

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

PARASTĀ APIŅA (*HUMULUS LUPULUS*) *IN VITRO* AUGU UN AUDU KULTŪRU IZVEIDE UN NO TĀM IEGŪTU EKSTRAKTU ANTIRADIKĀLĀS UN ANTIMIKROBIĀLĀS AKTIVITĀTES RAKSTUROŠANA

Bakalaura darbs

Autors: Madara Balode

Stud. apl. Nr. mb18142

Darba vadītājs: Mag. biol. Elza Kaktiņa

RĪGA 2020

## KOPSAVILKUMS

Darba mērķis bija iegūt parastā apiņa *in vitro* augu un audu (kallusu) kultūras un raksturot no tām, kā arī no lapu drogām, iegūtu ekstraktu antiradikālo un antimikrobiālo aktivitāti.

*In vitro* augu un audu kultūru ieguvei tika ievākti trīs apiņa šķirņu paraugi. Analizējot kopējo fenolu saturu, antiradikālo un antimikrobiālo aktivitāti, tika savstarpēji salīdzināti drogu, *in vitro* augu un kallusu kultūru ekstrakti, kā arī izvērtētas efektīvākās ekstrakcijas metodes.

Kallusu kultūras tika iegūtas uz ar augšanas regulatoriem bagātinātas *McCown Woody Plant* barotnes. Lielāko fenolu savienojumu saturu un augstāko antiradikālo aktivitāti uzrādīja visu šķirņu drogu ekstrakti, vienlaikus antimikrobiālā aktivitāte tika novērota arī divu šķirņu *in vitro* augu un kallusu ekstraktiem. 30/30 etanola-glicerīna šķīdums tika konstatēts kā efektīvākais no izmantotajiem šķīdinātājiem.

*Key words:* parastais apinis, augu audu kultūras, augu ekstrakti, kopējais fenolu saturs, antiradikālā aktivitāte, antimikrobiālā aktivitāte.

## SUMMARY

*Thesis title:* Development of *in vitro* plant and tissue cultures of common hop (*Humulus lupulus*) and characterization of antiradical and antimicrobial activity of its extracts.

The aim of the thesis was to establish *in vitro* plant and tissue (callus) cultures of common hop and to characterize its as well as wild plant leaf extract antiradical and antimicrobial activities.

To establish *in vitro* plant and tissue cultures, samples of three common hop varieties were collected. Different extraction methods of the plant material were compared as well as total phenolic content, antiradical and antimicrobial activity.

Callus cultures were established on *McCown Woody Plant* medium supplemented with various growth regulators. Wild plant extracts possessed the highest total phenolic content and antiradical activity in all hop varieties. Antimicrobial activity was shown in all wild plant extracts as well as in callus and *in vitro* culture extracts of two hop varieties. 30/30 ethanol-glycerol solution was found to be the most efficient of the solvents used.

*Key words:* common hop, plant tissue cultures, plant extracts, total phenolic content, antiradical activity, antimicrobial activity.

## DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

- 2,4-D - 2,4-dihlorfenoksietikskābe
- ARA – antiradikālā aktivitāte
- BAP - 6-benzilaminopurīns
- DNS – dezoksiribonukleīnskābe
- DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils (angl., - 2,2 – diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- DW – sausā masa (angl., - dry weight)
- ER $\alpha$  – estrogēnu receptors  $\alpha$
- ER $\beta$  – estrogēnu receptors  $\beta$
- FD – *Fredos Derlingieji* (parastā apiņa šķirne)
- GABA -  $\gamma$ -aminosviestskābe (angl., -  $\gamma$ -aminobutyric acid)
- IC50 – puse no maksimālās inhibējošās koncentrācijas (angl., - the half maximal inhibitory concentration)
- ISTR – *Istrinskij-15* (parastā apiņa šķirne)
- LMKK – Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcija
- LU – Latvijas Universitāte
- MBC – minimālā bakteriostatiskā koncentrācija (angl., - minimal bacteriostatic concentration)
- MES – 2-(N-morfolino)etānsulfonskābe (angl., - 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)
- MFC – minimālā fungicīdā koncentrācija (angl., minimal fungicidal concentration)
- MIC – minimālā inhibējošā koncentrācija (angl., - minimal inhibitory concentration)
- MS – Murashige & Skoog
- NAA -  $\alpha$ -naftiletikskābe (angl., 1-Naphthaleneacetic acid)
- ROS – reaktīvā skābekļa formas (angl., - reactive oxygen species)
- RPM – apgriezieni minūtē (angl., - revolutions per minute)
- SD – standartnovirze (angl., - standard deviation)
- SMO – *Smoļistij* (parastā apiņa šķirne)
- TDZ - tidiazurons
- TPC – kopējais fenolu daudzums (angl., total phenolic content)
- VEGF – vaskulārā endotēlija augšanas faktors (angl., - vascular endothelial growth factor)
- WP - *McCown Woody Plant*

# SATURS

<b>IEVADS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. LITERATŪRAS ANALĪZE</b> .....	<b>8</b>
1.1. Parastā apiņa ( <i>Humulus lupulus</i> ) raksturojums .....	8
1.1.1. Parastā apiņa botāniskais raksturojums .....	8
1.1.2. Parastā apiņa bioķīmiskais raksturojums .....	9
1.1.3. Parastā apiņa sekundāro metabolītu antioksidatīvās īpašības .....	11
1.1.4. Parastā apiņa sekundāro metabolītu antimikrobiālās īpašības .....	11
1.1.5. Citas apiņu bioloģiski aktīvo savienojumu perspektīvas izmantošanai cilvēka veselības uzlabošanā.....	12
1.2. Augu un audu kultūras .....	14
1.2.1. Augu audu kultūru iedalījums.....	14
1.2.2. Auga audu kultūras iniciēšana un uzturēšana .....	14
1.2.3. Kallusu kultūru raksturojums.....	16
<b>2. MATERIĀLI UN METODES</b> .....	<b>17</b>
2.1. Materiāli.....	17
2.1.1. Reāģenti, buferšķīdumi, kultivēšanas un audzēšanas barotnes .....	17
2.1.2. Šķīdumi .....	18
2.1.3. Iekārtas un materiāli .....	20
2.1.4. Mikroorganismu kultūras .....	21
2.1.5. Datorprogrammas.....	21
2.2. Metodes.....	22
2.2.1. Bartoņu sagatavošana .....	22
2.2.2. <i>Humulus lupulus</i> eksplantu sagatavošana un sterilizēšana.....	22
2.2.3. Kallusu kultūru audzēšana un uzturēšana.....	23
2.2.4. <i>Humulus lupulus</i> sēklu ievākšana un sterilizēšana.....	23
2.2.5. Sēklu diedzēšana un sterila <i>in vitro</i> auga dzinumu kultūras iegūšana .....	24
2.2.6. Ekstraktu pagatavošana no drogām, <i>in vitro</i> augiem un kallusiem.....	24
2.2.7. Parastā apiņa ekstraktu kopējā fenolu (TPC) satura noteikšana.....	24
2.2.8. <i>Humulus lupulus</i> ekstraktu antiradikālās aktivitātes (ARA) noteikšana ....	25
2.2.9. <i>Humulus lupulus</i> ekstraktu antimikrobiālās aktivitātes noteikšana.....	25
2.2.10. Datu analīze.....	26
<b>3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA</b> .....	<b>27</b>
3.1. Eksplantu un sēklu sterilizēšana.....	27
3.2. Kallusu un <i>in vitro</i> augu kultūru iegūšana un uzturēšana .....	28
3.3. Parastā apiņa ekstraktu raksturošana pēc kopējā fenolu satura un antiradikālās aktivitātes.....	29
3.4. Parastā apiņa ekstraktu antimikrobiālās aktivitātes raksturošana .....	35
3.5. Tālākie pētījuma mērķi .....	36
<b>SECINĀJUMI</b> .....	<b>37</b>
<b>PATEICĪBAS</b> .....	<b>38</b>
<b>LITERATŪRAS SARAKSTS</b> .....	<b>39</b>
<b>Pielikumi</b> .....	<b>44</b>

## IEVADS

Parastais apinis (*Humulus lupulus*) ir pārtikas industrijā plaši lietots ārstniecisks augs. Visbiežāk sievišķā auga reproduktīvās daļas (rogas) izmanto alus ražošanā to veidotās rūgtās garšas un antiseptisko īpašību dēļ, kā arī tautas medicīnā, lai ārstētu vieglus miega traucējumus un nervozitāti. Pēdējā desmitgadē interese par parastā apiņa sekundāro metabolītu pētniecību ir pieaugusi, jo apiņa sastāvā ir polifenolu un flavonoīdu savienojumi, kuriem ir novērota nozīmīga bioloģiskā un farmakoloģiskā aktivitāte, piemēram, pretiekaisuma, antioksidatīvā, antimikrobiālā, estrogēnā un pat pretvēža aktivitāte (Bocquet et al., 2018).

Paaugstināts pieprasījums pēc bioloģiski aktīviem un medicīniski nozīmīgiem sekundārajiem metabolītiem palielina spiedienu ražot šos savienojumus, izmantojot alternatīvus ceļus, piemēram, veidojot augu šūnu un audu kultūras *in vitro* (Gatica-Arias et al., 2012). Augu audu un šūnu kultūrām ir būtiska nozīme gan pētniecībā, gan komerciālu produktu ražošanā, jo no šīm kultūrām ir iespējams iegūt savienojumus, kurus nespēj producēt mikroorganismi, vai kuri nevar tikt iegūti ķīmiskās sintēzes ceļā. Šīs tehnoloģijas priekšrocība ir tā, ka šādi iespējams nodrošināt standartizētu, nepārtrauktu lielapjoma izejvielu ražošanu. Papildus tam, augu audu un šūnu kultūrām ir liela nozīme jaunu medikamentu atklāšanā, kā arī lauksaimniecībai būtisku kultūru attīstīšanā, ar ģenētiskās inženierijas palīdzību iegūstot īpatņus ar augstāku ražīgumu un lielāku izturību pret patogēniem un nelabvēlīgiem vides un klimatiskajiem apstākļiem (Mulabagal and Tsay, 2004).

Parastais apinis satur daudzus aktīvus savienojumus, kuri tiek plaši izmantoti ārstniecisku preparātu ražošanā (Karabin et al., 2016, Bocquet et al., 2018), taču tradicionālo kultūraugu audzēšanu būtiski ietekmē mikroklimats un sezonālitate (Apostolakis et al., 2014). Tāpēc kontrolētos apstākļos kultivētiem specifiski modificētām parastā apiņa audu un šūnu kultūrām ir liels potenciālais pielietojums standartizētu un kvalitatīvu aktīvo savienojumu ieguvē.

### **Darba mērķis:**

Iegūt parastā apiņa *Humulus lupulus in vitro* augu un audu kultūras un raksturot no tām, kā arī no lapu drogām, iegūtu ekstraktu antiradikālo un antimikrobiālo aktivitāti.

### **Darba uzdevumi:**

1. Ievākt 3 parastā apiņa šķirņu augus un veikt to eksplantu sterilizēšanu, kā arī dažādu augšanas barotņu izvērtēšanu kallusu kultūru ieguvei;

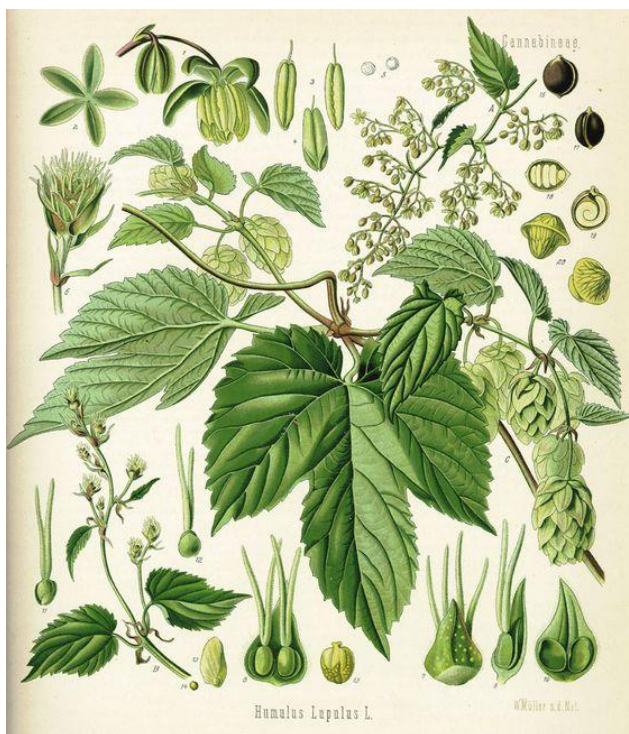
2. Ievākt 3 parastā apiņa šķirņu sēklas, veikt to sterilizēšanu *in vitro* augu ieguvei;
3. Izvērtēt dažādu ekstrakcijas metožu un šķīdinātāju efektivitāti attiecībā uz kopējo fenolu saturu, kā arī uz ekstraktu antiradikālo un antimikrobiālo aktivitāti;
4. Savstarpēji salīdzināt parastā apiņa lapu drogu, *in vitro* augu lapu un kallusu ekstraktu antiradikālo un antimikrobiālo aktivitāti, kā arī kopējo fenolu saturu.

# 1. LITERATŪRAS ANALĪZE

## 1.1. Parastā apiņa (*Humulus lupulus*) raksturojums

### 1.1.1. Parastā apiņa botāniskais raksturojums

Parastais apinis ir daudzgadīgs divmāju augs, kas klasificējams pie apiņu ģints (*Humulus*), kaņepju dzimtas (*Cannabaceae*) un rožu rindas (*Rosales*) (Almaguer et al, 2014). Tam ir kāpelējošs, vijīgs stublājs, kas spēj izaugt no 3 līdz 10 metriem. Lapas pie stublāja ir piestiprinātas pretēji, trīsstaraini līdz piecstaraini šķeltas ar zobotu plātnes malu (1.attēls). Apinim, kā divmāju augam, veidojas gan sievišķie, gan vīrišķie ziedi. Sievišķais augs zied no jūlija līdz augustam, tam ir novērojamas, dažādas zieda nobriešanas stadijas, līdz izveidojas čiekurveida auglķopa, kura satur nelielas sēkliņas (Plumlee, 2004, Shepard et al, 2000).



1. attēls. Franza Eugēna Kohlera parastā apiņa ilustrācija (no grāmatas *Medizinal-Pflanzen*, 1887).

Figure 1. Franz Eugen Kohler illustration of common hop (from book *Medizinal-Pflanzen*, 1887).

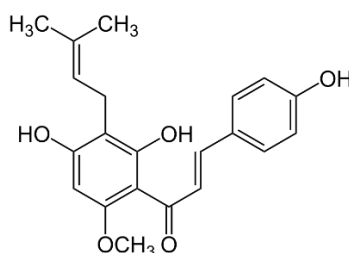
Apiņu ģints auga izcelsmes vieta ir Ziemeļamerika, Eiropa un Āzija, bet tas ir sastopams visā mērenajā klimata joslā. Komerciāliem nolūkiem to pārsvarā audzē Klusā okeāna piekrastē, bet savvaļā tas ir sastopams auglīgās augsnēs: mežos, ezeru, upju un purvu malās, kā arī dārzos (Plumlee, 2004).

Sievišķajās apiņu augļkopās ir lupulīna dziedzeri, kuri sekretē sveķus un ēteriskās eļļas. Šo savienojumu dēļ, apiņus plaši izmanto medicīnā un alus rūpniecībā (Karabin et al., 2016).

### 1.1.2. Parastā apiņa bioķīmiskais raksturojums

Apiņi satur tādus komponentus un ķīmiskus savienojumus kā sveķus, ēteriskās eļļas, olbaltumvielas, polifenolus, lipīdus, vaskus, celulozi un aminoskābes. Medicīnā, biotehnoloģiskajā un farmaceitiskajā rūpniecībā apiņi ir nozīmīgi tādu sekundāro metabolītu dēļ kā polifenoli, sveķi un ēteriskās eļļas. Pētījumi liecina, ka šiem savienojumiem piemīt plaša spektra pretvēža, antioksidatīvās un pretiekaisuma īpašības (Almaguer et al, 2014, Karabin et al., 2016).

Apiņos polifenoli sastāda aptuveni 4% no kopējās sausās masas. Pārsvārā tos var konstatēt sievišķo apiņu augļkopu jeb rogu biomasā. Piemēram, prenilflavonoīds ksantohumols tiek sekretēts tikai caur rogu lupulīna dziedzeriem un ir viena no sveķu sastāvdaļām. Polifenolu frakcija pārstāv plašu savienojumu klasi ar atšķirīgām strukturālajām īpašībām. Daļa no polifenoliem ir specifiski tieši apiņiem (Almaguer et al, 2014). Tikai apiņos ir konstatēts ksantohumols (2. attēls), desmetilksantohumols, 6-prenilnaringenīns, 8-prenilnaringenīns (Stevens et al., 1998). Tos var klasificēt flavonos, flavan-3-olos, fenol karboksilskābēs un citos polifenolu savienojumos. Apiņu polifenoli viegli oksidējas un kalpo kā spēcīgi antioksidanti, un daļa no tiem ir visaktīvākie fitoestrogēni augu valstī (Milligans et al., 1999, Almaguer et al, 2014 ).



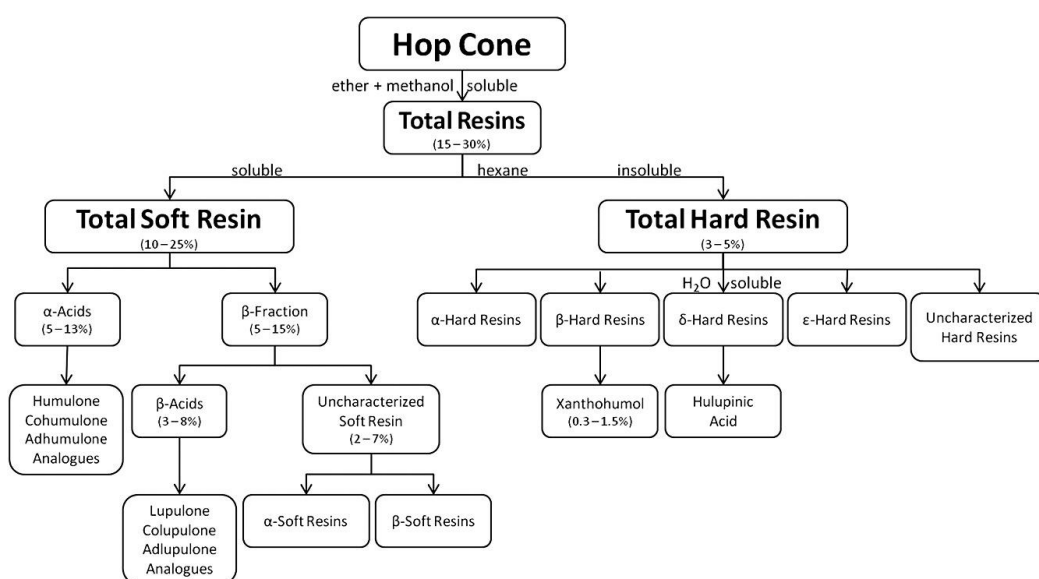
2. attēls. Ksantohumola molekulārā struktūra (Almaguer et al, 2014).

Figure 2. Molecular structure of xanthohumol resins (Almaguer et al, 2014).

Atkarībā no apiņu šķirnes un augšanas apstākļiem, sveķu sastāvs var būt 15-30% no kopējās sausās augu biomasas. Kopējos sveķus var iedalīt mīkstajos (10-25%) un cietajos (3-5%) sveķos (3. attēls). To ķīmiskās un fizikālās īpašības savā starpā atšķiras. Mīkstie sveķi pārsvārā ir dzeltenā krāsā un veido biezu viskozu, blīvu šķīdumu, kas ir līdzīgs medum. Cieto sveķu ekstrakti, veicot superkritisko CO<sub>2</sub> ekstrakciju, veido tumši zaļu pulveri (Almaguer et al, 2014).

Mīksto sveķu sastāvā ir atrodamas rūgtās  $\alpha$ -skābes, kas ir sešu humulonū analogu sajaukums (humulons, kohumulons un adhumulons), kā arī to analogs - rūgtās  $\beta$ -skābes.  $\beta$ -skābes veido lupulons un tā radniecīgās vielas: kolupulons un adlupulons.  $\beta$ -frakcijā ietilpst arī vēl neraksturoti mīkstie sveķi, kuros atrodamas ēterisko eļļu komponentes un apiņu vasks (Almaguer et al, 2014).

Tiek pieņemts, ka cietie ir cēlušies no mīksto vasku oksidācijas. To sastāvā ir  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  un vēl neraksturotie cietie sveķi. Ksantohumols ir vienīgais zināmais dabiskais sastopamais metilētais apiņu sveķis, kuram piemīt plašs veselību uzlabojošs potenciāls.  $\delta$  cietoajos sveķos ietilpst huluponskābe, kas sastāda mazāk kā 0,05 % no apiņu sausās masas (Almaguer et al, 2014).



3. attēls. Apiņu sveķu klasifikācija un nomenklatūra (Almaguer et al, 2014).

Figure 3. Classification and nomenclature of total hop resins (Almaguer et al, 2014).

Ēteriskās eļļas tiek sekretētas lupulīna dziedzeros un rada apiņu raksturīgo aromātu, kopumā saturot aptuveni 400 - 1000 dažādu savienojumu, tās sastāda 0,5-3% no sausnes (Velde and Verzele, 1986, Roberts et al., 2004, Almaguer et al., 2014). Apiņu ēteriskās eļļas tiek iedalītas trīs galvenajās grupās: hidrokarboni, oksigenētie un sēru saturošie savienojumi (Almaguer et al., 2014). To sastāvā esošās vielas plaši izmanto kosmētikā un medicīnā kā smaržvielas vai krāsvielas, piemēram, mircēnu, kariofilēnu un linalolu (Gomes-Carneiro et al., 2005, Herman et al., 2016, Fydit et al., 2016).

### 1.1.3. Parastā apiņa sekundāro metabolītu antioksidatīvās īpašības

Tādi apiņu ekstraktos sastopami polifenoli kā kvercētīns, kemferols un dažādi flavonoīdu glikozīdi ir zināmi kā spēcīgi antioksidanti (Almeida et al., 2020). Ir izpētīts, ka polifenoli spēj saistīt reaktīvā skābekļa formas (ROS), vienvērtīgo skābekli, vai tādus savienojumus kā ūdeņraža peroksīdu un superoksīdu. Šie radikāļi ir iesaistīti oksidatīvā stresa veidošanā un var būt kā audzēju, aterosklerozes, Alcheimera, Parkinsona un novecošanos veicinoši faktori. Polifenolu antioksidatīvo iedarbību raksturo to spēja nomākt dažādu specifisku enzīmu darbību, kas ir iesaistīti ROS veidošanā, piemēram NADPH oksidāzi, ciklooksigenāzi vai lipoksigenāzi. Inhibējot šos enzīmus, tie nodrošina oksidatīvā stresa mazināšanos. Fenolu savienojumi var arī helatēt tādus mikroelementus kā vara un dzelzs jonus, kuri piedalās zema blīvuma lipoproteīnu oksidācijā un aterosklerozes attīstībā. Fenolu savienojumi to antioksidatīvās iedarbības dēļ ir efektīvi cīņā pret aptaukošanos - tie spēj modulēt lipīdu un enerģijas metabolismu, veicinot svara zudumu. Ne tikai polifenoli, bet arī fenolskābes ir spēcīgi antioksidanti, un labvēlīgi ietekmē sirds un asinsvadu veselību, stimulējot antioksidatīvo enzīmu darbību.

Ēteriskajām eļļām antioksidatīvās īpašības ir komplicētas. Tās var būt neitrālas, stipri antioksidanti vai pat būt kā prooksidanti (Karabin et al., 2016). Piemēram, apinī sastopamais linalols samazina ūdeņraža peroksīda inducētu lipīdu oksidāciju (Karabin et al., 2016, Herman et al., 2016). Mircēns ir spējīgs novērst oksidatīvos bojājumus, palielinot superoksīda dismutāzes un glutaciona peroksidāzes aktivitāti, tādējādi novēršot peptiskās čūlas slimību (Bonamin et al., 2014, Karabin et al., 2016).

### 1.1.4. Parastā apiņa sekundāro metabolītu antimikrobiālās īpašības

Apiņos sastopamie savienojumi ir ne tikai spēcīgi antioksidanti, bet tiem piemīt arī antimikrobiālā aktivitāte. Tādas rūgtvielas kā  $\alpha$ -skābes, iso- $\alpha$ -skābes un  $\beta$ -skābes iesaistās mikroorganismu šūnu membrānās un darbojas kā jonofori, veicot tādu divvērtīgo katjonu kā  $Mn^{2+}$  apmaiņu pret protoniem. Tas noved pie intracelulāras protonu uzkrāšanās, transmembrānu protonu gradienta izjukšanas, protonu kustības spēka samazināšanās, kam seko nepietiekama minerālu uzņemšana un šūnu nāve (Karabin et al., 2016). Daudzu polifenolu antimikrobiālās aktivitātes mehānisms balstās uz to spēju šķērsot membrānas un

uzkrāties šūnās, traucējot lielu daļu Gram-pozitīvo, un relatīvi nelielu daļu Gram-negatīvo baktēriju, sēnīšu un viensūnu parazītu vairošanos (Alvesalo 2006, Karabin et al., 2016). Ir izpētīts, ka prenilflavonoīdi spēj nelabvēlīgi ietekmēt Gram pozitīvo *Staphylococcus* un *Streptococcus* baktēriju augšanu, kā arī inhibējoši iedarbojas uz plašu loku RNS vīrusu, citomegalovīrusu un DNS vīrusu virulences faktoriem. Polifenolu īpašības palīdz samazināt mikroorganismu adhēziju un tādējādi arī biofilmu veidošanos (Rozalski et al., 2013, Karabin et al., 2016). Ēteriskajām eļļām ir zemāka antimikrobiālā iedarbība, taču tās var palīdzēt cīņā ar Gram negatīvajām *E.coli*, Gram pozitīvajām *B.subtilis* un *S. aureus* baktērijām, un raugu *C.albicans* (Langezaal et al., 1992).

### **1.1.5. Citas apiņu bioloģiski aktīvo savienojumu perspektīvas izmantošanai cilvēka veselības uzlabošanā**

Apiņi jau izsenis ir pazīstami kā augi, kuriem piemīt sedatīvas īpašības. Nomierinošais efekts tiek panākts palielinot neirotransmitera  $\gamma$ -aminosviestskābes (GABA) aktivitāti, modulējot smadzeņu GABA (A) receptorus, tādējādi nomācot centrālo nervu sistēmu. Kombinācijā ar baldriāni apiņus izmanto miega problēmu mazināšanai. Klīniskajos pētījumos ir panākti uzlabojumi miega kvalitātē pacientiem ar insomniju un neorganiskā miega traucējumiem, jo GABA neirotransmiteri regulē arī miega hormona melatonīna darbību (Franco et al., 2012). Īpaši stimulējošu GABA efektu nodrošina tādi savienojumi kā humulons un 6-prenilnaringenīns (Benkherouf et al., 2020). Ir izpētīts, ka apiņu ekstrakts var samazināt arī depresijas un trauksmes izraisītos simptomus (Kyrou et al., 2017).

Parastajā apinī sastopamie savienojumi ir spējīgi iesaistīties cīņā pret dažādiem specifiskiem cilvēka veselību apdraudošiem faktoriem. Pētījumos ir konstatēta statistiski nozīmīga sakarība starp samazinātu plaušu vēža risku un flavonoīda kvercetinā uzņemšanu, kā arī saistība ar zemāku kuņģa vēža risku un apiņos esošo flavonoīdu kvercetinā, kemferolu un miricetinā (Karabin et al., 2016). Ksantohumols spēj inhibēt prokarcinogēnu aktivāciju, inducējot enzīmu darbību, kas iesaistīti karcinogēnu destrukcijā vai pat novērst audzēju augšanu gan proliferācijas agrīnajā stadijā, gan arī jau vēlākos posmos (Gerhauser et al., 2002). Ir izpētīts, ka tas spēj inhibēt augšanu vai inducēt apoptozi olnīcu, krūšu, resnās zarnas, prostatas, aknu, plaušu un leukēmijas *in vitro* vēža šūnu līnijās (Karabin et al., 2016). Humulons, savukārt, spēj inhibēt angiogēnēzi un vaskulārā endotēlija augšanas faktora (VEGF) producēšanu, kas var tikt izmantots cīņā ar dažādām angiogēnēzes slimībām (Shimamura et al., 2001).

Viena no svarīgām īpašībām, kas piemīt apiņos sastopamajiem savienojumiem, ir to estrogēnā aktivitāte - spēja piesaistīties estrogēnu receptoriem (ER $\alpha$  un ER $\beta$ ), un atdarināt estrogēnu darbību, kā arī inhibēt specifiskus enzīmus (Karabin et al., 2016). Ksantohumolam un isoksantohumolam piemīt spēja modulēt aromatāzes aktivitāti, kas androgēnus pārveido par estrogēniem. Šo dabisko īpašību dēļ prenilflavonoīdu izmantošana tiek uzskatīta par daudzsološu alternatīvu hormonu aizstāšanas terapijā, lai mazinātu tādus menopauzes simptomus kā osteoporozī, karstuma viļņus u.c. (Helle et al., 2014, Karabin et al., 2016).

Kaut arī parastajā apinī esošajiem savienojumiem piemīt antiradikālas, antimikrobiālas, pretvēža un citas cilvēka veselību uzlabojošas īpašības, jāņem vērā, ka pārāk augstas koncentrācijas individuālu apiņu savienojumu, piemēram, kvercetinā,  $\beta$ -mircēnā, linalolā un geraniolā, izmantošana, atsevišķos gadījumos var izraisīt citotoksisku efektu cilvēka ķermenī, kā arī ādas kairinājumu (Karabin et al., 2016). Tādēļ parasto apiņu augu ekstraktus ne vienmēr ieteicams izmantot kosmētikas līdzekļos iespējamā kairinājuma dēļ, un būtu jāmeklē alternatīva efektīvu, bet mazāk kairinošu ekstraktu ieguvei. Šajā gadījumā kā potenciālu izejmateriālu varētu izmantot no apinim iegūtas un specifiski modificētas audu un šūnu *in vitro* kultūras.

## 1.2. Augu un audu kultūras

### 1.2.1. Augu audu kultūru iedalījums

Augu audu kultūras, tiek sauktas arī par *in vitro* vai sterilajām kultūrām, ir nozīmīgs rīks gan pētījumos, gan komerciālos nolūkos. Tās ir aseptiskas šūnu, audu, orgānu un to komponentu kultūras, kas veidojas fizikāli un ķīmiski kontrolētos apstākļos *in vitro* (Loyola-Vargas et al., 2006). Tās galvenokārt tiek veidotas, lai iegūtu augu klonus, kuri ir ģenētiski identiski, taču pastāv arī audu kultūru veidi, kur ir iespējama ģenētiska nestabilitāte. Tādi kontrolētie apstākļi un parametri kā barības vielu pievade, pH, temperatūra, gaismas režīms, gāzmaiņa, ir svarīgi, lai nodrošinātu stabilu kultūras augšanu. Arvien plašāk audu kultūras tiek izmantotas augu pavairošanā, iegūstot komerciāli nozīmīgus no dažādām slimībām un patogēniem brīvus augus, uzlabojot to īpašības, kā arī spējas pastiprināti producēt specifiskus sekundāros metabolītus (Hussain et al., 2011).

Audu kultūrās ir iespējama gan organizēta, gan neorganizēta audu augšana. Organizētu augšanu veicina noteiktas struktūras veidošana vai uzturēšana. Tā rodas, kad auga orgāni kā dzinumi (galotnes) vai saknes (apikālās meristēmas) tiek pārvērsti par kultūru un turpina augt, saglabājot savu struktūru. Konsekventu organizētu augšanu var panākt arī, inducējot auga orgānu veidošanos, novietojot auga daļas (eksplantus) uz augšanas barotnes, vai no iepriekš neorganizētām audu kultūrām, izmainot tādas izmantotās augšanas barotnes komponentes kā augšanas regulatorus un to koncentrācijas. *De novo* orgānu veidošanās tiek saukta par organoģenēzi vai morfoģenēzi. Neorganizētas augšanas rezultātā šūnas veido agregātus ar nenoteiktu struktūru, un tajos sastopams tikai neliels daudzums specializētu un diferencētu šūnu. Pie neorganizētām audu kultūrām pieder, piemēram, kallusu, šūnu suspensiju un protoplastu kultūras (George et al., 2008).

### 1.2.2. Auga audu kultūras iniciēšana un uzturēšana

*In vitro* apstākļos augu audu augšanai un attīstībai ir nepieciešama barotne, kura nodrošina šūnas ar visām vitāli svarīgajām komponentēm. Visplašāk tiek izmantotas cietās Murashige & Skoog barotnes (Murashige and Skoog, 1962). Tās satur minerālvielas ar visiem nepieciešamajiem makro- un mikroelementiem, ogļhidrātus (oglekļa avotu), aminoskābes, vitamīnus un augšanas regulatorus (Ieviņš, 2016).

Audu kultūras aizsāk no auga, kas ir sadalīts daļās. Izmantotā auga daļa kultūras izveidei tiek izvēlēta atkarībā no pašas auga sugas specifiskuma, no tā kādu kultūru vēlas

iniciēt, un kāds būs tās izmantošanas mērķis. Augi kas aug *in vivo* apstākļos ir kontaminēti ar mikroorganismiem un citiem kaitēkļiem. Šie piesārņotāji galvenokārt atrodas uz auga virsmas, taču daži mikroorganismi, tā saucamie endofīti, kā arī vīrusi var sistēmiski atrasties pašos audos. Audu kultūras ir jāuztur aseptiskos apstākļos, tāpēc augu materiāls tiek sterilizēts un tikai pēc tam ievietots pirms tam autoklāvētā augšanas barotnē, kas var būt gan sacietināta, izmantojot gelējošos aģentus - agaru, gelrītu u.c., gan arī šķidra, kā tas ir suspensiju kultūrām, nodrošinot, ka barotnes saturs tiek maisīts vai kratīts (George et al., 2008).

Audu kultūru veiksmīgai attīstībai nepieciešama augšanas telpa, kurā ir kontrolēta gaismas intensitāte, temperatūra un mitruma līmenis (George et al., 2008, Ieviņš, 2016). Augšanu var ietekmēt arī tas, kurā sezonā augs ir ievākts un iegūti eksplanti, jo mainoties sezonām var atšķirties endogēno augšanas regulatoru koncentrācija mātes augā. No augu šūnām barotnē, difūzijas ceļā var nonākt dažādas būtiskas vielas: alkaloīdi, aminoskābes, enzīmi, polisaharīdi, kas var dažādi ietekmēt pašu šūnu augšanu. Ja neorganizētās audu kultūrās šūnas aug kopumos, kur auga materiāla attiecība pret barotni ir augsta, ir gaidāma šūnu nāve. Tomēr, kad šūnas tiek inokulētas ar zemu blīvumu attiecībā pret barotni, būtisko savienojumu koncentrācija gan šūnās, gan barotnē var kļūt nepietiekama kultūras izdzīvošanai. Veiksmīgai kultūras iniciācijai nepieciešams noteikt minimālā eksplanta izmēru vai šūnu daudzumu uz barotnes tilpuma vienību. Šūnu suspensijas blīvums vai pārliktā kallusa diametrs ietekmē arī kultūras augšanas ātrumu *in vitro*, un tas var būt sugas specifisks, kā arī atkarīgs no citiem kultūras apstākļiem (George et al., 2008).

Augu kallusu kultūrām ir trīs attīstības posmi: šūnu dalīšanās indukcija, aktīvā šūnu dalīšanās, kuras laikā diferencētās šūnas zaudē noteiktas īpašības un augšanas regulatoru ietekmē var kļūt par dediferenciētām, un periods, kura laikā šūnu dalīšanās palēninās vai apstājas. Pieaugot šūnu blīvumam kallusu, suspensiju vai orgānu kultūrās, biomasa tiek sadalīta jaunos eksplantos kultūras iniciācijai svaigās barotnēs. Subkultūru veidošana ir nepieciešama, ja šūnu, to audu vai orgānu blīvums kļūst pārmērīgs, ir mērķis palielināt kultūras apjomu vai orgānu daudzumu. Subkultūras no iniciācijas brīža līdz pārlikšanai jaunā barotnē, sauc arī par pasāžām. Jaunu pasāžu veidošanas iemesls ir toksisku metabolītu uzkrāšanās, barotnes satura izsīkums vai izzūšana, kas nelabvēlīgi ietekmē auga biomasu vai tās pieaugumu slēgtā traukā. Subkulturēšana pārsvarā notiek ik pēc 3-6 nedēļām, un var tikt veikta daudzu mēnešu garumā. Jāņem vērā, ka ilgākā laika periodā audos var uzkrāties šūnas, kuras ir ģenētiski mainījušās (George et al., 2008).

### 1.2.3. Kallusu kultūru raksturojums

Kallusu kultūras ir homogēnu šūnu kopums, kas veidojas no heterogēni strukturētiem audiem. Nesenākie pētījumi liecina, ka kallusu šūnas nav dediferencētas, bet gan drīzāk ir veidojušās no iepriekš eksistējušām audu cilmes šūnām (Efferth, 2019). Kallusu veidošanās tiek inducēta audu ievainojuma vai stresa rezultātā. Daudzu augu daļu audiem var būt potenciāls pavairošanai *in vitro*, bet ir konstatēts, ka kallusu kultūras vieglāk iegūt no meristēmas audiem (George et al., 2008). Kallusu kultūru atšķirības ir novērojamas dažādu sugu līmenī, uzrādot atšķirīgu audu biomasas krāsu, struktūru, morfogēno potenciālu (George et al., 2008, Efferth, 2019). Pārsvārā kallusu kultūras tiek uzturētas uz cietām agara barotnēm, kas satur visas nepieciešamās barības vielas. Neorganiskais fosfāts ir svarīgs fotosintēzei, glikolīzei, kā arī stimulē šūnu augšanu un primāro metabolismu. Zems fosfātu līmenis un papildu elicitoru pievienošana barotnei nodrošina sekundāro metabolītu veidošanos. Kallusu augšanai barotnēs pievieno arī specifiskus augšanas regulātorus jeb fitohormonus kā auksīnus, citokinīnus un giberlīnus. Fitohormonu ietekmē ar ģenētiskiem un epiģenētiskiem mehānismiem tiek regulēta embriotiskā un postembriotiskā attīstība, totipotence un diferenciacija. Kallusu kultūras var būt gan embriogēnas, gan neembriogēnas. Embriogēnas kallusu kultūras satur diferencētas embriogēnētiski kompetentas šūnas, kuras reģenerē jaunu augu pilnībā. Neembriogēni kallusi veido viendabīgu šūnu masu, kuru var izmantot sekundāro metabolītu ražošanā (Efferth, 2019).

Kallusu kultūrām ir liels komerciāls potenciāls. Tās var izmantot sekundāro metabolītu producēšanai terapeitiskiem mērķiem gan kosmētikas, gan farmācijas sfērās, antivielu un citu rekombinantu proteīnu ražošanai, kā arī lauksaimniecībai vai dārzkopībai nozīmīgu augu ieguvei (Efferth, 2019).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Reaģenti, buferšķīdumi, kultivēšanas un audzēšanas barotnes

1. tabula

Darbā izmantotie reaģenti, buferšķīdumi, kultivēšanas barotnes.

Table 1

Reagents, buffer solutions, cell cultivation media used in reserch.

Nosaukums	Ražotājvalsts	Ražotājs
Etanols 96%	Latvija	Enola
Tween 20 Nr. P1379	Vācija	Sigma-Aldrich
Sērskābe 96% (HCl)	Latvija	Enola
1 N nātrija hidroksīds (NaOH)	Latvija	Enola
HCl 100%	Latvija	Enola
BBL™ Mueller Hinton II agars Nr. 211438	ASV	Becton, Dickson and Company
Iesala ekstrakta buljons Nr. 1.05397	Vācija	Merck
Muller Hinton buljons Nr. 1214	Spānija	Conda
Murashige & Skoog barotne (MS) Nr. M0222	Nīderlande	Duchefa Biochemie
<i>McCown Woody Plant</i> barotne (WP) Nr. M0219	Nīderlande	Duchefa Biochemie
Bakterioloģiskais agars Nr. 1809	Spānija	Conda
Klīstalizēta saharoze Nr. S0809	Nīderlande	Duchefa Biochemie
Augu agars Nr. P1001	Nīderlande	Duchefa Biochemie
MES monohidrāts (MES) Nr. M1503	Nīderlande	Duchefa Biochemie
Folin-Ciocalteu fenolu reaģents Nr. F9252	Vācija	Sigma-Aldrich
DPPH Nr. D9132	Vācija	Sigma-Aldrich
Trolox Nr. 238813-1G	Vācija	Sigma-Aldrich
Galluskābe	Vācija	Sigma-Aldrich

Nr. PHL89198		
ACE balinātājs	Lielbritānija	ACE
Nātrija karbonāts	Latvija	Enola
Glicerīns	Latvija	Enola
$\alpha$ -naftil-etiķskābe (NAA) Nr. N0903	Nīderlande	Duchefa Biochemie
2,4-dihlortfenoksi-etiķskābe (2,4-D) Nr. D0911	Nīderlande	Duchefa Biochemie
6-benzilaminopurīns (BAP) Nr. B0904	Nīderlande	Duchefa Biochemie
Tidiazurons (TDZ) Nr. T0916	Nīderlande	Duchefa Biochemie

2. tabula  
Augu augšanas barotnes.

Table 2  
Plant growth medium.

Nosaukums	Sastāvs
50% MS barotne <i>in vitro</i> augu kultūrām	30 g/L saharoze 7,5 g/L agars 0,5 g/L MES 2,2 g/L MS 1 L destilēts ūdens 1 N NaOH un 0,1 N HCl pH regulēšanai
WP barotne kallusu kultūrām	30 g/L saharoze 7,5 g/L agars 0,5 g/L MES 2,46 g/L WP 1 L destilēts ūdens 1,5 mg/L 2,4-D 2 mg/L BAP 1 mg/L NAA 0,1 mg/L TDZ

### 2.1.2. Šķīdumi

3. tabula  
Darbā izmantotie šķīdumi.

Table 3  
Solutions used in research.

Nosaukums	Sastāvs
1 L 20% ACE balinātāja šķīdums	200 mL komerciālais ACE balinātājs 0,5 mL Tween 20 800 mL destilēts ūdens

1 L 50% ACE balinātāja šķīdums	500 mL komerciālais ACE balinātājs 0,5 mL Tween 20 500 mL destilēts ūdens
30/30 glicerīna-etanola šķīdums	1L šķīdinātāja: 312,5 mL 96% etanols 300 mL glicerīns 387,5 mL destilēts ūdens
70% etanola šķīdums	1L šķīdinātāja: 730 mL 96% etanols 270 mL destilēts ūdens
Galluskābes šķīdums	10 mg galluskābe 5 mL 70% etanols (vai cits šķīdinātājs, kas izmantots ekstrakta pagatavošanai)
7% nātrija karbonāts (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	700 mg Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10 mL destilēts ūdens
Folin-Ciocalteu reaģents	1:1 (Folin-Ciocalteu : destilēts ūdens)
Trolox šķīdums	12,5 mg Trolox 5 mL 96% EtOH
DPPH šķīdums	1,7 mg DPPH 28,8 mL 96% EtOH
0.1 N sālsskābe (HCl)	1 L 0,1 N HCl: 8,21 mL konc. HCl 1000 mL dejonizēts ūdens
100 mL 1000x α-naftil-etiķskābes (NAA) uzglabāšanas šķīdums	0,1 g NAA 1 N NaOH līdz NAA izšķīst līdz 100 mL destilēts ūdens
100 mL 1000x 2,4-dihlortfenoksi-etiķskābes (2,4-D) uzglabāšanas šķīdums	0,1 g 2,4-D 96% EtOH līdz 2,4-D izšķīst līdz 100 mL destilēts ūdens
100 mL 1000x 6-benzilaminopurīna (BAP) uzglabāšanas šķīdums	0,1 g BAP 1 N NaOH līdz BAP izšķīst līdz 100 mL destilēts ūdens
100 mL 1000x Tidiazurona (TDZ) uzglabāšanas šķīdums	0,1 g TDZ 1 N NaOH līdz TDZ izšķīst līdz 100 mL destilēts ūdens

### 2.1.3. Iekārtas un materiāli

4. tabula  
Laboratorijas iekārtas.  
Table 4  
Laboratory equipment.

Nosaukums	Ražotājvalsts	Ražotājs
Dzesēšanas/ sildīšanas termostats CH-100	Latvija	Biosan
Automātiskās mikropipetes (200-1000 µL, 50-200 µL, 20-100 µL, 2-10 µL, 0,2-2 µL)	ASV	Gilson
Pipetēšanas palīgs Accurpette	Lielbritānija	VWR
Ultra zemas temperatūras saldētava (-86°C)	Dānija	Arctiko
Ledusskapis RB-35DC4SW	Vācija	Bauer
Elektroniskie svāri	Šveice	Precisa
pH metrs AD 1405	Latvija	Adrona
Rotators RS-60	Latvija	BioSan
Centrifūga mini Spin plus	Vācija	eppendorf
Gaismas skapis	Japāna	Sanyo
Laminārās plūsmas blokss PV-30/70	Singapūra	ESCO
Velkmes skapis	Vācija	Waldner
Orbitālais kratītājs Multi-Shaker PSU 20	Latvija	BioSan
Liofilizators	Vācija	Martin Christ
Autoklāvs 2100 Classic	ASV	Prestige Medical
Autoklāvs MLS-3781L	Japāna	Sanyo
Ultraskaņas vanna BK-9050	Ķīna	Baku
Spektrofotometrs/ mikroplašu lasītājs Infinite 200 PRO	Šveice	Tecan
Stereomikroskops Leica EZ4	Vācija	Leica

5. tabula  
Laboratorijas materiāli.  
Table 5  
Laboratory materials.

Nosaukums	Ražotājvalsts	Ražotājs
Pipešu uzgaļi (1000 µL, 200 µL, 10 µL)	Vācija	Sarstedt
Centrifugēšanas stobriņi (50 mL, 15 mL, 2mL, 1,5 mL, 0,2 mL)	Vācija	Sarstedt

Seroloģiskās pipetes (25 mL, 10 mL, 5 mL, 2 mL)	Vācija	Sarstedt
96-lauciņu mikroplate	Vācija	Sarstedt
0,2 nm filtri	Vācija	Sarstedt
Petri plates	Vācija	Sarstedt
Parafilm M	ASV	Bemis
Augu kultivēšanas trauki	Vācija	Sigma Aldrich
Stikla pipetes	ASV	Thermo Fisher Scientific
Stikla plates	Vācija	Sigma Aldrich
Bakterioloģiskā cilpiņa	Vācija	Sarstedt
Piesta un piestala	Vācija	Sigma Aldrich
Burkas paraugu uzglabāšanai (100 mL, 200 mL, 500 mL)	ASV	Duran
Filtrpapīrs	Vācija	Sarstedt
Skalpeļa kāts	Vācija	Heinz Herenz
Pincete	Vācija	Heinz Herenz
Skalpeļa asmeņi	Vācija	Heinz Herenz

#### 2.1.4. Mikroorganismu kultūras

6. tabula  
Izmantotie mikroorganismu celmi.  
Table 6  
Microorganism strains used in research.

Nosaukums	Mikroorganismu celms
<i>Staphylococcus aureus</i>	LMKK 334
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LMKK 333
<i>Escherichia coli</i>	LMKK 332
<i>Candida albicans</i>	LMKK 378

#### 2.1.5. Datorprogrammas

Datu apstrādes programma – Microsoft Office Excel 365

Tecan plašu lasītāja programma – i-control 1.10

Statistikas analīze – GraphPadPrism V8.1.2.

## 2.2. Metodes

Svaigais augu materiāls tika ievākts sadarbībā ar Nacionālo Botānisko dārzu. Darba izstrādē tika izmantotas sievišķo augu vasas daļas un sēklas no trim apiņu šķirnēm: *Smoļistij*, *Istrinskij-15*, *Fredos Derlingieji*, kas tika ievāktas Botāniskā dārza teritorijā periodā no 2019. gada augusta līdz 2019. gada oktobrim.

### 2.2.1. Bartoņu sagatavošana

Apiņu kallusi tika audzēti uz cietas agarizētas barotnes. Lai sagatavotu cietās barotnes, *Murashige & Skoog (MS)* (Murashige and Skoog, 1962) un *McCown Woody Plant (WP)* (McCown and Lloyd, 1981) sastāvdaļas iesver 1L uzglabāšanas burkā, pievieno attiecīgo destilētā ūdens daudzumu, augšanas regulatorus un pielīdzina pH līdz pH 5.7-5.8, izmantojot sārmu (1N NaOH) vai skābi (0,1 N HCl).

Gatavo maisījumu autoklāvē 121°C temperatūrā 15 minūtes. Barotni izlej *Petri* platēs pa 15 mL katrā, atdzesē, attiecīgi marķē un uzglabā ledusskapī 4°C temperatūrā.

### 2.2.2. *Humulus lupulus* eksplantu sagatavošana un sterilizēšana

Svaigu augu sagriež un atdala lapas, lapu kātus, mezglu daļas, stumbrus, pumpurus un ziedkātus. Augu daļas (1g) ievieto atsevišķi marķētās *Petri* platēs un žāvē tumšā vietā istabas temperatūrā, lai iegūtu auga drogas.

Eksplantiem veic virsmas sterilizēšanu, lai atbrīvotos no mikrobioloģiskā piesārņojuma pēc Majid 2014 un Tripathi et al. 2017 ieteikumiem ar nelielām modifikācijām. Sterilizēšanai pagatavo ACE balinātāja šķīdumu divās koncentrācijās – 20% un 50%. Sagatavotos eksplantus sadala grupās pēc to šķirnes un veida, un ieliek neilona maisiņos. Sterilizēšanu veic 6 posmos:

1. Skalo ar tekošu ūdeni 30 minūtes;
2. Maisiņus ievieto mazgāties burkā ar ūdeni un *Fairy* trauku mazgājamo līdzekli. Burkas liek uz kratītāja 30 minūtes;
3. Auga daļas maisiņos skalo ar tekošu ūdeni 1 stundu;
4. Auga daļas ievieto burkā ar 70% etanolu uz 1 minūti un ar roku kustību maisa;

5. Tad tās velkmes skapī ievieto burkā ar 20% ACE balinātāja šķīdumu 30 minūtes un 50% ACE šķīdumu 20 minūtes un liek orbitālajā kratītājā, kas uzstādīts uz 90 apgriezieniem minūtē (rpm).

6. Burkas pārnes uz sterilu laminārās plūsmas bloku un auga daļas trīs reizes skalo ar destilētu, autoklāvētu ūdeni.

Sterilos eksplantus sadala aptuveni 1cm<sup>2</sup> gabaliņos un mehāniski ierēto ar skalpeļa asmeni, veicot mazus iegriezumus. 4 – 6 eksplantu daļas ar pinceti novieto uz sagatavotām agarizētām barotnēm *Petri* platēs. *Petri* plates marķē, noslēdz ar *Parafilm*.

### 2.2.3. Kallusu kultūru audzēšana un uzturēšana

Kallusus uz agarizētas barotnes *Petri* platēs audzē gaismas skapī ar fotoperiodu 16/8 stundas 25°C temperatūrā. Tiklīdz tiek konstatēta baktēriju vai sēņu klātbūtne barotnē, kontaminācijas neskartie eksplanti uzmanīgi tiek pārlikti uz sterilu barotni. Nesterilo barotni utilizē, to autoklāvējot. Ar stereomikroskopu novēro kallusu masas veidošanos. Izveidojušos kallusus ar pincetes un skalpeļa palīdzību pārlik uz svaigām barotnēm. Turpmāk kallusu subkulturēšanu veic ik pēc 30 dienām, uz barotnes platē atstatus pārliedzot aptuveni 5-6 mm<sup>2</sup> lielus kallusu gabaliņus. *Petri* plates attiecīgi marķē, noslēdz ar *Parafilm*.

### 2.2.4. *Humulus lupulus* sēklu ievākšana un sterilizēšana

Sēklas ievāc tās izlasot no sievišķo augu attīstītajiem pumpuriem. Sēklas 2 nedēļas uzglabā tumsā 4°C temperatūrā, lai sinhronizētu dīgšanas procesu (Liberatore et al., 2018). Sagatavo 20% ACE balinātāja, 0,05% Tween un ūdens šķīdumu. Sēklas, atkarībā no auga šķirnes, sadala grupās un ievieto stikla platēs.

Sterilizēšanu veic 4 posmos:

1. Velkmes skapī auga sēklas ievieto koncentrētā sērskābē (95-97%) uz 4 minūtēm. Sērskābi atsūc ar stikla pipeti.

2. Sēklām pievieno etanolu uz 1 minūti, un atsūc to ar stikla pipeti.

3. Sēklas pārvieto uz stikla mēģenēm ar 20% ACE balinātāja šķīdumu. Mēģenes ievieto kratītājā uz 20 minūtēm 90 rpm.

4. Mēģenes pārvieto uz sterilu vidi laminārā un 5 reizes skalo ar sterilu destilētu ūdeni.

Sēklas žāvē uz *Petri* plates ar ieklātu sterilu filtrpapīru. Ar sterilu pinceti novieto uz agarizētas 50% MS barotnes *Petri* platēs. Plates marķē un noslēdz ar *Parafilm*.

### 2.2.5. Sēklu diedzēšana un sterila *in vitro* auga dzinumu kultūras iegūšana

Sēklas tiek diedzētas istabas temperatūrā, tumsā. Ja tiek konstatēta baktēriju vai sēņu mikroorganismu klātbūtne *Petri* platēs, kontaminācijas neskartās sēklas tiek pārliktas uz sterilu barotni. Mikroorganismu skarto barotni utilizē, to autoklāvējot. Novērojot pirmo dīglīlapu attīstīšanos, dīgli laminārā pārvieto uz sterilas agarizētas 50% *MS* barotnes slēgtās mēģenēs vai augu kultivēšanas traukos un audzē gaismas skapī ar fotoperiodu 16/8 stundas 25°C temperatūrā. Veido *in vitro* dzinumu (galotņu) kultūru, ik pēc mēneša no izaugušā auga atdalot galotni un pārliedot svaigā barotnē augu kultivēšanas traukā tādos pašos apstākļos.

### 2.2.6. Ekstraktu pagatavošana no drogām, *in vitro* augiem un kallusiem

Ekstraktu pagatavošanai izmanto parastā apiņa lapu drogas, -80°C temperatūrā sasaldētas, un pēc tam 24 stundas liofilizētas dzinumu kultūrās iegūtu *in vitro* augu lapas un no lapām iegūtu kallusu biomasu. Sauso masu nosver, saberž pietā, ievieto 15 mL centrifugēšanas stobriņos un pievieno 70% etanolu, ūdeni vai 30/30 glicerīna-etanola šķīdumu attiecībā 1:100 w/v (sausā masa: šķīdinātājs).

Veic dažāda veida ekstrahēšanu ar trīs dažādiem šķīdinātājiem:

- a) Šķīdumu karsē 50°C temperatūrā 15 minūtes, liek kratītājā uz 18 stundām;
- b) Šķīdumu nekarsē, liek kratītājā uz 18 stundām;
- c) Šķīdumu karsē 50°C temperatūrā 15 minūtes, autoklāvē 121° temperatūrā augstspiedienā 15 minūtes.

Biomassas šķīdumus centrifugē 10 minūtes pie 3700 rpm, un supernatantu filtrē caur 0,2 µm filtru, iegūstot ekstraktu turpmākajām analīzēm.

### 2.2.7. Parastā apiņa ekstraktu kopējā fenolu (TPC) satura noteikšana

Kopējā fenolu daudzuma noteikšanai tika izmantots modificēts Onder et al. 2013 sastādītais protokolu. Tika izmantos *Folin-Ciocalteu* reaģents. Tests katram ekstraktam tika veikts dupletos ar seriālajiem atšķaidījumiem 100%, 50%, 25% un 12,5% koncentrācijās 96-lauciņu mikroplatēs.

1. Lauciņos iepilda 75  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 25  $\mu\text{L}$  parauga, galluskābes standarta vai negatīvās kontroles (70% EtOH), paraugiem veidojot seriālatšķaidījumus, un kā beidzamo visos lauciņos pievieno 25  $\mu\text{L}$  *Folin-Ciocalteu* 1:1 reaģentu.

2. Inkubē 6 minūtes istabas temperatūrā.

3. Pievieno 100  $\mu\text{L}$  7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

4. Paraugu inkubē tumsā 90 minūtes.

5. Absorbcijas rezultātus nolasa ar spektrofotometru pie 765 nm un rezultātus izsaka galluskābes ekvivalentos, kas ir pieņemts standarts kopējā fenolu satura novērtēšanai. Standartlīknes konstruēšanai TPC noteikšanas testā izmanto galluskābi, un rezultātus izsaka galluskābes ekvivalentos.

### **2.2.8. *Humulus lupulus* ekstraktu antiradikālās aktivitātes (ARA) noteikšana**

Antiradikālās aktivitātes noteikšanai tika izmantots modificēts Onder et al. 2013 sastādītais protokols, kas zināms arī kā *DPPH* tests. Tests katram ekstraktam tika veikts tripletos ar seriālajiem atšķaidījumiem 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,57%, 0,78%, 0,39% koncentrācijās 96-lauciņu mikroplatēs.

1. Lauciņos iepilda 20  $\mu\text{L}$  parauga vai antioksidanta Trolox standarta, paraugiem veido seriālatšķaidījumus ar  $\text{dH}_2\text{O}$ , un pievieno 180  $\mu\text{L}$  150  $\mu\text{M}$  radikāļa *DPPH* šķīduma.

2. Atsevišķos lauciņos iepilda 200  $\mu\text{L}$  negatīvās kontroles (70% etanols un 30/30 etanola-glicerīna šķīdums) un *DPPH* šķīdumus (150  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ ).

3. Paraugu inkubē 60 minūtes.

5. Absorbcijas rezultātus nolasa ar spektrofotometru pie 517 nm. Standartlīknes konstruēšanai izmanto gan Trolox kā standartu ekstraktu ARA noteikšanai, ko izsaka Trolox ekvivalentos, gan *DPPH* šķīdumus ekstraktu  $\text{IC}_{50}$  vērtību noteikšanai, kas atbilst pusei no maksimālās inhibējošās koncentrācijas.

### **2.2.9. *Humulus lupulus* ekstraktu antimikrobiālās aktivitātes noteikšana**

Antimikrobiālā aktivitāte tiek novērtēta pēc koloniju suspensiju metodes, izmantojot trīs veidu baktērijas – Gram pozitīvas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* un Gram negatīvas *Escherichia coli* baktērijas, kā arī rauga sēnīti – *Candida albicans*.

Novērtējumā izmantotie mikroorganismi tika iegūti no Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijas. Minimālās inhibējošās un minimālās bakteriostatiskās, vai minimālās fungicīdās koncentrācijas tika noteiktas pēc modificētas Wiegand et al. 2008 metodes.

1. Baktēriju kultivēšanai izmanto BBL™ Mueller Hinton II agarizētas barotnes ar pH  $7,3\pm 0,1$ , bet rauga sēņu kultivēšanai – iesala ekstrakta agarizētas barotnes ar pH  $4,7\pm 0,1$ . Tās inkubē  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūrā.

2. Pēc 24 stundu inkubēšanas kolonijas ar sterilu bakterioloģisko cilpiņu suspendē sterilā ūdenī, tā lai suspensijas optisko blīvums pie 625 nm viļņa garuma būtu robežās no 0,08 līdz 0,1.

3. Sterilā 96-lauciņu mikroplatē ienes testējamo ekstraktu ar 6 seriālajiem atšķaidījumiem 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,27%, 0,76% Mullera-Hintona vai iesala ekstrakta barotnē. Parauga tilpums lauciņā – 0,1 mL.

4. Mikroorganismu suspensijas atšķaida attiecībā 1:100 ar kultivēšanas barotni un 0,1 mL no atšķaidītās suspensijas ienes katrā 96-lauciņu plates lauciņā ar ekstraktu atšķaidījumiem.

5. Papildus ekstraktiem testā tika iekļautas šķīdinātāju kontroles – etanola šķīdums, ūdens un ūdens-glicerīna šķīdums, kā arī pozitīvā kontrole – mikroorganismu suspensija bez pievienotiem ekstraktiem vai šķīdinātājiem, un negatīvā kontrole – kultivēšanas barotne.

6. Mikroplates inkubē 24 stundas  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūrā.

7. Pēc inkubēšanas nosaka minimālo inhibējošo koncentrāciju (MIC) – testējamā ekstrakta lielāko atšķaidījumu jeb zemāko koncentrāciju pie kuras mikroorganismu augšana netika novērota.

8. Tika noteikta minimālā bakteriostatiskā (MBC) vai fungicīdā koncentrācija. 4  $\mu\text{L}$  no 96-lauciņu plates lauciņiem izsēj uz atbilstošām agarizētām barotnēm. Plates inkubē 24 stundas  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Pēc inkubēšanas mikroplatei nosaka atbilstošo lielāko atšķaidījumu jeb zemāko koncentrāciju pie kuras uz agarizētām platēm augšana netiek novērota.

#### **2.2.10. Datu analīze**

Statistiskā analīze paraugkopu salīdzināšanai tika veikta izmantojot *two-way* ANOVA, kam sekoja Bonferroni tests. Būtiskuma līmenis tika definēts kā  $p < 0,05$ . TPC un ARA rezultāti tika savstarpēji salīdzināti ar Pīrsona korelācijas analīzi.

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. Eksplantu un sēklu sterilizēšana

30 dienas pēc parastā apiņa eksplantu sterilizēšanas un ievietošanas *Petri* platēs ar agarizētu barotni, tika aprēķināts kontaminēto barotņu skaits (5.tabula). No sākotnēji veidotajām 137 sterilizēto eksplantu platēm, izdevās iegūt 55 plates, uz kurām netika novērota mikroorganismu augšana.

7.tabula

*Petri* plašu procentuālais daudzums uz kurām tika konstatēta mikroorganismu augšana.

Table 7

Percentage of *Petri* dishes with no visible microorganism growth.

Šķirne	Eksplantu veids							
	Lapas		Stumbri		Lapu kāti		Mezglu segmenti	
	20% ACE	50% ACE	20% ACE	50% ACE	20% ACE	50% ACE	20% ACE	50% ACE
<b>FD</b>	28,3%	0%	100%	100%	75%	55%	100%	100%
<b>ISTR</b>	8,3%	7,7%	100%	100%	100%	83,3%	100%	50%
<b>SMO</b>	63,6%	30,8%	100%	100%	100%	73,3%	100%	100%

Lai novērtētu balinātāja sterilizēšanas efektivitāti, eksplantu virsmas sterilizēšanas procesā tika izmantotas divas dažādas komerciālā līdzekļa *ACE* koncentrācijas: 20% un 50%. Balinātājā esošā hipohlorskābe ( $\text{HOCl}$ ) un hipohlorīta jons ( $\text{OCl}^-$ ) darbojas kā spēcīgi oksidētāji bioorganiskās molekulās. Šie savienojumi reaģē ar proteīniem, aminoskābēm, lipīdiem un DNS. Izteiktāka antimikrobiālā iedarbība ir hipohlorskābes ( $\text{HOCl}$ ) savienojuma formā. Tā var izklūt cauri šūnu membrānai, inaktivējot vai pārveidojot citoplazmatiskos enzīmus, signālproteīnus un DNS molekulas (Fukuzaki, 2006).

Tika konstatēts, ka eksplantiem ar šķiedraināku un cietāku struktūru virsmas sterilizēšanas efektivitāte bija zema, un būtu nepieciešams izvēlēties citu metodi. Antimikrobiālie aģenti nebija spējīgi 100% novērst nevēlamu mikroorganismu augšanu platēs. Visefektīvāk tika nosterilizēti lapu eksplanti. Smoļstij šķirnes apiņu eksplantu sterilizēšanas efektivitāte bija viszemākā, ko, iespējams, varētu skaidrot ar to, ka uz konkrētās šķirnes auga bija lielāks mikroorganismu daudzums. 50% *ACE* šķīdums bija efektīvāks par 20% *ACE* šķīdumu, taču augstākā koncentrācijā tika novērota eksplantu brūnēšana. Palielinoties balinātājā esošo oksidētāju ( $\text{HOCl}$  un  $\text{OCl}^-$ ) koncentrācijai, tā negatīvi ietekmē augu audu reģenerēšanās kapacitāti un var veicināt to bojāeju (Yildiz, 2012).

Parastā apiņa sēklu sterilizēšanas efektivitāte un dīgtspēja tika novērtēta 3 nedēļas pēc to ievietošanas cietās agarizētās barotnēs *Petri* platēs (8. tabula). No 293 sēklām pēc

sterilizēšanas izdevās iegūt 233 no mikroorganismiem brīvas sēklas, no kurām izdīga 57, kas kopumā ir 19,45 %.

8.tabula  
Sēklu virsmas sterilizēšanas efektivitāte un dīgspēja.

Table 8  
Seed surface sterilization efficiency and germination rate.

	Sākotnējais sēklu skaits	Sekmīgi nosterilizētās sēklas	Sēklu dīgspēja, %
<b>FD</b>	23	19	52,63%
<b>SMO</b>	159	123	7,31%
<b>ISTR</b>	111	91	41,75%

Pētījumos ir konstatēts, ka apiņu sēklu dīgspēja ir zema (3-5%). To ietekmē necaur laidīgais sēklapvalks un sveķu saturs, kurš neļauj sēklā absorbēties ūdenim un skābeklim, izraisot organisko mieru (Liberatore et al., 2018). Lai miera periodu pārtrauktu, būtiski ir izvēlēties vispiemērotāko metodi (Baskin and Baskin, 2014). Parastā apiņa sēklām tā ir aukstā stratifikācija, ķīmiskā apstrāde un augšanas regulatoru pielietošana (Liberatore et al., 2018). Izmantojot auksto stratifikāciju un ķīmisko apstrādi ar sērskābi, tika iegūta salīdzinoši augsta dīgspēja intervālā no 7,31% līdz 52,63%.

### 3.2. Kallusu un *in vitro* augu kultūru iegūšana un uzturēšana

Stabilas kallusu kultūras izdevās iegūt no lapu eksplantiem visām trim parastā apiņa šķirnēm. Tika iegūts arī neliels daudzums kallusu no *Smoļstij in vitro* augu lapām, rogām un ziedkātiem, taču biomasa nebija pietiekoši liela tālākiem eksperimentiem. Lai noteiktu piemērotāko barotnes veidu, tika veikts 18 dažādu barotņu skrīnings, kas ietvēra pirms tam literatūrā izpētītu dažādu komerciālo barotņu (*Murashige & skoog, McCown Woody Plant, Schenk & Hildebrandt*) un augšanas hormonu kombināciju testēšanu, vizuāli novērtējot kallusu krāsu, struktūru un biomasas pieaugumu. Dzīvotspējīgi kallusi veidoja gaišu, viendabīgi graudainu masu, taču bojā gājušie bija tumši brūni, bez manāma biomasas pieauguma. Dzīvotspējīgi kallusi tika novēroti uz *Woody plant (WP)* barotnes, kurai pievienota 1,5 mg/L 2,4-dihlorfenoksietilskābe (2,4-D), 2 mg/L 6-benzilaminopurīns (BAP), 1 mg/L 1-naftiletilskābe (NAA), 0,1 mg/L tidiazurons (TDZ) (1. pielikums).

No visām trim apiņu šķirņu sēklām tika izaudzēti *in vitro* augi agarizētā 50% MS barotnē bez papildu augšanas regulatoriem augu kultivēšanas burciņās (2. pielikums). Šiem augiem tika konstatēta izmērā mazāka un plānāka lapu struktūra, salīdzinot ar brīvi augošiem augiem. Salīdzinot ar dabiskajiem apstākļiem, augiem bija pieejama mazāka augšanas telpa, līdz ar to netika sasniegts potenciālais briedums.

### 3.3. Parastā apiņa ekstraktu raksturošana pēc kopējā fenolu satura un antiradikālās aktivitātes

Savstarpējam aktivitātes salīdzinājumam no trim apiņu šķirnēm tika veidoti 39 dažādi ekstrakti, no tiem 21 lapu drogu, 6 *in vitro* augu lapu un 6 no lapām iegūtu kallusu ekstrakti (9.tabula). Pētījumam tika izvēlēti šķīdinātāji, kuri ir nekaitīgi gan lietošanai pārtikā, gan kosmētikā (Doble and Kruthiventi, 2007).

9.tabula  
Parastā apiņa ekstraktu uzskaitē.  
Table 9  
Accounting of common hop extracts.

Augu materiāls	Šķirne	Ekstrakta veids						
		30/30 (etanols/glicerīns)		70% etanols		dH2O		
		karsēts	nekarsēts	karsēts	nekarsēts	karsēts	nekarsēts	karsēts augstspiedienā (autoklāvā)
Droga	SMO	x	x	x	x	x	x	x
	ISTR	x	x	x	x	x	x	x
	FD	x	x	x	x	x	x	x
<i>In vitro</i>	SMO	x		x				x
	ISTR	x		x				x
	FD	x		x				x
Kallus	SMO	x		x				x
	ISTR	x		x				x
	FD	x		x				x

Drogu ekstraktiem tika novērtēta fizikāli ķīmiskā faktora – karsēšanas - ietekme uz kopējo fenolu saturu (TPC) un antiradikālo aktivitāti (ARA). Tika izmantoti trīs šķīdinātāju veidi – 30% un 30% v/v (turpmāk 30/30) etanols-glicerīns, 70% etanols un destilēts ūdens, un tika pielietotas divas ekstrakcijas metodes – ekstrakcija augstspiedienā un 18h ekstrakcija kratītājā, istabas temperatūrā, pirms tam karsējot vai nekarsējot. Tika konstatēts, ka 50°C temperatūrā 15 minūtes karsētu drogu ekstraktiem kopējais polifenolu daudzums un

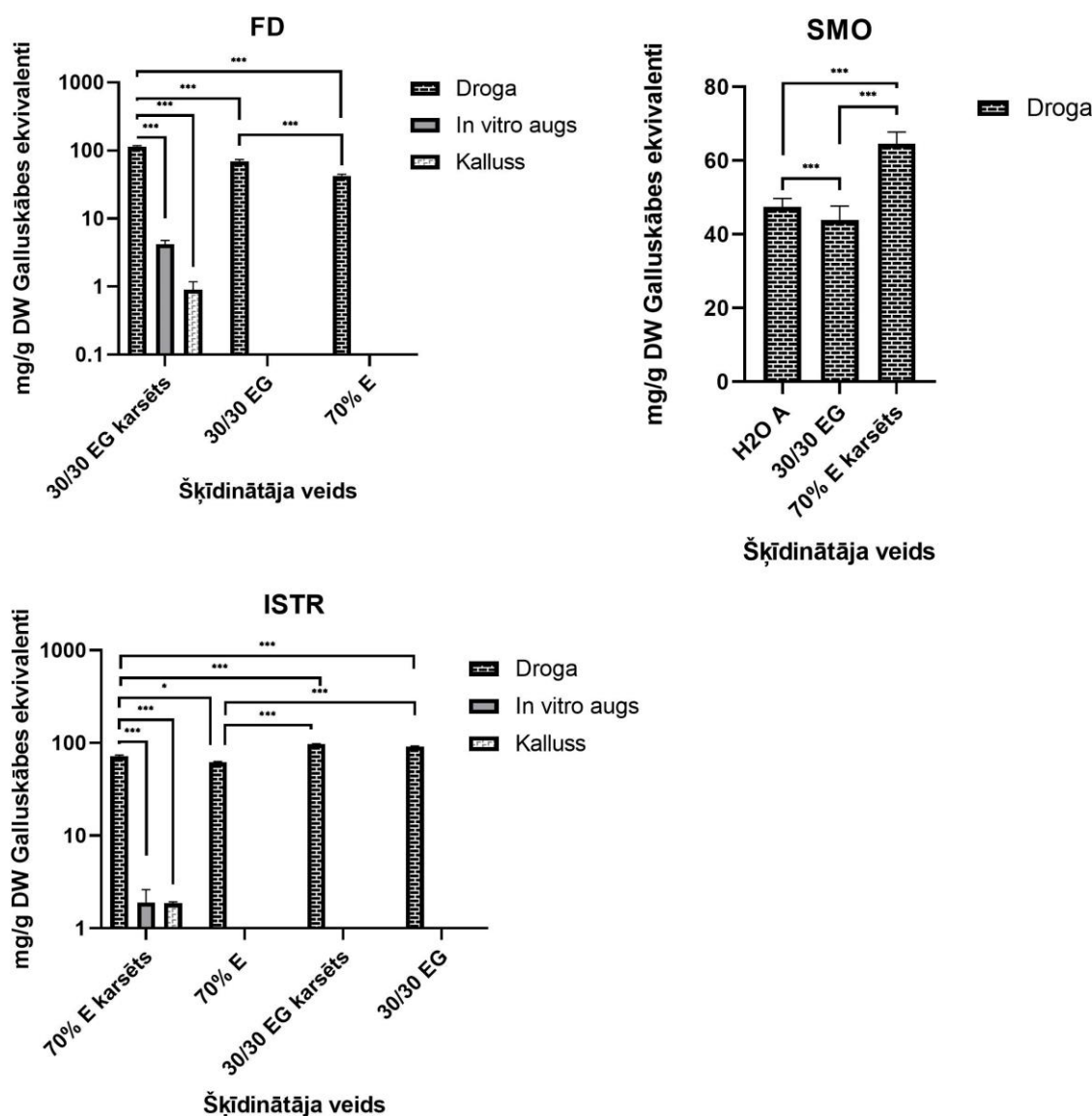
antiradikālā aktivitāte ir augstāka kā nekarsētiem ekstraktiem (3., 4. pielikums). Karsēšana ūdens vannā ir svarīga termiska metode ar kuras palīdzību tiek inaktivēti enzīmi, tādējādi saglabājot vērtīgos savienojumus. Piemēram, augu materiālā plaši izplatīta ir polifenolu oksidāze un peroksidāze. Polifenolu oksidāzes ietekmē fenolu savienojumi tiek oksidēti, kā rezultātā notiek augu materiāla brūnēšana un (detektējamā) polifenolu kopējā satura samazināšanās augu materiālā. Peroksidāzes un ūdeņraža klātbūtnē noris fenolu savienojumu oksidēšanās par fenoksi radikāļiem un hlorofila oksidēšanās (Li et al., 2018).

Ekstraktu šķīdinātāju tālākai salīdzināšanai pēc kopējo fenolu satura un antiradikālās aktivitātes tika izmantoti tikai termiski apstrādāti (karsēti) ekstrakti (5.,6. pielikums). Visaugstāko ekstrakcijas efektivitāti *Fredos Derlingieji* un *Itrinskij-15* apiņu šķirnēm veica 30/30 etanola-glicerīna šķīdums, taču *Smoļistij* – 70% etanola šķīdums. Viszemākā šķīdinātāja efektivitāte tika konstatēta destilētām ūdenim, ekstrahējot augstspiedienā autoklāvā. Kaut arī augu materiāla ūdens ekstrakcija ir videi draudzīgāka metode, paaugstinātā temperatūrā ne visi parastā apinī esošie polifenolu savienojumi ir ūdenī šķīstoši un daļa savienojumu var tikt degradēti (Shi et al., 2002, Almaguer et al., 2014). Etanola šķīdums nodrošina ātrāku ekstrakciju, kas var būt saistīts ar etanola zemo blīvumu ( $d = 0.789 \text{ g cm}^{-3}$ ). Šī īpašība atvieglo šķīdinātāja iekļūšanu cietās daļiņās, veicina ātru polifenolu šķīšanu un pārvešanu ekstraktā ūdens-etanola sistēmas polaritātes dēļ. Veicot ekstrahēšanu ar 30/30 etanola-glicerīna šķīdumu, glicerīna ietekmē noris lēna iekšēja difūzija, kas nodrošina sekmīgāku polifenolu pārvešanu ekstraktā. Ekstrahēšanas process ir lēnāks, taču var būt efektīvāks. To varētu skaidrot ar polārāku fenolu frakciju ekstrakciju, un glicerīna klātbūtnē varētu tikt izšķīdināts plašāks savienojumu klāsts (Apostolakis et al., 2014), paaugstinot ekstraktu kopējo fenolu saturu un līdz ar to – antiradikālo aktivitāti. Ar etanola šķīdumu var iegūt ekstraktus, kas ir bagāti ar apiņu fenoliem, taču literatūrā ir minētas efektīvākas metodes, kur tos veiksmīgāk var izdalīt izmantojot n-heksāna, etilacetāta, metanola un ūdens šķīdumu (5:5:4:3), kā arī CO<sub>2</sub> ekstrakciju augstspiedienā paaugstinātā temperatūrā (Chen et al., 2012, Roj et al., 2015). Svarīgi ir ņemt vērā arī to, ka *in vivo* ievāktā materiāla polifenolu koncentrācija un sastāvs var atšķirties sezonas un mikroklimata ietvaros (Apostolakis et al., 2014).

TPC un ARA analīzes tika atkārtoti veiktas uz izvēlētiem 14 apiņu ekstraktiem, kas papildus tika iegūti no attiecīgā augu materiāla bioloģiskā atkārtojuma veikšanas nolūkos. Rezultātiem tika veikta statistiskā analīze, lai noteiktu būtiskuma līmeni starp paraugkopām sugu ietvaros, un tika veikta arī korelācijas analīze starp TPC un ARA. Pētījumos ir pierādīts, ka augu ekstraktos esošo kopējo polifenolu saturs, kas ir būtiski augu attīstībai, savstarpēji korelē ar antiradikālo aktivitāti (Piljac-Žegarac et al., 2009, Piluzza and Bullitta, 2011).

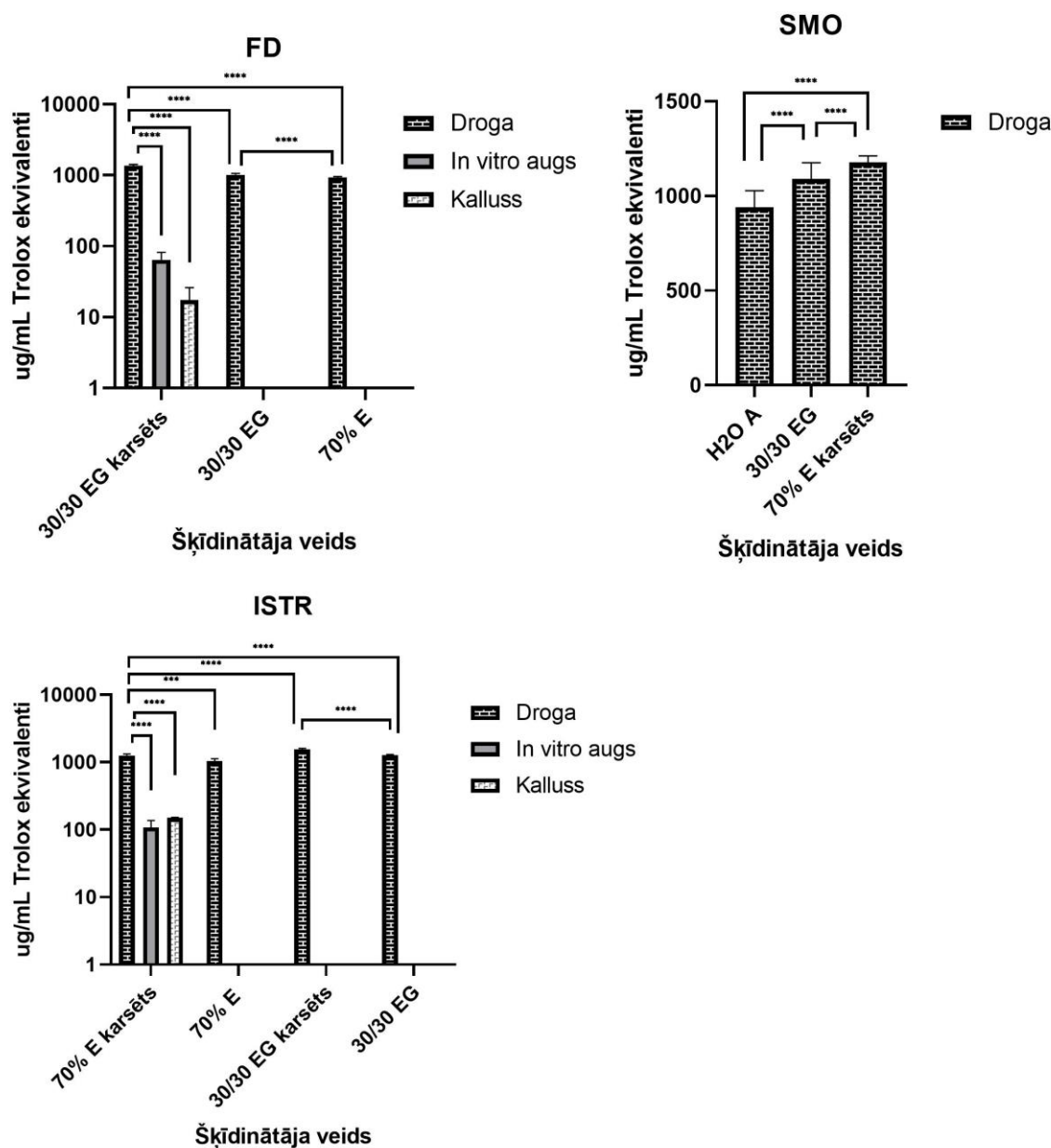
Veicot TPC datu analīzi, būtiska atšķirība tika novērota starp drogu ekstraktu dažādiem ekstrakcijas veidiem visām apiņu šķirnēm. *Istrinskij-15* un *Fredos Derlingieji* šķirnēm savstarpēji būtiska atšķirība tika konstatēta starp karsētiem un nekarsētiem 70% etanola un 30/30 etanola-glicerīna ekstraktiem un dažādām augu materiāla izejvielām, kā arī starp visiem šķīdinātāju veidiem SMO drogu ekstraktu gadījumā (4. attēls). TPC gadījumā labākos rezultātus FD un ISTR augiem uzrādīja karstēta 30/30 šķīdinātāja izmantošana, bet SMO gadījumā – karsēts 70% etanols. Grafikos tika uzrādītas tikai ar specifisko metodi detektētās ekstraktu vērtības. Līdzīgi novērojumi tika konstatēti arī pēc ARA datu analīzes (5. attēls). Papildus tam, rezultāti uzrāda, ka ekstraktu antiradikālā aktivitāte korelē ar kopējo fenolu saturu (Pīrsona korelācijas koeficients  $r=0,944$ ,  $p<0.0001$ ).

Drogu ekstraktiem kopējais fenolu saturs bija robežās no 40 līdz 111 mg/g DW galluskābes ekvivalentu, bet antiradikālā aktivitāte ir no 922 līdz 1548 ug/mL Trolox ekvivalentu, kas ir līdzvērtīgas vai pat augstākas vērtības kā citos pētījumos ar apini (Barbosa-Pereira et al., 2013, Abram et al., 2015, Onder et al., 2013). *In vitro* augu un kallusu kultūru audzēšana noris kontrolētos apstākļos, mēģinot atdarināt optimālus dabiskos apstākļus, taču nav tiešas sezonālās, vides apstākļu un bioloģisko faktoru, piemēram, patogēnu, ietekmes, kas būtiski var palielināt sekundāro metabolītu produkciju (Apostolakis et al., 2014). *In vitro* sistēmās augu un audu kultūras galvenokārt ir tendētas uz primāro metabolītu ražošanu izdzīvošanas vajadzībām. Ir pierādīts, ka nobriedušū apiņu sastāvā ir augstāka polifenolu koncentrācija kā jaunos īpatņos (Almaguer et al., 2014). Lai sekmētu sekundāro metabolītu produkciju, būtu nepieciešams variēt ar biotisku vai abiotisku elicitoru iedarbību (Shasmita et al., 2018, Karuppusamy, 2010).



4. attēls. Apiņu ekstraktu kopējais fenolu saturs trīs dažādām apiņu šķirnēm (FD, ISTR, SMO). Rezultāti ir norādīti kā vidējās vērtības ar  $\pm$  SD mg/g DW, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n=2$ , FD un ISTR rezultāti izteikti  $\log_{10}$  skalā (A-augstspiediena; EG – etanols-glicerīns; E – etanols, FD – *Fredos Derlingieji*, SMO – *Smoļstij*, ISTR – *Istrinskij-15*).

Figure 4. Total phenolic content of three hop varieties (FD, ISTR, SMO). Results are expressed as mean  $\pm$  SD mg/g DW, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n=2$ , FD and ISTR results are expressed on a  $\log_{10}$  scale (A – high pressure; EG – ethanol-glycerol; E – ethanol, FD – *Fredos Derlingieji*, SMO – *Smoļstij*, ISTR – *Istrinskij-15*).



5. attēls. Apiņu ekstraktu antiradikālā aktivitāte trīs dažādām apiņu šķirnēm (FD, ISTR, SMO). Rezultāti ir norādīti kā vidējās vērtības ar  $\pm$  SD ug/mL, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n=2$ , FD un ISTR rezultāti izteikti  $\log_{10}$  skalā (A-augstspiediena; EG – etanols-glicerīns; E – etanols, FD – *Fredos Derlingieji*, SMO - *Smoļstij*, ISTR – *Istrinskij-15*).

Figure 5. Antiradical activity of three hop varieties (FD, ISTR, SMO). Results are expressed as mean  $\pm$  SD ug/mL \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n=2$ , FD and ISTR results are expressed on a  $\log_{10}$  scale (A – high pressure; EG – ethanol-glycerol; E – ethanol, FD – *Fredos Derlingieji*, SMO - *Smoļstij*, ISTR – *Istrinskij-15*).

Individuālu ekstraktu radikāļa DPPH neutralizēšanas spēja tika izteikta procentuāli ar  $IC_{50}$ , kas atbilst ekstrakta koncentrācijai, kas ir nepieciešama, lai nodrošinātu absorbcijas samazināšanos par 50% jeb lai neutralizētu 50% no kopējā izmantotā DPPH daudzuma (Abram et al., 2015). DPPH neutralizēšanā visefektīvākie ir visu šķirņu drogu ekstrakti, kas 50% DPPH neutralizē koncentrācijās no 13-17% (10. tabula). *In vitro* augu un kallusu ekstraktiem antiradikālā aktivitāte ir zema, un būtu nepieciešama to iekonzentrēšana (FD karsēta 30/30 kallusu ekstrakta gadījumā pat vairāk kā 5x), lai sasniegtu pietiekami lielu fenolu - antioksidantu daudzumu, kas nodrošinātu absorbcijas samazināšanu līdz 50%.

10. tabula

Apiņu ekstraktu procentulā koncentrācija 50% DPPH neutralizēšanai.

Table 10

Percentage of hop extracts capable to neutralize 50% DPPH.

<b>Ekstrakta veids</b>	<b>IC<sub>50</sub> ± SD, %</b>
<i>Fredos Derlingieji</i> karsēts drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	20,35 ± 2,13
<i>Fredos Derlingieji</i> drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	16,98 ± 1,16
<i>Fredos Derlingieji</i> karsēts <i>in vitro</i> augu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	19,65 ± 1,17
<i>Fredos Derlingieji</i> karsēts kallusu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	527,69 ± 50,81
<i>Istrinskij-15</i> karsēts drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	389,11 ± 31,78
<i>Istrinskij-15</i> drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	20,02 ± 2,78
<i>Istrinskij-15</i> drogu 70% etanola ekstrakts	13,97 ± 0,89
<i>Istrinskij-15</i> karsēts drogu 70% etanola ekstrakts	23,42 ± 0,92
<i>Istrinskij-15</i> drogu 70% etanola ekstrakts	18,97 ± 1,74
<i>Istrinskij-15</i> karsēts <i>in vitro</i> augu 70% etanola ekstrakts	146,81 ± 11,64
<i>Istrinskij-15</i> karsēts kallusu 70% etanola ekstrakts	200,01 ± 20,20
<i>Smoļstij</i> drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	23,79 ± 2,93
<i>Smoļstij</i> karsēts drogu 70% etanola ekstrakts	13,30 ± 4,19
<i>Smoļstij</i> kallusu ekstrakts ūdenī augstspiedienā	24,44 ± 5,33

### 3.4. Parastā apiņa ekstraktu antimikrobiālās aktivitātes raksturošana

Kā cilvēku ādas patogēni tika izvēlēti pētījumos plaši izmantoti 4 mikroorganismu celmi (Bocquet et al., 2018), skatīt 6. tabulu. 39 dažādu apiņu ekstraktiem tika veikts antimikrobiālās iedarbības skrīnings pēc koloniju suspensiju metodes, izmantojot trīs veidu baktērijas – grampozitīvas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* un gramnegatīvas *Escherichia coli* baktērijas, kā arī rauga sēnīti – *Candida albicans* (7., 8. pielikums). Visaugstākā antimikrobiālā iedarbība tika konstatēta uz rauga sēnītes *Candida albicans* kultūru, taču nebija nozīmīgas ietekmes uz visu trīs baktēriju kultūrām, kaut arī literatūrā ir norādīta antibakteriāla apiņu ekstraktu iedarbība uz *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* un *Escherichia coli* (Bartmanska et al., 2018, Langezaal et al., 1992). Salīdzinot ar šķīdinātāju pozitīvajām kontrolēm, kopumā zema iedarbība ir ūdens ekstraktiem, augstāka tā bija 30/30 etanola-glicerīna un 70% etanola ekstraktiem (8. tabula). Lai pārbaudītu datu precizitāti, tika veikti bioloģiskie atkārtojumi 12 atlasītajiem ekstraktiem, kuriem tika novērota efektivitāte, un atkārtoti novērtēta minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) uz *Candida albicans* (8.tabula). Minimālā inhibējošā parauga koncentrācija svārstījās robežās no 1.56% līdz 6.25% uz plates lauciņu.

11. tabula

Apiņu ekstraktu antimikrobiālā aktivitāte uz *Candida albicans*.

Table 11

Antimicrobial activity of hop extract on *Candida albicans*.

Ekstrakta veids	MIC (parauga konc. uz lauciņu)
<i>Smoļstijkallusu</i> ekstrakts ūdenī augstspiedienā	6,25 %
<i>Fredos Derlingieji</i> karsēts drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	6,25 %
<i>Fredos Derlingieji</i> drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	6,25 %
<i>Fredos Derlingieji</i> karsēts <i>in vitro</i> augu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	1,56%
<i>Fredos Derlingieji</i> karsēts kallusu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	1,56%
<i>Istrinskij-15</i> karsēts drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	6,25 %
<i>Istrinskij-15</i> drogu 30/30 etanola-glicerīna ekstrakts	6,25 %
<i>Istrinskij-15</i> drogu 70% etanola ekstrakts	3,13%
<i>Istrinskij-15</i> karsēts drogu 70% etanola ekstrakts	6,25 %
<i>Istrinskij-15</i> drogu 70% etanola ekstrakts	6,25 %
<i>Istrinskij-15</i> karsēts <i>in vitro</i> augu 70% etanola ekstrakts	3,13%
<i>Istrinskij-15</i> karsēts kallusu 70% etanola ekstrakts	3,13%

Antifungālās iedarbības atšķirības ir novērojamas ne tikai ekstraktu šķīdinātāju ietvaros, bet arī visu trīs apiņu šķirņu ietvaros. Viszemākā tā bija apiņu šķirnei *Smoļistij*, bet iedarbību ne tikai drogu, bet arī kallusu un *in vitro* augu ekstraktiem uzrādīja arī *Istrinskij-15* un *Fredos derlingieji*. Starp kopējo fenolu saturu, antiradikālo un antimikrobiālo aktivitāti netika novērota korelācija. Bez TPC var būt arī citi faktori vai savienojumi, kas var ietekmēt antimikrobiālo aktivitāti, kuru noskaidrošanai papildus būtu jāveic ekstraktu ķīmiskās analīzes.

Apiņu ekstraktos flavanoni un 6-prenilnaringenīns ir identificēti kā antifungāli savienojumi (Bocquet et al., 2018, Mizobuchi and Sato, 1985), tāpēc būtu vērtīgi veikt ķīmiskās analīzes un uzzināt, vai testētajos brīvi augošu augu lapu ekstraktos šādi savienojumi ir detektējami. Apiņos esošo dabīgo savienojumu aktivitāte izrādījās zemāka kā sintētiskiem fungicīdiem (Bocquet et al., 2018).

### 3.5. Tālākie pētījuma mērķi

Praktiskā darba izstrādes laikā tika iegūts arī neliels daudzums kallusa materiāla no nenobriedušām sievišķajām ziedkopām - rogām. Attīstot stabilu kultūru, varētu tikt analizēts kallusu ekstraktu ķīmiskais sastāvs, jo pētījumos minēts, ka tādas aktīvās vielas kā ksantohumols, kuru sekretē lupulīna dziedzeri, paaugstinātā daudzumā dabā, kā jau tika minēts iepriekš, ir atrodams tikai apiņu rogās (Almaguer et al, 2014). Ir pierādīts, ka nelielā daudzumā ksantohumolu var iegūt arī no lapu eksplantu suspensijām. Tādējādi no lapu eksplantiem iegūtas apiņu kallusu kultūras var kalpot par izejmateriālu ksantohumola sintēzei, tās papildus elicitējot vai izmantojot metaboliskās inženierijas metodes (Gatica-Arias, 2012). Turpinot attīstīt kallusu kultūras un papildus iegūstot šūnu suspensiju kultūras, varētu paaugstināt arī to antimikrobiālo efektivitāti un citu sekundāro metabolītu sintēzi (Shasmita et al., 2018).

Pētījumos ir konstatēts, ka parastajā apinī esošie savienojumi var izraisīt kairinājumu cilvēka ādai (Karabin et al., 2016), tādēļ būtu nepieciešams salīdzināt iegūto ekstraktu citotoksicitāti un iedarbību uz ādas šūnu modeļsistēmām *in vitro*.

Balstoties uz *Weber* un viņa kolēģu veiktajiem pētījumiem, ir pamats domāt, ka apiņu ekstraktiem ir potenciāls izmantošanai pretaknes kosmētikas līdzekļu ražošanā, tāpēc šī pētījuma turpinājumā ekstraktu antimikrobiālo iedarbību būtu nepieciešams pārbaudīt arī uz *Propionibacterium Acnes* baktērijām (Weber et al., 2019).

## SECINĀJUMI

1. Trīs parastā apiņa šķirņu – *Smoļstij*, *Istrinskij* un *Fredos Derlingieji* – kallusu kultūras tika iegūtas uz agarizētas *McCown Woody Plant* barotnes, kurai pievienoti augšanas regulatori: auksīni 1,5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L NAA, kā arī citokinīni 2 mg/L BAP, 0,1 mg/L TDZ.
2. 20% un 50% ACE balinātāja šķīdums kombinācijā ar etanolu un sērskābi ir efektīvs līdzeklis eksplantu un sēklu virsmu sterilizēšanai *in vitro* augu un kallusu kultūru ieguvē. Vienlaikus būtu nepieciešama sterilizēšanas metodes optimizēšana rezultātu uzlabošanai.
3. Visaugstākais kopējo fenolu saturs un antiradikālā aktivitāte tika novērota, kā šķīdinātāju izmantojot karsētu 30/30 etanola-glicerīna šķīdumu. Antimikrobiālās aktivitātes testos līdzvērtīgu efektivitāti uzrādīja arī karsēti 70% etanola ekstrakti.
4. No iegūtajiem ekstraktiem lielāko fenolu savienojumu saturu un augstāko antiradikālo aktivitāti uzrādīja visu petīto šķirņu drogu ekstrakti, taču antimikrobiālā aktivitāte bija novērojama arī *Istrinskij-15* un *Fredos Derlingieji in vitro* augu un kallusu ekstraktiem.
5. Lai objektīvi izvērtētu parastā apiņa *in vitro* augu kallusu kultūru ekstraktu potenciālo pielietojumu, būtu nepieciešams veikt papildus ķīmiskās un antimikrobiālās aktivitātes analīzes, kā arī kultūru elicitēšanas eksperimentus.

## PATEICĪBAS

Darba autore izsaka lielu pateicību darba vadītājai mag. biol. Elzai Kaktiņai, konsultantēm mag. biol. Annai Ramatai-Stundai, Dorai Livkišai un SIA Alternative Plants kolektīvam.

Pateicība Latvijas Mikroorganismu kolekcijas kolektīvam par darbā izmantoto mikroorganismu kultūru nodrošināšanu, kā arī LU Nacionālajam Botāniskajam dārzam un Zandai Jefremovai par palīdzību parastā apiņa kultūru kultivēšanas uzsākšanā.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Poklar Ulrih N. 2015. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*, 64, 124–134.
2. Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K. and Becker, T. 2014. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told.- *J. Inst. Brew.*, 120: 289– 314.
3. Almeida A.D.R., Maciel M.V.D.O.B., Machado M.H., Bazzo G.C., de Armas R.D., Vitorino V.B., Vitali L., Block J.M., Barreto P.L.M. 2020. Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. *Int J Food Sci Technol*, 55: 340-347.
4. Alvesalo J., Vuorela H., Tammela P., Leinonen M., Saikku P., Vuorela P. 2006. Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. *Biochem Pharmacol* 71(6):735–41.
5. Apostolakis A., Grigorakis S., Makris D.P. 2014. Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol mixtures, *Separation and Purification Technology*, Volume 128, Pages 89-95.
6. Barbosa-Pereira L., Angulo I., Paseiro-Losada P., Cruz J.M.. 2013. Phenolic profile and antioxidant properties of crude extract obtained from a brewery waste stream, *Food Research International*, Volume 51, Issue 2.
7. Bartmanska A., Walecka-Zacharska E., Tronina T., Poplonski J., Sordon S., Brzezowska E., Bania J., Huszcza E. 2018. Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolates Therefrom and Their Derivatives, *Molecules*, 23(8), 2059.
8. Baskin C.C., Baskin J.M. 2014. Chapter 3 – Types of Seeds and Kinds of Seed Dormancy, *Seeds (Second Edition)*, Academic Press, Pages 37-77.
9. Benkherouf A.Y., Logrén N., Somborac T., Kortensniemi M., Soini S.L., Yang B., Salo-Ahen O.M.H., Laaksonen O., Uusi-Oukari M., 2020. Hops compounds modulatory effects and 6-prenylnaringenin dual mode of action on GABAA receptors, *European Journal of Pharmacology*, Volume 873, 172962.
10. Bocquet L., Rivière C., Dermont C., Samaillie J., Hilbert J.L., Halama P., Siah A., Sahpaz S. 2018. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*, *Industrial Crops and Products*, Volume 122, 290-297.

11. Bonamin F., Moraes T.M., dos Santos R.C., Kushima H., Faria F.M., Silva M.A., Junior I.V., Nogueira L., Bauab T.M., Brito A.R.M.S., da Rocha L.R.M., Hiruma - Lima C.A. 2014. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: the role of beta-myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chem-Biol Interact* 212:11–9.
12. Chen Q.H., Fu M.L., Chen M.M., Liu J., Liu X.J., He G.Q., Pu S.C. 2012. Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Food Chem.* 132(1):619-623.
13. Doble M., Kruthiventi A.K. 2007. Chapter 5 - Alternate Solvents, *Green Chemistry and Engineering*, Academic Press, Pages 93-104.
14. Efferth T. 2019. *Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures, Engineering*, Volume 5, Issue 1:50-59.
15. Fidyk K., Fiedorowicz A., Strzdała L., & Szumny A. 2016.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer medicine*, 5(10), 3007–3017.
16. Franco L., Sánchez C., Bravo R., Rodriguez A., Barriga C., Juárez, J. 2012. The sedative effects of hops(*Humulus lupulus*), a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Acta Physiologica Hungarica*, 99(2), 133–139.
17. Fukuzaki S. 2006. Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes, *Biocontrol Science*, Volume 11, Issue 4, Pages 147-157.
18. Gatica-Arias A., Farag M.A., Stanke M. 2012. Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L.. *Plant Cell Rep* 31, 111–119.
19. George E., Hall M., De Klerk G.J. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd ed.: Volume 1. The Background.
20. Gerhauser C., Alt A., Heiss E., Gamal - Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H.R., Frank N., Bartsch H., Becker H. 2002. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* 1(11):959–69.
21. Gomes-Carneiro M.R., Viana M.E.S., Felzenszwalb I., Paumgarten F.J.R. 2005. Evaluation of  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -terpinene and (+)- and (-)- $\alpha$ -pinene in the Salmonella/microsome assay, *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 247-252.
22. Helle J., Kraker K., Bader M.I., Keiler A.M., Zierau O., Vollmer G., Welsh J., Kretzschmar G. 2014. Assessment of the proliferative capacity of the flavanones 8-prenylnaringenin, 6-(1.1-dimethylallyl)naringenin and naringenin in MCF-7 cells and the rat mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* 392(1–2):125–35.

23. Herman A., Tambor K. and Herman A. 2016. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Curr Microbiol* 72, 165–172.
24. Hussain A., Qarshi I.A., Nazir H., Ullah I. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities, Recent Advances in Plant in vitro Culture, Annarita Leva and Laura M. R. Rinaldi, IntechOpen, 219 pp.
25. Ieviņš Ģ. 2016. Augu fizioloģija. Funkcijas un mijiedarbība ar vidi. Rīga: LU Akadēmiskais apgāds, 608 lpp.
26. Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L. And Dostálek, P. (2016), Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15: 542-567.
27. Karuppusamy S. 2010. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3. 1222-1239.
28. Kohler F.E. 1887. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America, pp 99.
29. Kyrou I., Christou A., Panagiotakos D., Stefanaki C., Skenderi K., Katsana K., Tsigos C. 2017. and stress levels in apparently healthy young adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover pilot study. *Hormones* 16, 171–180.
30. Langezaal C.R., Chandra A., Scheffer J.J.C. 1992. Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L cultivars. *Pharm Weekblad* 14(6):353–6.
31. Li R., Shang H., Wu H., Wang M., Duan M., & Yang J. 2018. Thermal inactivation kinetics and effects of drying methods on the phenolic profile and antioxidant activities of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Scientific reports*, 8(1), 9529.
32. Liberatore C.M., Mattion G., Rodolfi M., Ganino T., Fabbri A., Chiancone B. 2018. Chemical and physical pre-treatments to improve in vitro seed germination of *Humulus lupulus* L., cv. Columbus, *Scientia Horticulturae*, Volume 235, Pages 86-94.
33. Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. & Humana Press. 2006. Plant cell culture protocols, 2nd ed, Humana Press, Totowa, N.J, 368 pp.
34. Majid B., Mehdi S., Harishchandra S., Dr. Geetha N. 2017. Establishment of an improved, efficient and eco-friendly micropropagation system in *Salacia chinensis* L. An endangered anti-diabetic medicinal plant. 63. 167-176
35. McCown, B.H. Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM)—a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience* 16, 453-453.

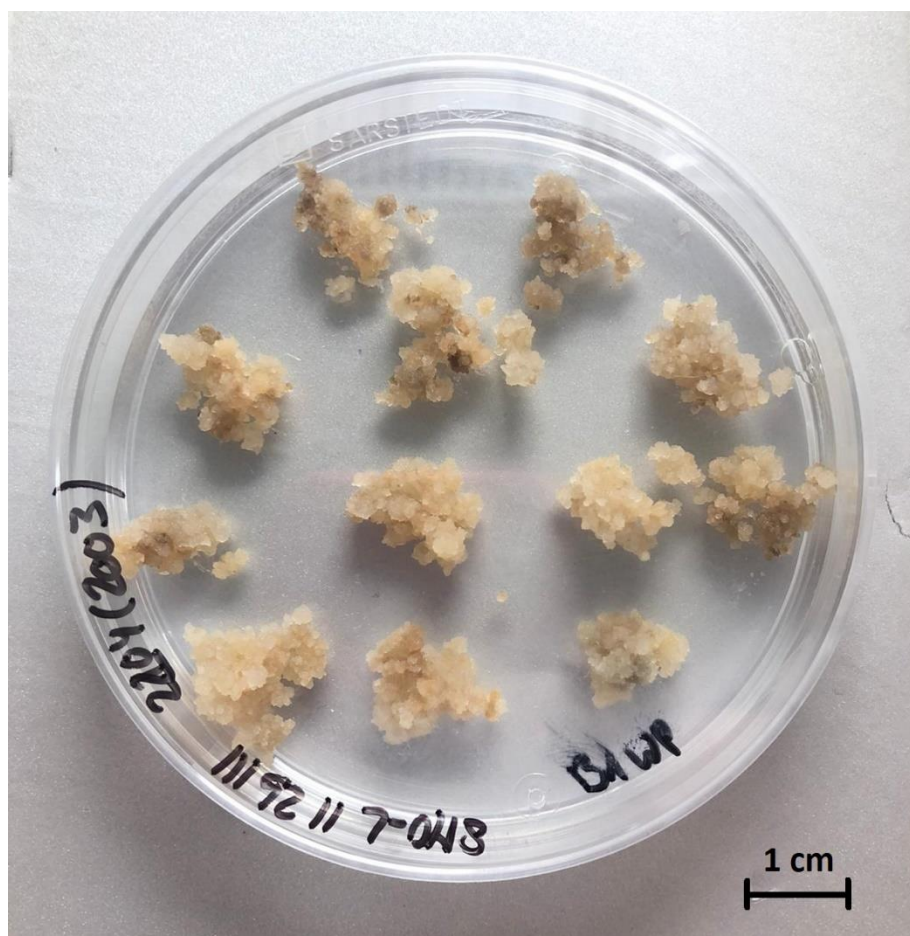
36. Milligan S. R., Kalita, J. C. Heyerick, A. Rong, H. Cooman L. D., and Keukeleire, D. D. 1999. Identification of potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2249–2252.
37. Mizobuchi S., & Sato Y. 1985. Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(2), 399–403.
38. Mulabagal, V. & Tsay, Hsin-Sheng. 2004. Plant Cell Cultures an Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *J Appl Sci Eng Tech.* 2. 29-48.
39. Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
40. Onder, F. C., Ay, M., & Sarker, S. D. 2013. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of the Extracts of *Humulus lupulus* L. And Quantification of Bioactive Components by LC–MS/MS and GC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44).
41. Piljac-Žegarac J., Belščak A., Piljac A. 2009. Antioxidant capacity and polyphenolic content of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaf infusions. *Journal of Medicinal Food* 12, 608-614.
42. Piluzza G, Bullitta S. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm Biol.* 2011;49(3):240-247.
43. Plumlee K.H. 2004. Chapter 25 – Plants. – *Clinical Veterinary Toxicology*, 337-442.
44. Roberts M. T., Dufour J. - P., and Lewis A. C. 2004. Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC × GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil, *J. Sep. Sci.* 27, 473–478.
45. Rój E., Tadić V. M., Mišić D., Žižović I., Arsić I., Dobrzyńska-Inger A., & Kostrzewa D. 2015. Supercritical carbon dioxide hops extracts with antimicrobial properties. *Open Chemistry*, 13(1).
46. Rozalski M., Micota B., Sadowska B., Stochmal A., Jedrejek D., Wieckowska - Szakiel M., Rozalska B. 2013. Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. Derived products: New pharmacological properties. *Biomed Res Int* 2013:1–8.
47. Shasmita S., Singh N.R., Rath S.K., Behera S., Naik S.K. 2018. In Vitro Secondary Metabolite Production Through Fungal Elicitation: An Approach for Sustainability. In:

- Prasad R., Kumar V., Kumar M., Wang S. (eds) Fungal Nanobionics: Principles and Applications. pp 215-242.
48. Shephard, H.L., Parker, J.S., Darby, P. and Ainsworth, C.C. (2000), Sexual development and sex chromosomes in hop.- *New Phytologist*, 148: 397-411.
  49. Shi J., Yu J., Pohorly J., Young J.C., Bryan M., Wu Y., & Canada A. 2003. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution.
  50. Shimamura M., Hazato T., Ashino H., Yamamoto Y., Iwasaki E., Tobe H., Yamamoto K., Yamamoto S. 2001. Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. *Biochem Biophys Res Commun* 289(1):220–4.
  51. Spiewak R., Góra A., Dutkiewicz J. 2001. Work-related skin symptoms and type I allergy among eastern-Polish farmers growing hops and other crops. *Ann Agric Environ Med*. 8(1):51-56.
  52. Stevens, J. F., Miranda, C. L., Buhler, D. R., and Deinzer, M. L. 1998. Chemistry and biology of hop flavonoids, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56, 136–145.
  53. Tripathi J., Matheka J., Merga I., Gebre E., Tripathi L. 2017. Efficient regeneration system for rapid multiplication of clean planting material of *Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman. *In vitro cellular & developmental biology. Plant : journal of the Tissue Culture Association*, 53(6), 624–630.
  54. Velde N. V. D., and Verzele M. 1986. High performance liquid chromatography of hop and beer extracts with photodiode array detection, *J. Inst. Brew.* 92, 584–587.
  55. Weber N., Biehler K., Schwabe K., Haarhaus B., Quirin K.-W., Frank U., Schempp, C.M., Wölfle U. 2019. Hop Extract Acts as an Antioxidant with Antimicrobial Effects against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. *Molecules* 24, 223.
  56. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3, 163–175.
  57. Yildiz M. 2012. The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration, *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, Annarita Leva and Laura M. R. Rinaldi, IntechOpen, 219 pp.

## Pielikumi

1. pielikums

Parastā apiņa *Smoļistij* kallusi agarizētajā WP barotnē *Petri* platē.  
Common hop *Smoļistij* calluses in *Petri* dish on WP agar medium.

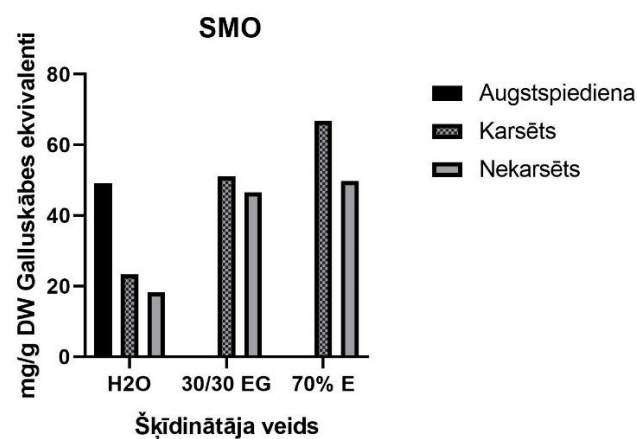
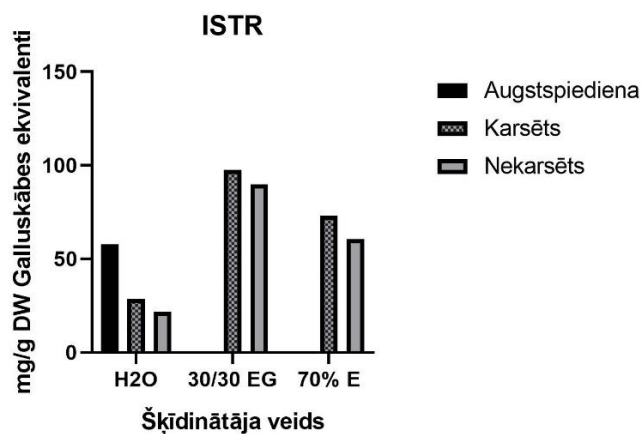
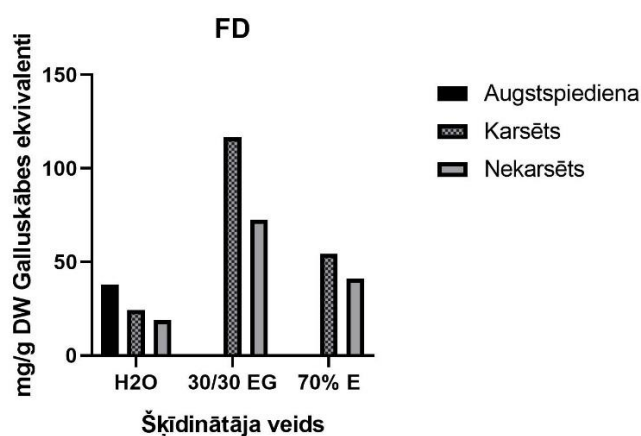


Parastā apiņa *Fredos Derlingieji in vitro* augs augu kultivēšanas traukā.  
Common hop *Fredos Derlingieji in vitro* plant in plant culture container.



Karsēšanas ietekme uz kopējo fenolu saturu parasto apiņu - *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO) – ūdens (H<sub>2</sub>O), 30/30 etanola-glicerīna (EG) un 70% etanola (E) drogu ekstraktos. Rezultāti normēti uz ekstraktiem izmantoto sauso biomasu.

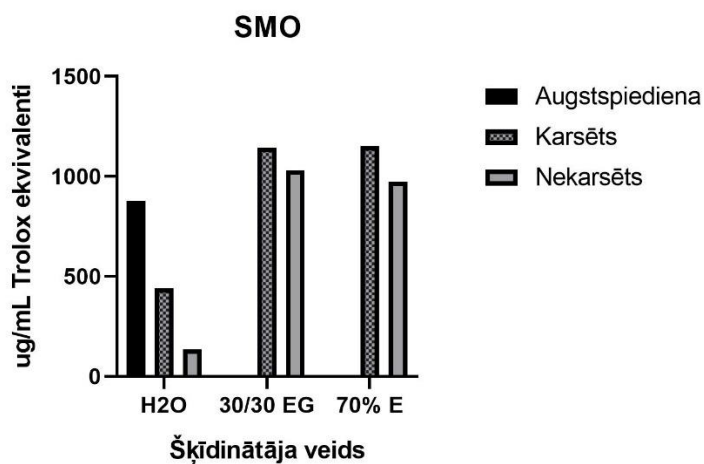
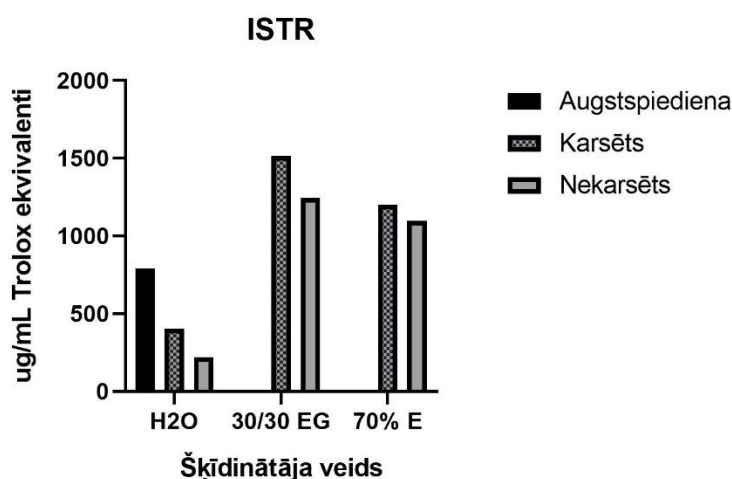
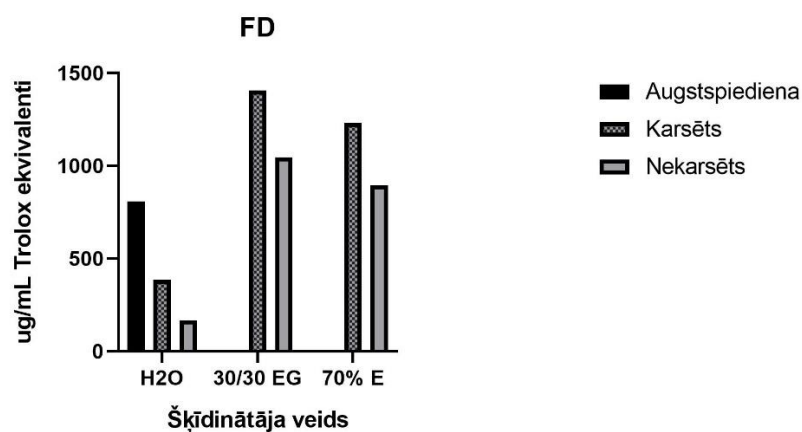
Effect of heat treatment on total phenolic content in water (H<sub>2</sub>O), 30/30 ethanol-glycerol (EG) and 70% ethanol (E) wild plant extracts of common hops *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO). Results are normalized to the dry biomass used in extraction.



#### 4. pielikums

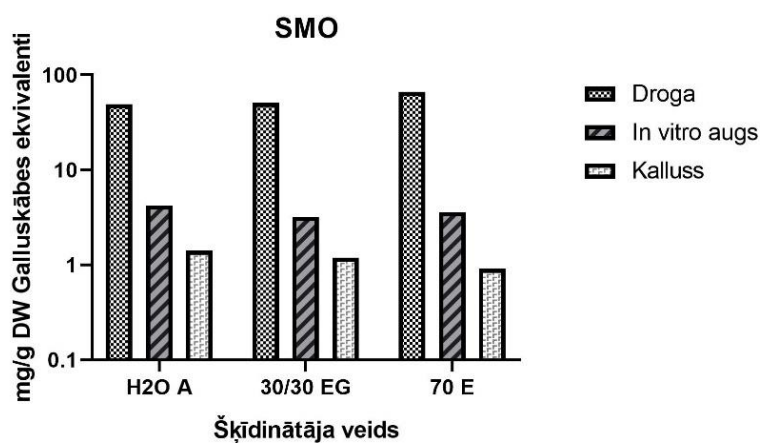
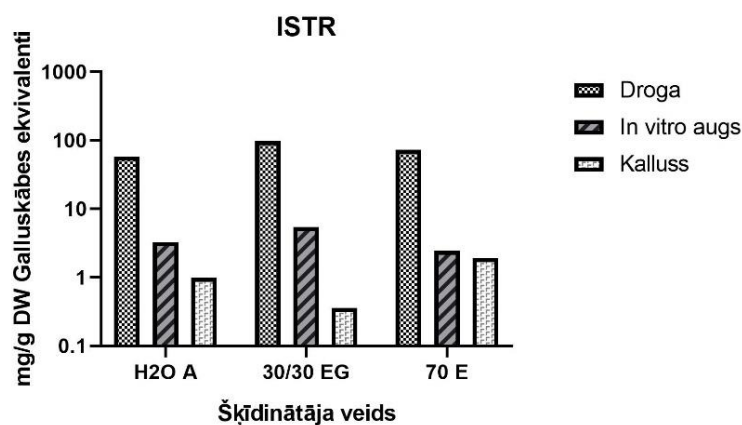
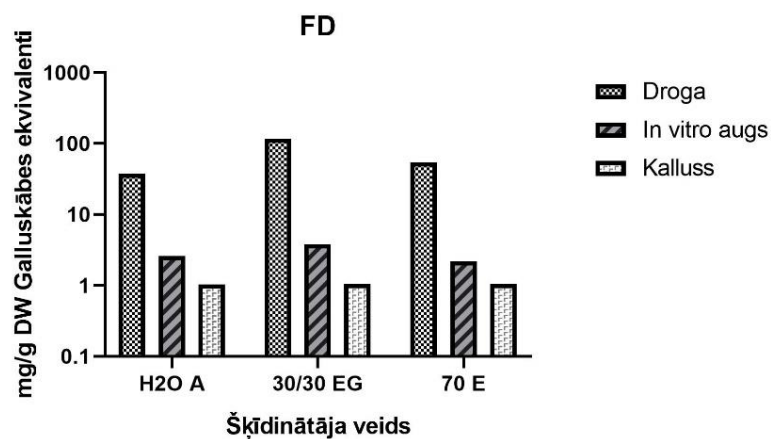
Karsēšanas ietekme uz antiradikālo aktivitāti parasto apiņu - *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO) – ūdens (H<sub>2</sub>O), 30/30 etanola-glicerīna (EG) un 70% etanola (E) ekstraktos.

Effect of heat treatment on antiradical activity in water (H<sub>2</sub>O), 30/30 ethanol-glycerol (EG) and 70% ethanol (E) extracts of common hops *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO).



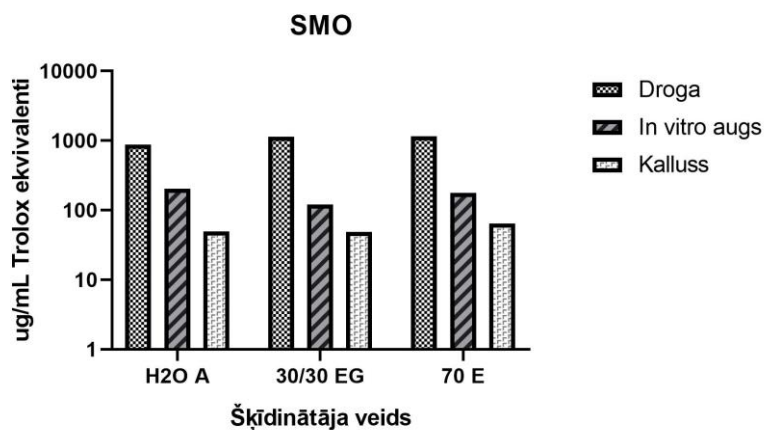
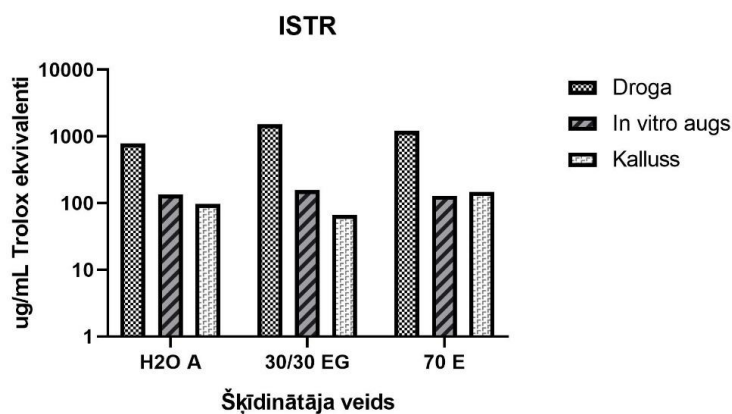
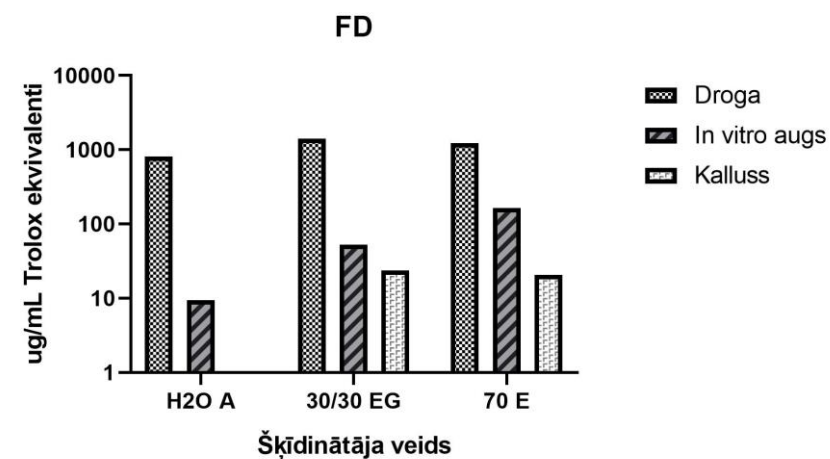
Dažādu šķīdinātāju ietekme uz kopējo fenolu saturu parasto apiņu - *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO) – ūdens (H<sub>2</sub>O), 30/30 etanola-glicerīna (EG) un 70% etanola (E) ekstraktos.

Effect of different solvents on total phenol content in water (H<sub>2</sub>O), 30/30 ethanol-glycerol (EG) and 70% ethanol (E) extracts of common hops *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO).



Dažādu šķīdinātāju ietekme uz antiradikālo aktivitāti parasto apiņu - *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO) – ūdens (H<sub>2</sub>O), 30/30 etanola-glicerīna (EG) un 70% etanola (E) ekstraktos.

Effect of different solvents on antiradical activity in water (H<sub>2</sub>O), 30/30 ethanol-glycerol (EG) and 70% ethanol (E) extracts of common hops *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO).



## 7. pielikums

Parasto apiņu - *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO) – ūdens (H<sub>2</sub>O), 30/30 etanola-glicerīna (EG) un 70% etanola (E) ekstraktu antimikrobiālā iedarbība uz *Candida albicans* un *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobial activity of the water (H<sub>2</sub>O), 30/30 ethanol-glycerol (EG) and 70% ethanol (E) extracts of common hops *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO) against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*.

Paraugu atšifrējumi	<i>C.albicans</i>						<i>S.aureus</i>						
	Parauga koncentrācija lauciņā												
	25%	12,50%	6,25%	3,13%	1,56%	0,78%	25%	12,50%	6,25%	3,13%	1,56%	0,78%	
FD-D <sup>1</sup> H2O A													
FD-V <sup>2</sup> H2O A													
FD-K <sup>3</sup> H2O A													
FD-D H2O K													
FD-D H2O													
ISTR-D H2O A													
ISTR-V H2O A													
ISTR-K H2O A													
ISTR-D H2O K													
ISTR-D H2O													
SMO-D H2O A													
SMO-V H2O A													
SMO-K H2O A													
SMO-D H2O K													
SMO-D H2O													
FD-D 30/30 EG K													
FD-D 30/30 EG													
FD-V 30/30 EG K													
FD-K 30/30 EG K													
ISTR-D 30/30 EG K													
ISTR-D 30/30 EG													
ISTR-V 30/30 EG K													
ISTR-K 30/30 EG K													
SMO-D 30/30 EG K													
SMO-D 30/30 EG													
SMO-V 30/30 EG K													
SMO-K 30/30 EG K													
FD-D 70% E K													
FD-D 70% E													
FD-V 70% E K													
FD-K 70% E K													
ISTR-D 70% E K													
ISTR-D 70% E													
ISTR-V 70% E K													
ISTR-K 70% E K													
SMO-D 70% E K													
SMO-D 70% E													
SMO-V 70% E K													
SMO-K 70% E K													
70% E													
30/30 EG													
H2O													

<sup>1</sup> droga; <sup>2</sup> *in vitro* augs; <sup>3</sup> kalluss; A- augstspiediena; K karsēts; zaļš lauciņš – augšanu inhibējoša ekstrakta koncentrācija; sarkans lauciņš – ekstrakta koncentrācija nav inhibējoša.

<sup>1</sup> wild plant; <sup>2</sup> *in vitro* plant; <sup>3</sup> callus; \* high pressure; \*\* heat treatment; green field – inhibitory extract concentration; red field – non inhibitory extract concentration.

## 8. pielikums

Parasto apiņu - *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO) – ūdens (H2O), 30/30 etanola-glicerīna (EG) un 70% etanola (E) ekstraktu antimikrobiālā iedarbība uz *Escherichia coli* un *Staphylococcus epidermidis*.

Antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* using water (H2O), 30/30 ethanol-glycerol (EG) and 70% ethanol (E) extracts of common hops *Fredos Derlingieji* (FD), *Istrinskij-15* (ISTR), *Smoļistij* (SMO).

Paraugu atšifrējumi	<i>E.Coli</i>						<i>S.epidermidis</i>					
	Parauga koncentrācija lauciņā											
	25%	12,50%	6,25%	3,13%	1,56%	0,78%	25%	12,50%	6,25%	3,13%	1,56%	0,78%
FD-D <sup>1</sup> H2O A												
FD-V <sup>2</sup> H2O A												
FD-K <sup>3</sup> H2O A												
FD-D H2O K												
FD-D H2O												
ISTR-D H2O A												
ISTR-V H2O A												
ISTR-K H2O A												
ISTR-D H2O K												
ISTR-D H2O												
SMO-D H2O A												
SMO-V H2O A												
SMO-K H2O A												
SMO-D H2O K												
SMO-D H2O												
FD-D 30/30 EG K												
FD-D 30/30 EG												
FD-V 30/30 EG K												
FD-K 30/30 EG K												
ISTR-D 30/30 EG K												
ISTR-D 30/30 EG												
ISTR-V 30/30 EG K												
ISTR-K 30/30 EG K												
SMO-D 30/30 EG K												
SMO-D 30/30 EG												
SMO-V 30/30 EG K												
SMO-K 30/30 EG K												
FD-D 70% E K												
FD-D 70% E												
FD-V 70% E K												
FD-K 70% E K												
ISTR-D 70% E K												
ISTR-D 70% E												
ISTR-V 70% E K												
ISTR-K 70% E K												
SMO-D 70% E K												
SMO-D 70% E												
SMO-V 70% E K												
SMO-K 70% E K												
70% E												
30/30 EG												
H2O												

<sup>1</sup> droga; <sup>2</sup> *in vitro* augs; <sup>3</sup> kalluss; A- augstspiediena; K karsēts; zaļš lauciņš – augšanu inhibējoša ekstrakta koncentrācija; sarkans lauciņš – ekstrakta koncentrācija nav inhibējoša.

<sup>1</sup> wild plant; <sup>2</sup> *in vitro* plant; <sup>3</sup> callus; \* high pressure; \*\* heat treatment; green field – inhibitory extract concentration; red field – non inhibitory extract concentration.

Bakalaura darbs „Parastā apiņa (*Humulus lupulus*) *in vitro* augu un audu kultūru izveide un no tām iegūtu ekstraktu antiradikālās un antimikrobiālās aktivitātes raksturošana” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Madara Balode 27.05.2020.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Mag.biol. Elza Kaktiņa 27.05.2020.

Recenzents: Dr.biol. Anete Boroduške

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 27.05.2020.

Lietvede: .....

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: