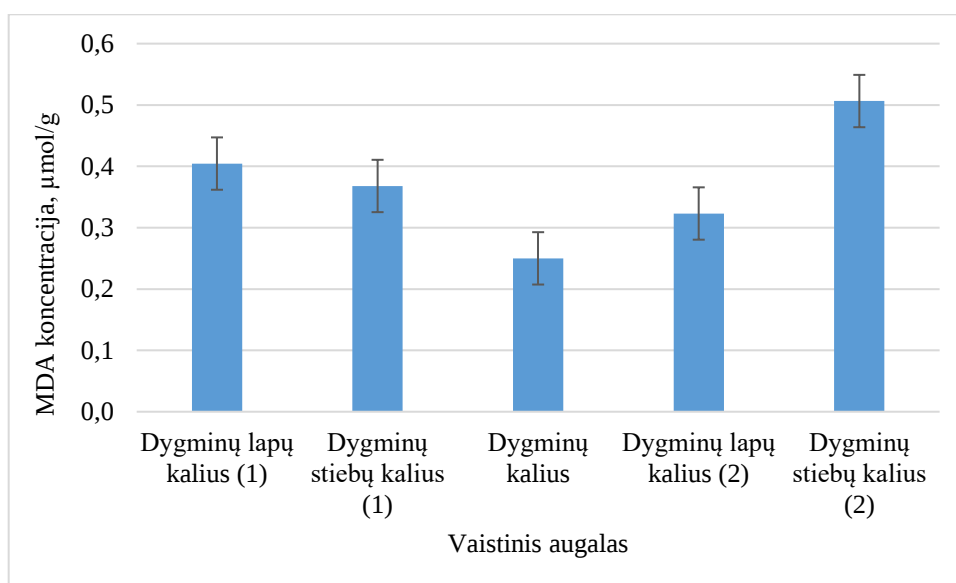
3.14. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

Paruošus vaistinių augalų ekstraktų tirpalus ir išmatavus jų šviesos sugertį skirtinguose bangos ilgiuose (532 ir 600 nm), gauti rezultatai naudoti formulėje (2.13). Apsakičiuotas MDA koncentracija medetkų ir dygminių ekstraktuose pateikiama 3.36 ir 3.37 pav.



3.36 pav. MDA koncentracijos grafikas medetkų ekstraktuose

MDA yra laikomas bendrosios lipidų peroksidacijos ir streso lygių rodikliu, todėl atlikus jo įvertinimą, nustatyta, kad didžiausią oksidacinį stresą patyrė medetkų žiedų (*in vivo*) ekstraktas – 0,494 $\mu\text{mol/g}$, medetkų šaknų kaliaus + „39“ ekstraktas (0,488 $\mu\text{mol/g}$) ir medetkų stiebų ir lapų kaliaus + „39“ ekstraktas (0,487 $\mu\text{mol/g}$). Mažesnius streso rodiklius rodė medetkų lapų kaliaus ir medetkų stiebų kaliaus (1) ekstraktai (0,369 ir 0,354 $\mu\text{mol/g}$). Mažiausiai streso patyrė medetkų stiebų kaliaus (2) ekstraktas – 0,326 $\mu\text{mol/g}$ ir medetkų kaliaus ekstraktas – 0,219 $\mu\text{mol/g}$.



3.37 pav. MDA koncentracijos grafikas dygminių ekstraktuose

Dygminių ekstraktų tyrime didžiausią oksidacinį stresą rodė dygminių stiebų kaliaus (2) ekstraktas – 0,506 $\mu\text{mol/g}$. Mažesnę stresą patyrė dygminių lapų kaliaus (1) ekstraktas (0,404 $\mu\text{mol/g}$), dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktas (0,368 $\mu\text{mol/g}$) bei dygminių lapų kaliaus (2) ekstraktas (0,323 $\mu\text{mol/g}$). Mažiausius streso rodiklius turėjo dygminių kaliaus ekstraktas – 0,25 $\mu\text{mol/g}$.

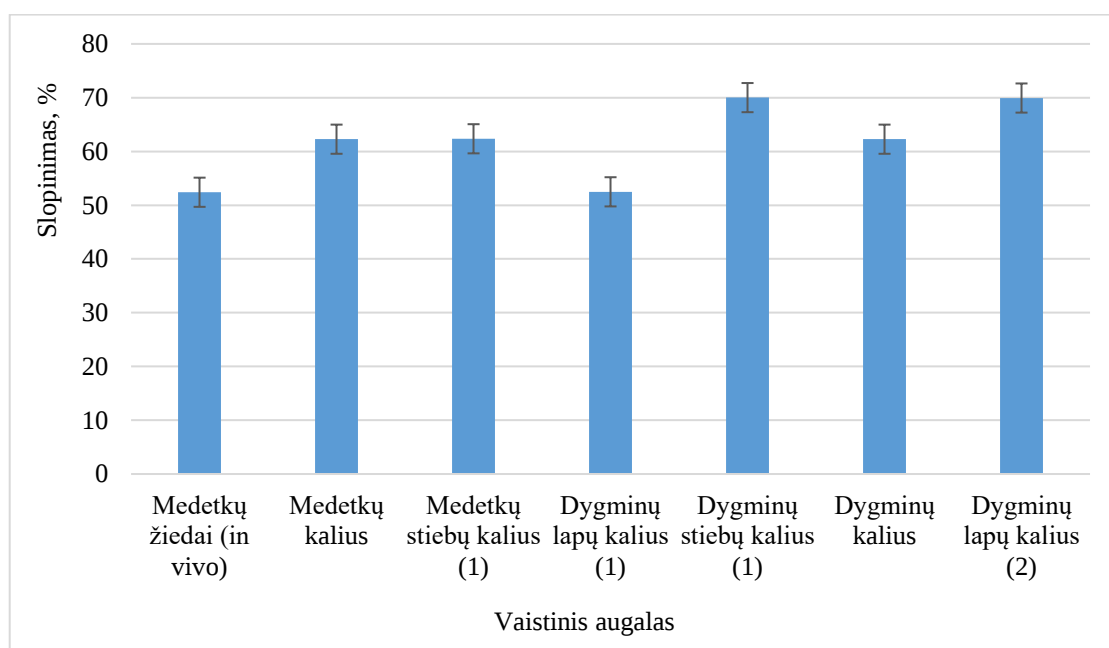
3.15. Vandenilio peroksido suardymas medetkų ir dygminių ekstraktais

Vandenilio peroksido suardymas medetkų ir dygminių ekstraktais buvo nustatomas 230 nm bangos ilgyje (3.8 lentelė):

3.8 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 230 nm bangos ilgyje

Vaistinis augalas	Šviesos sugertis 230 nm
Medetkų žiedai (<i>in vivo</i>)	0,603
Medetkų kalius	0,478
Medetkų stiebų kalius (1)	0,477
Dygminių lapų kalius (1)	0,602
Dygminių stiebų kalius (1)	0,380
Dygminių kalius	0,478
Dygminių lapų kalius (2)	0,381

Gauti duomenys buvo naudojami vandenilio peroksido slopinamam kiekiui augalų ekstraktais skaičiuoti pagal formulę (2.14).

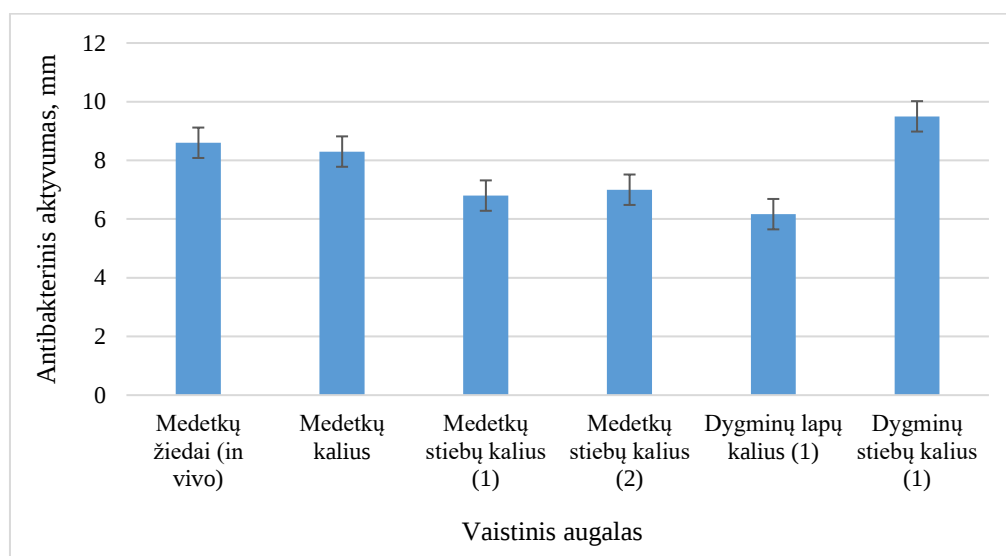


3.38 pav. Vandenilio peroksido suardymas vaistiniais augalų ekstraktais

Atlikus vandenilio peroksido suardymą medetkų ir dygminių ekstraktais, gauti rezultatai rodo, kad dygminių stiebų kaliaus (1) ir dygminių lapų kaliaus (2) ekstraktai (70 ir 69 %) pasižymi šiek tiek stipresnėmis slopinančiomis savybėmis nei medetkų stiebų kaliaus (1) ir medetkų kaliaus ekstraktai (62,3 ir 62,2 %). Silpnesnėmis slopinančiomis savybėmis pasižymėjo dygminių lapų kaliaus (1) ir medetkų žiedų (*in vivo*) ekstraktai – 52,5 ir 52,4 %.

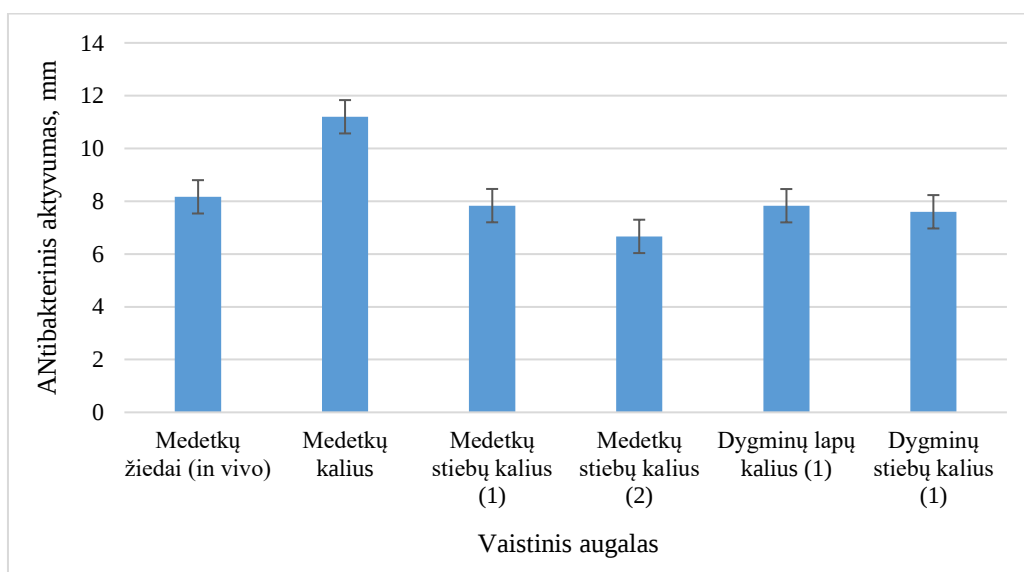
3.16. Medetkų ir dygminių ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaro difuziniu metodu

Atliktas antibakterinio aktyvumo įvertinimas medetkų ir dygminių ekstraktams naudojant *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris* bakterijų suspensijas.



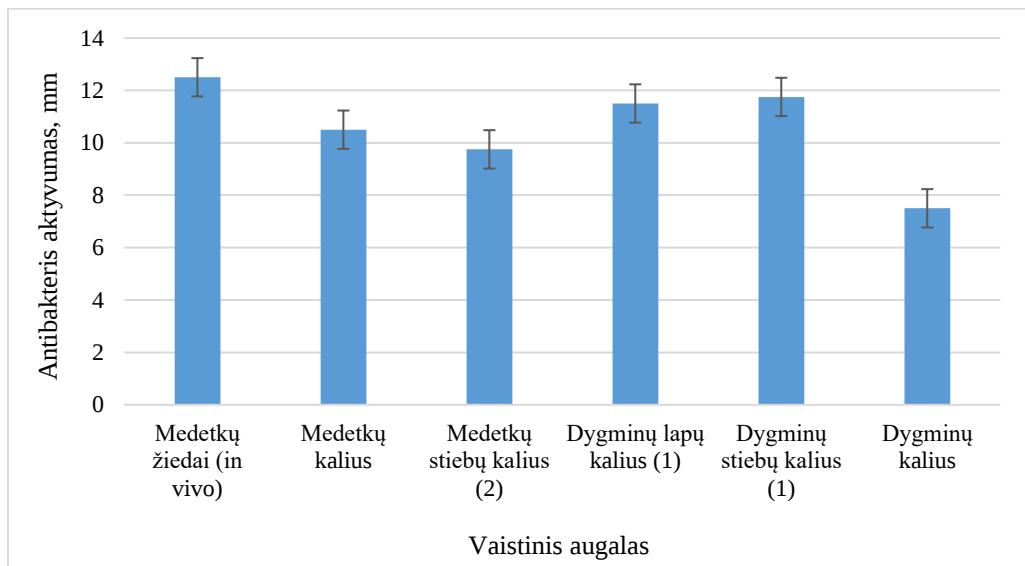
3.39 pav. Vaistinių augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *Bacillus subtilis*

Tyrimo metu nustatyta, kad stipriausią antibakterinį poveikį *Bacillus subtilis* bakterijoms turėjo dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktas, kurio bakterijos slopinimo zonos vidurkis buvo 9,5 mm. Šiek tiek mažesnėmis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo medetkų žiedų (*in vivo*) ir medetkų kaliaus ekstraktai, kurių slopinimo zonos vidurkiai siekė 8,6 ir 8,3 mm. Silpniausią antibakterinį poveikį turėjo dygminių lapų kaliaus (1) ekstraktas – 6,1 mm.



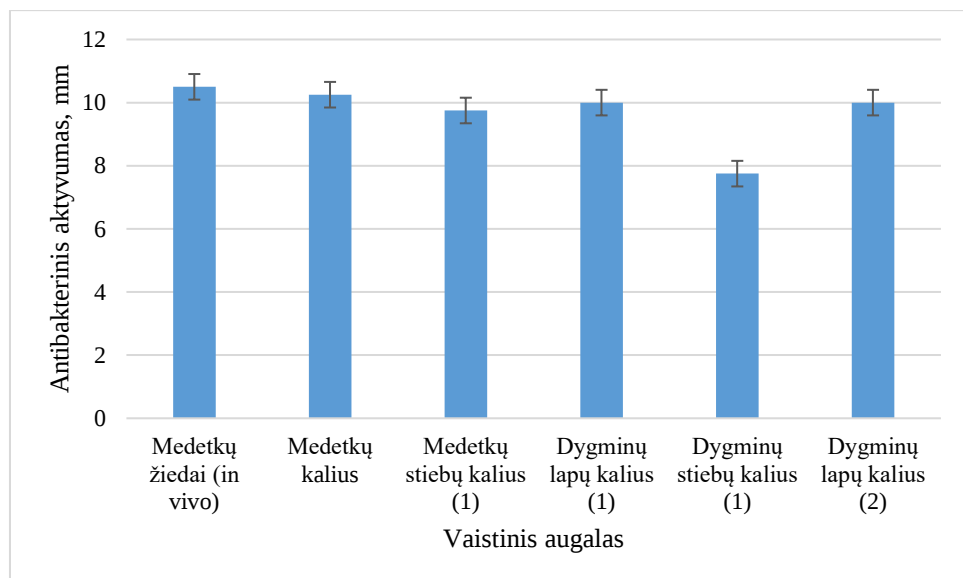
3.40 pav. Vaistinių augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*

Stipriausią antibakterinį poveikį *Rhizobium radiobacter* bakterijoms turėjo medetkų kaliaus ekstraktas, kurio bakterijos slopinimo zonos vidurkis buvo 11,2 mm. Šiek tiek mažesnėmis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo medetkų žiedų (*in vivo*), medetkų stiebų kaliaus ekstraktai, bei dygminių lapų kaliaus (1) ir dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktai. Silpniausią antibakterinį poveikį turėjo medetkų stiebų kaliaus (2) ekstraktas – 6,6 mm.



3.41 pav. Vaistinių augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli*

Atlikus antibakterinio poveikio įvertinimą prieš *Escherichia coli* bakterijas, nustatyta, kad stipriausiomis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo medetkų žiedų (*in vivo*) ekstraktas – 12,5 mm. Silpnesnes savybes parodė dygminių lapų kaliaus (1) ir dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktai – 11,7 ir 11,5 mm. Silpniausias antibakterines savybes turėjo dygminių kaliaus ekstraktas – 7,5 mm.



3.42 pav. Vaistinių augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *Xanthomonas campestris*

Tyrimo metu taip pat nustatyta, kad stipriausią antibakterinį poveikį *Xanthomonas campestris* bakterijoms turėjo medetkų žiedų ir medetkų kaliaus ekstraktai, kurio bakterijos slopinimo zonos vidurkis buvo 10,5 ir 10,2 mm. Šiek tiek mažesnėmis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo dygminių lapų kaliaus (1), medetkų stiebų kaliaus (1) ir dygminių lapų kaliaus (2) ekstraktai. Silpniausią antibakterinį poveikį turėjo dygminių stiebų kaliaus (1) ekstraktas – 7,7 mm.

3.17. Antioksidantų ir tiriamojo junginio tyrimai

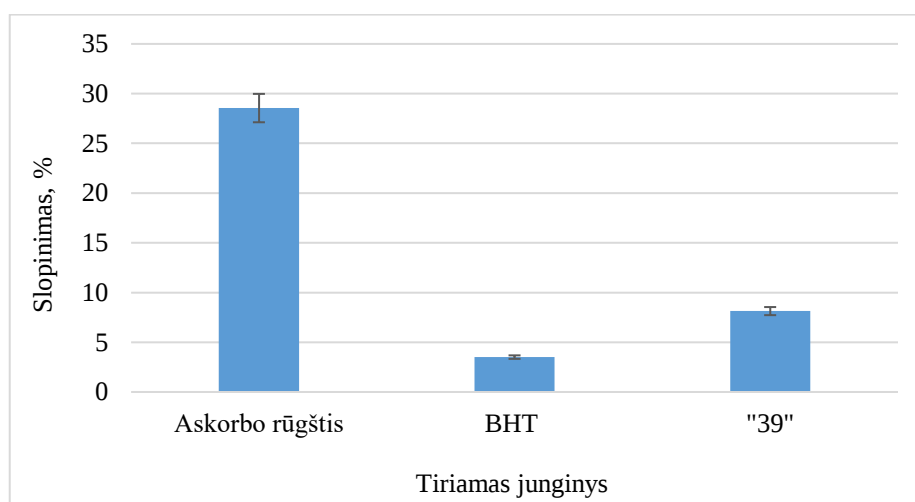
3.17.1. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Antiradikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai. Todėl tolimesniam tyrimui buvo paruošti askorbo rūgštis, butilino hidroksitolueno (BHT) ir „39“ junginio tirpalai. Išmatuota jų šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje ir gauti rezultatai naudoti antioksidacinio aktyvumo skaičiavimams.

3.9 lentelė. Tiriamų junginių tirpalų šviesos sugerties rezultatai 515 nm bangos ilgyje

Tiriamas junginys	Šviesos sugertis 515 nm
Askorbo rūgštis	0,448
BHT	0,605
"39"	0,576

Apskaičiuotas tiriamų junginių antioksidacinis aktyvumas. Nustatyta kiek procentų stabilaus DPPH radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai (3.43 pav.).



3.43 pav. Tiriamų junginių antioksidacinis aktyvumas

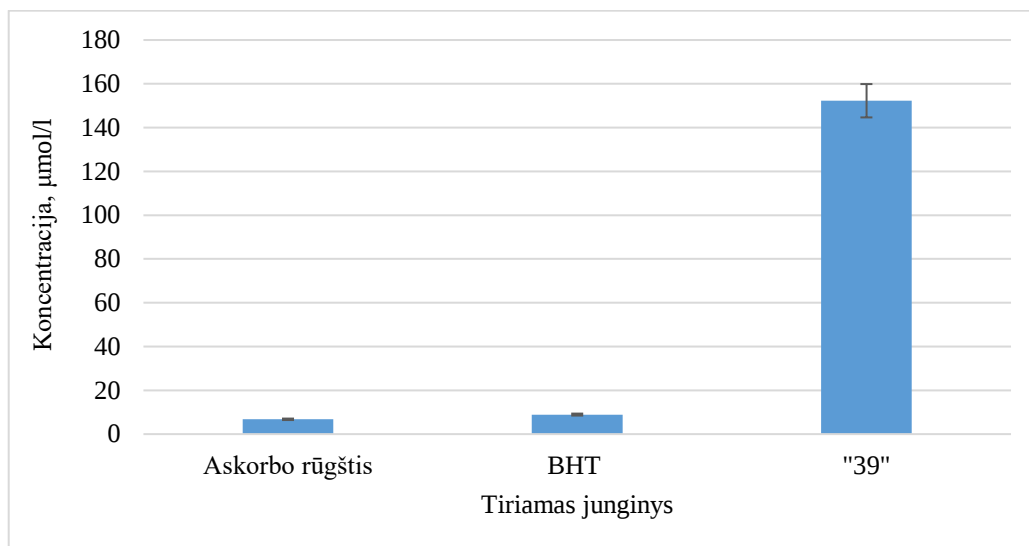
Atlikus tiriamų junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimą DPPH metodu, nustatyta, kad askorbo rūgštis neutralizuoja didžiausią kiekį (28,5 %) stabilaus DPPH radikalo, „39“ junginio tirpalas slopino 8 % ir BHT 3,5 %.

3.17.2. Antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Paruošti askorbo rūgštis, BHT ir „39“ junginio tirpalai, išmatuota jų šviesos sugertis 593 nm bangos ilgyje (3.10 lentelė) ir apskaičiuotas tiriamų junginių antioksidacinis aktyvumas (3.44 pav.).

3.10 lentelė. Tiriamų junginių tirpalų šviesos sugerties rezultatai 593 nm bangos ilgyje

Tiriamas junginys	Šviesos sugertis 593 nm
Askorbo rūgštis	0,104
BHT	0,134
"39"	2,097

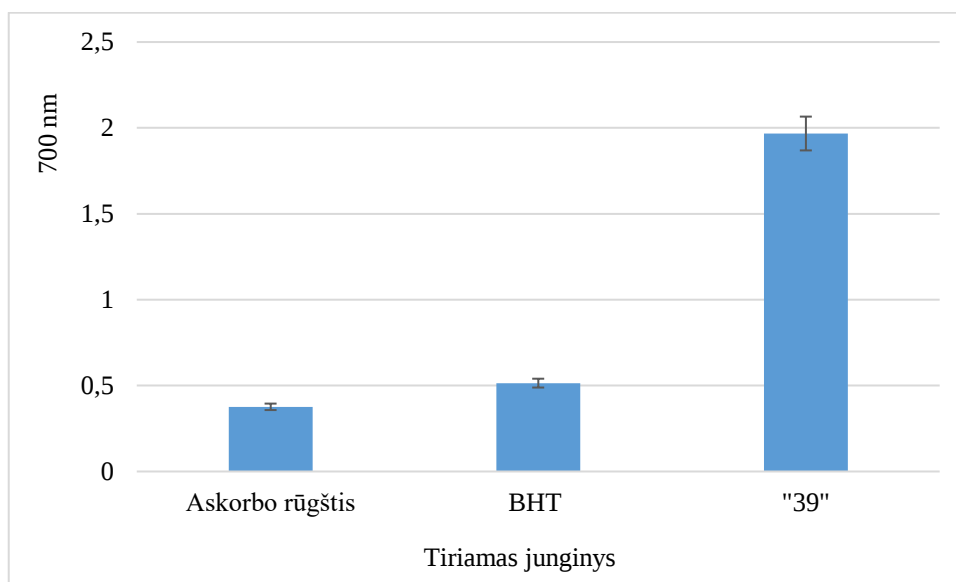


3.44 pav. Tiriamų junginių antioksidacinis aktyvumas

Atlikus antioksidacinio aktyvumo tyrimą askorbo rūgšties, BHT ir „39“ junginio tirpalams pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną, nustatyta, kad stipriausias antioksidacines savybes turėjo „39“ junginys ($152 \mu\text{mol/l}$). Pramoniniai antioksidantai pasižymėjo labai silpnomis antioksidacinėmis savybėmis: BHT – $8,9 \mu\text{mol/l}$ ir askorbo rūgštis – $6,7 \mu\text{mol/l}$.

3.17.3. Redukcinių savybių įvertinimas

Išmatuojama paruoštų askorbo rūgšties, BHT ir „39“ junginio tirpalų šviesos sugertis 700 nm bangos ilgyje (3.45 pav). Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcinės savybes.



3.45 pav. Tiriamų junginių redukcinių savybių įvertinimas

Atlikus redukcinių savybių įvertinimą tiriamuose junginiuose, nustatyta, kad „39“ junginys turi stipriausias redukcinės savybes (šviesos sugertis $1,967$). Daug silpnesnėmis savybėmis pasižymėjo pramoniniai antioksidantai – BHT šviesos sugertis siekė $0,514$, o askorbo rūgšties $0,376$.

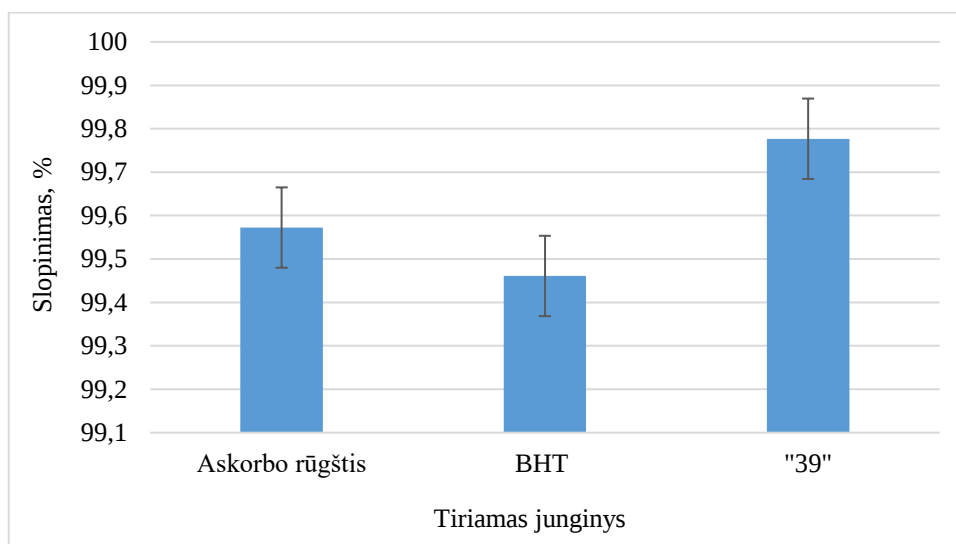
3.17.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

ABTS metodas paremtas radikalo anijono slopinimu, kuris turi mėlynai - žalią spalvą. Askorbo rūgšties, BHT ir „39“ junginio šviesos sugertis buvo matuojama 734 nm bangos ilgyje (3.11 lentelė).

3.11 lentelė. Vaistinių augalų ekstraktų tirpalų šviesos sugerties rezultatai 734 nm bangos ilgyje

Tiriamas junginys	Šviesos sugertis 734 nm
Askorbo rūgštis	0,0077
BHT	0,0097
"39"	0,0040

Įstačius gautus rezultatus į formulę (3) apskaičiuotas tiriamų junginių antioksidacinis aktyvumas. Nustatyta kiek procentų radikalo anijono yra slopinama askorbo rūgšties, BHT ir „39“ junginio tirpaluose (3.46 pav.).



3.46 pav. Tiriamų junginių antioksidacinis aktyvumas

Šiame tyrime, stipriausias antioksidacines savybes, taip pat parodė „39“ junginys, kurio slopinamas poveikis radikalo anijonui buvo net 99,77 %. Šiek tiek mažesniu slopinimu pasižymėjo ir pramoniniai antioksidantai. Askorbo rūgšties slopinamas poveikis buvo 99,57 %, o BHT – 99,46 %.

4. Rekomendacijų dalis

Liuteino gamybos principinėje schemoje (4.1 pav.) pavaizduota, kaip iš medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) žiedų, galima gauti bioaktyviąją medžiagą – liuteiną.

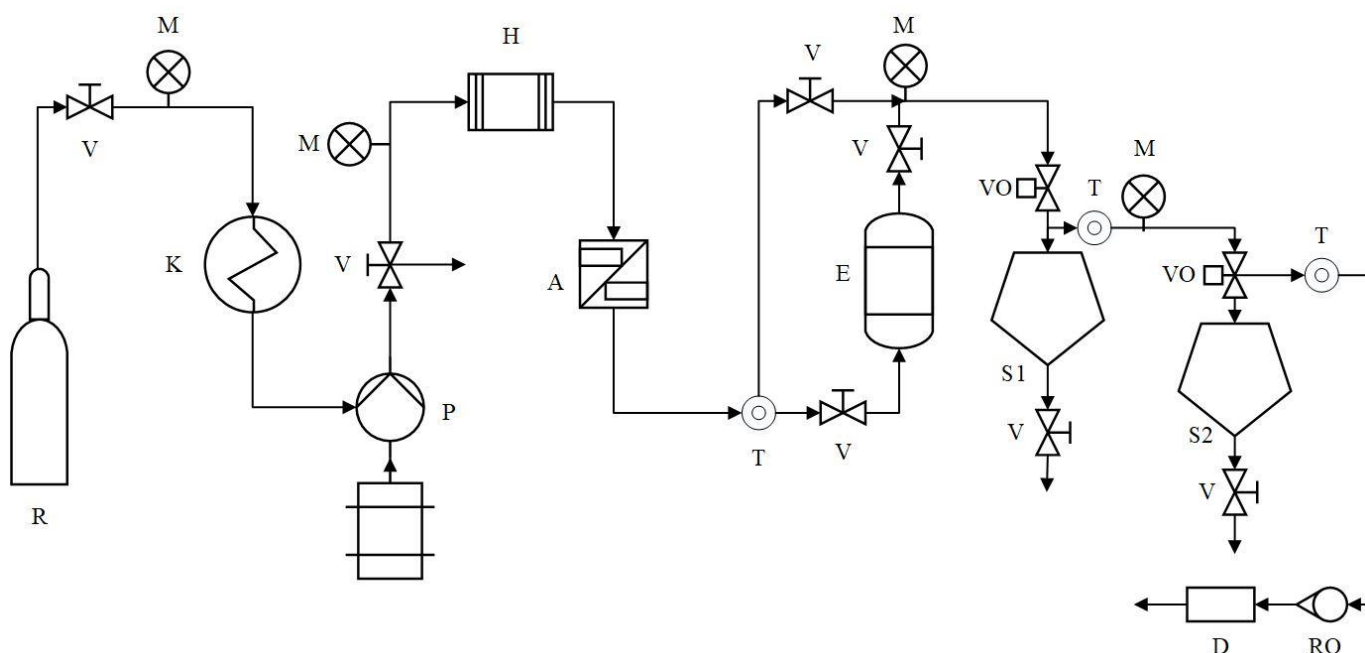
Ekstrahavimas naudojant superkritinę CO₂ būseną yra populiari gamybos iš augalinių medžiagų technika. Augalų aliejus paprastai susideda iš mono- ir seskviterpeno angliavandenilių bei jų deguonies darinių, daugiausia alkoholių, ketonų ir aldehidų. Įprasti procesai, tokie kaip distiliavimas, ekstrahavimas tirpikliais ir kt., dažnai reikalauja papildomų veiksmų, tokių kaip ekstrakto atskyrimas, o ir jų selektyvumas paprastai yra prastesnis. Be to, naudojant žemesnę temperatūrą išvengiama terminio skilimo, o mažas vandens kiekis riboja hidrolizės procesą. Taigi, gautuose lakiuose koncentratuose nėra riebalų rūgščių, dervų, vaškų ir dažiklių, kurie paprastai ekstrahuojami įprastiniu tirpiklio ekstraktu, o produktas yra panašesnis į pradinę medžiagą, iš kurios jis buvo gautas. Beveik išskirtinis suspausto CO₂ panaudojimas lakiųjų medžiagų ar aromatinių medžiagų, skirtų žmonių mitybos, farmacijos ir kvepalų pramonei, išgaunamas dėl jo cheminių ir fizikinių savybių. Jis yra saugus, netoksiškas, nedegus, nebrangus, o jo kritinė temperatūra ir slėgis nėra aukšti (31,06 °C; 73,82 baro). Be to, daugelis junginių rodo lengvą tirpumą superkritiniame CO₂ [38].

Superkritinio CO₂ ekstrakcija atliekama laboratoriniame aparate, kuriame įrengtas 400 cm³ ekstrakcijos indas, veikiantis perėjus vienkartiniam CO₂ praleidimo būdai per fiksuotą augalinių dalelių sluoksnį. Aukšto slėgio diafragminis siurblys P, kurio maksimali galia yra 6 kg/h, pumpuoja skystą CO₂, pasirenkant norimą srauto greitį. Tada CO₂ pašildomas iki ekstrahavimo temperatūros termostatu valdomame šildytuve H (tikslumas 0,02 °C). Vaškai padeda gauti lakų koncentratą iš dviejų nuosekliai sujungtų separatorių, S1 ir S2, atitinkamai 300 cm³ ir 200 cm³. Pirmas separatorius aušinamas naudojant termostatą. Antrasis separatorius leidžia skystą produktą išleisti norimais laiko intervalais. Ekstrahavimas atliekamas pusiau nuolatinio režimu. CO₂ srautas stebimas kalibruotu rotametu RO, esančiu po antro separatoriaus S2. Visas ekstrahavimo bandymo metu išleistas CO₂ matuojamas sausu dujų tūrio matuokliu D. Temperatūra ir slėgis ekstrahavimo metu matuojami naudojant atitinkamai termoporas (T) ir manometrus (M). Slėgį reguliavo dideli slėgio vožtuvai valdomi rankiniu būdu (VO).

Lakus *C. officinalis* L. žiedų koncentratas gaunamas esant 90 barų ir 50 °C temperatūrai (CO₂ tankis 0,287 g/cm³). Ekstraktas analizuojamas naudojant GC/MS, kad būtų galima stebėti jo sudėtį. Pasirenkamos sąlygos, sukeliančios visų vaškų nusėdimą pirmajame separatoriuje: 90 barų ir -5 °C. Tomis pačiomis veikimo sąlygomis lakiųjų junginių tirpumas labai didelis. Antrame separatoriuje randamas tik lakus koncentratas, kurio veikimo sąlygos pasirinktos siekiant sumažinti lakiųjų koncentratų nuostolius dujiniame CO₂ sraute, išeinančiame iš aparato. Išnaudotoje matricoje atliekamas tolesnis ekstrahavimas didesniu slėgiu (320 barų) ir 5 °C temperatūroje su vienu separatoriumi liuteinui ekstrahuoti iš medetkų žiedų.

Lakų koncentratą, gautą antrame separatoriuje, veikiančiame 15 barų ir 15 °C temperatūroje, daugiausia sudaro metilheksadekanoatas (23,8 %), metilo linoleatas (18,6 %), metilas 9,12,15-oktadekatrienoatas (17,2 %), metiloktadekanoatas (4,8%), metiltetradekanoato (4,6 %), γ-kadineno ir kubenolio (4,0 %), 6-kadineno (3,2 %), α-kadinolio (1,8 %) ir oplopanono (1,3 %). Lakiųjų koncentratų išeiga gaunama 0,18 % masės medžiagos, esančios ekstraktoriuje. Naudojant superkritinį CO₂, iš *Calendula officinalis* L. žiedų galima išskirti didesnės molekulinės masės junginius, tačiau lakiųjų koncentratų sudėtį galima keisti keičiant veikimo parametrus. Ekstrahavimas atliekamas esant 320 barų slėgiui ir 50 °C temperatūrai 360 min. Ekstraktą sudaro vaškai (70 %) ir esteriai (30 %).

Šiame ekstrakte yra liuteino, kurio išeiga apie 0,01 %. Norint gauti patenkinamą regeneraciją (> 70 %), reikia veikti esant aukštam slėgiui (700 barų) [39, 40].



4.1 pav. Principinė aparatūrinė schema liuteinui gauti iš medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) žiedų

4.1 lentelė. Aparatūrinėje schemoje naudojami prietaisai

Prietaiso žymėjimas	Prietaisas
R	CO ₂ tiekimo rezervuaras
V	vožtuvas
M	manometras
K	kaitinimo elementas
P	aukšto slėgio diafragminė siurblys
H	šildytuvas
A	pulsacijos amortizatorius
T	termoporos
E	ekstrakcijos indas
S1, S2	separatorius
RO	rotametas
VO	slėgio reguliavimo vožtuvai
D	dujų tūrio matuoklis

Superkritinio CO₂ ekstrahavimo privalumai:

- gaunamas kokybiškas produktas – išsaugomi naudingi komponentai;
- procesas yra švarus – CO₂ dujos yra inertiškos, galutinis produktas neturi pašalinių medžiagų, o ekstraktuose lieka didelė koncentracija veikliųjų medžiagų ir biologiškai aktyvių junginių;

- procesas yra aplinkai nežalingas – gamybos proceso metu neišskiriama gamybinių atliekų;
- platus pritaikymas – tinkama ekstrahuoti medžiagoms, neatsparioms karščiui;
- galimybė gauti ekstraktus, kurių aromatas labai artimas pradinei žaliavai.

Išvados

1. Suformuotos medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūros *in vitro* iš lapų, stiebų ir šaknų. Medetkos lapų ir šaknų kaliaus kultūros *in vitro*, lyginant su medetkos žiedais *in vivo*, turėjo mažiau antioksidacinių fermentų, patyrė didesnę oksidacinę stresą, tačiau beveik nesiskyrė antioksidacinėmis savybėmis.
2. Ištyrus medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) ir dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.) antioksidacinį aktyvumą, nustatyta, kad stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo dygminų stiebų kaliaus (TDZ 0,5 mg/l; NAR 0,2 mg/l) ekstraktas, kurio antioksidacinis aktyvumas siekė 24,06 µmol/l.
3. Nustatyti antioksidaciniai fermentai medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) ir dygmino (lot. *Carthamus tinctorius* L.) augalų ekstraktuose, kuriuose askorbatperoksidazės, superoksido dismutazės ir katalazės didžiausias aktyvumas buvo medetkų žiedų *in vivo* ekstrakto. Didžiausios fenolinių junginių koncentracijos nustatytos medetkų šaknų kaliaus su *N*-(1,3-dioksoizindolin-2-il)-3-((4-metoksifenil)amino) propanamido junginiu ekstrakto, o didžiausia liuteino koncentracija buvo rasta medetkos žieduose *in vivo*.
4. Stipriausiomis antibakterinėmis savybėmis prieš gramneigiamas bakterijas pasižymėjo medetkų (lot. *Calendula officinalis* L.) ekstraktai. Medetkų žiedų *in vivo* ekstrakto slopinimo zona prieš *Escherichia coli* siekė 1,25 cm.
5. Pateikta liuteino aparatūrinė schema bioaktyviajam junginiui - liuteinui ekstrahuoti, naudojant superkritinę CO₂ ekstrakciją iš medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) žiedų.

Literatūros sąrašas

1. H. S. CHAWLA, Introduction to Plant Biotechnology. Pantnagar, India, CRC Press, 2011, pp. 760. ISBN 978-1-57808-636-8.
2. JIKUN HUANG, SCOTTROZELLE, CARL PRAY, QINFANG WANG, Plant Biotechnology in China. JAV, 2002, Volume 295, Issue 5555, pp. 674–676. Prieiga per: doi: 10.1126/science.1067226
3. WUSHENG LIU, JOSHUA S. YUAN, C. NEAL STEWART JR, Advanced genetic tools for plant biotechnology. *Nature Reviews Genetics*. Teksasas, JAV, 2013, Volume 107, Issue 1506, pp. 781–793. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1038/nrg3583>. ISSN 1471-0064.
4. GARY H TOENNIESSEN, JOHN CO'TOOLE, JOSEPHDEVRIES, Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Current Opinion in Plant Biology*. JAV, 2003, Volume 6, Issue 2, pp. 191–198. Prieiga per: Science Direct. doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00002-5).
5. THOMAS EFFERTH, Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*. Germany, 2019, Volume 5, Issue 1, pp. 50–59. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>.
6. HARINDER P. S. MAKAR, P. SIDDHURAJU, KLAUS BECKER, Plant Secondary Metabolites. Vokietija, Humana Press 2007, pp. 130. Prieiga per: Springer. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-425-4>. ISBN 978-1-59745-425-4.
7. ARNOLD L. DEMAINE, AIQI FANG, The Natural Functions of Secondary Metabolites. *History of Modern Biotechnology I*. Cambridge, JAV, 2001, Volume 69, pp. 1–39. Prieiga per: Springer. doi: https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1. ISBN 978-3-540-44964-5.
8. NELOFER JAN, KHURSHID IQBAL ANDRABI, RIFFAT JOHN, Calendula officinalis - An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. India, 2017, Nr. 4, pp. 769–787. Prieiga per: ResearchGate. doi: 10.16943/ptinsa/2017/49126.
9. BURCU ÇETIN, FATİH KALYONCU, BETÜL KURTULUŞ, Antibacterial activities of Calendula officinalis callus extract. *International Journal of Secondary Metabolite*. Turkija, 2017, Volume 4, Issue 3, pp. 257-263. Prieiga per: ResearchGate. ISSN 2148-6905. doi:10.21448/ijsm.372108.
10. ANTANAS ŠARKINAS, Bendrosios mikrobiologijos laboratoriniai darbai. Lietuva, 2013. Prieiga per: KTU ebooks. ISBN 978-609-02-0883-0, doi: 10.5755/e01.9786090208830
11. MARIKO SASAKI, YOKO OZAWA, TOSHIHIDE KURIHARA, Neuroprotective Effect of an Antioxidant, Lutein, during Retinal Inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. Japonija, 2009, Volume 50, Issue 3, pp. 1433–1439. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2493>.
12. LE MA, XIAO-MING LIN, Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Kinija, 2010, Volume 90, Issue 1, pp. 2–12. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3785>.

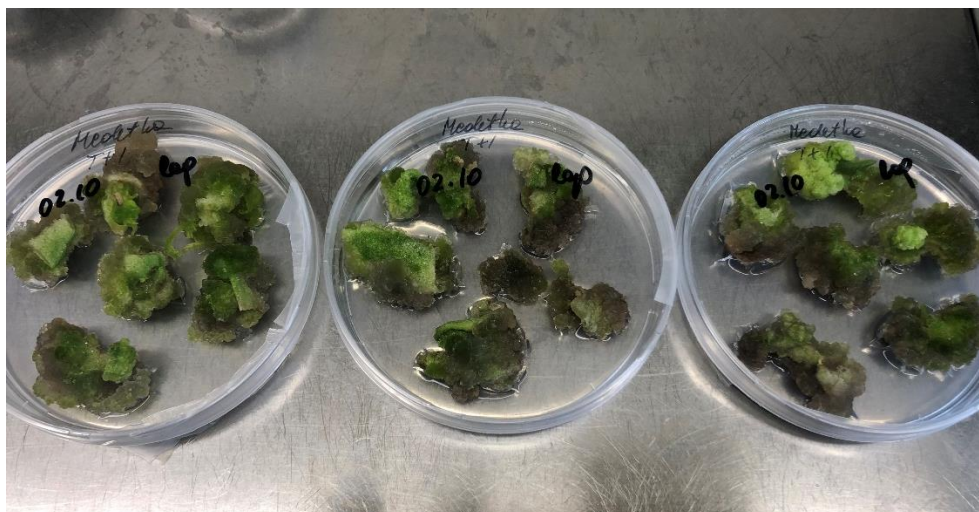
13. MONICA BUTNARIU, IOAN SARAC, MARIUS PENTEA, Approach for Analyse Stability of Lutein from *Tropaeolum majus*. *Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition*. Bukareštas, 2016, Volume 67, Issue 3, pp. 503–506. Prieiga per: ResearchGate. ISSN 1582-9049.
14. INGRIDA TUMOŠIENĖ, KRISTINA KANTMINIENĖ, ARNAS KLEVINSKAS, VILMA PETRIKAITĖ, ILONA JONUŠKIENĖ, Vytautas Mickevičius, Antioxidant and Anticancer Activity of Novel Derivatives of 3-[(4-Methoxyphenyl)amino]propane-hydrazide. *Molecules*. Lietuva, 2020, pp. 5-6. Prieiga per: doi:10.3390/molecules25132980.
15. MONIKA BARTEKOVÁ, ADRIANA ADAMEOVÁ, ANIKÓ GÖRBE, Natural and synthetic antioxidants targeting cardiac oxidative stress and redox signaling in cardiometabolic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. Kanada, 2021, Volume 169, pp. 446–477. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.045>.
16. ELAHE DELSHAD, MAHDI YOUSEFI, PAYAM SASANNEZHAD, HASAN RAKHSHANDEH, ZAHRA AYATI, Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): a comprehensive review from Traditional Medicine to Modern Medicine. *Electron Physician*. Iran, 2018, Volume 10, Issue 4, pp. 6672–6681. Prieiga per: doi: 10.19082/6672.
17. JUDONG YEO, FEREIDOON SHAHIDI, JOSEPH SMITH, Safflower Oil. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 2005, pp. 126–219. ISBN: 9780471678496. Prieiga per : doi: <https://doi.org/10.1002/047167849X.bio052>.
18. ALI ESMAIL AL-SNAFI, The Chemical Constituents and Pharmacological Importance of *Carthamus Tinctorius*-an overview. *Journal of Pharmaceutical Biology*. Irakas, 2015, Volume 5, Issue 3, pp. 143-166. ISSN - 2249-7560.
19. JINOUS ASGARPANAH, NASTARAN KAZEMIVASH, Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. Kinija, 2013, pp. 153–159. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1007/s11655-013-1354-5>.
20. SONJA GADZOVSKA, VALENTINA PAVLOVA, MAJA NASTESKA, ALEKSANDRA NESKOSKA, MIRKO SPASENOSKI, Secondary metabolite production in *in vitro* shoots of marigold (*Calendula officinalis* L.). Proceedings of the III Congress of Ecologists of Macedonia. Makedonija, 2007, Volume 8. ISSN 06-09.10.2007.
21. F. GHANATI, S. BAKHTIARIAN, P. ABDOLMALEKI, Induction of changes in secondary metabolites and essential oils of *Calendula officinalis* L. by methyl jasmonate. *Planta Medica Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research*. Iranas, 2011, Volume 77. Prieiga per: doi: 10.1055/s-0031-1282296.
22. MONICA BUTNARIU, CRISTINA ZEPÄ CORADINI, Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *BioMed Central*. Rumunija, 2012; Volume 6, pp. 35. Prieiga per: doi: 10.1186/1752-153X-6-35.
23. MARYAM CHAVOUSHI, FARZANEH NAJAFI, AZAM SALIMI, SEYED ABDOLHAMID ANGAJI, Effect of salicylic acid and sodium nitroprusside on growth parameters, photosynthetic pigments and secondary metabolites of safflower under drought stress. *Scientia Horticulturae*. 2020, Volume 259. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108823>.

24. FENGMING TAN, HAIMING CUI, CHAO BAI, CUIYING QIN, LULU XU, JING HAN, Preparation, optimization, and transcorneal permeability study of lutein-loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Kinija, 2021, Volume 62. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102362>.
25. CRISTINA TOMÁS-ZAPICO, ANA COTO-MONTES, A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of Pineal Research*. 2005, Ispanija, Volume 39, Issue 2, pp. 99 – 104. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x>.
26. GUILLERMO T. SÁEZ, NURIA ESTÁN-CAPELL, Antioxidant Enzymes. *Encyclopedia of Cancer*. 2017, Berlynas, pp. 288 – 292. Prieiga per: Springer. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_7210.
27. ARIANNA CAROLINA ROSA, NATASCIA BRUNI, GIORGIA MEINER, DANIELE CORSI, NICCOLÒ CAVI, DANIELA GASTALDI, FRANCO DOSIO, Strategies to expand the therapeutic potential of superoxide dismutase by exploiting delivery approaches. *International Journal of Biological Macromolecules*. Italija, 2021, Volume 168, pp. 846 – 865. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.149>.
28. ABEERA SHAEER, MEHWISH ASLAM, NAEEM RASHID, Structural and functional analyses of a novel manganese-catalase from *Bacillus subtilis* R5. *International Journal of Biological Macromolecules*. Pakistanas, 2020, Volume 180, pp. 222 – 233. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.074>.
29. SUN-CHOL YU, IN-CHOL KIM, KUM-JU RI, JIN IR, HARTMUT KÜHN, New insight into the role of glutathione reductase in glutathione peroxidase-like activity determination by coupled reductase assay: Molecular Docking Study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vokietija, 2020, Volume 215. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111276>.
30. MAGNUS RÖDING, LEANDER LACROIX, ANNIKA KRONA, TOBIAS GEBÄCK, NIKLAS LORÉN, A Highly Accurate Pixel-Based FRAP Model Based on Spectral-Domain Numerical Methods. *Biophysical Journal*. Švedija, 2019, Volume 116, Issue 7, pp. 1348-1361. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.02.023>.
31. KANDI SRIDHAR, ALBERT LINTON CHARLES, *In vitro* antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH radical and ABTS radical assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*. Indonezija, 2019, Volume 275, pp. 41-49. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.040>.
32. HUMA ALI, SAVITA DIXIT, *In vitro* antimicrobial activity of flavanoids of *Ocimum sanctum* with synergistic effect of their combined form. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Indija, 2012, Volume 2, Supplement 1, pp. 396-398. Prieiga per: Science Direct. doi: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60189-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60189-3).
33. J. A. POVEDA-GIRALDO, C. A. CARDONA ALZATE, A biorefinery for the valorization of marigold (*Calendula officinalis*) residues to produce biogas and phenolic compounds. *Food and Bioprocess Processing*. Kolumbija, 2020, Volume 125, pp. 91-104. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.015>.

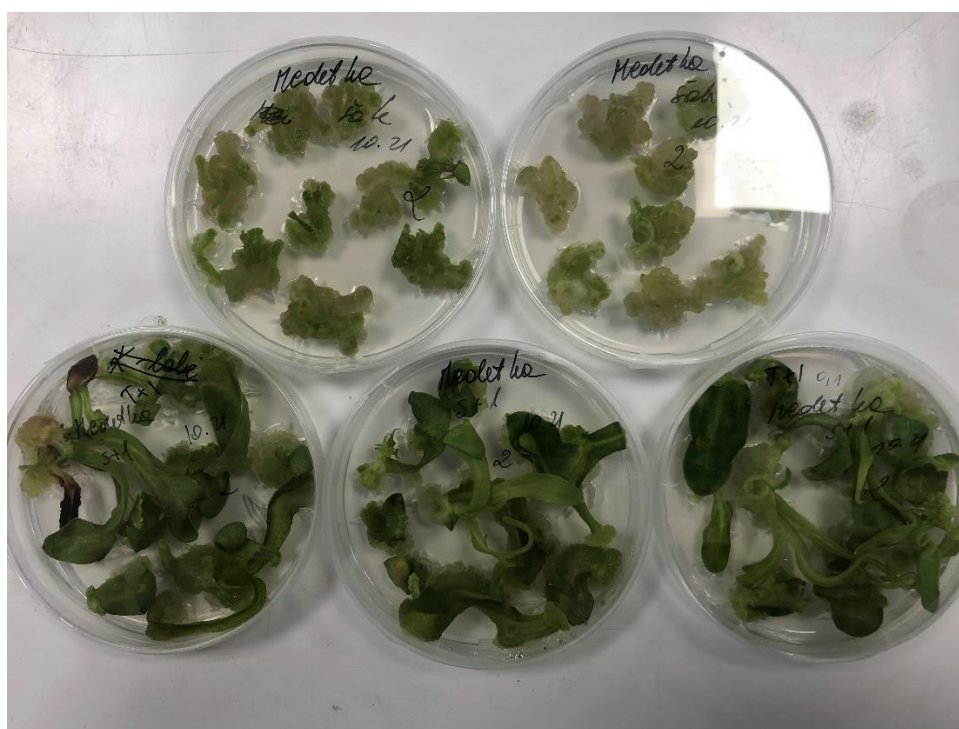
34. TSUTOMU KANEHIRA, SUSUMU TAKEKOSHI, HIDETAKA NAGATA, KENTARO MATSUZAKI, A novel and potent biological antioxidant, Kinobeaon A, from cell culture of safflower. *Life Sciences*. Japonija, 2003, Volume 74, Issue 1, pp. 87-97. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.06.033>.
35. GISLENE G. F. NASCIMENTO, JULIANA LOCATELLI, PAULO C. FREITAS, GIULIANA L. SILVA, Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. Brazilija, 2000, Volume 31, Issue 4. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>. ISSN 1678-4405.
36. ILONA JONUŠKIENĖ, Augalų ir mikroorganizmų biotechnologija. Lietuva, 2012, pp. 131. Prieiga per: KTU ebooks. doi: 10.5755/e01.9786094331886. ISBN: 978- 609-433-188-6.
37. JIAN-HAOLIN, DUU-JONGLEE, JO-SHUCHANG, Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*. Taivanas, 2015, Volume 184, pp. 421-428. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.099>.
38. MAŠA HOJNIK, MOJCA ŠKERGET, ŽELJKO KNEZ, Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Science and Technology*. Slovėnija, 2008, Volume 41, Issue 10, pp. 2008-2016. Prieiga per: Science Direct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.017>.
39. NICOLETTA CRABAS, BRUNO MARONGIU, ALESSANDRA PIRAS, TIZIANA PIVETTA, SILVIA PORCEDDA, Extraction, Separation and Isolation of Volatiles and Dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* Britton by Supercritical CO₂. *Journal of Essential Oil Research*. Italija, 2011, Volume 15, pp. 272 – 277. Prieiga per: doi: 10.1080/10412905.2003.9712141.
40. IFEANYI D., UDENIGWE, CHIBUIKE C., ALUKO, ROTIMI E., Lutein and zeaxanthin: production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. *Trends in Food Science & Technology*. Kanada, 2015, pp. 1 – 30. Prieiga per: doi: 10.1016/j.tifs.2015.12.005.

Priedai

1 priedas. Medetkos kaliaus kultūros *in vitro*.



1.1 pav. Medetkų lapų kaliaus kultūros



1.2 pav. Medetkų šaknų ir lapų kaliaus kultūros

2 priedas. Vaistinių augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas prieš gramneigiamas bakterijas.



2.1 pav. Medetkų žiedų (*in vivo*) ekstrakto slopinimo zona 9,9 mm



2.2 pav. Medetkų kaliaus (BAP 2,5 mg/l; NAR 0,5 mg/l) ekstrakto slopinimo zona 10 mm



2.3 pav. Dygminių lapų kaliaus (BAP 1,8 mg/l; 2,4 D 0,3 mg/l; Kazeinas 0,1%) ekstrakto slopinimo zona 8,8 mm



2.4 pav. Dygminių stiebų kaliaus (BAP 1,8 mg/l; 2,4 D 0,3 mg/l; Kazeinas 0,1%) ekstrakto slopinimo zona 9,1 mm