

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Urtė Griškevičienė

**LIETUVOJE AUGANČIŲ DYGIŲJŲ
USNIŲ (*CIRSIIUM VULGARE* (SAVI)
TEN.) FITOCHEMINIS TYRIMAS
IR BIOLOGINIO POVEIKIO
ĮVERTINIMAS**

Daktaro disertacija
Medicinos ir sveikatos mokslai,
farmacija (M 003)

Kaunas, 2025

Disertacija rengta 2020–2024 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedroje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Liudas Ivanauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto farmacijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Lina Raudonė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Nariai:

prof. dr. Ramunė Morkūnienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003);

doc. dr. Vilma Kaškonienė (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003);

dr. Vaida Sirgedaitė-Šėžienė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – N 012);

prof. dr. Roman Lesyk (Danylo Halytsky Lvovo nacionalinis medicinos universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Disertacija bus ginama viešame Farmacijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2025 m. birželio 26 d. 9 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto „Santakos“ slėnio Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro A-202 auditorijoje.

Disertacijos gynimo adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Urtė Griškevičienė

**PHYTOCHEMICAL STUDY AND
EVALUATION OF THE BIOLOGICAL
EFFECTS OF BULL THISTLE
(*CIRSIIUM VULGARE* (SAVI) TEN.)
GROWING IN LITHUANIA**

Doctoral Dissertation
Medical and Health Sciences,
Pharmacy (M 003)

Kaunas, 2025

Dissertation has been prepared at the Department of Analytical and Toxicological Chemistry in the faculty of Pharmacy of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2020–2024.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Liudas Ivanauskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

Dissertation is defended at the Pharmacy Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Lina Raudonė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

Members:

Prof. Dr. Ramunė Morkūnienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003);

Assoc. Prof. Dr. Vilma Kaškonienė (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Chemistry – N 003);

Dr. Vaida Sirgedaitė-Šežienė (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Natural Sciences, Ecology and Environmental – N 012);

Prof. Dr. Roman Lesyk (Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

Dissertation will be defended at the open session of the Pharmacy Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on the 26th of June, 2025 at 9 a.m. in the A-202 auditorium of “Santaka” Valley Centre for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies.
Address: Sukilėlių 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	7
ĮVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1.1. Dygiųjų usnių (<i>C. vulgare</i>) morfologija ir paplitimas.....	14
1.2. Dygiųjų usnių (<i>C. vulgare</i>) fitocheminės sudėties tyrimo metodai	15
1.3. Dygiųjų usnių (<i>C. vulgare</i>) ekstraktų biologinio aktyvumo tyrimai.....	21
1.3.1. Antioksidacinio poveikio tyrimai.....	21
1.3.2. Priešvėžinio aktyvumo tyrimai	24
1.3.3. Antimikrobinio aktyvumo tyrimai	28
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	32
2.1. Tyrimo objektas.....	32
2.2. Medžiagos ir reagentai	32
2.3. Ekstrakcijos metodai	33
2.4. Tyrimo metodai	34
2.5. Antioksidacinio aktyvumo <i>in vitro</i> nustatymas.....	36
2.6. Priešvėžinio aktyvumo <i>in vitro</i> nustatymas.....	36
2.7. Antimikrobinio aktyvumo <i>in vitro</i> nustatymas.....	38
2.8. Statistinė analizė.....	39
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	40
3.1. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties nustatymas <i>C. vulgare</i> augalinių žaliavų ekstraktuose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu	40
3.1.1. Ekstrakcijos sąlygų parinkimas.....	40
3.1.2. ESC metodikos fenolinių junginių nustatymui <i>C. vulgare</i> augalinės žaliavos ekstraktuose validavimas	46
3.1.3. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties <i>C. vulgare</i> augalinių žaliavų ekstraktuose nustatymas	49
3.2. Aminorūgščių kokybinės ir kiekybinės sudėties <i>C. vulgare</i> augalinės žaliavos ekstraktuose nustatymas DC–MS metodu.....	59
3.2.1. DC–MS metodikos aminorūgščių nustatymui <i>C. vulgare</i> augalinės žaliavos ekstraktuose validacija	59
3.2.2. Aminorūgščių kokybinės ir kiekybinės sudėties <i>C. vulgare</i> augalinių žaliavų ekstraktuose nustatymas	62

3.3. Dygiosios usnies ekstraktų biologinio poveikio tyrimai	68
3.3.1. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas	67
3.3.2. Priešvėžinio poveikio tyrimai	71
3.3.3. Antimikrobinio poveikio tyrimas	81
IŠVADOS	87
SUMMARY	89
LITERATŪROS SĄRAŠAS	121
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS	132
MOKSLINIŲ KONFERENCIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS	133
PRIEDAI.....	134
CURRICULUM VITAE.....	139
PADĖKA	140

SANTRUMPOS

ABTS	–	2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis)
ATCC	–	Amerikietiškos ląstelių kultūros kolekcija (angl. <i>American type culture collection</i>)
A7G	–	apigenin-7-O-gliukozidas
BMR	–	branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija
CGA	–	chlorogeno rūgštis
CLSI	–	klinikinių ir laboratorinių standartų institutas
CUPRAC	–	vario redukcinė antioksidacinė galia (angl. <i>cupric reducing antioxidant capacity</i>)
DC-MS	–	dujų chromatografija – masių spektrometrija
DMD	–	diodų matricos detektorius
DPPH	–	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
EC ₅₀	–	koncentracija, kuri sukelia 50 proc. biologinių ar biocheminių funkcijų praradimą
ESC	–	efektyvioji skysčių chromatografija
FBS	–	fetalinis veršelių serumas
FRAP	–	geležies redukcinė antioksidacinė galia (angl. <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)
GSH	–	glutationas (γ-glutamilsteinoilglicinas)
HF	–	žmogaus odos fibroblastai
HT-29	–	žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos ląstelių linija
KATOIII	–	žmogaus skrandžio karcinomos ląstelių linija
LPO	–	lipidų peroksidacija
MSK	–	minimali slopinanti koncentracija
MTT	–	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
PC	–	plonasluoksnė chromatografija
SC-KFE/MS	–	skysčių chromatografijos – kietos fazės ekstrakcijos/masių spektrometrija
SOD	–	fermentas superoksido dismutazė
UESC	–	ultraefektyvioji skysčių chromatografija

IVADAS

Gamtinės kilmės junginiai yra perspektyvus bioaktyvių komponentų šaltinis, nes dažnai pasižymi mažesniu toksiškumu ir geba veikti sinergistiškai, sustiprindamos terapinį poveikį [1]. Ypatingas dėmesys skiriamas augalinės kilmės ekstraktams, kuriuose aptinkama biologiškai aktyvių junginių, galinčių turėti antimikrobinį, antioksidacinį ir priešvėžinį poveikį [2, 3]. Antimikrobinį ir priešvėžinį junginių atranka bei jų biologinių poveikių tyrimai yra viena iš prioritetinių šiuolaikinės medicinos ir farmakologijos mokslinių tyrimų kryptų. Didėjant atsparumui antibiotikams ir vėžio atvejų augimui, visame pasaulyje ieškoma naujų, efektyvių ir saugių terapinių alternatyvų [4, 5]. Tikslingas nepakankamai išnaudotų augalų tyrimas yra svarbus tiek moksliniu, tiek praktiniu požiūriu, nes leidžia atrasti naujus natūralios kilmės bioaktyvių junginių šaltinius, kurie gali būti pritaikomi maisto, farmacijos ar kosmetikos srityse. Daugelio tokių augalų biologinis poveikis ir cheminė sudėtis vis dar nėra pakankamai ištirti, todėl jų panaudojimo potencialas išlieka neišnaudotas. Ypač svarbu tirti augalus, gebančius augti ekstremaliomis ar nepalankiomis sąlygomis, nes jie dažnai turi išvystytus apsauginius biocheminius mechanizmus. Tokie mechanizmai lemia didesnę antrinių metabolitų, įskaitant antioksidantus ir fenolinius junginius, koncentraciją, o tai padidina jų biologinį aktyvumą ir galimą terapinį poveikį. Be to, šie junginiai gali turėti priešuždegiminį, antimikrobinį, priešvėžinį ar kitokią naudingą farmakologinį poveikį. Viena iš nepakankamai išnaudotų augalinių žaliavų, turinčių reikšmingą terapinį potencialą, yra dygioji usnis *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. [6].

Dygioji usnis (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.) yra astrinių (*Asteraceae*) augalų šeimai priklausantis žolinis augalas. *C. vulgare* yra paplitusi Europoje, Azijoje, Šiaurės Afrikoje ir Šiaurės Amerikoje. Lietuvoje dygioji usnis nėra priskiriama vaistiniams augalams. Tai ruderalinis augalas, kuris geba prisitaikyti prie aplinkos sąlygų, todėl šio augalo žaliavos panaudojimas – tvarus būdas panaudoti mažai vertintą natūralią florą. Šių augalinių žaliavų fitocheminės sudėties ir jų poveikio nustatymo tyrimai yra svarbi mokslinių tyrimų kryptis, leidžianti įvertinti šių augalinių žaliavų panaudojimo galimybes sveikatinimo srityse [7].

Dygosios usnies ekstraktuose nustatyti biologiškai aktyvūs junginiai (fenolio junginiai, aminorūgštys) pasižymi įvairiapusių biologiniu aktyvumu [6–9]. Fenolio junginiai, tokie kaip fenolinės rūgštys ir flavonoidai, pasižymi stipriu antioksidaciniu poveikiu – apsaugo ląsteles nuo oksidacinio streso, kuris yra susijęs su lėtinių ligų ir vėžinių susirgimų vystymusi [10]. Aminorūgštys, tokios kaip L-glutamo rūgštis ir L-asparto rūgštis, yra būtinos

žmogaus organizmui, nes dalyvauja metabolizmo procesuose. Šios aminorūgštys yra svarbios ląstelių augimui ir proliferacijai, nukleotidų sintezei ir gliukogenezei bei nervų sistemos vystymuisi [7, 11, 12]. Literatūroje aprašomi mokslinių tyrimų rezultatai apie dygiosios usnies ekstraktų priešuždegiminį, antiseptinį, hepatoprotekcinį ir diuretinį poveikius [7, 12–15]. Dygiosios usnies ekstraktai naudojami liaudies medicinoje reumatinio uždegimo požymiams gydyti, o nuovirai – skausmui mažinti [7, 9]. Atsižvelgiant į dygiosios usnies ekstraktų sudėtyje esančių biologiškai aktyvių junginių įvairovę ir jų farmakologinį potencialą, šis augalas išlieka vertingu natūralių bioaktyvių medžiagų šaltiniu, todėl svarbu plėsti šio augalo biologiškai aktyvių junginių identifikavimo ir jų biologinio poveikio tyrimus, siekiant įvertinti *C. vulgare* žaliavos potencialą sveikatinimo produktų gamyboje.

Norint nustatyti naujas *C. vulgare* augalinės žaliavos taikymo galimybes sveikatinimo srityse, būtina išsamiai analizuoti veiksnius, lemiančius šio augalo biologiškai aktyvių junginių sudėtis ir koncentracijos pokyčius. Biologiškai aktyvių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėtis nustatymui, *C. vulgare* augalinėje žaliavoje, svarbu taikyti metodus, kurių dėka galima tiksliai įvertinti augalinės žaliavos ir iš jos pagamintų produktų fitocheminę sudėtį. Šiuolaikinės validuotos metodikos leidžia įvertinti fitocheminę sudėtį skirtingais fenologiniais tarpsniais ir nustatyti, kada sukaupiama daugiausia biologiškai aktyvių junginių. Analizuojant skirtingas augalo dalis (žiedynus, lapus, šaknis), galima nustatyti junginių kaupimosi dėsningumus vegetatyviniuose ir generatyviniuose organuose. Dygiosios usnies augalinės žaliavos ekstraktų fitocheminę sudėtį svarbu tyrinėti išsamiau, siekiant nustatyti biologiškai aktyvius junginius, galinčius turėti reikšmingą poveikį organizmo ląstelėms. Atlikti tyrimai pateikia naujų mokslinių žinių ir padeda geriau suprasti dygiosios usnies augalinėje žaliavoje nustatytų junginių biologinį poveikį.

Darbo tikslas: Ištirti Lietuvoje augančių dygiųjų usnių (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.) fenolinių junginių ir aminorūgščių kokybinę ir kiekybinę sudėtį bei įvertinti ekstraktų biologinį poveikį ląstelių kultūroms *in vitro*.

Uždaviniai:

1. Išvystyti ir validuoti efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodiką fenolinių junginių ir dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (DC–MS) metodiką aminorūgščių kokybinės ir kiekybinės sudėtis nustatymui dygiųjų usnių ėminiuose.

2. Ištirti dygiųjų usnių augalinių žaliavų (lapų, žiedynų, šaknų) fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties variavimą skirtingais fenologiniais tarpsniais.
3. Ištirti dygiųjų usnių augalinių žaliavų (lapų, žiedynų, šaknų) aminorūgščių kokybinės ir kiekybinės sudėties variavimą skirtingais fenologiniais tarpsniais.
4. Įvertinti dygiųjų usnių ekstraktų antioksidacinį, priešvėžinį ir antimikrobinį poveikį *in vitro* modelinėse sistemose.

Naujumas

Šiame tyrime nagrinėjama nepakankamai išnaudota augalinė *Cirsium vulgare* žaliava, kuri yra biologiškai aktyvių medžiagų šaltinis. Tyrimai susiję su *C. vulgare* žaliava išlieka moksliskai neapibrėžti. Iki šiol nėra mokslinių tyrimų, kuriuose būtų vertinta vegetacijos eiga, aminorūgščių kiekis ir šios žaliavos potencialas maistingumui. Tyrimai su šia augaline žaliava tebėra fragmentiški ir jų apimtis yra maža. Šiame darbe pirmą kartą kompleksiskai analizuojami *C. vulgare* antriniai metabolitai, jų biologinis aktyvumas. Gauti tyrimo rezultatai prisideda prie naujų duomenų kaupimo apie nepakankamai išnaudotus vietinius augalus, kurie gali būti pritaikomi kaip tvarūs ir ekonomiškai naudingi ištekliai įvairiose pramonės srityse. Tai leidžia ne tik plėsti mokslines žinias apie rūšies cheminę sudėtį ir biologinį aktyvumą, bet ir vertinti jos praktinį potencialą platesniame taikomųjų mokslų kontekste.

Tyrimų metu, pritaikius ekstrakciją su grįžtamuju šaldytuvu, naudojant 50 proc. (v/v) etanolį, fenolinių junginių ekstrakcijos efektyvumas padidėjo 1,7 karto, lyginant ją su ekstrakcijomis atliktomis kitokiomis sąlygomis. Tokiu būdu atlikta ekstrakcija užtikrino patikimą ir efektyvų fenolinių junginių išgavimą iš dygiųjų usnių žaliavos. Kokybinei ir kiekybinei fenolinių junginių bei aminorūgščių sudėties analizei atitinkamai pritaikytos ir validuotos ESC–DMD bei DC–MS su derivatizacija metodikos. Pirmą kartą atlikti dygiųjų usnių (*C. vulgare*) žaliavose esančių 11 fenolinių junginių tyrimai, kuriuose didžiausią dalį sudarė apigenin-7-*O*-gliukozidas (A7G) ir chlorogeno rūgštis (CGA). Tyrimų metu augalo lapų, žiedynų ir šaknų ekstraktuose nustatyta atitinkamai 15, 14 ir 13 aminorūgščių, iš kurių didžiausią dalį sudarė nepakeičiamosios L-asparto ir L-glutamo rūgštys. Fenolinių junginių ir aminorūgščių kiekybinės bei kokybinės sudėties pokyčių analizė, nuo fenologinio ramybės periodo pabaigos iki sėklų brandos tarpsnio, leidžia nustatyti, kada sukaupiama didžiausia šių junginių koncentracija ir įvertinti jų potencialų panaudojimą. Pirmą kartą atlikti biologinio aktyvumo tyrimai, kuriuose įvertintas skirtingų dygiųjų usnių (*C. vulgare*) ekstraktų (lapų, žie-

dynų, šaknų) antioksidacinis, antimikrobinis ir priešvėžinis poveikis. Nustatytas reikšmingas usnių žaliavų ekstraktų biologinis aktyvumas patvirtina jų potencialų panaudojimą tolimesniems tyrimams. Siekiant geriau suprasti *C. vulgare* ekstraktuose aptiktų biologiškai aktyvių junginių veikimo mechanizmus ir jų taikymo galimybes sveikatinimo srityje, būtina atlikti išsamesnius farmakologinius ir klinikinius tyrimus.

Praktinė ir teorinė reikšmė

Atlikti moksliniai tyrimai pateikia naujų žinių apie dygiųjų usnių (*C. vulgare*) augalinių žaliavų cheminę sudėtį ir jų ekstraktų biologinį aktyvumą. Tyrimų metu pritaikytos ir validuotos ICH Q2(R2) gairės atitinkančios efektyviosios skysčių chromatografijos ir dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodikos, skirtos detaliam fenolinių junginių ir aminorūgščių nustatymui *C. vulgare* augalinėje žaliavoje. Dygiųjų usnių (lapų, žiedynų, šaknų), surinktų skirtingais fenologiniais tarpsniais, fenolinių junginių ir aminorūgščių sudėties pokyčių analizė yra svarbi, siekiant suprasti antrinių metabolitų biosintezės dėsninumus augalo vystymosi metu. Validuotos metodikos gali būti taikomos vertinant dygiųjų usnių augalinių žaliavų kokybę ir atliekant *C. vulgare* ekstraktų kokybinės bei kiekybinės sudėties standartizavimo tyrimus.

Dygiųjų usnių augalinėse žaliavose (lapuose, žiedynuose, šaknyse) nustatyti fenoliniai junginiai ir aminorūgštys yra biologiškai aktyvūs komponentai. Nepakeičiamų aminorūgščių, tokių kaip L-asparto ir L-glutamo rūgščių, nustatymas suteikia vertingų žinių apie *C. vulgare* augalinės žaliavos maistinę vertę. Kiekybinė analizė parodė, kad L-glutamo ir L-asparto rūgščių kiekis tirtų augalų lapų žaliavose svyravo nuo 2,68 iki 3,78 mg/g ir buvo maždaug dvigubai didesnis, palyginti su kitų tirtų *Asteraceae* šeimos augalų lapų žaliavomis, kuriose šių aminorūgščių kiekis siekė 1,10–1,33 mg/g [16]. Usnių ekstraktuose nustatytas platus spektras aminorūgščių, kurios gali būti panaudojamos natūraliuose maisto papilduose, skirtuose papildyti organizmą aminorūgštimis. Nustatytos aminorūgštys augalo ekstraktuose gali būti pritaikytos kuriant preparatus, skirtus medžiagų apykaitos, kepenų ar raumenų funkcijos palaikymui. Atlikti tyrimai skatina tolesnius tyrimus, siekiant pagrįsti augalo žaliavos ekstraktų panaudojimą sveikatinimo produktų gamyboje.

Sausųjų ekstraktų, pagamintų iš augalo žiedynų ir šaknų, antimikrobinio aktyvumo tyrimo rezultatai su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* ir *Proteus vulgaris* bakterijų kultūromis parodė, kad šie ekstraktai gali būti potencialiai veiksmingi dėl jų antimikrobinio poveikio. Priešvėžiniuose tyrimuose naudoti ekstraktai, pagaminti iš dygiųjų usnių

žiedynų, reikšmingai slopino žmogaus skrandžio karcinomos (KATO III) ir žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos (HT–29) ląstelių linijų gyvybingumą. „Žaizdos gijimo“ tyrimo metu nustatyta, kad šaknų ekstraktas stipriausiai slopino HT–29 ląstelių migraciją. Žiedynų ekstraktas sumažino sferoidų gyvybingumą iki 77,9 proc., o šaknų ekstraktas – iki 81,5 proc. Nustatytas *C. vulgare* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas yra svarbus vertinant potencialų jų naudojimą produktuose, skirtuose oksidacinio streso ir su juo susijusių būklių kontrolei. Dygiųjų usnių ekstraktai slopino mikroorganizmų, įskaitant gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas bei mieliagrybius, augimą, kas pateikia naujų mokslinių duomenų apie jų galimą panaudojimą kaip natūralių konservantų. Tyrimo rezultatai apie dygiosios usnies ekstraktų priešvėžinį poveikį yra reikšmingi ieškant naujų, natūralios kilmės, papildomų ar alternatyvių priešvėžinės terapijos galimybių. Turimi tyrimų duomenys apie dygiosios usnies ekstraktų antioksidacinį, antimikrobinį ir priešvėžinį aktyvumą skatina tolesnius tyrimus, siekiant nustatyti biologiškai aktyvių junginių individualų poveikį bei sinergistinę sąveiką.

Darbo rezultatų aprobavimas

Tyrimų rezultatai pristatyti 5-iose tarptautinėse mokslinėse konferencijose: „IECPS 2024 : The 3rd International electronic conference on Plant Sciences” (2024 m. sausio mėn. 15–17 d. nuotolinė konferencija), „International conference of Life Sciences The COINS 2023” (2023 m. balandžio mėn. 24–27 d. Vilnius, Lietuva), „The joint international scientific practical conference Contemporary Pharmacy: Issues, Challenges and Expectations 2022 – CPICE-PSP 2022” (2022 m. gegužės mėn. 6 d. Kaunas, Lietuva), „70th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)” (2022 m. rugpjūčio 28–31 d. Salonikai, Graikija), „The Vital Nature Sign: 15th International Scientific Conference The Vital Nature Sign” (2021 m. gegužės 20–21 d. Kaunas, Lietuva).

Tyrimų tematika paskelbtos 4 mokslo publikacijos, išspausdintos tarptautiniuose mokslo leidiniuose, turinčiuose cituojamumo rodiklį *Clarivate Analytics Web of Science (CA WoS)* duomenų bazėje.

Darbo apimtis ir struktūra

Disertacija parengta lietuvių kalba. Disertaciją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektai ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, santrauka (anglų k.), literatūros sąrašas (194 šaltiniai), disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas, mokslo konferencijų disertacijos tema sąrašas, priedai, gyvenimo aprašymas, padėka. Darbe pateiktos 9 lentelės ir 17 paveikslų. Disertacijos apimtis 140 puslapių.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Dygiųjų usnių (*C. vulgare*) morfologija ir paplitimas

Cirsium vulgare (Savi) Ten., dar kitaip vadinama *Carduus lanceolatus* L., *Carduus vulgaris* Savi. Augalas priklauso eukariotų domenui, augalų karalystei, *Asteraceae* šeimos augalams, *Cirsium* genčiai [17].

C. vulgare yra dvimetis, kartais daugiametis augalas [18]. Stiebas 50–120 cm aukščio, šakotas. Lapai ištisiniai, lancetiški arba skiautėti, spygliškai dantyti [19]. Pirmaisiais metais suformuojama lapų rozetė su elipsiškais, dygliuotais lapais dantytu lapalakščiu. Augalas turi šakotą liemeninių šaknų sistemą, sudarytą iš keleto šaknų [20]. Antraisiais metais augalo aukštis gali siekti iki 2 metrų [21]. Stiebas briaunotas ir dygliuotas su pražanginiais lapais. Stiebo lapai lancetiški iki 30 cm ilgio, jų lapalakštis yra su didesnėmis skiltimis ir iškarpymais nei rozetės lapų. Viršutinė lapo pusė yra spygliuota. Lapo skiltys baigiasi spygliu. Violetinės spalvos dvilyčiai žiedai (virš 200) yra vamzdiški, išsidėstę galvutės pavidalo žiedyne. Žiedynai būna pavieniai arba sudaro grupes iš 2–3 žiedų. Baltažiedė forma yra reta. Žiedynas yra kiaušinio formos ir gausiai apgaubtas pažiedėmis [20]. Žiedynsostis yra 3–5 cm ilgo, plokščias. Violetiniai dvilyčiai žiedai yra vamzdiniai, išsidėstę galvutėje (trumpakočiai žiedai sutelkti sustorėjusiame žiedynsostyje). Pažiedlapiai sudaro skraistę, kuri gaubia žiedynsostį. Žiedynai gali atsirasti pavieniui arba žiedkočio galūnėje suformuojant dviejų ar trijų žiedynų sandrupą. Galvutės, kurių didžiausioje yra daugiau nei 200 žiedynų, yra kiaušinio formos su daugybe žiedynų [18]. Žydėjimas trunka didžiąją metų dalį, tačiau paprastai vyksta nuo pavasario iki rudens, priklausomai nuo augimo sąlygų [20]. Vaisius yra lukštavaisis (arba vienasėklis neatsidarantis sausasis vaisius) su skristuku. Skirstuko spalva varijuoja ir gali būti balta, geltona, pilka, ruda ar juoda. Lukštavaisiai atvirkščiai kiaušiniški, suploti, keturbriauniai, prie pagrindo siaurėjantys. Lukštavaisių paviršius plikas, vagotas, blizgantis, šviesiai geltonos ar rudos spalvos su tamsesnėmis juostelėmis (2,5–4 mm ilgio ir apie 1,5 mm pločio) su giliai įdubusia viršūne [22, 23]. Ant jų yra skristukas (lot. *pappus*) iš balkšvų plunksnų šerių (8–25 mm ilgio), kurie beveik apgaubia subrendusį vaisių [23, 24]. *C. vulgare* dauginasi beveik vien sėklomis, turinčiomis skristuką (lot. *pappus*), kurios vėjo pagalba pasklinda po aplinką. Mažesniu mastu sėklas platina vanduo, gyvūnai, transporto priemonės [21].

Augalas *C. vulgare* yra kilęs iš Eurazijos, kur ypač paplitęs pūdymuose, ganyklose ir apleistose neužstatytose vietose [24, 25]. Jis randamas daugiau nei 50 šalių, yra natūralizuotas ir plačiai paplitęs visuose žemynuose, išskyrus

Antarktidą [22]. Tai ypač paplitusi invazinė usnių rūšis Pietų Afrikoje, Etio-pijoje, Kenijoje, Šiaurės Amerikoje, Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje, kuri aptinkama kviečių auginimo vietose ir aplink didžiųjų ežerų regioną [25, 26].

1.2. Dygiųjų usnių (*C. vulgare*) fitocheminės sudėties tyrimo metodai

Literatūroje aprašomi tyrimų duomenys nurodo, kad *Cirsium* genties augalai, o tame tarpe ir *C. vulgare* savo sudėtyje kaupia flavonoidus, sterolius, triterpenus, alkaloidus, poliacetilenus, acetilenus, angliavandenius, aminorūgštis, seskviterpenus, laktonus, fenolio rūgštis ir lignanus [27]. Visi šie junginiai aptinkami pavieniuose *Cirsium* genties fitocheminės sudėties tyrimuose [21, 28, 29]. Išsamūs tyrimai apie metanolinių *C. vulgare* lapų ir žiedynų ekstraktų kokybinę ir kiekybinę sudėtį yra atlikti autorių Nazaruk ir Sieliwoniuk [6, 30]. Autoriai Nazaruk ir kiti, savo tyrime nurodo, kad naudojant skirtingus tirpiklius iš *C. vulgare* žaliavos galima išekstrahuoti labai platų biologiškai aktyvių junginių spektrą, todėl išsami kiekinės sudėties analizė panaudojant kitokius ekstrahentus yra reikalinga [6].

Fenolinių junginių nustatymo metodai *C. vulgare* augalinėje žaliavoje

C. vulgare savo sudėtyje kaupia flavonoidus, flavonus ir fenolio rūgštis. Tai dalis junginių priklausančių fenolinių junginių grupei [31]. Flavonoidai gali būti skirstomi į flavonolius, flavonus, izoflavonus, antocianinus, flavanonus, katechinus ir chalkonus, atsižvelgiant į jų cheminę struktūrą ir heterociklinio žiedo oksidacijos laipsnį. Flavonoidai paprastai būna glikozidų pavidalu. Dvi pagrindinės fenolio rūgščių grupės tai hidroksibenzenkarboksirūgštys ir hidroksicinamono rūgštys. Stilbenai, taninai ir ligninai yra gaunami iš fenolio rūgščių [32].

Nors atlikta daugybė tyrimų fenolio junginių aptikimui skirtingomis tyrimų metodikomis ir fenolio junginių struktūrinių grupių kiekybiniam nustatymui, augalų cheminės sudėties tyrimai vis dar išlieka sudėtingi dėl daugia-komponentės augalų žaliavų sudėties. Fenolinių junginių kiekiai *C. vulgare* augalinėje žaliavoje iki šiol buvo tyrinėti mažai. Pavienėse studijose buvo ištirti fenolinių junginių kokybiniai skirtumai *C. vulgare* augalinėje žaliavoje, tačiau trūksta duomenų apie *C. vulgare* augalinės žaliavos fitocheminės sudėties pokyčius skirtinguose fenologiniuose tarpsniuose ir skirtingose žaliavos dalyse [33, 34]. Tikslių kiekybinių fenolinių junginių nustatymo metodikų

poreikis nuolat auga, todėl aktualu plėtoti ir taikyti metodikas grindžiamas fenolinių grupių struktūromis [35].

Efektyvioji skysčių chromatografija (ESC) ir dujų chromatografija (DC), arba jų kombinacijos su masių spektrometrija (MS), yra du dažniausiai taikomi metodai fenoliniams junginiams kiekybiškai įvertinti. Kiti svarbūs metodai apima spektrofotometrinius testus ir plonasluoksnę chromatografiją [36]. Augalų ekstraktų fitocheminė sudėtis gali būti analizuojama naudojant plonasluoksnės chromatografijos „pirštų atspaudą“, kuris atspindi specifinių farmakologiškai aktyvių junginių, įskaitant fenolinius junginius, chromatografinį profilį. ESC yra pažangesnė ir automatizuota plonasluoksnės chromatografijos versija, kurią sudaro naujausi techniniai patobulinimai, skirti fitocheminių medžiagų kokybės vertinimui ir analizei. Šis metodas pasižymi tokiais pranašumais kaip paprastas mėginių paruošimas, galimybė optimizuoti specifinių junginių analizę ir tuo pačiu metu palyginti daugybę mėginių vienoje plokštelėje. Toks lygiagretus palyginimas leidžia nustatyti tiriamų augalų sudėties panašumus ir skirtumus [37–39].

Dujų chromatografija (DC) yra vienas iš metodų, naudojamų fenolinių junginių, tokių kaip fenolio rūgštys [40], kondensuoti taninai [41] ir flavonoidai [42], atskyrimui, identifikavimui ir kiekybiniam nustatymui. Naudojant dujų chromatografiją, fenolinių junginių kiekybinis nustatymas gali reikalausti papildomų paruošimo etapų, tokių kaip lipidų pašalinimas iš ekstrakto, fenolinių junginių atpalaidavimas iš glikozidinių ir esterių jungčių, naudojant fermentines [43], šarmines [44] ar rūgštines [45] terpes, cheminio modifikavimo žingsnių, pavyzdžiui, jų pavertimo lakiaisiais dariniais [35]. Autoriai Banaras ir kiti, tyrę antimikrobinį *Cirsium arvense* poveikį pasirinktoms mikroorganizmų kultūroms, atliko ir *C. arvense* metanolinių ekstraktų analizę dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu. Atlikto tyrimo metu nustatyta, kad didžiausias identifikuotas fitocheminių junginių kiekis nustatytas metanoliniame lapų ekstrakto. Identifikuota dešimt fitocheminių junginių, tarp kurių nustatyti vyraujantys junginiai: 10-oktadekano rūgšties metilo esteris (26,44 proc.), 6,7-dimetoksi-2,2-dimetil-2H-1-benzpiranas (20,19 proc.), heksadekano rūgšties metilo esteris (15,75 proc.) ir (Z,Z)-oktadeka-9,12-dieno rūgšties metilo esteris (12,63 proc.) [46].

Pagrindiniai su dujų chromatografija susiję iššūkiai, kurie nėra būdingi efektyviosios skysčių chromatografijos metodams, apima fenolinių junginių derivatizaciją. Derivatizacijai ir lakiųjų junginių atskyrimui yra naudojamos įvairios reagentų rūšys. Etil- ir metilchloroformiatas, diazometanas ir dimetilsulfoksidas kartu su metiljodatu yra naudojami fenolinių junginių metilo ar etilo esteriams gauti [47–49]. Kita reagentų karta, turinti privalumų atskiriant lakias medžiagas, yra trimetilsililo junginių grupė, tokia kaip trifluoracetamidas, N-(tret-butyl-dimetilsilil)-N-metiltrifluoracetamidas ir trimetilsililo

dariniai [33, 50]. Sililinio reakcija yra paprasta, nesusidaro nepageidaujami šalutiniai produktai [51]. Sililo derivatizacija yra tinkamas pasirinkimas fenoliniams junginiams identifikuoti [42]. DC suteikia didesnę jautrumą ir specifiškumą, kai naudojama kartu su masių spektrometrija [33]. Padilha ir kiti autoriai, nurodo, kad įprastos DC flavonoidinių glikozidų analizės sunkumai išspręsti, pritaikius aukštos temperatūros aukštos raiškos DC–MS metodą [52]. Aludat ir kitų autorių tyrimo rezultatai parodė, kad DC–MS analizė, naudojant flavonoidų, terpenoidų, lignanų standartų mėginius, buvo efektyvesnė nei ESC, nes leido greičiau atlikti analizę, pasiekiant geresnę skiriamąją gebą ir užtikrinant aiškesnį junginių atskyrimą sumažinant jų persidengimą išsiskyrimo metu [53]. Autoriai Aydın ir kiti, tyrinėję *C. vulgare* žaliavos heksaninius ir metanolinius ekstraktus, identifikavo 41 bioaktyvų junginių remiantis DC–MS biblioteka. Terpenoidai sudarė didžiąją dalį (52,89 proc.) ekstraktuose nustatytų fitocheminių junginių, iš kurių augalo ekstraktuose vyraujantys junginiai buvo lup-20(29)-en-3-olilo acetatas ir lupeolis. Didžiausiu bendru fitocheminių junginių kiekiu pasižymėjo ekstraktai pagaminti metanolio pagrindu [13]. Išskirtinę daugiapakopę analizę lignanų dariniams aptikti, atliko autoriai Khodami ir kiti, kurie pritaikė seką papildomų DC–MS, SC–MS/MS, SC–SLMS/MS metodų ir BMR technologiją. Balanofoninas ir trachelozido lignanai pirmą kartą nustatyti *C. vulgare* sėklose [54].

Efektyvioji skysčių chromatografija yra dažniausiai naudojama tiek fenolinių junginių atskyrimui, tiek kiekybiniam nustatymui [55]. Įvairūs veiksniai daro įtaką ESC fenolinių junginių analizei, įskaitant mėginio grynumą, mobiliąją fazę, kolonėlių tipus ir detektorius [36]. Įprastai išgryninti fenoliniai junginiai ESC sistemoje analizuojami naudojant atvirkštinės fazės C18 kolonėlę (RP-C18), diodų matricos detektorių (DMD) ir rūgštintus organinius tirpiklius [33]. Tokį metodinį požiūrį patvirtina ir Malgorzatos su bendraautoriais atliktas tyrimas. Taikydami atvirkštinės fazės ESC metodą usnių genties augalų žiedynų metanoliniams ekstraktams analizuoti, autoriai identifikavo penkis vyraujančius fenolinius junginius: chlorogeno rūgštį, apigenin-7-*O*-gliukozidą, kempferol-3-ramnoglikozidą, kempferol-3-gliukozidą ir apigeniną [56]. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodo jautrumas ir aptikimo riba priklauso nuo detektoriaus, chromatografinės sistemos, analitės savybių ir mėginio grynumo. Autoriai Sieliwoniuk ir kiti, *Cirsium* rūšies augalui, *Cirsium palustre*, pritaikė išplėstinį ESC metodą su srautine injekcine chemiliuminescencine detekcija. Tyrimo metu nustatyta, kad šis fenolinių junginių nustatymo metodas yra 40–65 kartus jautresnis nei ESC su DMD detektoriumi [57].

Fenolinių junginių kiekybiniam nustatymui taikant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą, tiriamieji mėginiai paprastai paruošiami naudojant organinių tirpiklių acetonitrilo arba metanolio ir vandens mišinius. Tokia

tirpiklio sistema užtikrina tinkamą junginių tirpumą bei palankų jų pasiskirstymą mobiliojoje fazėje, leidžiantį efektyviai pernešti analites per chromatografinę kolonėlę [58–60]. Rekomenduojamas mobiliosios fazės pH intervalas taikomas nuo 2 iki 4, siekiant išvengti fenolinių junginių jonizacijos identifikavimo metu. Mobiliajai fazei naudojami vandeniniai acto skruzdžių ir/ar fosforo rūgščių tirpalai arba fosfato, citrato ir amonio acetato buferiniai tirpalai esant žemam pH [55, 60]. Fenolinių junginių analizei dažniausiai taikomas gradientinis eliuavimo metodas, kuris, palyginti su izokratiu, užtikrina geresnį junginių atskyrimą. To pasekoje, padidėja analizės tikslumas tiek kokybiniu, tiek kiekybiniu požiūriu, o tai ypač svarbu tiriant sudėtingus fenolinių junginių mišinius [51]. Šį požiūrį patvirtina ir Hawrył su bendraautoriais atliktas tyrimas – tiriant metanolinius *Cirsium* genties, įskaitant *C. vulgare*, ekstraktus, kuomet buvo taikytas efektyviosios skysčių chromatografijos metodas su gradientiniu eliuavimu, o analizės trukmė buvo 45 minutės [61].

Teisingas kolonėlės pasirinkimas yra svarbus veiksnys fenoliniams junginiams identifikuoti. Atskiriant skirtingas fenolinių junginių klases pagal poliarumą, dažniausiai naudojamos atvirkštinės fazės (RP-C18) arba normaliosios fazės kolonėlės, kurių ilgis siekia 10–30 cm, vidinis skersmuo yra 3,9–4,6 mm, o dalelių dydis – 3–10 μm . [51, 62]. Autoriai Havrył ir kiti, tyrimų su *Cirsium* genties augalais metu panaudojo keturias Kinetex (150 $\times$ 4,6 mm) chromatografines kolonėles (C18 5 μm , C18 2,6 μm , pentafluorfenilo 5 μm , fenil-heksilo 5 μm) ir mobilią fazę, sudarytą iš metanolio/vandens/1 proc. skruzdžių rūgšties. Atliktame tyrime, naudojant aštuonis standartus (naringino, vanilino rūgšties, chlorogeno rūgšties, kavos rūgšties, rutino, liuteolino, apigenino, *p*-kumaro rūgšties) metanoliniuose ekstraktuose siekta nustatyti junginių atsikartojamumą genties tyrime. Iš visų tirtų *Cirsium* genties augalų, tik chlorogeno rūgšties atsikartojamumas buvo nustatytas visose tirtose *Cirsium* genties augaluose. Visi kiti tirti fitocheminiai junginiai variavo skirtinguose žaliavų ekstraktuose, priklausomai nuo augalo rūšies. Tiriami fitocheminiai junginiai ekstraktuose identifikuoti lyginant jų sulaikymo laikus su standartinių tirpalų sulaikymo laikais [61].

ESC technikoms, tokioms kaip UESC, aukštos temperatūros skysčių chromatografija (angl. *HTLC*) ir dvimatė skysčių chromatografija (SC $\times$ SC), naudojamos naujos kartos kolonėlės (monolitinės ir dalinai porėtos), kurių ilgis yra 3–25 cm, vidinis skersmuo – 1–4,6 mm, o dalelių dydis – 1,7–10 μm [63, 64]. Dauguma ESC analizių atliekamos esant aplinkos temperatūrai, tačiau pastaruoju metu dėl naujų kolonėlių ir įrangos siūloma naudoti aukštesnę temperatūrą, kurią padidinus chromatografinio atskyrimo procesas vyksta greičiau [65]. ESC analizės laikas, kuris gali varijuoti nuo 10 iki 150 min., taip pat daro įtaką fenolinių junginių aptikimui. Roggero ir kiti,

pabrėžė, kad ilgesnis analizės laikas užtikrina aukštą rezultatų atkuriamumą, jei palaikoma pastovi temperatūra [66]. Tai patvirtina ir Malgorzatos su bendraautorais tyrimas – taikydami atvirkštinės fazės efektyviąją skysčių chromatografiją usnių genties augalų metanoliniuose ekstraktuose, gautuose iš žiedynų, jie identifikavo penkis vyraujančius fenolinius junginius: chlorogeno rūgštį, apigenin-7-*O*-gliukozidą, kempferol-3-ramnoglikozidą, kempferol-3-gliukozidą ir apigeniną [56].

Fenoliniams junginiams identifikuoti naudojami įvairūs detektoriai, leidžiantys atlikti tiek kiekybinę, tiek kokybinę analizę. Dažniausiai taikomi diodų matricos (DMD) ir fluorescenciniai detektoriai (FLD) [67], taip pat gali būti naudojamos kolorimetrinės sistemos [68], kurios, nors ir mažiau jautrios, pasižymi paprastumu ir leidžia greitai nustatyti junginius pagal spalvinius pokyčius. Siekiant padidinti analizės jautrumą ir specifiškumą, DMD detektoriai gali būti jungiami su fluorescenciniais detektoriais [69]. Efektyvioji skysčių chromatografija, sujungta su masių spektrometrijos (MS) detektoriais, yra itin jautrus ir selektyvus analizės metodas, leidžiantis tiksliai identifikuoti bei kiekybiškai įvertinti fenolinius junginius net ir sudėtingos, daugiakomponentės sudėties mišiniuose. Aukštas metodo specifiškumas pasiekiamas dėl masių selektyvumo – galimybės atskirti junginius pagal jų molekulinę masę, o MS detektoriai suteikia papildomą struktūrinę informaciją, padedančią patvirtinti junginių tapatybę [70]. Sieliwoniuk ir bendraautoriai, siekdami ištirti fenolinius junginius *Cirsium vulgare* žiedynų ekstraktuose, taikė efektyviosios skysčių chromatografijos metodą su diodų matricos detektoriumi ir chemiliuminescencine detekcija. Naudojant optimizuotas chromatografines atskyrimo sąlygas, atlikta analitinė metodikos charakteristika, o sukurtas metodas sėkmingai pritaikytas dešimties fenolinių junginių identifikavimui *C. vulgare* žiedynų ekstraktuose. Tyrime pirmą kartą palyginta analičių koncentracija ekstraktuose, paruoštuose naudojant skirtingus tirpiklius – metanolį 100 proc., 96 proc. (v/v) etanolį, 70 proc. (v/v) metanolį, 70 proc. (v/v) etanolį ir vandenį. Nustatyta, kad vyraujantis junginys visuose ekstraktuose buvo apigenin-7-*O*-gliukuronidas [30]. Atsižvelgiant į fenolinių junginių įvairovę, jų svarbą bei metodinių sprendimų įtaką identifikavimui, būtina tęsti ir plėtoti patikimus analitinius tyrimus, skirtus *C. vulgare* augalinės žaliavos fitocheminės sudėties nustatymui.

Aminorūgščių klasifikacija ir aminorūgščių nustatymo metodai

***C. vulgare* augalinėje žaliavoje**

Mitybos požiūriu, aminorūgštys yra suskirstytos į 3 grupes – pakeičiamosios, nepakeičiamosios ir dalinai pakeičiamos. Dalinai pakeičiamos

aminorūgštys yra sintetinės organizmo, tačiau laikomos nepakeičiamomis, kuomet organizmas yra stresinėje būsenoje [71]. Dalinai pakeičiamos aminorūgštys yra būtinos organizmo augimo procesuose, todėl jų pakankamas kiekis svarbus augantiems vaikams, mamoms nėštumo ir žindymo laikotarpiu [72]. Devynios aminorūgštys, įskaitant histidiną, izoleuciną, leuciną, liziną, metioniną, fenilalaniną, treoniną, triptofaną ir valiną yra klasifikuojamos kaip nepakeičiamosios, kadangi žmogaus ir kitų žinduolių organizmas negali jų sintetinti. Dėl šios priežasties, šios aminorūgštys turi būti gaunamos su maistu [73]. Pakeičiamosios aminorūgštys yra sintetinės organizmo. Yra atvejų, kuomet tiek pakeičiamųjų tiek nepakeičiamųjų aminorūgščių santykis gali kisti. Aminorūgštys taip pat skirstomos į 3 grupes pagal radikalo struktūrą – neutralias, rūgštines ir bazines aminorūgštis [74]. Kai kurios aminorūgštys yra paverčiamos į angliavandenius ir vadinamos gliukogeninėmis aminorūgštimis [75]. Tam tikros aminorūgštys atlieka labai svarbias funkcijas mūsų organizme. Pavyzdžiui, tirozinas gali būti paverčiamas hormonais – skydliaukės hormonais: tetrajodtironinu (T4) ir trijodtironinu (T3), antinksčių hormonais: epinefrinu, norepinefrinu ar kankorėžinės liaukos išskiriamu hormonu melatoninu, kuris reguliuoja skydliaukės išskiriamų hormonų veiklą nakties metu. Metionino aktyvi forma S-adenozilmetioninas svarbus trans-metilimo ląsteliniuose procesuose, nes perduoda metilo grupę vykstant hormonų, nukleorūgščių, baltymų, fosfolipidų ir kitų medžiagų sintezei. Cistinas ir metioninas yra pagrindiniai sieros šaltiniai [71].

Dažniausiai aminorūgščių nustatymui augalinėse žaliavose yra taikoma jonų mainų chromatografija su pokolonėline derivatizacija, ESC ir DC-MS. Jonų mainų chromatografija su pokolonėline derivatizacija plačiai naudojamas metodas aminorūgščių nustatymui įvairiuose biologiniuose mėginiuose, įskaitant gyvūninės ir augalinės kilmės žaliavas. Ši technika apima aminorūgščių atskyrimą, derivatizacijos reakcijas, dažniausiai su ninhidrinu, sudarant spalvotus kompleksus, kurie vėliau nustatomi fotometrinio būdu. Aptikto komplekso signalo intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas aminorūgščių koncentracijai [76, 77]. ESC metodas aminorūgščių detekcijai naudojamas dėl savo aukšto jautrumo, tikslumo ir gebėjimo analizuoti sudėtingus mėginius. ESC leidžia efektyviai atskirti aminorūgštis pagal jų chemines savybes, tokias kaip poliariškumas ir molekulinė masė. Taip pat, papildomai atlikus junginių derivatizaciją, galima pagerinti detekciją, padidinant ESC metodo jautrumą ir selektyvumą [78].

Dujų chromatografijos taikymas aminorūgščių aptikimui augalinėje žaliavoje gali būti tikslingas metodas ne tik aminorūgščių koncentracijai nustatyti, bet ir siekiant identifikuoti specifinę augalo rūšį, remiantis skirtingomis aminorūgščių sekų variacijomis [79]. Autoriai Bongsang ir kiti, taikant

dujų chromatografijos metodiką ir remdamiesi jau žinomais *Cirsium* genties aminorūgščių sudėties genomo „pėdsakais“, aprašė naują *Cirsium* augalų rūšį – *C. nipponicum* [79]. Dėl aminorūgščių poliškumo, prieš taikant DC analizę, dažnai rekomenduojama atlikti derivatizaciją. Aminorūgščių atveju derivatizacija apima aktyvių vandenilio atomų, esančių OH, NH₂ ir SH grupėse, pakeitimą į nepolines grupes. Silinimas yra dažnai taikoma derivatizacijos technika, naudojama įvairių junginių analizėje [80]. Aminorūgščių analizės metodų parinkimas ir taikymas yra itin svarbus ne tik jų kiekybiniam nustatymui augalinėje žaliavoje, bet ir specifinių augalų rūšių identifikavimui bei cheminės sudėties ypatumų įvertinimui.

1.3. Dygiųjų usnių (*C. vulgare*) ekstraktų biologinio aktyvumo tyrimai

1.3.1. Antioksidacinio poveikio tyrimai

Oksidacinis stresas – tai būseną, kai laisvųjų radikalų kiekis organizme viršija antioksidacinę apsaugą ir jis gali būti kiekybiškai įvertintas [81–83]. Laisvieji radikalai sukelia grandininės reakcijos, pažeidžiančias ląsteles, o antioksidantai jas nutraukia, oksiduodamiesi patys [84]. Antioksidantai skirstomi į fermentinius (pvz.: SOD, KAT, GPx) ir nefermentinius (pvz.: polifenoliai, glutationas), kurie veikia sinergiškai, neutralizuodami oksidacinį stresą [85–87]. Antioksidantai skirstomi į natūralius ir sintetinius, kurių veiksmingumas priklauso nuo jų cheminės struktūros. Dauguma sintetinių antioksidantų yra fenolio tipo junginiai [88, 89]. Jų struktūros dažniausiai pasižymi viena ar keliomis hidroksigrupėmis prijungtomis prie aromatinio žiedo, o šių grupių skaičius, padėtis bei kiti prisijungę pakaitai (pvz., metilo, butilo grupės) lemia antioksidacinį aktyvumą. Skirtingos cheminės struktūros taip pat turi įtakos fizikinėms savybėms, tokioms kaip lakumas, tirpumas ar terminis stabilumas [90, 91].

Yra įvairių metodų, skirtų antioksidacinio poveikio nustatymui, kurių kiekvienas turi savitų ypatumų, priklausomai nuo tiriamų antioksidantų tipo. Antioksidacinių savybių tyrimai dažniausiai skirstomi į dvi pagrindines grupes, remiantis cheminėmis reakcijomis, kurios vyksta tarp antioksidantų ir laisvųjų radikalų. Jie skirstomi į metodus pagrįstus vandenilio atomų perdavimu (HAT, angl. *hydrogen atom transfer*) ir metodus pagrįstus elektronų perdavimu (SET, angl. *single electron transfer*) [92]. Dažniausiai taikomi HAT reakcijomis pagrįsti antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai yra šie: mažo tankio lipoproteinų oksidacijos inhibavimas, deguonies radikalų sugerties pajėgumas (ORAC, angl. *oxygen radical absorbance capacity*), bendras radikalus sugaudančio antioksidanto parametras (TRAP, angl. *total*

radical trapping antioxidant parameter) ir krokino išblukinimo metodas. Šie metodai dažnai naudojami norint įvertinti antioksidantų gebėjimą neutralizuoti laisvuosius radikalus, tokius kaip hidroksilo ir vandenilio radikalai [93]. Fotochemiliuminescencijos (FCL) metodas, kurį taikė Sieliwoniuk ir kiti tirdami dygiųjų usnių ekstraktus, pagrįstas HAT reakcijomis. Atliekant antioksidacinį tyrimą šiuo metodu, luminolis naudojamas kaip fotosensibilizatorius ir deguonies radikalų aptikimo reagentas. Luminolis reaguoja su deguonies radikalais, ir ši reakcija sukelia šviesos emisiją, kuri yra proporcinga antioksidacinio aktyvumo lygiui. Dėl šio mechanizmo HAT reakcijos leidžia įvertinti antioksidantų gebėjimą neutralizuoti deguonies radikalus, kadangi vandenilio atomų perdavimas efektyviai slopina laisvųjų radikalų aktyvumą. Tai padeda nustatyti ekstraktų gebėjimą kovoti su oksidaciniu stresu, suteikiant svarbių duomenų apie jų antioksidacinį potencialą [30].

Metodai pagrįsti elektronų perdavimu (SET), apima tokias reakcijas kaip DPPH laisvųjų radikalų surišimo metodas, ABTS radikalų – katijonų surišimo metodas, geležies redukcijos antioksidantinė galia (FRAP, angl. *ferric reducing antioxidant power*), spektrofotometrinis metodas, išreiškiamas standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentu (TEAC) naudojant ABTS, vario redukcijos antioksidacinės galios (CUPRAC) tyrimas, tiobarbitūro rūgšties reaktyviųjų medžiagų (TBARS, angl. *Thiobarbituric acid reactive substance*) tyrimas [94]. Nazaruk ir kiti, tyrinėdami dygiųjų usnių ekstraktus, pasirinko antioksidaciniam aktyvumui nustatyti DPPH metodą. Autoriai nurodo, jog didžiausiu aktyvumu pasižymėjo metanolinė žiedų frakcija, kurioje nustatytas didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis [6]. Sabudak ir kiti autoriai, atliko *C. vulgare* ekstraktų, pagamintų iš skirtingų tirpiklių (metanolio, etanolio, heksano), antioksidacinio aktyvumo įvertinimą DPPH metodu. Autoriai nurodo, kad skirtingai nei Nazaruk, ekstraktuose nustatytas suminis fenolinių junginių kiekis su ekstraktų antioksidaciniu aktyvumu nekoreliavo [14]. Kitas tyrimas, atliktas Nazaruk ir bendraautorių, apėmė ABTS radikalų – katijonų surišimo metodą, skirtą dygiųjų usnių ekstraktams, gautiems iš augalo lapų. Antioksidacinis aktyvumas buvo išreikštas kaip bendras antioksidacinis statusas (BAS), kuris varijavo nuo 2,31 iki 2,78 mmol/l [95].

CUPRAC tyrimas, pagrįstas elektronų pernašos metodu, yra plačiai naudojamas ir gerai žinomas metodas, skirtas nustatyti jonų redukcijos antioksidantinę galią, t. y. bendrą junginio antioksidacinį pajėgumą. Šis metodas remiasi paprasta redokso reakcija, kurioje antioksidantas veikia kaip elektronų donoras. Tai lemia divalenčio vario (Cu(II)) ir neokuproino (Cu(II)-Nc) komplekso redukciją į chromogeninį Cu(I)-Nc kompleksą, taip sumažinant vario Cu²⁺ jonus į Cu⁺ jonus [96]. Šis tyrimas, lyginant su kitais, yra palyginti paprastas, patikimas, universalus ir reikalaujantis mažesnių finansinių kaštų.

CUPRAC tyrimas yra plačiai naudojamas dėl savo greičio ir didelio jautrumo bei tinkamumo įvairių fitocheminių medžiagų antioksidacinio aktyvumo nustatymui [96, 97]. CUPRAC tyrimas yra veiksmingas glutationo (GSH) ir tiolio tipo antioksidantų nustatymui dėl elektroninės Cu (II) struktūros. Lyginant su FRAP metodu, kuris atliekamas esant mažam pH, CUPRAC metodas yra jautresnis tiolio tipo antioksidantams, nes FRAP metodas, dėl savo cheminės prigimties ir pusiau užpildytų didelio sukimosi geležies d-orbitalių, yra mažiau jautrus šiai antioksidantų grupei. CUPRAC yra pranašesnis pH atžvilgiu, dėl artimumo fiziologiniam pH (pH 7), skirtingai nei FRAP, kuris atliekamas rūgštinėmis sąlygomis. Rūgštinė aplinka gali slopinti arba padidinti mėginio redukcijos gebėjimą, todėl tai gali turėti įtakos antioksidacinių junginių redukcijos veiksmingumui. CUPRAC, būdamas neutraliame pH, suteikia tikslesnius duomenis, atitinkančius fiziologines sąlygas, ir leidžia geriau įvertinti antioksidacinių junginių poveikį. CUPRAC metodas, palyginus su plačiai naudojamu geležies redukcijos antioksidacinės galios nustatymo metodu (FRAP), biologinių skysčių analizei, yra plačiau pritaikomas lipofilinių ir hidrofilinių antioksidantų aptikimui biologiniuose organizmo skysčiuose, dėl šio metodo gebėjimo nustatyti bendrą biologinių skysčių antioksidacinį pajėgumą. Spalvoti reagentai, naudojami antioksidantų tyrimuose, dažnai yra jautrūs įvairiems išoriniams veiksniams, tokiems kaip šviesa, drėgmė, pH ir tirpikliai [96, 98].

DPPH reagentas, kuris yra plačiai naudojamas matuojant antioksidacinį aktyvumą, gali prarasti savo stabilumą esant nepalankioms aplinkos sąlygoms (netinkama pH, per aukšta/ per žema temperatūra ir kt.). Tuo tarpu vario (I) neokuproinas, reagentas CUPRAC tyrime, vertinamas kaip stabilus ir nejautrus daugumai išorinių parametrų, įskaitant pH, šviesą ir drėgmę, todėl jis suteikia tikslesnius ir patikimesnius rezultatus. CUPRAC reagentu galima lengvai išmatuoti polifenolių ir flavonoidų kiekį augaliniuose ekstraktuose ir atlikti įvairių augalų ekstraktų antioksidacinį profiliavimą [98–100]. Kurc ir kiti atliko tyrimus, kuriais buvo įvertintas įvairių antioksidacinio poveikio metodų efektyvumas, tiriant dygiosios usnies heksaninius ekstraktus. Autoriai panaudojo tiek SET metodus, tokius kaip TEAC, CUPRAC, FRAP, tiek HAT metodus, tokius kaip β -karoteno-linolo rūgšties (linoleato) reakcija ir vandenilio atomų perdavimo tyrimai. Atlikto mokslinio tyrimo rezultatai parodė, kad metanoliniai ekstraktai turi stipresnį antioksidacinį poveikį nei heksaniniai ekstraktai. Metanoliniai ekstraktai pasiekė TEAC vertę 0,86 $\mu\text{mol TE/g}$, FRAP 1436,6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ir CUPRAC 2,14 $\mu\text{mol TE/g}$. Metanoliniai ekstraktai parodė stipresnį β -karoteno oksidacijos inhibicijos poveikį (28,47 proc.) ir didesnę superoksido anijono radikalų surišimo gebėjimą (74,85 proc.), palyginti su tirtais heksaniniais ekstraktais [13].

1.3.2. Priešvėžinio aktyvumo tyrimai

Atliekama daugybė ikiklinikinių tyrimų, siekiant atrasti veiksmingus junginius piktybinių navikų gydymui. Tik nedidelė dalis šių junginių, mažiau nei 10 proc. pasiekia visus klinikinių tyrimų etapus ir tik apie 1–5 proc. patenka į rinką [101]. Viena iš pagrindinių priežasčių – laboratorinėse sąlygose dažnai netiksliai atkuriamą vėžinių ląstelių biologinę aplinką. Augaliniu pagrindu pagaminti vaistai skiriasi nuo sintetinių cheminių vaistų dėl įvairių biologinių junginių, veikiančių kelias vėžio patologijas vienu metu. Augalinės kilmės vaistai dažnai sukelia mažiau šalutinių poveikių, nes jų veikimo mechanizmai yra platesni ir mažiau specifiniai. Tuo tarpu cheminiai vaistai dažniausiai yra orientuoti į vieną vėžio patologiją, dėl ko gali pasireikšti daugiau šalutinių poveikių ir padidėti atsparumo susidarymo tikimybė [102].

Augaluose kaupiamų bioaktyvių junginių chlorogeno rūgšties, apigenin-7-*O*-gliukozido ar kitų fenolinių junginių tyrimai, reikšmingi tiriant vėžinių ląstelių gyvybingumo slopinimą [103]. Chlorogeno rūgštis, bioaktyvus fenolinis junginys, randamas įvairiuose augaluose, įskaitant *Cirsium* rūšies augalus [104]. Šis fenolinis junginys slopino vėžinių ląstelių gyvybingumą ir turėjo žaizdų gijimo potencialą keliuose *in vitro* tyrimuose [105–111]. Chlorogeno rūgštis tirama dėl jos poveikio naviko ląstelių signaliniams keliams, vėžio ląstelių sferoidų modeliuose [112]. Tyrimų metu nustatyta, kad chlorogeno rūgštis gali slopinti naviko progresavimą, slopindama ląstelių proliferaciją, migraciją ir indukuodama apoptozę vėžio ląstelių linijose, įskaitant HT-29 ląstelių liniją [113,114]. Kurata ir kitų autorių atlikto tyrimo metu, nagrinėtas polifenolių poveikis KATO III ir kitoms vėžio ląstelių linijoms, įskaitant chlorogeno rūgštį, iš saldžiųjų bulvių (*Ipomoea batatas* L.) lapų ekstraktų. Tyrimo metu nustatyta, kad chlorogeno rūgštis ir kafeoilchino rūgščių dariniai slopina vėžio ląstelių proliferaciją priklausomai nuo koncentracijos [115]. Tyrimai su *Acanthopanax senticosus* augalo stiebo ekstraktais, parodė poveikį KATO III ląstelių gyvybingumui, slopinant šių ląstelių augimą ir indukuojant apoptozę. Šis poveikis sietinas su augalo stiebo ekstraktuose nustatyta vyraujančia chlorogeno rūgštimi [116].

Tyrimai su flavonoidu apigenin-7-*O*-gliukozidu, atskleidė reikšmingą priešvėžinį šio fitocheminio junginio poveikį per įvairius mechanizmus. Tyrimų metu nustatyta, kad apigenin-7-*O*-gliukozidas gali slopinti vėžio ląstelių proliferaciją ir indukuoti apoptozę keliose ląstelių linijose [117]. Pavyzdžiui, HepG2 kepenų vėžio ląstelių modelyje apigenin-7-*O*-gliukozidas sumažino ląstelių augimą, skatino apoptozę per išorinius kelius ir indukavo ląstelių ciklo sustabdymą G2/M fazėje. Tikslesni duomenys apie

chlorogeno rūgšties poveikį HT–29 ir KATO III ląstelėms, taip pat 3D ląstelių kultūrų tyrimuose, dar turi būti papildyti ir patvirtinti tolimesniais tyrimais.

Nemaža dalis *Cirsium* genties augalų pasižymi citotoksiškumu prieš įvairias vėžinių ląstelių linijas. *Cirsium* genties augalas *Cirsium japonicum* pasižymi įvairių fitocheminių junginių, tarp jų ir diosmino, profiliu. Diosminas susijęs su stipriu antioksidaciniu ir priešvėžiniu aktyvumu. Be diosmino, šios rūšies ir kitų *Cirsium* genties augalų ekstraktuose, kokybiškai ištirti ir nustatyti fitocheminiai junginiai – apigenin-7-*O*-gliukozidas, luteolino-7-*O*-glikozidas, hesperidinas ir kvercetas. Šie junginiai prisideda prie ekstraktų biologinio aktyvumo, pasižymi antioksidacinėmis, prieš- uždegiminėmis bei potencialiomis priešvėžinėmis savybėmis [118, 119]. Įrodyta, kad šie flavonoidai prisideda prie laisvųjų radikalų neutralizavimo – moduliuoja kelis ląstelių signalų perdavimo kelius, svarbius vėžio progresijai, įskaitant apoptozės indukciją ir ląstelių migracijos slopinimą [120]. *C. japonicum* parodė slopinantį poveikį krūties vėžio (MCF–7) ir kepenų vėžio (HepG2) ląstelių linijose. *C. japonicum* ekstraktų priešvėžinis aktyvumas daugiausia siejamas su fitocheminiais junginiais, tokiais kaip pektolinarinas ir apigeninas, kurie pasižymi vėžinių ląstelių žūtį skatinančiu ir angiogenezės procesą slopinančiu poveikiu bei gebėjimu mažinti krūties vėžio (MCF–7) ir kepenų vėžio (HepG2) ląstelių migraciją [121]. Panašiai, *Cirsium setidens* ekstraktas pasižymėjo stipriu citotoksiškumu prieš storosios žarnos vėžio (HT–29) ir kepenų vėžio (HepG2) ląstelių linijas. Jung ir kitų autorių tyrime, yra aprašomas *C. setidens* metanolinių ekstraktų apoptozės indukavimas, daugiausia per kaspazės signalų aktyvaciją, taip pat moduliuojant svarbių apoptozės proceso baltymų, tokių kaip Bcl-2 ir Bax, ekspresiją. Ši moduliacija sustiprina apoptozės atsaką vėžio ląstelėse, tuo pačiu sumažindama ląstelių proliferaciją ir migraciją [122].

Poveikio ląstelių metaboliniam aktyvumui/gyvybingumui vertinti naudojami įvairūs metodai, kurie apima dažų sugebėjimą įsiskverbti į gyvas ląsteles, ATP kiekių matavimą, oksidacinio streso rodiklių analizę ir kitus biologinius testus, leidžiančius įvertinti ląstelių gyvybingumą ir metabolizmo pokyčius, atsirandančius dėl gydymo ar eksperimentinių medžiagų poveikio [123, 124]. Šie metodai skirstomi į kolorimetrinius ir fluorimetrinius testus, kurie dažniausiai taikomi *in vitro* citotoksiškumo tyrimuose, preliminariai vertinant priešvėžinį junginių veiksmingumą [125]. Pagrindinis skirtumas tarp kolorimetrinių ir fluorimetrinių testų yra naudojami reagentai ir jų veikimo mechanizmas. Kolorimetriniai testai paprastai priklauso nuo dehidrogenazių aktyvumo, kuris lemia spalvinių reakcijų intensyvumą, tuo tarpu fluorimetriniai metodai remiasi fluorescencinių molekulių aptikimu, lei-

džiančiu tiksliau nustatyti gyvų ląstelių kiekį. Kolorimetriniai tyrimai skirstomi į kelias kategorijas, priklausomai nuo matuojamo biologinio proceso. LDH testas (laktato dehidrogenazės) vertina ląstelių membranos vientisumą, nustatant laktato dehidrogenazės fermento išsiskyrimą iš pažeistų ar suirusių ląstelių. SRB testas (raudonojo sirano B) sudaro stabilų kompleksą su ląstelių baltymais, leidžiantį įvertinti bendrą baltymų kiekį ir netiesiogiai – ląstelių gyvybingumą. CVS testas (kristalvioleto) nustato ląstelių gyvybingumą pagal kristalvioleto dažų prisijungimą prie ląstelių baltymų. XTT testas matuoja mitochondrijų dehidrogenazių aktyvumą, nes gyvybingos ląstelės skaido XTT reagentą į spalvotą formazano produktą, kurio intensyvumas koreliuoja su ląstelių gyvybingumu. MTS ir MTT testai pagrįsti tetrazolio junginių redukcija. Dehidrogenazių aktyvumo dėka – MTT testas suformuoja netirpius formazano kristalų sankaupas, o MTS generuoja tirpius formazano junginius, kurių koncentracija gali būti išmatuojama spektrofotometriškai. MTT testas plačiai naudojamas gyvybingų ląstelių skaičiui įvertinti, nes mitochondrijų dehidrogenazių aktyvumas skatina tetrazolio druskos redukciją į netirpų formazaną, o gautas redukcinis aktyvumas tiesiogiai koreliuoja su ląstelių gyvybingumu [125, 126].

Įprastai priešvėžinių junginių veiksmingumas vertinamas dvimatėje (2D) ląstelių kultūroje, tačiau jos nevisiškai atspindi tikrąją naviko mikroaplinką organizme, kadangi ląstelės jose sąveikauja kitaip nei natūraliuose audiniuose [127]. „Žaizdų gijimo“ testas yra paprastas, nebrangus ir vienas iš anksčiausiai sukurtų metodų, skirtų tirti kryptingą ląstelių migraciją *in vitro*. Kolektyvinė ląstelių migracija yra žaizdų atstatymo, vėžio invazijos ir metastazių, imuninio atsako, angiogenezės ir embriono morfogenezės požymis [128]. Tai apima dinamines sąveikas ir įvairių ląstelių tipų susikirtimą, sąveiką su ekstraląstelinės matricos molekulėmis bei reguliuojamą tirpių mediatorių ir citokinų gamybą. Ląstelių migracijos analizė *in vitro* yra naudingas tyrimas, norint kiekybiškai įvertinti ląstelių migracijos pajėgumo pokyčius, reaguojant į eksperimentines manipuliacijas [129]. Ląstelių migracijos tyrimuose dažnai taikomas „žaizdos gijimo“ testas, leidžiantis įvertinti migracijos dinamiką ir ląstelių tarpusavio sąveiką. Pagrindiniai šio metodo etapai apima kontroliuojamos „žaizdos“ sukūrimą ląstelių vienasluoksnyje, po kurio atliekamas ląstelių judėjimo stebėjimas. Ląstelių migracija fiksuojama vaizdo kitimo stebėjimo metodais tiek pradiniam etape, tiek reguliariais laiko intervalais iki visiško „žaizdos“ užsidarymo. Gautų vaizdų analizė leidžia kiekybiškai įvertinti migracijos greitį bei modeliuoti ląstelių elgseną skirtingomis tyrimo sąlygomis. Šis metodas ypač naudingas tiriant ląstelių sąveiką su ekstraląsteline matrica bei kitomis ląstelėmis, siekiant nustatyti biologinių veiksmų ar terapinių junginių poveikį migracijos procesams [130]. Naudojant 2D modelius, neįmanoma tiksliai modeliuoti visų svarbių navikų savybių, tokių kaip

morfologija ir genetinis profilis. Tuo tarpu, 3D modeliai gali įveikti šiuos trūkumus, užtikrindami teisingą ląstelių poliarizaciją, originalią formą, genetinį profilį ir heterogeniškumą, apimančią tiek kamienines ląsteles, tiek vėžines ląsteles. 3D modeliai gali veikti kaip tiltas tarp *in vitro* tyrimų ir tyrimų su gyvūnais, reikalingų ruošiantis klinikiniais tyrimams [131].

In vitro modeliai nuolat tobulinami, kad geriau imituotų ir prognozuotų gyvų organizmų biologines reakcijas. Vien pastaraisiais metais sukurta daug naujų trimačių (3D) organotipinių modelių, kurie gali imituoti audinių struktūrą, funkciją ir net ligos progresavimą [132]. Sferoidai yra ląstelių, išaugintų suspensijoje arba įterptų į 3D matricą, naudojant 3D kultivavimo metodus, agregatai [133, 134]. Vėžio ląstelių sferoidai, žinomi kaip daugialąsteliniai naviko sferoidai (MCTS), yra avaskuliniai naviko mazgeliai arba mikrometastazės [135]. Nors 3D sferoidų auginimas yra sudėtingesnis ir reikalauja daugiau resursų bei laiko, palyginti su 2D ląstelių kultūromis, 3D sferoidai plačiai naudojami vaistų atrankos procesuose, taip pat, naviko augimo ir proliferacijos bei imuninės sistemos sąveikos tyrimuose. Sferoidai, įterpti į matricą, naudojami invazijos, matricos remodeliavimo ir angiogenezės tyrimams [133, 134, 136]. 3D sferoidai apima ląstelių su ląstelėmis bei ląstelės ir matricos sąveiką tarp naviko ląstelių ir mikroaplinkos [134, 135], taip pat transportavimo savybes [137]. Didesni sferoidai palaiko deguonies ir maistinių medžiagų gradientus, dėl kurių dažnai susidaro nekrozinė šerdis, panaši į pablogėjusios kraujotakos navikus [138]. Dėl šių veiksnių vėžinių ląstelių baltymų ir genų ekspresijos profiliai sferoiduose yra daug artimesni klinikiniais ir *in vivo* genų ekspresijos profiliams nei 2D kultūrose [136, 138]. Vėžio sferoidai plačiai naudojami siekiant įvertinti naviko atsaką ir jautrumą chemoterapiniams vaistams, kombinuotam gydymui (pvz., chemoterapiniams vaistams ir mažų molekulių inhibitoriams), tikslinei chemoterapijai ir vaistų tiekimo priemonėms [139]. Naujausi tyrimai nagrinėjantys chlorogeno rūgšties potencialą vėžio gydyme, ypač 3D ląstelių kultūrų modeliuose, nurodo, kad chlorogeno rūgštis gali slopinti vėžio ląstelių proliferaciją ir sukelti apoptozę, o tai nusako jos potencialų panaudojimą, kaip terapinės priemonės, onkologijoje [140].

Apibendrinant, *Cirsium vulgare* ir kiti *Cirsium* genties augalai, išsiskiria dideliu bioaktyvių fenolinių junginių kiekiu, kuris gali turėti potencialą slopinti vėžio ląstelių augimą ir plitimą. Tyrimai su *C. vulgare* ekstraktais gali suteikti vertingų įžvalgų apie jų potencialą indukuoti apoptozę, slopinti migraciją ir sukelti citotoksiškumą vėžio ląstelėse, o tai skatina tolimesnius tyrimus vertinant ekstraktų poveikį vėžinėms ląstelėms.

1.3.3. Antimikrobinio aktyvumo tyrimai

Jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tyrimai yra esminiai norint identifikuoti specifinius vaistus, gauti tikslius epidemiologinius duomenis ir tiksliai prognozuoti gydymo rezultatus [4]. Siekiant ištirti antimikrobinį poveikį *in vitro* reikia žinoti galimas taikyti metodikas antimikrobinio poveikio nustatymui.

Naujų antimikrobinio poveikio medžiagų paieška yra būtina dėl augančios problemos – žinomų antimikrobinų vaistų neveiksmingumo, kuris yra susijęs su bakterijų atsparumu šiems vaistams [141]. Gamtinės kilmės produktai šiandien vis dar yra vienas iš pagrindinių naujų vaistų molekulių šaltinių. Jie gaunami iš prokariotinių bakterijų, eukariotinių mikroorganizmų, augalų ir įvairių gyvūnų organizmų. Iš augalų ir mikroorganizmų išgautos medžiagos sudaro didžiąją dalį iki šiol atrastų antimikrobinų junginių [142]. Augalai ir kiti natūralūs šaltiniai gali būti daugybės sudėtingų ir struktūriškai įvairių junginių šaltinis. Pastaruoju metu mokslininkai daugiausia dėmesio skiria augalų ir mikroorganizmų ekstraktų, eterinių aliejų, išgrynintų antrinių metabolitų bei naujų sintetinių molekulių, kaip galimų antimikrobinų medžiagų, tyrimams [143–145].

Antimikrobiniai tyrimai apima įvairius metodus, skirtus vertinti antimikrobinį aktyvumą prieš mikroorganizmus. Šie tyrimai yra skirstomi į difuzijos metodus, plonasluoksnės chromatografijos (TLC) – bioautografijos tyrimus, skiedimo metodus, angl. *time-kill assays* (matoma žūties laiko kreivė), ATP bioluminescencijos tyrimus ir srauto citofluorimetrinius metodus. Difuzijos metodai skirstomi į agarą disko difuzijos metodus, antimikrobinio gradiento tyrimus (Etest) ir kitus difuzijos metodus, tokius kaip agarą šulinėlio difuzijos metodas (angl. *agar well diffusion method*), agarą kamščio difuzijos metodas (angl. *agar plug diffusion method*), kryžminio ruožo metodas (angl. *cross-streak method*) ir apnuodyto maisto metodas (angl. *poisoned food method*) [146]. Khan ir kiti vertindami *C. arvense* antimikrobinį poveikį naudojo agarą šulinėlio difuzijos metodą. Tyrimo metu ištirti penki aktyvūs junginiai, aptikti *C. arvense* augalo žaliavoje: α -tokoferolis, 9,12,15-oktadekatrieno rūgštis, tracinai, hispidulinas ir liuteolinas. Tirtas šių junginių poveikis įvairioms bakterijų kultūroms (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*) ir mieliagybiams (*T. longifusus*, *C. albicans*, *A. flavus*, *M. canis*, *C. glabrata*, *F. solani*). Stipriausiu antimikrobinio poveikiu pasižymėjo junginiai: triterpenoidas – tracinai ir flavonoidai – hispidulinas, liuteolinas. Kaip kontrolinė medžiaga tyrime naudotas imipenemas [147]. Sabudak su bendraautoriais, pasirinkę naudoti agarą šulinėlio difuzijos metodą, kurio metu tyrė *C. vulgare* metanolinių ekstraktų poveikį *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* ir

P. aeruginosa bakterijų kultūroms, nustatė, kad *C. vulgare* ekstraktai labiau slopino *P. aeruginosa* ląstelių kultūrą [14].

Antimikrobinio aktyvumo tyrimuose gali būti naudojami trys bioautografiniai metodai: agarų difuzija (dar žinomas kaip kontakto su agaru metodas), tiesioginė bioautografija ir agarų uždengimas (skiedimo metodai): sultinio skiedimas ir agarų skiedimas. 1.3.3.1 lentelėje pateikiama kokie metodai ir mitybinės terpės tinka tirti skirtingas mikroorganizmų grupes.

1.3.3.1 lentelė. Antimikrobinio aktyvumo tyrimo metodai taikomi tirti skirtingas mikroorganizmų grupes, remiantis CLSI rekomendacijomis

Metodai	Mikroorganizmai	Augimo terpės
Disko difuzijos metodas	Bakterijos/grybeliai/mielės	MHA / nepapildytas MHA / MHA + ^a GMB
Sultinio mikroskiedimo metodas	Bakterijos/grybeliai/mielės	MHB / ^b RPMI 1640 / ^b RPMI 1640
Sultinio makroskiedimo metodas	Bakterijos/grybeliai/mielės	MHB / ^b RPMI 1640 / ^b RPMI 1640
Agarų skiedimo metodas	Bakterijos	MHA
Laiko nužudymo testas	Bakterijos	MHB

MHA: Muellerio–Hintono agaras. MHB: Muellerio–Hintono sultinys. ^aGMB: terpė su Muellerio–Hintono agaru, papildyta 2 proc. gliukozės ir 0,5 mg/ml metileno mėlynojo. ^bRPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640 terpė (su glutaminu, be bikarbonato ir su fenolio raudonuoju kaip pH indikatoriumi) 1640, buferizuota iki pH 7 su MOPS (morfolino propiono sulfonrūgštimi) esant 0,165 M.

Skiedimo metodai yra tinkamiausi MSK reikšmėms nustatyti, nes jie suteikia galimybę įvertinti tiriamos antimikrobinės medžiagos koncentraciją agare (agarų skiedimas) arba sultinio (makroskiedimas arba mikroskiedimas) terpėje. Antimikrobiniam aktyvumui prieš bakterijas ir grybelius kiekybiškai išmatuoti *in vitro* gali būti naudojamas sultinio arba agarų skiedimo metodas. Nustatyta MSK reikšmė apibrėžiama kaip mažiausia tiriamos antimikrobinės medžiagos koncentracija, kuri slopina matomą tiriamo mikroorganizmo augimą ir įprastai yra išreiškiama µg/ml arba mg/l. Paskelbta nemažai rekomendacijų antimikrobinio aktyvumo prieš atsparias arba sunkiai paveikiamas bakterijas, mieliagrybius ir grybelius įvertinimui, tačiau plačiausiai pripažinti standartai pateikiami CLSI (angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) bei Europos antimikrobinio jautrumo tyrimų komitete (EUCAST) [148]. Kurc ir kiti autoriai, pasirinko sultinio mikroskiedimo metodą tyrimams, siekdami įvertinti dygiųjų usnių ekstraktų antimikrobinį poveikį įvairioms mikroorganizmų rūšims, įskaitant gramteigiamas bakterijas *S. aureus*

ir *B. subtilis*, gramneigiamas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, mieliagrybius *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ir pelėsinis grybus *P. chrysogenum*, *A. fumigatus*. Šis metodas buvo pasirinktas dėl savo paprastumo ir efektyvumo vertinant mikroorganizmų augimo slopinimą, nes sultinio mikroskiedimo technika leidžia tiksliai nustatyti minimalią slopinančią koncentraciją (MSK), kurią pasiekus, ekstraktas efektyviai slopina mikroorganizmų augimą. Tyrimo metu nustatyta, kad dygiųjų usnių ekstraktai gali veikti mikroorganizmus dėl savo biologiškai aktyvių komponentų, kurie turi antimikrobinį poveikį, slopindami bakterijų ir grybų ląstelių dauginimąsi bei vystymąsi. Tyrime naudoti heksaniniai ekstraktai pasižymėjo didžiausiu veiksmingumu vertinant MSK reikšmes. Mažiausiu veiksmingumu pasižymėjo metanoliniai *C. vulgare* ekstraktai [13]. Šį metodą dygiųjų usnių ekstraktų antimikrobiniam aktyvumui nustatyti naudojo ir autoriai Nazaruk su kitais bendraautoriais. Autoriai tyrime naudojo dvi gramteigiamas bakterijų kultūras *S. aureus* ir *B. subtilis*, gramneigiamą *P. aeruginosa* ir mieliagrybių kultūros atstovą – *C. albicans*. Tyrime naudoti vandeniniai *C. vulgare* ekstraktai pasižymėjo mažu veiksmingumu prieš *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ir *C. albicans* mikroorganizmų kultūras (MSK > 50 mg/ml) [149]. *C. vulgare* antimikrobinio poveikio tyrimą atlikę autoriai Sabudak su bendraautoriais, taip pat pasirinko naudoti sultinio skiedimo metodą. Tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti augalų ekstraktų antibakterinį poveikį keturioms bakterijų kultūroms: *S. aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 35218), *B. subtilis* (NRRL NRS-744), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) [13]. Agarų skiedimo metodą taikė ir Karasacal su bendraautoriais, kurie tyrinėjo *Cirsium bulgaricum* lapų ekstraktus. Antibakteriniam aktyvumui nustatyti *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* bakterijų kultūros naudotos kaip tiriamosios bakterijos. Visgi šio tyrimo metu buvo vertintas ploto pokytis užsėjimo vietoje, o ne MSK reikšmės. Acetono pagrindu pagaminti *C. bulgaricum* lapų ekstraktai parodė antibakterinį aktyvumą prieš visas tirtas bakterijų rūšis – slopinimo zonų skersmuo svyravo nuo $17,00 \pm 1,72$ mm iki $19,88 \pm 1,75$ mm. Metanolio 80 proc. (v/v) pagrindu pagaminti ekstraktai taip pat veikė visas tirtas bakterijas, tačiau jų slopinimo zonos buvo mažesnės – nuo $11,35 \pm 1,43$ mm iki $14,43 \pm 1,32$ mm [150].

Agarų skiedimo metodas apima skirtingų norimų antimikrobinų medžiagų koncentracijų įterpimą į agarą terpę (išlydytą agarą terpę), įprastai naudojant serijinius dvigubus skiedimus, vėliau į agarą plokštelės paviršių pasėjant apibrėžtą mikrobinį inokuliantą. Atliekant tyrimą šiuo metodu MSK laikoma mažiausia antimikrobinės medžiagos koncentracija, kuri visiškai slopina augimą tinkamomis inkubavimo sąlygomis. Šis metodas tinka tiek antibakteriniam, tiek priešgrybeliniam poveikiui tirti. Jei tiriami keli izoliatai prieš vieną junginį arba jei tirtas junginys (arba ekstraktas) užmaskuoja

mikrobų augimą skystoje terpėje savo dažymu, MSK nustatymui dažnai pirmenybė teikiama agaro skiedimo metodui, o ne sultinio metodui. Agaro skiedimo metodas dažnai rekomenduojamas kaip standartizuotas metodas specifiniams mikroorganizmams, tokiems kaip anaerobinės *Helicobacter* rūšys, tirti. Jis taip pat naudojamas tiriant priešgrybelinių medžiagų ir vaistų derinių aktyvumą prieš *Candida* sp., *Aspergillus*, *Fusarium* grybelio padermes ir dermatofitus [151–155]. Skiedimo agaru metodas rodo gerą koreliaciją su Etest (minimalios slopinančios koncentracijos testu), ypač atliekant antibakterinius tyrimus prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas. Palyginus agaro skiedimo, disko difuzijos ir sultinio mikroskiedimo metodus, galima gauti išsamesnius ir patikimesnius rezultatus, leidžiančius tiksliau įvertinti antimikrobinio aktyvumo spektrą ir efektyvumą [156]. Priešgrybeliniams tyrimams dažnai taikoma mikroduobučių testavimo technika, kuri leidžia įvertinti grybelio augimo slopinimą esant skirtingoms priešgrybelinių medžiagų koncentracijoms. Taip pat yra taikomi šiuolaikiniai metodai, tokie kaip mikroskopijos technikos, leidžiančios stebėti grybelio morfologinius pokyčius, ir molekuliniai metodai, pvz., PGR (polimerazės grandininė reakcija), siekiant identifikuoti grybelio rūšį ir nustatyti atsparumą specifinėms antimikrobinėms medžiagoms. Apsinuodijimo maistu nustatymo metodai taip pat gali būti taikomi siekiant aptikti specifinius maisto teršalus, tokius kaip *Vibrio parahaemolyticus*, kuris yra viena iš pagrindinių apsinuodijimo jūrų gėrybėmis priežasčių. Šie metodai taip pat gali būti naudojami vertinant grybelinių teršalų, įskaitant mikotoksinų, buvimą ir jų poveikį maisto produktams, ypač analizuojant grybelio atsparumą įvairiems antimikrobiniais agentams. Norint toliau nuodugniai ištirti antimikrobinį mikroorganizmo poveikį, rekomenduojami nuo laiko priklausomi žūties testai ir srauto citofluorometriniai metodai, kurie suteikia informacijos apie slopinamojo poveikio pobūdį (baktericidinį ar bakteriostatinį) (priklausomą nuo laiko arba priklausomą nuo koncentracijos) ir ląstelių pažeidimą (apie tiriamajam mikroorganizmui padarytą žalą) [146].

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Dygosios usnies (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.) mėginiai tyrimui auginti ir rinkti VU Šiaulių akademijos botanikos sode (55°55'57" šiaurės platumos, 23°16'59" rytų ilgumos (PGS)). Tyrimo objektu pasirinkti *C. vulgare* augalo lapai, žiedynai ir šaknys, surinkti 2020–2022 metais, fenologiniais laikotarpiais, nuo ramybės laikotarpio pabaigos iki sėklų brandos. Tikslios žaliavos rinkimo datos pateiktos lentelėje 2.1.1 lentelėje.

2.1.1 lentelė. Fenologiniai *C. vulgare* žaliavų rinkimo tarpsniai ir rinkimo datos

Fenologinis tarpsnis	Rinkimo data
Ramybės periodo pabaiga	04.11, 04.25, 05.09, 05.23
Masinis atžėlimas	06.06, 06.20
Butonizacija	07.04
Žydėjimo pradžia	07.18
Masinis žydėjimas	08.01, 08.15
Žydėjimo pabaiga	08.29
Sėklų branda	09.12

Atskirti dygosios usnies lapai, žiedynai ir šaknys džiovinti 40 °C temperatūroje džiovinimo kameroje. Po džiovinimo augalo dalys susmulkintos malūnėliu ir gauta susmulkinta masė sijota per 0,5 mm trapecijos formos sietą. Kiekvienas mėginys paimtas iš trijų skirtingų augalų, atitinkamų dalių (žiedynų, lapų ar šaknų). Visi eksperimentai kartoti 3 kartus (n = 3).

2.2. Medžiagos ir reagentai

Ekstraktų gamybai tyrimuose naudotas 96 proc. etanolis („Vilniaus degtinė“, Vilnius, Lietuva). Dejonizuotas vanduo ekstraktams ruošti pagamintas naudojant „Super Purity Water System“, Millipore, JAV. Tyrime naudoti ESC ir analitinės kokybės reagentai: trifluoracto rūgštis ir acetonitrilas („Sigma–Aldrich“ Steinheim miestas, Vokietija). Tyrime naudoti standartiniai lyginamieji junginiai: chlorogeno rūgštis, apigenin-7-*O*-gliukozidas, apigeninas, liuteolinas, hiperozidas, neochlorogeno rūgštis, izokvercitrinas, *p*-kumaro rūgštis, kavos rūgštis, *trans*-ferulo rūgštis ir 4-*O*-kafeoilchino rūgštis, rutinas („Sigma–Aldrich“, Steinheim, Vokietija).

Antioksidaciniam tyrimui atlikti naudotas vario (II) chlorido dihidratas įsigytas iš „Alfa Aesar GmbH & Co KG“ Karlsruhė, Vokietija, o neokup-roinas iš „Sigma–Aldrich Chemie“, Steinheim, Vokietija. Tyrime naudota amonio acetato buferinė sistema pH 7 iš „Sigma–Aldrich“ Hoeilaart, Belgija. Referencinis standartas Trolox (98 proc.) įsigytas iš „FlukaChemika“ Buchs, Šveicarija. Žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos ląstelių linija HT–29 ir žmogaus skrandžio karcinomos ląstelių linija – KATO III, gautos iš Amerikos ląstelių kultūrų kolekcijos (ATCC, Manassas, VA, JAV). Žmogaus odos fibroblastai (HF) gauti iš ATCC ir pateikti prof. Helder Santos (Helsinkio universitetas, Suomija). Visos ląstelių linijos kultivuojamos Dul-becco modifikuotoje Eagle’s GlutaMAX terpėje (Gibco (Carlsbad, CA, JAV)), papildytoje 10 000 V/ml penicilino, 10 mg/ml streptomicino (Gibco) ir 10 proc. galvijų vaisiaus serumo (Gibco). „Miulerio–Hintono“ agaras gautas iš „BBL“ Baltimorėje, MD, JAV. Ląstelių kultūrų kolekcijos anti-mikrobiniam tyrimui: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 8035, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Candida albicans* ATCC 10231 buvo gautos iš Amerikos ląste-lių kultūrų kolekcijos (ATCC, Manassas, VA, JAV).

2.3. Ekstrakcijos metodai

Ekstrakcija ultragarsu. $0,1 \pm 0,001$ g sausų sumaltų dygiosios usnies lapų mišinys (3 skirtingų augalų), 10 ml tikslaus matavimo kolbutėse, užpilamas 10 ml 50 proc. (v/v) etanolio. Ekstrakcija vykdoma naudojant ultragarso vonelę (dažnis 38 kHz) („Grant Instruments TM XUB12 Digital“, Kembridžas, Jungtinė Karalystė). Ekstrakcijos trukmė 10 min., 15 min., 30 min., 45 min. arba 60 min. Gauti ekstraktai filtruojami per $0,22 \mu\text{m}$ PTFE hidrofobinius filtrus į stiklinius buteliukus. Bandymai kartojami tris kartus ($n = 3$).

Maceracija. $0,1 \pm 0,001$ g sausų sumaltų dygiosios usnies lapų mišinys (3 skirtingų augalų), 50 ml talpos plokščiadugnėse kolbose, užpilamas 10 ml 50 proc. (v/v) etanolio, kurios yra sandariai uždaromos ir laikomos tamsioje spintoje, periodiškai pamaišant. Ši ekstrakcija vykdoma 6 val., 12 val., 24 val. arba 48 val. Gauti ekstraktai filtruojami per $0,22 \mu\text{m}$ PTFE hidro-fobinius filtrus į stiklinius buteliukus. Bandymai kartojami tris kartus ($n = 3$).

Šildymas su grįžtamuju šaldytuvu. $0,1 \pm 0,001$ g sausų sumaltų dygiosios usnies lapų, šaknų ar žiedynų mišinys (3 skirtingų augalų), 100 ml talpos apvaliadugnėse kolbose, užpilamas 10 ml 50 proc. (v/v) etanolio.

Kolbos patalpinamos į glicerolio vonią ir prijungiamas grįžtamasis šaldytuvas. Ekstrakcija vykdoma 90 °C temperatūroje. Ekstrakcijos trukmė 30 min., 1 val., 1,5 val., 2 val. arba 3 val. Gauti ekstraktai filtruojami per 0,22 µm PTFE hidrofobinius filtrus į stiklinius buteliukus. Bandymai kartojami tris kartus (n = 3).

Sausųjų ekstraktų gamyba. $0,5 \pm 0,001$ g sausų sumaltų dygiosios usnies lapų, žiedynų ar šaknų mišinys (3 skirtingų augalų), 250 ml talpos apvaliadugnėse kolbose, užpilamas 50 ml 50 proc. (v/v) etanolio. Kolbos patalpinamos į glicerolio vonią, prijungiamas grįžtamasis šaldytuvas, ekstrakcija vykdoma 90 °C temperatūroje 1,5 val. Gauti ekstraktai filtruojami per 0,22 µm PTFE hidrofobinį filtrą į stiklinius buteliukus. Vakuomo pagalba pašalinamas etanolis, o likęs tirpalo likutis dedamas į džiovinimo spintą (40 °C temperatūroje) ir džiovinamas iki sausos masės. Sausieji ekstraktai naudoti dygiosios usnies antimikrobinio ir priešvėžinio poveikio įvertinimui.

2.4. Tyrimo metodai

Fenolinių junginių sudėties ir kiekio nustatymas dygiosios usnies etanoliniuose ekstraktuose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Kokybinė ir kiekybinė fenolinių junginių analizė atlikta Waters Alliance 2695 skysčių chromatografu su Waters 996 diodų matricos detektoriumi (DMD) ir kolonėle ACE C18 (250 mm × 4,6 mm) sorbento dalelių dydis 5 µm („Advanced Chromatography Technologies“, Aberdynas, Škotija). Mobiliąją fazę sudarė tirpikliai A (0,1 proc. trifluoracto rūgštis) ir B (acetonitrilas). Taikytas gradientinis eliuavimas: 95 proc. A/5 proc. B 0 min., 85 proc. A/15 proc. B 8 min., 80 proc. A/20 proc. B 30 min., 60 proc. A/40 proc. B 48 min., 50 proc. A/50 proc. B 58–65 min., 5 proc. A/ 95 proc. B 66–70 min. ir 95 proc. A/5 proc. B 71 min. Eliuento tėkmės greitis 1 ml/min., injekcijos tūris – 10 µl, kolonėlės temperatūra 25 °C. Absorbcija matuojama šviesos bangų diapazone nuo 230 nm iki 400 nm. Fenolinių junginių identifikavimas atliktas naudojant šiuos standartinių junginių tirpalus pagal sulaikymo trukmes ir šviesos absorbcijos spektrus: chlorogeno rūgštį, apigenin-7-*O*-gliukozidą, apigeniną, liuteoliną, hiperozidą, neochlorogeno rūgštį, izokvercitriną, *p*-kumaro rūgštį, kavos rūgštį, rutiną, *trans*-ferulo rūgštį ir 4-*O*-kafeoilchino rūgštį. Eksperimentai kartoti tris kartus. Suminis fenolinių junginių kiekis buvo apskaičiuotas remiantis kiekybiniais rezultatais, gautais pagal atitinkamų junginių kalibracinius grafikus. Vienuolikos identifikuotų junginių kiekiai buvo sumuojami, taip gaunant suminį fenolinių junginių kiekį atitinkamais fenologiniais tarpsniais.

Aminorūgščių sudėties ir kiekio nustatymas etanoliniuose dygiosios usnies ekstraktuose dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu. Analizė atlikta naudojant SHIMADZU GC/MS–QP2010nc Ultra chromatografinę sistemą (su elektronų jonizacijos (EJ) jonų šaltiniu ir vienu kvadrupoliu, „Shimadzu Technologies“, Kiotas, Japonija). Palaikoma injektoriaus temperatūra 250 °C. Analitės atskirtos naudojant Rxi–5ms (5 proc. difenilo ir 95 proc. polidimetilsiloksano) kapiliarinę kolonėlę 30 m ilgio, 0,25 mm išorinio skersmens ir 0,25 µm skystos stacionarios fazės storio („Restek Corporation“, Beaufort, PA, JAV). Nešančios dujos – analitinio grynumo (99,999 proc.) helis, srauto greitis 1,49 ml/min. Termostatas užprogramuojamas naudojant laipsniško kolonėlės temperatūros pokyčio programą: 75 °C 5 min., po to padidinama iki 290 °C esant 10 °C/min. ir didinama iki 320 °C esant 20 °C/min., palaikoma 10 min. Bendra analizės trukmė 41 min. Masių spektrometro sąsajos ir jonų šaltinio temperatūra nustatyta atitinkamai 280 °C ir 200 °C. Tyrimo rezultatai registruojami naudojant bendrojo jonų srauto signalo (angl. *TIC*, *total ion chromatogram*) ir pasirinktų fragmentų stebėjimo (angl. *SIM*, *selected ion monitoring*) režimu, skenavimo diapazonas tarp 35–500 m/z. Masių spektrometrija veikė teigiamu režimu (elektronų energija 70 eV). Injekcijos tūris – 1 µl, taikytas srauto padalinimo santykis 1:20. Duomenų surinkimas ir analizė atlikta naudojant LabSolution GC/MS (5.71 versija) („Shimadzu Corporation“, Kiotas, Japonija). Eksperimentai kartoti 3 kartus.

Efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) ir dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (DC–MS) metodų validavimas. Fenolinių junginių bei aminorūgščių kiekybiniam įvertinimui dygiosios usnies (*C. vulgaris*) ekstraktuose taikyti efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) ir dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (DC–MS) metodai buvo validuoti vadovaujantis ICH Q2(R2) gairėmis [157]. Metodų tinkamumui įvertinti šie validacijos parametrai: tiesiškumas, tikslumas, preciziškumas, aptikimo ir nustatymo ribos, specifiškumas, teisingumas bei tvirtumas. Tiesiškumas įvertintas sudarant kalibracines kreives ir apskaičiuojant jų regresijos lygtis bei koreliacijos koeficientus. Aptikimo ir nustatymo ribos nustatytos remiantis signalo ir triukšmo santykiu. Preciziškumas įvertintas atliekant pakartotinius matavimus per trumpą laiką bei skirtingomis dienomis, apskaičiuojant santykinio standartinio nuokrypio reikšmes. Tikslumas nustatytas atlikus atkūrimo tyrimus, kai tiriamajai matricai buvo pridėtas žinomas standartinių junginių kiekis. Specifiškumas patvirtintas palyginus ekstraktuose identifikuotas smailes su atitinkamais grynųjų standartų signalais, užtikrinant, kad analizės metu nėra trikdančių ar persidengiančių medžiagų. Darbo sritys apėmė analizuojamų junginių koncentracijų intervalą, o metodo

tvirtumas įvertintas atliekant analizę pastoviomis eksperimentinėmis sąlygomis, stebint rezultatų stabilumą.

2.5. Antioksidacinio aktyvumo *in vitro* nustatymas

Mėginio antioksidacinio poveikio nustatymas atliekamas spektrofotometrinio metodu, naudojant CUPRAC reagentą. Tirtų junginių antioksidacinio poveikio nustatymui naudojamas spektrofotometras (HALO DB 20) ir CUPRAC reagentas. CUPRAC reagento sudėtis: 0,1 M vario (II) chlorido vandeninis tirpalas, 0,1 amonio acetato buferinis tirpalas (pH 7), 0,0075 M neokuproino metanolinis ($(\text{CH}_3)_2\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2$) tirpalas, kurių santykis 1:1:1. Pagamintas reagentas laikomas tamsoje, kambario temperatūroje, vieną valandą. Tyrimo eiga: 10 μl mėginio (ekstrakto) sumaišoma su 3 ml CUPRAC reagento. Po 30 minučių inkubacijos kambario temperatūroje registruojama absorbcija esant 450 nm šviesos bangos ilgiui. Antioksidacinis aktyvumas CUPRAC metodu išreiškiamas pagal trolokso ekvivalentą, sudarant kalibracinę trolokso kreivę: $y = 0,00004x + 0,0215$; $R^2 = 0,9991$. Eksperimentai kartoti tris kartus.

2.6. Priešvėžinio aktyvumo *in vitro* nustatymas

Ląstelių kultūrų auginimas. Žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos ląstelių linija HT–29, žmogaus skrandžio karcinomos ląstelių linija KATO III ir žmogaus odos fibroblastų linija CRL – 1502 (HF) auginamos 37 °C temperatūroje, esant 95 proc. santykinei drėgmei, kurioje buvo 5 proc. CO_2 .

Ląstelių gyvybingumo tyrimas. Sausų ekstraktų poveikis ląstelių gyvybingumui tiriamas naudojant 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido (MTT; „Sigma–Aldrich Co.“, MO, JAV) redukcijos metodą. Šio tyrimo metodą aprašė ir pritaikė mokslininkai Braciulienė ir kiti [158]. Ląstelės sėjamos į 96 šulinėlių plokšteles, po 4×10^3 KATO III ir HT–29 ląstelių, ir 5×10^3 HF šulinėlyje. Po 24 val. inkubacijos ląstelės paveikiamos sausų ekstraktų serijiniais skiedimais (nuo 2,5 iki 0,016 mg/ml) arba chlorogeno rūgštimi (nuo 500 iki 15,6 μmol). Po 72 val. įpilama 20 μl 5 mg/ml MTT reagento ir inkubuojama 3 val. Tuomet susidarę formazano kristalai ištirpinami DMSO („Sigma–Aldrich Co.“, MO, JAV). Absorbcija matuojama daugiafunkciniu mikroplokštelių skaitytuvu esant 570 ir 630 nm šviesos bangos ilgiui. Ląstelės, inkubuotos terpėje be tiriamųjų medžiagų, naudojamos kaip neigiama kontrolė (jų gyvybingumas atitiko 1,0), o šulinėliai be ląstelių, kuriuose buvo tik terpė, naudotos kaip teigiama kontrolė (ląstelių

gyvybingumas atitiko 0). Panaudojant Hilo lygtį, apskaičiuojamos EC_{50} vertės (junginio/ekstrakto koncentracija, kuri sukelia 50 proc. ląstelių metabolinio aktyvumo sumažėjimą). Eksperimentai kartojami tris kartus.

Poveikio ląstelių migracijai tyrimas „Žaizdos gijimo“ metodu. Tyrimo metodą aprašė Dabkevičiūtė ir kiti [159]. Vėžinės ląstelės pasėjamos po 6×10^4 ląstelių/šulinėlyje 24 šulinėlių plokštelėse. Po 48 val. inkubacijos 100 μ l pipetės antgaliu padaromi įbrėžimai kiekviename šulinėlyje. Ląstelės šulinėliuose atsargiai praplaunamos PBS ir įpilama šviežia terpė, kurioje yra 0,2 arba 0,1 mg/ml ekstraktų. Kaip neigiama kontrolė naudojama terpė be ekstraktų. Eksperimentai kartojami tris kartus.

Ekstraktų aktyvumas ląstelių 3D kultūrose (sferoiduose). Vėžinių ląstelių sferoidams suformuoti naudojamas magnetinio 3D biospausdinimo metodas, kaip aprašyta Šermukšnytės ir kitų autorių [160]. Pirmiausia, ląstelės auginamos 6 šulinėlių plokštelėje iki kol ląstelės padengia apie 70 proc. šulinėlio paviršiaus. Tuomet į šulinėlį įpilama 20 μ l nanodalelių Nanoshuttle („n3D Biosciences”, Inc., Hiustonas, Teksasas, JAV) ir inkubuojama 8 val. Po to ląstelės tripsinizuojamos, centrifuguojamos ir sėjamos į itin mažo prilipimo 96 šulinėlių plokštelę taip, kad viename šulinėlyje būtų $1,5 \times 10^3$ vėžinių ląstelių ir $1,5 \times 10^3$ žmogaus fibroblastų. Plokštelė uždedama ant specialaus padėklo su 96 magnetais ir inkubuojamos dvi dienas 37 °C temperatūroje, esant 95 proc. santykinei drėgmei. Tuomet susiformuoja sferoidai. Terpė pakeičiama šviežia terpe su 0,35 mg/ml tiriamųjų ekstraktų. Eksperimentai kartojami tris kartus. Sferoidų nuotraukos daromos kas dvi dienas Olympus IX73 invertuotu mikroskopu („OLYMPUS CORPORATION“, Tokijas, Japonija), o sferoidų dydžio analizė atliekama naudojant ImageJ, 1.53o versija („National Institutes of Health“, Betesda, Marilandas, JAV) ir Microsoft „Office Excel 2024“ programinę įrangą („Microsoft Corporation“, Redmondas, WA, JAV). Paskutinę eksperimento dieną į kiekvieną šulinėlį įpilama po 10 μ l WST–1 reagento („Sigma–Aldrich Co“, Burlingtonas, MA, JAV). Po 10 val. inkubacijos 50 μ l skysčio iš kiekvieno šulinėlio perkeliama į kitą 96 šulinėlių plokštelę, o absorbcija išmatuojama esant 460 ir 530 nm bangos ilgiui.

2.7. Antimikrobinio aktyvumo *in vitro* nustatymas

Antimikrobinis aktyvumas nustatytas difuzijos į standųjį mitybinį agarą metodu. Naudotas Miulerio–Hintono agaras („Mueller–Hinton II Agar“, Baltimorė JAV). Etaloninės nesporinių bakterijų *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus vulgaris* kultūros auginamos 20–24 val. 35–37 °C temperatūroje ant Miulerio–Hintono agaro („Mueller–Hinton II Agar“, Baltimorė, JAV). Bakterijų suspensija gaminama iš išaugintų bakterijų kultūrų steriliame fiziologiniame natrio chlorido (0,9 proc.) tirpale, standartizuojama McFarland'o standartiniu indikatoriumi („Standart indikator McFarland“) „Sigma–Aldrich“, Hoeilaart, Belgija), kuris matuoja mėgintuvėlyje esančios suspensijos drumstumą. Bakterijų suspensija laikoma standartizuota, kai indikatoriaus reikšmė lygi 0,5. Tai reiškia, kad 1 ml bakterijų suspensijos yra $1,5 \times 10^8$ mikroorganizmo ląstelių. Etaloninė sporinė bakterijų *Bacillus cereus* kultūra auginama 7 dienas 35–37 °C temperatūroje ant Miulerio–Hintono agaro. Užaugus sporinių bakterijų kultūrai, ji nuplaunama nuo terpės paviršiaus steriliu fiziologiniu tirpalu. Pagaminta suspensija šildoma 30 min. 70 °C temperatūroje ir skiedžiama fiziologiniu tirpalu, kol sporų koncentracija 1 ml yra ribose nuo 10×10^6 iki 100×10^6 . Tokią pagamintą sporų suspensiją galima laikyti ilgą laiką žemesnėje nei 4 °C temperatūroje. Etaloninė mieliagrybių kultūra – *Candida albicans* auginama 20–24 val. 30 °C temperatūroje 72 val. ant Saburo agaro. Mieliagrybių suspensija gaminama iš užaugintų mieliagrybių kultūrų fiziologiniame tirpale, standartizuojama McFarland'o standartiniu indikatoriumi.

Tyrime naudoti 0,02–0,1 mg/ml etanoliniai ir 0,033 mg/ml koncentracijos sausieji *C. vulgare* ekstraktai. Į sterilias Petri lėkštes pilta po 0,5–1 ml etanolinių ir po 1 ml, 0,5 ml, 0,4 ml, 0,3 ml, 0,2 ml ir 0,1 ml sausųjų ekstraktų, ištirpintų 5 ml Miulerio–Hintono agare. Į kiekvieną Petri lėkštelę su mėginiu įpilama po 5 ml 45 °C skysto Miulerio–Hintono agaro ir sumaišoma. Agarui sukietėjus, atskiruose segmentuose pasėjamos paruoštos etaloninių mikroorganizmų kultūros. Miulerio–Hintono agaras su mėginiais ir įvestomis etaloninėmis bakterijų kultūromis inkubuojamas termostate 20–24 val. 35 °C temperatūroje, o po to dar 24 val. laikomas kambario temperatūroje. Eksperimentai kartojami tris kartus. Ištirto mėginio antimikrobinis aktyvumas vertinamas lyginant jį su etalonine mikroorganizmų kultūra. Jei etaloninė mikroorganizmo kultūra auga pasėlio vietoje, laikoma, kad mėginys neslopina etaloninės mikroorganizmo kultūros augimo; jei etaloninė mikroorganizmo kultūra neauga pasėlio vietoje, laikoma, kad mėginys turi antimikrobinį poveikį prieš šį etaloninį mikroorganizmą. Naudojant agaro difuzijos metodą, papildomai yra nustatoma tiriamo mėginio minimali slopinanti koncentracija

(MSK). MSK apibrėžiama kaip mažiausia antimikrobinės medžiagos koncentracija, kuri slopina matomą mikroorganizmo augimą po inkubacijos per naktį. Šis metodas suteikia kiekybinius duomenis apie antimikrobinio poveikio stiprumą prieš tiriamas mikroorganizmų kultūras.

2.8. Statistinė analizė

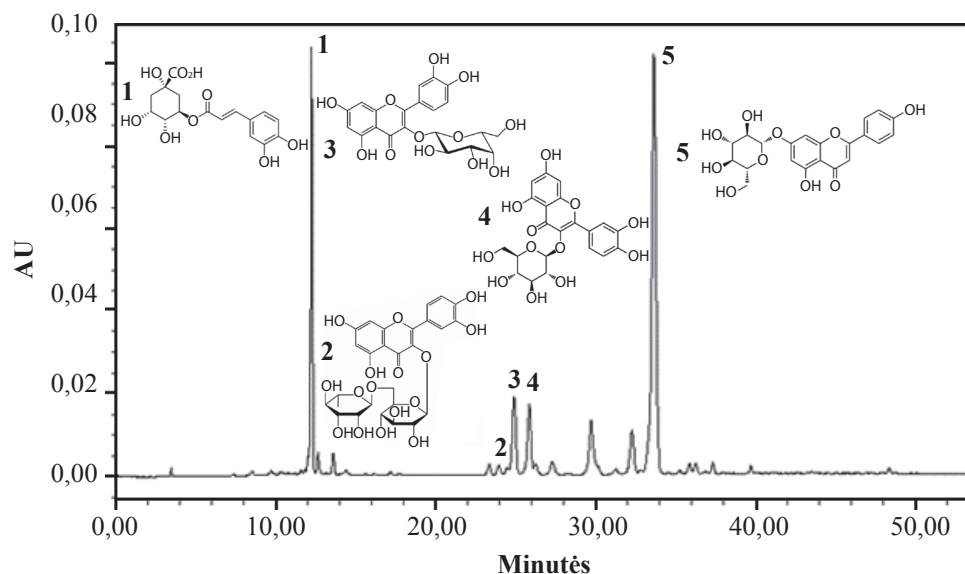
Kiekybiniai rezultatai pateikiami kaip trijų pakartojimų vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis (SD). Duomenys apdoroti naudojant „Microsoft Office Excel 2024“ („Microsoft“, WA, JAV) ir „SPSS 25“ („IBM“, NY, JAV) programinę įrangą. Reikšmingi skirtumai tarp *C. vulgare* žiedynų, lapų ir šaknų ekstraktų nustatyti taikant vienfaktorę dispersijos analizę (ANOVA) su Tukey post hoc testu, kuri taip pat naudota atliekant priešvėžinių ir antimikrobinų rezultatų analizę. Pearsono koreliacinė analizė atlikta siekiant nustatyti ryšį tarp fenolinių junginių kiekio ir žiedynų, lapų bei šaknų ekstraktų antioksidacinio poveikio. Kalibracinėms kreivėms sudaryti naudota tiesinė regresinė analizė, kurios metu įvertintas ryšys tarp analitės koncentracijos ir signalo stiprumo, apskaičiuotas regresijos koeficientas (R^2), o reikšmės laikytos tinkamomis, kai $R^2 \geq 0,99$. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties nustatymas *C. vulgare* augalinių žaliavų ekstraktuose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

3.1.1. Ekstrakcijos sąlygų parinkimas

Ekstrahento ir ekstrakcijos sąlygų parinkimas yra reikšminga proceso dalis, vystant augalinių žaliavų biologiškai aktyvių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties nustatymo metodiką [161]. Vertinant ekstrahento poliškumo įtaką fenolinių junginių ekstrakcijai iš dygiųjų usnių augalinės žaliavos, tyrimui pasirinkta naudoti dejonizuotą vandenį ir skirtingos koncentracijos etanolį – 50 proc. (v/v), 60 proc. (v/v), 70 proc. (v/v), 80 proc. (v/v), 90 proc. (v/v) ir 96 proc. (v/v). Paruošti ekstraktai 15 min. laikyti ultragarso vonelėje. Dygiųjų usnių ekstraktuose fenoliniai junginiai nustatyti naudojant ESC metodą. Tyrimo metu identifikuoti penki fenoliniai junginiai: apigenin-7-*O*-gliukozidas, chlorogeno rūgštis, rutinas, hiperozidas ir izokvercitrinas. Junginių chromatograma pateikta 3.1.1.1 pav.



3.1.1.1 pav. Fenoliniai junginiai identifikuoti dygiųjų usnių lapų ekstraktuose

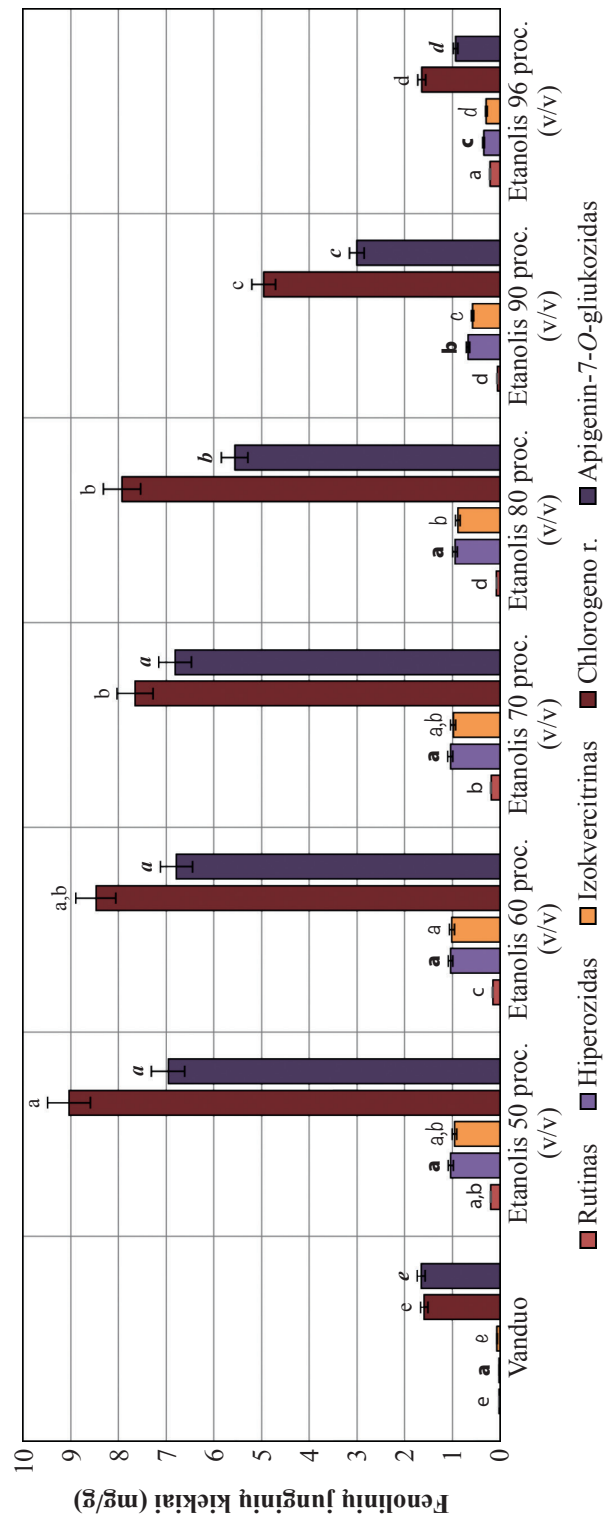
1 – chlorogeno rūgštis (CGA), 2 – rutinas, 3 – hiperozidas, 4 – izokvercitrinas, 5 – apigenin-7-*O*-gliukozidas (A7G).

Įvertinus dygiųjų usnių ekstraktuose identifikuotų junginių apigenin-7-*O*-gliukozido, chlorogeno rūgšties, rutino, hiperozido ir izokvercitrino kiekybinę sudėtį, nustatyta, kad didžiausi fenolinių junginių kiekiai gauti naudojant 50 proc. (v/v) etanolį ($p < 0,05$) (3.1.1.2 pav.). Dygiosios usnies lapų ekstrakto, pagamintame naudojant 50 proc. (v/v) etanolį, chlorogeno rūgšties ir apigenin-7-*O*-gliukozido kiekiai buvo atitinkamai 5,5 ir 7,5 karto didesni už kiekius nustatytus dygiosios usnies ekstrakto, pagamintame su 96 proc. (v/v) etanolio ir vandeniu atitinkamai (3.1.1.2 pav.).

Mokslininkai, Sieliwoniuk ir kiti, atliko *C. vulgare* augalinės žaliavos ekstrakciją naudodami 70 proc. (v/v) metanolį ir 70 proc. (v/v) etanolį. Jų gauti rezultatai parodė, kad didesni fenolinių junginių (chlorogeno rūgšties, liuteolino-7-*O*-gliukozido ir apigenino) kiekiai gauti ekstraktų gamybai pasirinkant 70 proc. (v/v) metanolį [30]. Koryza ir kiti autoriai, *Cirsium canum* žiedynų ekstraktų gamybai naudojo 50 proc. (v/v) metanolį, 80 proc. (v/v) metanolį, 100 proc. metanolį, dichlormetaną, acetoną ir etilacetatą. Didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis nustatytas, ekstrakcijai naudojant 50 proc. (v/v) metanolį ($p < 0,05$) [162]. Publikacijoje autoriai nurodo, kad tiriant apigenino kiekį *C. canum* žiedynų ekstraktuose, pagamintuose naudojant 50 proc. (v/v) metanolį, 80 proc. (v/v) metanolį, 100 proc. metanolį, acetoną ir etilacetatą, statistiškai reikšmingų apigenino kiekių skirtumų nenustatyta [162].

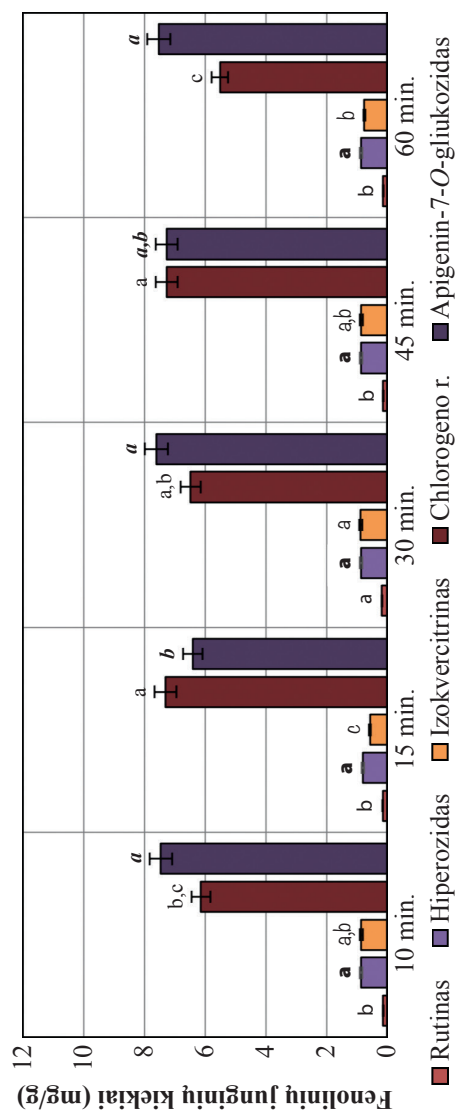
Fenolinių junginių nustatymui svarbu parinkti tinkamiausią ekstrakcijos metodą, nes nuo jo priklauso fenolinių ir kitų aktyviųjų junginių kiekiai. Tyrimų metu taikyti trys ekstrakcijos metodai: ekstrakcija ultragarsu, maceracija ir šildymas su grįžtamuju šaldytuvu.

Norėdami įvertinti ekstrakcijos ultragarsu metodo įtaką fenolinių junginių kiekiui, dygiosios usnies lapų ėminiai skirtingais laiko intervalais (nuo 10 min. iki 60 min.) laikyti ultragarso vonelėje 30 °C temperatūroje (3.1.1.3 pav.). Ekstrakcija ultragarso vonelėje pagreitina tirpių medžiagų atsipalaidavimą ir difuziją. Šis metodas reikalauja mažų tirpiklio ir energijos sąnaudų, ir jam nebūtina aukšta temperatūra [163]. Dygiosios usnies ekstraktuose, gautuose taikant ekstrakciją ultragarsu didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis nustatytas po 15 min. ekstrakcijos ($7,31 \pm 0,37$ mg/g), o apigenin-7-*O*-gliukozido – po 30 min. ($7,60 \pm 0,38$ mg/g) (3.1.1.3 pav.). Kitų junginių – rutino, hiperozido ir izokvercitrino kiekiai, pagamintuose dygiosios usnies ekstraktuose nustatyti 7,3–7,5 kartų mažesni. Rutino, hiperozido ir izokvercitrino kiekiai variavo nuo 0,13 iki 0,87 mg/g, o ekstrakcijos trukmė, kurios metu gauti didžiausi šių fenolinių junginių kiekiai – 30 min (3.1.1.3 pav.).



3.1.1.2 pav. Identifikuotų fenolinių junginių kiekio (mg/g) skirtumai, naudojant skirtingus ekstrahentus – dejonizuotą vandenį, 50 proc., 60 proc., 70 proc., 80 proc., 90 proc. bei 96 proc. etanolio vandens tirpalą

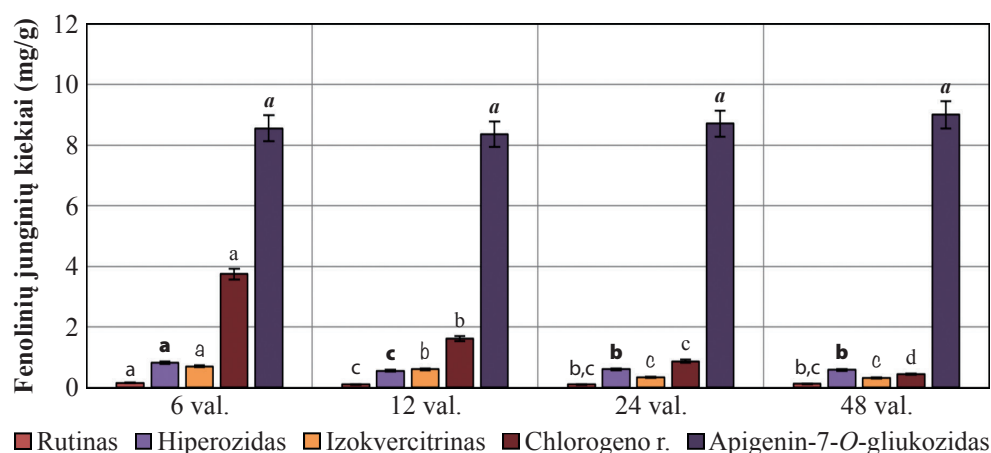
Skirtingos raidės palyginamojoje grupėje žymi statistškai reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$).



3.1.1.3 pav. Ekstrakcijos ultragarsu laiko įtaka fenolinių junginių kiekiui

Skirtingos raidės palyginamojoje grupėje žymi statistiškai reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$).

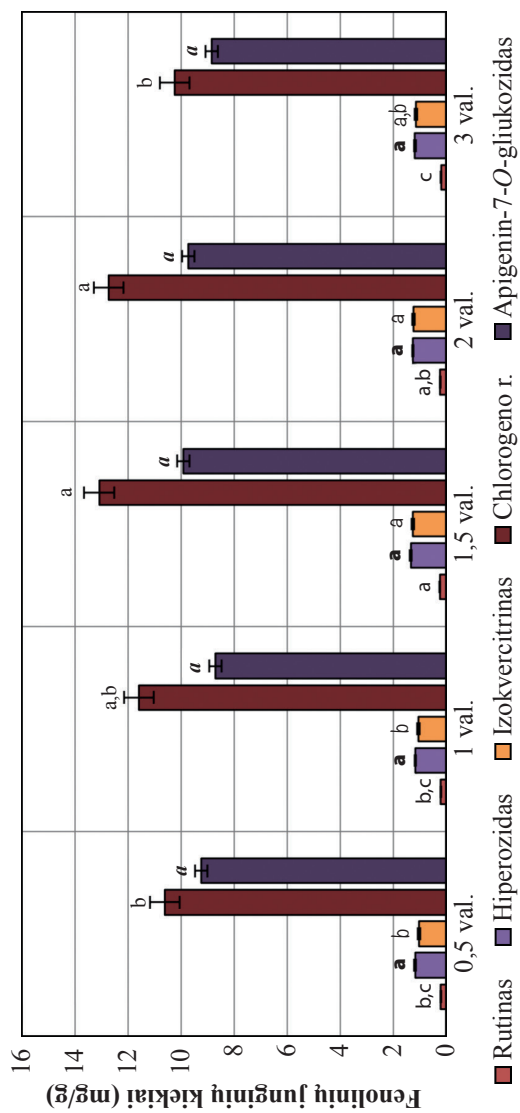
Maceracija yra paprastas ekstrahavimo metodas, kurio privalumas jautrių temperatūrai junginių išgavimas. Šio metodo trūkumas – mažas efektyvumas ir ilgas junginių išgavimo laikas [164]. Dygiųjų usnių augalinės žaliavos ekstrakcijos maceracijos metodu rezultatai pateikti 3.1.1.4 pav. Didžiausi rutino ($0,15 \pm 0,03$ mg/g), izokvercitrino ($0,70 \pm 0,07$ mg/g), hiperozido ($0,82 \pm 0,09$ mg/g) ir chlorogeno rūgšties ($3,74 \pm 0,13$ mg/g) kiekiai dygiųjų usnių ekstraktuose nustatyti atlikus 6 val. trukmės maceraciją, o apigenin-7-*O*-gliukozido atveju maceracija buvo efektyvesnė ją atliekant 48 val. (kiekis $9,01 \pm 0,45$ mg/g) (3.1.1.4 pav.).



3.1.1.4 pav. Ekstrakcijos metodo – maceracijos trukmės įtaka fenolinių junginių kiekiui (mg/g)

Skirtingos raidės palyginamojoje grupėje žymi statistškai reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$).

Tyrimo metu siekiant padidinti fenolinių junginių kiekio išgavimą iš dygiosios usnies žaliavos buvo pritaikyta ekstrakcija, naudojant šildymą su grįžtamuoju šaldytuvu (3.1.1.5 pav.). Nustatyta, kad *C. vulgare* ekstraktuose, gautuose naudojant šildymą su grįžtamuoju šaldytuvu gauti iki 1,7 karto didesni fenolinių junginių kiekiai, lyginant su kiekiais nustatytais ekstraktuose pagamintuose taikant maceracijos ir ekstrakcijos ultragarsu metodus ($p < 0,05$). Šildymo su grįžtamuoju šaldytuvu ekstrakcija vykdyta $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir tai galėjo sąlygoti didesnę fenolinių junginių kiekį, lyginant su ekstrakcija ultragarsu ir maceracija, kurių metu naudota $25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Tyrimo metu atlikta ekstrakcijos su grįžtamuoju šaldytuvu pagamintų ekstraktų fenolinių junginių sudėties analizė ir nustatyti fenolinių junginių kiekiai: rutino – $0,24 \pm 0,01$ mg/g, hiperozido – $1,33 \pm 0,07$ mg/g, izokvercitrino – $1,26 \pm 0,06$ mg/g, chlorogeno rūgšties – $13,09 \pm 0,66$ mg/g ir apigenin-7-*O*-gliukozido – $9,92 \pm 0,49$ mg/g (3.1.1.5 pav.).



3.1.1.5 pav. Ekstrakcijos su grįžtamuoju šaldytuvu laiką įtaka fenolinių junginių kiekiui

Skirtingos raidės palyginamojoje grupėje žymi statistiškai reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$).

Apibendrinant dygiosios usnies ėminių ekstrakcijos sąlygų parinkimo tyrimų rezultatus, nustatyta, kad didžiausi fenolinių junginių (apigenin-7-*O*-gliukozido, chlorogeno rūgšties, rutino, hiperozido, izokercitrino) kiekiai gauti ekstrahuojant usnies lapų ėminus 50 proc. (v/v) etanoliu, ekstrakciją atliekant 1,5 val. 90 °C temperatūroje su grįžtamuju šaldytuvu ($p < 0,05$). Šis metodas pasirinktas ruošiant ekstraktus tolimesniems tyrimams. Jang ir bendraautorių tyrime, atliekant ekstrakciją iš *Cirsium japonicum* augalo žaliavos, nustatyta, kad 70 proc. (v/v) etanolis buvo optimalus tirpiklis fenolinių junginių išgavimui, o didesnė temperatūra (85–95 °C) bei ekstrakcija su grįžtamuju šaldytuvu padidino išskiriamų bioaktyvių medžiagų kiekį. Šie rezultatai atitinka ir mūsų darbo metu taikytas sąlygas – aukštesnės temperatūros panaudojimas fenolinių junginių ekstrahavimui pasitvirtino kaip efektyvus metodas, leidžiantis padidinti išekstrahuojamų biologiškai aktyvių junginių kiekius [165].

3.1.2. ESC metodikos fenolinių junginių nustatymui

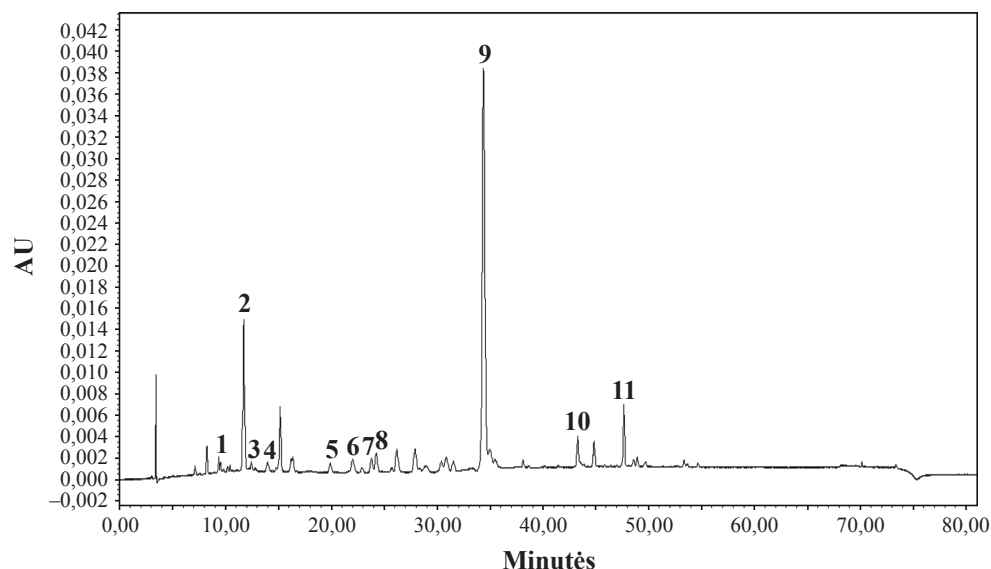
***C. vulgare* augalinės žaliavos ekstraktuose validavimas**

Tyrimo metu atlikta ESC metodikos validacija fenolinių junginių nustatymui *C. vulgare* augalinės žaliavos ekstraktuose. Metodikos validacija atlikta pagal EMA (Europos medicinos agentūros) ICH Q2(R2) gaires. Validacijos duomenys pateikti 3.1.2.1 lentelėje. Tyrimo metu buvo įvertintas metodikos specifiškumas, pagrįstas lyginant analitės bei etaloninio junginio sulaikymo laiką ir etaloninių junginių bei analizių UV absorbcijos spektrus. Dygiosios usnies ekstraktuose identifikuota vienuolika fenolinių junginių, kurių sulaikymo trukmės: 9,53 min. – neochlorogeno rūgštis, 11,94 min. – chlorogeno rūgštis, 12,41 min. – 4-*O*-ferulo rūgštis, 14,09 min. – kavos rūgštis, 20,04 min. – *p*-kumaro rūgštis, 22,65 min. – *trans*-ferulo rūgštis, 23,61 min. – hiperozidas, 24,51 min. – izokvercitrinas, 34,51 min. – apigenin-7-*O*-gliukozidas, 43,78 min. – liuteolinas, 47,79 min. – apigeninas (3.1.2.1 pav.).

3.1.2.1 lentelė. Fenolinių junginių aptikimo *C. vulgare* žaliavos ekstraktuose validacijos duomenys

Aktyvūs junginiai	^b AR, µg/ml	^c NR, µg/ml	Atkuria- mumas, proc.	Tiesiskumo ribos, µg/ml	^a R ²	Pakartojia- mumas, proc.	Tarpinis preciziškumas, proc.	Kalibracinės kreivės lygtis
Chlorogeno rūgštis	0,030	0,110	99,4	0,113–14,5	0,9999	0,21	0,32	Y = 31400X + 58,9
Apigenin-7-O-gliukozidas	0,032	0,078	101,3	0,625–20,0	0,9999	0,41	0,63	Y = 35300X – 141
Apigeninas	0,063	0,200	100,0	0,250–16,1	0,9999	0,12	0,20	Y = 34200X – 1590
Luteolinas	0,053	0,195	98,4	0,214–110,0	0,9999	0,10	0,15	Y = 42300X + 389
Hiperozidas	0,132	0,264	99,8	0,528–16,9	0,9997	0,47	1,02	Y = 21300X + 581
Neochlorogeno rūgštis	0,035	0,105	98,7	0,141–36,0	0,9999	0,15	0,42	Y = 13300X – 408
Izokvercitrinas	0,109	0,217	100,5	0,870–27,9	0,9999	0,45	0,86	Y = 21400X + 2090
<i>p</i> -kumaro rūgštis	0,123	0,404	100,3	0,810–103,5	0,9999	0,32	0,63	Y = 75900X + 9760
Kavos rūgštis	0,318	1,020	101,1	2,554–81,8	0,9999	0,30	0,40	Y = 58300X + 33600
<i>trans</i> -ferulo rūgštis	0,345	1,104	99,2	5,521–176,7	0,9998	0,20	0,30	Y = 51800X – 20800
4-O-kafeoilchino rūgštis	0,135	0,779	98,9	0,859–25,5	0,9997	0,10	0,30	Y = 58800X + 9890

^aR² – regresijos koeficientas; ^bAR – aptikimo riba; ^cNR – nustatymo riba.



3.1.2.1 pav. Fenoliniai junginiai identifikuoti dygiųjų usnių lapų ekstraktuose

1 – neochlorogeno rūgštis, 2 – chlorogeno rūgštis, 3 – 4-*O*-kafeoilchino rūgštis, 4 – kavos rūgštis, 5 – kumaro rūgštis, 6 – ferulo rūgštis, 7 – hiperozidas, 8 – izokvercitrinas, 9 – apigenin-7-*O*-gliukozidas, 10 – liuteolinas, 11 – apigeninas.

Tiesiškumui patvirtinti, įvertinta analitės smailės ploto priklausomybė nuo analitės koncentracijos tiriamajame tirpale, sudarant usnių lapų, žiedynų ir šaknų ekstraktuose identifikuotų junginių kalibravimo grafikus ir įvertinant regresijos koeficientus bei kalibracinės kreivės tiesinės regresijos lygtis. Visų analizių regresijos koeficientas buvo daugiau nei 0,999, tai patvirtina ESC metodikos tiesiškumą. Tyrimo metu nustatyta, kad identifikuotų junginių tiesiškumo ribos variavo nuo 0,113 µg/ml iki 176,7 µg/ml, kurios apima visus tyrimo metu nustatytus fenolinių junginių kiekius. Visų tirtų fenolinių junginių aptikimo ribos nustatytos, kai smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykis – 3:1, o kiekybinio nustatymo ribos įvertintos, kai smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykis – 10:1 [157]. Visų tyrime naudotų analizių aptikimo ribos variavo nuo 0,03 µg/ml iki 0,345 µg/ml, o nustatymo ribos – nuo 0,078 µg/ml iki 1,104 µg/ml. Metodo tvirtumas buvo įvertintas, keičiant kai kuriuos analizės parametrus: kolonėlės temperatūrą ± 2 °C ir mobilios fazės santykį ± 2 proc. (v/v). Nustatyta, kad šie pokyčiai neturėjo reikšmingos įtakos smailių sulaikymo laikams, formoms ar intensyvumui. Visų junginių kiekybiniai rezultatai išliko nuoseklūs, o variacijos koeficientas neviršijo 2 proc., todėl ESC metodas laikomas tvirtu analitinių sąlygų pokyčiams. Glaudumas įvertintas, nustatant pakartojamumo ir tarpinio

preciziškumo įverčius. Visų identifikuotų junginių variacijos koeficientas neviršija 1,02 proc. [157].

Nustatyti ESC metodikos tinkamumo rezultatai patvirtina, kad pasirinkti chromatografiniai parametrai tinkami dygiosios usnies ekstraktų fenolinių junginių kokybinei ir kiekybinei sudėčiai įvertinti. Validuota ESC metodika taikyta tolesnei fenolinių junginių kokybinei ir kiekybinei analizei, užtikrinant tikslius ir patikimus rezultatus, kurie atitinka nustatytus parametrus [166].

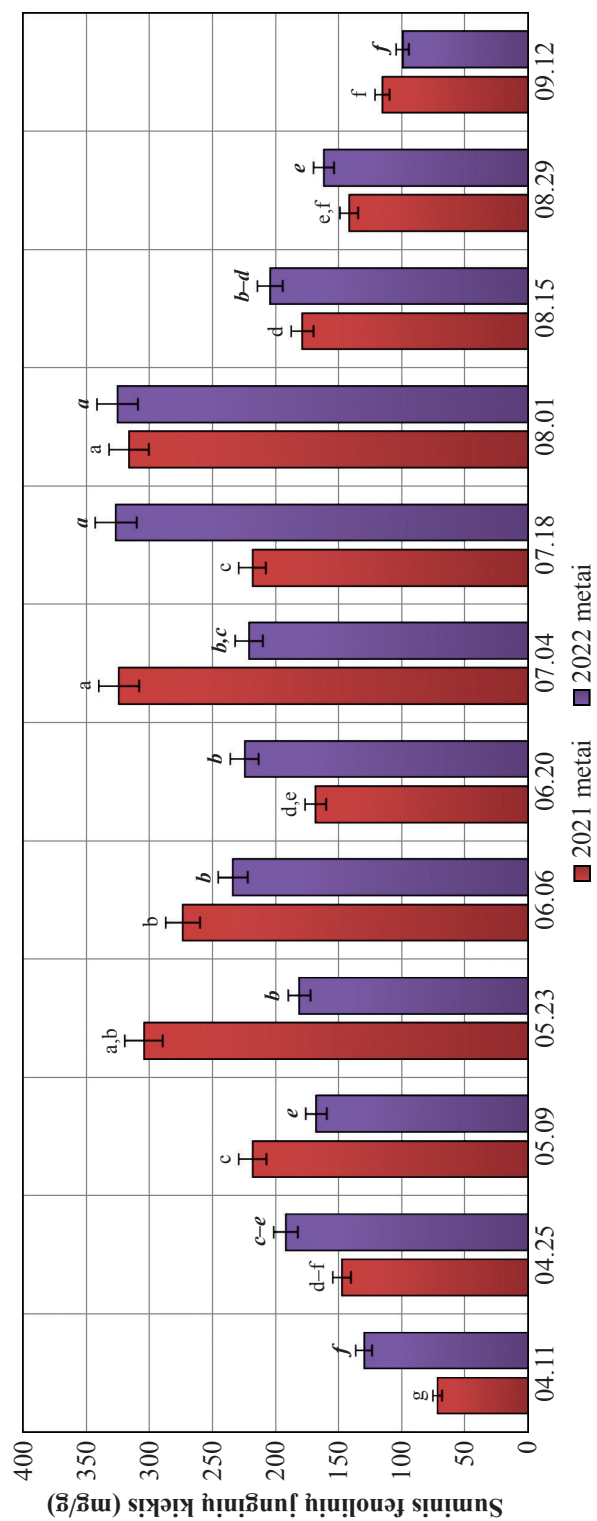
3.1.3. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties

***C. vulgare* augalinių žaliavų ekstraktuose nustatymas**

Fenolinių junginių koncentracija ir kaupimosi dėsningumai skirtingose augalų dalyse bei organuose skiriasi priklausomai nuo augalo augimo fazės ir gyvavimo ciklo [167]. Fenolinių junginių kaupimosi dėsningumų nustatymas dygiosios usnies augalinėje žaliavoje yra aktualus siekiant įvertinti šių junginių kiekių ir kokybinių profilių pokyčius augalo vystymosi metu (skirtinguose fenologiniuose tarpsniuose).

Tyrimų metu fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties pokyčiai įvertinti *C. vulgare* augalinėse žaliavose (lapų, žiedynų ir šaknų) surinktose dvejų metų laikotarpiu (2021–2022 m.), fenologiniu laikotarpiu nuo ramybės laikotarpio pabaigos iki sėklų brandos.

Suminis fenolinių junginių kiekis nustatytas dygiosios usnies augalinėse žaliavose, surinktose skirtingais metais, reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$) (3.1.3.1 pav.). Dygiosios usnies augalinėje žaliavoje, rinktoje 2021 metais, didžiausi suminiai fenolinių junginių kiekiai nustatyti *C. vulgare* ėminiuose, surinktuose ramybės periodo pabaigoje (05.23), butonizacijos (07.04) ir masinio žydėjimo metu (08.01) ($p < 0,05$) (3.1.3.1 pav.). Remiantis Lietuvos hidrometeorologijos tarnybos duomenimis, ramybės periodo pabaigoje (05.23) oro temperatūra Šiaulių apskrityje savaitę iki ėminių rinkimo ir rinkimo dieną svyravo nuo 6,6 iki 17,6 °C, santykinis oro drėgnis – nuo 44 iki 90 proc., o kritulių kiekis – nuo 0,0 iki 2,1 mm. Butonizacijos metu (07.04) aplinkos sąlygos buvo šiltesnės – oro temperatūra siekė 14,5–26,5 °C, santykinis oro drėgnis – 44–99 proc., kritulių nefiksuota. Masinio žydėjimo laikotarpiu (08.01) oro temperatūra svyravo nuo 13,2 iki 30,7 °C, santykinis drėgnis – nuo 32 iki 76 proc., kritulių kiekis – nuo 0,0 iki 5,3 mm.

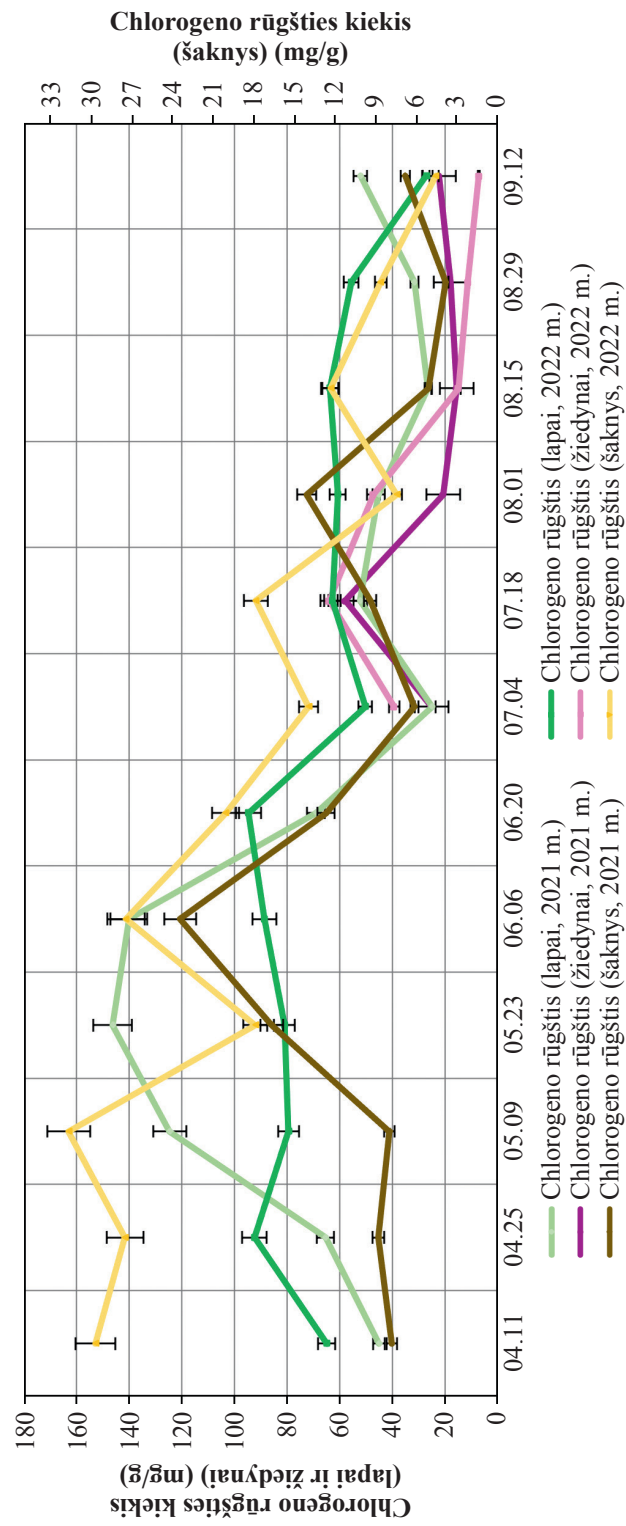


3.1.3.1 pav. Suminis identifikuotų fenolinių junginių kiekis (mg/g) dygiųjų usnių žaliavų (šaknų, žiedynų, lapų) ekstraktuose dvejų metų rinkimo laikotarpiu 2021–2022

Skirtingos raidės palyginamojoje grupėje žymi statistškai reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$).

Dygiųjų usnių žaliavoje, rinktoje 2022 metais, didžiausi fenolinių junginių kiekiai nustatyti ėminiuose, surinktuose augalo žydėjimo pradžios (07.18) ir masinio žydėjimo (08.01) laikotarpiu ($p < 0,05$). Suminis identifikuotų fenolinių junginių kiekis nustatytas 2021 ir 2022 metų fenologinių tarpsnių metu dygiosios usnies augalinės žaliavos ėminiuose variavo nuo 71,87 mg/g iki 324,16 mg/g ir nuo 99,36 iki 326,57 mg/g, atitinkamai. Vertinant oro sąlygų įtaką fitocheminių junginių kiekiui, nustatyta, kad žydėjimo pradžioje (07.18) aplinkos temperatūra svyravo nuo 10,6 iki 22,2 °C, santykinis oro drėgnis – nuo 50 iki 97 proc., o kritulių kiekis siekė 0,0–5,5 mm. Masinio žydėjimo metu (08.01) oro temperatūra svyravo nuo 8,4 iki 22,8 °C, santykinis drėgnis – nuo 49 iki 97 proc., kritulių kiekis – nuo 0,0 iki 12,4 mm (3.1.3.1 pav.). Nazaruk ir kiti nustatė reikšmingai didesnius fenolinių junginių kiekius metanoliniuose *C. vulgare* lapų ir žiedynų ekstraktuose, kurie pagaminti iš augalinių žaliavų, surinktų masinio žydėjimo fenologiniame tarpsnyje nuo birželio galo iki rugpjūčio mėnesio pradžios [168]. Suminiai fenolinių junginių kiekiai, tiek atskirų junginių – tokių kaip chlorogeno rūgštis – koncentracijos dygiosios usnies augalinėje žaliavoje reikšmingai kito priklausomai nuo augimo fazės ir meteorologinių sąlygų. Didžiausi fenolinių junginių kiekiai fiksuoti augalo intensyvios fotosintezės laikotarpiais – ramybės periodo pabaigoje, žydėjimo bei masinio atžėlimo metu. Šie duomenys rodo, kad fenologinis tarpsnis yra svarbus veiksnys į kurį būtina atsižvelgti, siekiant optimizuoti augalinės žaliavos surinkimo laiką, siekiant išgauti maksimalius fenolinių junginių kiekius.

Taikant validuotą ESC metodiką identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti vienuolika fenolinių junginių *C. vulgare* augalinių žaliavų ekstraktuose. Didžiausią identifikuotų junginių dalį dygiosios usnies žaliavose sudarė chlorogeno rūgštis (44,90 proc.) ir apigenin-7-*O*-gliukozidas (41,48 proc.). Kitų identifikuotų fenolinių junginių kiekis *C. vulgare* augalinėje žaliavoje sudarė mažą dalį suminio fenolinių junginių kiekio: izokvercitrinas (3,16 proc.), hiperozidas (2,32 proc.), apigeninas (1,20 proc.), *p*-kumaro rūgštis (1,07 proc.), neochlorogeno rūgštis (0,62 proc.), 4-*O*-kafeoilchino rūgštis (0,46 proc.), kavos rūgštis (0,32 proc.), *trans*-ferulo rūgštis (0,21 proc.), luteolinas (0,21 proc.). Vegetacijos tarpsniai turėjo ženklų įtaką fenolinių junginių kiekybinei sudėčiai dygiųjų usnių lapuose, žiedynuose ir šaknyse. Gauti tyrimo rezultatai atitinka kitų autorių pastebėjimus. Nazaruk ir kiti, nustatė didesnę fenolinių junginių koncentraciją metanoliniuose *C. vulgare* lapų ir žiedynų ekstraktuose, pagamintuose iš žaliavos, surinktos masinio žydėjimo fenologiniu laikotarpiu (birželio pabaigoje–rugspjūčio pradžioje) ($p < 0,05$) [168].



3.1.3.2 pav. Chlorogeno rūgšties kiekio pokyčiai dygiųjų usnių augalinių žaliavų ėminiuose, surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu 2021–2022 m.

Atlikto tyrimo metu chlorogeno rūgšties kiekio pokyčiai dygiosios usnies augalinėse žaliavose, surinktose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu pateikti 3.1.3.2 pav. Didžiausi chlorogeno rūgšties kiekiai $146,28 \pm 0,13$ mg/g ir $140,15 \pm 0,14$ mg/g nustatyti *C. vulgare* lapų augalinėje žaliavoje, surinktoje 2021 metų ramybės periodo pabaigoje ir 2021 metų masinio atžėlimo metu, atitinkamai ($p < 0,05$). *C. vulgare* lapų augalinėje žaliavoje, surinktoje 2021 metų ramybės periodo metu ir masinio atžėlimo metu, nustatyti reikšmingai didesni chlorogeno rūgšties kiekiai ($146,28 - 81,08$ mg/g) lyginant su chlorogeno rūgšties kiekiais nustatytais šaknų ($27,47 - 16,68$ mg/g) augalinėse žaliavose tuo pačiu laikotarpiu ($p < 0,05$).

Palyginus chlorogeno rūgšties kiekybinę sudėtį *C. vulgare* žiedynų augalinėse žaliavose, surinktose 2021 ir 2022 metų tais pačiais fenologiniais tarpsniais, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta ($p > 0,05$). Analizuojant chlorogeno rūgšties kaupimosi dėsninumus dygiosios usnies žiedynų žaliavoje nustatyta, kad 2021 ir 2022 metų žydėjimo pradžios fenologiniame tarpsnyje (07.18) surinktuose žiedynuose sukaupti didžiausi chlorogeno rūgšties kiekiai $58,02 \pm 0,41$ mg/g ir $64,08 \pm 0,23$ mg/g, atitinkamai. Palyginus chlorogeno rūgšties kiekį *C. vulgare* šaknų augalinėse žaliavose, surinktose skirtingais metais tuo pačiu metu statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta ($p > 0,05$). Didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis nustatytas šaknų augalinėje žaliavoje, surinktoje 2022 metų fenologinio ramybės periodo pabaigoje 05.09 ($31,71 \pm 0,11$ mg/g) (3.1.3.2 pav.).

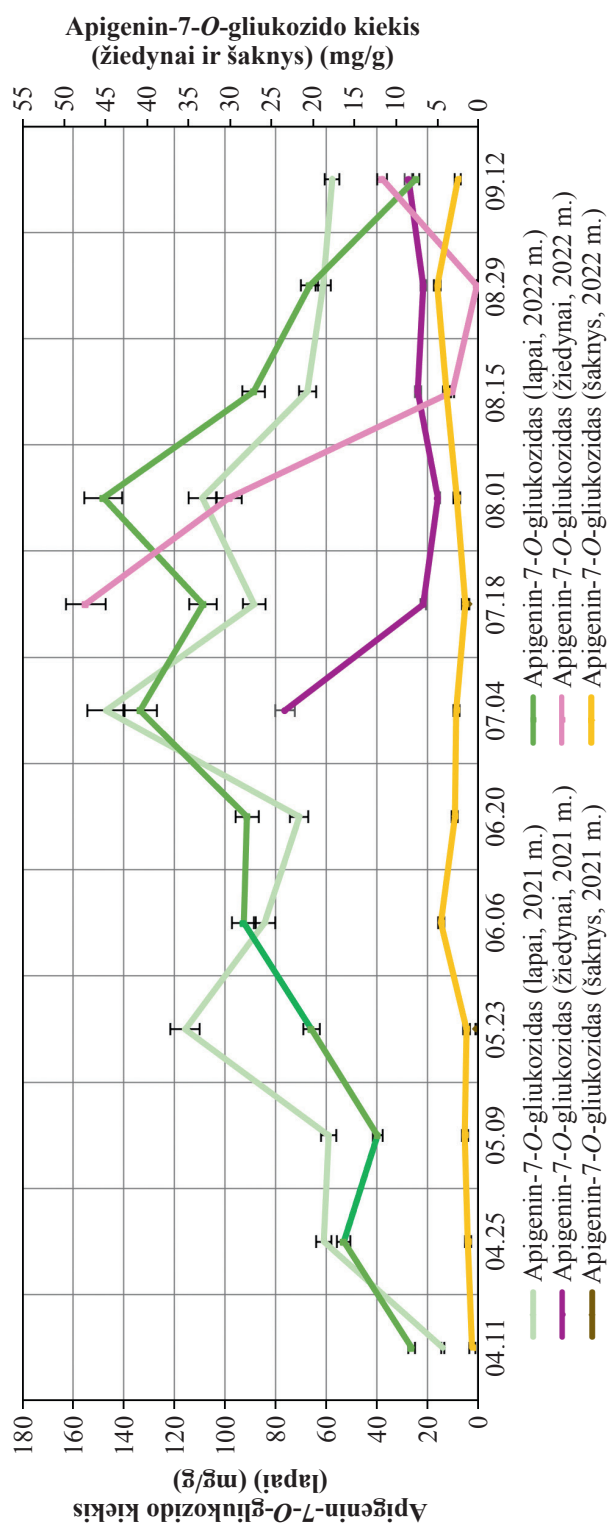
Apigenin-7-*O*-gliukozido kiekio pokyčiai dygiosios usnies augalinėse žaliavose, surinktose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu pateikti 3.1.3.3 pav. *C. vulgare* lapų augalinių žaliavų ėminiuose, surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais 2021 ir 2022 metais, nustatytas apigenin-7-*O*-gliukozido kiekis ($14,05 - 146,81$ mg/g – 2021 metais, $24,61 - 147,96$ mg/g – 2022 metais) buvo didesnis už kiekius nustatytus *C. vulgare* žiedynų ($16,05 - 76,30$ mg/g 2021 metais ir $0,18 - 147,32$ mg/g 2022 metais) ir šaknų ($0,37 - 1,15$ mg/g 2021 metais ir $0,75 - 4,95$ mg/g 2022 metais) augalinėse žaliavose. Tyrimo metu įvertinta, kad didžiausias apigenin-7-*O*-gliukozido kiekis $147,96 \pm 0,34$ mg/g nustatytas *C. vulgare* lapų augalinės žaliavos ėminiuose, surinktuose 2022 metų masinio žydėjimo fenologinėje stadijoje (08.01), kuris statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo apigenin-7-*O*-gliukozido kiekio $146,81 \pm 0,31$ mg/g nustatyto *C. vulgare* lapų augalinės žaliavos ėminiuose, surinktuose 2021 metais butonizacijos fenologiniame tarpsnyje (07.04). Lyginant žiedynų augalinėse žaliavose nustatytą apigenin-7-*O*-gliukozido kiekį, didžiausias apigenin-7-*O*-gliukozido kiekis nustatytas žiedynų ėminiuose, surinktuose 2021 metais butonizacijos fenologiniame tarpsnyje $76,30 \pm 0,31$ mg/g ($p < 0,05$). Dygiosios usnies šaknų augalinės žaliavos ėminiuose didžiausias apigenin-7-*O*-gliukozido kiekis nustatytas ėminiuose,

kurie surinkti 2022 metų masinio atžėlimo tarpsnyje ($4,48 \pm 0,03$ mg/g) (3.1.3.3 pav.). Palyginus su kitais *Asteraceae* šeimos augalais, *C. vulgare* lapuose nustatytas apigenin-7-*O*-gliukozido kiekis yra reikšmingai didesnis. *Achillea millefolium* žieduose šio flavonoido kiekis yra apie 10–15 kartų mažesnis, o *Calendula officinalis* žieduose apigenin-7-*O*-gliukozido koncentracija yra apie 5–8 kartus mažesnė nei *C. vulgare* lapuose nustatytų kiekių [169–171]. Šie duomenys parodo, kad *C. vulgare* gali būti vertingas natūralus apigenin-7-*O*-gliukozido šaltinis, ypač kai žaliava renkama butonizacijos ir masinio žydėjimo fenologiniais tarpsniais.

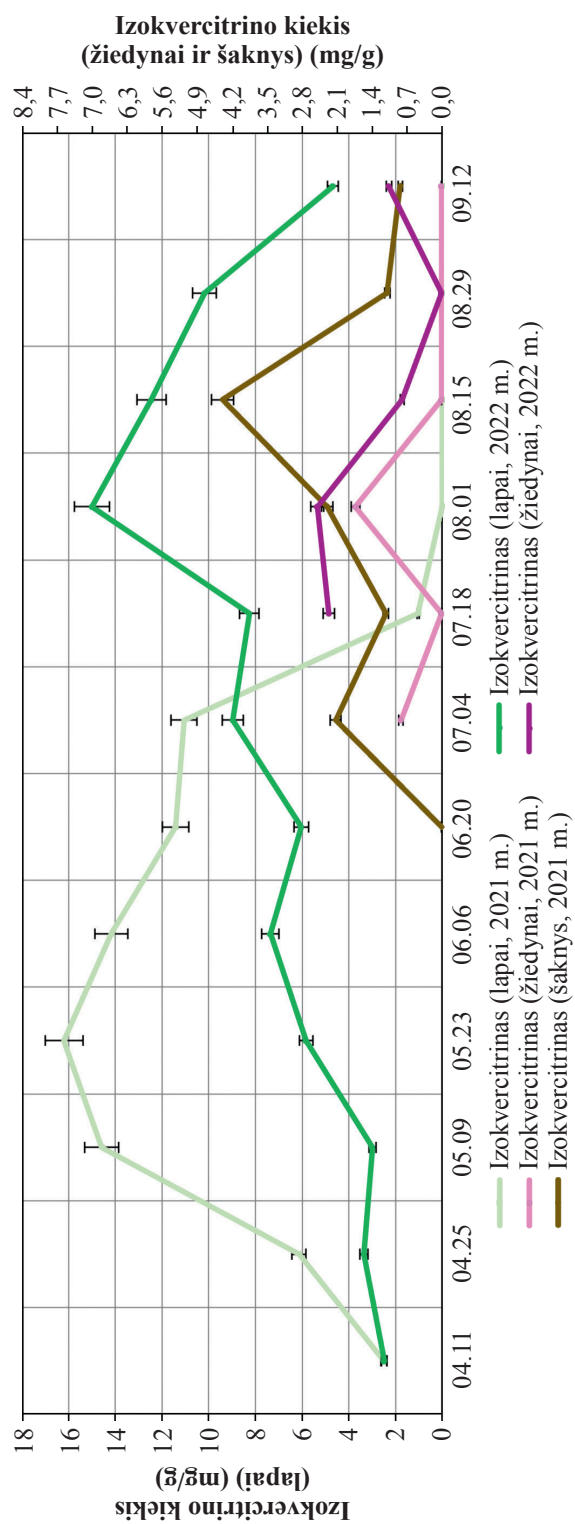
Izokvercitrino kiekio pokyčiai dygiosios usnies augalinėse žaliavose, surinktose skirtingais fenologiniais tarpsniais 2021 ir 2022 metais pateikti 3.1.3.4 pav. *C. vulgare* lapų augalinėje žaliavoje, surinktoje 2021 metais ramybės periodo metu (05.09, 05.23) ir masinio atžėlimo metu (06.06), nustatyti reikšmingai didesni izokvercitrino kiekiai ($16,197\text{--}14,162$ mg/g) lyginant su izokvercitrino kiekiais nustatytais šaknų ($0,240\text{--}0,08$ mg/g) augalinėse žaliavose tuo pačiu laikotarpiu ($p < 0,05$). Augalo lapų žaliavose, surinktose 2021 metais, nustatyti statistiškai didesni fenolinio junginio izokvercitrino kiekiai, palyginus juos su izokvercitrino kiekiais nustatytais augalo lapų žaliavose, surinktose 2022 metais ($p < 0,05$).

Tyrimo metu nustatyta, kad 2021 metais surinktose šaknų augalinės žaliavos ėminiuose izokvercitrinas aptiktas ir kiekybiškai įvertintas prasidėjus butonizacijos fenologiniam tarpsniui (07.04). Vėliau jo kiekiai *C. vulgare* šaknų augalinėje žaliavoje didėjo ir didžiausias izokvercitrino kiekis $4,39 \pm 0,04$ mg/g nustatytas šaknų augalinės žaliavos ėminiuose, surinktuose 2021 metais masinio žydėjimo fenologiniame tarpsnyje (08.15). *C. vulgare* šaknų augalinėse žaliavos ėminiuose surinktose 2022 metais izokvercitrinas nustatytas nebuvo.

Palyginus žiedynų augalinėse žaliavose aptiktus izokvercitrino kiekius, nustatyta, kad didžiausias izokvercitrino kiekis $2,49 \pm 0,01$ mg/g nustatytas *C. vulgare* žiedynų augalinės žaliavos ėminiuose, surinktuose 2022 metais masinio žydėjimo fenologiniame tarpsnyje (08.01) ($p < 0,05$) (3.1.3.4 pav.).



3.1.3.3 pav. Apigenin-7-O-gliukozido kiekio pokyčiai dygiųjų usnių augalinių žaliavų ėminiuose, surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu 2021–2022 m.

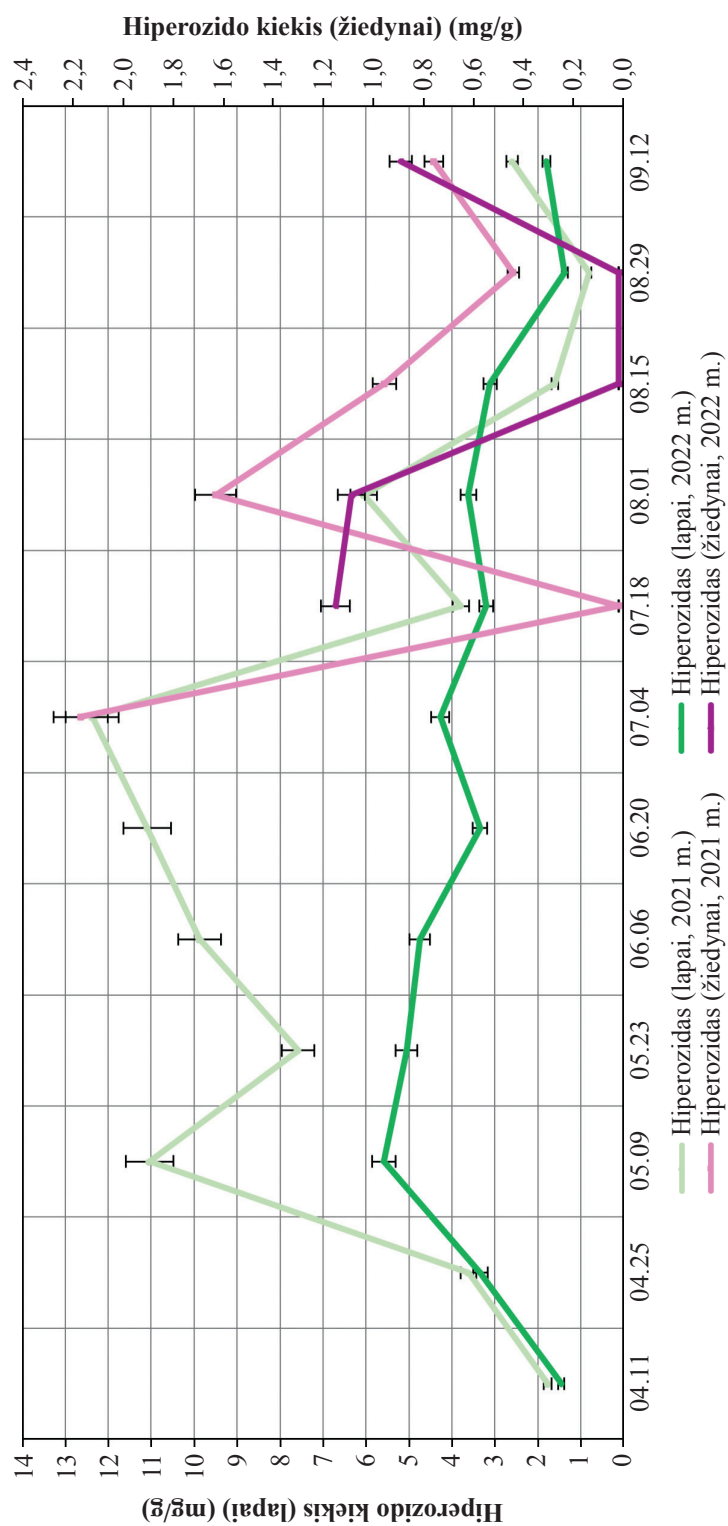


3.1.3.4 pav. Izokvercitrino kiekio pokyčiai dygių usnių augalinių žaliavų ėminiuose, surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu 2021–2022 m.

Hiperozido kiekio pokyčiai dygiosios usnies augalinėse žaliavose, surinktose skirtingais fenologiniais tarpsniais 2021 ir 2022 metais pateikti 3.1.3.5 pav. Tyrimo metu hiperozidas nustatytas *C. vulgare* lapų ir žiedynų augalinėse žaliavose, o *C. vulgare* šaknų augalinėje žaliavoje hiperozido nenustatyta.

C. vulgare lapų augalinės žaliavos ėminiuose, surinktuose 2021 metais skirtingais fenologiniais laikotarpiais, nustatytas hiperozido kiekis buvo didesnis ($12,37-0,80$ mg/g) lyginant su hiperozido kiekiu ($5,58-1,37$ mg/g) nustatytu *C. vulgare* lapų augalinės žaliavos ėminiuose, surinktuose 2022 metais skirtingais fenologiniais tarpsniais. Didžiausias hiperozido kiekis $12,37 \pm 0,07$ mg/g nustatytas dygiosios usnies lapų žaliavos ėminiuose, surinktuose 2021 metų butonizacijos fenologinėje fazėje (07.04), kuris statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kiekio $11,09 \pm 0,09$ mg/g nustatyto dygiosios usnies lapų žaliavos ėminiuose, surinktuose 2021 metų lapų masinio atžėlimo laikotarpiu (06.20) ($p > 0,05$).

C. vulgare žiedynų augalinėse žaliavose nustatyta iki 12,5 kartų mažesnis hiperozido kiekis, lyginant su *C. vulgare* lapų augalinėse žaliavose nustatytu hiperozido kiekiu. Palyginus žiedynų augalinėse žaliavose aptiktus hiperozido kiekius, nustatyta, kad didžiausias hiperozido kiekis $2,17 \pm 0,05$ mg/g buvo nustatytas *C. vulgare* žiedynų augalinės žaliavos ėminiuose, surinktuose 2021 metais butonizacijos (07.04) fenologiniame tarpsnyje ($p < 0,05$) (3.1.3.5 pav.).



3.1.3.5 pav. Hiperozido kiekio pokyčiai dygiųjų usnių augalinių žaliavų ėminiuose, surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu 2021–2022

Atsižvelgiant į dygiosios usnies augalinių žaliavų ėminių, surinktų skirtingų fenologinių tarpsnių metu, ekstraktuose nustatytą fenolinių junginių kiekybinę sudėtį, tolimesniems biologinio aktyvumo tyrimams buvo pasirinkti ekstraktai turintys didžiausią fenolinių junginių kiekį. Tyrimams pasirinkti dvejų 2021–2022 metų ekstraktai: šaknys, surinktos fenologinės ramybės periodo pabaigoje (04.11, 04.25, 05.09), lapai, surinkti fenologinės ramybės periodo pabaigoje (04.25), lapai, surinkti masinio atžėlimo periodu (06.06), žiedynai, surinkti masinio žydėjimo periodu (07.30), lapai, surinkti sėklų brandos periodu (09.12), žiedynai, surinkti sėklų brandos periodu (09.12), lapai, surinkti fenologinės ramybės periodo pabaigoje (04.25), lapai, surinkti fenologinės ramybės periodo pabaigoje (05.23), lapai, surinkti masinio atžėlimo periodu (06.06).

3.2. Aminorūgščių kokybinės ir kiekybinės sudėties *C. vulgare* augalinės žaliavos ekstraktuose nustatymas DC–MS metodu

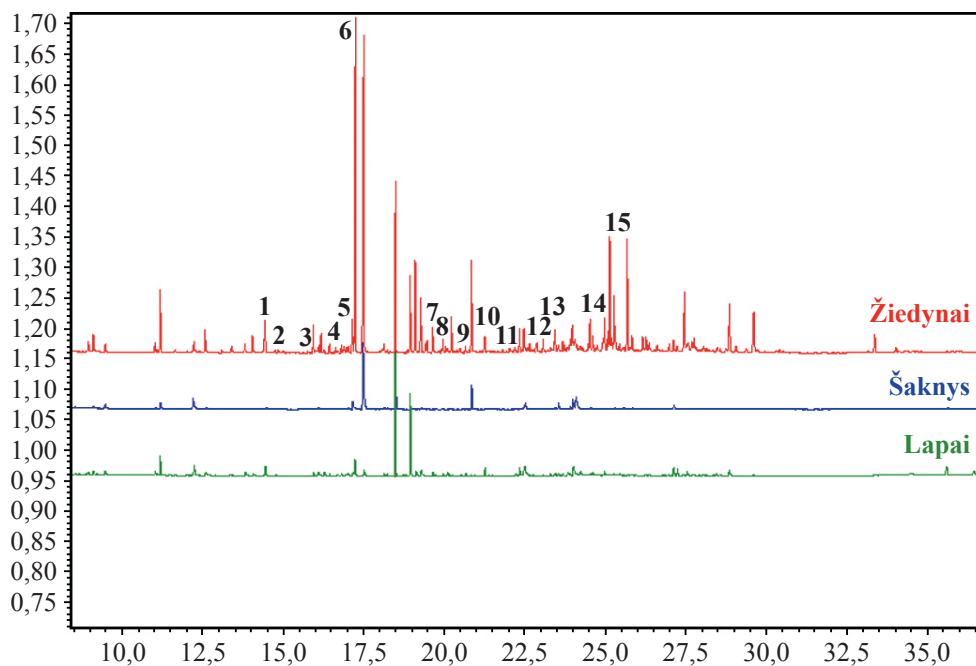
3.2.1. DC–MS metodikos aminorūgščių nustatymui *C. vulgare* augalinės žaliavos ekstraktuose validacija

Aminorūgščių nustatymas augaluose, tokiuose kaip *C. vulgare*, yra svarbus, siekiant įvertinti jų maistinę vertę ir potencialą kaip alternatyvų baltymų šaltinį. Atliekant dygiosios usnies žaliavų fitocheminės sudėties analizę nustatyta, kad augalas kaupia laisvąsias aminorūgštis. Kai kurios iš jų yra nepakeičiamosios aminorūgštys, kitos – pakeičiamosios. Tiek pakeičiamosios, tiek nepakeičiamosios aminorūgštys yra svarbios organizmo metabolizmo procesuose. Nepakeičiamosios aminorūgštys, tokios kaip leucinas, izoleucinas, lizinas, metioninas, fenilalaninas, treoninas, triptofanas ir valinas yra būtinos baltymų sintezei, fermentų ir hormonų gamybai, taip pat imuninės sistemos veiklai. Šių aminorūgščių organizmas negamina, todėl jos turi būti gaunamos su maistu ar papildomais maisto priedais. *C. vulgare* augalinėse žaliavose nustatytos aminorūgštys pagrindžia šios žaliavos naudojimo potencialą tiek žmonių, tiek gyvūnų mityboje, prisidedant prie subalansuotos ir pilnavertės mitybos užtikrinimo.

Metodikų vystymas ir validavimas yra svarbus siekiant tiksliai įvertinti aminorūgščių sudėtį tiriamosiose *C. vulgare* žaliavose. Tyrimo metu atlikta DC–MS (dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos) metodikos su derivatizacijos etapu validacija aminorūgščių nustatymui *C. vulgare* augalinės žaliavos ekstraktuose. Metodikos validacija atlikta pagal EMA (Europos medicinos agentūros) ICH Q2(R2) gaires, vertinant šiuos parametrus: tiesiškumą, tikslumą, preciziškumą, aptikimo ir nustatymo ribas, specifiskumą,

teisingumą bei tvirtumą. Specifiškumas įvertintas analizuojant analičių chromatografinių smailių sulaikymo laikus ir jų masių spektrus, kurie buvo būdingi kiekvienai aminorūgščiai ir atitiko kokybės reikalavimus [157, 172]. Metodika validuota naudojant 16 aminorūgščių: alaniną, gliciną, cisteiną, valiną, leuciną, izoleuciną, metioniną, proliną, seriną, tirozino, fenilalanino, asparto rūgštį, glutamo rūgštį, liziną, histidiną ir treoniną. Glaudumo tyrimų metu nustatyta, kad metodas pasižymi dideliu pakartojamumu – variacijos koeficientas neviršijo 1 proc., o tai patvirtina metodo preciziškumą. Tiesiškumas įvertintas kalibracinių kreivių pagrindu, ir nustatyta, kad smailių ploto ir koncentracijų santykis buvo tiesinis 25–200 µg/ml intervale, determinacijos koeficientui (R^2) svyruojant nuo 0,986 iki 0,999. Aptikimo ir nustatymo ribos buvo individualios kiekvienai aminorūgščiai ir neviršijo 2,400 µg/ml. Tikslumas įvertintas pagal atkuriamumo procentus, kurie, priklausomai nuo analitės, svyravo nuo 98,4 proc. iki 101,3 proc. Pavyzdžiui, L-alanino atkuriamumas siekė 99,4 proc., glicino – 100,0 proc., L-valino – 98,8 proc., o L-tirozino – 100,5 proc. Visi šie rezultatai atitinka ICH Q2(R2) gairėse nurodytus tikslumo kriterijus. Tvirtumo vertinimo metu buvo analizuotas ir derivatizacijos etapas – tirtas metodikos jautrumas nedideliems derivatizacijos trukmės, temperatūros bei reagentų koncentracijos pokyčiams. Gauti rezultatai parodė, kad šie parametrai neturėjo reikšmingos įtakos analitiniam duomenimui, todėl derivatizacijos žingsnis laikytinas patikimu. Apibendrinant galima teigti, kad išvystyta DC–MS metodika yra jautri, tiksli ir patikima, bei pilnai atitinka ICH Q2(R2) metodų validacijos reikalavimus, todėl tinkama naudoti tiek kokybinei, tiek kiekybinei aminorūgščių analizei *C. vulgare* augalinėje žaliavoje.

Ištyrus dygiosios usnies ekstraktus DC–MS metodu skirtingose *C. vulgare* augalinėse žaliavose aptiktos ir kiekybiškai nustatytos šios aminorūgštys: L-alaninas, glicinas, L-valinas, L-leucinas, izoleucinas, L-prolinas, L-metioninas, L-serinas, L-treoninas, L-fenilalaninas, L-asparto rūgštis, L-glutamo rūgštis, L-lizinas, L-histidinas ir L-tirozinas (3.2.1.1 pav.). *C. vulgare* lapų ekstraktuose aptikta 15 aminorūgščių, žiedynų ekstraktuose aptikta 14 aminorūgščių, o šaknų ekstraktuose aptikta 13 aminorūgščių.



3.2.1.1 pav. Aminorūgštys, identifikuotos *C. vulgare* ekstraktuose

1 – L-alaninas*, 2 – glicinas*, 3 – L-valinas, 4 – L-leucinas, 5 – izoleucinas, 6 – L-prolinas*, 7 – L-serinas*, 8 – L-treoninas, 9 – L-fenilalaninas, 10 – L-asparto rūgštis*, 11 – L-glutamo rūgštis*, 12 – L-lizinas, 13 – L-tirozinas*, 14 – L-histidinas*, 15 – L-tirozinas; (*) žymi nepakeičiamas aminorūgštis.

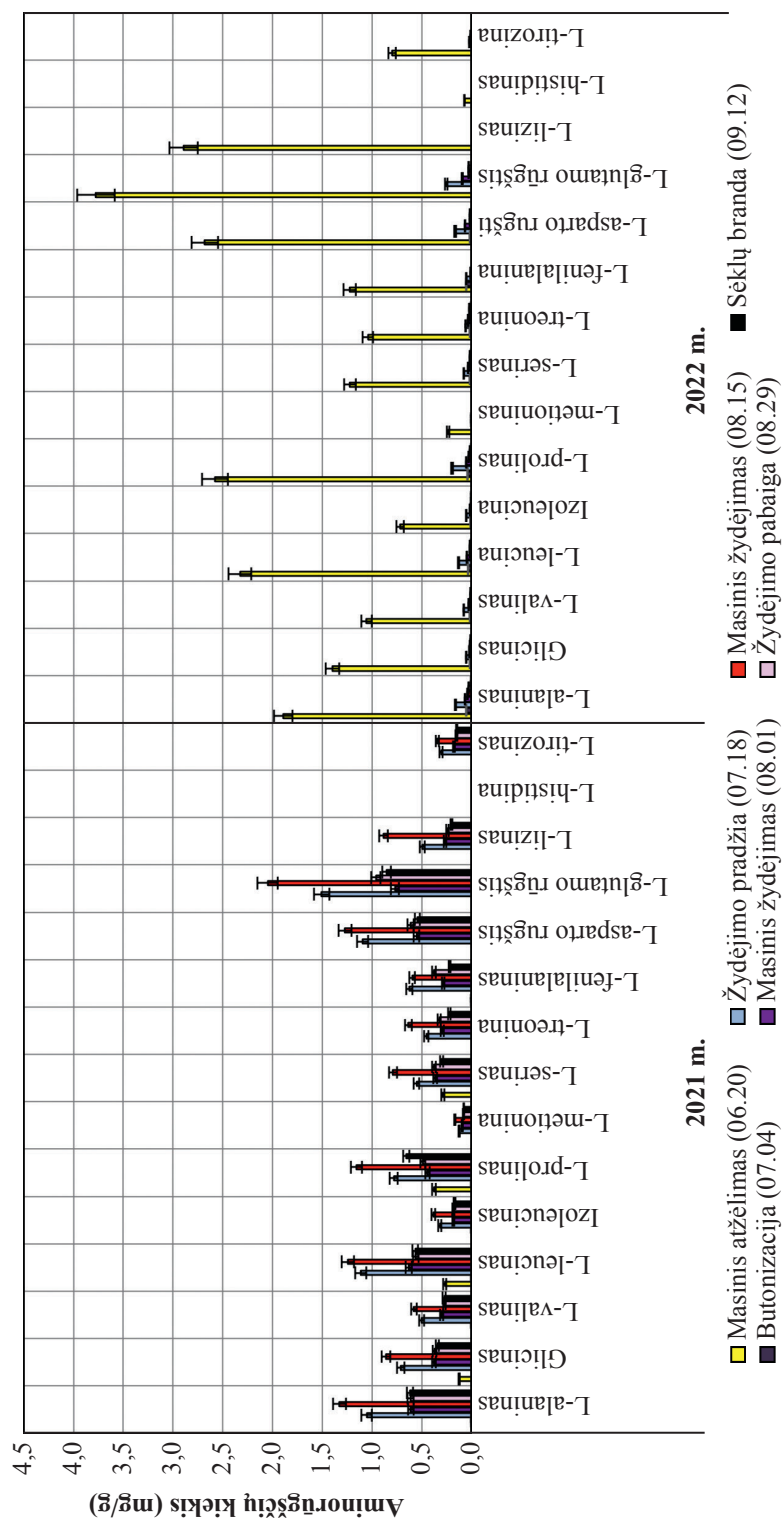
Atliktame kokybiniame aminorūgščių tyrime, Ashirova ir bendradarbiai tyrė *Asteraceae* šeimos augalus *Cichorium intybus* L., *Chamomilla recutita* L., *Achillea millefolium* L. ir šių augalų žiedynų žaliavose nustatė 15 laisvųjų aminorūgščių: argininą, cisteiną, liziną, tiroziną, fenilalaniną, histidiną, leuciną, izoleuciną, metioniną, valiną, proliną, treoniną, seriną, alaniną ir gliciną [173]. Lyginant *Asteraceae* šeimos augalais – *Cichorium intybus*, *Chamomilla recutita* ir *Achillea millefolium* – *C. vulgare* pasižymi panašiu aminorūgščių spektru kokybiniuose tyrimuose [174–176]. Atsižvelgiant į bendrą augalo biocheminę sudėtį ir fitocheminį potencialą, *C. vulgare* gali būti laikomas perspektyviu alternatyviu baltymų šaltiniu, tinkamu naudoti funkcinėje mityboje ar augalinės kilmės papildų gamyboje.

3.2.2. Aminorūgščių kokybinės ir kiekybinės sudėties

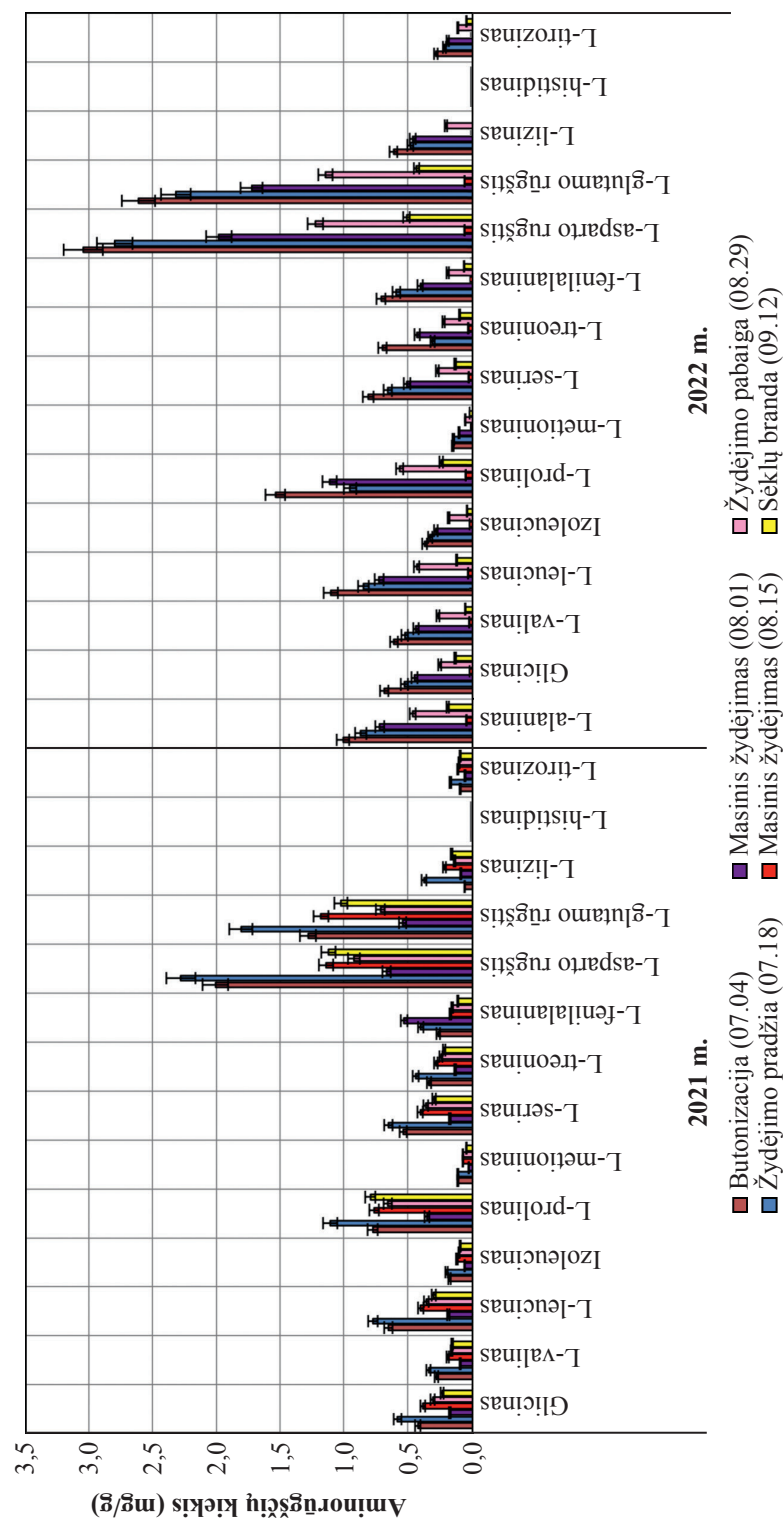
C. vulgare augalinių žaliavų ekstraktuose nustatymas

Aminorūgščių kiekis *C. vulgare* augalinėse žaliavose variavo priklausomai nuo augalo dalies (lapų, žiedynų, šaknų) ir žaliavos surinkimo laiko (augalo fenologinių tarpsnių įtakos rinkimo metais). Visi duomenys pateikti 3.2.2.1 pav. Visi gauti statistiškai reikšmingi skirtumai aminorūgščių tyrime pateikti disertacijos pabaigoje, priedų dalyje.

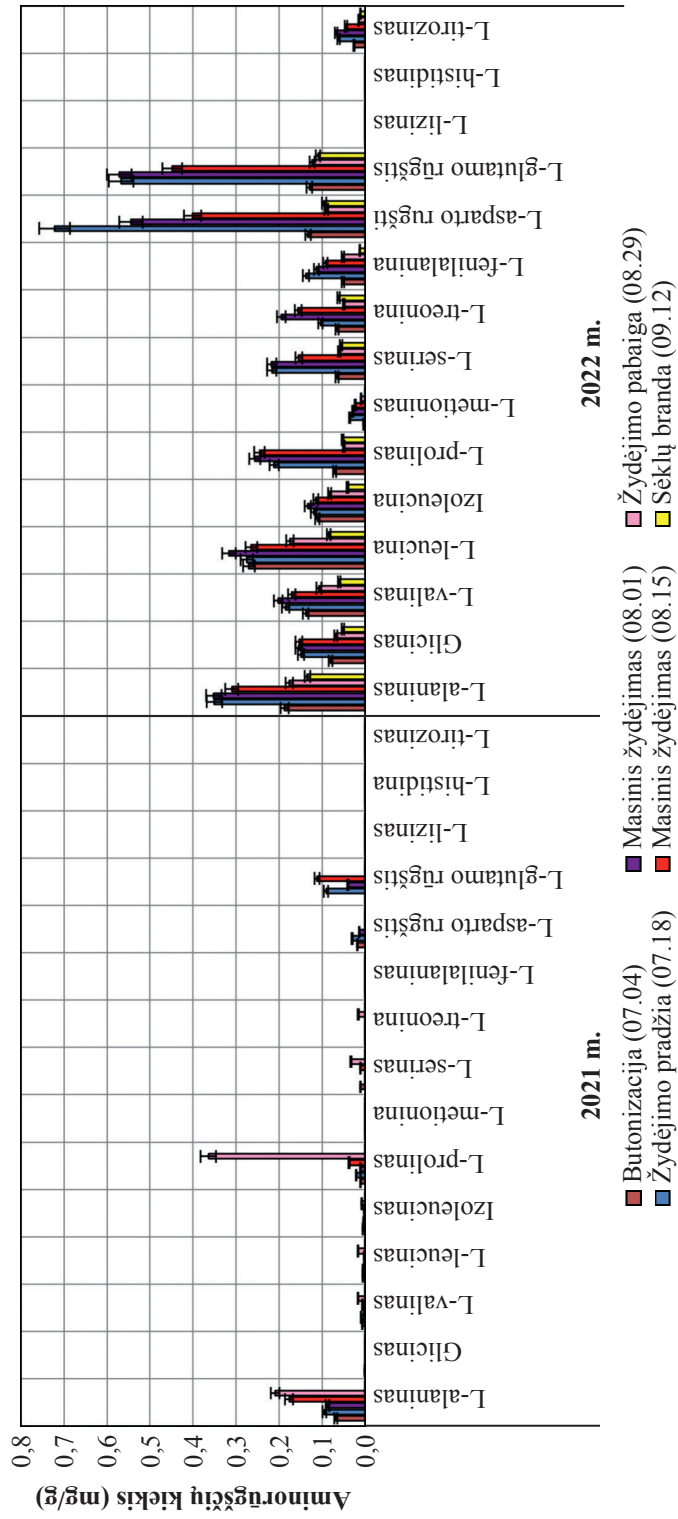
Įvertinus aminorūgščių kokybinės sudėties skirtumus *C. vulgare* augalinėse žaliavose (lapuose, žiedynuose, šaknyse), didžiausia aminorūgščių kokybinė įvairovė nustatyta augalo lapų ekstraktuose (15 aminorūgščių) (3.2.2.1 pav. A). Žiedynų ekstraktuose nustatyta 14 aminorūgščių (3.2.2.1 pav. B), o šaknų ekstraktuose 13 aminorūgščių (3.2.2.1 pav. C). *C. vulgare* lapų augalinių žaliavų ėminiuose, surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais 2021 ir 2022 metais, nustatytas suminis aminorūgščių kiekis (0,01–12,28 mg/g (2021 m.), 0,03–23,90 mg/g (2022 m.)) buvo šiek tiek didesnis už kiekius nustatytus *C. vulgare* žiedynų (3,25–10,04 mg/g (2021 m.), 0,30–14,20 mg/g (2022 m.)) ir šaknų (0,01–0,66 mg/g (2021 m.), (0,77–3,15 mg/g (2022 m.)) augalinėse žaliavose.



3.2.2.1 pav. (A) Aminorūgščių kiekio pokyčiai dygiųjų usnių augalinių žaliavų ėminiuose (lapų žaliavos ekstraktuose), surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu 2021–2022 m.



3.2.2.1 pav. (B) Aminorūgščių kiekio pokyčiai dygiųjų usnių augalinių žaliavų ekstraktuose, surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu 2021–2022 m.



3.2.2.1 pav. (C) Aminorūgščių kiekio pokyčiai dygiųjų usnių augalinių žaliavų ėminiuose (šaknų augalinės žaliavos ekstraktuose), surinktuose skirtingais fenologiniais tarpsniais dvejų metų laikotarpiu 2021–2022 m.

Palyginus aminorūgščių kiekio pokyčius usnies augalo lapų žaliavose, surinktose 2021 metų fenologinių tarpsnių metu, nustatyta, kad lapų žaliavoje sukauptas aminorūgščių kiekis ($0,01 \pm 0,00$ mg/g) buvo mažiausias butonizacijos laikotarpiu (07.04). Vėlesnių fenologinių tarpsnių metu (07.18–09.12) surinktose usnies lapų augalinėse žaliavose nustatytas aminorūgščių suminis kiekis buvo ženkliai didesnis ir variavo nuo $5,19 \pm 0,15$ mg/g iki $12,28 \pm 0,21$ mg/g. *C. vulgare* lapų augalinėje žaliavoje didžiausias suminis aminorūgščių kiekis ($12,49 \pm 0,15$ mg/g) nustatytas žaliavoje, surinktoje 2021 metais masinio žydėjimo laikotarpiu (08.15) ($p < 0,05$) (3.2.2.1 pav. A).

Palyginus aminorūgščių kiekio pokyčius usnies augalo lapų žaliavose, surinktose 2022 metų fenologinių tarpsnių metu, nustatyta, kad lapų žaliavoje, surinktoje masinio atžėlimo laikotarpiu (06.20), sukauptas aminorūgščių kiekis ($23,91 \pm 0,31$ mg/g) buvo didžiausias ($p < 0,05$). Vėlesnių fenologinių tarpsnių metu (07.04–09.12) surinktose usnies lapų augalinėse žaliavose nustatytas aminorūgščių kiekis buvo ženkliai mažesnis ir variavo nuo $0,01$ mg/g iki $1,31$ mg/g (3.2.2.1 pav. A). Pagrindinės lapų žaliavoje, surinktoje masinio atžėlimo metu (06.20), nustatytos aminorūgštys L-glutamino rūgštis ($3,78 \pm 0,06$ mg/g), L-lizinas ($2,89 \pm 0,04$ mg/g) ir L-asparto rūgštis ($2,68 \pm 0,04$ mg/g). Jos sudarė 39,11 proc. nustatyto suminio aminorūgščių kiekio.

Įvertinus augalo žiedynuose kaupiamų aminorūgščių kokybinę ir kiekybinę sudėtį nustatyta, kad juose nėra histidino, kuri buvo aptikta lapų ekstraktuose (3.2.2.1 pav. B). Palyginus aminorūgščių kiekio pokyčius *C. vulgare* žiedynų žaliavose, surinktose 2021 metų ir 2022 metų fenologinių tarpsnių metu, nustatyta, kad didžiausi suminiai aminorūgščių kiekiai ($10,04 \pm 0,19$ mg/g ir $14,20 \pm 0,12$ mg/g, atitinkamai) nustatyti augalinėse žaliavose, surinktose liepos mėnesį, vykstant butonizacijai ir žydėjimo pradžioje. Žiedynų augalinėje žaliavoje, surinktoje 2022 metais butonizacijos fenologiniame tarpsnyje (07.04), nustatytas suminis aminorūgščių kiekis buvo 2 kartus didesnis už suminį aminorūgščių kiekį nustatytą žiedynų augalinėje žaliavoje, surinktoje 2021 metais tuo pačiu laikotarpiu. Pagrindinės žiedynų žaliavoje, surinktoje 2022 metų butonizacijos laikotarpyje (07.04), vyravusios aminorūgštys buvo L-glutamino rūgštis ($3,04 \pm 0,07$ mg/g) ir L-asparto rūgštis ($2,61 \pm 0,05$ mg/g). Jos sudarė 39,8 proc. visų nustatytų aminorūgščių kiekio (3.2.2.1 pav. B). Tylei ir kiti autoriai, tyrę *C. japonicum*, taip pat nustatė, kad kiekybiškai ištyrus augalo žiedynų sudėtį, juose nustatytas aminorūgščių kiekis buvo didesnis nei kitose augalo dalių žaliavose [177].

Augalo šaknys kaupė mažiausius aminorūgščių kiekius, o kokybinės sudėties tyrime nebuvo nustatyta dviejų aminorūgščių – L-histidino ir L-lizino, kurios buvo aptiktos lapų ekstraktuose. *C. vulgare* šaknų žaliavose,

surinktose 2021 metų fenologinių tarpsnių metu nustatyti suminiai aminorūgščių kiekiai buvo iki 20 kartų mažesni už kiekius nustatytus *C. vulgare* šaknų žaliavose, surinktose atitinkamų fenologinių tarpsnių metu 2022 metais (3.2.2.1 pav. C). Įvertinus *C. vulgare* šaknų žaliavose, surinktose 2021 metais fenologinių tarpsnių laikotarpiu, esančius aminorūgščių kiekius, nustatyta, kad didžiausias suminis aminorūgščių kiekis $0,66 \pm 0,07$ mg/g aptiktas šaknų žaliavoje, surinktoje žydėjimo pabaigoje (08.29). Žydėjimo pabaigoje (08.29) surinktoje *C. vulgare* šaknų žaliavoje vyravo dvi aminorūgštys L-alaninas (31,48 proc.) ir L-prolinas (54,84 proc.). Įvertinus aminorūgščių kiekį *C. vulgare* šaknų žaliavose, surinktose 2022 metais fenologinių tarpsnių laikotarpiu, nustatyta, kad didžiausias suminis aminorūgščių kiekis $3,15 \pm 0,16$ mg/g buvo šaknų augalinėje žaliavoje, surinktoje masinio žydėjimo fenologiniame tarpsnyje (08.01). Pagrindinės šaknų žaliavoje, surinktoje 2022 metais masinio žydėjimo (08.01) laikotarpyje, vyravusios aminorūgštys buvo L-glutamato rūgštis ($0,57 \pm 0,01$ mg/g) ir L-asparto rūgštis ($0,54 \pm 0,01$ mg/g). Jos sudarė 35,37 proc. nustatyto suminio aminorūgščių kiekio (3.2.2.1 pav. C).

Tyrimų duomenimis, *C. intybus* lapų ekstraktuose dažniausiai randamos aminorūgštys yra argininas, cisteinas, valinas, alaninas ir glicinas, o jų kiekiai, ypač lapų ir šaknų žaliavose, yra didesni nei *C. vulgare* žaliavose [176]. Tuo tarpu *A. millefolium* ir *C. recutita* taip pat pasižymi įvairiu aminorūgščių profiliu, tačiau jų pasiskirstymas skirtingose augalo dalyse (žiedynuose, lapuose ar šaknyse) yra kintantys ir įprastai, mažesni nei *C. vulgare* žaliavoje [174, 175]. Nors *C. vulgare* aminorūgščių kiekiai kai kuriais atvejais yra mažesni nei minėtų augalų, šis augalas išsiskiria unikalia aminorūgščių kompozicija, kuri gali papildyti kitų *Asteraceae* šeimos augalų maistinę vertę.

Atlikus detalią aminorūgščių analizę nustatyta, kad *C. vulgare* augalinės žaliavos sudėtis (lapai, žiedynai, šaknys), rinkimo metai ir fenologiniai tarpsniai yra svarbūs veiksniai, lemiantys aminorūgščių kokybinę ir kiekybinę sudėtį dygiosios usnies augalinėje žaliavoje. Įvertinus junginių kaupimosi dėsningumus, nustatyta, kad 2022 metais surinktuose usnių žiedynuose ir šaknyse aminorūgščių kiekis buvo didesnis, palyginti su 2021 metais *C. vulgare* žiedynų ir šaknų žaliavose nustatyto junginių kiekiu. Aminorūgščių kaupimosi dėsningumai usnių lapuose buvo skirtingi: 2021 metais surinktuose lapų ėminiuose didžiausias junginių kiekis nustatytas augalui pradėjus žydėti ir išliko aukštas iki sėklų brandos, tuo tarpu 2022 metais surinktuose lapuose didžiausia aminorūgščių koncentracija buvo masinio atžėlimo metu, tačiau vėliau reikšmingai sumažėjo. Siekiant užtikrinti aukštos kokybės augalinės žaliavos gavimą su žinomu aminorūgščių kiekiu, būtina taikyti validuotą analizės metodiką ir tinkamai parinkti augalinių žaliavų paruošų laiką. Tokie nepakankamai išnaudotų augalų tyrimai gali būti perspektyvių, maisto

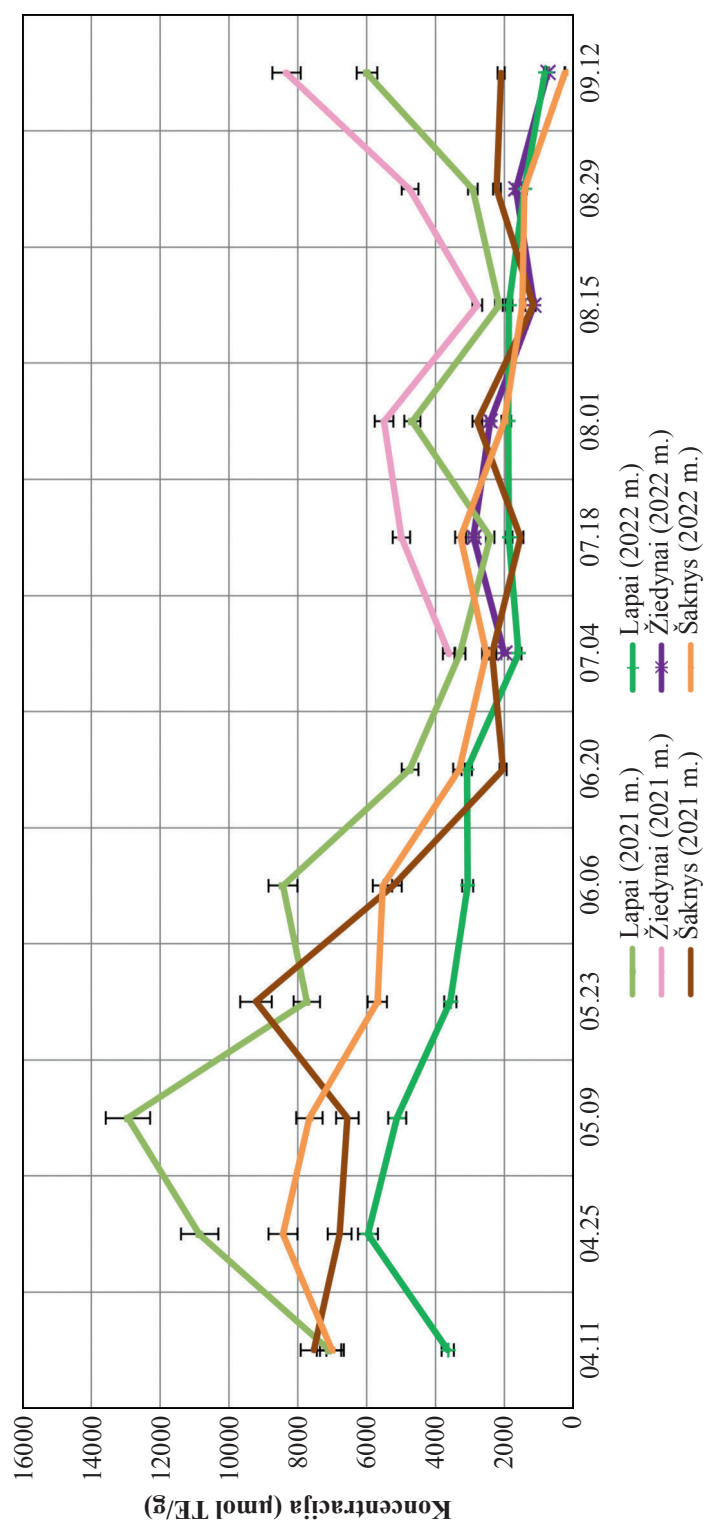
pramonėje pritaikomų, natūralių aminorūgščių šaltinis, prisidedantis prie subalansuotos mitybos ir funkcinių produktų kūrimo.

3.3. Dygiosios usnies ekstraktų biologinio poveikio tyrimai

3.3.1. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas

Antioksidacinio aktyvumo tyrime naudoti ekstraktai, kuriuose nustatyti didžiausi fenolinių junginių ir aminorūgščių kiekiai. Antioksidacinio aktyvumo tyrimo metu buvo siekiama įvertinti skirtingų dygiosios usnies augalo dalių (lapų, žiedynų, šaknų) ekstraktų antioksidacinį aktyvumą lyginant ekstraktus, pagamintus iš žaliavų surinktų 2021 ir 2022 metų rinkimo tapačių fenologinių tarpsnių metu.

Dygiosios usnies ekstraktų, pagamintų iš skirtingų augalinių žaliavų, surinktų 2021 ir 2022 metais skirtingais fenologiniais tarpsniais, antioksidacinio aktyvumo duomenys, vertinti CUPRAC metodu ($\mu\text{mol TE/g}$), pateikti 3.3.1.1 pav. Ekstraktai, pagaminti iš 2021 metų rinkimo augalo lapų, pasižymėjo stipriausiu antioksidaciniu poveikiu, dėl žaliavoje kaupiamų didžiausių fitocheminių junginių kiekio, lyginant su kiekiais nustatytais kitose augalo žaliavos dalyse. Nustatyta, kad stipriausiu aktyvumu pasižymėjo usnių žiedynų ekstraktai, pagaminti iš 2021 metų surinktos žiedynų žaliavos. Nustatytas žiedynų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo 1,48 karto stipresnis už 2022 metų rinktų usnies lapų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ir 2,24 karto stipresnis už 2021 metų rinktų usnies šaknų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ($p < 0,05$). Stipriausias antioksidacinis aktyvumas ($12938 \mu\text{mol TE/g}$) nustatytas *C. vulgare* lapų ekstraktuose, kurių žaliava buvo surinkta 2021 metais fenologinio ramybės periodo pabaigoje. Šie lapų ekstraktai pasižymėjo aukščiausiu suminiu fenolinių junginių kiekiu – $218,15 \text{ mg/g}$, kurio $124,61 \text{ mg/g}$ sudarė chlorogeno rūgštis, o $59,071 \text{ mg/g}$ apigenin-7-*O*-gliukozidas. Silpniausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas *C. vulgare* lapų ėminiuose, kurių žaliava buvo surinkta 2022 metais sėklų brandos fenologiniame tarpsnyje ($813 \mu\text{mol TE/g}$). Demirtas ir kiti nurodo, kad birželio mėnesį surinkti neapdoroti *C. arvense* lapų ekstraktai pasižymėjo stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu, taikant DPPH ir FRAP metodus [179].



3.3.1.1 pav. Iš skirtingų žaliavos dalių – lapų, žiedynų ir šaknų, pagamintų *C. vulgare* etanolinių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo vertinimas dvejų metų žaliavoje skirtingais fenologiniais tarpniais

Paveiksle pateikiama antioksidacinio poveikio išreiškiamo CUPRAC reagentu metodo rezultatų išraiška, trolokso ekvivalento koncentracija ($\mu\text{mol TE/g}$).

Lyginant *C. vulgare* ekstraktų antioksidacinio poveikio stiprumą, nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ekstraktų, kurie pagaminti iš antrų rinkimo metų skirtingų augalo dalių (2022 m.). Nustatyta, kad stipriausiu aktyvumu pasižymėjo usnies šaknų ekstraktai, pagaminti iš 2022 metais surinktos šaknų žaliavos. Nustatytas šaknų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo 1,4 karto stipresnis už 2022 metų rinktų usnies lapų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ir 2,2 karto stipresnis už 2022 metų rinktų usnies žiedynų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ($p < 0,05$). Yin ir kiti autoriai, tyrė *C. japonicum* šaknų ekstraktų antioksidacinį poveikį ir nustatė, kad metanoliniai ekstraktai turi stipresnį laisvųjų radikalų šalinimo aktyvumą nei vandeniniai ekstraktai. Vandeninis ir metanolinis *C. japonicum* šaknų ekstraktai pasižymėjo nuo koncentracijos priklausomu hidroksilo radikalų šalinimo aktyvumu ir sumažėjusia galia bei metalo kompleksinių junginių sudarymo pajėgumu [180]. Kim ir kiti autoriai, *C. japonicum* ekstraktuose nustatė šešis polifenolinius junginius (siringiną, chlorogeno rūgštį, 3,5-di-kafeoilchino rūgštį, 3'-hidroksicinamono rūgštį ir 3,4-dikafeoilchino rūgštį) ir patvirtino usnių žaliavose kaupiamų fenolinių junginių antioksidacinį poveikį [181].

2021 metais surinktų *C. vulgare* lapų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo 2,16 karto stipresnis už 2022 metais surinktų *C. vulgare* lapų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ($p < 0,05$). 2022 metų ramybės periodo pabaigos laikotarpiu (04.25) surinktų *C. vulgare* lapų žaliavos ekstraktuose nustatytas stipriausias antioksidacinis aktyvumas (5963 $\mu\text{mol TE/g}$). Silpniausias antioksidantinis aktyvumas nustatytas *C. vulgare* lapų ekstraktuose, kurių žaliava surinkta 2022 metų sėklų brandos fenologiniame tarpsnyje (813 $\mu\text{mol TE/g}$).

2021 metais surinktų *C. vulgare* žiedynų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo 2,76 karto stipresnis už 2022 metais surinktų *C. vulgare* žiedynų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą ($p < 0,05$). 2021 metais sėklų brandos fenologiniame tarpsnyje surinktų *C. vulgare* žiedynų žaliavos ekstraktuose nustatytas stipriausias antioksidacinis aktyvumas (8331 $\mu\text{mol TE/g}$). Šios žaliavos ekstraktuose dominavo apigenin-7-*O*-gliukozidas (27,62 mg/g) ir chlorogeno rūgštis (22,42 mg/g). Mažiausias antioksidacinis aktyvumas (738 $\mu\text{mol TE/g}$) nustatytas ekstraktuose, kurie pagaminti iš *C. vulgare* žiedynų surinktų 2022 metais sėklų brandos fenologiniame tarpsnyje.

Lyginant dvejų metų šaknų ekstraktų antioksidacinį poveikį, statistiškai reikšmingo skirtumo tarp 2021 m. ir 2022 m. rinkimo metų šaknų ekstraktų antioksidacinio poveikio stiprumo nenustatyta ($p > 0,05$). 2021 metų rinktų šaknų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas variavo nuo 1143 $\mu\text{mol TE/g}$ iki 9213 $\mu\text{mol TE/g}$, o 2022 metų rinktų usnies šaknų ekstraktų – nuo 238 $\mu\text{mol TE/g}$ iki 8438 $\mu\text{mol TE/g}$. Stipriausias antioksidacinis aktyvumas (9213 $\mu\text{mol TE/g}$) nustatytas ekstraktuose, kurie pagaminti iš *C. vulgare* šaknų žaliavos

surinktos 2021 metų ramybės periodo pabaigoje (05.23). Mažiausias antioksidacinis aktyvumas (238 $\mu\text{mol TE/g}$) nustatytas ekstraktuose, kurie pagaminti iš *C. vulgare* šaknų surinktų 2022 metais sėklų brandos fenologiniame tarpsnyje.

Koryza bei Nazaruk ir kitų autorių, tiriančių šiaurės rytinėje Lenkijos dalyje auginamų *Cirsium* genties augalų žiedynų ir lapų antioksidacines savybes, nustatė teigiamą koreliaciją tarp šių dviejų žaliavų ekstraktų antioksidacinio poveikio ir bendro fenolinių junginių kiekio ekstraktuose [56, 168]. Kurç ir kiti autoriai nustatė, kad birželio mėn. surinktas *C. vulgare* augalo dalių (šaknų, stiebų, lapų ir žiedynų) metanolinis ekstraktas pasižymėjo stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu, taikant CUPRAC metodą, kurio Trolox ekvivalento redukcijos pajėgumas buvo 2,14 $\mu\text{mol TE/g}$, o EC_{50} vertė 18,5 $\mu\text{g/ml}$. Minėti mokslininkai taip pat nustatė, kad tas pats ekstraktas pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu, įvertinus FRAP (1436,6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ekstrakto), ABTS (1436,6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ekstrakto) ir superoksido anionų radikalų šalinimo aktyvumo metodais. Įvairių (FRAP, ABTS, CUPRAC) antioksidacinio aktyvumo metodų dėka nustatyta, kad *C. arvense* etanoliniai ekstraktai, palyginus juos su turimais standartais, turi nuo dozės priklausomą antioksidacinį aktyvumą [182].

Apibendrinant antioksidacinio aktyvumo CUPRAC metodo rezultatus, nustatyta, kad stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu (12938 $\mu\text{mol TE/g}$) pasižymėjo ekstraktai, pagaminti iš *C. vulgare* augalo lapų, surinktų 2021 metais fenologinio ramybės periodo pabaigoje (05.09). 2021 metų žaliavos ekstraktai, ypač lapai ir žiedynai, pasižymėjo ryškiu antioksidaciniu aktyvumu, kurį lėmė chlorogeno rūgšties ir apigenin-7-O-gliukozido kiekiai. Gauti duomenys patvirtina, kad dygiosios usnies augimo metai ir fenologiniai tarpsniai turi reikšmingą poveikį fitocheminiam profiliui bei antioksidaciniam aktyvumui, o tai atskleidžia žaliavos surinkimo laikotarpio svarbą vertinant augalų antioksidacines savybes.

3.3.2. Priešvėžinio poveikio tyrimai

C. vulgare priešvėžinis poveikis nėra išsamiai tyrinėtas. Kitų autorių tyrimai su *Cirsium* genties augalais, tokiais kaip *C. japonicum*, kurie kaupia chlorogeno rūgštį ir pasižymi atsparumu oksidaciniam stresui, rodo šios rūšies potencialą priešvėžiniuose tyrimuose [104]. Šie duomenys leidžia manyti, kad ir *C. vulgare* gali turėti panašų poveikį prieš oksidacinį stresą, todėl tolimesni tyrimai šiai hipotezei patvirtinti yra būtini.

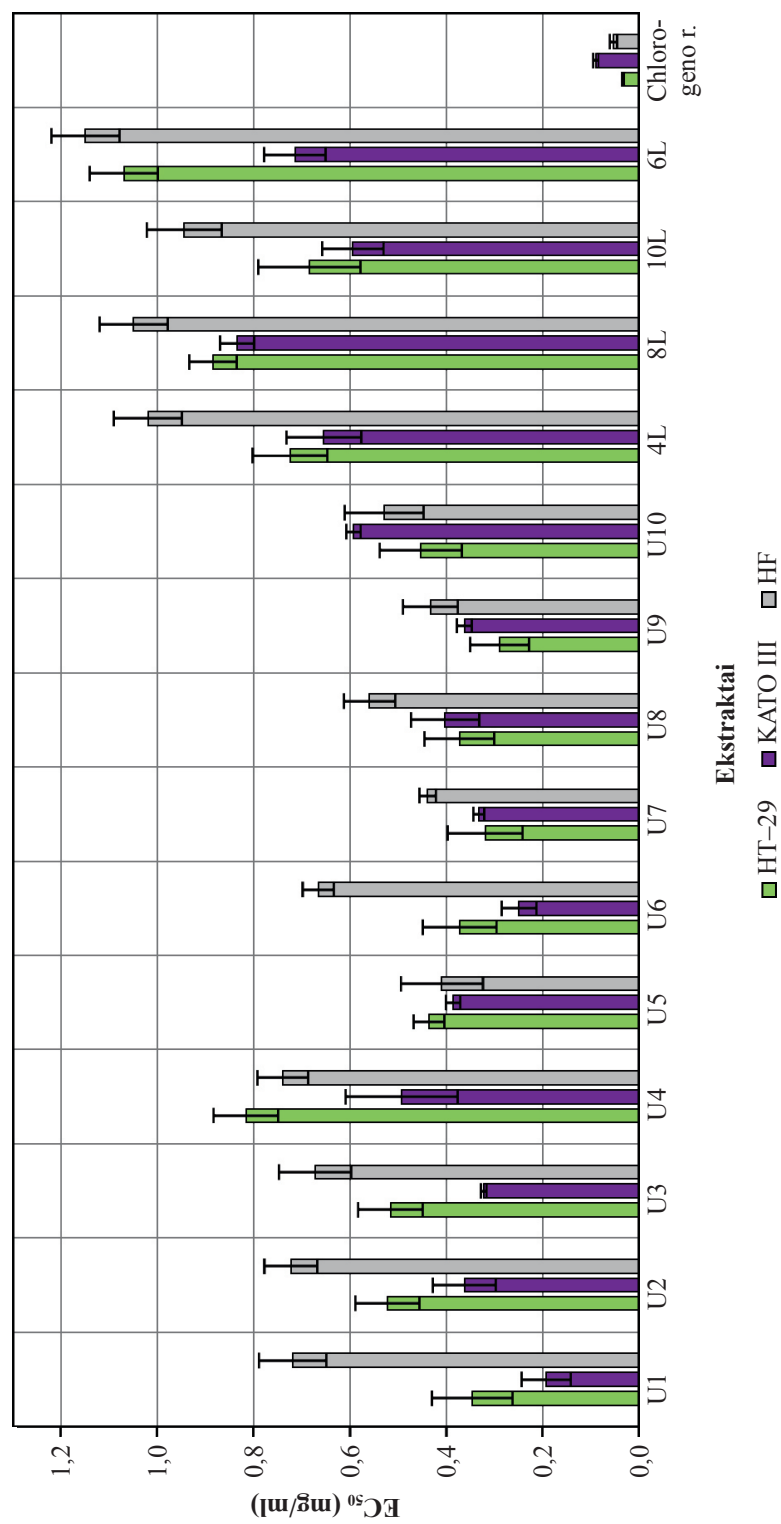
Atlikus dviejų metų (2021–2022 m.) žaliavų antioksidacinio aktyvumo analizę, pagal gautą antioksidacinio aktyvumo koncentraciją buvo atrinkti tolimesniems tyrimams ekstraktai, kurie aprašyti 3.3.2.1 lentelėje.

3.3.2.1 lentelė. Dygiųjų usnių augalo ekstraktai, ekstraktų kodavimas: ekstrakto numeris, surinkimo data, fenologinė stadija, žaliavos dalis, CGA (*chlorogeno r.*) kiekis, suminis fenolinių junginių (SFJ) kiekis

Ekstrakto kodas	Rinkimo data	Fenologinis tarpsnis	Augalo dalis iš kurios gaminti ekstraktai	CGA kiekis	SFJ kiekis
U1	2021.09.12	Sėklų branda	Žiedynas	22,42 mg/g	53,63 mg/g
U2	2021.08.01	Masinis žydėjimas	Žiedynas	20,73 mg/g	41,76 mg/g
U3	2021.07.18	Žydėjimo pradžia	Žiedynas	58,02 mg/g	82,50 mg/g
U4	2021.09.12	Sėklų branda	Lapai	52,20 mg/g	115,59 mg/g
U5	2022.04.25	Ramybės periodo pabaiga	Šaknys	27,53 mg/g	33,31 mg/g
U6	2022.04.11	Ramybės periodo pabaiga	Šaknys	29,73 mg/g	33,66 mg/g
U7	2022.05.23	Ramybės periodo pabaiga	Šaknys	17,91 mg/g	24,02 mg/g
U8	2022.05.09	Ramybės periodo pabaiga	Šaknys	31,71 mg/g	38,05 mg/g
U9	2022.06.06	Masinis atžėlimas	Šaknys	27,47 mg/g	40,69 mg/g
U10	2022.04.25	Ramybės periodo pabaiga	Lapai	92,49 mg/g	158,50 mg/g
4L	2021.04.25	Ramybės periodo pabaiga	Lapai	65,47 mg/g	138,34 mg/g
8L	2021.05.23	Ramybės periodo pabaiga	Lapai	156,28 mg/g	286,27 mg/g
10L	2021.06.06	Masinis atžėlimas	Lapai	140,15 mg/g	248,50 mg/g
6L	2021.05.09	Ramybės periodo pabaiga	Lapai	124,61 mg/g	209,55 mg/g

Tyrimas, kuriame analizuojamas keturiolikos sausųjų *C. vulgare* ekstraktų ir chlorogeno rūgšties poveikis ląstelių gyvybingumui, parodė, kad visi ekstraktai veikė žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos ląstelių liniją (HT–29) ir žmogaus skrandžio karcinomos ląstelių liniją (KATO III). U1 ekstraktas pasižymėjo didžiausiu aktyvumu, reikšmingiausiai slopinamas KATO III ląstelių linijos gyvybingumą (EC_{50} $0,19 \pm 0,05$ mg/ml). Šis ekstraktas taip pat reikšmingai mažino HT–29 ląstelių linijos gyvybingumą (EC_{50} $0,35 \pm 0,08$ mg/ml). Atitinkamai, U9 ekstraktas buvo efektyviausias slopinant HT–29 ląstelių proliferaciją (EC_{50} $0,29 \pm 0,06$ mg/ml) (3.3.2.1 pav.). Mažiausiai aktyvūs buvo lapų 4L, 8L, 10L ir 6L ekstraktai. Šie ekstraktai turėjo didžiausią chlorogeno rūgšties kiekį (65,47–156,28 mg/g), palyginus visų ekstraktų chlorogeno rūgšties kiekių duomenis.

Lyginant žaliavos dalis, iš kurių buvo pagaminti ekstraktai, stipriausias poveikis (EC_{50} nuo $0,29 \pm 0,06$ iki $0,37 \pm 0,08$) HT–29 (žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos) ląstelių linijai buvo pastebėtas ląsteles paveikus ekstraktais pagamintais iš usnies šaknų. Poveikiu prieš HT–29 ląstelių linijos gyvybingumą, išsiskyrė ir ekstraktas U1, kuris buvo pagamintas iš usnies žiedynų, surinktų sėklų brandos fenologiniu tarpsniu. Pastebėta šaknų ekstraktų tendencija, kad ekstraktai, kurių žaliava – šaknys buvo surinkta masinio žydėjimo metu (EC_{50} $0,29 \pm 0,06$) (U9) ir fenologinio ramybės laikotarpio pabaigoje (EC_{50} $0,32 \pm 0,08$) (U7), turėjo stiprų poveikį. Tuo tarpu KATO III ląstelių linijos gyvybingumą efektyviausiai slopino ekstraktai, pagaminti iš augalo žiedynų. Ypač aktyvus buvo iš augalo žiedyno, surinkto sėklų brandos fenologiniame tarpsnyje (U1), pagamintas ekstraktas, kuris pasižymėjo didžiausiu aktyvumu slopinant šios ląstelių linijos gyvybingumą. HF ląstelių linijos gyvybingumą labiausiai slopino ekstraktai U5 ir U8, pagaminti iš augalo šaknų. Šių ekstraktų žaliavos buvo surinktos ramybės laikotarpio pabaigos fenologiniame tarpsnyje. Skrandžio karcinomos ląstelių linijos, tokios kaip KATO III, yra mažai jautrios dėl savo sudėtingos naviko mikroaplinkos ir atsparumo chemoterapijai, todėl atlikto tyrimo rezultatai yra svarbūs. HT–29 storosios žarnos adenokarcinomos ląstelių modelis yra žinomas dėl savo atsparumo tradiciniams gydymo metodams, todėl U1 (žiedynų) ir U9 (šaknų) ekstraktų poveikis šioms ląstelių linijoms yra svarbus įvertinti.



3.3.2.1 pav. Ekstraktų EC_{50} vertės HT-29, KATO III ir HF ląstelių linijoms, po 72 val. inkubacijos

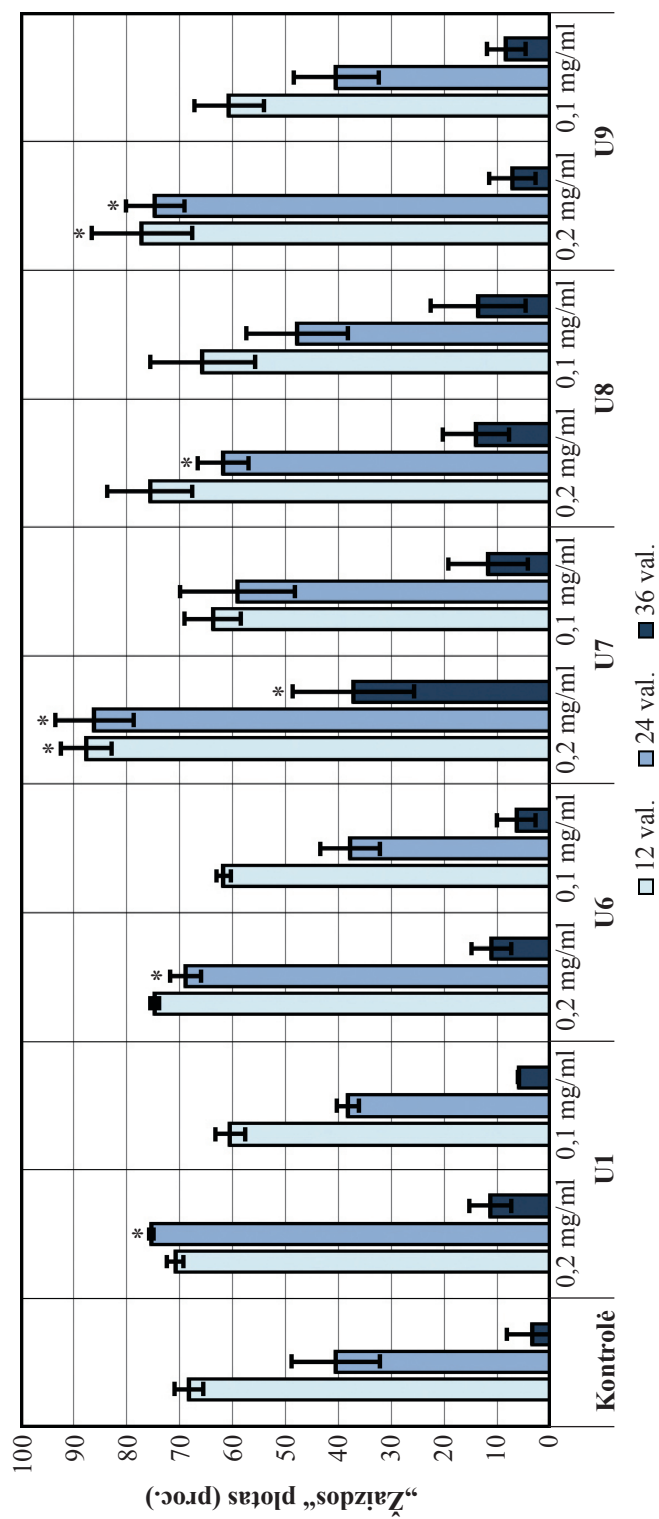
Gauti tyrimo rezultatai atitinka kitų tyrėjų atliktus tyrimus su *Cirsium* genties augalais [122, 183]. *C. setidens*, vartojamos Rytų Azijos medicinoje pasižymėjo selektyviu citotoksiškumu prieš žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos vėžio ląsteles [183]. Reikšmingas poveikis pastebėtas tyrime naudojant 100–250 µg/ml ekstraktų koncentracijas. Šių koncentracijų ekstraktai sukėlė apoptozę, aktyvuodami kaspazes ir moduliudami Bcl-2 baltymą, kuris yra svarbus ląstelių išlikimui [183]. Tyrimai su *C. japonicum* parodė, kad naudoti 200–500 µg/ml ekstraktai, kuriuose nustatytas didelis kiekis aktyvių fenolinių junginių, turėjo citotoksiinį poveikį kepenų vėžio (HepG2) ir krūties vėžio (MCF-7) ląstelių linijoms [122]. Šis poveikis daugiausia buvo siejamas su flavonoidais, tokiais kaip pektolinarinas ir apigeninas, kurie veikia specifinius vėžio mechanizmus [122, 184]. Šios koncentracijos yra panašios į naudotas mūsų tyrime, kurio metu *C. vulgare* ekstraktai, ypač U1 (žiedynų) ir U9 (šaknų), pademonstravo selektyvų priešvėžinį poveikį. Tai rodo, kad augalo žaliavos dalys surinktos tam tikrais augimo tarpsniais gali turėti bioaktyvių junginių, kurių koncentracija yra pakankama tiksliniam citotoksiškumui sukelti.

Atlikto tyrimo metu nustatyta, kad *C. vulgare* ekstraktai U4 (lapų), U5 (šaknų) ir U10 (lapų) neselektyviai slopino sveikų žmogaus fibroblastų (HF) gyvybingumą, palyginus su KATO III ir HT-29 ląstelių linijomis (nuo 0,9 iki 1,2 karto). Tuo tarpu *C. vulgare* ekstraktai U1 (žiedynų), U6 (šaknų), U7 (šaknų), U8 (šaknų), U9 (šaknų) turėjo mažesnę poveikį žmogaus fibroblastų (HF) ląstelių gyvybingumui lyginant su KATO III ir HT-29 vėžio ląstelių linijomis (nuo 1,48 iki 3,79 karto). Tai leidžia daryti išvadą, kad ekstraktai U1 (žiedynų), U6 (šaknų), U7 (šaknų), U8 (šaknų) ir U9 (šaknų) yra selektyvesni KATO III ir HT-29 ląstelių linijoms, palyginus jas su HF ląstelėmis, ir lyginant ekstraktus su U4 (lapų), U5 (šaknų) ir U10 (lapų) ekstraktais (3.3.2.1 pav.).

Chlorogeno rūgšties poveikis ląstelių gyvybingumo sumažėjimui taip pat buvo nustatytas, kadangi ši medžiaga buvo aptikta visuose tirtuose ekstraktuose dideliais kiekiais. Chlorogeno rūgšties kiekis šiuose sausuose ekstraktuose variavo nuo 17,91 iki 156,28 mg/g. Tačiau nenustatyta jokio tiesioginio ryšio tarp chlorogeno rūgšties kiekio ir jos poveikio ląstelių linijoms. Pastebėta, kad ekstraktai, pasižymintys reikšmingai didesniu aktyvumu HT-29 ir KATO III ląstelių linijose, turėjo palyginti mažesnę chlorogeno rūgšties kiekį. Chlorogeno rūgšties kiekis augalų ekstraktuose labai skyrėsi. Didžiausias šio junginio kiekis buvo nustatytas ekstraktuose, pagamintuose iš augalo lapų, surinktų pirmųjų fenologinių metų ramybės pabaigoje ir masinio atžėlimo metu. Tačiau tyrimuose, susijusiuose su ląstelių gyvybingumu ir žaizdų gijimu, šių ekstraktų EC₅₀ efektai buvo silpniausi tiek analizuojamose vėžinių ląstelių kultūrose, tiek HF ląstelėse. Chlorogeno rūgštis stipriau mažina HF ląstelių gyvybingumą nei KATO III vėžinių ląstelių, o taip pat buvo labai neselektyvi prieš vėžinių ląstelių linijas (3.3.2.1 pav.).

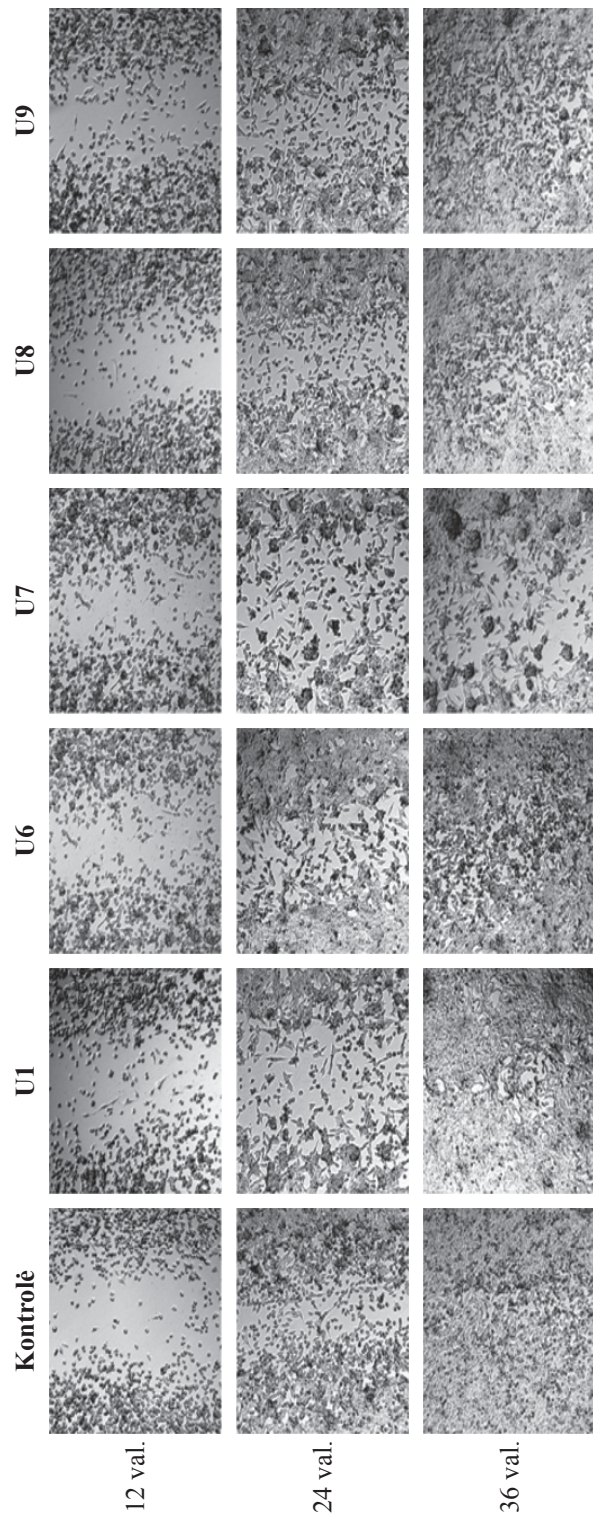
Chlorogeno rūgštis, kurios buvo gausu *C. vulgare* ekstraktuose, gerai žinoma dėl savo priešvėžinių savybių. Chlorogeno rūgšties koncentracija 100 μ M buvo siejama su apoptozės indukcija, ląstelių ciklo sustabdymu ir proliferacijos mažinimu vėžinėse ląstelėse [185]. HT–29 ląstelėse chlorogeno rūgšties 50–200 μ M koncentracijos, mažino proliferaciją ir skatino apoptozę, moduluodamos su apoptoze susijusius baltymus. Tai leidžia manyti, kad chlorogeno rūgšties turintys *C. vulgare* ekstraktai gali pasiekti panašius efektus, skatindami apoptozę. Žiedynų ekstrakte (U1) nustatyta didesnė apigenin-7-*O*-gliukozido koncentracija, siekianti 27,62 mg/g, tačiau šiame ekstrakte nenustatyta reikšmingų kitų biologiškai aktyvių junginių, aptiktų šaknų ekstrakte (U9). Šaknų ekstrakte apigenin-7-*O*-gliukozido koncentracija yra mažesnė – 4,48 mg/g, tačiau jame identifikuota keletas papildomų bioaktyvių junginių, įskaitant kumariną (5,39 mg/g), neochlorogeno rūgštį (1,22 mg/g) ir kofeino rūgštį (2,13 mg/g). Šie nustatyti junginiai šaknų ekstrakte, atsižvelgiant į galimą jų sinergistinį poveikį, rodo platesnį potencialių antioksidacinių ir priešuždegiminių savybių veikimo spektrą, palyginti su žiedyno ekstraktu. Atsižvelgiant į tai, kad aktyviausi ekstraktai U1 (žiedynų) ir U9 (šaknų) turi didelį chlorogeno rūgšties ir apigenin-7-*O*-gliukozido kiekį, šie rezultatai patvirtina jų citotoksinį veiksmingumą ir galimą mechanizmą per mitochondrinės apoptozės kelius, kas ypač svarbu gydant žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos ir skrandžio karcinomos vėžį.

Išnagrinėjus dygiosios usnies ekstraktų poveikį ląstelių gyvybingumui, tolesniems tyrimams buvo atrinkti aktyviausi ekstraktai – U1 (žiedynų), U6 (šaknų), U7 (šaknų), U8 (šaknų) ir U9 (šaknų), kurių poveikis HT–29 vėžinių ląstelių migracijai buvo įvertintas naudojant „žaizdos gijimo“ metodą, taikant 0,1 mg/ml ir 0,2 mg/ml koncentracijas. „Žaizdos gijimo“ testas, kuris vertina ląstelių migraciją, kaip metastazinio potencialo rodiklį, parodė, kad šaknų ekstraktas U7 stipriausiai slopino HT–29 ląstelių migraciją ($p < 0,05$), palyginus su kontrole. Net po 36 val., esant 0,2 mg/ml koncentracijai, „žaizda“ liko neužgijusi, o „žaizdos“ plotas viršijo daugiau nei 15 proc. kontrolės rodiklio (3.3.2.2 pav.). Tai reikšminga, atsižvelgiant į stiprią HT–29 ląstelių migraciją, susijusią su metastaziniu progresavimu. Panašūs anti-migraciniai efektai, esant panašioms koncentracijoms pastebėti ir kitų *Cirsium* rūšių tyrimuose. *C. japonicum* slopino krūties vėžio ląstelių (MCF–7) migraciją 100–300 μ g/ml koncentracijose, kur bioaktyvūs junginiai paveikė ląstelių judrumą, keisdami citoskeleto dinamiką ir mažindami matricinių metaloproteinazių (MMP) ekspresiją, kurios yra būtinos metastazėms progresuoti [184, 186]. Tai leidžia manyti, kad *C. vulgare* bioaktyvūs junginiai, tokie kaip chlorogeno rūgštis ir apigenino dariniai, gali slopinti migraciją priklausomai nuo koncentracijos, galimai veikdami ląstelių judrumą, keisdami citoskeleto dinamiką ar mažindami matricinių metaloproteinazių (MMP) ekspresiją.



3.3.2.2 pav. (A) Kiekybiniai „žaidos“ ploto (proc.) skaičiavimai žmogaus HT-29 atveju

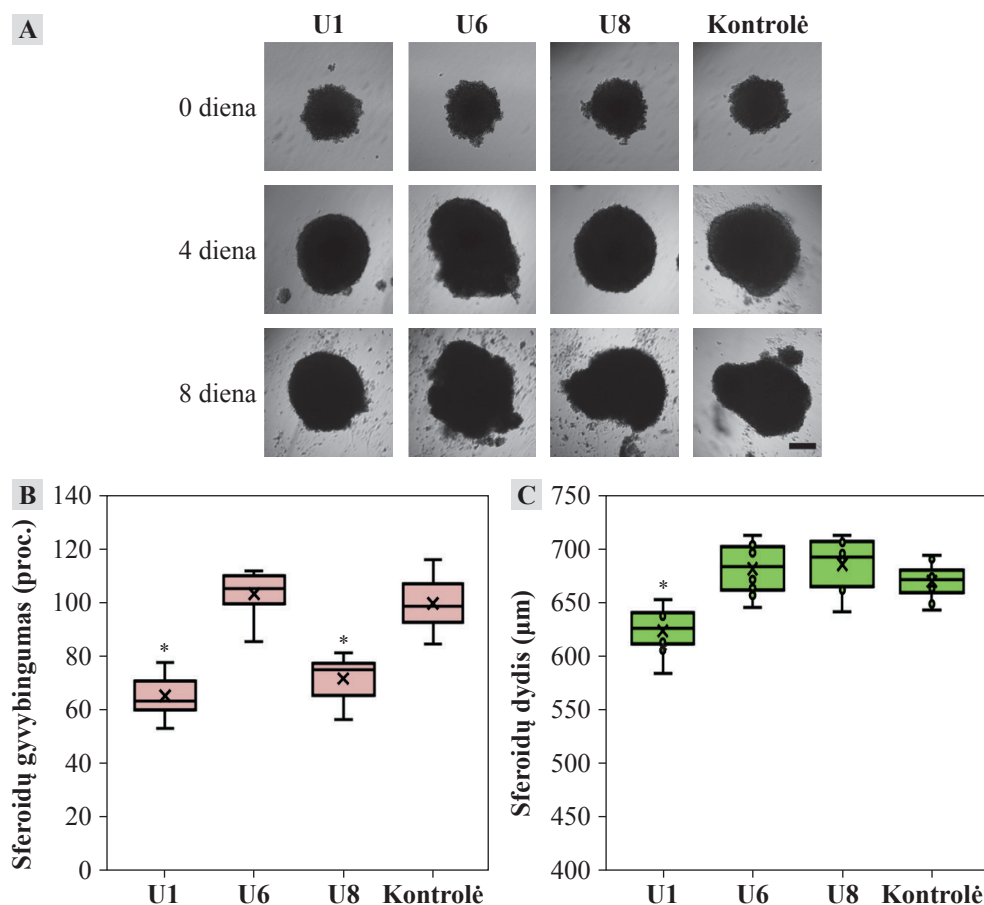
Paveiksle pavaizduoti HT-29 „žaidos“ plotas po 0, 12, 24, 36 val. inkubacijos su 0,2 ir 0,1 mg/ml *C. vulgare* sausaisiais ekstraktais bei kontrole (tik terpė). Paveikslas mastelio juosta – 100 µm; n = 3 (nepriklausomi eksperimentai). Žvaigždutės (*) rodo, kad lyginamos grupės turi reikšmingų skirtumų tarp grupių ($p < 0,05$).



3.3.2.2 pav. (B) HT-29 „žaiždos“ nuotraukos

Ekstraktai U1 (žiedynų), U6 (šaknų) ir U8 (šaknų) parodė panašų poveikį HT–29 ląstelių linijai 2D migracijos modelyje, esant 0,2 mg/ml ir 0,1 mg/ml koncentracijoms. Jie statistiškai reikšmingai sumažino „žaizdos“ plotą po 24 val., palyginus su kontroliniais mėginiais. Vėžinių ląstelių „žaizdos“ plotas po 24 val. išliko akivaizdžiai neužgijęs ir viršijo 45 proc. Rezultatai parodė, kad, palyginus su kontrolinės grupės rezultatais, „žaizdos“ dydis išliko labiau matomas veiktose grupėse net po 36 val., esant 0,2 mg/ml koncentracijai. Chlorogeno rūgšties poveikis ląstelių migracijai buvo nustatytas ir kituose vėžio ląstelių modeliuose, kur jis parodė panašų efektą [185]. Moksliniuose tyrimuose nurodoma, kad 50–150 μ M koncentracijos veiksmingai sumažina MMP ekspresiją ir pakeičia aktino dinamiką, mažindamos migraciją skrandžio ir žmogaus gaubtinės žarnos adenokarcinomos ląstelėse [185]. Stebėtas *C. vulgare* ekstraktų anti-migracinis poveikis greičiausiai susijęs su chlorogeno rūgšties ir flavonoidinių junginių gebėjimu moduluoti ląstelių judrumo kelius. Tai pabrėžia šių junginių svarbą strategijose, siekiančiose sumažinti metastazių plitimą.

3D sferoidų modelis, kuris artimai atkartoja *in vivo* auglio mikroaplinką, atskleidė reikšmingą *C. vulgare* ekstraktų poveikį, mažinantį sferoidų augimą ir gyvybingumą. Plačiai pripažįstama, kad junginio poveikio vertinimas tik pagal sferoidų dydžio pokyčius nėra visiškai tikslus, nes tai gali būti tiesiogiai nesusiję su ląstelių gyvybingumu sferoiduose [187]. Tyrimo metu *C. vulgare* ekstraktų poveikis HT–29 sferoidų augimui ir gyvybingumui buvo vertinamas naudojant WST-1 metodiką (3.3.2.3 pav.). KATO III ląstelės nesuformavo sferoidų, todėl ši ląstelių linija nebuvo naudojama ekstraktų aktyvumui vertinti 3D kultūrose. HT–29 sferoidai buvo sudaryti iš vėžinių ląstelių ir fibroblastų (HF) santykiu 1:1, siekiant geriau imituoti realią auglio mikroaplinką. Šis požiūris atsižvelgia į jungiamojo audinio buvimą augliuose, kuris atlieka svarbų vaidmenį auglio augime ir metastazėse. Eksperimento pradžioje sferoidų skersmuo siekė 300–350 μ m (3.3.2.3 pav. A).



3.3.2.3 pav. (A) HT–29 ląstelių sferoidų nuotraukos eksperimento pradžioje ir pabaigoje (po 8 dienų inkubacijos su 0,35 mg/ml ekstraktais); **(B)** HT–29 sferoidų gyvybingumas eksperimento pabaigoje; **(C)** HT–29 sferoidų dydis eksperimento pabaigoje

Žvaigždutės (*) rodo stat. reikšmingumą ($p < 0,05$) lyginant su kontroline grupe (nepaveiktais sferoidais).

HT–29 sferoidai, paveikti ekstraktu pagamintu iš augalo žiedynų (U1), parodė reikšmingą dydžio ir gyvybingumo sumažėjimą po 8 dienų, sferoidų skersmeniui sumažėjus iki 584,1–641,2 μm, palyginti su kontroliniu mėginiu (643–690,1 μm, $p < 0,05$) (3.3.2.3 pav. C). Šie rezultatai atitinka tyrimų, atliktų su *C. japonicum*, išvadas, kur 250–500 μg/ml flavonoidų turintys ekstraktai sumažino HepG2 kepenų vėžio sferoidų augimą, indukuodami apoptozę ir slopindami ląstelių proliferaciją [122]. Atsižvelgiant į panašias veiksmingas koncentracijas, galima teigti, kad *C. vulgare* ekstraktai taip pat

gali turėti įtakos vėžinių ląstelių gyvybingumui per apoptozę ir anti-proliferacinius kelius, dėl ekstraktuose esančių aktyvių junginių – chlorogeno rūgšties ir kitų flavonoidų, kurie trikdo signalų kelius, reikalingus vėžinių ląstelių augimui. Šis tyrimas parodė, kad ekstraktai U1 (žiedynų) ir U8 (šaknų) sumažino sferoidų gyvybingumą atitinkamai iki 77,9 proc. ir 81,5 proc. (3.3.2.3 pav. B). Šis gyvybingumo sumažėjimas atitinka chlorogeno rūgšties tyrimus apie HT–29 ląstelių linijos sferoidų modelius, kur 500 μ M ir didesnės koncentracijos indukuoja oksidacinį stresą, aktyvuoja kaspazių kelius ir trikdo ląstelių išgyvenimo signalus kietųjų auglių modeliuose [112]. U1 (žiedynų) ir U8 (šaknų) veiktų sferoidų stebimas aktyvumas rodo, kad šie ekstraktai gali apeiti atsparumą, kuris dažnai pasitaiko auglio sferoiduose dėl jų hipoksinės ir maistinių medžiagų stokojančio aplinkos. Fibroblastų buvimas šiame 3D modelyje leido vėžinėms ląstelėms sąveikauti su jungiamojo audinio komponentais, kurie yra svarbūs auglio progresavimui. Anksčiau atlikti tyrimai su *C. setidens* parodė, kad augalo flavonoidai gali moduluoti vėžinių ląstelių ir jungiamojo audinio sąveiką, mažindami fibroblastų skatinamus auglio efektus [188]. Tai rodo, kad *C. vulgare* ekstraktai taip pat gali sąveikauti auglio mikroaplinkoje, slopindami tiek vėžinių ląstelių augimą, tiek jungiamojo audinio palaikomąjį vaidmenį, taip pabrėžiant jų potencialą sudėtinguose vėžio modeliuose.

3.3.3. Antimikrobinio poveikio tyrimas

Antimikrobinio poveikio nustatymas atliekamas tiriant etanolinių ir sausųjų dygiųjų usnių ekstraktų poveikį bakterijų kultūroms. Tyrime naudotos devynios bakterijų kultūros. Etaloninės nesporinių bakterijų kultūros *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ir *P. vulgaris*, etaloninė sporinė bakterijų kultūra – *B. cereus* ir etaloninė mieliagrybių kultūra – *C. albicans*. Antimikrobinio poveikio nustatymui naudoti dygiosios usnies žaliavų ekstraktai nurodyti 3.3.3.1 lentelėje.

3.3.3.1 lentelė. Naudoti *C. vulgare* augalo žaliavos ekstraktai

Ekstrakto kodas	Augalo žaliavos dalis	Fenologinis tarpsnis	Rinkimo data	Ekstrakto rūšis
UŠ1	Šaknys	Ramybės periodo pabaiga	2022.04.11	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UŠ2	Šaknys	Ramybės periodo pabaiga	2022.04.25	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UŠ3	Šaknys	Ramybės periodo pabaiga	2022.05.09	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL4	Lapai	Ramybės periodo pabaiga	2022.04.25	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL5	Lapai	Ramybės periodo pabaiga	2022.05.23	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL6	Lapai	Masinis atžėlimas	2022.06.06	Etanolinis 50 proc. (v/v)

3.3.3.1 lentelės tęsinys

Ekstrakto kodas	Augalo žaliavos dalis	Fenologinis tarpsnis	Rinkimo data	Ekstrakto rūšis
UŽ7	Žiedynai	Masinis žydėjimas	2021.07.30	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL8	Lapai	Sėklų branda	2021.09.12	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UŽ9	Žiedynai	Sėklų branda	2021.09.12	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL10	Lapai	Ramybės periodo pabaiga	2022.04.25	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL11	Lapai	Ramybės periodo pabaiga	2022.05.23	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL12	Lapai	Masinis atžėlimas	2022.06.06	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL13	Lapai	Ramybės periodo pabaiga	2022.04.25	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UL13*	Lapai	Ramybės periodo pabaiga	2022.04.25	Etanolinis 50 proc. (v/v)
UF	Žiedynai	Sėklų branda	2021.09.12	Sausasis
UR	Šaknys	Ramybės periodo pabaiga	2022.04.11	Sausasis

Duomenys apie naudotas bakterijų kultūras ir ekstraktų poveikį pateikti 3.3.3.2 ir 3.3.3.3 lentelėse. Etanoliniai ekstraktai, kurie buvo pilami po 1 ml į 5 ml agarą terpę su išaugintomis ir paruoštomis kultūromis buvo labiausiai aktyvūs prieš *C. albicans* (lapų ekstraktai UL11, UL12, kurių MSK 8,35 mg/ml), gramneigiamą *P. vulgaris* (UL11, UL12 lapų ekstraktai, kurių MSK 8,35 mg/ml) ir gramteigiamą *S. epidermidis* (lapų ekstraktai UL12, UL13), kurių MSK 8,35 mg/ml) ląstelių kultūras. Etanoliniai ekstraktai turėjo labai silpną poveikį gramteigiamai *S. aureus* (lapų ekstraktas UL13, kurio MSK 8,35 mg/ml) ir gramneigiamai *P. aeruginosa* (UL10 lapų ekstraktas, kurio MSK 16,7 mg/ml) ląstelių linijoms. Etanoliniai dygiosios usnies ekstraktai visiškai neveikė gramteigiamą *E. faecalis* ir *B. cereus* bei gramneigiamą *E. coli* ir *K. pneumonia* ląstelių kultūrų. Mažesnėmis nei 1 ml/5 ml ekstrakto agare koncentracijomis ekstraktai visiškai neveikė jokių bakterinių ląstelių kultūrų (3.3.3.2 lentelė).

Antimikrobinis usnies žaliavos ekstraktų poveikis gali būti sietinas su vyrausia chlorogeno rūgštimi tirčiuose ekstraktuose. Kabir ir kiti autoriai, nurodo, kad chlorogeno rūgštis pasižymi antimikrobinio poveikio prieš *E. coli* ląstelių kultūrą [189]. Autoriai tyrė *Cirsium* genties augalų žiedynų bei lapų ekstraktus – *C. palustre*, *C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. rivulare* ir *C. vulgare* nurodė, jog tirti ekstraktai pasižymi antimikrobinio aktyvumu, kurio MSK vertė yra 10 mg/ml, ir šį poveikį lemia chlorogeno rūgšties kiekis ekstraktuose [56, 57, 190]. Tyrimuose aprašomas iš *C. arvense* nesmulkintos žolės išgautas flavonoidas apigenin-7-O-gliukozidas, kuris kartu su kitais flavonoidais sąlygojo antimikrobinį poveikį prieš įvairias tirtas gramteigiamas ląstelių kultūras [191].

3.3.3.2 lentelė. Antimikrobinis *C. vulgare* etanolinių ekstraktų poveikis *Muellerio–Hintono* agare (5 ml) etaloninėms mikroorganizmų kultūroms (MSK reikšmės mg/ml)

Etaloninės mikroorganizmų kultūros	UŠ1 1,0	UŠ2 1,0	UŠ3 1,0	UL4 1,0	UL5 1,0	UL6 1,0	UŽ7 1,0	UL8 1,0	UŽ9 1,0	UL10 1,0	UL11 1,0	UL12 1,0	UL13 1,0	UL13* 0,5	Etanolis 1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8,35	NA	NA
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16,7	NA	8,35	8,35	NA	NA
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16,7	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	16,7	NA	NA	16,7	NA	NA	NA	NA	NA	16,7	8,35	8,35	NA	NA	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	16,7	NA	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	8,35	8,35	NA	NA	NA

NA – neslopina mikroorganizmų etaloninės kultūros augimo (nėra antimikrobinio poveikio).

Ekstraktų pavadinimų reikšmės: UŠ1 – šaknys, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.04.11), UŠ2 – šaknys, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.05.09), UŠ3 – šaknys, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.05.23), UŠ4 – lapai, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.04.25), UŠ5 – šaknys, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.05.23), UŠ6 – lapai, masinio atžėlimo fenologinis tarpsnis (22.04.25), UŠ7 – žiedynai, masinio žydėjimo fenologinis tarpsnis (21.07.30), UŠ8 – lapai, sėklų brandos fenologinis tarpsnis (21.09.12), UŠ9 – žiedynai, sėklų brandos fenologinis tarpsnis (21.09.12), UŠ10 – lapai, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.04.25), UŠ11 – lapai, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.05.23), UŠ12 – lapai, masinio atžėlimo tarpsnis (22.05.23), UŠ13 – lapai, masinio atžėlimo tarpsnis (22.05.23) (2 g sausos žaliavos + 10 ml etanolio (50 proc. (v/v))); UŠ13* – lapai, ramybės periodo pabaigos fenologinis tarpsnis (22.05.23) (2 g sausos žaliavos + 10 ml etanolio (50 proc. (v/v))).

Priešingai nei *C. vulgare* etanoliniai ekstraktai, sausieji ekstraktai turėjo aktyvesnį antimikrobinį poveikį prieš tiriamas etalonines bakterinių ląstelių kultūras. Sausas ekstraktas UF parodė veiksmingumą prieš gramteigiamas ląstelių linijas, įskaitant *S. aureus* (MSK 3 mg/ml), *S. epidermidis* (MSK 3 mg/ml), *B. cereus* (MSK 3 mg/ml) ir *P. vulgaris* (MSK 5,567 mg/ml), kai naudotų ekstraktų koncentracija agare variavo nuo 1 ml/5 ml iki 0,5 ml/5 ml. Naudojant ekstrakto agare koncentracijas 0,5 ml/5 ml ir mažesnes, poveikio prieš *P. vulgaris* nustatyta nebuvo. Ekstraktas UR, pagamintas iš usnies šaknų, buvo aktyvus prieš tas pačias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* ir *P. vulgaris* etalonines bakterijų kultūrų linijas. Nustatyta, kad stipriau nei usnies žiedynų UF ekstraktas (MSK 3 mg/ml), usnies šaknų UR ekstraktas, kur pirminis augalo šaknų ekstraktas buvo skiestas 13,5 k., pasižymėjo didesniu aktyvumas prieš gramteigiamą *S. epidermidis* (MSK 2,47 mg/ml) (3.3.3.3 lentelė). Kenny ir kiti atliktame tyrime nustatė, kad *C. vulgare* vandens ir etanolio pagrindu pagaminti ekstraktai neturėjo antimikrobinio poveikio prieš *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* ir *S. typhi* ląstelių kultūras, tuo tarpu mūsų tirti sausieji žiedynų ir šaknų ekstraktai, turėjo poveikį *S. aureus* ir *B. cereus* ląstelių kultūroms [192]. Šio tyrimo išvados sutampa su Borawska ir kiti tyrimu, kurie tyrė *C. vulgare* ir kitų *Cirsium* genties augalų ekstraktus nurodė, kad žiedynų ir lapų sausieji ekstraktai, turi stiprų antibakterinį poveikį prieš *P. aeruginosa* ir *S. aureus* ląstelių kultūras [193]. Kurč ir kiti, tyrime nustatė, kad birželio mėnesį surinkti *C. vulgare* viso augalo dalių (šaknies, stiebo, lapų ir žiedynų) metanolio, etilacetato, dietilo eterio ir heksano ekstraktai turėjo antibakterinį poveikį prieš *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium* ląstelių linijas. Taip pat, buvo nustatytas priešgrybelinis aktyvumas prieš *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *P. chrysogenum* ir *A. fumigatus* [13]. Stipriausias antibakterinis aktyvumas nustatytas su dygiosios usnies etilacetato ir dietilo eterio ekstraktais. Stipriausias priešgrybelinis aktyvumas nustatytas heksano ekstraktuose. Įrodyta, kad *C. vulgare* metanolinis ekstraktas pasižymi antimikrobinio poveikiu prieš *S. aureus*, *P. aeruginosa* ir *C. albicans* [13].

3.3.3.3 lentelė. Antimikrobinis *C. vulgare* sausųjų ekstraktų poveikis Miulero–Hintono agarė (5 ml) etaloninėms mikroorganizmų kultūroms (MSK reikšmės mg/ml)

Etaloninės mikroorganizmų kultūros	UF 1,0	UF 0,5	UF 0,4	UF 0,3	UF 0,2	UF 0,1	UR 1,0	UR 0,5	UR 0,4	UR 0,3	UR 0,2	UR 0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5,567	3	NA	NA	NA	NA	5,567	3	NA	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	5,567	3	NA	NA	NA	NA	5,567	3	2,47	NA	NA	NA
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	5,567	3	NA	NA	NA	NA	5,567	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	5,567	NA	NA	NA	NA	NA	5,567	3	NA	NA	NA	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA – neslopina mikroorganizmų etaloninės kultūros augimo (nėra antimikrobinio poveikio).

Ekstraktų pavadinimų reikšmės: UF – *C. vulgare* žiedynai, sėklų brandos fenologinis tarpsnis (pirmi metai 2021.09.12), UR – *C. vulgare* šaknys, fenologinis ramybės periodo pabaigos tarpsnis (antri metai 2022.04.11).

Atliktas palyginamasis tyrimas su žinomo poveikio antimikrobiniais vaistais (ampicilinu, gentamicinu, tetraciklinu ir ciprofloksacinu), jų poveikiu etanolinėms mikroorganizmų kultūroms ir jų MSK reikšmėmis, palyginant jas su MSK koncentracijomis, dygiosios usnies ekstraktų, prieš tas pačias etalonines ląstelių kultūras (3.3.3.4 lentelė). *Cirsium* augalo antibakterinis aktyvumas priskiriamas jo sudėtyje esančioms fenolio rūgštims. Fenoliniai hidroksilai gali dalyvauti metalų kompleksinėse reakcijose bakterijose, sutrikdydami jų maistinių medžiagų įsisavinimą ir sukeldami antibiotinį aktyvumą. Fenolio rūgštys pasižymi priešgrybelinėmis savybėmis, nes slopina ergosterolio sintezę, kvėpavimo procesus, sukcinato dehidrogenazės (SDH) ir NADH oksidazės aktyvumą [194].

3.3.3.4 lentelė. *C. vulgare* etanolinių ir sausųjų ekstraktų bei antibiotikų antimikrobinis aktyvumas (MSK reikšmės išreikštos mg/ml); $n = 3$.

Ekstrakto kodas/ Antibiotikas	Mikroorganizmų kultūros		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
UL10*	NA	16,7	16,7
UL12*	NA	8,35	NA
UL13*	8,35	8,35	NA
UF1,0	5,57	5,57	NA
UF0,5	3	5,57	NA
UR1,0	5,57	5,57	NA
UR0,5	3	3	NA
UR0,4	NA	2,47	NA
Ampicilinas	$\geq 0,0005$	$\geq 0,0005$	NA
Gentamicinas	$\geq 0,002$	$\geq 0,002$	$\geq 0,002$
Tetraciklinas	$\geq 0,004$	$\geq 0,004$	$\geq 0,002$
Ciprofloksacinas	$\geq 0,002$	$\geq 0,002$	$\geq 0,004$

NA – neslopina mikroorganizmų etaloninės kultūros augimo (nėra antimikrobinio poveikio).

Antibiotikai – ampicilinas, gentamicinas, tetraciklinas ir ciprofloksacinas turėjo stipresnį antimikrobinį poveikį pagal gautas MSK reikšmes lyginant jas su naudotų ekstraktų MSK, tačiau ieškant naujų natūralių antimikrobinų medžiagų tolimesniuose tyrimuose turėtų būti siekiama sukonzentruoti dygiosios usnies ekstraktus ir pakartotinai įvertinti jų potencialų antimikrobinį poveikį.

IŠVADOS

1. Išvystyti ESC ir DC–MS metodai, skirti fenolinių junginių ir aminorūgščių analizei *C. vulgare* lapų, žiedynų ir šaknų žaliavose, pasižymi aukštu tikslumu, tvirtumu ir jautrumu. ESC metodas nurodo patikimą tiesiškumą ($R^2 > 0,999$), žemas aptikimo ir nustatymo ribas bei didelį pakartojamumą. DC–MS metodas taip pat patvirtinamas kaip tikslus ir jautrus, su žemomis aptikimo ribomis ir aukštu atkuriamumo tikslumu (98,4–101,3 proc.). Abu metodai atitinka ICH Q2(R2) validacijos reikalavimus ir yra tinkami kokybiniam bei kiekybiniam fenolinių junginių ir aminorūgščių nustatymui.
2. Suminis fenolinių junginių kiekis dygiųjų usnių žaliavose pirmų (2021 m.) ir antrų (2022 m.) rinkimo metų ėminiuose variavo nuo 71,87 iki 324,16 mg/g ir nuo 99,36 iki 326,57 mg/g, atitinkamai. Taikant ESC metodą identifikuota ir kiekybiškai įvertinta 11 fenolinių junginių, iš kurių chlorogeno rūgštis (44,90 proc.) ir apigenin-7-*O*-gliukozidas (41,48 proc.), sudarė didžiausią dalį suminio identifikuotų junginių kiekio. Didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis ($146,28 \pm 0,13$ mg/g ir $140,15 \pm 0,14$ mg/g) nustatytas 2021 metų rinkimo lapuose, surinktuose ramybės periodo pabaigoje (05.23) ir masinio atžėlimo tarpsniu (06.06) ($p < 0,05$). Didžiausias apigenin-7-*O*-gliukozido kiekis ($147,96 \pm 0,34$ mg/g) nustatytas 2022 metų rinkimo lapuose masinio žydėjimo tarpsnyje (08.01).
3. Lapuose nustatyta – 15, žiedynuose – 14, o šaknyse – 13 laisvųjų aminorūgščių. Didžiausias aminorūgščių kiekis $23,91 \pm 0,31$ mg/g, nustatytas 2022 metų rinkimo *C. vulgare* lapuose, surinktuose masinio atžėlimo laikotarpiu (06.20) ($p < 0,05$). Pagrindinės, šiame fenologiniame tarpsnyje, lapų ėminiuose, nustatytos aminorūgštys – L-glutamo rūgštis ($3,78 \pm 0,06$ mg/g), L-lizinas ($2,89 \pm 0,04$ mg/g) ir L-asparto rūgštis ($2,68 \pm 0,04$ mg/g), kurios sudarė 39,11 proc. suminio aminorūgščių kiekio.
4. Nustatyta, kad ekstraktai pasižymi antioksidaciniu, priešvėžiniu ir antimikrobiniu poveikiu.
 - 4.1. Stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo 2021 metų rinkimo *C. vulgare* lapų ekstraktai ($12938 \mu\text{mol TE/g}$), kurie buvo surinkti ramybės periodo pabaigoje (2021 m.).
 - 4.2. Priešvėžiniuose tyrimuose naudotas žiedynų ekstraktas, pagamintas iš 2021 metų žiedynų žaliavos, surinktos sėklų brandos tarpsnyje, reikšmingiausiai slopino žmogaus skrandžio karcinomos ląstelių linijos (EC₅₀ $0,19 \pm 0,05$ mg/ml) ir storosios žarnos adenokarcinomos (EC₅₀ $0,35 \pm 0,08$ mg/ml) ląstelių linijos gyvybingumą. Šaknų

ekstraktas, pagamintas iš 2022 metų šaknų žaliavos, surinktos masinio atžėlimo metu, buvo efektyviausias stabdant storosios žarnos adenokarcinomos ląstelių linijos proliferaciją (EC_{50} $0,29 \pm 0,06$ mg/ml). „Žaizdos gijimo“ testu nustatyta, kad šaknų ekstraktas pagamintas iš 2022 metų rinkimo šaknų, surinktų ramybės periodo pabaigoje, stipriausiai slopino storosios žarnos adenokarcinomos ląstelių linijos migraciją ($p < 0,05$). Palyginus su kontrolinės grupės rezultatais, „žaizdos“ dydis išliko labiau matomas veiktose grupėse net po 36 val., esant 0,2 mg/ml koncentracijai. 2021 metų rinkimo usnies žiedynų ekstraktas ir 2022 metų rinkimo šaknų ekstraktas, sumažino sferoidų gyvybingumą iki 77,9 proc. ir 81,5 proc., atitinkamai.

- 4.3. Sausieji augalo žiedynų (UF) ir augalo šaknų (UR) ekstraktai stipriau slopino gramteigiamų bakterijų augimą nei etanoliniai ekstraktai, ypač *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* (MSK 3 mg/ml) ir *P. vulgaris* (MSK 5,567 mg/ml) kultūras.

SUMMARY

INTRODUCTION

The compounds of natural origin are a promising source of bioactive components, as they often have lower toxicity and can act synergistically, enhancing the therapeutic effect [1]. Particular attention is paid to plant extracts, which contain biologically active compounds that may have antimicrobial, antioxidant, and anticancer effects [2, 3]. The selection of antimicrobial and anticancer compounds and the study of their biological effects are among the priority study directions of modern medicine and pharmacology. With the increasing resistance to antibiotics and number in cancer cases, new, effective, and safe therapeutic alternatives are being sought all over the world [4, 5]. One important direction in this field is the targeted investigation of underutilized plant materials. Such research not only contributes to the scientific understanding of phytochemicals but also offers practical potential for discovering new natural sources of bioactive compounds applicable in food, pharmaceutical and cosmetic industries. Many of these plants remain insufficiently studied in terms of their phytochemical composition and biological activity, leaving their full potential untapped. Plants capable of thriving under extreme or unfavorable environmental conditions are especially noteworthy, as they often develop advanced biochemical defense mechanisms. These mechanisms lead to the accumulation of higher levels of secondary metabolites, including antioxidants and phenolic compounds, which may enhance their biological activity and therapeutic potential. Such compounds may exhibit anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, or other beneficial pharmacological effects. One of the promising plants with therapeutic potential is bull thistle, *Cirsium vulgare* (Savi) Ten., (*C. vulgare*). It is an herbaceous plant from the *Asteraceae* family. *C. vulgare* is widespread in Europe, Asia, North Africa, and North America. In Lithuania, bull thistle is commonly called thistle and is considered a weed plant. The studies of the phytochemical composition of weed plant raw materials and their effects are important research direction for evaluating the possibilities of use of these raw materials in wellness-promoting areas [6]. Studies on the phytochemical composition of these plant raw materials and their effects are an important research direction that allows assessing the potential use of these plant raw materials in health-promoting areas [7]. Biologically active compounds (phenolic acids, flavonoids, amino acids) identified in bull thistle extracts are characterized by diverse biological activity [6–9]. Phenolic compounds, such as chlorogenic acid, apigenin, and other flavonoids, have a

strong antioxidant effect – they protect cells from oxidative stress, which is associated with developing chronic diseases and cancer [10]. Amino acids, such as L-glutamic acid and L-aspartic acid, are essential for the human body as they participate in metabolic processes. These amino acids are critical for cell growth and proliferation, nucleotide synthesis and gluconeogenesis, and nervous system development [7, 11, 12]. The literature sources present the investigation results on thistle extracts' anti-inflammatory, antiseptic, hepato-protective and diuretic effects [7, 12–15]. In folk medicine, bull thistle extracts are used to treat symptoms of rheumatic inflammation and the plant's decoctions – to reduce pain [6, 8]. Considering the diversity of biologically active compounds in bull thistle extracts and their pharmacological potential, this plant remains a valuable source of natural bioactive substances. To identify new possibilities for the application of *C. vulgare* plant raw materials in medicine and wellness, it is necessary to thoroughly analyze the factors determining changes in the composition and concentration of biologically active compounds of this plant. It is also important to apply methodologies that accurately evaluate the phytochemical composition of the plant raw material and products to determine the biologically active compounds' qualitative and quantitative composition of the *C. vulgare* plant raw materials. Modern validated methods allow to evaluate phytochemical composition at different plant phenological stages and determine when the most significant concentration/accumulation of biologically active compounds occurs. By analyzing different plant parts (inflorescences, leaves, roots), it is possible to determine the regularities and patterns of the compounds' accumulation in vegetative organs. Studying the phytochemical composition of the raw materials of bull thistle plant extracts in more detail way, is important to identify biologically active compounds, that may have a significant effect on human body cells. The conducted study provides new scientific knowledge and helps understand the biological effects of compounds identified in bull thistle plant raw materials better.

Study aim. To study the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and amino acids found in bull thistle (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.) growing in Lithuania and evaluate the extracts' biological effects on cell cultures *in vitro*.

Study objectives:

1. To develop and validate the high-performance liquid chromatography (HPLC) methodology to determine the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methodology to determine the qualitative and quantitative composition of amino acids in bull thistle samples.
2. To study the variation of phenolic compounds' qualitative and quantitative composition in the bull thistle plant raw materials (leaves, inflorescences, roots) at different plant phenological stages.
3. To study the variation of amino acids' qualitative and quantitative composition in the bull thistle plant raw materials (leaves, inflorescences, roots) at different phenological stages.
4. To evaluate the antioxidant, anticancer, and antimicrobial effects of bull thistle extracts in *in vitro* model systems.

Novelty. This study focuses on the underutilized plant material of *Cirsium vulgare*, which serves as a source of biologically active compounds. Research related to *C. vulgare* raw material remains scientifically underexplored. The literature lacks comprehensive evaluations of its vegetative development stages, amino acid content, and nutritional potential. Existing studies on this plant material are fragmented and limited in scope. For the first time, this research presents a complex analysis of secondary metabolites in *C. vulgare* and their biological activity. Few studies have investigated the phytochemical composition of *C. vulgare*; therefore, it is relevant to study the phytochemical composition of this plant further and supplement the existing scientific data. By applying heating with a reflux condenser extraction using 50% (v/v) ethanol, the efficiency of phenolic compound extraction increased 1.7 times compared to the extractions performed under other conditions. The extraction performed this way ensured reliable and efficient extraction of phenolic compounds from bull thistle raw materials. For the analysis of the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and amino acids, the HPLC-PDA and GC-MS with derivatization methodologies were applied and validated, respectively. First studies of 11 phenolic compounds identified in bull thistle (*C. vulgare*) raw materials, with apigenin-7-*O*-glucoside and chlorogenic acid being the predominant compounds were conducted. The studies determined the presence of 15, 14, and 13 amino acids in the plant leaves, inflorescences and roots extracts, respectively, with the essential L-aspartic and L-glutamic acids dominating in quantity. The analysis of the changes in qualitative and quantitative composition of phenolic compounds

and amino acids from the end of the dormancy period to the seed maturation stage allows determining when a peak concentration/accumulation of compounds occurs and evaluating their potential use. The studies of biological activity and evaluation of the antioxidant, antimicrobial, and anticancer effects of different bull thistle (*C. vulgare*) extracts (leaves, inflorescences, roots) were performed for the first time. It was found that bull thistle extracts exhibit significant biological activity, confirming their potential for further investigation. More detailed pharmacological and clinical studies are needed to understand better the activity mechanisms of biologically active compounds identified in *C. vulgare* extracts and their potential application in the wellness area.

Practical and theoretical significance. The scientific studies conducted provided new knowledge on the chemical composition of bull thistle (*C. vulgare*) plant raw materials and the biological activity of their extracts. The studies applied and validated the methodologies corresponding to modern scientific progress to identify in detail phenolic compounds and amino acids in the *C. vulgare* plant raw material. Analyzing changes in the phenolic compound and amino acid composition of bull thistle raw materials (leaves, inflorescences, roots) collected at different phenological stages is crucial for understanding the biosynthesis regularities/patterns of secondary metabolites during plant development. The validated methodologies can be applied to evaluate the quality of bull thistle plants raw materials and perform the standardization studies of the qualitative and quantitative composition of *C. vulgare* extracts. The phenolic compounds and amino acids identified in bull thistle raw materials (leaves, inflorescences, roots) are biologically active components. The identified phenolic compounds and amino acids in *C. vulgare* plant parts (leaves, inflorescences, roots) are biologically active constituents. A broad spectrum of amino acids detected in *C. vulgare* extracts highlights their potential application in natural dietary supplements intended to replenish amino acids in the human body. The determination of essential amino acids, such as L-aspartic and L-glutamic acids, contributes valuable knowledge regarding the nutritional value of *C. vulgare* raw materials. Quantitative analysis revealed that the content of L-glutamic and L-aspartic acids in the plant leaves raw materials ranged from 3.78 to 2.68 mg/g – approximately twice as high as in the leaves raw materials of other studied plants from the *Asteraceae* family, where these amino acids ranged between 1.10–1.33 mg/g [16]. Identifying the essential amino acids, such as L-aspartic and L-glutamic acids, provides new knowledge about the nutritional value of the *C. vulgare* plant raw materials and encourages further studies to substantiate their use in producing wellness products. The results of the antimicrobial

activity study of dry extracts prepared from the plant's inflorescences and roots with the *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* and *Proteus vulgaris* bacterial cultures, showed that these extracts may be potentially effective due to their antimicrobial effect. The extracts prepared from the bull thistle inflorescences used in anticancer studies significantly inhibited the viability of human gastric carcinoma (KATO III) and human colon adenocarcinoma (HT-29) cell lines. The "wound healing" study found that the roots extracts had the most substantial inhibitory effect on the HT-29 cell migration. The inflorescence extract reduced the viability of spheroids to 77.9% and the roots extracts – to 81.5%. The antioxidant activity of *C. vulgare* extracts is essential for evaluating their potential use in products intended to control oxidative stress and related conditions. The bull thistle extracts reduced the growth of microorganisms, including gram-positive and gram-negative bacteria and yeasts, which provides new scientific data on their potential use as natural preservatives. The study findings on the anticancer effect of bull thistle extracts are significant in searching for new, natural, supplement, or alternative anticancer therapy options. The obtained data on the antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of *C. vulgare* extracts, encourage further studies to determine the individual effect of biologically active compounds and their synergistic interactions.

OBJECT OF THE STUDY AND METHODS

Object of the study. Samples of the *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. for the researches were cultivated and collected at the Botanical Garden of Vilnius University Šiauliai Academy (55°55'57" N latitude, 23°16'59" E longitude (WGS)). The research focused on the leaves, inflorescences, and roots of *C. vulgare*, collected during the phenological periods from the end of dormancy to seed maturity in the years of 2020–2022. The dates of raw material collection are given in Table 2.1.1. The separated leaves, inflorescences, and roots of the bull thistle were dried in a drying chamber at 40 °C. After drying, the plant parts were grounded using a mill, and the resulting material was sieved through a 0.5 mm trapezoidal sieve. Each sample was taken from three different plants and corresponding plant parts (inflorescences, leaves, or roots), with all experiments repeated three times ($n = 3$).

Materials and reagents. For the preparation of extracts, 96% ethanol (Vilniaus degtinė, Vilnius, Lithuania) was used. Deionized water for extracts preparation was obtained using the "Super Purity Water System" (Millipore, USA). The study employed HPLC-PDA and analytical grade reagents, including trifluoroacetic acid and acetonitrile (Sigma Aldrich, Steinheim,

Germany). Standard reference compounds used in the study included chlorogenic acid, apigenin-7-*O*-glucoside, apigenin, luteolin, hyperoside, neochlorogenic acid, isoquercitrin, *p*-coumaric acid, caffeic acid, rutin, *trans*-ferulic acid, and 4-*O*-caffeoylquinic acid (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). For the antioxidant study, copper (II) chloride dihydrate was purchased from Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany), and neocuproine from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). An ammonium acetate buffer system at pH 7 was used from Sigma-Aldrich (Hoeilaart, Belgium). The reference standard Trolox (98%) was obtained from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). Human colon adenocarcinoma cell line HT-29 and human gastric carcinoma cell line KATO III were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Human skin fibroblasts (HF) were obtained from ATCC and provided by Prof. Helder Santos (University of Helsinki, Finland). All cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's GlutaMAX medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10,000 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin (Gibco), and 10% fetal bovine serum (Gibco). Mueller-Hinton agar was obtained from BBL (Baltimore, MD, USA). Microbial strains used for antimicrobial testing included *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 8035, *Proteus vulgaris* ATCC 8427 and *Candida albicans* ATCC 10231, all obtained from ATCC (Manassas, VA, USA).

Ultrasound-assisted extraction. A 0.1 ± 0.001 g portion of dried and ground *C. vulgare* leaves was placed in 10 mL volumetric flasks and mixed with 10 mL of 50% (v/v) ethanol. The extraction was performed using an ultrasonic bath (frequency 38 kHz) (Grant Instruments TM XUB12 Digital, Cambridge, UK) for 10, 15, 30, 45, or 60 minutes. The obtained extracts were filtered through 0.22 μ m PTFE hydrophobic filters into glass vials. Experiments were repeated three times ($n = 3$).

Maceration. A 0.1 ± 0.001 g portion of dried and ground *C. vulgare* leaves was placed in 50 mL flat-bottomed flasks and mixed with 10 mL of 50% (v/v) ethanol. The flasks were tightly sealed and kept in a dark cabinet with periodic stirring. The extraction process lasted 6, 12, 24, or 48 hours. The extracts were filtered through 0.22 μ m PTFE hydrophobic filters into glass vials. Experiments were repeated three times ($n = 3$).

Reflux heating extraction. A 0.1 ± 0.001 g portion of dried and ground *C. vulgare* leaves, roots, or inflorescences (from three different plants) was placed in 100 mL round-bottom flasks and mixed with 10 mL of 50% (v/v)

ethanol. The flasks were immersed in a glycerol bath and connected to a reflux condenser. The extraction was performed at 90 °C for 30 minutes, 1 hour, 1.5 hours, 2 hours, or 3 hours. The obtained extracts were filtered through 0.22 µm PTFE hydrophobic filters into glass vials. Experiments were repeated three times (n = 3).

Production of dry extracts. A 0.5 ± 0.001 g portion of dried and ground *C. vulgare* leaves was placed in a 250 mL round-bottom flask and mixed with 50 mL of 50% (v/v) ethanol. The flask was immersed in a glycerol bath and connected to a reflux condenser. The extraction was performed at 90 °C for 1.5 hours. The extract was filtered through a 0.22 µm PTFE hydrophobic filter into a glass vial. Ethanol was removed under vacuum, and the remaining solutions were placed in a drying oven at 40 °C until completely dry. The dry extracts were used to evaluate the antimicrobial and anticancer properties of the bull thistle. Experiments were repeated three times (n = 3).

Validation of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Methods. For the quantitative determination of phenolic compounds and amino acids in the extracts of the bull thistle (*Cirsium vulgare*), the methods of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) were validated according to ICH Q2(R2) guidelines [157]. The following validation parameters were assessed to determine the suitability of the methods: linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), limits of detection and quantification, specificity, concentration range, and robustness. Linearity was assessed by constructing calibration curves and calculating their regression equations and correlation coefficients. The limits of detection and quantification were determined based on the signal-to-noise ratio. Precision was evaluated by performing repeat measurements within a short period of time and on different days, calculating the relative standard deviation (RSD) values. Accuracy was assessed by performing recovery studies, where a known amount of standard compounds was added to the sample matrix. Specificity was confirmed by comparing the peaks identified in the extracts with the corresponding signals of pure standard compounds, ensuring that no interfering or overlapping substances were present during the analysis. The concentration range covered the interval of the analytes' concentrations, and the robustness of the method was evaluated by performing the analysis under consistent experimental conditions, monitoring the stability of the results.

Determination of phenolic compound composition and content in bull thistle ethanolic extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC). The qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds was performed using a Waters Alliance 2695 liquid chromatograph with a Waters 996 diode array detector (PDA) and an ACE C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size) (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland). The mobile phase consisted of solvents A (0.1% trifluoroacetic acid) and B (acetonitrile), using a gradient elution. The eluent flow rate was 1 mL/min, injection volume 10 µL, and column temperature 25 °C. Absorption was measured in the wavelength range of 230–400 nm. Phenolic compounds were identified using standard solutions based on retention times and absorption spectra. Experiments were repeated three times (n = 3). The total phenolic content was calculated based on quantitative results obtained from calibration curves of the respective compounds.

Determination of amino acid composition and content in bull thistle ethanolic extracts using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analysis was performed using the SHIMADZU GC/MS-QP2010nc Ultra chromatographic system (with an electron ionization (EI) ion source and a single quadrupole, Shimadzu Technologies, Kyoto, Japan). The injector temperature was maintained at 250 °C. The analytes were separated using an Rxi-5 ms capillary column (5% diphenyl and 95% polydimethylsiloxane) with a length of 30 m, an outer diameter of 0.25 mm, and a stationary phase thickness of 0.25 µm (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA). The carrier gas was analytical-grade helium (99.999%), with a flow rate of 1.49 mL/min. The thermostat was programmed with a gradual column temperature increase: 75 °C for 5 min, then increased to 290 °C at 10 °C/min, and further increased to 320 °C at 20 °C/min, maintained for 10 min. The total analysis duration was 41 min. The mass spectrometer interface and ion source temperatures were set at 280 °C and 200 °C, respectively. The results were recorded using the total ion current (TIC) and selected ion monitoring (SIM) modes, with a scan range between 35–500 m/z. Mass spectrometry operated in positive mode with an electron energy of 70 eV. The injection volume was 1 µL, and a split ratio of 1:20 was applied. Experiments were repeated three times (n = 3). Data acquisition and analysis were performed using LabSolution GC/MS (version 5.71) software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Experiments were repeated three times.

Determination of antioxidant activity *in vitro*. The antioxidant activity of the sample was determined by a spectrophotometric method using the CUPRAC reagent. The antioxidant effect of the tested compounds was determined using a spectrophotometer (HALO DB 20) and the CUPRAC reagent.

The CUPRAC reagent composition included 0.1 M aqueous copper (II) chloride solution, 0.1 M ammonium acetate buffer solution (pH = 7), and 0.0075 M methanolic neocuproine ($(\text{CH}_3)_2\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2$) solution, in a 1:1:1 ratio. The prepared reagent was stored in the dark at room temperature for one hour. Procedure: 10 μL of the sample (extract) was mixed with 3 mL of the CUPRAC reagent. After 30 minutes of incubation at room temperature, absorption was recorded at a wavelength of 450 nm. Experiments were repeated three times ($n = 3$). Antioxidant activity was expressed as Trolox equivalent, creating a Trolox calibration curve: $y = 0.00004x + 0.0215$; $R^2 = 0.9991$.

Determination of anticancer activity *in vitro*. Cell culture growth: human colon adenocarcinoma (HT-29), human gastric carcinoma (KATO III), and human skin fibroblast (HF) cell lines were cultured at 37 °C, with 95% relative humidity and 5% CO_2 .

Cell viability assay: the effect of dried extracts on cell viability was assessed using the MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Co., MO, USA). This method was described and adapted by Braciuliene A et al. [158]. Cells were seeded in 96-well plates at densities of 4×10^3 KATO III and HT-29 cells and 5×10^3 HF cells per well. After 24 hours of incubation, cells were treated with serial dilutions of dried extracts (2.5–0.016 mg/mL) or chlorogenic acid (500–15.6 μmol). After 72 hours, 20 μL of 5 mg/mL MTT reagent was added and incubated for 3 hours. The resulting formazan crystals were dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich Co., MO, USA). Absorbance was measured at 570 and 630 nm using a multifunctional microplate reader. Cells incubated without test substances were used as a negative control (viability set to 1.0), and wells without cells containing only the medium served as a positive control (viability set to 0). The EC_{50} values (the concentration causing a 50% reduction in metabolic activity) were calculated using the Hilo equation. Experiments were repeated three times ($n = 3$).

“Wound Healing” assay: the method was described by Dabkevičiūtė et al. [159]. Cancer cells were seeded at 6×10^4 cells/well in 24 – well plates. After 48 hours of incubation, scratches were made using a 100 μL pipette tip. The cells were carefully washed with PBS, and fresh medium containing 0.2 or 0.1 mg/mL of extracts was added. The medium without test substances served as a negative control. Experiments were repeated three times ($n = 3$).

Extract activity in 3D cell cultures (spheroids): spheroids were formed using magnetic 3D bioprinting as described by Šermukšnytė et al. [160]. Cells were first cultured in 6-well plates until reaching ~70% confluence. Then, 20 μL of Nanoshuttle nanoparticles (n3D Biosciences, Inc., Houston, Texas,

USA) was added and incubated for 8 hours. Cells were trypsinized, centrifuged, and seeded into ultra – low attachment 96 – well plates, with 1.5×10^3 cancer cells and 1.5×10^3 human fibroblasts per well. The plate was placed on a 96 – magnet holder and incubated for two days. Once spheroids formed, the medium was replaced with fresh medium containing 0.35 mg/mL of test extracts. Experiments were repeated three times ($n = 3$). Spheroid images were captured every two days using an Olympus IX73 inverted microscope (OLYMPUS CORPORATION, Tokyo, Japan). Spheroid size analysis was conducted using ImageJ (version 1.53o, National Institutes of Health, MA, USA) and Microsoft Office Excel 2024 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). On the final experiment day, 10 μ L of WST-1 reagent (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) was added to each well. After 10 hours, 50 μ L from each well was transferred to a new 96 – well plate, and absorbance was measured at 460 and 530 nm.

Determination of antimicrobial activity *in vitro*. Antimicrobial activity was determined using the agar diffusion method on Mueller-Hinton agar (Mueller-Hinton II Agar, BBL, USA). Reference non-sporulating bacterial cultures (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus vulgaris*) were incubated at 35–37 °C for 20–24 hours. The bacterial suspension was prepared in sterile physiological sodium chloride (0.9%) solution and standardized using the McFarland standard (0.5, corresponding to 1.5×10^8 CFU/ml). Spore-forming *Bacillus cereus* was cultured for 7 days, and *Candida albicans* was grown at 30 °C for 72 hours. Ethanol extracts (0.02–0.1 mg/mL) and dry extracts (0.033 mg/mL) of *C. vulgare* were tested. Experiments were repeated three times ($n = 3$). The antimicrobial activity was evaluated based on bacterial growth inhibition zones, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined.

Statistical analysis. Quantitative results were presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three replicates. Data were analyzed using Microsoft Office Excel 2024 and SPSS 25 (IBM, NY, USA). One-way ANOVA with Tukey post hoc test was applied to determine significant differences ($p < 0.05$) between inflorescences, leaves, and roots extracts of *C. vulgare*. Pearson correlation analysis was used to assess the relationship between phenolic compound content and antioxidant activity. Linear regression analysis was used to generate calibration curves, assessing the relationship between analyte concentration and signal strength, calculating the regression coefficient (R^2), and considering values as acceptable when $R^2 \geq 0.99$. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in *C. vulgare* plant raw material extracts using the HPLC method

Selecting extraction conditions. Selecting an extrahent and the extraction conditions is a significant part of developing a methodology for determining the qualitative and quantitative composition of biologically active compounds of plant's raw materials [161]. Considering an extrahent polarity influence on the extraction of phenolic compounds from bull thistle raw materials, the deionized water, and ethanol of different concentrations (50% (v/v), 60% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v) and 96% (v/v)) were chosen to study. The prepared extracts were kept in an ultrasonic bath for 15 min. The phenolic compounds in bull thistle extracts were determined using the HPLC method. The study identified five phenolic compounds: apigenin-7-*O*-glucoside, chlorogenic acid, rutin, hyperoside, and isoquercitrin. The chromatogram of the compounds is presented in Fig. 3.1.1.1. After evaluating the quantitative composition of those five compounds identified in bull thistle extracts, it was determined that the largest quantities of phenolic compounds were obtained using 50% (v/v) ethanol ($p < 0.05$) (Fig. 3.1.1.2). The bull thistle extract prepared using 50% (v/v) ethanol had the contents of chlorogenic acid and apigenin-7-*O*-glucoside 5.5 and 7.5 times higher, respectively, than the contents determined in the bull thistle extract prepared using 96% (v/v) ethanol and water. Sieliwoniuk et al. extracted the *C. vulgare* plant raw materials using 70% (v/v) methanol and 70% (v/v) ethanol. Their study results showed that higher phenolic compounds' (chlorogenic acid, luteolin-7-*O*-glycoside, and apigenin) contents were obtained when 70% (v/v) methanol was used for extraction [30]. Koryza et al. used 50% (v/v) methanol, 80% (v/v) methanol, 100% methanol, dichloromethane, acetone, and ethyl acetate to produce the *C. canum* inflorescences extracts. The highest chlorogenic acid content was determined when 50% (v/v) methanol was used for extraction ($p < 0.05$) [162]. The publication authors indicated that when studying the content of apigenin in *C. canum* inflorescences extracts prepared using 50% (v/v) methanol, 80% (v/v) methanol, 100% methanol, acetone, and ethyl acetate, no statistically significant differences in the apigenin content were found [162].

Choosing the most appropriate extraction method for determining phenolic compounds is crucial since the phenolic quantities and other active compounds depend on it. This study used three extraction methods: ultrasonic-assisted, maceration, and heating with a reflux condenser.

The samples of bull thistle leaves were kept in an ultrasonic bath at 30 °C for different time intervals (from 10 min to 60 min) to evaluate the ultrasonic extraction method's impact on the quantity of phenolic compounds. This extraction method accelerates the release and diffusion of soluble substances, features low solvent and energy consumption and does not require high temperatures [157]. In the bull thistle extracts obtained by ultrasonic extraction, the highest content of chlorogenic acid was determined after 15 min (7.31 ± 0.37 mg/g), and apigenin-7-*O*-glucoside – after 30 min (7.60 ± 0.38 mg/g) of extraction (Fig. 3.1.1.3). The determined contents of rutin, hyperoside, and isoquercitrin were 7.3–7.5 times lower and varied from 0.13 to 0.87 mg/g. The highest phenolic compound quantities were developed at the extraction duration of 30 min. Maceration is a simple extraction method. Its advantage is an extraction of temperature-sensitive compounds, the disadvantages – low efficiency and long compound extraction time [164]. The results of bull thistle raw material extraction by the maceration method are presented in Fig. 3.1.1.4. The highest contents of rutin (0.15 ± 0.03 mg/g), isoquercitrin (0.70 ± 0.07 mg/g), hyperoside (0.82 ± 0.09 mg/g) and chlorogenic acid (3.74 ± 0.13 mg/g) in the extracts were determined after 6 h of maceration. In contrast, for apigenin-7-*O*-glucoside, the maceration duration of 48 h was more effective (content 9.01 ± 0.45 mg/g). The extraction method of heating with a reflux condenser was used to increase the quantities of phenolic compounds extracted from bull thistle raw materials. The study showed that the *C. vulgare* extracts obtained using heating with a reflux condenser contained up to 1.7 times higher contents of phenolic compounds than the extracts prepared using maceration and ultrasonic-assisted extraction methods. The heating with a reflux condenser extraction was performed at a 90 °C temperature, which may have resulted in more phenolic compounds than using ultrasonic- assisted and maceration extraction methods, which used 25–30 °C temperatures. The analysis of the composition of the phenolic compounds in the extracts produced by heating with a reflux condenser extraction determined such phenolic compound content: rutin – 0.24 ± 0.01 mg/g, hyperoside – 1.33 ± 0.07 mg/g, isoquercetin – 1.26 ± 0.06 mg/g, chlorogenic acid – 13.09 ± 0.66 mg/g and apigenin-7-*O*-glucoside – 9.92 ± 0.49 mg/g) (Fig. 3.1.1.5). Summarizing the results of the optimization studies on bull thistle sample extraction, it was determined that the highest contents of phenolic compounds (apigenin-7-*O*-glucose, chlorogenic acid, rutin, hyperoside, isoquercetin) were obtained by extracting the bull thistle leaves samples with 50% (v/v) ethanol at 90 °C for 1.5 h using a reflux condenser. This method was selected to prepare the extracts for further study. Similar results were obtained in another scientific study. Jang et al. studied the *Cirsium japonicum* plant raw material extracts and found that 70% (v/v) ethanol was the optimal

solvent for the extraction of phenolic compounds, while higher temperatures (85–95 °C) and heating with a reflux condenser increased the yield of released bioactive substances [165]. These results are consistent with the conditions used in our work – the use of higher temperatures in reflux extraction for the extraction of phenolic compounds has proven to be an effective method for increasing the quantity of biologically active compounds.

Validating the HPLC methodology to determine phenolic compounds in the extracts of *C. vulgare* raw materials. This study performed the validation of the HPLC methodology to determine phenolic compounds in the extracts of *C. vulgare* plant raw materials. The validation of the methodology was performed according to the European Medicines Agency's (EMA) International Council's for Harmonization ICH Q2(R2) guidelines, evaluating the following parameters: detection limit, quantification limit, linearity including concentration limits (R^2), precision (repeatability and intermediate precision) [157]. The validation data are presented in Table 3.1.2.1. The study identified eleven compounds in the bull thistle extracts, with their respective retention times: 9.53 min – neochlorogenic acid, 11.94 min – chlorogenic acid, 12.41 min – 4-*O*-ferulic acid, 14.09 min – caffeic acid, 20.04 min – *p*-coumaric acid, 22.65 min – *trans*-ferulic acid, 23.61 min – hyperoside, 24.51 min – isoquercitrin, 34.51 min – apigenin-7-*O*-glucoside, 43.78 min – luteolin, 47.79 min – apigenin (Fig. 3.1.2.1). The study determined that the linearity limits of the detected compounds varied from 0.113 µg/mL to 176.7 µg/mL, covering all phenolic compound concentration contents determined during the study. The detection limits of all studied phenolic compounds were determined at a signal-to-noise ratio of 3:1, and the quantification limits – at a signal-to-noise ratio of 10:1 [157]. The detection limits of all analytes used in the study varied from 0.03 µg/mL to 0.345 µg/mL, and the quantification limits – from 0.078 µg/mL to 1.104 µg/mL. The determination coefficient of all analytes was more than 0.999, confirming the HPLC methodology's linearity. The robustness of the method was assessed by varying some of the analytical parameters: column temperature ± 2 °C and mobile phase ratio $\pm 2\%$ (v/v). It was found that these changes did not significantly affect the retention times, shapes or intensities of the peaks. The quantitative results for all compounds remained consistent, and the coefficient of variation did not exceed 2%, therefore the HPLC method is considered robust to changes in analytical conditions. The precision was assessed by determining repeatability and intermediate precision estimates. The coefficient of variation for all identified compounds does not exceed 1.02% [157]. The results of the HPLC methodology suitability confirmed that the selected chromatographic parameters were

suitable for the evaluation of the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in bull thistle extracts. The validated HPLC methodology was applied for further qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds, ensuring accurate and reliable results that meet the specified parameters [166].

Determining phenolic compounds' qualitative and quantitative composition in the *C. vulgare* plant extracts raw material. The concentration and accumulation patterns of phenolic compounds in larger plant parts and organs depend on the growth and life cycle of the plant [167]. It was relevant to determine the accumulation patterns of phenolic compounds in the bull thistle plant raw materials to evaluate the changes in the contents and qualitative profiles of compounds during plant development (at different phenological stages). This study evaluated the changes in the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in the *C. vulgare* plant raw materials (leaves, inflorescences and roots) collected over a two-year period (2021–2022) at the phenological stage from the dormancy end to seed maturity. The total content of phenolic compounds determined in the bull thistle plant raw materials collected in the designated years differed significantly ($p < 0.05$). In the bull thistle raw materials collected in 2021, the highest total contents of phenolic compounds were found in the *C. vulgare* samples collected at the end of their dormancy stage (05.23), during butonization (07.04) and mass flowering (08.01) ($p < 0.05$) (Fig. 3.1.3.1). According to the data of the Lithuanian Hydrometeorological Service, at the end of the dormancy period (05.23), the air temperature in Šiauliai County during the week before and on the day of sample collection ranged from 6.6 to 17.6 °C, relative humidity from 44 to 90%, and precipitation from 0.0 to 2.1 mm. During budding (07.04), environmental conditions were warmer - the air temperature reached 14.5–26.5 °C, relative humidity from 44–99%, and no precipitation was recorded. During the mass flowering period (08.01), the air temperature ranged from 13.2 to 30.7 °C, relative humidity from 32 to 76%, and precipitation from 0.0 to 5.3 mm.

The samples of bull thistle raw materials collected in 2022, at the beginning of plant flowering (07.18) and during mass flowering (08.01) stages ($p < 0.05$) accumulated the largest contents of phenolic compounds. The total phenolic compounds' content of determined at the phenological stages of the 2021 and 2022 bull thistle raw material samples varied from 71.87 mg/g to 324.16 mg/g and from 99.36 to 326.57 mg/g, respectively. When assessing the influence of weather conditions on the content of phytochemical compounds, it was found that at the beginning of flowering (07.18) the ambient temperature ranged from 10.6 to 22.2 °C, relative

humidity from 50 to 97%, and precipitation from 0.0 to 5.5 mm. During mass flowering (08.01), the air temperature ranged from 8.4 to 22.8 °C, relative humidity from 49 to 97%, and precipitation from 0.0 to 12.4 mm.

Nazaruk et al. found higher levels of phenolic compounds in the methanolic extracts of *C. vulgare* leaves and inflorescences, which were prepared from plant raw materials collected during the mass flowering phenological stage from late June to early August [168]. The total amount of phenolic compounds, as well as the concentrations of individual compounds – such as chlorogenic acid – in the raw material of the bull thistle plant, varied significantly depending on the growth phase and meteorological conditions. The highest amounts of phenolic compounds were recorded during periods of intensive biosynthetic activity of the plant – at the end of the dormant period, during flowering and mass regrowth. These data indicate that the phenological stage is an important factor that must be considered in order to optimize the time of collection of the raw material of the plant in order to obtain the maximum amounts of phenolic compounds.

Applying the validated HPLC methodology, this study identified and quantitatively evaluated eleven phenolic compounds in the extracts of *C. vulgare* plant raw materials. The most significant proportion of the identified compounds in the bull thistle raw materials were chlorogenic acid (44.90%) and apigenin-7-*O*-glucoside (41.48%). The content of other identified phenolic compounds in the *C. vulgare* raw materials constituted a small part of the total content of phenolic compounds: isoquercitrin (3.16%), hyperoside (2.32%), apigenin (1.20%), *p*-coumaric acid (1.07%), neochlorogenic acid (0.62%), 4-*O*-caffeoylquinic acid (0.46%), caffeic acid (0.32%), *trans*-ferulic acid (0.21%), luteolin (0.21%). Vegetation stages significantly influenced the quantitative composition of phenolic compounds in the leaves, inflorescences, and roots of bull thistle ($p < 0.05$) [168].

The changes in chlorogenic acid content in the bull thistle raw materials collected at different phenological stages over a two-year period are presented in Fig. 3.1.3.2. The highest chlorogenic acid contents of 146.28 ± 0.13 mg/g and 140.15 ± 0.14 mg/g were found in the raw materials of *C. vulgare* leaves collected at the end of the dormancy stage in 2021 and during mass regrowth in 2021, respectively ($p < 0.05$). In the raw materials of *C. vulgare* leaves collected during the dormancy period and mass regrowth in 2021, significantly bigger quantities of chlorogenic acid (146.28–81.08 mg/g) were determined compared to the quantities of chlorogenic acid determined in the raw materials of roots (27.47–16.68 mg/g) during the same period ($p < 0.05$). When analyzing the patterns of chlorogenic acid accumulation in the raw materials of bull thistle inflorescences, it was detected that the inflorescences collected at the phenological stage of the beginning of flowering in 2021 and

2022 (07.18) accumulated the highest amounts of chlorogenic acid, 58.02 ± 0.41 mg/g and 64.08 ± 0.23 mg/g, respectively. The highest chlorogenic acid content was found in the roots raw materials of the plant collected at the end of the phenological dormancy period 2022 on 05.09 (31.71 ± 0.11 mg/g).

The changes in the content of apigenin-7-*O*-glucoside in the bull thistle raw materials collected at different phenological stages over a two-year period are presented in Fig. 3.1.3.3. In the samples of *C. vulgare* leaves raw materials collected at different phenological stages in 2021 and 2022, the content of apigenin-7-*O*-glucoside (14.05–146.81 mg/g in 2021, 24.61–147.96 mg/g in 2022) was higher than the contents in the *C. vulgare* inflorescences (16.05–76.30 mg/g in 2021 and 0.18–147.32 mg/g in 2022) and roots (0.37–1.15 mg/g in 2021 and 0.75–4.95 mg/g in 2022). The study found that the largest apigenin-7-*O*-glucoside content of 147.96 ± 0.34 mg/g was determined in the *C. vulgare* leaves raw material samples collected in 2022 during a mass flowering phenological stage (08.01), which was not statistically significantly different from the apigenin-7-*O*-glucoside content of 146.81 ± 0.31 mg/g found in the *C. vulgare* leaves samples from the 2021 raw materials collected during the butonization phenological stage (07.04). The highest apigenin-7-*O*-glucoside content determined in the inflorescences samples collected in 2021 during the butonization phenological stage was 76.30 ± 0.31 mg/g ($p < 0.05$). The highest content of apigenin-7-*O*-glucoside in the bull thistle roots' raw material samples was found in roots collected during the mass regrowth phase in 2022 (content – 4.48 ± 0.03 mg/g). Compared to other plants of the *Asteraceae* family, the amount of apigenin-7-*O*-glucoside found in *C. vulgare* leaves is significantly higher. The amount of this flavonoid in *Achillea millefolium* flowers is about 10–15 times lower, and the concentration of apigenin-7-*O*-glucoside in *Calendula officinalis* flowers is about 5–8 times lower than the amounts found in *C. vulgare* leaves [169–171]. These data demonstrate that *C. vulgare* may be a valuable natural source of apigenin-7-*O*-glucoside, especially when the raw material is collected during the phenological stages of budding and mass flowering.

The changes in the isoquercitrin content in raw plant materials of bull thistle collected at different phenological stages in 2021 and 2022 are presented in Fig. 3.1.3.4. The raw materials of *C. vulgare* leaves collected in 2021 during the dormancy (05.09, 05.23) and mass regrowth (06.06) periods showed significantly higher amounts of isoquercitrin (16.197–14.162 mg/g) compared to the amounts of isoquercitrin found in the raw materials of roots (0.240–0.08 mg/g) during the same period ($p < 0.05$). In the raw materials of the *C. vulgare* leaves collected in 2021, there were statistically higher amounts of the phenolic compound isoquercitrin compared to the amounts of isoquercitrin found in the raw material of the plant leaves collected in 2022

($p < 0.05$). In the raw material of *C. vulgare* roots, the highest isoquercitrin content of 4.39 ± 0.04 mg/g was detected in the roots raw material samples collected during the phenological stage of mass flowering in 2021 (08.15). No isoquercitrin was detected in the raw material samples of *C. vulgare* roots collected in 2022. When comparing the amounts of isoquercitrin detected in the raw materials of inflorescences, it was found that the highest isoquercitrin amount of 2.49 ± 0.01 mg/g was determined in the raw material samples of *C. vulgare* inflorescences collected in 2022 in the phenological phase of mass flowering (08.01) ($p < 0.05$). The changes in the hyperoside amount in the raw material of bull thistle collected at different phenological stages in 2021 and 2022 are presented in Fig. 3.1.3.5. During the study, hyperoside was detected in the plant raw materials of *C. vulgare* leaves and inflorescences. In contrast, hyperoside was not found in the plant raw materials of *C. vulgare* roots. The amount of hyperoside detected in the plant raw materials of *C. vulgare* leaves collected in 2021 at different phenological periods was higher (12.37–0.80 mg/g) compared to the amount of hyperoside (5.58–1.37 mg/g) detected in the plant raw materials of *C. vulgare* leaves collected in 2022 at different phenological stages. The highest hyperoside content of 12.37 ± 0.07 mg/g was in the raw material samples of bull thistle leaves collected in the phenological stage of butonization in 2021 (07.04), which was not statistically significantly different from the content of 11.09 ± 0.09 mg/g found in the raw material samples of bull thistle leaves collected in the period of mass regrowth in 2021 (06.20). When comparing the amounts of hyperoside in the plant raw materials of inflorescences, it was found that the highest hyperoside content of 2.17 ± 0.05 mg/g was in the plant raw materials of *C. vulgare* inflorescences collected in the phenological stage of butonization (07.04) in 2021 ($p < 0.05$).

Considering the quantitative composition of phenolic compounds determined in the extracts of bull thistle plant raw material samples collected during plant phenological stages, the extracts with the highest content of phenolic compounds were selected for the further studies of biological activity. The extracts prepared from the two-year (2021–2022) samples were studied: roots collected at the end of the phenological dormancy stage (04.11, 04.25, 05.09), leaves – at the end of the phenological dormancy period (04.25), leaves – during the mass regrowth period (06.06), inflorescences – during the mass flowering stage (07.30), leaves – during the seed maturity stage (09.12), inflorescences – during the seed maturity stage (09.12), leaves – at the end of the phenological dormancy stage (04.25), leaves – at the end of the phenological dormancy period (05.23), leaves – during the mass regrowth period (06.06).

Determination of the qualitative and quantitative composition of amino acids in the *C. vulgare* plant raw material extracts using the GC–MS method

Validating the GC–MS method for determining amino acids in the extracts of *C. vulgare* plant raw materials. Determining amino acids in plants, such as *C. vulgare*, is essential in order to evaluate their nutritional value and potential as an alternative source of protein. The analysis of the phytochemical composition of bull thistle raw materials showed that the plant accumulated free amino acids. Some of them are essential amino acids; others – non-essential. Both non-essential and essential amino acids are critical in the body's metabolic processes. The essential amino acids, such as leucine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan, and valine, are necessary for protein synthesis, enzyme and hormone production, as well as for the activity of the immune system. The body does not produce these amino acids; therefore, they must be obtained from food or additional food additives. The amino acids identified in the *C. vulgare* plant raw materials support the potential use of this raw material in both human and animal nutrition, contributing to ensuring a balanced and complete diet. Developing and validating methodologies that meet modern scientific progress is crucial to accurately evaluate the amino acid composition of the *C. vulgare* raw materials under study. This study validated the GC–MS methodology with a derivatization step for determining amino acids in the *C. vulgare* plant raw material extracts. The methodology was validated according to the EMA ICH Q2(R2) guidelines, evaluating the following parameters: specificity, linearity, accuracy (repeatability and intermediate precision), detection, and determination limits. The specificity was evaluated by the retention times and mass spectra of the chromatographic peaks of the analytes, complying with the requirements of the ICH guidelines [157, 172]. The validation process using the developed methodology was performed using 16 amino acids: alanine, glycine, cysteine, valine, leucine, isoleucine, methionine, proline, serine, tyrosine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, histidine, and threonine. The analysis of accuracy showed that the repeatability and intermediate precision of the method remained stable with the variation coefficient not exceeding 1%, which ensured the reproducibility of the methodology. The linearity analysis showed that the relationship between the peak areas of the calibration curves and the concentrations was linear in the 25–200 µg/mL concentration range. The determination coefficients (R^2) were 0.986–0.999, which confirmed the method's ability to accurately determine the amounts of analytes. Each analyte's detection and determination limits differed, but all remained low, not exceeding 2.400 µg/mL.

The accuracy was assessed by reproducibility percentages, which, depending on the analyte, ranged from 98.4% to 101.3%. For example, the reproducibility of L-alanine was 99.4%, glycine was 100.0%, L-valine was 98.8%, and L-tyrosine was 100.5%. All of these results meet the accuracy criteria specified in the ICH Q2(R2) guidelines. The derivatization step was also analyzed during the robustness assessment, examining the sensitivity of the methodology to small changes in derivatization time, temperature, and reagent concentrations. The results obtained showed that these parameters did not significantly affect the analytical data, therefore the derivatization step can be considered reliable. The developed GC–MS methodology meets the validation criteria and is suitable for both qualitative and quantitative amino acid analysis, ensuring high sensitivity, accuracy, and reliability.

After analyzing the bull thistle extracts by the GC-MS method, the amino acids, detected and quantitatively evaluated in the *C. vulgare* plant raw materials, were the following: L-alanine, glycine, L-valine, L-leucine, isoleucine, L-proline, L-methionine, L-serine, L-threonine, L-phenylalanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-lysine, L-histidine and L-tyrosine (Fig. 3.2.1.1). The analysis results showed that 15 amino acids were detected in the *C. vulgare* leaves extracts, 14 amino acids – in inflorescences extracts, and 13 amino acids – in roots extracts.

Ashirova et al. studied the *Asteraceae* family plants – *Cichorium intybus* L., *Chamomilla recutita* L., and *Achillea millefolium* L. The authors identified 15 free amino acids in the plant raw materials of inflorescences: arginine, cysteine, lysine, tyrosine, histidine, phenylalanine, valine, proline, threonine, serine, alanine, and glycine [173]. Compared to other plants of the *Asteraceae* family, *Cichorium intybus*, *Chamomilla recutita* and *Achillea millefolium*, *C. vulgare* has a similar amino acid spectrum, but significant differences in their concentrations were found [174–176]. According to research, the most common amino acids found in *C. intybus* leaves extracts are arginine, cysteine, valine, alanine and glycine, and their amounts, especially in leaves and roots raw materials, are higher than in *C. vulgare* raw materials [176]. Meanwhile, *A. millefolium* and *C. recutita* also have a diverse amino acid profile, but their distribution in different parts of the plant (inflorescences, leaves or roots) is variable and usually lower than in *C. vulgare* raw materials [174, 175]. Considering the overall biochemical composition and phytochemical potential of the plant, *C. vulgare* can be considered a promising alternative protein source suitable for use in functional nutrition or in the production of plant-based supplements.

Determination of the qualitative and quantitative composition of amino acids in the *C. vulgare* plant raw material extracts. The study analyzed the changes in the qualitative and quantitative composition of amino acids in the bull thistle plant raw materials collected at different phenological stages, from mass regrowth to seed maturity, over the two-year period of 2021–2022. The amino acid content in the *C. vulgare* plant raw material varied depending on a part of the plant (leaves, inflorescences, roots) and raw material collecting time (the influence of the plant phenological stages depending on the collection year). All data are presented in Fig. 3.2.2.1. All statistically significant differences obtained in the amino acid study are presented at the end of the dissertation, in the appendices section.

After evaluating the differences in the qualitative composition of amino acids in the *C. vulgare* plant raw materials (leaves, inflorescences, roots), the highest qualitative diversity of amino acids was found in the plant leaves extracts (15 amino acids) (Fig. 3.2.2.1 A). The extracts of inflorescences contained 14 amino acids (Fig. 3.2.2.1 B) and of roots – 13 amino acids (Fig. 3.2.2.1 C). In the samples of the *C. vulgare* leaves raw materials collected at different phenological stages in 2021 and 2022, the total amino acid content (0.01–12.28 mg/g (2021), 0.03–23.90 mg/g (2022)) was slightly higher than the amounts found in the plant raw materials of *C. vulgare* inflorescences (3.25–10.04 mg/g (2021), 0.30–14.20 mg/g (2022)) and roots (0.01–0.66 mg/g (2021), (0.77–3.15 mg/g (2022)). When comparing the changes in the amino acid content, the highest parameters (12.49 ± 0.15 mg/g) were in the plant raw materials of *C. vulgare* collected in 2021 during mass flowering stage (08.15) ($p < 0.05$). When comparing the changes in the amino acid content in the raw materials of the bull thistle plant leaves collected during the phenological stages in 2022, it was found that the accumulated amounts of total amino acids (23.91 ± 0.31 mg/g) were the highest ($p < 0.05$) in the raw materials of the leaves collected during the mass regrowth period (06.20) (Fig. 3.2.2.1 A). The primary amino acids identified in the raw materials of the plant leaves collected during the mass regrowth stage (06.20) were L-glutamic acid (3.78 ± 0.06 mg/g), L-lysine (2.89 ± 0.04 mg/g) and L-aspartic acid (2.68 ± 0.04 mg/g). They accounted for 39.11% of the total quantity of amino acids.

After evaluating the qualitative and quantitative composition of accumulated amino acids in the plant's inflorescences, it was found that there was no histidine, which was detected in the extracts of leaves. Comparing the changes in the amino acid contents in the *C. vulgare* inflorescences raw materials collected during the phenological stages in 2021 and 2022, it was found that the biggest total amino acid quantities (10.04 ± 0.19 mg/g and 14.20 ± 0.19 mg/g and 14.20 ± 0.12 mg/g) were found in the collected samples of raw

plant materials at the stages of butonization and the beginning of flowering. In the inflorescences raw materials collected in 2022 at the butonization phenological stage (07.04), the total amino acid content was two times higher than the total amino acid content in the inflorescences raw materials collected in 2021 at the same period. The primary amino acids that predominated in the inflorescences raw materials collected at the butonization period in 2022 (07.04) were L-glutamic acid (2.61 ± 0.05 mg/g) and L-aspartic acid (3.04 ± 0.07 mg/g). They accounted for 39.8% of the total amino acids determined (Fig 3.2.2.1 B). Tylei et al. studied *C. japonicum* and also found that after quantitatively examining the composition of the plant's inflorescences, the amino acid amount in them was higher than in the raw materials from other plant parts [177]. The plant roots contained the lowest levels of amino acids, and the qualitative composition analysis did not determine two amino acids, L-histidine and L-lysine, detected in the leaves extracts (Fig. 3.2.2.1 C). The evaluation of amino acid quantities in the raw plant materials of *C. vulgare* roots collected in 2021 during the phenological stages, showed that the highest total amount of amino acids 0.66 ± 0.07 mg/g was detected in the raw materials of roots collected at the end of flowering (08.29). At the end of flowering (08.29), the two amino acids, L-alanine (31.48%) and L-proline (54.84%), predominated in the raw materials of *C. vulgare* roots collected at the end of flowering (08.29). The content of amino acids in the raw materials of *C. vulgare* roots collected in 2022 during the phenological stages was determined, and the highest total amino acid content of 3.15 ± 0.16 mg/g was in the root raw materials collected during the phenological stage of mass flowering (08.01). The primary amino acids that predominated in the raw materials of roots collected in 2022 during the period of mass flowering (08.01) were L-glutamic acid (0.57 ± 0.01 mg/g) and aspartic acid (0.54 ± 0.01 mg/g). They accounted for 35.37% of the determined total amino acid content (Fig. 3.2.2.1 C).

According to research data, the most commonly found amino acids in *C. intybus* leaves extracts are arginine, cysteine, valine, alanine, and glycine, with their levels – especially in leaves and roots raw materials – being higher than those found in *C. vulgare* [176]. Meanwhile, *A. millefolium* and *C. recutita* also present a diverse amino acid profile, but the distribution across different plant parts (inflorescences, leaves, or roots) is variable and generally lower than in *C. vulgare* raw material [174, 175]. Although the amino acid content in *C. vulgare* is, in some cases, lower than in the aforementioned plants, it stands out due to its unique amino acid composition, which may complement the nutritional value of other *Asteraceae* family plants

The detailed analysis of amino acids revealed that the composition, collection year, and phenological stages of the *C. vulgare* raw materials (leaves, inflorescences, roots) were critical factors in determining the qualitative and quantitative composition of amino acids in the bull thistle plant raw materials. The evaluation of compound accumulation patterns showed that the quantity of amino acids in the inflorescences and roots collected in 2022 was bigger than that in the plant parts collected in 2021. The obtained study results provide new knowledge about the amino acid accumulation patterns in the *C. vulgare* plant raw materials. It is necessary to apply a validated analysis methodology and the appropriate preparation time for raw plant materials to ensure the production of high-quality raw materials with a detected content of amino acids. Such standardized raw materials may have prospects in the food industry as a natural source of amino acids, contributing to a balanced diet and the development of functional products.

Study of the biological effects of bull thistle extracts

Antioxidant activity study. The antioxidant activity study was conducted using the CUPRAC method. The study used ethanolic bull thistle extracts prepared from the leaves, inflorescences, and roots of the plant. The extracts with the highest amounts of phenolic compounds and amino acids were used in the antioxidant activity study. The antioxidant activity study aimed to evaluate the antioxidant activity of extracts of different parts of the bull thistle plant (leaves, inflorescences, roots) by comparing the extracts prepared from the raw materials collected in 2021 and 2022 at identical phenological stages. The antioxidant activity data of bull thistle extracts, prepared from different plant raw materials collected in 2021 and 2022 at different phenological stages, evaluated by the CUPRAC method ($\mu\text{mol TE/g}$), are presented in Fig. 3.3.1.1. The extracts prepared from the leaves collected in 2021 characterized the strongest antioxidant effect. It was found that the most potent activity was observed in the bull thistle inflorescences extracts prepared from inflorescences raw materials collected in 2021. The determined antioxidant activity of inflorescences extracts was 1.48 times stronger than that of the bull thistle leaves extracts collected in 2022 and 2.24 times stronger than that of the plant roots extracts collected in 2021 ($p < 0.05$). The highest antioxidant activity ($12938 \mu\text{mol TE/g}$) was determined in the *C. vulgare* leaves extracts, the raw material of which was collected in 2021 at the end of the phenological dormancy stage. Demirtas et al. indicated that the crude *C. arvense* leaves extracts collected in June exhibited the most potent antioxidant activity when using the DPPH and FRAP methods [179]. When comparing the antioxidant activity of *C. vulgare*

extracts, a statistically significant difference was found between the extracts prepared from different parts of the plant in the second collection year (2022). It was found that the strongest activity was observed in the bull thistle roots extracts prepared from the roots raw materials collected in 2022. The antioxidant activity of the roots extracts was 1.4 times stronger than of bull thistle leaves extracts collected in 2022 and 2.24 times stronger than of inflorescences extracts collected during 2022 ($p < 0.05$). Yin et al. studied the antioxidant effect of *C. japonicum* roots extracts and found that methanol extracts had stronger free radical scavenging activity than aqueous extracts. The aqueous and methanolic extracts of *C. japonicum* roots exhibited concentration-dependent hydroxyl radical scavenging activity and reduced potency and metal complexation capacity [180]. Kim et al. identified six polyphenolic compounds (syringin, chlorogenic acid, 3,5-di-caffeoylquinic acid, 3'-hydroxycinnamic acid, and 3,4-dicaffeoylquinic acid) in *C. japonicum* extracts and confirmed the antioxidant effect of phenolic compounds accumulated in thistle plant [181]. The antioxidant activity of *C. vulgare* leaves extracts prepared from the first year of raw material collection (2021) was 2.16 times stronger than that of *C. vulgare* leaves extracts from the second year of raw material collection (2022) ($p < 0.05$). The highest level of antioxidant activity (5963 $\mu\text{mol TE/g}$) was observed in the raw material extracts of *C. vulgare* leaves collected during the end of the dormancy stage of the second year of collection (2022). The antioxidant activity of *C. vulgare* inflorescences extracts collected during the first year of collection (2021) was 2.76 times stronger than the antioxidant activity of *C. vulgare* inflorescences extracts collected during the second year of collection (2022) ($p < 0.05$). The strongest antioxidant activity (8331 $\mu\text{mol TE/g}$) was found in the raw material extracts of *C. vulgare* inflorescences from the first year of collection (2021) collected at the seed maturity phenological stage. Koryza and Nazaruk et al., studying the antioxidant properties of inflorescences and leaves of the *Cirsium* genus plants grown in northeastern Poland, found a positive correlation between the antioxidant effect of the extracts of these two raw materials and the total content of phenolic compounds in the extracts [56,168]. Kurç et al. found that the methanol extract of *C. vulgare* plant parts (roots, stems, leaves, and inflorescences) collected in June had the strongest antioxidant activity using the CUPRAC method, with a Trolox equivalent reducing capacity of 2.14 $\mu\text{mol TE/g}$ and an EC_{50} value of 18.5 $\mu\text{g/mL}$. The mentioned scientists also found that the same extract had the highest antioxidant activity when evaluated by FRAP (1436.6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g extract}$), ABTS (1436.6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g extract}$), and superoxide anion radical scavenging activity methods. Various antioxidant activity methods (FRAP, ABTS, CUPRAC) have shown that the ethanolic extracts of

C. arvense, compared with available standards, have a dose-dependent antioxidant activity [182]. Summarizing the results of the CUPRAC method for antioxidant activity, it can be stated that the strongest antioxidant activity was observed in the extracts made from plant leaves collected in the first year of collection (2021), during the phenological dormancy stage (05.09) (12938 $\mu\text{mol TE/g}$). The obtained data confirm that the year of growth and phenological stages of the bull thistle have a significant effect on the phytochemical profile and antioxidant activity, which reveals the importance of the raw material collection period in assessing the antioxidant properties of plants.

Anticancer effect study. The anticancer effect of *C. vulgare* has not been extensively studied. The other authors' studies on the *Cirsium* genus plants, such as *C. japonicum*, which accumulate chlorogenic acid and are resistant to oxidative stress, indicate the potential of these species in anticancer studies [104]. These data suggest that *C. vulgare* may also have a similar effect against oxidative stress, therefore further studies are necessary to confirm this hypothesis. After performing the analysis of the antioxidant activity of raw materials for two years (2021–2022), the extracts were selected for further studies based on the obtained antioxidant activity concentration, which are described in Table 3.3.2.1. The study analyzing the effect of fourteen dry *C. vulgare* extracts and chlorogenic acid on cell viability showed that all extracts affected the human colon adenocarcinoma cell line (HT–29) and the human gastric carcinoma cell line (KATO III). The U1 inflorescences extract showed the highest activity, most significantly inhibiting the viability of the KATO III cell line (EC_{50} 0.19 ± 0.05 mg/mL). This extract also significantly reduced the viability of the HT–29 cell line (EC_{50} 0.35 ± 0.08 mg/mL). Accordingly, the U9 roots extract was the most effective in inhibiting the proliferation of HT–29 cells (EC_{50} 0.29 ± 0.06 mg/mL) (Fig. 3.3.2.1). The leaves extracts 4L, 8L, 10L and 6L were the least active. These extracts had the highest chlorogenic acid content (65.47–156.28 mg/g) when compared with the data on chlorogenic acid content of all extracts. When comparing the raw material parts from which the extracts were made, the most substantial effect (EC_{50} from 0.29 ± 0.06 to 0.37 ± 0.08) on the HT–29 (human colon adenocarcinoma) cell line was observed after exposing the cells to the extracts made from bull thistle roots. The effect against the viability of the HT–29 cell line was also distinguished by the extract U1, which was made from the plant inflorescences at the phenological stage of seed maturity. A tendency of roots extracts was observed – the roots raw materials collected during mass flowering (EC_{50} 0.29 ± 0.06) (U9) and at the end of the phenological dormancy stage (EC_{50} 0.32 ± 0.08) (U7), had a

substantial effect. Meanwhile, the viability of the KATO III cell line was most effectively inhibited by the extracts made from the inflorescences of the plant. The extracts prepared from the plant's inflorescences, collected at the seed maturity phenological stage (U1), were particularly active, and showed the highest activity in suppressing the viability of this cell line. The HF cell line viability was most inhibited by the extracts U5 and U8, prepared from the plant roots. The raw materials for these extracts were collected at the end of the dormancy phenological stage. Gastric carcinoma cell lines, such as KATO III, are poorly sensitive due to their complex tumor microenvironment and resistance to chemotherapy, therefore, the results of this study are essential. The HT-29 cell model is known for its resistance to traditional treatment methods; therefore, evaluating the effect of U1 (inflorescences) and U9 (roots) extracts on these cell lines is important. This study's results are consistent with other studies on the *Cirsium* genus plants [122, 183]. *C. setidens*, used in the East Asian medicine, exhibited selective cytotoxicity against human colon adenocarcinoma cancer cells [183]. Significant effects were observed in a study using extract concentrations of 100–250 µg/mL. The extracts at these concentrations induced apoptosis by activating caspases and modulating the Bcl-2 protein, which is crucial for cell survival [183]. The studies with *C. japonicum* showed that the extracts at 200–500 µg/mL, which contained high contents of active phenolic compounds, had cytotoxic effects on liver cancer (HepG2) and breast cancer (MCF-7) cell lines [122]. This effect was mainly attributed to flavonoids such as pectolinarin and apigenin, which act on specific cancer mechanisms [122, 184]. These concentrations are similar to those used in this study, in which the *C. vulgare* extracts, especially U1 (inflorescences) and U9 (roots), demonstrated a selective anti-cancer effect. It shows that plant materials collected at specific growth stages may contain bioactive compounds characterized by the concentrations sufficient to induce targeted cytotoxicity. In this study, the *C. vulgare* extracts U4 (leaves), U5 (roots) and U10 (leaves) non-selectively inhibited the viability of human fibroblasts (HF) compared to KATO III and HT-29 cell lines (from 0.9 to 1.2 times). Meanwhile, the *C. vulgare* extracts U1 (inflorescences), U6 (roots), U7 (roots), U8 (roots), U9 (roots) had a lower effect on the viability of human fibroblast (HF) cells compared to KATO III and HT-29 cancer cell lines (1.48 to 3.79 times) allowing to conclude that the extracts U1 (inflorescences), U6 (roots), U7 (roots), U8 (roots) and U9 (roots) are more selective for KATO III and HT-29 cell lines, compared to HF cells, and comparing them to the extracts U4 (leaves), U5 (roots) and U10 (leaves) (Fig. 3.3.2.1).

The chlorogenic acid effect on cell viability was also determined, as this substance was found in high amounts in all the extracts studied. The chlorogenic acid content in these dry extracts ranged from 17.91 to 156.28 mg/g. However, no direct relationship was found between the chlorogenic acid content and its effect on the cell lines. The extracts with significantly higher activity against HT-29 and KATO III cell lines were observed to have relatively lower chlorogenic acid content. Chlorogenic acid was more potent in reducing the viability of HF cells than KATO III cancer cells and was also highly non-selective against cancer cell lines (Fig. 3.3.2.1). Chlorogenic acid, well known for its anticancer properties, was found in large quantities in the *C. vulgare* extracts. Chlorogenic acid concentrations as low as 100 μ M have been associated with apoptosis induction, cell cycle arrest, and inhibited proliferation in cancer cells [185]. In HT-29 cells, chlorogenic acid at 50–200 μ M concentrations suppressed proliferation and induced apoptosis by modulating apoptosis-related proteins. This suggests that the chlorogenic acid-containing *C. vulgare* extracts may induce apoptosis similarly. The inflorescences extract (U1) contained a higher concentration of apigenin-7-*O*-glucoside, reaching 27.62 mg/g, but this extract did not contain any significant other bioactive compounds found in the roots extract (U9). The roots extract contained a lower concentration of apigenin-7-*O*-glucoside, 4.48 mg/g, but several additional bioactive compounds were identified, including coumarin (5.39 mg/g), neochlorogenic acid (1.22 mg/g), and caffeic acid (2.13 mg/g). Considering their possible synergistic effects, these identified compounds in the roots extract show a broader spectrum of potential antioxidant and anti-inflammatory properties than the inflorescences extract. Considering that the most active extracts, U1 (inflorescences) and U9 (roots), contained high levels of chlorogenic acid and apigenin-7-*O*-glucoside, these results confirm their cytotoxic efficacy and a possible mechanism through mitochondrial apoptosis pathways, which is particularly important in the treatment of human colon adenocarcinoma and gastric carcinoma.

After studying the effect of bull thistle extracts on cell viability, the most active extracts – U1 (inflorescences), U6 (roots), U7 (roots), U8 (roots) and U9 (roots) – were selected to study further. The extract effect on the HT-29 cancer cell migration was evaluated applying the “wound healing” method using the concentrations of 0.1 mg/mL and 0.2 mg/mL. The “wound healing” test, evaluating cell migration as an indicator of metastatic potential, showed that the roots extract U7 most strongly inhibited the migration of HT-29 cells ($p < 0.05$) compared to the control samples. Even after 36 h, at a concentration of 0.2 mg/mL, the “wound” remained unhealed, and the “wound” area exceeded the control indicator by more than 15% (Fig. 3.3.2.2). This finding

is significant given the strong migration of HT-29 cells associated with metastatic progression. Similar anti-migratory effects at similar concentrations have been observed in the studies of other *Cirsium* genus species. *C. japonicum* inhibited the migration of breast cancer cells (MCF-7) at concentrations of 100–300 µg/mL, where the bioactive compounds affected cell motility by altering cytoskeletal dynamics and downregulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs), which are vital for metastasis [184, 186]. It allows presuming that the *C. vulgare* bioactive compounds, such as chlorogenic acid and apigenin derivatives, depending on concentration, may inhibit migration, possibly by affecting cell motility, altering cytoskeletal dynamics, or downregulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs). The extracts U1 (inflorescences), U6 (roots), and U8 (roots) showed similar effects on the HT-29 cell line in a 2D migration model at 0.2 mg/mL and 0.1 mg/mL concentrations. They statistically significantly reduced the “wound” area after 24 h compared to the control samples. The “wound” area of cancer cells after 24 h remained unhealed and exceeded 45%. The test sample results showed that, compared to the control sample results, the “wound” size remained more visible in the test groups even after 36 h at a concentration of 0.2 mg/mL. The chlorogenic acid impact on cell migration was established in other cancer cell models, where it showed a similar effect [185]. According to the existing studies, 50–150 µM concentrations effectively reduce the MMP expression and alter actin dynamics, reducing migration in gastric and human colon adenocarcinoma cells [175]. The observed anti-migratory effect of *C. vulgare* extracts is likely related to the chlorogenic acid and flavonoid compound properties to modulate cell motility pathways. This highlights the significance of these compounds in strategies aimed at inhibiting the spread of metastases.

A 3D spheroid model, replicating *in vivo* tumor microenvironment, revealed the significant *C. vulgare* extract impact on reducing spheroid growth and viability. It is known that evaluating the impact of a compound solely based on changes in spheroid size is not entirely accurate, as this may not directly correlate with cell viability within the spheroids [187]. This study evaluated the *C. vulgare* extract impact on HT-29 spheroid growth and viability using the WST-1 methodology (Fig. 3.3.2.3). KATO III cells did not form spheroids; therefore, this cell line was not used to evaluate the activity of the extracts in 3D cultures. The HT-29 spheroids comprised tumor cells and fibroblasts (HF) in a 1:1 ratio to replicate an actual tumor microenvironment better. This approach considers the presence of connective tissue in tumors, which plays a crucial role in tumor growth and metastasis. At the beginning of the experiment, the spheroids’ diameter was 300–350 µm (Fig. 3.3.2.3 A). The HT-29 spheroids treated with the extract U1 prepared

from the plant inflorescences showed a significant reduction in size and viability after 8 days, with the spheroid diameter decreasing to 584.1–641.2 μm compared to the control samples (643–690.1 μm , $p < 0.05$) (Fig. 3.3.2.3 C). These study results are consistent with the findings of the studies conducted with *C. japonicum*, where the extracts containing 250–500 $\mu\text{g/mL}$ flavonoids suppressed the growth of HepG2 liver cancer spheroids by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation [122]. Given the similar effective concentrations, it can be stated that the *C. vulgare* extracts may also impact cancer cell viability through apoptosis and anti-proliferative pathways, due to the active compounds, chlorogenic acid and other flavonoids, in the extracts which interfere with signaling pathways required for tumor growth. This study showed that the extracts U1 (inflorescences) and U8 (roots) reduced spheroid viability by 77.9% and 81.5%, respectively (Fig. 3.3.2.3 B). This decrease in viability is consistent with the studies of chlorogenic acid on HT–29 cell line spheroid models, where the concentrations of 500 μM and higher induce oxidative stress, activate caspase pathways, and interfere with cell survival signals in solid tumor models [113]. The activity observed in the U1 (inflorescences) and U8 (roots) treated spheroids shows that these extracts can circumvent the resistance that often occurs in tumor spheroids due to their hypoxic and nutrient-deficient environment. The presence of fibroblasts in this 3D model allowed cancer cells to interact with connective tissue components critical for cancer progression. The previous studies with *C. setidens* found that plant flavonoids could modulate the interaction between cancer cells and connective tissue, reducing fibroblast-mediated tumor effects [188]. It shows that the *C. vulgare* extracts can also interact in the tumor microenvironment, inhibiting both cancer cell growth and the supporting role of connective tissue, thus highlighting their potential in complex cancer models.

Antimicrobial effect study. Antimicrobial effect was determined by studying the impact of bull thistle ethanolic and dry extracts on bacterial cultures. The study included nine bacterial cultures: standard cultures of non-spore-forming bacteria *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *P. vulgaris*, standard spore-forming bacterial culture – *B. cereus* and etalon yeast culture – *C. albicans*. The raw material extracts used to determine the antimicrobial effect of bull thistle are presented in Table 3.3.3.1. The data on the effect of the bacterial cultures and the extracts used in the study are presented in Tables 3.3.3.2 and 3.3.3.3. The ethanolic extracts, which were added in 1 mL in 5 mL agar medium with cultivated and prepared cultures, were mainly active against *C. albicans* (leaves extracts UL11, UL12, with MIC 8.35 mg/mL), gram-negative *P. vulgaris* (leaves extracts UL11, UL12 with MIC 8.35 mg/mL) and gram-

positive *S. epidermidis* (leaves extracts UL12, UL13, with MIC 8.35 mg/mL) cell cultures. The ethanolic extracts weakly impacted the cell lines of gram-positive *S. aureus* (leaves extract UL13, with MIC 8.35 mg/mL) and gram-negative *P. aeruginosa* (leaves extract UL10, with MIC 16.7 mg/mL). The ethanolic extracts of bull thistle had no impact on gram-positive *E. faecalis* and *B. cereus* and gram-negative *E. coli* and *K. pneumonia* cell cultures (Table 3.3.3.2). Although Kabir et al. reported that chlorogenic acid has antimicrobial properties against *E. coli* cell cultures [189], in this study, this effect was not determined. The authors who investigated the inflorescences and leaves extracts of *Cirsium* genus plants – *C. palustre*, *C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. rivulare* and *C. vulgare* – noted that the studied extracts exhibited a high antimicrobial activity with an MIC of 10 mg/mL, and that the chlorogenic acid concentration contents conditioned this effect [56, 57, 190]. The studies described the flavonoid apigenin-7-*O*-glucoside extracted from the *C. arvense* whole herb, which, together with other flavonoids, caused antimicrobial effect against various studied gram-positive cell cultures [191]. In contrast to the ethanolic *C. vulgare* extracts, dry extracts had a stronger antimicrobial effect against the studied etalon bacterial cell cultures. The dry extract of the inflorescences UF demonstrated efficacy against gram-positive cell lines, including *S. aureus* (MIC 3 mg/mL), *S. epidermidis* (MIC 3 mg/mL), *B. cereus* (MIC 3 mg/mL) and *P. vulgaris* (MIC 5.567 mg/mL), when the concentration of used extracts in agar varied from 1 mL/5 mL to of 0.5 mL/5 mL. When using the extract in agar concentrations of 0.5 mL/5 mL and lower, no effect was detected against *P. vulgaris*. The bull thistle roots extract UR was active against the same reference bacterial culture lines of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* and *P. vulgaris*. It was found that the UR extract of bull thistle roots, where the original roots extract was diluted 13.5 times, was more potent than the UF extract of bull thistle inflorescences (MIC 3 mg/mL) and was characterized by higher activity against gram-positive *S. epidermidis* (MIC 2.47 mg/mL) (Table 3.3.3). Kenny et al. found that the *C. vulgare* and ethanol-based water extracts had antimicrobial effects against *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* and *S. typhi* cultures, whereas the dry inflorescences and leaves extracts studied in this study impacted the *S. aureus* and *B. cereus* cell cultures [192]. The findings of this study are consistent with those of Borawska et al., who studied the *C. vulgare* extracts and other *Cirsium* genus plants of the and indicated that dry inflorescences and leaves extracts had strong antibacterial effects against *P. aeruginosa* and *S. aureus* cell cultures [193]. Kurç et al., in their study, found that methanol, ethyl acetate, diethyl ether and hexane extracts of the whole *C. vulgare* plant parts (roots, stem, leaves and inflorescences) collected in June had antibacterial effects against *S. aureus*,

B. subtilis, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. miratybilis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *P. chrysogenum* and *A. fumigatus* [13]. The strongest antibacterial activity was found with ethyl acetate and diethyl ether extracts of *C. vulgare*. The strongest antifungal activity was found with hexane extracts. The methanol extract of *C. vulgare* has been shown to have antimicrobial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* [13].

A comparative study was conducted with known antimicrobial medicine (ampicillin, gentamicin, tetracycline, and ciprofloxacin), their effects on ethanolic cultures of microorganisms and their MIC values, comparing them with the MIC concentrations of bull thistle extracts against the same reference cell cultures (Table 3.3.3.4). The *Cirsium* genus plant's antibacterial activity is attributed to its phenolic acids. Phenolic hydroxyls can participate in metal complex reactions in bacteria, disrupting their nutrient uptake and causing antibiotic activity. Phenolic acids have antifungal properties, inhibiting ergosterol synthesis, respiratory processes, succinate dehydrogenase (SDH), and NADH oxidase activity [194]. In the study, antibiotics – ampicillin, gentamicin, tetracycline, and ciprofloxacin – had a more substantial antimicrobial effect according to the obtained MIC values compared to the MIC of the extracts used. However, in a search for new natural antimicrobial substances, further studies should aim to concentrate on the bull thistle extracts and re-evaluate their potential antimicrobial effect.

CONCLUSIONS

1. The developed HPLC and GCC–MS methodologies for the analysis of phenolic compounds and amino acids in *C. vulgare* leaves, inflorescences, and roots raw materials demonstrate high accuracy, robustness, and sensitivity. The HPLC method shows reliable linearity ($R^2 > 0.999$), low limits of detection and quantification, and high repeatability. The GC–MS methodology is also confirmed to be precise and sensitive, with low detection limits and high reproducibility accuracy (98.4–101.3%). Both methods comply with the ICH Q2(R2) validation requirements and are suitable for the qualitative and quantitative determination of phenolic compounds and amino acids.
2. The total content of phenolic compounds in bull thistle raw materials in samples of the first (2021) and second (2022) collection years varied from 71.87 to 324.16 mg/g and from 99.36 to 326.57 mg/g, respectively. Using the HPLC method, 11 phenolic compounds were identified and quantified, of which chlorogenic acid (44.90%) and apigenin-7-*O*-glucoside (41.48%) accounted for the most significant proportion of the total content of identified compounds. The highest chlorogenic acid content (146.28 ± 0.13 mg/g and 140.15 ± 0.14 mg/g) was determined in the leaves of the first year of collection (2021), collected at the end of the dormancy period (2021.05.23) and during the mass regrowth stage (2021.06.06) ($p < 0.05$). The highest apigenin-7-*O*-glucoside content (147.96 ± 0.34 mg/g) was determined in the leaves of the second year of collection (2022), at the mass flowering stage (08.01).
3. The 15 free amino acids were found in leaves, 14 – in inflorescences, and 13 – in roots. The highest amino acid content of 23.91 ± 0.31 mg/g was found in the *C. vulgare* leaves of the second year of raw material collection (2022), collected at the mass regrowth stage (06.20) ($p < 0.05$). The primary amino acids identified in leaves samples at this phenological stage were L-glutamic acid (3.78 ± 0.06 mg/g), L-lysine (2.89 ± 0.04 mg/g), and L-aspartic acid (2.68 ± 0.04 mg/g), accounting for 39.11% of the total amino acid content.
4. It has been determined that the extracts of *C. vulgare* exhibit antioxidant, anticancer and antimicrobial properties.
 - 4.1. The highest antioxidant activity was observed in the *C. vulgare* leaves extracts from the first year (2021) of collection ($12938 \mu\text{mol TE/g}$), collected at the end of dormancy stage.

- 4.2. The inflorescences extract used in the anticancer effect study was prepared from the inflorescences collected in the first year (2021), at the stage of seed maturity, and inhibited the viability of KATO III (EC_{50} 0.19 ± 0.05 mg/mL) and HT-29 (EC_{50} 0.35 ± 0.08 mg/mL) cells most significantly. The U9 extract, obtained from the roots collected in the second year (2022) at the mass regrowth stage, was most effective in inhibiting HT-29 proliferation (EC_{50} 0.29 ± 0.06 mg/mL). The “wound healing” test showed that the extract U7 (from the roots of the second year of collection (2022), collected at the end of the dormancy stage) most strongly reduced the HT-29 cell migration ($p < 0.05$). Compared to the control group, the size of the “wound” remained more visible in the test groups even after 36 h at a 0.2 mg/mL concentration. The bull thistle inflorescences extract U1 from the first year of collection and the bull thistle roots extract U8 from the second year of collection, reduced the viability of spheroids to 77.9% and 81.5%, respectively.
- 4.3. The dry extracts of plant inflorescences (UF) and plant roots (UR) inhibited the growth of gram-positive bacteria, especially *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* (MIC 3 mg/mL), and *P. vulgaris* (MIC 5.567 mg/mL) cultures, more strongly than the ethanolic extracts.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Chopra B, Dhingra AK. Natural products: a lead for drug discovery and development. *Phytotherapy Research* 2021;35:4660–702.
2. Asma ST, Acaroz U, Imre K, Morar A, Shah SRA, Hussain SZ, et al. Natural products/bioactive compounds as a source of anticancer drugs. *Cancers (Basel)* 2022;14:6203.
3. Pancu DF, Scurtu A, Macasoi IG, Marti D, Mioc M, Soica C, et al. Antibiotics: conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity – a pharmacototoxicological screening. *Antibiotics* 2021;10:401.
4. Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, et al. Antimicrobial resistance: prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2022;170:106103.
5. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18:663–72.
6. Nazaruk J, Chłędzik S, Strawa J, Bazydło K, Wajs-Bonikowska A. Chemical composition and antioxidant activity of *Cirsium vulgare* inflorescences. *Nat Prod Commun* 2017;12.
7. Aggarwal G, Kaur G, Bhardwaj G, Mutreja V, Sohal HS, Nayik GA, et al. Traditional uses, phytochemical composition, pharmacological properties, and the biodiscovery potential of the genus *Cirsium*. *Chemistry (Easton)* 2022; 4:1161–92.
8. Syed Q, Rizvi A. Surfactants and detergents: chemistry and applications. 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959: ASTM International; 2021.
9. Shahrajabian MH. Bull thistle (*Cirsium Vulgare* L.) and Ramsons (*Allium Ursinum* L.), impressive health benefits and high-nutrient medicinal plants. *Pharmacognosy Communications* 2021;11:168–71.
10. Simunkova M, Alwasel SH, Alhazza IM, Jomova K, Kollar V, Rusko M, et al. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Arch Toxicol* 2019;93:2491–513.
11. Trier N, Houen G. Epitope specificity of anti-citrullinated protein antibodies. *Antibodies* 2017;6:5.
12. Bureš P, Del Guacchio E, Šmerda J, Özcan M, Blizňáková P, Vavrinec M, et al. Intergeneric hybrid origin of the invasive tetraploid *Cirsium vulgare*. *Plant Biol* 2024;26:749–63.
13. Aydın Kurç M, Orak HH, Gülen D, Caliskan H, Argon M, et al. Antimicrobial and antioxidant efficacy of the lipophilic extract of *Cirsium vulgare*. *Molecules* 2023; 28:7177.
14. Sabudak T, Orak HH, Gulen D, Ozer M, Caliskan H, Bahriseft I et al. Investigation of some antibacterial and antioxidant properties of wild *Cirsium vulgare* from Turkey. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 2017;51:s363–7.
15. Fernández-Martínez E, Jiménez-Santana M, Centeno-Álvarez M, Torres-Valencia JM, Shibayama M, Cariño-Cortés R. Hepatoprotective effects of nonpolar extracts from inflorescences of thistles *Cirsium vulgare* and *Cirsium ehrenbergii* on acute liver damage in rat. *Pharmacogn Mag* 2018;13:S860–7.
16. Mondal AK, Parui S, Mandal S. Analysis of the free amino acid content of nine *Asteraceae* species of known allegenic activity. vol. 5. 1998.
17. Klinkhamer PG, Jong TJ. *Cirsium Vulgare* (Savi) Ten. *J Ecol* 1993;81:177.

18. Grime JP. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. London,UK: Springer; 2014.
19. Hyde-Wyatt BH. The noxious and secondary weeds of Tasmania. 3rd ed. Tasmania, Australia: Department of Agriculture; 2011.
20. Holm LG. World weeds: natural histories and distribution. 5th ed. N.Y,USA: Wiley; 2007.
21. Forcella F. Biology of bull thistle, *Cirsium vulgare* (Savi) Tenore. Reviews of Weed Science 1994;6:29–50.
22. Doucet C, Cavers PB. Induced dormancy and colour polymorphism in seeds of the bull thistle *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. Seed Sci Res 1997;7:399–408.
23. Radford AE. Fundamentals of plant systematics. N.Y,USA: Harper and Row; 1986.
24. Moore RJ. The thistles of Canada. vol. 10. Research Branch, Canada Department of Agriculture; 1974.
25. Parsons WT. Noxious weeds of Australia . Melbourne, Australia: Inkata Press; 1992.
26. Peterson LA. A field guide to edible wild plants of eastern and central North America. Boston, USA: Houghton Mifflin Company; 1977.
27. Jordon-Thaden IE, Louda SM. Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds? Biochem Syst Ecol 2003;31:1353–96.
28. Lin PC, Ji L, Zhong XJ, LI JJ, Wang X, Shang XY, et al. Taraxastane-type triterpenoids from the medicinal and edible plant *Cirsium setosum*. Chin J Nat Med 2019; 17:22–6.
29. Nazaruk J, Gudej J. Flavonoid compounds from the flowers of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. Acta Pol Pharm 2003;60:87–9.
30. Nalewajko-Sieliwoniuk E, Malejko J, Twarowska P, Timoszuk M, Nazaruk J. Postcolumn determination of polyphenolic antioxidants in *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. extracts. J Sep Sci 2017;40:3830–8.
31. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 2009;56:317–33.
32. Ambriz-Perez DL, Leyva-Lopez N, Gutierrez-Grijalva EP, Heredia JB. Phenolic compounds: natural alternative in inflammation treatment. A Review. Cogent Food Agric 2016;2.
33. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chem 2011;126:1821–35.
34. Tsao R, Yang R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 2003;1018:29–40.
35. Liu Q, Cai W, Shao X. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. Talanta 2008;77:679–83.
36. Naczek M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. J Chromatogr A 2004;1054:95–111.
37. Shanaida M, Jasicka-Misiak I, Makowicz E, Stanek N, Shanaida V, Wieczorek P. Development of high-performance thin layer chromatography method for identification of phenolic compounds and quantification of rosmarinic acid content in some species of the Lamiaceae family. J Pharm Bioallied Sci 2020;12:139.
38. Staszek D, Orłowska M, Waksmundzka-Hajnos M, Sajewicz M, Kowalska T. Marker fingerprints originating from tlc and hplc for selected plants from the *Lamiaceae* family. J Liq Chromatogr Relat Technol 2013;36:2463–75.

39. Jug U, Glavnik V, Kranjc E, Vovk I. HPTLC – densitometric and HPTLC–MS methods for analysis of flavonoids. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2018;41: 329–41.
40. Martin JG, Gloria EM, Porto E, Alencar SM et al. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. *J Nat Prod* 2012;5:27–36.
41. Shadkami F, Estevez S, Helleur R. Analysis of catechins and condensed tannins by thermally assisted hydrolysis/methylation-GC/MS and by a novel two step methylation. *J Anal Appl Pyrolysis* 2009;85:54–65.
42. Proestos C, Boziaris IS, Nychas G, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem* 2006;95:664–71.
43. Liggins J, Bluck LJC, Coward WA, Bingham SA. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem* 1998;264:1–7.
44. Siess MH, Le Bon AM et al. Flavonoids of honey and propolis: characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene–DNA binding in rats. *J Agric Food Chem* 1996;44:2297–301.
45. Wang LF, Kim DM, Lee CY. Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *J Agric Food Chem* 2000; 48:4227–32.
46. Banaras S, Javaid A, Shaob A, Ahmed E. Antifungal activity of *Cirsium arvense* extracts against phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Planta Daninha* 2017;35.
47. Smolarz HD. Application of GC-MS method for analysis of phenolic acids and their esters in chloroformic extracts from some taxons of *Polygonum* L. genus. *Chem Analitczna* 2001;46:439–40.
48. Waksmundzka-Hajnos M. Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;717:93–118.
49. Hušek P. Fast derivatization and GC analysis of phenolic acids. *Chromatographia* 1992;34:621–6.
50. Zadernowski R, Czaplicki S, Naczki M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chem* 2009;112:685–9.
51. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 2003;51:2866–87.
52. Costa Padilha M, Radler de Aquino Neto F. Two decades of high temperature gas chromatography (1983–2003): what's next? *Microchemical Journal* 2004; 77:141–9.
53. Aludatt MH, Alli I, Ereifej K, Alhamad M, Al-Tawaha AR, Rababah T. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chem* 2010;123:117–22.
54. Boldizsár I, Krasznai M, Tóth F, Tóth G, Sólyomváry A, Noszál B, et al. The role of harmonized, gas and liquid chromatography mass spectrometry in the discovery of the neolignan balanophonin in the fruit wall of *Cirsium vulgare*. *J Chromatogr A* 2012;1264:143–7.
55. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 2007;30:3268–95.
56. Kozyra M, Woznia KS. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids from inflorescences and aerial parts of selected *Cirsium* species using ase method. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 2014;71:877–81.
57. Sieliwoniuk E, Malejko J, Mozolewska M, Wołyniec E, Nazaruk J. Determination of polyphenolic compounds in *Cirsium palustre* (L.) extracts by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Talanta* 2015;133:38–44.

58. Zarena AS, Sankar K.U. Phenolic acids, flavonoid profile and antioxidant activity in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp. *J Food Biochem* 2012; 36:627–33.
59. Qin C, Li Y, Niu W, Ding Y, Zhang R, Shang X. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. *Czech Journal of Food Sciences* 2010;28: 117–26.
60. Diagone CA, Colombo R, Lanças FM, Yariwake JH. CZE/PAD and HPLC-UV/PAD profile of flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* “espinheira santa” leaves extracts. *Chromatography Research International* 2012;2012:1–7.
61. Hawrył AM, Ziobro A, Swieboda RS, Hawrył MA, Chernetskyy M, Waksmundzka-Hajnos M. The HPLC fingerprint analysis of selected *Cirsium* species with aid of chemometrics. *J Braz Chem Soc* 2016.
62. Lopes-Lutz D, Dettmann J, Nimalaratne C, Schieber A. Characterization and quantification of polyphenols in Amazon grape (*Pourouma cecropiifolia*). *Molecules* 2010;15:8543–52.
63. Klejdus B, Vacek J, Benešová L, Kopecký J, Lapčík O, Kubáň V. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Anal Bioanal Chem* 2007;389: 2277–85.
64. Churchwell M, Twaddle N, Meeker L, Doerge D. Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B* 2005;825:134–43.
65. Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Sacchetti P, Samperi R, Laganà A. Rapid-resolution liquid chromatography/mass spectrometry for determination and quantitation of polyphenols in grape berries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008;22: 3089–99.
66. Roggero JP. *Chromatography of phenolics*. Washington, DC, USA: American Chemical Society; 1997.
67. Selvaggini R, Servili M, Urbani S, Esposto S, Taticchi A, Montedoro G. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J Agric Food Chem* 2006;54:2832–8.
68. Kraushofer T, Sontag G. Determination of some phenolic compounds in flax seed and nettle roots by HPLC with coulometric electrode array detection. *European Food Research and Technology* 2002;215:529–33.
69. Rostagno MA, D’Arrigo M, Martínez JA, Martínez JA. Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2010;29:553–61.
70. Bianco A, Buiarelli F, Cartoni G, Coccioli F, Muzzalupo I, Polidori A, et al. Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in olives and oils. *Anal Lett* 2001;34: 1033–51.
71. Lopez MJ, Mohiuddin SS. *Biochemistry, essential amino acids*. StatPearls Publishing LLC; 2024.
72. Hoffman JR, Falvo MJ. Protein – which is best? *J Sports Sci Med* 2004;3:118–30.
73. Hou Y, Wu G. Nutritionally essential amino acids. *Advances in Nutrition* 2018;9:849–51.
74. Church DD, Hirsch KR, Park S, Kim IY, Gwin JA, Pasiakos SM et al. Essential amino acids and protein synthesis: insights into maximizing the muscle and whole-body response to feeding. *Nutrients* 2020;12:3717.
75. Holeček M. Origin and roles of alanine and glutamine in gluconeogenesis in the liver, kidneys, and small intestine under physiological and pathological conditions. *Int J Mol Sci* 2024;25:7037.

76. Smon A, Cuk V, Brecelj J, Murko S, Groselj U et al. Comparison of liquid chromatography with tandem mass spectrometry and ion-exchange chromatography by post-column ninhydrin derivatization for amino acid monitoring. *Clinica Chimica Acta* 2019;495:446–50.
77. Ngere JB, Ebrahimi KH, Williams R, Pires E, Walsby-Tickle J, McCullagh JSO. Ion-exchange chromatography coupled to mass spectrometry in life science, environmental, and medical research. *Anal Chem* 2023;95:152–66.
78. Jámboř A, Molnár-Perl I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *J Chromatogr A* 2009;1216:3064–77.
79. Kim B, Lee Y, Koh B, Jhang SY, Lee CH, Kim S et al. Distinctive origin and evolution of endemic thistle of Korean volcanic island: Structural organization and phylogenetic relationships with complete chloroplast genome. *PLoS One* 2023;18:e0277471.
80. Sobolevsky TG, Revelsky AI, Miller B, Oriedo V, Chernetsova ES, Revelsky IA. Comparison of silylation and esterification/acetylation procedures in GC-MS analysis of amino acids. *J Sep Sci* 2003;26:1474–8.
81. Bangalore DV, McGlynn W, Scott DD. Effect of β -cyclodextrin in improving the correlation between lycopene concentration and ORAC values. *J Agric Food Chem* 2005;53:1878–83.
82. Calliste CA, Trouillas P, Allais D-P, Duroux J-L. *Castanea sativa* Mill. Leaves as new sources of natural antioxidant: an electronic spin resonance study. *J Agric Food Chem* 2005;53:282–8.
83. Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* 2005;53:227–35.
84. Tan BL, Norhaizan ME, Liew W-P-P, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Front Pharmacol* 2018;9:1162.
85. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev* 2019;177:37–45.
86. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:S31–8.
87. Flieger J, Flieger W, Baj J, Maciejewski R. Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials (Basel)* 2021;14.
88. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 2018;54:287–93.
89. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:270–8.
90. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003;22:18–35.
91. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007;43:4–15.
92. Singh S, Singh RP. *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Reviews International* 2008;24:392–415.
93. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. *Int J Mol Sci* 2021;22:3380.

94. Moharram HA, Youssef MM. Methods for determining the antioxidant activity: a review. vol. 11. 2014.
95. Nazaruk J, Czechowska SK, Markiewicz R, Borawska MH. Polyphenolic compounds and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. *Nat Prod Res* 2008;22:1583–8.
96. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Çelik SE. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta* 2008;160:413–9.
97. Badarinath AV, Rao KM CC, Ramkanth S, Rajan TV, Gnanaprakash K. A review on in-vitro antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. *Int J Pharmtech Res* 2010;2:1276–85.
98. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007;12:1496–547.
99. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Esin Karademir S, Erçağ E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr* 2006;57:292–304.
100. Ribeiro JPN, Magalhães LM, Reis S et al. High-throughput total cupric ion reducing antioxidant capacity of biological samples determined using flow injection analysis and microplate-based methods. *Analytical Sciences* 2011;27: 483–8.
101. Sun D, Gao W, Hu H, Zhou S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharm Sin B* 2022;12:3049–62.
102. Siddiqui AJ, Jahan S, Singh R, Saxena J, Ashraf SA, Khan A, et al. Plants in anticancer drug discovery: from molecular mechanism to chemoprevention. *Biomed Res Int* 2022;2022.
103. Naeem A, Hu P, Yang M, Zhang J, Liu Y, Zhu W, et al. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules* 2022;27: 8367.
104. Cho M, Kim Y, You S, Hwang DY, Jang M. Chlorogenic acid of *Cirsium japonicum* resists oxidative stress caused by aging and prolongs healthspan via SKN-1/Nrf2 and DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. *Metabolites* 2023;13:224.
105. Moghadam S, Ebrahimi S, Salehi P, Moridi Farimani M, Hamburger M, Jabbarzadeh E. Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-*O*- β -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. *Molecules* 2017;22:1501.
106. Sapio L, Salzillo A, Illiano M, Ragone A, Spina A, Chiosi E, et al. Chlorogenic acid activates ERK1/2 and inhibits proliferation of osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* 2020;235:3741–52.
107. Wang L, Du H, Chen P. Chlorogenic acid inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cell lines by targeting annexin A2 *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Pharmacother* 2020;131:110673.
108. Pressete CG, Viegas FPD, Campos TG, Caixeta ES, Hanemann JAC, Ferreira-Silva GÁ, et al. Piperine-chlorogenic acid hybrid inhibits the proliferation of the SK-MEL-147 melanoma cells by modulating mitotic kinases. *Pharmaceutics*, 2023;16: 42–44..
109. Jiang F, Dusting G. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Curr Vasc Pharmacol* 2003;1:135–56.
110. Wang X, Liu J, Xie Z, Rao J, Xu G, Huang K, et al. Chlorogenic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in A498 human kidney cancer cells via inactivating PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *J Pharm Pharmacol* 2019;71:1100–9.

111. Chen X, Liu B, Tong J, Bo J, Feng M, Yin L, et al. Chlorogenic acid inhibits proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells via AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2024;19:146–53.
112. Vélez MD, Pedroza-Díaz J, Santa-González GA. Data on the cytotoxicity of chlorogenic acid in 3D cultures of HT-29 cells. *Data Brief* 2023;50:109527.
113. Li W, Ping Z, Xuemei G, Hongjuan M, Yi H, Xiaoli L, et al. Chlorogenic acid regulates the proliferation and migration of high-grade serous ovarian cancer cells through modulating the miR199a5p/DDR1 axis. *Acta Biochim Pol* 2022.
114. Manoharan P. *In vitro* evaluation of the antioxidant and anticancer activities of chlorogenic acid on human colon cancer (HT-29) cells. *Tropical Journal of Natural Product Research* 2024;8.
115. Kurata R, Adachi M, Yamakawa O, Yoshimoto M. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *J Agric Food Chem* 2007;55:185–90.
116. Hibasami H, Fujikawa T, Takeda H, Nishibe S, Satoh T, Fujisawa T, et al. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells. *Oncol Rep* 2000.
117. Bhosale PB, Abusaliya A, Kim HH, Ha SE, Park MY, Jeong SH, et al. Apigenin promotes TNF α -induced apoptosis, necroptosis, G2/M phase cell cycle arrest, and ROS generation through inhibition of NF- κ B pathway in Hep3B liver cancer cells. *Cells* 2022;11:2734.
118. Kuo CH, Weng BC, Wu CC et al. Apigenin has anti-atrophic gastritis and anti-gastric cancer progression effects in *Helicobacter pylori* – infected Mongolian gerbils. *J Ethnopharmacol* 2014;151:1031–9.
119. Maheshwari N, Sharma MC. Anticancer properties of some selected plant phenolic compounds: future leads for therapeutic development. *J Herb Med* 2023;42:100801.
120. Zhao ZW, Chang HC, Ching H et al. Antioxidant effects and phytochemical properties of seven Taiwanese *Cirsium* species extracts. *Molecules* 2021;26:3935.
121. Zhu L, Zhou J, Pan Y, Lv J et al. Glucagon-like peptide-1 receptor expression and its functions are regulated by androgen. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019;120:109555.
122. Jung HA, Abdul QA, Byun JS et al. Protective effects of flavonoids isolated from Korean milk thistle *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *J Ethnopharmacol* 2017;209:62–72.
123. Singh M, Patra S, Singh RK. Common techniques and methods for screening of natural products for developing of anticancer drugs. *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules*, Elsevier; 2021, p. 323–53.
124. Romar GA, Kupper TS, Divito SJ. Research techniques made simple: techniques to assess cell proliferation. *Journal of Investigative Dermatology* 2016; 136:e1–7.
125. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. 2004.
126. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS One* 2016;11:e0155772.
127. McCauley J, Zivanovic A, Skropeta D. Bioassays for anticancer activities, 2013, p. 191–205.
128. Rodriguez LG, Wu X, Guan J-L. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* 2005;294:23–9.

129. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Investigative Dermatology* 2017;137:e11–6.
130. Cory G. Scratch-wound assay, 2011, p. 25–30.
131. Samadian H, Jafari S, Sepand MR, Alaei L, Sadegh Malvajerd S, Jaymand M, et al. 3D bioprinting technology to mimic the tumor microenvironment: tumor-on-a-chip concept. *Mater Today Adv* 2021;12:100160.
132. Kijanska M, Kelm J. *In vitro* 3D spheroids and microtissues: ATP-based cell viability and toxicity assays. 2004.
133. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987; 113:101–22.
134. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C et al. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 2010;148:3–15.
135. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* 2013;31:108–15.
136. LaBarbera D V, Reid BG, Yoo BH. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012;7: 819–30.
137. Mehta RS, Barlow WE, Albain KS, Vandenberg TA, Dakhil SR, Tirumali NR, et al. Combination anastrozole and fulvestrant in metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2012;367:435–44.
138. Friedrich R, Friederici AD. Mathematical logic in the human brain: syntax. *PLoS One* 2009;4:e5599.
139. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. *In vitro* tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front Bioeng Biotechnol* 2016;4.
140. Shay C, Teng Y. Evaluating the anticancer activity of natural products using a novel 3D culture model, 2022, p. 159–64.
141. Kebede T, Gadisa E, Tufa A. Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: a possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. *PLoS One* 2021;16:e0249253.
142. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, 2005;58:1–26.
143. Runyoro DK, Matee MI, Ngassapa OD, Joseph CC, Mbwapbo ZH. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-candida activity. *BMC Complement Altern Med* 2006;6:11.
144. Mabona U, Viljoen A, Shikanga E, Marston A, Van Vuuren S. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. *J Ethnopharmacol* 2013;148:45–55.
145. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceutics* 2013;6:1451–74.
146. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016;6:71–9.
147. Zia U, Haq K, Shafiullah K. *In vitro* antimicrobial activity of the chemical constituents of *Cirsium arvense* (L). *Scop. Journal of Medicinal Plants Research* 2013;7:1894–5.
148. Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:268–80.

149. Nazaruk J, Czechowska SK, Markiewicz R, Borawska MH. Polyphenolic compounds and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. *Nat Prod Res* 2008;22:1583–8.
150. Karasakal A. Antioxidant, antimicrobial activities and total flavonoid contents of *Cirsium bulgaricum* DC. leaf extracts. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2015;1:43–43.
151. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved Guideline 2010;2.
152. Menon T, Umamaheswari K, Kumarasamy N, Solomon S, Thyagarajan SP. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. *Acta Trop* 2001;80:151–4.
153. Imhof A, Balajee SA, Marr KA. New methods to assess susceptibilities of *Aspergillus* isolates to caspofungin. *J Clin Microbiol* 2003;41:5683–8.
154. Mock M, Monod M, Baudraz-Rosselet F, Panizzon RG. Tinea capitis dermatophytes: susceptibility to antifungal drugs tested *in vitro* and *in vivo*. *Dermatology* 1998;197:361–7.
155. Speeleveld E, Gordts B, Landuyt HW Van, Vroey C De, Raes-Wuytack C. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs. *Mycoses* 1996;39:37–40.
156. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29:533–8.
157. European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
158. Braciuliene A, Janulis V, Petrikaite V. The chemo-sensitizing effect of doxorubicin of apple extract-enriched triterpenic complex on human colon adenocarcinoma and human glioblastoma cell lines. *Pharmaceutics* 2022;14: 2593.
159. Dabkeviciute G, Maccioni E, Petrikaite V. Effect of sunitinib derivatives on glioblastoma single-cell migration and 3D cell cultures. *Am J Cancer Res* 2023; 13:1377–86.
160. Šermukšnytė A, Kantminienė K, Jonuškienė I, Tumosienė I, Petrikaitė V. The effect of 1,2,4-triazole-3-thiol derivatives bearing hydrazone moiety on cancer cell migration and growth of melanoma, breast, and pancreatic cancer spheroids. *Pharmaceutics* 2022;15:1026.
161. Kozyra M, Głowniak K. Phenolic acids in extracts obtained from the flowering herbs of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. growing in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2013;82:325–9.
162. Kozyra M, Biernasiuk A, Malm A, Chowaniec M. Chemical compositions and antibacterial activity of extracts obtained from the inflorescences of *Cirsium canum* (L.) all. *Nat Prod Res* 2015;29:2059–63.
163. Edo GI, Nwachukwu SC, Ali ABM, Yousif E, Jikah AN, Zainulabdeen K, et al. A review on the composition, extraction and applications of phenolic compounds. *Ecological Frontiers* 2025;45:7–23.
164. Cacique AP, Barbosa ÉS, Pinho GP de, Silvério FO. Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência e Agrotecnologia* 2020;44.
165. Jang M, Kim K-H, Kim G-H. Antioxidant capacity of thistle (*Cirsium japonicum*) in various drying methods and their protection effect on neuronal PC12 cells and *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants* 2020;9:200.
166. González-González RM, Barragán-Mendoza L, Peraza-Campos AL, Muñiz-Valencia R, Ceballos-Magaña SG, Parra-Delgado H. Validation of an HPLC-DAD method for

- the determination of plant phenolics. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2019;29: 689–93.
167. Feduraev P, Chupakhina G, Maslennikov P, Tacenko N, Skrypnik L. Variation in phenolic compounds content and antioxidant activity of different plant organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at different growth stages. *Antioxidants* 2019;8:237.
 168. Nazaruk J. Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from north–east region of Poland. *Fitoterapia* 2008;79:194–6.
 169. Vitalini S, Beretta G, Iriti M, Orsenigo S, Basilico N, Dall’acqua S, et al. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. 2011.
 170. Benetis R, Radušienė J, Janulis V, Benetis R. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* wild populations in Lithuania Correspondence to. n.d.
 171. Erian NS, Hamed HB, El-Khateeb AY, Farid M. Phytochemical, HPLC analysis and antibacterial activity of crude methanolic and aqueous extracts for some medicinal plant flowers. vol. 2. Article; 2016.
 172. Sha Y, Meng J, Zhang Y, Deng C, Wu D. Determination of volatile organic acids in tobacco by single-drop microextraction with in-syringe derivatization followed by GC-MS. *J Sep Sci* 2010;33:212–7.
 173. Ashirova ZB, Kuzhantaeva ZZ, Abdrassulova ZT, Shaimerdenova GZ, Atanbaeva GK. Studying phytochemical features of three *Asteraceae* herbs growing wild in Kazakhstan. *Floresta e Ambiente* 2021;28.
 174. Bitarishvili S, Clement G, Meyer C, Volkova P. Metabolic profiling of *Achillea millefolium* from the Chernobyl exclusion zone reveals the adaptive strategies to low-dose chronic radiation exposure. *Plant Physiology and Biochemistry* 2025;220: 109551.
 175. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava M. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. *Pharmacogn Rev* 2011;5:82.
 176. Street RA, Sidana J, Prinsloo G. *Cichorium intybus* : traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;2013:1–13.
 177. Tiley GED. Biological flora of the British Isles: *Cirsium arvense* (L.) Scop. *Journal of Ecology* 2010;98:938–83.
 178. Park YJ, Baek SA, Kim JK, Park SU. Integrated analysis of transcriptome and metabolome in *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC. *ACS Omega* 2020;5:29312–24.
 179. Demirtas I, Tufekci AR, Yaglioglu AS, Elmastas M. Studies on the antioxidant and antiproliferative potentials of *Cirsium arvense* subsp. *vestitum*. *J Food Biochem* 2017; 41:e12299.
 180. Yin J, Heo SI, Wang MH. Antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Cirsium japonicum* roots. *Nutr Res Pract* 2008;2:247.
 181. Kim HH, Jeong SH, Park MY, Bhosale PB, Abusaliya A, Kim HW, et al. Potential antioxidant and anti-inflammatory properties of polyphenolic compounds from *Cirsium japonicum* extract. *Int J Mol Sci* 2024;25:785.
 182. Lokman Hossain M, Monjur-Al-Hossain A, Kumar Sadhu S, Md Lokman Hossain C. HPLC profiling and evaluation of *in vitro* antioxidant activity of *Cirsium arvense* L. (Family: *Asteraceae*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2016;5:272–7.
 183. Lee JH, Jung HK, Han Y-S, Yoon YM, Yun CW, Sun HY, et al. Antioxidant effects of *Cirsium setidens* extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 2016;14:3777–84.
 184. Ghil J. *Cirsium japonicum* extract induces apoptosis and anti-proliferation in the human breast cancer cell line MCF-7. *Mol Med Rep* 2010;3.

185. Ranjbary AG, Bagherzadeh A, Sabbaghi SS, Faghihi A, Karimi DN, Naji S, et al. Chlorogenic acid induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Mol Biol Rep* 2023;50:9845–57.
186. Cho C, Kang L, Jang D, Jeon J, Lee H, Choi S, et al. *Cirsium japonicum* var. *maackii* and apigenin block Hif-2 α -induced osteoarthritic cartilage destruction. *J Cell Mol Med* 2019;23:5369–79.
187. Sonju JJ, Dahal A, Prasasty VD, Shrestha P, Liu Y-Y, Jois SD. Assessment of antitumor and antiproliferative efficacy and detection of protein-protein interactions in cancer cells from 3D tumor spheroids. *Curr Protoc* 2022; 2:e569.
188. Song JH, Kim MS, Lee SH et al. Hydroethanolic extract of *Cirsium setidens* ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by AMPK-PGC-1 α -SOD-mediated mitochondrial protection. *Phytomedicine* 2024;129:155633.
189. Kabir F, Katayama S, Tanji N, Nakamura S. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2014;57:359–65.
190. Su M, Liu F, Luo Z, Wu H, Zhang X, Wang D, et al. The antibacterial activity and mechanism of chlorogenic acid against foodborne pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Foodborne Pathog Dis* 2019;16:823–30.
191. Singh L, Kumar D, Antil R, Dahiya P. *Cirsium arvense* : a multi-potent weed. vol. 36. 2020.
192. Kenny O, Smyth TJ, Walsh D, Kelleher CT, Hewage CM, Brunton NP. Investigating the potential of under-utilised plants from the *Asteraceae* family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chem* 2014;161:79–86.
193. Borawska MH, Czechowska SK, Markiewicz R, Socha K, Nazaruk J, Pałka J, et al. Enhancement of antibacterial effects of extracts from *Cirsium* species using sodium picolinate and estimation of their toxicity. *Nat Prod Res* 2010; 24:554–61.
194. Tang X, Xie M, Gou J, Chen L, Tian J, Zhang X, et al. Antibacterial activity of plants in *Cirsium*: a comprehensive review. *Chin J Integr Med* 2024;30:835–41.

**MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ,
KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS
TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS**

1. Griškevičienė, U., Ivanauskas, L., Petrikaitė, V. (2025). Anticancer properties of *Cirsium vulgare* (Savi) ten. Dry extracts from different plant parts and phenological stages of Raw material collection. Scientific Reports, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-96329-4> [S1] [M.kr.: M003] [Citav. rodiklis: 3.8, bendr. cit. rod.: 5.68, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)]
2. Griškevičienė, U., Dambrauskienė, J., Marksa, M., Maželienė, Žaneta, Vainorienė, R., Ivanauskas, L. (2024). Effect of the Phenological Stage on the Phenolic Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. Extracts. Life, 14(9), 1-24. <https://doi.org/10.3390/life14091191> [S1] [M.kr.: M003, M001, N010] [Citav. rodiklis: 3.2, bendr. cit. rod.: 3.801, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)]
3. Griškevičienė, U., Marksa, M., Ževžikovienė, A., Ževžikovas, A., Ivanauskas, L. (2022). Evaluation of free amino acids in *Cirsium vulgare* (Bull thistle) plant materials using gas chromatography–mass spectrometry. Chemija. Vilnius : Lietuvos Mokslų Akademija, 2022, Vol. 33, No. 3., 73-78. <https://doi.org/10.6001/chemija.v33i3.4749> [S1] [M.kr.: M003] [Citav. rodiklis: 0.6, bendr. cit. rod.: 6.9, kvartilis: Q4 (2022. InCites JCR SCIE)]
4. Griškevičienė, U., Marksa, M., Ževžikovienė, A., Kazlauskienė, D., Vainorienė, R., Ževžikovas, A., Ivanauskas, L. (2021). *Cirsium vulgare* leaves: isolation and identification of phenolic compounds. Chemija. Vilnius : Lietuvos Mokslų Akademija, 2021, Vol. 32, No. 3-4, 92-99. <https://doi.org/10.6001/chemija.v32i3-4.4547> [S1] [M.kr.: M003] [Citav. rodiklis: 0.638, bendr. cit. rod.: 7.462, kvartilis: Q4 (2021. InCites JCR SCIE)]

**MOKSLINIŲ KONFERENCIJŲ,
KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS
TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS**

1. Biennial Plant *Cirsium Vulgare* Savi Ten. Comparison of Chemical Composition and Antioxidant Activity during Two Years Grow; Griškevičienė, Urtė; Marksa, Mindaugas; Vainorienė, Rimanta; Ivanauskas, Liudas IECPS 2024: The 3rd International Electronic Conference on Plant Sciences : Online, 15–17 January 2024
2. Ethanolic extracts of *Cirsium vulgare* Savi Ten. antioxidant activity Griškevičienė, Urtė; Marksa, Mindaugas; Vainorienė, Rimanta; Ivanauskas, Liudas; International Conference of Life Sciences The COINS 2023: book of abstracts: [April 24–27, 2023, Vilnius, Lithuania] / Vilnius University. Vilnius : Vilnius University, 2023., p. 3–3.
3. Qualitative evaluation of phenolic compounds and free amino acids in *Cirsium vulgare* plant raw materials Griškevičienė, Urtė; Ževžikovienė, Augusta; Marksa, Mindaugas; Ževžikovas, Andrejus; Ivanauskas, Liudas; Planta Medica : 70th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) : August 28–31, 2022, Thessaloniki, Greece : abstracts. Stuttgart ; New York : George Thieme, 2022, vol. 88, no. 15., p.
4. Qualitative Evaluation of free Amino Acids in *Cirsium Vulgare* Plant Raw Materials. Griškevičienė, Urtė; Marksa, Mindaugas; Ževžikovienė, Augusta; Ževžikovas, Andrejus; Ivanauskas, Liudas; The Joint International Scientific Practical Conference Contemporary Pharmacy: Issues, Challenges and Expectations 2022 – CPICE-PSP 2022 : abstract book : May 6th, 2022, Kaunas, Lithuania / Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Science
5. Optimisation of Extraction Conditions for Phenolic Compounds from *Cirsium vulgare* Leaves. Griškevičienė, Urtė; Marksa, Mindaugas; Ževžikovienė, Augusta; Ževžikovas, Andrejus; Ivanauskas, Liudas; The Vital Nature Sign: 15th International scientific conference The Vital Nature Sign : May 20th–21st, 2021, Kaunas, Lithuania : abstract book / [Editors: Audrius Maruška, Nicola Tiso, Vilma Kaškonienė, Mantas Stankevičius]. Kaunas: Vytautas Magnus University.

PRIEDAI

P.1 lentelė. DC–MS tyrimo metu nustatytų aminorūgščių statistškai reikšmingi skirtumai

A	2021 m.						2022 m.							
	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12
L-alaninas	0,01 ± 0,00 f	0,01 ± 0,00 f	1,05 ± 0,03 c	0,61 ± 0,03 d	1,33 ± 0,03 b	0,61 ± 0,03 d	0,62 ± 0,03 d	1,89 ± 0,03 a	0,05 ± 0,00 e,f	0,16 ± 0,03 c	0,07 ± 0,03 e,f	0,04 ± 0,00 f	0,03 ± 0,00 f	0,01 ± 0,00 f
Glicinas	0,00 ± 0,00 e	0 ± 0 f	0,71 ± 0,02 c	0,38 ± 0,02 d	0,86 ± 0,02 b	0,37 ± 0,02 d	0,34 ± 0,02 d	1,40 ± 0,02 a	0,02 ± 0,00 f	0,06 ± 0,00 e,f	0,02 ± 0,00 f	0,02 ± 0,00 f	0,01 ± 0,00 f	0 ± 0 f
L-valinas	0 ± 0 f	0 ± 0 f	0,5 ± 0,02 c	0,3 ± 0,02 d	0,58 ± 0,02 b	0,27 ± 0,02 d	0,27 ± 0,02 d	1,06 ± 0,02 a	0,02 ± 0,00 f	0,08 ± 0,02 c	0,03 ± 0,00 e,f	0,01 ± 0,00 f	0,01 ± 0,00 f	0 ± 0 f
L-leucinas	0,01 ± 0,00 e	0 ± 0 g	1,11 ± 0,04 c	0,63 ± 0,04 d	1,24 ± 0,04 b	0,56 ± 0,04 d	0,57 ± 0,04 d	2,33 ± 0,04 a	0,03 ± 0,00 f,g	0,13 ± 0,04 f	0,05 ± 0,00 f,g	0,02 ± 0,00 f,g	0,02 ± 0,00 f,g	0 ± 0 g
Izoleucinas	0 ± 0 f	0 ± 0 f	0,32 ± 0,01 c	0,18 ± 0,01 d	0,38 ± 0,01 b	0,18 ± 0,01 d	0,17 ± 0,01 d	0,72 ± 0,01 a	0,01 ± 0,00 f	0,05 ± 0,01 c	0,02 ± 0,00 f	0,01 ± 0,00 f	0,01 ± 0,00 f	0 ± 0 f
L-prolinas	0,01 ± 0,00 e	0 ± 0 g	0,78 ± 0,04 c	0,44 ± 0,04 e	1,16 ± 0,04 b	0,49 ± 0,04 e	0,65 ± 0,04 d	2,58 ± 0,04 a	0,04 ± 0,00 g	0,20 ± 0,04 f	0,06 ± 0,00 g	0,03 ± 0,00 g	0,02 ± 0,00 g	0 ± 0 g
L-metioninas	0 ± 0 f	0 ± 0 f	0,12 ± 0,00 c	0,09 ± 0,00 d	0,17 ± 0,00 b	0,08 ± 0,00 d,e	0,08 ± 0,00 e	0,24 ± 0,00 a	0 ± 0 f	0,01 ± 0,00 f	0 ± 0 f	0 ± 0 f	0 ± 0 f	0 ± 0 f
L-serinas	0,01 ± 0,00 f	0 ± 0 h	0,55 ± 0,02 c	0,36 ± 0,02 d	0,79 ± 0,02 b	0,38 ± 0,02 d	0,30 ± 0,02 e,f	1,22 ± 0,02 a	0,02 ± 0,00 g,h	0,08 ± 0,00 g	0,04 ± 0,00 g,h	0,02 ± 0,00 g,h	0,02 ± 0,00 g,h	0 ± 0 h
L-treoninas	0,01 ± 0,00 g	0 ± 0 g	0,45 ± 0,02 c	0,29 ± 0,02 d	0,63 ± 0,02 b	0,32 ± 0,02 d	0,22 ± 0,02 c	1,04 ± 0,02 a	0,02 ± 0,00 f,g	0,06 ± 0,00 f	0,04 ± 0,00 f,g	0,02 ± 0,00 f,g	0,02 ± 0,00 f,g	0 ± 0 g
L-fenilalaninas	0 ± 0 f	0 ± 0 f	0,63 ± 0,02 b	0,28 ± 0,02 d	0,60 ± 0,02 b	0,38 ± 0,02 c	0,22 ± 0,02 c	1,22 ± 0,02 a	0,06 ± 0,02 f	0,05 ± 0,00 f	0,01 ± 0,00 f	0 ± 0 f	0 ± 0 f	0 ± 0 f
L-asparto r.	0 ± 0 f	0 ± 0 f	1,10 ± 0,04 c	0,55 ± 0,04 d	1,27 ± 0,04 b	0,61 ± 0,04 d	0,54 ± 0,04 d	2,68 ± 0,04 a	0,02 ± 0,04 f	0,16 ± 0,01 c	0,06 ± 0,00 e,f	0,02 ± 0,00 f	0,02 ± 0,00 f	0 ± 0 f
L-glutamato r.	0 ± 0 f	0 ± 0 f	1,51 ± 0,06 c	0,77 ± 0,06 d	2,05 ± 0,06 b	0,96 ± 0,06 d	0,86 ± 0,06 d	3,78 ± 0,06 a	0 ± 0 f	0,25 ± 0,06 c	0,09 ± 0,00 e,f	0,03 ± 0,00 f	0,03 ± 0,00 f	0 ± 0 f

A	2021 m.						2022 m.							
	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12
L-lizinas	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0,50 ± 0,04 ^c	0,26 ± 0,04 ^d	0,88 ± 0,04 ^b	0,24 ± 0,04 ^d	0,20 ± 0,04 ^d	2,89 ± 0,04 ^a	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e
L-histidinas	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0,07 ± 0,00 ^a	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b
L-tirozinas	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^d	0,3 ± 0,01 ^c	0,18 ± 0,01 ^d	0,34 ± 0,01 ^b	0,15 ± 0,01 ^d	0,15 ± 0,01 ^d	0,80 ± 0,01 ^a	0 ± 0 ^e	0,03 ± 0,00 ^e	0,01 ± 0,00 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^e
B	2021 m.						2022 m.							
	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12
L-alaninas	N/N	0,67 ± 0,02 ^c	0,85 ± 0,02 ^b	0,24 ± 0,02 ^f	0,49 ± 0,02 ^d	0,42 ± 0,02 ^{d,e}	0,34 ± 0,02 ^e	N/N	1,00 ± 0,02 ^a	0,87 ± 0,02 ^b	0,72 ± 0,02 ^c	0,04 ± 0,00 ^g	0,46 ± 0,02 ^d	0,18 ± 0,02 ^f
Glicinas	N/N	0,42 ± 0,01 ^{c,d}	0,58 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,01 ^g	0,38 ± 0,01 ^d	0,30 ± 0,01 ^e	0,23 ± 0,01 ^f	N/N	0,68 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,01 ^b	0,44 ± 0,01 ^c	0,01 ± 0,00 ^h	0,25 ± 0,01 ^{e,f}	0,13 ± 0,01 ^g
L-valinas	N/N	0,27 ± 0,01 ^e	0,33 ± 0,01 ^d	0,09 ± 0,01 ^g	0,18 ± 0,01 ^f	0,16 ± 0,01 ^f	0,15 ± 0,01 ^f	N/N	0,61 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,01 ^b	0,44 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,00 ^h	0,26 ± 0,01 ^e	0,05 ± 0,01 ^{g,h}
L-leucinas	N/N	0,65 ± 0,02 ^d	0,77 ± 0,02 ^{b,c}	0,18 ± 0,02 ^g	0,39 ± 0,02 ^e	0,35 ± 0,02 ^f	0,29 ± 0,02 ^f	N/N	1,10 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,02 ^b	0,72 ± 0,02 ^{c,d}	0,03 ± 0,00 ^h	0,43 ± 0,02 ^e	0,11 ± 0,02 ^g
Izoleucinas	N/N	0,17 ± 0,00 ^d	0,19 ± 0,00 ^d	0,05 ± 0,00 ^f	0,11 ± 0,00 ^e	0,09 ± 0,00 ^e	0,09 ± 0,00 ^e	N/N	0,37 ± 0,00 ^a	0,32 ± 0,00 ^b	0,28 ± 0,00 ^c	0,01 ± 0,00 ^g	0,18 ± 0,00 ^d	0,03 ± 0,00 ^{f,g}
L-prolinas	N/N	0,77 ± 0,03 ^{d,e}	1,10 ± 0,03 ^b	0,35 ± 0,03 ^g	0,76 ± 0,03 ^{d,e}	0,65 ± 0,03 ^{e,f}	0,79 ± 0,03 ^d	N/N	1,54 ± 0,03 ^a	0,95 ± 0,03 ^c	1,11 ± 0,03 ^b	0,04 ± 0,00 ^h	0,56 ± 0,03 ^f	0,24 ± 0,03 ^g
L-metioninas	N/N	0,10 ± 0,00 ^b	1,10 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,00 ^e	0,07 ± 0,00 ^c	0,06 ± 0,00 ^c	0,04 ± 0,00 ^d	N/N	0,15 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^a	0,09 ± 0,00 ^b	0 ± 0 ^f	0,05 ± 0,00 ^d	0,01 ± 0,00 ^e
L-serinas	N/N	0,53 ± 0,01 ^c	0,65 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,01 ^g	0,40 ± 0,01 ^d	0,36 ± 0,01 ^{d,e}	0,29 ± 0,01 ^{e,f}	N/N	0,81 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,01 ^b	0,50 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,00 ^h	0,26 ± 0,01 ^f	0,13 ± 0,01 ^g

B	2021 m.						2022 m.							
	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12
L-treoninas	N/N	0,33 ± 0,01 c	0,44 ± 0,01 b	0,13 ± 0,01 g	0,28 ± 0,01 d ^e	0,24 ± 0,01 e ^f	0,21 ± 0,01 f	N/N	0,69 ± 0,01 a	0,30 ± 0,01 c,d	0,43 ± 0,01 b	0,02 ± 0,0 h	0,22 ± 0,01 f	0,09 ± 0,01 g
L-fenilalaninas	N/N	0,26 ± 0,01 e	0,39 ± 0,01 d	0,53 ± 0,01 c	0,16 ± 0,01 f	0,15 ± 0,01 f ^g	0,10 ± 0,01 g ^h	N/N	0,71 ± 0,01 a	0,59 ± 0,01 b	0,40 ± 0,01 d	0,05 ± 0,00 i	0,18 ± 0,01 f	0,05 ± 0,01 i
L-asparto r.	N/N	2,00 ± 0,07 c	2,28 ± 0,07 b	0,67 ± 0,07 f	1,14 ± 0,07 d ^e	0,92 ± 0,07 d	1,12 ± 0,07 d ^e	N/N	3,04 ± 0,07 a	2,80 ± 0,07 a	1,98 ± 0,07 c	0,05 ± 0,01 g	1,22 ± 0,07 d	0,51 ± 0,07 f
L-glutamato r.	N/N	1,28 ± 0,05 d	1,81 ± 0,05 c	0,54 ± 0,05 f, g	1,18 ± 0,05 d ^e	0,71 ± 0,05 f	1,02 ± 0,05 e	N/N	2,61 ± 0,05 a	2,32 ± 0,05 b	1,72 ± 0,05 c	0 ± 0 ^h	1,14 ± 0,05 d ^e	0,43 ± 0,05 g
L-lizinas	N/N	0,05 ± 0,01 g	0,37 ± 0,01 c	0,08 ± 0,01 g	0,21 ± 0,01 d	0,13 ± 0,01 f	0,15 ± 0,01 e ^f	N/N	0,61 ± 0,01 a	0,48 ± 0,01 b	0,46 ± 0,01 b	0 ± 0 ^h	0,20 ± 0,01 d ^e	0 ± 0 ^h
L-histidinas	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
L-tirozinas	N/N	0,08 ± 0,00 d	0,16 ± 0,00 c	0,05 ± 0,00 e	0,10 ± 0,00 d	0,09 ± 0,00 d	0,09 ± 0,00 d	N/N	0,28 ± 0,00 a	0,21 ± 0,00 b	0,18 ± 0,00 c	0 ± 0 ^f	0,11 ± 0,00 d	0,04 ± 0,00 e
C	2021 m.						2022 m.							
	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12
	N/N	0,07 ± 0,01 f	0,09 ± 0,01 f	0,09 ± 0,01 f	0,18 ± 0,01 d	0,21 ± 0,01 c	0 ± 0	N/N	0,19 ± 0,01 c,d	0,35 ± 0,01 a	0,35 ± 0,01 a	0,31 ± 0,01 b	0,18 ± 0,01 d	0,13 ± 0,01 e
	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0,18 ± 0,00 b	0,15 ± 0,00 a	0,15 ± 0,00 a	0,15 ± 0,00 a	0,07 ± 0,00 c	0,05 ± 0,00 d
	N/N	0,01 ± 0,00 f, g	0,01 ± 0,00 f, g	0 ± 0	0,01 ± 0,00 f, g	0,02 ± 0,00 f, g	0 ± 0	N/N	0,14 ± 0,00 c	0,18 ± 0,00 b	0,20 ± 0,00 a	0,17 ± 0,00 b	0,11 ± 0,00 d	0,06 ± 0,00 e
	N/N	0,01 ± 0,00 e	0,01 ± 0,00 e	0 ± 0	0 ± 0	0,02 ± 0,00 e	0 ± 0	N/N	0,27 ± 0,00 b	0,28 ± 0,00 b	0,32 ± 0,00 b	0,26 ± 0,00 b	0,18 ± 0,00 c	0,08 ± 0,00 d
Izoleucinas	N/N	0,01 ± 0,00 e	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,01 ± 0,00 e	0 ± 0	N/N	0,11 ± 0,00 b	0,12 ± 0,00 b	0,13 ± 0,00 a	0,12 ± 0,00 b	0,08 ± 0,00 c	0,04 ± 0,00 d

C	2021 m.							2022 m.						
	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12	06.20	07.04	07.18	08.01	08.15	08.29	09.12
L-prolinas	N/N	0,01 ± 0,00 g	0,02 ± 0,00 g	0,01 ± 0,00 g	0,04 ± 0,00 f,g	0,36 ± 0,00 a	0 ± 0	N/N	0,07 ± 0,00 d	0,21 ± 0,00 c	0,26 ± 0,00 b	0,25 ± 0,00 b	0,05 ± 0,00 d,e	0,05 ± 0,00 d,e
L-metioninas	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0 ± 0	0,04 ± 0,00 a	0,03 ± 0,00 b	0,02 ± 0,00 c	0,01 ± 0,00 d	0 ± 0
L-serinas	N/N	0,01 ± 0,00 e	0 ± 0	0 ± 0	0,01 ± 0,00 e	0,03 ± 0,00 d	0 ± 0	N/N	0,07 ± 0,00 c	0,22 ± 0,00 a	0,22 ± 0,00 a	0,15 ± 0,00 b	0,06 ± 0,00 c	0,06 ± 0,00 c
L-treoninas	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,02 ± 0,00 f	0 ± 0	N/N	0,07 ± 0,00 d	0,10 ± 0,00 c	0,20 ± 0,00 a	0,16 ± 0,00 b	0,05 ± 0,00 c	0,06 ± 0,00 d
L-fenilalaninas	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0,05 ± 0,00 d	0,14 ± 0,00 a	0,11 ± 0,00 b	0,09 ± 0,00 c	0,05 ± 0,00 d	0,01 ± 0,00 e
L-asparto r.	N/N	0,02 ± 0,00 e	0,03 ± 0,01 e	0,01 ± 0,01 e	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0,13 ± 0,01 d	0,72 ± 0,01 a	0,54 ± 0,01 b	0,40 ± 0,01 c	0,09 ± 0,01 d	0,10 ± 0,01 d
L-glutamato r.	N/N	0 ± 0	0,09 ± 0,01 c	0,04 ± 0,01 d	0,11 ± 0,01 c	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0,13 ± 0,01 c	0,57 ± 0,01 a	0,57 ± 0,01 a	0,45 ± 0,01 b	0,12 ± 0,01 c	0,11 ± 0,01 c
L-lizinas	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
L-histidinas	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
L-tirozinas	N/N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	N/N	0,03 ± 0,00 d	0,06 ± 0,00 b	0,07 ± 0,00 a	0,04 ± 0,00 c	0,01 ± 0,00 e	0,01 ± 0,00 e

Lentelėje pateikti aminorūgščių kiekio pokyčiai dygiųjų usnių augalinių žaliavų ėminiuose: A – lapų, B – žiedynų, C – šaknų ėminiuose. Visos nurodytos raidės prie reikšmių ir standartinio nuokrypio (SN), rodo $p < 0,05$.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Urtė Griškevičienė
Address: Department of Analytical and Toxicology chemistry, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Sukilėlių 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania
E-mail: urte.griskeviciene@lsmu.lt

Education:

2020–present	Lithuanian University of Health Sciences, PhD studies in Pharmacy
2016–2018	Lithuanian University of Health Sciences, Master's degree in Public Health management
2011–2016	Lithuanian University of Health Sciences, Master's degree in Pharmacy
1999–2011	Kaunas “Jonas Paulius II” gymnasium

Qualification:

2022–present	Advanced practice pharmacist
--------------	------------------------------

Work experience:

2024–present	Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical and Toxicology chemistry, junior assistant
2025–present	UAB “Eurovaistinė”, Customer Experience and Service Development Director
2022–2025	UAB “Tamro”, HR business partner in retail
2017–2022	UAB “Eurovaistinė”, pharmacy manager
2017–2019	UAB “Eurovaistinė”, selection manager
2016–2017	UAB “Eurovaistinė”, pharmacist
2013–2016	UAB “Eurovaistinė”, pharmacy assistant
2012–2013	“GSK”, key account manager

Memberships:

2022–present	Pharmacognosy club
--------------	--------------------

PADĖKA

Pirmiausia padėką noriu skirti savo darbo vadovui prof. Dr. Liudui Ivanuskui, kuris gebėjo pastūmėti kada reikia ir nespausti, kada laikas skirtas apmastymams. Taip pat, laboratorijos kolegai, didžiausiam pagalbininkui atliekant chromatografinius tyrimus, kuris juokaudamas pasižadėjo baigti kartu doktorantūrą, jei ir aš tam pasiryšiu – Mindaugui Marksai, bei žinoma jo nuostabiai žmonai Justei Marksienei, kuri visada buvo labai teisingas, gerąją prasme tiesmukiškas žmogus, su ypatingai geru humoro jausmu. Didžiausia padėka „skrieja“ visais analizinės ir toksikologinės katedros komandai. Žodis „komanda“ čia ne veltui paminėta. Tai komanda iš didžiosios „K“, kuri ne tik nepatingės perskaityti, patarti, bet ir nuteiks tam ko neišvengsi. „Visi turėjom šį džiaugsmą, dabar tavo eilė“ – pasakė gerbiama kolegė Augusta Ževžikovienė. Be viso to, labai dėkoju už palaikymą ir raminančius žodžius, nuo doktorantūros pradžios iki pat darbų pabaigos. Taip pat, be galo didelis ačiū profesorei Vilmai Petrikaitei, už jos indėlį į priešvėžinius tyrimus. Dar nuo magistro laikų, šis profesionalas man įdiegė didelius vertybinius pamatus ir atsakingumo jausmą, kuris yra susijęs su mokslinių darbų atlikimu. Be galo dėkoju savo vyrui Simonui, mamai ir tėčiui, ir na žinoma vaikams, kurių egzistavimas leido doktorantūros ir disertacijos rašymo metais, turėti gaivių, kasdienių akimirkų, leidžiančių atsikvėpti nuo disertacijos rengimo ir su tuo susijusių veiklų. Kas be ko, be galo dėkoju savo trečiojo straipsnio bendraautorei Justinai Dambrauskienei, už parodytą teisingą kelią rašant kokybišką straipsnį, už palaikymą ir visas teisingas pastabas, kurios padėjo pasiekti vienu metu jau atrodo nepasiekiamo rezultato. Na ir ačiū sau, kad reikia ar nereikia, imu ir darau. Trečias „vaikas“ jau tuoj atvyks į šį pasaulį.