

KOPSAVILKUMS

Pētījuma mērķis: Novērtēt drogu sagatavošanas un uzglabāšanas kvalitātes atbilstību Pasaules Veselības organizācijas vadlīnijām un pārbaudīt izveidoto mikroskopisko metožu universalitāti.

Pētījuma metodes: Tēju drogās novērtēja šūnu dzīvotspēju, morfoloģiju, hloroplastu hlorofila fluorescenci un mikrobioloģisko piesārņojumu.

Nozīmīgākie rezultāti un secinājumi: Neatbilstošos apstākļos ievāktas un uzglabātas, ka arī neatbilstošā temperatūrā dehidratētas drogās rodas kvalitātes īpašību un bioloģiski aktīvo vielu zudumi. Lai novērtētu drogu kvalitāti ir izveidots šūnu bioloģijas un mikroskopisko metožu kopums. Tas ļāvis novērtēt saimniecības ražošanas procesā sagatavoto drogu kvalitāti. Turpmākajos pētījumos vajadzētu optimizēt fluorescences novērtēšanas un rehidratēto paraugu kultivēšanas metodes.

Atslēgas vārdi: Dehidratācija, šūnu dzīvotspēja, hloroplastu fluorescences, anabioze.

SUMMARY

Research purpose: To evaluate the quality compliance of World Health Organization guidelines of herbs preparation and storage and establishing the universal benefits of microscopic methods.

Research methods: A tea herbs evaluated cell viability, chloroplast chlorophyll fluorescence and microbiological contamination.

Key Findings and Conclusions: Herbs harvested and stored under inappropriate conditions, as well as herbs dehydrated inappropriately leads to their loss of qualitative properties and biologically active substances. A set of cell biology and microscopic methods has been developed to assess the quality of herbs. This allows to assess the quality of herbs prepared in the production process of the farm. Future studies should optimize fluorescence estimation and culture methods for rehydrated samples.

Keywords: Dehydration, cell viability, chloroplast fluorescence, anabiosis.

SATURS

KOPSAVILKUMS	2
SUMMARY	3
TERMINU VĀRDNĪCA UN SAĪSINĀJUMU SARAKSTS	7
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APRAKSTS	10
1.1. Ārstniecības augu sagatavošana izmantošanai medicīnā	10
1.1.1. Sarkanā āboliņa (<i>Trifolium pratense L.</i>) raksturojums	11
1.1.2. Šaurlapu ugunspuķes (<i>Chamaenerion angustifolium L.</i>) raksturojums	14
1.1.3. Moldāvijas pūķgalves (<i>Dracocephalum moldavica L.</i>) raksturojums	17
1.2. Laba ārstniecības augu novākšanas prakse	19
1.2.1. Žāvēšana un citas ārstniecības augu apstrādes metodes	20
1.2.2. Lapu drogu žāvēšanas nosacījumi	25
1.2.3. Žāvēšanas un uzglabāšanas metožu ietekme uz lapu uzturvērtību	28
1.3. Lapu drogu kvalitātes kontroles metodes	29
1.3.1. Mikroskopiskās kontroles metodes	31
1.3.2. Mikrobioloģiskais piesārņojums	31
1.4. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija	34
1.5. Augu šūnas bojāejas rādītāji	34
1.5.1. Programmēta šūnu nāve	34
1.5.2. Šūnu nekroze	38
1.5.3. Programmētas šūnu nāves un nekrozes morfoloģisko pazīmju salīdzinājums	39
1.6. Anabioze	40
1.6.1. Anabiozes veidi	40
1.6.2. Anabiozi izraisošie faktori	41
1.6.3. Dehidratācija un rehidratācija	42
1.6.4. Šūnu dzīvotspējas pierādīšana ar propīdija jodīdu	43
1.7. Augu mikrovaurošana un audu kultūras	43
2. MATERIĀLI UN METODES	45
2.1. Izmantotie pētījuma objekti	45
2.2. Pētījuma shēma	45
2.2. Augu materiāls	45
2.3. Materiāla sagatavošana	46
2.3.1. Dehidratācija	46
2.3.2. Rehidratācija	46
2.3.3. Mikroskopisko preparātu sagatavošana	46

2.3.4. Mikroskopēšana	47
2.3.5. Anabiozes stāvokļa pārbaude 72 h MS barotnē	47
2.4. Datu apstrādes metodes	48
2.5. Drogu kvalitātes novērtēšanas metodes	48
3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI	49
3.1. Svaigu <i>T. pratense</i> , <i>D. moldavica</i> un <i>Ch. angustifolium</i> augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums	49
3.2. 22°C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu <i>T. pratense</i> , <i>Ch. angustifolium</i> un <i>D. moldavica</i> augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums	50
3.3. 45°C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu <i>T. pratense</i> , <i>Ch. angustifolium</i> un <i>D. moldavica</i> augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums	51
3.4. 120°C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu <i>T. pratense</i> , <i>Ch. angustifolium</i> un <i>D. moldavica</i> augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums	53
3.5. PVO vadlīnijām neatbilstoši uzglabāto un dzeltējošo <i>T. pratense</i> lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums	53
3.6. 2018. gada <i>T. pratense</i> , <i>Ch. angustifolium</i> un <i>D. moldavica</i> tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums	55
3.7. 2019. gada <i>T. pratense</i> , <i>Ch. angustifolium</i> un <i>D. moldavica</i> tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums	56
3.8. Dažādās temperatūrās dehidratētu <i>Ch. angustifolium</i> un 2019. gada nefiksētu tējas lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums pēc 72h kultivēšanas MS barotnē	58
3.9. Dažādās temperatūrās dehidratētu <i>Ch. angustifolium</i> un 2019. gada fiksētu tējas lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums pēc 72h kultivēšanas MS barotnē	59
3.10. <i>T. pratense</i> , <i>Ch. angustifolium</i> un <i>D. moldavica</i> lapu un ziedu vainaglapu šūnu baktēriju raksturojums	60
3.11. <i>T. pratense</i> svaigu un dažādās temperatūrās dehidratētu lapu šūnu hloroplastu hlorofila vidējā fluorescences	61
3.12. <i>T. pratense</i> 2018. gada, 2019. gada tējas un dažādās temperatūrās dehidratētu lapu un ziedu vainaglapu šūnu organoleptiskais novērtējums	61
4. DISKUSIJA	64
4.1. Laboratorijā dehidratēto <i>T. pratense</i> , <i>D. moldavica</i> un <i>Ch. angustifolium</i> drogu šūnu morfoloģisko pazīmju salīdzinājums ar ražošanas procesā iegūtām drogām	64
4.2. Laboratorijā dehidratēto <i>T. pratense</i> , <i>D. moldavica</i> un <i>Ch. angustifolium</i> drogu šūnu dzīvotspējas salīdzinājums ar ražošanas procesā iegūtām drogām	66

4.3. Hlorofila vidējās fluorescences salīdzinājums svaigās un dehidratētās <i>T.pratense</i> lapu šūnās	67
4.4. Kultivēto <i>Ch. angustifolium</i> un <i>T. pratense</i> lapu šūnu proliferācijas spēju salīdzinājums dažādās dehidratācijas temperatūrās	68
4.5. Laboratorijā dehidratēto <i>T. pratense</i> , <i>Ch. angustifolium</i> un <i>D. moldavica</i> drogu šūnu mikrobioloģiskā piesārņojuma salīdzinājums ar ražošanas procesā iegūtām drogām.....	68
4.5. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopijas metode kā universālā drogu kvalitātes nepilnību novērtējuma metode	69
SECINĀJUMI.....	72
PRIEKŠLIKUMI	73
PATEICĪBAS	74
IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI	75
PIELIKUMI.....	89

TERMINU VĀRDNĪCA UN SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

Proteāzes – kaspāzes – enzīmi, kas degradē olbaltumvielas, pārraujot peptīdu saites molekulās

Endonukleāzes - enzīmi, kas degradē nukleīnskābes, pārraujot saites starp nukleotīdiem

I fotosistēma – olbaltumvielu komplekss, kurš realizē fotosintēzi

II fotosistēma - olbaltumvielu komplekss, kurš realizē fotosintēzi

Skābekļa singleta forma – skābekļa jons ar noteiktu elektronu skaitu

Zedeņu parenhīmas šūnas – lapu šūnas, kas realizē fotosintēzi

PVO – Pasaules Veselības organizācija

t°C – temperatūras apzīmējums pēc Celsija skalas

W – vats ir SI sistēmas jaudas mērvienība

MHz – mega hercs ir periodisku procesu frekvences mērvienība

mm – milimetrs ir SI garuma mērvienība

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

RNS – ribonukleīnskābe

mmHg – dzīvsudraba staba milimetrs ir ārpus sistēmas spiediena mērvienība

nm – nanometrs ir metra miljardā daļa

min⁻¹ – apgriezieni minūtē ir rotācijas ātruma jeb rotācijas frekvences mērvienība

MS – Murašige un Skūga *barotne*

µm – mikrometrs ir metra miljona daļa

IEVADS

Gadu tūkstošiem cilvēki izmanto ārstniecības augus dažādu slimību ārstēšanai. Šī iemesla dēļ ārstniecības augi tiek izmantoti visā pasaulē tradicionālajā medicīnā. Visās tradicionālās medicīnas sistēmās, lai arī balstītas uz dažādiem teorētiskiem un kultūras modeļiem, savā doktrīnā iekļauj fitoterapiju (World Health Organization, 2007).

Neatbilstošos apstākļos ievāktas un uzglabātas, ka arī neatbilstošā temperatūrā dehidratētas augu drogās var rasties kvalitātes īpašību izmaiņas un bioloģiski aktīvo vielu zudumi (Roshanak, et al., 2016). Lai garantētu augstus ārstniecības augu kvalitātes standartus ir svarīgi, lai visā pasaulē kopīgi lietotu noteiktu noteikumu kopumu. Pasaulē ir izveidotas daudzveidīgas ārstniecības augu materiāla ievākšanas, sagatavošanas un uzglabāšanas metodes (World Health Organization, 2007). Taču pašreizējās augu materiāla kvalitātes kontroles metodes maz izmanto mūsdienu analītiskās zinātnes sasniegumus un tehnoloģijas, kuras spētu dot kvantificējamus un atkārtojamus rezultātus. Piemēram, Bioloģiskās lauksaimniecības asociācijas 2006. gada izdotas "Labās higiēnas prakses vadlīnijas kaltētu garšaugu, tējas un ārstniecības augu pirmapstrādei, pārstrādei un realizācijai bioloģiskajā lauksaimniecībā" paredz tikai mitruma kontroles un subjektīvas organoleptiskas kvalitātes kontroles metodes (Vaivare M., u.c. 2006). Arī citos gadījumos maz ir kvantificējamas kvalitātes kontroles metodes. Piemēram, Indijas lielākais tējas eksportētājs kontrolē ļoti ierobežotu parametru skaitu, mikroskopiski pārbaudot tikai virspusējo tējas lapu struktūru (Tea Board India, 2020; Lu et al., 2019).

2011. gada Pasaules Veselības organizācijas vadlīnijas paredz novecojušu un mūsdienu tehnoloģijām neatbilstošu drogu mikroskopisko analīzi. Tradicionāli ārstniecības augu kvalitāte tiek pārbaudīta ar elektronisko mikroskopu. Taču to izmanto audzēšanas apstākļu kontrolei, nevis iegūto drogu kvalitātes novērtēšanai. Šī metode ir dārgākā par konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju un parasti aizņem vairāk laika. Tādēļ svarīgi ir veidot jaunās analītiskas metodes un novērtēt to izmantojamību un universalitāti dažādu augu sugu drogu kvalitātes un derīguma termiņa novērtēšanai.

Darba mērķis.

Darba mērķis ir novērtēt drogu sagatavošanas un uzglabāšanas kvalitātes atbilstību Pasaules Veselības organizācijas vadlīnijām un pārbaudīt izveidoto mikroskopisko metožu universalitāti.

Darba hipotēzes.

1. Dažādu augu sugu optimālos apstākļos dehidratētām un uzglabātām drogām derīguma termiņa ietvaros šūnas saglabā dzīvotspēju un proliferācijas spējas, kuras ir iespējamās dehidratācijas izraisītas anabiozes gadījumā.
2. PVO rekomendācijām neatbilstoši sagatavotām un uzglabātām drogām būs raksturīga hloroplastu un hlorofila degradācija, programmēta šūnu nāve, nekroze un mikrobioloģiskais piesārņojums, ko var pārbaudīt izmantojot fluorescentus marķierus un konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas metodes.

Darba uzdevumi.

1. Izstrādāt un pārbaudīt mikroskopiskās metodes sarkanā āboliņa (*Trifolium pratense L.*), Moldāvijas pūķgalves (*Dracocephalum moldavica L.*) un šaurlapu ugunspuķes (*Chamaenerion angustifolium L.*) lapu un ziedu drogu šūnu dzīvotspējas un bojāejas novērtēšanai.
2. Salīdzināt laboratorijā dehidratēto sarkanā āboliņa (*Trifolium pratense L.*), Moldāvijas pūķgalves (*Dracocephalum moldavica L.*) un šaurlapu ugunspuķes (*Chamaenerion angustifolium L.*) drogu šūnu dzīvotspēju ar ražošanas procesā iegūtām tējas drogām.
3. Salīdzināt laboratorijā dehidratēto sarkanā āboliņa (*Trifolium pratense L.*), Moldāvijas pūķgalves (*Dracocephalum moldavica L.*) un šaurlapu ugunspuķes (*Chamaenerion angustifolium L.*) drogu šūnu morfoloģiju ar ražošanas procesā iegūtām tējas drogām.
4. Kultivēt sarkanā āboliņa (*Trifolium pratense L.*), Moldāvijas pūķgalves (*Dracocephalum moldavica L.*) un šaurlapu ugunspuķes (*Chamaenerion angustifolium L.*) lapu drogu paraugus MS barotnē un novērtēt šūnu dzīvotspēju un proliferāciju.

1. LITERATŪRAS APRAKSTS

1.1. Ārstniecības augu sagatavošana izmantošanai medicīnā

Ārstniecības augi tradicionālās medicīnas praksē tiek izmantoti kopš aizvēstures laikiem. Pēdējo divdesmit gadu laikā gan attīstījās, gan jaunattīstības valstīs ir palielinājusies interese par tradicionālajām medicīnas sistēmām, it īpaši par augu izcelsmes ārstniecības zālēm. Līdz ar to veselības iestādēm, farmācijas uzņēmumiem un sabiedrībai kopumā ārstniecības augu drošība un kvalitāte kļūst aizvien nozīmīgākā. Neapstrādātu un gatavu augu valsts materiālu drošība un kvalitāte ir atkarīga no iekšējiem un ārējiem faktoriem. Pie iekšējiem faktoriem pieder ģenētika un pie ārējiem faktoriem pieder vide, audzēšana, ražas novākšana, apstrādes metodes, transportēšana un uzglabāšana. Jebkurā ražošanās posmā augu izcelsmes materiālu mikrobioloģiskais vai ķīmiskais piesārņojums var izraisīt drošības un kvalitātes pasliktināšanos. Drošības un kvalitātes pasākumi ir nepieciešami, lai nodrošinātu stabilu, pieņemamu un ilgtspējīgu augu valsts materiālu piegādi (World Health Organization, 2018; World Health Organization, 2011).

Pasaules Veselības organizācija ārstniecības augus definē kā dabiskos augu materiālus, kurus izmanto slimību ārstēšanai vai profilaksei bez rūpnieciskās pārstrādes vietējā vai reģionālā mērogā. Saskaņā ar PVO datiem vairāk nekā 80% pasaules iedzīvotāju paļaujas uz tradicionālajām zālēm – galvenokārt ārstniecības augiem, kas kalpo kā galvenais veselības aprūpes avots (Jamshidi – Kia et.al., 2018). Pēdējās desmitgadēs Eiropā, Ziemeļamerikā un Āzijā pieprasījums pēc ārstniecības augiem ir pieaudzis no 8% līdz 15% (Rasool, 2012).

Ārstniecības augus iegūst pārstrādājot to daļas – lapas, stublājus, ziedus, saknes un sēklas. Augus izmanto neapstrādātā vai ekstraktu veidā, mērcējot tos ūdenī, etanolā un citos šķīdinātājos. Ārstniecības augi satur dažādas farmakoloģiski aktīvās vielas – flavonoīdus, sterīnus, alkaloidus, glikozīdus, saponīnus u.c. Lielākajai aktīvo savienojumu daļai, kas atrodas augos ir raksturīga terapeitiskā iedarbība un tāpēc tos izmanto kā ārstniecības līdzekļus. To vērtīgas sastāvdaļas izmanto sintezējot un ražojot zāles, jo daudziem augiem piemīt pretmikrobu, pretvēža, pret cukura diabēta, pret aterosklerozi, imūnmodulējoša, atjaunojoša un hepatoprotektīva iedarbība (Bent, 2008; Phillipson, 2001; Verma and Singh, 2008).

Zāļu tēja ir zāļu maisījums, ko pagatavo no dažādu augu lapām, ziediem, sēklām un saknēm. Atšķirībā no citām tēju formām zāļu tējas nesatur kofeīnu. Tās labi garšo un ir viegli dzeramas. Zāļu tējām auga daļas iegūst nevis no parastajiem augiem, bet no zāļu augiem, kurus izmanto to ārstniecisko īpašību dēļ. Tirgū ir pieejamas dažādas zāļu tējas, kur katrai ir noteikts terapeitisks vai medicīnisks ieguvums. Pastāv plaša tēju daudzveidība, piemēram, ir tējas, kas palīdz atslābināties, tējas, ko lieto kuņģa – zarnu trakta slimību gadījumos, imunitāti stiprinošas

zāļu tējas, tējas organisma attīrīšanai, tējas enerģijas un labsajūtas veicināšanai, miega tējas u.c. (Ravikumar, 2014). Tējas sastāvs un kvalitāte var atšķirties atkarībā no šķirnes, gadalaika, lapu vecuma, klimata, ražas novākšanas un sagatavošanas prakses (Bansal et al., 2013).

1.1.1. Sarkanā āboliņa (*Trifolium pratense L.*) raksturojums

T. pratense ir daudzgadīgs tauriņziežu dzimtas lakstaugs. Stumbrs ir no 40 līdz 60 cm garš. Lapas ir trīsstaraini saliktas, lapiņas olveida. Ziedi ir sarkanā vai purpursarkanā krāsā, sakopoti lielās, apaļās galviņās. Tas ir bieži sastopams augs visā Latvijā. Parasti aug pļāvās, meža izcirtumos, mežmalās, izdegumos un sausos mežos. Zied no jūnija līdz septembrim. Drogai ievāc uzriedējošās ziedkopas – galviņas (Rubine un Eniņa, 2004).

T. pratense ir iekļauts Eiropas Padomes 2. kategorijas sarakstā kā dabīgs aromatizētājs. Šī kategorija norāda, ka to nelielos daudzumos var pievienot pārtikas produktiem (Barenes, et al., 2007). Auga ziediem ir salda garša. Tradicionāli ziedus izmanto kā garšvielu salātos, zupās, desertos un dzērienos. Arī jaunās lapas ir lietojamas pārtikā – salātos un kā piedeva sieram. Šo ārstniecības augu plaši pielieto zāļu tējas pagatavošanai. *T. pratense* piemīt antisklerotiskas īpašības, jo tas kavē holesterola uzkrāšanos asinsvados. To lieto kā diurētisku līdzekli, lai ar urīnu no organisma izvadītu slāpekļa vielmaiņas produktus (Rubine un Eniņa, 2004). Tradicionāli šo ārstniecības augu izmanto ādas slimību ārstēšanā, piemēram, psoriāzes vai ekzēmas gadījumā. Ziedu un lakstu uzlējumu vai tinktūru lieto kā atkrēpošanās līdzekli garā klepus, bronhīta un bronhiālās astmas ārstēšanai. Drudža un saaukstēšanās gadījumā to lieto kā sviedrējošu līdzekli (Heinrich et al., 2012). Ir zināms, ka tanīniem, kas ietilpst *T. pratense* piemīt savēlkošas īpašības. Ārīgi drogu lieto augoņu, strutaino iekaisumu un brūču ārstēšanai (Rubine un Eniņa, 2004).

T. pratense satur četras fitoestrogēnu grupas, galvenokārt formononetīnu un biohanīnu A un mazākās koncentrācijās – daidzeīnu un genisteīnu, kā arī bioloģiski aktīvus savienojumus – flavonoīdus – trifolīnu un izotrifolīnu, kumarīna atvasinājumus, ēterisko eļļu, miecvielas, polisaharīdus, antociānus un askorbīnskābi (Ramos et al., 2012; Heinrich et al., 2012; Rubine un Eniņa, 2004). Ziedēšanas laikā *T. pratense* satur visvairāk izoflavonu, galvenokārt glikozīdu veidā – 51% sastāda formononetīns, 40% biohanīns A, 7% genisteīns un 2% daidzeīns (Lemeziene et al., 2015).

Simts grami žāvētā auga satur $37,1 \pm 1,63\%$ ogļhidrātu, $35,1 \pm 1,6\%$ olbaltumvielu, $23,6 \pm 0,4\%$ pelnu un $4,2 \pm 0,3\%$ tauku. Analizējot minerālvielu saturu piecās dažādās *Trifolium* sugās statistiski nozīmīgi konstatēts, ka no visām sugām *T. pratense* sugai ir visaugstākā kalcija, dzelzs un hroma koncentrācija un viszemākā mangāna, kobalta un nikelja koncentrācija (Gounden et al., 2018).

Lapās un ziedos ir identificētas fenolskābes – protokatehīnskābe, p-hidroksibenzoskābe, kofeīnskābe, p-kumarīnskābe, ferulīnskābe un salicilskābe. Fenolskābes ir fenolu savienojumu grupa, kurai piemīt spēcīga antioksidatīvā darbība. Šīs skābes var iznīcināt brīvos radikāļus un neitralizēt skābekļa reaktīvos savienojumus. *T. pratense* lapas satur lielu formononetīna un biohanīna A koncentrāciju – 5,57 – 9,05 mg/g un 10,94 – 14,59 mg/g. Jaunās lapās biohanīna A koncentrācija ir vēl lielāka (Kolodziejczyk – Czepas, 2012; Saviranta et al., 2008).

Galvenās *T. pratense* bioloģiski aktīvās sastāvdaļas, kurām pierādīta efektivitāte ir izoflavonoīdi, kurus var iedalīt izoflavonos un pterokarpānos. Izoflavoni sastāv galvenokārt no glikozīdiem un malonilglikozīdiem. Ir atklāts, ka no *T. pratense* iegūtie izoflavoni spēj nomākt iekaisuma attīstību. Eksperimenta gaitā izoflavoni efektīvi inhibēja ciklooksigenāzes aktivitāti makrofāgu šūnu līnijā un cilvēka monocītos, samazinoties prostoglanīna E2 un/ vai tromboksāna B2 sintēzei (Lam, 2004; Rijke et al., 2001; Tsao et al., 2006).

Nerandomizēts pētījums, kurā iesaistījās 38 vīrieši pierādīja, ka dienā lietojot 160 mg *T. pratense* izoflavonu var apturēt prostatas vēža progresēšanu zemā un vidējā smaguma pakāpē (Jarred, et al., 2002). Arī citā pētījumā, kurā piedalījās 20 vīrieši 60 gadu vecumā, kuriem ir paaugstināts priekšdziedzera specifiskais antigēns (PSA) novēroja *T. pratense* ekstrakta labvēlīgo ietekmi uz prostatas vēzi. Gada laikā lietojot 60 mg *T. pratense* izoflavonu priekšdziedzera specifiskais antigēna līmenis samazinājās no 10,16 ng/ml līdz 7,15 ng/ml ($p < 0,019$) (Engelhardt et al. 2008).

Sievietēm menopauzes laikā ir raksturīgs pazemināts estrogēna līmenis, kas ir saistīts ar tādiem vazomotoriem simptomiem kā svīšana naktī, karstuma viļņi un miega traucējumi. Fitoestrogēniem, kas ir atrodami *T. pratense* ir strukturālā līdzība ar 17β -estradiolu. Līdz ar to sievietes hormonu aizstājterapijā plaši lieto šo augu kā dabisko estrogēnu avotu (Heinrich et al., 2012).

Randomizētā placebo – kontrolētā pētījumā ir pierādīts, ka sievietēm ar ciklisko mastalģiju *T. pratense* ekstrakta lietošana var mazināt sāpes. Augā esošais biohanīns A inhibē kancerogēnā benzopirēna metabolisko aktivāciju zīdītāju šūnu kultūrā, kas liecina par ķīmijprofilaktiskām īpašībām (Heinrich et al., 2012). Turklāt ir novērota *T. pratense* pozitīvā ietekme uz karstuma viļņiem sievietēm menopauzes laikā. Sievietēm, kas lietoja *T. pratense* karstuma viļņu biežums statistiski nozīmīgi samazinājās, salīdzinot ar sievietēm placebo grupā ($p = 0,04$) (Ehsanpour et al., 2012).

Fitoestrogēni spēj labvēlīgi ietekmēt lipīdu metabolismu. Pētījumā, kurā piedalījās 40 sievietes pēc menopauzes un kuras katru dienu 12 mēnešu laikā lietoja 40 mg *T. pratense* izoflavonu ziņoja par ievērojamu kopējā holesterīna un zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna līmeņa pazemināšanos. Salīdzinot ar kontroles grupu, sievietēm, kas gada laikā lietoja *T.*

pratense izoflavonus kopējais holesterīna līmenis samazinājās no 5,62 līdz 4,96 mmol/L, bet kontroles grupā palielinājās no 5,55 līdz 5,65 mmol/L ($p=0,005$ un $p=0,028$). Pēc astoņiem mēnešiem sievietēm, kas lietoja *T. pratense* fitoestrogēnus zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna līmenis samazinājās no 2,84 līdz 2,79 mmol/L, bet kontroles grupā no 3,12 līdz 3,10 mmol/L ($p=0,027$ un $p=0,032$) (Terzic et al., 2009).

Fitoestrogēni var ietekmēt angiogēnēzi. Izoflavoni ieskaitot genisteīnu un daidzeīnu nomāc angiogēnēzē iesaistīto olbaltumvielu gēnus un mRNS līmeņus, piemēram, IL – 8, matricas metalloproteīnāzi – 13 un fibronektīnu. *T. pratense* ekstrakta novērtējums uzrādīja ievērojamu angiogēnēzes darbības kavēšanu. Turklāt ir konstatēts, ka daidzeīnam un genisteīnam ir spēcīgāka angiogēnā aktivitāte, nekā formononetīnam un biohanīnam A (Krenn and Paper, 2009).

T. pratense augam ir labvēlīga ietekme uz vazomotorajiem simptomiem. Sievietēm, intervences grupā, kas lietoja *T. pratense* ievērojami samazinājās vazomotoro simptomu intensitāte no 55,5% līdz 34,72%, salīdzinot ar sievietēm kontroles grupā, kur vazomotoro simptomu intensitāte samazinājās no 62,5% līdz 55,7% ($p=0,003$) (Taavoni et al., 2012).

Pētot *T. pratense* ietekmi uz nakts svīšanu sievietēm menopauzes laikā konstatēja statistiski nozīmīgas atšķirības. Sievietēm, kas 90 dienu laikā lietoja *T. pratense* nakts svīšana samazinājās no 96,2% līdz 30,2%, bet sievietēm placebo grupā no 96,2% līdz 92,2% ($p<0,05$) (Hidalgo et al., 2005).

Bieži vien sievietēm menopauzes laikā iesaka lietot *T. pratense* uztura bagātinātāju veidā. Vienā pētījumā konstatēja, ka sievietēm lietojot *T. pratense* saturošos uztura bagātinātājus statistiski nozīmīgi samazinājās triglicerīdu līmenis no $199,6 \pm 77,8$ mg/dl līdz $181,1 \pm 72,3$ mg/dl, salīdzinot ar triglicerīdu līmeni sievietēm placebo grupā, kas palielinājās no $199,6 \pm 77,8$ mg/dl līdz $242,7 \pm 166,9$ mg/dl. Turklāt sievietēm, kas lietoja *T. pratense* novēroja pozitīvo ietekmi uz maksts citoloģiju, kā arī tām būtiski samazinājās menopauzes simptomi (Hidalgo et al., 2005).

Pētījums, kurā piedalījās 109 sievietes pēc menopauzes, ziņoja par endometrija biezuma samazināšanos par 15% sievietēm, kuras 90 dienu laikā ārstēja ar 80 mg *T. pratense*, salīdzinot ar sievietēm, kuras tika ārstētas ar placebo (Hidalgo, et al., 2005).

Novērtējot *T. pratense* ekstrakta ietekmi uz garastāvokļa traucējumiem, 190 sievietes pēc menopauzes periodā nejauši sadalīja divās grupās. Deviņdesmit dienu laikā vienai grupai deva 80 mg izoflavonu kapsulas un otrai vienlīdzīgas formas placebo kapsulas. Ārstēšana, izmantojot *T. pratense* izoflavonu kapsulas sievietēm pēcmenopauzes laikā ievērojami samazināja depresijas un trauksmes simptomus (Lipovac et al., 2011).

Dubultslēptā un placebo – kontrolētā viena gada pētījumā ziņoja par *T. pratense* labvēlīgo ietekmi uz mugurkaula jostas daļu sievietēm vecumā no 49 līdz 65 gadiem (n=177). Pētījuma dalībnieces gada laikā saņēma *T. pratense* produktu, kura sastāvā ir 26 mg biohanīna A, 16 mg formononetīna, 1 mg genisteīna, 0,5 mg daidzeīna vai placebo. Salīdzinot ar placebo grupu sievietēm, kas lietoja *T. pratense* produktu mugurkaula jostas daļā ievērojami palēninājās kaulu minerālvielu satura un minerālā blīvuma zudums ($p=0,04$ un $p=0,023$). Toties netika novērota būtiska ietekme uz gūžas kaulu, kas salīdzinot ar mugurkaulu nav tik metaboliski aktīvs un ir grūtāk izmērāms (Atkinson et al., 2004a).

Metabolais sindroms ir riska faktoru kopums, kas ietver trīs no četriem riska faktoriem – insulīnrezistenci ar vai bez hiperglikēmijas, paaugstināto asinsspiedienu, aterogēno lipīdu profilu un abdominālo adipozitāti. Tiek ziņots, ka fitoestrogēnu terapija sievietēm pirms un pēc menopauzes periodā uzlabo jutību pret insulīnu, normalizē asinsspiedienu, lipīdu profilu un artēriju sienīņu elastību (American Herbal Pharmacopoeia, 2017).

Tiek ziņots, ka *T. pratense* ekstrakti ietekmē peroksisomu proliferatora aktivēto receptoru funkcijas. Peroksisomu proliferatora aktivētais receptors regulē adipocītu diferenciāciju, taukskābju uzkrāšanos, glikozes metabolismu un insulīna sensibilizāciju. *T. pratense* ekstrakti, īpaši genisteīns un biohanīns A ir spēcīgi peroksisomu proliferatora aktivētā receptora ligandi un aktivatori (Mueller et al., 2010).

Krūts vēzis ir biežākais ļaundabīgais audzējs sievietēm. *T. pratense* ir efektīvs palīg līdzeklis audzēju ārstēšanā, kas ir saistīti ar hormonālajiem traucējumiem. Ir atklāts, ka *T. pratense* ēteriskās eļļas spēj citotoksiski iedarboties uz MCF-7 krūts vēža šūnām. Salīdzinot ar kontroles rezultātiem pēc MCF-7 šūnu apstrādes ar *T. pratense* ēterisko eļļu ir novērots, ka dzīvotspējīgo šūnu procentuālais daudzums samazinās ($p<0,05$). Turklāt *T. pratense* ēteriskās eļļas citotoksiskais efekts bija atkarīgs no devas un laika. Vislielāko vēža šūnu samazināšanos novēroja pielietojot 15 vai 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ēteriskās eļļas koncentrāciju. *T. pratense* ēteriskā eļļa radīja izmaiņas MCF-7 krūts vēža šūnu morfoloģijā. Raksturīgākās izmaiņas ir zvaigzņveida šūnas forma, vakuolizācija, citoplazmas un šūnu saraušanās, piknotiskie kodoli un apoptiskie ķermeņi (Kianinodeh et al., 2017).

1.1.2. Šaurlapu ugunspuķes (*Chamaenerion angustifolium L.*) raksturojums

Ch. angustifolium ir naktssveču dzimtas daudzgadīgs lakstaugs. Lapas ir lancetiskas, zobainas, tumšzaļas, ar dzīslām, izvietotas pamišus, to garums variē no 4 līdz 12 cm un platums no 0,6 līdz 1,8 cm. Ziedi izvietoti piramidālā ķekarā stublājā galotnē. *Ch. angustifolium* zied dažādās krāsās – rozā, purpursārtā, retāk baltā krāsā. Zied no jūlija līdz septembrim (United States Department of Agriculture, 2011). Latvijā augs bieži ir sastopams sausos mežos,

izcirtumos, izdegumos, mežmalās un vietām veido audzes. Pārsvārā vāc lapas un ziedus. Lapas vāc pirms auga ziedēšanas. Ziedus vāc auga ziedēšanās laikā, kad ir uzriedējusi apmēram trešdaļa ķekaru. Dažkārt ievāc arī saknes, ko izrok rudenī (Rubine un Eniņa, 2004).

Ch. angustifolium plaši lieto kā dārzeņus. Jaunos dzinumus, ko novāc pavasarī pirms ziedēšanas ēd spargeļu vietā. Neatvērtos pumpurus pievieno salātiem (Rogers, 2014). Auga tējai piemīt relaksējošās un nomierinošās īpašības. Tā atgādina zaļo tēju, tikai bez kofeīna. No sākuma lapas fermentē un tikai pēc tam izmanto tējas pagatavošanā. Auga saknes grauzdē un lieto kā kafijas aizstājēju (Rogers, 2014). *Ch. angustifolium* tēju vai uzlējumu dzer pie saaukstēšanās simptomiem, kā arī migrēnas, bezmiega, anēmijas, delīrija un infekcijas slimību ārstēšanai (Schepetkin et al., 2016). No auga ziediem gatavo uzlējumu un lieto kā rīkles skalošanas līdzekli faringīta un laringīta gadījumā. Gatavojot uzlējumu ziedus bieži kombinē ar lapām un lieto bezmiega un nervozitātes izraisīto galvassāpju ārstēšanai. *Ch. angustifolium* sulai, ko iegūst izspiežot no svaigiem ziediem, piemīt antiseptiskās īpašības. Vēsos auga novārījumus lieto pie žagām, garā klepus un bronhiālās astmas. Lapu tēju dzer dažādos asiņošanas gadījumos, piemēram, plaušu, deguna, urīnpūšļa vai dzemdes (Rogers, 2014). *Ch. angustifolium* lapu novārījums palīdz pie dažādām kuņģa slimībām, piemēram, pie čūlas, gastrīta un kolīta. Tā kā lapu novārījumam piemīt neliels savēlkoša darbība, tas varētu būt noderīgs caurejas vai dizentērijas ārstēšanai (Rogers, 2014).

Lokāli *Ch. angustifolium* lieto kā tīršanas, nomierinošo, antiseptisko un dziedinošo līdzekli, lai ārstētu nelielus apdegumus, ādas izsitumus, čūlas un infekcijas, kā arī ausu, deguna un rīkles iekaisumu (Schepetkin et al., 2016).

Ch. angustifolium satur gļotvielas, tanīnus (līdz 20%), cukuru, pektīnvielas, C vitamīnu, kalcija sāļus, β – sitosterola kaproātu, sitosterola glikozīdus, dažādus steroīdus, ieskaitot propionātu, kaproātu, kaprilātu, kaprātu, palmitātu un flavonoīdus, tostarp miricetīna 3-O- β -D-glikuronīdu, kvercetīnu (0,42%), miricetīnu (0,32%), kemferolu (0,37%), seksangularetīnu un dažādus sterīna acetātus - β – sitosterīnus (66,8%), kampesterolu (1,2%) un stigmasterolu (0,4%). Ārstniecības augā ir identificētas 39 skābes, ieskaitot feruskābi, galluskābi, protokatehīnskābi, ursolskābi, oleanolskābi, maslīnskābi, kofeīnskābi, gentizīnskābi un hlorogēnskābi. Lapas, pumpuri un stublāju gali satur no 28 līdz 31% olbaltumvielu un no 9 līdz 10% celulozes. Piecdesmit astoņi grami jauno lapu satur 8 mg kalcija, 1 mg dzelzs, 0,49 mg riboflavīna un 57 mg C vitamīna. Ziedi satur seksangularetīnu, hanerolu, linolēnskābi, laurīnskābi, kaprīnskābi, miristīnu, miristolu, ānonadekānskābi, oleīnskābi, pentadekānskābi, stearīnskābi un palmitīnskābi (Rogers, 2014). Auga virszemes daļas satur lipofilo frakciju, kas ir bagāta ar steroīdiem, terpenoīdiem un taukskābēm. Turklāt taukskābes un triterpēni ir galvenie auga ekstrakta lipofilās frakcijas komponenti (Schepetkin et al., 2016). Visaugstākais

polifēnolu saturs ir konstatēts auga ziedēšanas laikā. Ziedos un ziedkopās vērojams augsts flavonoīdu daudzums. Auga ziedi satur par 10% vairāk oenotīna – B un uz pusi mazāk oenotīna – A nekā lapas (Baert et al., 2017).

Ch. angustifolium satur trīs dažādas polifēnolu grupas. Galvenās no tām ir flavonoīdi, fenolskābes un elagitanīni. Flavonoli sastāv no aglikoniem – kvercētīna, kaempferola un miricētīna un flavonoīdu glikozīdiem – afzelīna, hiperozīda, izokvercētīna, kvercētīna, u.c. Daži no šiem savienojumiem ir daudzu ārstniecisko augu aktīvās sastāvdaļas, kuras tradicionālajās zālēs lieto neiroprotektīvo, pretiekaisuma, antioksidatīvo, antiproliferatīvo un citu farmakoloģisko īpašību dēļ. No *Ch. angustifolium* ekstraktiem ir izdalīti oligomēriski tanīni, ieskaitot oenoteīnu – A un telimagradīna I bāzes elagitanīnus. Augā esošie oenotīni – B ir makrocikliskie elagitanīni, kas uzrāda antioksidatīvo, imūnmodulējošo, citotoksisko darbību, enzīmu inhibīciju, kas ir nozīmīgs noteiktos prostatas traucējumos (Prasad et al., 2018).

Ch. angustifolium ekstraktā ir identificēti aptuveni 50 dažādi flavonoīdi un to atvasinājumi. Fenolskābes un to atvasinājumi ir viena no dominējošajām fenolu grupām, kas ir atrodama augā. Fenolskābēm piemīt antioksidatīvā un terapeitiskā iedarbība labdabīgas prostatas hiperplāzijas gadījumā. (Schepetkin et al., 2016). *Ch. angustifolium* sastāvā ir daudz elagitanīnu, kas veido apmēram 15% no izzāvētās auga masas. Oenotīns – B ir galvenais bioaktīvais savienojums un visizplatītākais elagitanīns, kura saturs svārstās līdz 50% no oligomēru elagitanīnu kopējas auga ekstrakta masas. Atkarībā no ražas novākšanas laika, oenotīna – B koncentrācija ārstniecības augā svārstās no 2 līdz 4,5%. Oenotīnam – B piemīt antiandrogēna, antiproliferatīva, pretvēža, antioksidatīva, pretiekaisuma un pretmikrobu darbība (Schepetkin et al., 2016).

Ch. angustifolium ēteriskajā eļļā ir identificēti aptuveni 50 dažādi savienojumi. Antenols un kariofilēns ir biežākie savienojumi, kas ietilpst auga ēteriskās eļļas sastāvā (Kaškonienē et al., 2016).

Pēdējā laikā ārstniecības augs *Ch. angustifolium* ir radījis plašu interesi zinātniskajos pētījumos. Eiropas Zāļu aģentūra 2015. gadā norādīja, ka šo augu izmanto jau vairāk nekā 30 gadus vairākās Eiropas valstīs. Tas ir viens no pazīstamākajiem ārstniecības augiem un tiek lietots visā pasaulē tradicionālajā medicīnā. Visbiežāk to lieto vīrieši ar labdabīgo prostatas hiperplāziju, lai atvieglotu apakšējo urīnceļu simptomus, piemēram, urinēšanas grūtības vai biežo urinēšanu. Turklāt ir minēts, ka *Ch. angustifolium* var lietot tikai pēc nopietnu saslimstību izslēgšanas (EMA, 2019).

Eksperimentālie pētījumi pierādīja, ka auga ekstraktam piemīt plaša spektra farmakoloģiskā iedarbība – tam ir antioksidantu, pretiekaisuma, antibakteriālās,

antiproliferatīvas un pretnovecošanās īpašības. *Ch. angustifolium* ekstrakts ir efektīvs kuņģa čūlas, divpadsmit pirkstu zarnas čūlas, gastrīta, kolīta un dažādu kuņģa – zarnu trakta darbības traucējumu ārstēšanā. To plaši pielieto urīnizvadkanāla iekaisuma, urinēšanās traucējumu un prostatas adenomas gadījumā (Schepetkin et al., 2016).

Vienā pētījumā atklāja, ka *Ch. angustifolium* lapām un ziediem piemīt spēcīgā aktivitāte pret noteiktām patogēnām baktērijām, piemēram, *Staphylococcus aureus* un *Candida albicans* un mērena aktivitāte pret *Escherichia coli* un *Pseudomonas aeruginosa* (Borchardt, 2008). *Ch. angustifolium* kavē *Klebsiella pneumoniae* – nosacīti patogēno baktēriju attīstību, kas ir plaši izplatītas slimnīcās (Battinelli et al., 2001).

Ch. angustifolium ekstrakts spēj inhibēt grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju augšanu. Salīdzinot ar kontroles rezultātiem, *Ch. angustifolium* ekstrakts kavēja dažādu baktēriju augšanu, ieskaitot *M. luteus* ($p < 0,01$), *S. aureus* ($p < 0,05$), *E. coli* ($p < 0,001$) un *P. aeruginosa* ($p < 0,001$). Turklāt šī auga ekstrakts efektīvāk kavēja baktēriju augšanu kultūrā, nekā vankomicīns ($p < 0,05$) un tetraciklīns ($p < 0,004$), kas visā pasaulē ir plaši pazīstami antibiotiskie līdzekļi (Bartfay et al., 2012).

Ch. angustifolium ekstraktam ir pierādīta efektivitāte galvas matu mikozes ārstēšanā. Tā satur tanīnus, kam piemīt pretsenīšu īpašības un tie spēj darboties kā tonizējošais ileocekālais vārsts pie hroniskās gremošanas orgānu kandidozes, mazinot kolikas un citus kairinātājus, ieskaitot caureju (Rogers, 2014). Auga sakneņi satur mazāk tanīnu un nesatur gļotvielas, toties satur flavonoīdus, kas ir noderīgi pretiekaisuma procesos, piemēram, prostatīta vai palielinātās prostatas gadījumā. Pretiekaisuma un prostoglandīnu inhibīcijas īpašības ir saistītas ar miricetīna 3-O- β -D-glikuronīdu, kas inhibē prostoglandīnu PGI₂, PGE₂ un PGD₂ izdalīšanos (Rogers, 2014). Vienā pētījumā konstatēja, ka tanīns, kas ir oenoteīns – B, ko iegūst no *Ch. angustifolium* ir aktīvs savienojums, kas inhibē 5 α -reduktāzi cilvēka prostatā. Ir pierādīts, ka šim savienojumam piemīt pretvīrusu un pretvēža aktivitāte (Lesuisse et al., 1996).

Ch. angustifolium var būt noderīga policistisku olnīcu sindroma, menorāģijas, hroniskā cistīta un akūtā prostatīta gadījumā. Pastāv novērojumi, ka oenoteīns – A un oenoteīns – B inhibē 5 α -reduktāzi un aromatāzi. Farmakoloģiskos preparātus, kas inhibē aromatāzi lieto pie hormonatkarīgiem audzējiem sievietēm un vīriešiem (Ducrey et al., 1997). Savukārt no *Ch. angustifolium* ekstraktiem izdalīts oenoteīns – B inhibē šūnu proliferāciju (Kiss et al., 2006).

1.1.3. Moldāvijas pūķgalves (*Dracocephalum moldavica L.*) raksturojums

D. moldavica ir lūpziežu dzimtas viengadīgs lakstaugs. Stumbrs ir no 25 līdz 75 cm garš. Ziedi ir violetā krāsā. Zied no jūlija līdz septembrim. Izcelsmes valsts ir Āzijas reģions.

Savvaļā sastopama Ukrainā, Ķīnā un Mongolijā 3000 m virs jūras līmeņa. Latvijā savvaļā nav sastopama, bet kultivēšanai Latvijā tā ir piemērota (Kārkliņa un Kulamena, 2017).

Pieaugoša interese par *D. moldavica* ir izskaidrojama ar to, ka šo augu plaši izmanto kā garšaugu, pārtikas aromatizētāju, parfimērijas un alkoholisko dzērienu ražošanā, kā arī medicīnā tējas maisījumu vai uzlējumu veidā. *D. moldavica* bieži pielieto tradicionālajā medicīnā kā vispārējo tonizējošo, gremošanas, pretvemšanas, nomierinošo un sviedrējošo līdzekli. Nesen veiktajā pētījumā atklāja, ka *D. moldavica* piemīt nomierinošs efekts. Tāpēc *D. moldavica* ekstraktu lieto kā trankvilizatoru un nervu sistēmas traucējumu mazināšanas līdzekli. Vienā pētījumā uz pelēm novērtēja sedatīvo, anksiolītisko un antidepresanta darbību, kas piemīt *D. moldavica* virszemes daļām. Pētījuma gaitā konstatēja, ka pelēm ekstrakts pagarināja pentobarbitāla izraisīto gulēšanas laiku, veicināja sedāciju, samazināja spontāno aktivitāti, radīja koordinācijas traucējumus un vispārējo CNS aktivitātes kavēšanu (Martinez-Vazquez et al., 2012).

D. moldavica sēklas ir vērtīgs taukskābju avots. Sēklu eļļa ir dzeltena, pikanta un ar patīkamu aromātu. Sēklas sastāvā ir ap 90% nepiesātināto taukskābju, galvenokārt linolēnskābes un linolskābes veidā, kas pieder pie neaizvietojamām taukskābēm (Dziki et al., 2013).

Kopš 1970. gada *Dracocephalum* ģintī ir identificēti 246 savienojumi, ieskaitot terpenoīdus, steroīdus, flavanoīdus, alkaloidus, lignānus, fenolus, kumarīnus un cianogēnos glikozīdus. Turklāt terpenoīdi ir dominējošie savienojumi (Zeng et al., 2010; Sultan et al., 2008). *D. moldavica* satur 16 aminoskābes, no kurām 8 ir neaizvietojamās. Tās sastāvā ir 1,03% cilvēkam nepieciešamo mikroelementu – dzelzs, varš, mangāns (Sultan et al., 2008). Augs satur no 0,06 līdz 0,92% ēterisko eļļu, maksimālo līmeni sasniedzot ziedēšanas laikā. Tā ir citronam līdzīga ēteriska eļļa, kuras sastāvā ir galvenokārt skābekļi saturošie acikliskie monoterpēni, piemēram, geraniols (29,6%), geranilacetāts (27,2%) un nerilacetāts (19,4%). Ir pierādīts, ka geraniols darbojas kā dabisks antioksidants, kas *in vitro* un *in vivo* var kavēt vēža attīstību un vēža šūnās veicināt apoptozi (Kakasy et al., 2006). No *D. moldavica* ekstrakta ir izolēts 31 savienojums, ieskaitot flavonoīdus, flavonolus un flavonoīdu glikozīdus, kā arī 13 fēnilpropanoīdu savienojumi, ieskaitot fēnilpropionskābi, lignānus un kumarīnus (Zeng et al., 2010). Žāvētā *D. moldavica* augā ir identificēti tādi flavonoīdi kā apigenīns, luteolīns, kaempferols, izoramnetīns u.c. (Kakasy et al., 2006).

D. moldavica tinktūru un tēju izmanto dažādu sirds slimību gadījumos, piemēram, paaugstinātā asinsspiediena, stenokardijas, aterosklerozes ārstēšanai, kā arī traheīta, neiralģijas, migrēnas, galvassāpju, zobu sāpju, kuņģa – zarnu trakta un aknu darbības traucējumu ārstēšanā (Nikitina et al., 2008; Yang, 2014). Auga spēcīgais aromāts mazina stresu, uztraukumu un

palīdz atjaunot spēkus. *D. moldavica* hidrolātu lieto migrēnas un galvassāpju gadījumos kā kompresi, vai izpūšot galvas apkārtnē. Hidrolātu var lietot herpes un sasitumu ārstēšanā, zobu sāpju un stomatītu gadījumos. Medicīnā augu izmanto kā imūnsistēmu uzlabojošo, urīnceļu un ginekoloģisko slimību ārstniecības līdzekli (Kārkliņa un Kulamene, 2017).

Viena pētījuma rezultāti liecināja par *D. moldavica* flavonoīdu neiroprotektīvo iedarbību uz smadzeņu išēmiju un reperfūzijas traumām. Iespējams, ka tas varētu būt saistīts ar tā antioksidatīvo un antiapoptisko darbību. Ekstrakts mazināja smadzeņu oksidatīvo stresu un bojājumus, kā arī apoptozi un neiroloģisko deficītu (Sun et al., 2014).

D. moldavica piemīt antibakteriāla, antioksidantu un kardioprotektīva iedarbība. Vienā pētījumā par žurku sirdīm rezultāti parādīja, ka išēmiskajos un reperfūzijas periodos. Ekstrakta lietošana izraisīja būtisku ventrikulārās tahikardijas skaita, ilguma un kopējo ventrikulāru ekstopisko sitienu skaita samazināšanos. Turklāt išēmiskās ventrikulārās tahikardijas incidence kontroles grupā samazinājās no 93% līdz 0,50% un 50% ārstēšanās grupā. Pirms *D. moldavica* ekstrakta lietošanas kontroles grupā infarktu biežums sastādīja $37 \pm 1\%$, taču pēc 25 $\mu\text{g}/\text{mol}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mol}$ un 200 $\mu\text{g}/\text{mol}$ ekstrakta perfūzijas infarktu biežums statistiski nozīmīgi samazinājās līdz $13 \pm 2,8\%$, $8 \pm 1\%$ un $18 \pm 2\%$ ($p < 0,001$) (Najafi et al., 2009).

Auga ēteriskajai eļļai piemīt spēcīga pretmikrobu darbība, īpaši pret *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria mnonocytogens*. Salīdzinot ar hloramfenikolu *D. moldavica* ēteriska eļļa uzrādīja statistiski nozīmīgu antibakteriālu un pretsēnīšu darbību. Turklāt minimālā inhibējošā ēteriskās eļļas koncentrācija pie kuras *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphulococcus aureus*, *Micrococcus luteus* un *Serratia marcescens* baktēriju augšana tika inhibētā ir 0,07 mg/ml. Savukārt sēnīšu (*Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium*) augšana tika apstādināta pielietojot 0,08 mg/ml *D. moldavica* ēteriskās eļļas. Tādējādi auga ēteriskā eļļa varētu būt efektīvs līdzeklis patogēno mikroorganismu kontrolei pārtikā un farmācijas rūpniecībā (Keikhaie et al., 2018).

1.2. Laba ārstniecības augu novākšanas prakse

Labu ārstniecības augu novākšanas un sagatavošanas praksi paredz sekojošie normatīvie dokumenti – PVO 2003. gada vadlīnijas par labu lauksaimniecības un ārstniecības augu novākšanas praksi, PVO 2007. gada augu izcelsmes zāļu kvalitātes novērtēšanas vadlīnijas, ņemot vērā piesārņotājus un atlikumus, PVO 2011. gada augu izcelsmes materiālu kvalitātes kontroles metodes, PVO 2018. gada vadlīnijas par labu ārstniecības augu izcelsmes zāļu pārstrādes praksi, 2013. gada Eiropas Farmakopejas 8. izdevums, Latvijas Bioloģiskās lauksaimniecības asociācijas 2006. gada labas higiēnas prakses vadlīnijas kaltētu garšaugu,

tējas un ārstniecības augu pirmapstrādei, pārstrādei un realizācijai bioloģiskajā lauksaimniecībā.

Labāko ražas novākšanas laiku nosaka pēc bioloģiski aktīvo sastāvdaļu kvalitātes un daudzuma, nevis pēc augu kopējās veģetatīvas ražas. Bioloģiski aktīvo sastāvdaļu kvantitatīvā koncentrācija mainās atkarībā no augu augšanas un attīstības stadijas. Tās attiecās arī uz toksiskām vai indīgām vietējo augu sastāvdaļām. Ārstniecības augus nedrīkst novākt vietās, kur ir augsts pesticīdu vai citu ķīmisko vielu piesārņojuma līmenis, piemēram, pie ceļa malām, drenāžas grāvjiem, raktuvēm, atkritumu izgāztuvēm un rūpnīcām, kas var radīt toksiskas emisijas. Lai izvairītos no dzīvnieku izcelsmes piesārņojuma augus nedrīkst vākt ganību vietās un to apkārtnēs, ieskaitot upju krastus, kas atrodas lejup no ganībām (World Health Organization, 2003; World Health Organization, 2018).

Novāktos augus ievieto tīros grozos, maisos vai ļābi vēdināmos konteineros, kuros nav svešķermeņu un augu atlikumu no iepriekšējām novākšanas reizēm. Pēc novākšanas ārstniecības augus apstrādā – pārskata, izņem nevēlamos piesārņotājus, nomazgā, sašķiro, sagriež un izžāvē. Novāktie ārstniecības augi jāšargā no kukaiņiem, grauzējiem, putniem un citiem kaitēkļiem, ka arī no mājlopiem un dzīvniekiem. Iekārtām un instrumentiem, ar kuriem apstrādā augus jābūt tīriem, īpaši iekārtu daļām, kas nonāk tiešā saskarē ar ārstniecības augu materiāliem (World Health Organization, 2003; World Health Organization, 2018).

1.2.1. Žāvēšana un citas ārstniecības augu apstrādes metodes

Pēc novākšanas neapstrādātos augus pārbauda, sašķiro, veic primāro apstrādi un izžāvē. Augu apstrādes metodes dažādām sugām var atšķirties. Dažus augus var apstrādāt sašķirojot, nomazgājot, noskalojot, sagriežot un izžāvējot. Lai uzlabotu kvalitāti, terapeitisko efektivitāti un izvairītos no toksiskām vielām dažām augu sugām ir nepieciešama sarežģītāka apstrāde, kas ietver šķirošanu, mazgāšanu, noskalošanu, fermentāciju, blanšēšanu, vārīšanu, tvaicēšanu, cepšanu, grauzdēšanu un žāvēšanu (World Health Organization, 2018).

Šķirošanas process ir pirmais solis, lai nodrošinātu ārstniecības augu tīrību. No augiem izņem redzamos svešķermeņus un nevēlamās vielas – augsnes daļas, putekļus, akmeņus, dažādus piemaisījumus, piemēram, kukaiņus, sapuvušās auga daļas, citus nonākušos augus, to daļas un toksiskās vielas (World Health Organization, 2018).

1.2.1.1. Žāvēšana

Žāvēšana pasargā augus no pelējuma sēnītēm un baktērijām, novērš augu audu bojājumus un fitoķīmisko vielu izmaiņas, kuras izraisa fermentu un mikroorganismu darbība. Žāvēšana atvieglo turpmāko augu sasmalcināšanas procesu. Žāvēšanas procesa laikā var samazināties gaistošo vielu, piemēram, ēterisko eļļu daudzums, kas atrodas svaigajā augu

materiālā. Izzāvētos augu materiālos mitruma līmenis atkarībā no sugas var atšķirties, bet nedrīkst pārsniegt 12% (Babua et al., 2018; World Health Organization, 2018).

Pareiza žāvēšana ietver četrus galvenos nosacījumus – temperatūras, mitruma, gaisa padeves un gaisa tīrības kontroli. Žāvēšanas apstākļus nosaka pēc neapstrādāto augu audu struktūras, ķīmiskā sastāva, kā arī vēlamā augu izskata un formas. Neatbilstoši izvēlētajā žāvēšanas metode var būtiski ietekmēt iegūto augu kvalitāti (World Health Organization, 2018).

Žāvēšanas process iedalās trīs veidos – pastāv termiskā, ķīmiskā un speciālā žāvēšana. Termiskā žāvēšana var norisināties dabiskās konvekcijas veidā, piemēram, žāvējot lapas saulainā, ēnainā vai vējainā vietā vai piespiedu konvekcijas veidā, piemēram, speciālajā žāvēšanās skapī vai uz konveijera lentes. Augu lapas var būt izžāvētas pielietojot ķīmisko žāvēšanas metodi, piemēram, pievienojot glicerīnu, silīcija smiltis vai kalcija hlorīdu. Trešais veids ir lapu žāvēšana speciālās iekārtās, piemēram, izmantojot presi, siltumnīcu, oglekļa dioksīdu, mikroviļņi, radiofrekvenci, vakuuma žāvēšanas krāsni vai iepriekš sasaldējot (Babua et al., 2018).

1.2.1.2. Termiskā žāvēšana

Daudzi pētījumi rāda, ka karsta gaisa temperatūra ietekmē lapu žāvēšanas kinētiku. Žāvētāji, kuros izmanto paaugstināto temperatūru ir efektīvākie, nekā tie, kuros izmanto apkārtējā gaisa temperatūru. Atbilstoša temperatūras paaugstināšana samazina žāvēšanas laiku, nodrošina vienmērīgu enerģijas izkliedi un paaugstina siltumvadītspēju, vienlaicīgi nodrošinot augstu gala produkta kvalitāti (Babua et al., 2018).

Izšķir divus termiskās žāvēšanas veidus – dabiskās un piespiedu konvekcijas žāvēšana. Dabiskās konvekcijas žāvēšanas laikā lapas tiek žāvētas pateicoties dabiskai gaisa cirkulācijai. Svaigas lapas izliek plānos slāņos un uz pāris nedēļām atstāj žāvēties tumšā un labi vēdināmā vietā, kur ir apkārtējā gaisa piekļuve. Žāvēšana saulainā vai ēnainā vietā ir divas visbiežāk pielietojamas dabiskās konvekcijas žāvēšanas metodes (Chen et al., 2006).

Dažus augu materiālus var žāvēt brīvā dabā tiešo saules staru iedarbībā piemērotā klimatā. Žāvēšanas ilgums ir atkarīgs no augu materiāla stāvokļa un laika apstākļiem. Žāvējot dabiskā veidā, augus izliek plānos slāņos uz žāvēšanas rāmjiem aptuveni 15 cm virs zemes. Lai panāktu vienmērīgu žāvēšanu un novērstu pelējuma veidošanos augu materiālus periodiski apgriez uz otru pusi (World Health Organization, 2003; World Health Organization, 2018; Babua et al., 2018). Efektīvai žāvēšanai saulainā vietā ir nepieciešami skaidri laika apstākļi ar tīru, sausu un karstu gaisu bez putekļu daļiņām. Saules starojums uzsilda apkārtējo gaisu, tādējādi izžāvējot svaigas lapas. Parasti šāda žāvēšanas metode tiek īstenota 28 – 40° C temperatūrā un ar relatīvo gaisa mitrumu, kas ir mazāks par 60% (GidadoLiman et al., 2014).

Žāvējot lapas saulainā vietā pastāv augstāks piesārņojuma risks ar mikroorganismiem, kukaiņiem un putekļiem, kas var sekmēt drogu kvalitātes pasliktināšanos (Dwiedy et al., 2012). Turklāt šāds žāvēšanas veids veicina lapu krāsas, garšas un bioloģiski aktīvo vielu zudumus, jo ir apgrūtināta gaisa temperatūras kontrole un lapas tiek pakļautas tiešo saules starojuma iedarbībai (Arun et al., 2011).

Lai izvairītos no tiešas un spēcīgas saules iedarbības ārstniecības augus var žāvēt ēnainā vietā, izmantojot apkārtējās vides gaisu ar atbilstošu mitruma līmeni un pietiekošo ventilāciju, bet bez ultravioleto staru piekļuves. Šāds žāvēšanas veids ir lēnāks, bet ir piemērotāks, ja vēlas saglabāt vai samazināt augu ziedu un lapu krāsu zudumus. Žāvējot zemākā temperatūrā un samazinot iztvaikošanu, augā saglabājas lielākā daļa gaistošo un aromātisko vielu (Babua et al., 2018; World Health Organization, 2018).

Trešais dabiskās konvekcijas žāvēšanas veids ir žāvēšana vējainā vietā. Gadījumā, ja gaisam, kas plūst gar lapām, ir zemāks relatīvais mitrums, nekā gaisam, kas izplūst no lapām, iztvaikošanas ātrums var paātrināties, sekmējot ātrāku žāvēšanas procesu (Babua et al., 2018).

Žāvējot lapas vējainā vietā ir nepieciešams ilgs laiks un pastāv lielākā varbūtība, ka lapas var tikt piesārņotas ar kukaiņiem, putekļiem, mikroorganismiem un sēnītēm, būtiski pazeminot gala produkta kvalitāti. Šādos gadījumos var pielietot piespiedu konvekcijas žāvēšanu, kas norisinās kontrolētos un izolētos apstākļos, izmantojot piespiedu konvekcijas žāvētājus. Žāvēšana piespiedu konvekcijas veidā uzlabo izzāvēto lapu kvalitātes īpašības (Tiwari, 2016). Žāvēšanas procesa laikā ventilatori vai gaisa pūtēji izlaiž gaisu caur sildītājiem, tādējādi paaugstinot temperatūru un pazeminot gaisa relatīvo mitrumu. Procesā laikā var kontrolēt temperatūru, relatīvo mitrumu un gaisa plūsmas ātrumu (Potisate et al., 2014).

1.2.1.3. Ķīmiskā žāvēšana

Izšķir trīs ķīmiskās žāvēšanas veidus – žāvēšana ievietojot lapas glicerīna šķīdumā, pievienojot lapām silīcija smiltis vai kalcija hlorīdu. Pimajā gadījumā lapas ieliek ūdens – glicerīna ķīmiskajā šķīdumā. Glicerīns ir mīkstinošs un organisks līdzeklis, kas lapas padara elastīgākas. Dabīgais mitrums, kas atrodas lapās tiek aizstāts ar glicerīna šķīdumu, saglabājot lapu tekstūru un formu. Daži pētījumi norāda, ka šāda svaigo lapu apstrādes metode ir vislabākā un efektīvākā (Babua et al., 2018).

Žāvēšanu ar silīcija smiltīm pielieto, ja izvēlētie augi nav paredzēti ēšanai. Svaigas lapas ievieto pannā un pārklāj ar sausām un karstām smiltīm, kas absorbē mitrumu. Pēc tam lapas atdzesē, izņem un izlīdzina ar karstu gludekli. Un tikai tad lapas iemēro ē bezkrāsainā lakā un izzāvē (Chen and Mujumdar, 2006).

Žāvējot svaigas lapas var pievienot kalcija hlorīdu. No sākuma noteiktu kalcija hlorīda daudzumu izkausē un ievieto hermētiski noslēdzamā plastmasas traukā platā slānī, konteineru noslēdz un lapas rūpīgi žāvē divu dienu laikā (Chen and Mujumdar, 2006).

1.2.1.4. Mākslīgā un speciālā žāvēšana

Lietainā laikā vai reģionos ar paaugstinātu gaisma mitrumu augu materiālus var žāvēt mākslīgā veidā speciālajās žāvēšanās iekārtās. Pielietojot mākslīgo žāvēšanu īsākā laika periodā var izžāvēt lielāko augu daudzumu. Pie šīm metodēm pieskaita tādas metodes kā žāvēšanu skapī (50 – 80°C), žāvēšanu uz konveijera lentes, žāvēšanu vakuumā (60 – 75°C) un ķīmisko žāvēšanu. Pie īpašām žāvēšanas metodēm pieder saldēšanas žāvēšana (-50°C), mikroviļņu žāvēšana (180 – 900 W) un radiofrekvenču žāvēšana (1 – 300 MHz). Svarīgi ir izvairīties no atvērtās liesmas, jo degšanas atlikumi var veicināt piesārņojumu. Tomēr ja lieto atvērtu liesmu, tad jābūt labi ventilētai teritorijai. Žāvēšanas temperatūra un mitrums ir atkarīgs no augu materiāla dabiskām īpašībām un tā aktīvo sastāvdaļu fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Pārkaršana var izraisīt pārmērīgo gaistošo vielu zudumus un ķīmisko komponentu sadalīšanos. Augu saknes un mizas žāvē pie temperatūras zem 60° C, bet lapas un ziedus pie temperatūras zem 40° C (Babua et al., 2018; World Health Organization, 2018).

Viens no speciālās žāvēšanas veidiem ir lapu žāvēšana starp avīzes loksnēm. Šajā gadījumā lapas ieliek starp avīzēm tā, lai ūdens no lapām varētu brīvi iztvaikoties. Žāvēšanas process norisinās diezgan ilgi – 120 – 130 stundas un rezultātā izžāvētas lapas saplacinās un zaudē formu. Ja vēlas izžāvēt lielos lapu daudzumus, tad pielieto žāvēšanu siltumnīcā. Siltumnīcas jumtu izgatavo no caurspīdīgiem materiāliem, piemēram, no stikla vai polikarbonāta, lai saules starojums varētu tikt iekšā. Lai izvairītos no mitruma, tai skaitā lietus iekļūšanas, polikarbonātu vai stiklu piestiprina pie tērauda balstiem. Saules starojumam nonākot siltumnīcā, tas vairākkārtīgi atspoguļojas un kļūst par īso starojumu, ko atspoguļo stikls. Garais starojums paliek siltumnīcā, temperatūra paaugstinās un lapas tiek žāvētas. Siltumnīcas sistēmas lieto ne tikai saulainās dienās saules enerģijas uzkrāšanai, bet arī siltuma enerģijas uzglabāšanai un lietošanai naktīs vai lietainā laikā (Babua et al., 2018). Piemēram, veicot eksperimentu ar amaranta lapām, pētnieki konstatēja, ka siltumnīcā vidējā gaisa temperatūra paaugstinājās no 30 līdz 44° C un relatīvais mitrums samazinājās no 42 līdz 37%. Tas liecina par to, ka siltumnīcas gaisam ir lielāks žāvēšanas potenciāls – masas apmaiņa un samazināts kopējais žāvēšanas laiks, nekā apkārtējās vides gaisam (Singh et al., 2014).

Bieži vien lapu drogas, kas ir jūtīgas pret karstumu žāvē pazeminātā temperatūrā vakuuma vai parastajā žāvēšanas skapī. Šajā gadījumā samazinās žāvēšanas laiks un gaisa trūkums samazina oksidatīvās reakcijas. Šīs metodes pielietojums var uzlabot augu krāsu, garšu

un tekstūru (Mohapatra et al., 2014). Vienā pētījumā autori salīdzināja dažādas žāvēšanas metodes un nonāca pie secinājuma, ka vakuuma žāvēšanas skapī citronu verbēnu varēja izžāvēt divas reizes ātrāk, nekā parastajā žāvēšanas skapī. Jo pie 40° C, 50° C un 60° C temperatūras parastajā žāvēšanas skapī lapu drogas tika pilnībā izžāvētas 25, 14 un 6 stundu laikā, savukārt vakuuma žāvēšanas skapī 13, 8 un 3 stundu laikā (Ebadi et al., 2015).

Īpaši ātra lapu drogu žāvēšanas metode ir žāvēšana mikroviļņu krāsnī. Žāvēšanas procesa laikā tiek izmantots elektromagnētiskais starojums frekvenču diapazonā no 300 MHz līdz 300 GHz. (Danso – Boateng, 2013). Žāvējot baziliku mikroviļņu krāsnī var saglabāt lielāku olbaltumvielu un ogļhidrātu daudzumu. Enerģijas pārnese mikroviļņu krāsnī īsā laika periodā paātrina ūdens iztvaikošanu no lapām, tādējādi samazinot oksidāciju un saglabājot uzturvērtību. Procesā laikā var samazināties dzelzs daudzums, jo sildīšanas process veicina oksidatīvo dzelzs noārdīšanos. Tomēr šāda žāvēšanas metode var izraisīt membrānu bojājumus (Feng et al., 2012).

Parastās žāvēšanas metodes var pazemināt gala produkta kvalitāti, pie tam patērējot daudz enerģijas. Lai no lapu drogām veicinātu ūdens iztvaikošanu, lapas var žāvēt ar oglekļa dioksīdu. Šī žāvēšanas metode tiek īstenota bezskābekļa vidē temperatūras diapazonā no 30 līdz 60° C, tādējādi augos saglabājot karstuma un skābekļa jutīgos savienojumus, piemēram, vitamīnus, pigmentus un olbaltumvielas. Turklāt oglekļa dioksīds inaktivē lapu drogās esošos mikroorganismus un efektīvi novērš oksidēšanās reakcijas, kas ir viens no lapu krāsas izmaiņas cēloņiem (Poomsa – ad et al., 2011).

Bieži vien žāvējot lapu drogas izmanto radio frekvences viļņus, kas ir elektromagnētiskie starojumi diapazonā no 1 līdz 300 MHz (Francesco et al., 2009).

1.2.1.5. Citas ārstniecības augu apstrādes metodes

Fermentācijas un blanšēšanas procesa laikā atkarībā no sugas augus uzglabā 45 – 65° C temperatūrā no vienas nedēļas līdz diviem mēnešiem. Fermentācijas procesā augu materiālu ķīmiskās sastāvdaļas tiek hidrolizētas un/ vai oksidētas. Augu materiālus blīvi sakrauj starp vilnas segām vai citiem audumu veidiem. Piemēram, vaniļas pupiņas divus mēnešus dienās laikā tur saulē vilnas segās. Fermentācijas procesa laikā vaniļas pākstis zaudē līdz pat 80% no svara un iegūst raksturīgo vaniļas krāsu un smaržu. Arī mazgāšanas procesa laikā dažus ārstniecības augus blanšē, īslaicīgi tos ievietojot verdošā ūdenī. Blanšēšana pagarina augu uzglabāšanas laiku, novērš piesārņošanu ar pelējumu sēnītēm un kukaiņiem, nodrošina labāku žāvēšanu un pārtrauc fermentu darbības aktivitāti (World Health Organization, 2018).

Vārīšanas laikā augus ievieto ūdenī vai citā šķīdumā. Tvaicējot, augus tur virs verdošā ūdens, kā rezultātā augu materiālu struktūra kļūst mitra. Bieži vien augu materiālus ievieto

tvaikonī vai speciālajā traukā ar rāmi, kas ir piekārts virs verdošā ūdens. Vārīšanas vai tvaicēšanas procesu izmanto, lai mīkstinātu auga audus, denaturētu fermentus un termiski noārdītu ķīmiskās vielas, kas atrodas augos (World Health Organization, 2018).

Cepšanas un grauzdēšanas procesā augus ievieto apkures ierīcē un silda, izmantojot netiešo un izkliedēto siltumu. Lai nodrošinātu vienmērīgu augu sildīšanu, iepriekš tos apstrādā ar magnija silikāta pulveri. Grauzdēšanas procesā dažus augus iesaiņo samitrinātā papīrā. Temperatūra un laiks var atšķirties atkarībā no augu materiāla (World Health Organization, 2018).

1.2.2. Lapu drogu žāvēšanas nosacījumi

Žāvēšanas paņēmienus un temperatūras režīmu izvēlas atkarībā no auga uzbūves īpatnībām, ķīmiskā sastāvā un tajos esošo vielu stabilitātes. Neatbilstoši izvēlētas augu žāvēšanas metodes var samazināt lapu kvalitāti un bioloģiski aktīvo vielu daudzumu. Līdz ar to dažādu lapu veidiem ir nepieciešamas specifiskas žāvēšanas metodes, kuras nodrošina sagaidāmo galaprodukta kvalitāti. Žāvēšanas laikā, lai lapās nodrošinātu vēlamo mitruma saturu ir jākontrolē klimatiskos apstākļus, gaisa relatīvo mitrumu, žāvēšanas laiku un izplatīšanas biežumu (Babua et al., 2018).

Žāvēšanas laikā mitruma iztvaikošanas ātrums ir atkarīgs no ārējiem klimatiskiem apstākļiem. Gaisa temperatūra, gaisa relatīvais mitrums un gaisa plūsmas ātrums mainās atkarībā no ģeogrāfiskās atrašanās vietas un gada laika. Karstos, sausos klimatiskos apstākļos lapas izžūst dažu dienu laikā, jo ūdens ātri iztvaiko. Toties mitrajā klimatā atkarībā no sākotnēja mitruma satura, gaisa plūsmas, žāvēšanas temperatūras un lapu dziļuma uz paplātes žāvēšana var aizņemt ilgāku laiku. Apkārtēja klimata ietekme būs lielāka, ja lapas tiek žāvētas atklātā saulē, ēnā vai vējā (Babua et al., 2018).

1.2.2.1. Žāvēšanas temperatūra

Pielietojot žāvēšanas metodi ar karstu gaisu ar lapām var notikt nevēlamas fiziskas, strukturālas un ķīmiskas izmaiņas, kas var negatīvi ietekmēt lapu kvalitāti, piemēram, tekstūru, garšu, smaržu, krāsu un uzturvērtību (Qasem et al., 2013). Lielāks aktīvo sastāvdaļu zudums vērojams, ja tiek palielināta gaisa temperatūra. Tas ir saistāms ar gaistošo vielu iztvaikošanu žāvēšanas laikā (Poomsa – ad et al., 2011). Turklāt žāvējot lapas paaugstinātā temperatūrā, kas ir virs 60° C var novērot būtiskas krāsas izmaiņas, jo lapu šūnās degradējās hlorofils. Žāvēšanas sākumposmā pārāk augsta un neatbilstoša temperatūra uz lapām var rādīt apdegumus un pūslīšus (Ataei et al., 2015). Lielākai daļai ārstniecības augu ir pieļaujama mērena žāvēšana temperatūrā, kas ir no 50 līdz 60° C. Turklāt 50° C žāvēšanas temperatūra ārstniecības augos un garšaugos rada minimālos kvalitātes zudumus (Shaw et al., 2007). Līdz ar to žāvējot tējas lapas

pielieto psihometrisko temperatūras atšķirību starp gaisa siltumu un izplūdes apstākļiem (Akhtaruzzaman et al., 2013).

No otras puses ārstniecības augus žāvējot pārāk zemā temperatūrā, mitrs gaiss var aktivizēt sadalīšanas procesu, lapās paātrinot fermentu aktivitāti un izraisot pastiprinātu mikroorganismu vairošanos, kas palēnina žāvēšanas procesu (Kustree et al., 2010).

Eksperimentāli pierādīts, ka fermentu aktivitāte zūd vai pavājinās, ja drogu strauji žāvē 50° C temperatūrā. Drogas, kuru sastāvā ir ēteriskās eļļas, parasti žāvē zemā temperatūrā (25 – 40° C). Sirdsdarbību ietekmējošos glikozīdus saturošās drogas žāvē ātri 50 – 60° C temperatūrā. Askorbīnskābi saturošās drogas sākumā jāžāvē 80 – 100° C temperatūrā, bet vēlāk temperatūru var pazemināt līdz 60° C (Rubine un Eniņa, 2004).

Lai nodrošinātu vēlamu tējas kvalitāti, žāvējot lapas ir svarīgi izvēlēties tam piemērotāko temperatūru, optimizējot pastāvīgos un mainīgos apstākļus. Vienota un atbilstoša gaisa temperatūra šajos divos atšķirīgajos žāvēšanas procesos nodrošina galaprodukta kvalitātes konsekvenci (Babua et al., 2018).

1.2.2.2. Gaisa relatīvais mitrums

Gaisa relatīvais mitrums ir mitruma daudzums gaisā salīdzinot ar maksimālo daudzumu, kas ir iespējams pie noteiktas temperatūras. Jo augstāks ir gaisa relatīvais mitrums, jo lēnāks ir ūdens iztvaikošanas ātrums no lapām. Pie nemainīgas apkārtējās vides temperatūras paaugstināta mitruma gradienta dēļ, pazemināts gaisa relatīvais mitrums palielina ūdens iztvaikošanas ātrumu (Babua et al., 2018). Drogu uzglabāšanai rekomendē gaisa relatīvo mitrumu, kas nepārsniedz 60% (Snow, 2003).

1.2.2.3. Gaisa plūsmas ātrums

Žāvēšanas laiks un žāvējama auga kvalitāte ir atkarīga no gaisa plūsmas ātruma un gaisa plūsmas vienotas cirkulācijas. Gaiss, kas atrodas uz auga virspuses uzsūc mitrumu un nepārtraukti tiek aizstāts ar svaigo gaisu ar zemo relatīvo mitrumu. Apkārtējā vidē pie nemainīgas gaisa temperatūras un relatīvā mitruma, maksimālais žāvēšanas ātrums tiek panākts pateicoties ātrai gaisa cirkulācijai virs auga virsmas un rezultātā ūdens ātri iztvaiko (Pereira et al., 2012).

Ātrākai augu žāvēšanai ir nepieciešama augsta temperatūra, zems relatīvais mitrums un liels gaisa kustības ātrums, vienlaicīgi neradot galaprodukta kvalitātes zudumus (Pereira et al., 2012).

1.2.2.4. Žāvēšanas ilgums

Lapu kvalitāte ir atkarīga no žāvēšanas laika. Žāvējot lapas pārāk ilgi, var pasliktināties to krāsa, struktūra un bioloģiski aktīvo vielu daudzums. Laiks, kas ir nepieciešams, lai lapas

varētu izzāvēt ir atkarīgs no vīšanas pakāpes, temperatūras, izplatīšanas biežuma un gaisa tilpuma (Babua et al., 2018).

Galīgo vēlamo mitruma saturu (līdz 12%) un oksidācijas apstāšanos var panākt īsākā žāvēšanas laikā, palielinot žāvēšanas ātrumu. Gaisa temperatūras pieaugums var samazināt žāvēšanas laiku. Augtāks mitruma un siltuma gradients var palielināt žāvēšanas ātrumu. Ja gradients nav pietiekams, žāvēšanas ātrums var samazināties un žāvēšanas process pagarināties (Tuncay et al., 2005).

1.2.2.5. Ūdens aktivitāte

Izzāvētajās lapu drogās zems mitruma saturs pagarina uzglabāšanas laiku (Babua et al., 2018). Lielāko daļu no svaigo lapu satura veido saistītais un nesaistītais ūdens. Mitrums lapu drogu uzglabāšanas laikā izraisa mikroorganismu vairošanos. Lai lapu drogas varētu uzglabāt pēc iespējas ilgāku laiku pielieto žāvēšanas metodi. Pareizi žāvējot, lapās saglabājas barības vielas, krāsa un smarža. Lai nepieļautu enzīmu reakcijas un oksidēšanos, lapās pēc iespējas ātrāk ir jāsamazina mitruma saturs līdz pieļaujamam procentam. Žāvēšanas laikā lapas zaudē līdz pat 85% no svara (Babua et al., 2018).

Aktīvais ūdens ir produktā esošā brīvā ūdens mērījums, kas tiek definēts kā vielas tvaika spiediena attiecība pret tīrā ūdens tvaika spiedienu noteiktā temperatūrā. Manipulācija ar aktīvā ūdens daudzumu var ietekmēt tekstūru, ne – fermentatīvas brūnēšanas reakcijas, fermentu aktivitāti, lipīdu oksidēšanos un citus pārtikas produktu aspektus (Luther et al., 2004). Ūdens aktivitāte tiek mērīta diapazonā no 0,030 līdz 1000. Tīrā ūdens aktivitāte ir 1000. Jo augstākā ir ūdens aktivitāte, jo lielāks ūdens daudzums atrodas augā, lai iesaistītos dažādās ķīmiskās un fizikālās reakcijās. Žāvējot lapas zemā temperatūrā un augstā relatīvā mitrumā, mikroorganismu attīstības rezultātā lapas var ātri bojāties, jo ūdens aktivitāte ir lielāka par 0,9. Līdz ar to lapas, kas tiek žāvētas mērenā temperatūrā no 50 līdz 60° C ir drošas lietošanai, jo nenotiek mikroorganismu proliferācija (Sagrin and Chong, 2013). Vidējais pieļaujama is mitruma daudzums žāvētās lapās var būt no 8 līdz 14% un ziedos no 8 līdz 15% (Rubine un Eniņa, 2004).

Ūdens aktivitātei ir būtiska ietekme uz lapu sensoro īpašību destruktijas ātrumu, piemēram, hlorofila noārdīšanos, kas ir viens no lapu kvalitātes rādītājiem. Veicot pētījumu par krāsas un hlorofila izmaiņām *Yerba mate* lapās pētnieki konstatēja, ka ūdens aktivitātei ir ievērojama ietekme uz hlorofila sadalīšanas ātrumu pie atbilstošas žāvēšanas gaisa temperatūras (Schmalko et al, 2005).

1.2.3. Žāvēšanas un uzglabāšanas metožu ietekme uz lapu uzturvērtību

Žāvētajās lapās aktīvo barības vielu daudzums ir četras reizes mazāks, nekā svaigajās lapās. Žāvēšanas temperatūra, žāvēšanas metodes un žāvēšanas laiks būtiski ietekmē uzturvielu daudzumu lapās. Olbaltumvielas, tauki, šķiedrvielas, oghidrāti, pelnu saturs, vitamīni (B1 un A), minerālvielas (dzelzs, jods, cinks, kalcijs), dzelzi saistošās vielas (fitāti, oksalāti), ķīmiskās vielas (saponīni, tanīni), sensorās īpašības (forma, krāsa, aromāts) un terapeitiskā kvalitāte (kopējais fenolu daudzums, antioksidatīvās īpašības) ir galvenās īpašības, kuras jāņem vērā žāvējot lapas. Kopumā žāvēšana samazina lapu uzturvērtību un palielina uzturvielu blīvumu (Abdalbasit et al., 2014).

Trūkst datu par optimāliem *T. pratense* žāvēšanas apstākļiem. Žāvēšana termostātā 100°C temperatūrā veicina malonilglikozīdu dekarboksilēšanu par acetilglikozīdiem. UV-B starojuma ietekmē palielinās formononetīna, biohanīna A, kofeīnskābes un flavonoīdu daudzums (Swinny and Ryan, 2005).

Lielākā daļa no *T. pratense* sastāvdaļām, piemēram, lapas un ziedi, kas ir pieejamas tirgū ir brūnā, nevis sarkanā krāsā, kas norāda uz neatbilstošu novākšanas laiku, apstrādi, žāvēšanu un uzglabāšanas apstākļiem (Tsai, et al., 2006).

Pozitīvo ietekmi uz askorbīnskābi un β – karotīnu novēroja, žāvējot lapas īslaicīgi un pie zemākās temperatūras. Salīdzinot ar žāvēšanu uz paplātes, lielākos šo vitamīnu zudumus konstatēja žāvējot lapas saulainā vietā (Negi and Roy, 2001; Zainab et al., 2015).

Piemēram, žāvēšanas temperatūra būtiski ietekmēja moringa lapu (*Moringa oleifera Lam.*) minerālvielu sastāvu. Mazākos minerālvielu zudumus novēroja pie zemākās temperatūras, pielietojot sublimācijas žāvēšanas metodi. Turklāt žāvējot lapas krāsnī un pie augstākās temperatūras konstatēja ievērojamos slāpekļa, fosfora, nātrija, magnija, kālija, hlora un kalcija zudumus (Gyamfi et al., 2011). Tomēr žāvējot krāsnī moringa lapām varēja novērot mazākus fitoķīmisko vielu zudumus (Adeyemi et al., 2014).

Žāvēšanas process var radīt izmaiņas lapu krāsā, aromātā un uzturvērtībā. Parasti lapas žāvē zemākā temperatūrā un ilgāku laiku (Shaw et al., 2007). No svaigām lapām žāvētās lapas atšķiras pēc izmēra, formas, masas un apjoma. Žāvēšanas laikā lapas zaudē līdz 52 – 86% no sākotnējās masas un to apjoms samazinās līdz 3,5 – 15,2% (Tomaszewski and Górkowska, 2016).

Žāvēto lapu krāsa ir svarīgs kvalitātes rādītājs. Žāvēšanas laikā lapu krāsu maiņa ir saistīta ar hlorofila pigmenta noārdīšanos. Kā rezultātā lapas var palikt brūnas. Hlorofila pigments lapās var samazināties arī ilgstošās uzglabāšanas rezultātā. Hlorofils ir jutīgs pret karstumu un augstākās temperatūrās viegli sadalās (Debabandya et al., 2014; Xiangyang et al., 2010). Izzāvētās lapas zaudē krāsu, jo gaismas ietekmē oksidējās tajās esošās nepiesātinātās

molekulas. Mazākus hlorofila zudumus varēja novērot žāvējot lapas ēnainā vietā (Negi and Roy, 2001). Žāvējot lapas vakuumā vai mikroviļņu krāsnī varēja novērot mazākus krāsas zudumus un augstāku porainības struktūru. Šīs metodes pielietojums samazina mitruma saturu lapās, pārvēršot to tvaikos (Nantawan and Weibiao, 2009).

Terapeitiskā kvalitāte ir viena no svarīgākajām īpašībām pēc kuras novērtē žāvēto lapu kvalitāti. Daudzos pētījumos konstatēts, ka žāvēšanas metodes ietekmē kopējo fenola savienojumu un antioksidantu daudzumu. Piemēram, žāvēšanas temperatūras pieaugums samazināja antioksidantu aktivitāti un polifēnolu savienojumu stabilitāti zīdkoka lapās. Savukārt salīdzinot mērenā temperatūrā (60° C) žāvētās zīdkoka lapas ar lapām, kuras žāvēja iepriekš sasaldējot, antioksidantu aktivitāte un polifēnolu stabilitāte abos paraugos būtiski neatšķirās (Takuya et al., 2009).

Ir maz literatūras pētījumu par *T. pratense* uzglabāšanas apstākļiem. Vienā pētījumā svaigā augu materiālā novēroja sekojošo izoflavonoīdu koncentrāciju – 2050 µg/g (sausā svara) formononetīna, 1766 µg/g biohanīna A, 306 µg/g genisteīna un 127 µg/g daidzeīna. Pēc četrām žāvēšanas dienām apkārtējā vides gaisā būtiskas izoflavonoīdu koncentrācijas izmaiņas nav novērotas, izņemot daidzeīnu, kura koncentrācija palielinājās divas reizes. Sekojošie eksperimenti laboratorijā pirmajās divās nedēļās uzrādīja izoflavonoīdu koncentrācijas samazināšanos, kam sekoja stabilizācija piecos atlikušajos eksperimenta mēnešos. Daidzeīna, genisteīna, biohanīna A un formononetīna koncentrācija samazinājās attiecīgi par 26%, 39%, 66% un 73% (Daems, et al., 2016).

1.3. Lapu drogu kvalitātes kontroles metodes

Neapstrādātu augu materiālu drošību un kvalitāti ietekmē ārējie un iekšējie faktori. Pie ārējiem faktoriem pieder apkārtējā vide, savākšanas metodes, audzēšana, ražas novākšana, apstrāde pēc ražas novākšanas, transportēšana un uzglabāšana. Netīša mikrobioloģiskā vai ķīmiskā piesārņošana jebkurā ražošanās posmā var izraisīt drošības un kvalitātes pasliktināšanos. No savvaļas populācijām savāktie ārstniecības augi nepareizas identifikācijas vai netīšā piesārņojuma gadījumā var būt piesārņoti ar citām augu sugām vai to daļām, kas var radīt bīstamas sekas cilvēku veselībai (Kosalec et al., 2009).

Lapu drogu kvalitāti novērtē pēc makroskopiskām, mikroskopiskām un organoleptiskām īpašībām. Lapu drogām jābūt pilnīgi brīvām no redzamā piesārņojuma pazīmēm, ko rada apkārtējā vide, baktērijas, pelējums, kukaiņi vai dzīvnieki. Inspicējamam lapu drogām nedrīkst būt nepatīkamai vai puvuma smakai, krāsas maiņai, svešķermeņu piejaukuma un bojājumu pazīmēm. Pēc apstrādes lapu drogas jāuzglabā tīrā un higiēniskā vietā,

lai nepieļautu to piesārņojumu. Nedrīkst pieļaut pelējuma sēņu veidošanos, jo tas var radīt cilvēku dzīvībai bīstamos aflatoksīnus (World Health Organization, 2011).

Vizuālā pārbaude ir vienkāršākais un ātrākais veids kā noteikt augu identitāti, tīrību, svešķermeņu klātbūtni un iespējams, kvalitāti. Ja tiek konstatēts, ka augu materiāls būtiski atšķiras pēc krāsas, konsistences, smaržas vai garšas no kontroles parauga, tad uzskata, ka tas neatbilst standartiem (World Health Organization, 2011).

Augu materiāla makroskopiskā pārbaude balstās uz formas, izmēra, krāsas, virsmas īpašību, tekstūras, izskata un iespējamo bojājumu izvērtēšanu (World Health Organization, 2011).

Neapstrādātu augu materiāla krāsu var pārbaudīt izkliegtā dienas gaismā. Pēc vajadzības var izmantot mākslīgo gaismas avotu, kura viļņa garums ir līdzīgs dienas gaismas viļņa garumam. Paraugu materiāla krāsu salīdzina ar kontroles parauga krāsu (World Health Organization, 2011).

Augu aromāta noteikšanai nelielu materiāla daļu ievieto plaukstā vai piemērotā izmērā glāzē. No sākuma lēni un vairākās reizes ieelpo gaisu virs materiāla. Ja aromāts netiek sajūts, tad ar īkšķi un rādītājpirkstu vai starp plaukstām materiālu nedaudz saberž un vēlreiz novērtē (World Health Organization, 2011).

Augu materiāla kvalitāti iespējams novērtēt pēc pelnu satura, nosakot kopējo, nešķīstošo un ūdenī šķīstošo pelnu daudzumu. Kopējo pelnu metodi pielieto, lai pēc aizdedzes noteiktu atlikušā augu materiāla kopējo daudzumu. Šī metode ietver gan “fizioloģiskos pelnus”, kas iegūti no paša augu materiāla audiem un “ne – fizioloģiskos pelnus”, kas ir svešķermeņu atlikums, piemēram, smiltis. Nešķīstošie pelni ir atlikums, kas ir iegūts pēc kopējo pelnu vārīšanas ar atšķaidītu sāļsskābi un atlikušās nešķīstošās vielas aizdegšanas. Ūdenī šķīstošie pelni ir svara starpība starp kopējiem pelniem un atlikumu, pēc kopējo pelnu apstrādes ar ūdeni (World Health Organization, 2011).

Svarīga ir ūdens daudzuma kontrole. Pārmērīgs ūdens daudzums augu materiālā var veicināt mikroorganismu, pelējumu un kukaiņu attīstību un vairošanos. Līdz ar to katram augu materiālam ir jābūt noteiktam pieļaujamam ūdens daudzumam. Īpaši tas ir svarīgs augu materiāliem, kas viegli uzsūc un ātri bojājās ūdens klātbūtnē. Tiešā veidā ūdens daudzumu augu materiālā var noteikt pielietojot azeotropo metodi. Materiālu destilējot kopā ar nesajaucamo šķīdinātāju, piemēram, ar toluolu vai ksilolu, tās absorbē paraugā esošo ūdeni. Ar dehidratācijas testu inspicējamā augu materiālā iespējams noteikt gan ūdens, gan gaistošo vielu klātbūtni. Dehidratāciju var veikt 3 veidos – augu materiālu sildot līdz 100 – 105° C temperatūrai, liekot augu materiālu eksikatorā ar fosfora pentoksīda reaģentu vai noteiktu laiku materiālu dehidratējot istabas temperatūrā pie pazeminātā spiediena (World Health Organization, 2011).

Ēteriskās eļļas augu materiālos tiek uzskatītas par esenci. Tās iegūst destilējot auga materiālu ar ūdens tvaikiem. To sastāvs var mainīties atkarībā no ģints, sugas, augšanas un izejvielu avotu novākšanas apstākļiem un no izmantotā procesa tehnikas. Ēterisko eļļu samazināšanās var norādīt uz nekvalitatīvu augu žāvēšanas procesu (World Health Organization, 2011).

1.3.1. Mikroskopiskās kontroles metodes

Pēc materiāla vizuālās pārbaudes, lai identificētu augu sugu un šūnu kvalitāti veic mikroskopisko pārbaudi. Lai veiktu mikroskopisko inspekciju ir nepieciešams mikroskops ar lēcām, kas nodrošina plašu palielinājuma diapazonu, kondensatoru, objektīviem ar 4x, 10x un 40x palielinājumu un krāsainiem filtriem no matētā zili – zaļās krāsas stikla, okulāriem, atsevišķi vai mikroskopā iebūvēto lampu, polarizējošo filtru komplektu, mikrometru, okulāra lineālu, kas ir ievietojams 6x okulārā un augu materiāla inspekcijai nepieciešamie instrumenti (World Health Organization, 2011).

Pirms mikroskopijas, lai no augu šūnām izdalītu ūdenī šķīstošo saturu vai cieto augu virsmu pirms griešanas varētu mīkstināt, dehidratēto augu materiālu rehidratē, ievietojot to mitrajā kamerā vai mērcējot ūdenī. Pēc tam augu materiālu apstrādā ar ķīmiskiem reaģentiem, kas var norādīt uz šūnas izmaiņām vai izšķīdināt nevēlamās auga struktūras, labākai parauga apskatei (World Health Organization, 2011).

PVO vadlīnijās minēts, ka paraugu izmēru noteikšanai jāizmanto kalibrēts okulāra lineāls. Cietes ieslēgumu, lipīdu, tanīnu u.c. struktūru vizualizēcijai izmanto histoķīmiskās krāsošanas metodes ar lugola šķīdumu, sudāna III šķīdumu u.c. Turklāt nav minēts, ka mūsdienās zinātnē izmanto videomikroskopijas metodes ar atbilstošām kalibrētām datorprogrammām un automatizētu šūnu skaitīšanu (World Health Organization, 2011).

1.3.2. Mikrobioloģiskais piesārņojums

Augot ārstniecības augu drogas var būt pakļautas mikrobioloģiskajam piesārņojumam no augsnes, gaisa un ūdens. Ārstniecības augu mikrobioloģisko piesārņojumu var ietekmēt arī tādi vides faktori kā temperatūra, mitrums, nokrišņu daudzums pirms un pēc ražas novākšanas, apstrādes veids, kā arī neapstrādātu un apstrādātu drogu uzglabāšanas apstākļi. Lai uzlabotu produktu tīrību un drošību ārstniecības drogu pagatavošanas laikā vēlams ievērot pamata higiēnu, standartizēt dažas fizikālās īpašības, piemēram, mitruma saturu, pH un mikrobioloģiskā piesārņojuma līmeni (Kunle et al., 2012).

Augu materiāli var būt piesārņoti ar dzīviem organismiem, piemēram, baktērijām un to sporām, raugiem, mikroskopiskām sēnītēm, pelējumu sēnēm, vīrusiem, viensūņiem, kukaiņu olām un kāpuriem u.c. No mikroskopiskām sēnītēm augu materiālā var nonākt metabolisma

produkti – mikotoksīni, kas cilvēku veselībai ir kancerogēni toksīni un bīstami ķīmiskie piesārņotāji. Augu materiāls var būt piesārņots ar visdažādākajām potenciāli patogēnām baktērijām, piemēram, ar *Salmonella typhi*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *E. cloacae*, *Vibrio fluvialis*, *Pasteurella multocida*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter iwoffii*, *Klebsiella spp.*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, un *Rhizopus stolonifer* sēnēm (Alwakeel, 2008; Idu et al., 2011).

Dažu baktēriju sporas, piemēram, *Bacillus un Clostridium spp.* ir izturīgas pret pastiprinātu apstrādi, paaugstinātu karstumu un sausiem apstākļiem. Līdz ar to uz augu drogām sporas var ilgstoši dzīvot un atrasties pasīvā stāvoklī. Baktēriju endosporas un sēnīšu sporas ir divas dominējošās piesārņotāju grupas, kas ir saistītas ar ārstniecības augiem. Baktēriju, vīrusu un sēnīšu šūnu daudzveidība var atrasties ne tikai uz auga virsmas, bet arī augu drogu iekšpusē (Martins et al., 2001).

Ārstniecības augos mikrobioloģiskais piesārņojums var rasties neievērojot audzēšanas, novākšanas, apstrādes, transportēšanas, žāvēšanas, uzglabāšanas, higiēnas noteikumus un sliktu klimatisko apstākļu gadījumā (Stevic et al., 2012).

Ārstniecības augiem, kuriem pirms lietošanas pievieno verdošo ūdeni ir noteikts maksimāli pieļaujama mikroorganismu līmenis. Pēc PVO vadlīnijām vienā gramā augu materiālā var būt ne vairāk kā 10^7 KVV aerobo baktēriju, maksimāli 10^4 KVV raugu un pelējumu sēņu, ne vairāk kā 10 *Escherichia spp.*, ne vairāk kā 10^3 KVV citu enterobaktēriju un nevar būt nevienas *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.* un *Shigella spp.* baktērijas (World Health Organization, 2007).

Tā kā pelējuma sēnes ir plaši izplatītas atmosfērā, tās tiek uzskatītas par dabiskajām ārstniecības augu piesārņotājām. Nonākot labvēlīgos apstākļos dažas pelējuma sēnes var sintezēt toksiskus metabolītus – mikotoksīnus. Starp zināmajiem mikotoksīniem, toksiskākais ir aflatoksīns, ko sintezē *Aspergillus flavus*. Piesārņojums ar *Aspergillus flavus* ir bieži sastopams ārstniecības augos un zāļu tējās (Kulshrestha et al., 2008).

Biežāk pelējumu novēro uz virszemes augiem un to daļām. Pētījumā par 91 ārstniecības augu paraugiem konstatēja, ka 50% no visiem augiem bija piesārņoti ar pelējumu un tikai 16% augu pelējumu novēroja uz ziediem (Bugno et al., 2006).

Inspicējamā augu materiālā kopējo dzīvotspējīgo mikroorganismu un pelējumu sēņu daudzumu nosaka izmantojot vienu no sekojošām metodēm – membrānas filtrēšanu, barotņu pielietošanu vai sērījveida atšķaidīšanu. Ja kopējais dzīvotspējīgo mikroorganismu un pelējumu daudzums pārsniedz maksimāli pieļaujamo daudzumu, tad turpmāko augu materiāla inspicēšanu neveic (World Health Organization, 2011).

Mikroorganismu noteikšanai daļu no augu materiāla ievieto kazeīna – sojas fermenta agarizētā barotnē Petri platē, kur pie 30 - 35° C temperatūras paraugu inkubē 48 – 72 stundas. Pēc tam saskaita izaugušo koloniju skaitu, identificē to daudzveidību un salīdzina ar standartiem. Pēc līdzīgās metodes nosaka pelējumu sēņu daudzumu augos. Daļu no auga parauga ievieto glikozes agarizētā barotnē Petri platē, kur pie 20 – 25° C temperatūras to inkubē 5 dienas. Pēc tam aprēķina izaugušo koloniju skaitu, identificē pelējumu sēņu daudzveidību un salīdzina ar standartiem (World Health Organization, 2011).

Ārstniecības augu žāvēšana ir mitruma samazināšanas process, kura mērķis ir novērst mikrobiālo un fermentatīvo aktivitāti, tādējādi nodrošinot ilgāku drogu uzglabāšanas laiku. Žāvēšana ir visizplatītākā un biežāk lietotā ārstniecības augu konservēšanas metode. Pielietojot atbilstošo žāvēšanas veidu var saglabāt augu materiāla ārstnieciskās īpašības (Rocha et al., 2011; WHO, 2003).

Žāvējot ārstniecības augus augstā temperatūrā samazinās kopējais aerobo mikroorganismu skaits. Žāvēšanas metodes var pazemināt ūdens aktivitāti līdz līmenim, kas ir nepieciešams *Aspergillus* augšanas novēršanai (Gonzaga de Freitas and Baubab, 2012).

Viens no faktoriem, kas ietekmē ārstniecības augu kvalitāti ir pH vērtība. Ja pH līmenis ir zems, tad baktēriju skaits varētu būt mazs, savukārt, ja pH līmenis ir neitrāls vai augsts, augu izcelsmes piesārņojuma līmenis var būt lielāks. Optimālais baktēriju augšanas līmenis novērojams, ja pH vērtība ir no 5 līdz 8,5 (Abba et al., 2009).

Ārstniecības augu uzglabāšana ir svarīga ražošanas procesa sastāvdaļa. Uzglabāšanas laikā ārējo un iekšējo faktoru mijiedarbības rezultātā, augu materiālā pakāpeniski notiek fizikālās, ķīmiskās un bioloģiskās izmaiņas. Ārstniecības augu ilgstoša uzglabāšana slikti vēdināmā telpā palielina mitruma saturu, padarot tos jutīgākus pret pelējuma rašanos un toksīnu veidošanās. Ja uzglabāšanas laikā netiek kontrolēts gaisa relatīvais mitrums, tad lielākā daļa pelējuma sēnīšu, kas atradās uz auga ražas novākšanas laikā var sākt attīstīties (Gonzaga de Freitas and Bauab, 2012).

Vienā pētījumā pārbaudīja ārstniecības augu drogas, kuras pēc novākšanas uzglabāja 6 – 9 mēnešus. Pārbaudes laikā konstatēja augu materiāla kvalitātes pasliktināšanos. Tika konstatēts, ka drogas ir piesārņotas *A. flavus* celmiem un satur aflatoksīnu B1, kas pārsniedz pieļaujamo līmeni (Gonzaga de Freitas and Bauab, 2012).

Mikrobioloģiskais piesārņojums izraisa augu drogu ārstniecisko īpašību pasliktināšanos, jo tiek traucēta ķīmiski aktīvo komponentu stabilitāte, mainītās fizikālās īpašības un ārējais izskats, kas noved pie ārstniecības augu aktīvo sastāvdaļu un palīgvielu inaktivācijas (European Pharmacopoeia, 2007).

1.4. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija

Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija ir kvalitatīvs optiskās mikroskopijas veids, kas dod iespēju iegūt augstas izšķirtspējas attēlus dažādos parauga dziļumos. Konfokālo mikroskopiju plaši pielieto bioloģijā un biomedicīnā. Pielietojot šo metodi var apskatīt dzīvus un fiksētus paraugus, kas parasti ir marķēti ar vienu vai vairākām fluorescējošām zondēm (Paddock et al., 2018).

Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopijā var regulēt redzes lauka dziļumu, veidot bieza parauga optisko griezumu sērijas, kā arī samazināt vai pilnībā novērst fona ietekmi uz redzamo attēlu. Attēli, kas iegūti ar konfokālo mikroskopiju ir daudz kvalitatīvāki, nekā attēli, kas iegūti ar parasto fluorescējošo mikroskopiju (Claxton et al., 2006).

Diafragmas atvērums ir svarīgākais mikroskopijas elements. Lāzera izstarotā koherentā gaisma iziet caur vienu diafragmas atvērumu, kas atrodas konjugētā plaknē ar parauga skenēšanas punktu un caur otro diafragmas atvērumu, kas ir novietots detektora priekšā. Tā kā lāzeru atspoguļo dihromatiskais spogulis un tas tiek skenēts parauga noteiktā fokusa plaknē, sekundārā fluorescences, ko izstaro caur parauga punktiem, iziet caur dihromatisko spoguļi un fokusējās kā konfokālais punkts diafragmas atverē. Šī procesa rezultātā tiek iegūts augstas kvalitātes un izšķirtspējas attēls, kuru sauc par parauga optisko griezumu (Claxton et al., 2006).

Viena no konfokālās mikroskopijas priekšrocībām ir spēja veidot no 0,5 līdz 1,5 mikrometriem biezus optiskos griezumus. Optiskā griešana novērš artefaktus, kas rodas fiziski pārgriežot paraugus vai paraugu fluorescentās krāsošanas laikā, ko pielieto tradicionālajā mikroskopijā (Paddock et al., 2018). Konfokālā mikroskopija nodrošina nelielus gan sānu, gan aksiālās izšķirtspējas uzlabojumus (Claxton et al., 2006; Paddock et al., 2018).

1.5. Augu šūnas bojāejas rādītāji

Pēdējos gados interese par augu šūnu nāvi ir ievērojami palielinājusies, jo tā ir būtiska augu attīstībai un aizsardzībai. Sākotnēji aprakstīja divas atšķirīgas šūnu nāves formas – programmētu šūnu nāvi un nekrozi (Locato and De Gara, 2018).

1.5.1. Programmēta šūnu nāve

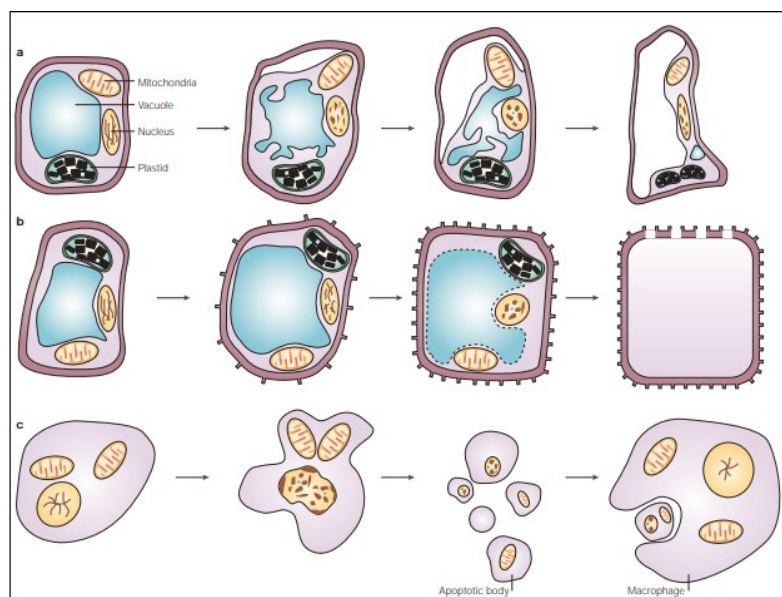
Programmēto šūnu nāvi definē kā darbību secību, kas noved pie kontrolētas un organizētas šūnas bojāejas. To raksturo atšķirīgas morfoloģiskās īpašības un no enerģijas atkarīgie bioķīmiskie mehānismi (Reape et al., 2008).

Šūnu nāve kā neatņemama dzīves cikla sastāvdaļa tiek novērota dažādos auga attīstības posmos, kā arī tās mijiedarbības rezultātā ar nelabvēlīgiem biotiskiem un abiotiskiem faktoriem un noteiktiem patoloģiskiem stāvokļiem. Programmēta šūnu nāve ļauj kontrolēt šūnu skaitu, iznīcināt nevēlamas vai bojātas šūnas un saglabāt šūnu homeostāzi (Gadjev et al., 2008).

Programmēta šūnu nāve ir iespējama visos organismos – sākot no baktērijām un beidzot ar eikariotiem. Augos programmēta šūnu nāve ietver sarežģītu signalizācijas ceļu tīklu, tostarp dažāda veida molekulāros signālus, piemēram, augu hormonus, kalciju, cikliskos nukleotīdus, brīvos skābekļa un slāpekļa radikāļus (Locato and De Gara, 2018).

Ruth F. Allen ir pirmais augu biologs, kas 1923. gadā pētīja ar sēnīti inficēto augu, programmēto šūnu nāvi atspoguļoja kā procesu, ko aktivizē augs, lai aizsargātos no patogēniem. Procesa laikā šūnas saglabā molekulāros mehānismus, kas ir nepieciešami pašas šūnas iznīcināšanai. Programmēta šūnu nāve tiek aktivizēta vecās auga daļās, piemēram, lapās un ziedlapiņās, lai pārstrādātu barības vielas (Dominguez and Cejudo, 2014; Ameisen, 2004).

Programmēto šūnu nāvi raksturo šūnas saraušanās, hromatīna kondensācija kodolos un šūnas sadalīšanās “apoptiskajos ķermeņos”. Augu šūnās kodoli maina formu no liela lodveida līdz mazam un plakanam kodolam. Hloroplastu izmēri un fluorescences samazinās. Šūnā par programmētās šūnu nāves iestāšanos norāda dažādas bioķīmiskās reakcijas, piemēram, citohroma c atbrīvošana no mitohondrijiem, specifisko proteāžu – kaspāžu un endonukleāžu aktivācija, kas starp nukleosomām pārrauj DNS un tādejādi izraisa tās sadalīšanos (Reape et al., 2008).



1. attēls. Morfoloģiskais salīdzinājums starp programmēto šūnu nāvi augos un apoptozi dzīvniekos (Lam, E. 2004).

Figure 1. Morphological comparison between programmed cell death in plants and apoptosis in animals (Lam, E. 2004).

Pirmajā variantā augu šūnā var novērot vakuolas un plazmatiskās membrānas saraušanos un novēlotu organelļu bojāeju. Šī procesa noslēgumā stadijā plazmatiskā membrāna sabrūk un atdalās no šūnu sienas, kas beidzas ar bojāgājušo šūnu satura noplūdi apoplastā.

Fragmentētā kodola DNS attēlota kā brūnā masa kodolos, kas ir pakļauti šūnu nāvei (Lam, 2004).

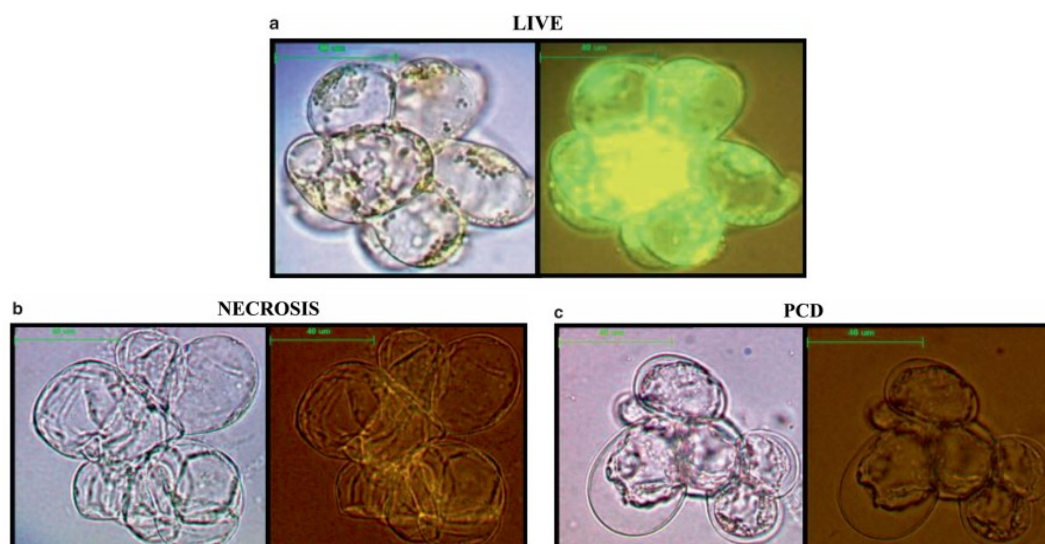
Otrajā variantā augu šūnas trahejas elementu diferenciacijas laikā var novērot vakuolas pietūkumu un plīsumu, kas tiek saskaņota ar šūnu sienas sabiezēšanu un pārstrukturēšanu. Vakuolas plīšana sākas pirms kodola DNS fragmentācijas, kas notiek šūnu nāves procesa vēlīnā stadijā pirms galīgās šūnas autofīzes. Īsi stublāji uz diferencētiem trahejas elementiem norāda uz sekundāri retikulēto šūnas sienu. Sabrukuši apgabali diferencētu trahejas elementu šūnas sienā norāda uz telpiski lokalizētām perforācijām (Lam, 2004).

Trešajā variantā apoptoze dzīvnieku šūnās sākas morfoloģiski ar hromatīna kondensāciju un fragmentāciju. Pēc plazmatiskās membrānas sadalīšanas veidojas apoptiskas struktūras, kuras tiek pārpackotas un sagremotas ar blakus esošām šūnām vai makrofāgiem (Lam, 2004).

Programmēta nāve tiek aktivizēta, ja augu šūna saņem informāciju no vairākiem avotiem, ieskaitot vidi, piemēram, tie varētu būt šūnu izdzīvošanas signāli, attīstības norādes, patogēnu atpazīšana, stresa signāli vai iekšēja informācija, piemēram, attīstības vēsture, šūnu bojājumi un vielmaiņas stāvoklis (Reape et al., 2008).

Jaunākie pētījumi, kuros izmantoja nosacīti fluorescējošo *Arabidopsis* mutantu, norāda, ka atkarībā no gaismas iedarbības intensitātes un gaismas pirmsapstrādes apstākļiem hloroplastos ražotais skābeklis singleta formā piedalās izpildītāj – atkarīgajos signālizācijas ceļos. Tie rada oksidatīvo stresu un izraisa šūnu nāvi (Gutierrez et al., 2014; Kim et al., 2012; Zhang et al., 2014). Hloroplastu membrānu bojājumi palielina skābekļa koncentrāciju singleta formā un ir vieni no pirmajiem soļiem, kas var izraisīt programmēto šūnu nāvi vai var būt sekundārās šūnu sadalīšanas sekas netiešas programmētās šūnu nāvēs laikā, kas palielina skābekļa koncentrāciju singleta formā (Kim et al., 2012).

Augos neliela stresa vai paaugstinātās jutības reakcijas laikā programmēta šūnu nāve izpaužas kā protoplasta atdalīšanās no šūnas sienas. Taču augsta stresa laikā šūnu nāve izpaužas nekontrolētas nāves jeb nekrozes veidā (Reape et al., 2008).



2. attēls. *Arabidopsis thaliana* šūnu veidi (Diamond et al., 2013).

Figure 2. Types of *Arabidopsis thaliana* cells (Diamond et al., 2013).

2. attēlā ir redzami *Arabidopsis thaliana* dažādi šūnu veidi pēc 10 minūšu termiskās apstrādes 53°C temperatūrā. Pirmajā variantā ir attēlotas dzīvas auga šūnas, kuras spēj sašķelt fluorescēna diacetātu un fluorescēt gaismā pie 490 nm viļņa garuma. Otrajā variantā var novērot nekrotiskās šūnas, kas nespēj sašķelt fluorescēna diacetātu, līdz ar to šūnas nefluorescē un neuzrāda protoplastu kondensāciju. Trešajā variantā var novērot, ka šūnās, kurās notika programmēta nāve protoplasts ir atdalījies no šūnas sienas. Šūnas nespēj sašķelt fluorescēna diacetātu un tādējādi nefluorescē (Diamond et al., 2013).

1.5.1.1. Hloroplastu izmaiņas programmētas šūnu nāves laikā

Augu programmētas šūnu nāves procesā noteicoša loma ir reaktīviem skābekļa un slāpekļa atvasinājumiem. Hloroplasti un mitohondriji ir lielākie reaktīvā skābekļa atvasinājumu avoti un pārmērīga ierosmes enerģija, piemēram, gaisma, ko saņem hloroplasti pārsniedzot fotosintēzei nepieciešamo daudzumu, rada fotosintēzes efektivitātes samazināšanos un augu augšanas aizkavēšanu (Zurbriggen et al., 2010; Mullineaux and Karpinski, 2002). Viena pētījuma autori atklāja, ka paaugstinātās jūtības reakcijas tabakas lapās paātrināja hloroplastu funkcijas izzušanu (Seo et al., 2000).

Pirmie ziņojumi par hloroplastu iesaistīšanos programmētā šūnu nāvē parādījās pētījumos par zirņu lapu epidermas šūnām. Šajos pētījumos konstatēja, ka gaismas stimulēts cianīds veicināja epidermas šūnu apvalku plīšanu, kas saturēja hloroplastus un mitohondrijus, savukārt epidermas šūnas, kurās nebija hloroplastu palika nemainīgas (Samuilov et al., 2002; Samuilov et al., 2003).

Palielinoties gaismas intensitātei un stresa reakciju laikā, kad fotosintēze nav tik efektīva, palielinās ierosmes enerģija, izraisot lielāku reaktīvo skābekļa atvasinājumu

veidošanos. Tas liecina par to, ka hloroplasti tāpat kā mitohondriji ir organellas, kas spēj izjust stresu un ierosināt reaktīvo skābekļa atvasinājumu signālu (Laloi et al., 2004; Mullineaux et al., 2010). Piemēram, vairāku autoru pētījumā konstatēja, ka ultravioletā starojuma izraisītai programmētai šūnu nāvei *Arabidopsis* protoplastos un stādos ir nepieciešams apgaismojums. *Arabidopsis* protoplastu šūnu nāve, kas tiek ierosināta ar fumonizīnu B1 ir atkarīga no gaismas, savukārt cianīdu izraisīto programmēto zirņu epidermas šūnu nāvi gaisma tikai pastiprina (Asai et al., 2000; Dzyubinskaya et al., 2006). Citā pētījumā novēroja, ka programmēta šūnu nāve, ko izraisa avirulenta patogēna inokulācija notiek uz *Arabidopsis* lapām, kas audzēja gaišajā vietā, nevis uz lapām, kas audzēja tumšajā vietā. Tas tiek skaidrots ar to, ka lapas, kas audzētas gaišajā vietā satur funkcionālos hloroplastus, bet lapas, kas audzētas tumšajā vietā tās nesatur (Zeier et al., 2004; Genoud et al., 2002).

Hlorofila fluorescences mikroskopija ir viena no vadošajām metodēm, ko izmanto, lai novērtētu augu fotosintēzes aktivitāti atsevišķu šūnu un hloroplastu līmenī (Omasa et al., 2009). Lapās hlorofils pastāv pigmentu – olbaltumvielu kompleksu veidā II fotosistēmā, I fotosistēmā un gaismas ieguves kompleksos, kas ir saistīti ar katru no šo reakciju centriem. Gaismas enerģija, ko absorbē hlorofila molekulas var izraisīt fotosintēzi un atkārtoti izstaroties siltuma vai gaismas veidā (fluorescence). Stresa ietekmē hloroplastos samazinās fotosintēze un palielinās fluorescence (Baker, 2008; Murchie and Lawns, 2013). Fotosintēzes samazināšanās, uzsverot izmaiņas hloroplastu struktūrā ir viena no pirmajām augu hipersensitīvo šūnu nāves pazīmēm (Boccaro et al., 2007).

1.5.2. Šūnu nekroze

Nekroze ir nekontrolēts un pasīvs process, kas iedarbojas uz lieliem šūnas laukumiem. Nekrotisko šūnu bojājumu ietekmē divi mehānismi – iekļaušanās enerģijas apgādē un tiešs šūnu membrānu bojājums (Elmore, 2007).

Galvenās morfoloģiskās izmaiņas, kas raksturo nekrozi ir šūnu piebriešana, endoplazmatiskā tīklā izstiepums, citoplazmas pūslīšu un vakuolu veidošanās, mitohondriju sablīvējums, piebriešana un plīsumi, ribosomu sadalīšanās un organellu membrānu bojājumi, lizosomu piebriešana un plīsumi, un gala rezultātā šūnas plazmatiskas membrānas degradācija. Šajā procesā novērojama strauja DNS, hlorofila u.c. vielu degradācija. Piebriešanu visos gadījumos izraisa membrānu bojājumi un osmoze. Tāpēc šajos šūnu nodaļumos ieplūst ūdens (Trumpe et al., 1997).

Agrāk nekrozi uzskatīja par pēkšņu un nekontrolētu šūnu nāves veidu, taču šobrīd parādījās pierādījumi, ka nekrozi var regulēt ar signāla pārvades ceļiem un katabolisko mehānismu kopumu (Golstein and Kroemer, 2007; Festjens et al., 2006).

Augu šūnās bojājumu vai griezumu vietās novērojama strauja brūnēšana, hlorofila degradācija un šūnu nāve, ko papildina reaktīvo skābekļa atvasinājumu uzkrāšanās un palielināta elektrolītu noplūde (Lakimova and Woltering, 2018).

1.5.3. Programmētas šūnu nāves un nekrozes morfoloģisko pazīmju salīdzinājums

Šūnā programmēto nāvi un nekrozi var izraisīt eksperimentāli mainot stresa līmeni. Piemēram, vienā pētījumā burkānu šūnas tika pakļautas dažādiem siltuma stresa līmeņiem. Autori atzīmēja, ka šūnu nāve pie temperatūras līdz 55° C izraisīja protoplasta atdalīšanos no šūnu sienas. Savukārt pie temperatūras virs 55° C šīs morfoloģijas biežums ievērojami samazinājās un pie temperatūras virs 75° C šūnas gāja bojā bez citoplazmas sadalīšanas. Tas norādīja uz to, ka citoplazmas sadalīšanās ir aktīvs programmētas šūnu nāves rezultāts, nevis nekroze. Mērena temperatūra lielāki šūnu daļai izraisa programmēto šūnu nāvi, bet augstāka temperatūra izraisa šūnu nekrozi. DNS šķelšanās ir vēl viens programmētas šūnu nāves marķieris. Burkānu šūnas, kas pakļautas siltuma stresam pie 55° C temperatūras uzreiz neuzrāda DNS fragmentāciju. To var konstatēt tikai 3 – 5 stundu laikā pēc termiskās apstrādes. Savukārt nekrozes gadījumā šūnas, kas ir pakļautas augstākām temperatūrām DNS sadalās nekavējoties (Reape et al., 2008).

Lai gan šūnu programmētas nāves un nekrozes mehānismi un morfoloģija atšķiras, bieži vien šie procesi pārklājas. Programmēta šūnu nāve un nekroze atspoguļo kopīgas bioķīmiskā tīkla morfoloģiskās pazīmes, kas ir aprakstītas kā “programmētas šūnu nāves – nekrozes” nepārtrauktība. Piemēram, divi faktori, kas notiekošo apoptotisko procesu pārveido nekrotiskajā procesā, ietver kaspāžu pieejamības un intracelulārās ATF samazināšanās (Denecker et al., 2001). Dažkārt apoptozi no nekrozes nav iespējams atšķirt, jo atkarībā no stimulu intensitātes un ilguma, ATF izsūkuma pakāpes un kaspāžu pieejamības, šie procesi var notikt vienlaicīgi (Zeiss, 2003).

Programmētas šūnu nāves un nekrozes morfoloģisko pazīmju salīdzinājums (Reape et al., 2008).

Table 1.

Comparison of morphological signs of programmed cell death and necrosis (Reape et al., 2008).

Programmēta šūnu nāve	Nekroze
skar atsevišķas vai nelielas šūnu kopas	skar blakus esošās šūnas
raksturīga šūnu saraušanas	raksturīgs šūnu piebriešana
netiek bojāta šūnu membrāna	tiek bojāta šūnu membrāna
citoplazma saglabājas apoptiskajās struktūrās	citoplazma degradējās
kondensējas hromatīns un kodoli saraujas vai saplacinās	kodoli maina formu
palielinās hlorofila fluorescence	notiek hloroplastu degradācija un hlorofila koncentrācijas samazināšanās.

1.6. Anabioze

Anabioze ir organisma bioloģiska adaptācija nelabvēlīgiem ārējiem apstākļiem, kas izveidojas evolūcijas procesa rezultātā. Tas ir organisma stāvoklis, kurā uz laiku tiek apturēti vai palēnināti dzīvības procesi, piemēram, vielmaiņa līdz tādai pakāpei, ka nav redzamas dzīvības izpausmes. Anabiozi var novērot baktērijām, augu sēklām un, ja organisma pastāvēšanas dažādos dzīvības posmos pēkšņi mainās apkārtējās vides apstākļi, piemēram, pazeminoties temperatūrai vai ūdens trūkuma dēļ. Līdz ar labvēlīgo apstākļu iestāšanos, normāls dzīvības procesu līmenis tiek atjaunots un tāpēc to bieži sauc par “atdzimšanu” (*angļu val. reviviscence*) (*Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*; Uzunova – Doneva and Dones; 2004 – 2005).

1.6.1. Anabiozes veidi

Vīrusa daļiņas jeb virioni ārpus baktēriju, augu un dzīvnieku šūnām atrodas anabiozes stāvoklī, kurā viegli var izturēt atdzimšanu, žāvēšanu un citas nelabvēlīgas ietekmes. Anabioze ir plaši izplatīta arī mikroorganismu vidū. Sporas veidojošas baktērijas un mikroskopiskās sēnes ir visizturīgākās pret žāvēšanu, atdzimšanu un karsēšanu. Piemēram, Sibīrijas mēra baktērijas *Bacillus anthracis* sporas daudzus gadus spēj dzīvot gan tuksneša sausajā augsnē, gan arktiskās tundras sasalušajā augsnē. Vairākas baktērijas, kas neveido sporas ir dzīvotspējīgas pat pēc

ilgstošas atdzesēšanas. Tas, piemēram, ļauj izolēt tīras kultūras no bojāgājušiem organismiem, ko normālos apstākļos kavē cita mikroflora. Daudziem organismiem, piemēram, sēklām, sporām un cystām gandrīz pilnīga dzīvības procesu pārtraukšana ir kļuvusi par normālā attīstības cikla sastāvdaļu. Šādos apstākļos sēklu dīgtspēja tiek saglabāta vismaz 50 gadus vai ilgāk (Uzunova – Doneva and Dones; 2004 – 2005). Dažos gadījumos dīgtspēja saglabājas vairākus tūkstošus gadu (Sallon et al., 2008).

Dzīvnieku anabiozi atklāja 1701. gadā nīderlandiešu izgudrotājs Antonijs van Lēvenhuks. Ir pierādīts, ka bezmugurkaulnieki – hidras, tārpi, daži kukaiņi, jūras un sauszemes gliemji un mugurkaulnieki – abinieki un rāpuļi var izdzīvot zaudējot pusi vai pat trīs ceturtdaļas no audu šķidrums. Gauskāji ir pirmie zināmie dzīvnieki, kas izdzīvoja pēc saskarsmes ar kosmosa vakuumu un saules ultravioleto starojumu. Desmit dienu laikā gauskāji tika pakļauti kosmosa vakuuma, ultravioletā starojuma iedarbībai un – 270°C temperatūrai. Vēlāk uz Zemes vairāk nekā 68% gauskāju, kas bija pakļauti saules ultravioletam starojumam 30 minūtes tika rehidratēti. Daudzi no tiem spēja radīt dzīvotspējīgus embrijus. Gauskāji spēj ieslīgt ekstremālajā anabiozes formā. 2019. gadā zinātnieki paziņoja, ka kapsula ar gauskājiem, kas bija anabiozes stāvoklī iespējams kādu laiku varēja izdzīvot uz Mēness (Courtland, 2008; Jonsson et al., 2008).

Anabiozes parādību žāvēšanas un dzesēšanas apstākļos pielieto sausu dzīvu vakcīnu ražošanā, ilgstošai baktēriju kultūru, vīrusu un audzēja šūnu saglabāšanai, dažādu audu un orgānu saglabāšanai, piemēram, asinis, skrimšļi, kauli, asinsvadu utt., kas nepieciešami transplantācijai. (Uzunova – Doneva and Dones; 2004 – 2005).

Anabiozei ir raksturīgas sekojošas pazīmes – metabolisma neesamība vai samazināšanās, struktūras saglabāšana ilgu laiku, brīvā ūdens kā pastāvīgās barotnes šķidrās fāzēs neesamība, paaugstināta izturība pret ekstremāliem apstākļiem, spēja atgūt dzīvībai svarīgas funkcijas (Uzunova – Doneva and Dones; 2004 – 2005).

1.6.2. Anabiozi izraisošie faktori

Divdesmitā gadsimta sākumā parādījās apstākļi mikroorganismu saglabāšanas metožu izstrādei. Galvenokārt tos varēja iedalīt divās grupās. Pirmās grupas mērķis tika virzīts uz šūnu vitalitātes samazināšanu līdz minimumam jeb hipobiozes stāvoklim, ko sauc par “šūnu miera stāvokli”. Otrās grupas mērķis – mikroorganismu virzīšana uz anabiotisko stāvokli, piemēram, žāvēšana, sasaldēšana zemā temperatūrā un liofilizācija (Uzunova – Doneva and Dones; 2004 – 2005).

Žāvēšana ir kultūru saglabāšanas metode, kas imitē dabiskos apstākļus. Lai nonāktu anabiozē, tā ir balstīta uz mikroorganismu dabiskām īpašībām. Smiltis, augsne, dubļi, aktīvā

ogle, zāģēšanas putekļi, sintētiskas bumbiņas un tabletes, polimēru matrica, materiāli ar augstu dispersiju un filtrpapīrs tiek izmantoti kā mikroorganismu nesēji. Liela nesēja virsma adsorbē mitruma daļu. Žāvēšanu veic istabas temperatūrā vai karsējot 36 – 40° C temperatūrā. Četrdesmitajos gados M. Litvinovs veica plašus pētījumus par raugu šūnu saglabāšanu, žāvējot *S. cerevisiae* sugas. Žāvēšana tika veikta eksikatorā uz filtrpapīra vai stikla, izmantojot vakuumu 18 mmHg un žāvējot 25 – 32° C temperatūrā kalcija – hlorīda klātbūtnē. Šādu konservēšanas metodi plaši pielieto maizes raugiem un alus darītavās (Uzunova – Doneva and Dones; 2004 – 2005).

Sasaldēšana līdz – 196° C temperatūrā šķidrā slāpekļī vai slāpekļa tvaikos lielākai daļai kultūru ir galvenā konservēšanas metode. Šādā veidā tiek saglabātas aktinomicētes, baktērijas, raugi, sēnītes, augu un dzīvnieku vīrusi un šūnu kultūras. Sēnēm optimālais atdzišanas ātrums ir 1° C min⁻¹, baktērijām un aktinomicētēm 2 – 45° C min⁻¹. Divdesmitajā gadsimtā 60. gados *Maussori* veica raugu sasaldēšanas eksperimentus ar dažādām ātruma līknēm, ieskaitot 6° C min⁻¹ (Donev, 2001). Šis process sastāv no sekojošiem posmiem – materiāla sasaldēšanas līdz zema jeb eitektiskai temperatūrai, primāras žāvēšanas, kad ledus kristālus sublimē zem sistēmā padotās siltuma enerģijas vakuumā apstākļos un sekundārās žāvēšanas, kad pēc ledus atdalīšanas palikušais materiāla mitrums tiek desorbēts maksimāli dziļā vakuuma apstākļos (Uzunova – Doneva and Dones; 2004 – 2005).

1.6.3. Dehidratācija un rehidratācija

Dehidratācijas laikā augu šūnām piemīt spēja sarauties, kas norāda uz labu elastības pakāpi. Augiem, kuriem ir palielināta izturība pret izzūšanu tā ir vitāli svarīga īpašība (Jones and McQueen – Mason, 2004).

Augi saskaroties ar ierobežotu ūdens piegādi veic pasākumus, lai samazinātu ūdens zudumus un tādējādi aizkavētu metabolos un šūnu bojājumus, ko var radīt ūdens nepietiekamība. Augi slēdz lapās esošās atvārsnītes, aizkavē augšanas reakcijas uz hormonu abscizskābi, kas palielinās līdz brīdim, kad ūdens trūkums augam kļūst potenciāli bīstams (Wilkinson and Davies, 2002).

Augos šūnu sienas izturību nosaka gan sienas pamatstruktūra, gan sienas modificējošo olbaltumvielu, piemēram, ekspansīnu aktivitāte. Ekspansīni ir olbaltumvielu grupa, kam ir būtiska loma augu fizioloģisko procesu nodrošināšanā. Ekspansīnu darbības mehānisms ir saistīts ar nekovalento saišu pārrāvumu starp šūnas sienas polisaharīdiem (Jones and McQueen – Mason, 2004). Lai pārvarētu izzūšanas stresu daži augi visos veģetatīvajos audos demonstrē ārkārtēju panesamības pakāpi. Dažu stundu laikā, kad ūdens kļūst pieejams augi spēj rehidratēties un atjaunot metabolisma aktivitāti (Scott, 2000).

Ķērpju ekoloģijā ūdenim ir būtiska loma, jo pamatfunkcijas nosaka tallusa hidratācijas pakāpe. Daži ķērpji spēj ātri pāriet no aktīvas dzīves mitra stāvokļa uz palēninātas dzīves sauso stāvokli un otrādi. To sauc par “atdzimšanas” fenomenu. Sausā stāvoklī ūdens saturs svārstās no 15 līdz 20% no sausnas svara, savukārt mitrā stāvoklī ūdens saturs var sasniegt 200 – 350%. Visaugstākais ūdens saturs ir želejveida tallusa ķērpjiem, sasniedzot līdz pat 3500% no sausnas svara. Mērcēšana ūdenī aizņem no 1 līdz 2 minūtēm, savukārt tvaiku absorbcija ir lēnāka un dažreiz prasa vairākas nedēļas. Un otrādi – dehidratācija notiek ļoti ātri. Ķērpji ar tallusu, kas veidojās sēņu un aļģu simbiozes rezultātā ir izturīgi pret dehidratāciju un to ūdens saturs krasi mainās, atkarībā no apkārtējās vides (Nascimbene and Nimis, 2006; Asta, 2020).

Pret dehidratāciju izturīga sūna *Bryum argenteum* kļuva par svarīgu organisma paraugu, lai izprastu augu veģetatīvās dehidratācijas tolerances molekulāros, strukturālos un ekoloģiskos aspektus. Sūnas, kas ir izturīgas pret dehidratāciju spēj pilnībā izzūt un pēc rehidratācijas atsākt normālu darbību (Bei et al., 2017).

Rehidratācija ir process, kura laikā tiek atjaunotas auga izejvielu īpašības, kad dehidratēts auga materiāls nonāk saskarē ar ūdeni (An et al., 2013). Rehidratācijas process tiek veikts, dehidratēto augu mērcējot ūdenī (Garcia – Pascual et al., 2005). Rehidratācijas pakāpe ir atkarīga no strukturālo un šūnu darbības traucējumu pakāpes (Krokida and Marinos – Kouris, 2003).

Dehidratēto augu rehidratācijas īpašības izmanto kā kvalitātes rādītāju, kas var norādīt vai dehidratācijas laikā ar auga materiālu ir notikušas fizikālās vai ķīmiskās izmaiņas. Fizikālās un ķīmiskās izmaiņas, kas notiek dehidratācijas laikā ietekmē tā augu materiālu kvalitāti, ka pat pievienojot ūdeni, nevar atjaunot izejvielu īpašības (Okpala and Ekechi, 2014).

1.6.4. Šūnu dzīvotspējas pierādīšana ar propīdija jodīdu

Lai pārbaudītu šūnu dzīvotspējas atjaunošanos, šūnas krāso ar propīdija jodīdu. Propīdija jodīts iekļūst šūnās ar bojāto plazmatisko membrānu un saistās ar nukleīnskābēm (DNS un RNS). Nebojātās šūnās krāsviela neiekļūst. To plaši izmanto augu un dzīvnieku šūnu dzīvotspējas noteikšanai (Coskun et al., 2012).

1.7. Augu mikroairošana un audu kultūras

Viena no jaunākajām augu pavairošanas metodēm ir mikropavairošana, kuru veic sterilos laboratorijas apstākļos izmantojot nelielas auga audu daļas, piemēram, meristēmas, kallusa embrijus, putekšņīcas utt. Nelielus auga fragmentus ievieto sterilā MS barotnē ar augu hormoniem, kas stimulē kallusa audu augšanu (Murashige et al., 1962). No kallusa audiem var izaugt jauns stādījums. Šo metodi pielieto, lai īsā laika periodā izaudzētu pēc iespējas vairāk jauno augu, kā arī, lai pavairotu ģenētiski modificētos augus, izmantojot parastās augu

selekcijas metodes (Pūtaiao, 2013; Sorensen, 2019). Nelielu augu audu daļu novieto augšanas barotnē, kas satur saharozi kā enerģijas avotu un vienu vai vairākus augu augšanas hormonus. Barotni sabiezina ar agaru, veidojot želeju, kas audzēšanas laikā uztur eksplantu. Pēc augu audu ieviešanas un augšanas, izveidošanas posmam seko pavairošana. Vienu eksplanta paraugu var palielināt no viena līdz simtiem un tūkstošiem augu, atkārtojot šī procesa ciklus. Atkarībā no audzēto audu veida pavairošana var ietvert dažādas metodes un barotnes. Ja stādāmais materiāls ir kallusa audi, tad tos var ievietot smalcinātājā, sagriezt mazākos gabaliņos un atkārtoti kultivēt uz tādas pašas barotnes, lai izaudzētu vairāk kallusa audu. Ja audus audzē stādu veidā, tad pievieno hormonus, kuru rezultātā tie veido daudz jaunu dzinumu. Pēc vairāku dzinumu veidošanās tos ievieto sakņu barotnē ar augstu augsni un citokīnu attiecību (Chandana et al., 2018; Ramchandra et al., 2017).

Mikropavairošanā izmanto augu veidotājaudus, piemēram, meristēmu kultūras, kallusa kultūras, suspensiju kultūras, embriju kultūras vai no lapām iegūtu protoplastu kultūras. Meristēmu kultūrā meristēmu un dažas lapas ievieto tam piemērotā augšanas vidē. Pēc dažām nedēļām veidojas iegarens sakņaugšs un pēc noteikta augstuma sasniegšanas augs tiek ievietots augsnē. Pielietojot šādu metodi var iegūt veselo augu bez slimībām. Šo metodi var izmantot ātrai augu pavairošanai, piemēram, cukurniedru vai zemeņu pavairošanai (Ramchandra et al., 2017; Gorakh et al., 2017).

Atsevišķa mikropavairošanas metožu grupa ir "šūnu kultūras". Pie suspensijas kultūrām attiecinā izkļiedētas šūnas vai šūnu grupas, kas aug gāzētā un šķidrā barotnē, un kurām pievieno sabalansēto hormonu devu (Chandana et al., 2018).

Protoplastu kultūrā augu šūnu var izolēt ar sienu noārdošo enzīmu palīdzību un augšanai piemērotā barotnē augu stādījumu atjaunošanas apstākļos. Piemērotos apstākļos protoplasti izveido šūnas sienu, kam seko šūnu dalīšanās un diferenciacijas palielināšanās, pārveidojoties jaunajā augā. No sākuma protoplastu kultivē šķidrā barotnē no 25 līdz 28° C temperatūrā ar gaismas intensitāti no 100 līdz 500 luksiem vai tumšā vietā un pēc šūnu dalīšanas tos ievieto cietā barotnē (Chandana et al., 2018).

Lai pārbaudītu, vai dehidratētu paraugu šūnas ir anabiozē, ir nepieciešams tās rehidratēt un ievietot apstākļos, kuri atbilst augu veģetatīvai pavairošanai ar audu kultūru metodi. Rehidratācijas procesā augu lapu šūnām atgriezīsies fizioloģiskā aktivitāte un būs novērojama cilmes šūnu proliferācija.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Izmantotie pētījuma objekti.

- Zemnieku saimniecībā 2019. gadā jūnijā ievākti svaigi augi – sarkanais āboliņš (*T. pratense*), Moldāvijas pūķgalve (*D. moldavica*), šaurlapu ugunspuķe (*Ch. angustifolium*).
- Zemnieku saimniecībā kultivētas, rūpnieciski žāvētas un uzglabātas (ražošanas procesā iegūtas) sarkanā āboliņa (*T. pratense*), Moldāvijas pūķgalves (*D. moldavica*), šaurlapu ugunspuķes (*Ch. angustifolium*) 2018. un 2019. gada tējas drogas.

2.2. Pētījuma shēma

- Augu drogu pagatavošana
- Preparātu sagatavošana
- Augu drogu mikroskopēšana
- Lapu drogu kultivēšana anabiozes pārbaudei

Lai validētu mikroskopisko metožu atbilstību, pētījumā tika izmantotas vairākas pozitīvās un negatīvās kontroles.

Negatīvā kontrole – svaigi augi, 22°C un 45°C temperatūrā dehidratēti paraugi (*T. pratense*, *D. moldavica*, *Ch. angustifolium*). Paredz neizmainītas šūnu morfoloģiskās un fizioloģiskās pazīmes, kas raksturīgas konkrētajai sugai:

- lapu epidermai atbilstošs kodolu un hloroplastu lielums un forma;
- nebojāta plazmatiskā membrāna/bojājuma gadījumā krāsojas kodols un citoplazma;
- minimāla hlorofila fluorescence.

Pozitīvā kontrole – 120°C dehidratēti paraugi (*T. pratense*, *D. moldavica*, *Ch. angustifolium*), *T. pratense* dzeltējošas lapas, PVO rekomendācijām atbilstoši dehidratētas un neatbilstoši uzglabātas *T. pratense* lapas: uzglabātas 24 mēnešus, uzglabātas novembrī 30 dienas ārā (mitrumā), uzglabātas 6 mēnešus 20% gaisa relatīvajā mitruma režīmā laboratorijas apstākļos. Paredz programmētai šūnu nāvei un nekrozei līdzīgas pazīmes.

Pārbaudāmie paraugi – ražošanas procesā iegūtas 2018. gada un 2019. gada tējas drogas.

2.2. Augu materiāls

Pētījumā tika izmantotas sarkanā āboliņa (*T. pratense*), Moldāvijas pūķgalves (*D. moldavica*) un šaurlapu ugunspuķes (*Ch. angustifolium*) drogas:

- svaigas *T. pratense* lapas un ziedi;
- svaigas *Ch. angustifolium* lapas un ziedi;

- svaigas *D. moldavica* lapas un ziedi;
- *T. pratense* lapas un zieda fragments dehidratēts – 22°C; 45°C un 120°C temperatūrā;
- *T. pratense* lapas un zieda fragments uzglabāts – 24 mēnešus, novembrī 30 dienas ārā (mitrumā), 6 mēnešus 20% gaisa mitruma režīmā, dzeltējošs;
- *Ch. angustifolium* lapas un zieda fragments dehidratēts – 22°C; 45°C un 120°C temperatūrā;
- *Ch. angustifolium* lapas fragments dehidratēts 22°C, 45°C un 120°C temperatūrā un kultivēts 72h MS barotnē;
- *Ch. angustifolium* 2019. g. lapu drogas kultivētas 72h MS barotnē;
- *D. moldavica* lapas un zieda fragments dehidratēts – 22°C; 45°C un 120°C temperatūrā;
- ražošanas procesā iegūtas 2018. un 2019. gada *T. pratense* tējas drogas;
- ražošanas procesā iegūtas 2018. un 2019. gada *Ch. angustifolium* tējas drogas;
- ražošanas procesā iegūtas 2018. un 2019. gada *D. moldavica* tējas drogas;

2.3. Materiāla sagatavošana

2.3.1. Dehidratācija

PVO vadlīnijām atbilstošu augu paraugi (lapu un ziedu gabaliņi, kuru izmērs nepārsniedz 2x2 mm) tika novietoti Petri traukos uz filtrpapīra. Tie tika žāvēti:

- a) 22°C temperatūrā, 20% gaisa mitrumā, tumsā 1 nedēļu un uzglabāti istabas temperatūrā;
- b) 45°C temperatūrā 2h ar gaisa plūsmu, izmantojot žāvēšanas iekārtu (*Environmetal shakerincubator ES 20, Biosan*) un uzglabāti istabas temperatūrā;
- c) 120°C temperatūrā 1h, izmantojot termostatu un uzglabāti istabas temperatūrā;

2.3.2. Rehidratācija

No katra varianta 3 paraugi tika ievietoti Petri traukos ar krāna ūdeni un rehidratēti 2 h istabas temperatūrā.

2.3.3. Mikroskopisko preparātu sagatavošana

Mikroskopēšanai tika ņemti svaigu augu, rehidratētu augu un 72h MS vidē kultivēti paraugi.

- Hloroplastu hlorofila fluorescences pārbaudei paraugi tika novietoti uz priekšmetstikla ūdens vidē (20 µl), pārsegti ar segstiklu un apskatīti mikroskopā, izmantojot eļļas imersiju.
- Membrānu caurlaidības pārbaudei paraugi tika novietoti uz priekšmetstikla PI šķīdumā (20 µl, 50 µM), krāsoti 10 min, pārsegti ar segstiklu un apskatīti mikroskopā, izmantojot eļļas imersiju.

- Šūnu morfoloģijas pārbaudei paraugi tika 30 min fiksēti 70% etanola šķīdumā centrifugācijas stobriņos (1,5 ml). Ar elektronmikroskopisko paraugu pārvietošanai paredzēto pinceti paraugi tika pārvietoti uz priekšmetstiklu un tika nogriezti 1mm gari gabaliņi. Paraugu krāsošanai tika uzpilināti 10 µl PI un krāsoti 10 min. Paraugi tika pārsegti ar segstiklu un apskatīti mikroskopā, izmantojot eļļas imersiju.

2.3.4. Mikroskopēšana

Mikroskopēšanai tika izmantots mikroskops *Leica DM-RA2* ar konfokālo sistēmu *Leica TCS-SL*. Tika izmantots objektīvs HCX PL APO CS 100.0 x1.40 OIL PH. Uz mikroskopa digitālā staru sadalītāja tika izvēlēta pozīcija DD 488/543.

Mikroskopēšana atstarotā gaismā tika ierosināta ar 488 nm argona lāzeri (jauda 40%), signāls tika uztverts diapazonā 480-500 nm.

Hlorofila fluorescence tika ierosināta ar 488 nm argona lāzeri (jauda 40%), hlorofila fluorescence tika uztverta diapazonā 680-710 nm (pastiprinājums 960).

PI fluorescence tika ierosināta ar 488 nm argona lāzeri (jauda 40%), PI fluorescence tika uztverta diapazonā 600-650 nm (pastiprinājums 960).

Autofluorescence tika ierosināta ar 488 nm argona lāzeri (jauda 40%), autofluorescence tika uztverta diapazonā 510-570 nm (pastiprinājums 960).

Attēli tika skanēti pa xyz asi, izvēloties optimālu parauga biezumu atkarībā no šūnu izmēriem. Optisko griezumu skaits tika izvēlēts tā, lai tā biezums nepārsniegtu 500 nm. Attēlu izšķirtspēja bija 1024x1024 punkti. Digitālais palielinājums bija robežās no 1 – 4 x.

Šūnu, kodolu un hloroplastu lielums, kā arī fluorescences intensitāte tika mērīta attēlos, izmantojot datorprogrammu (*Leica confocal Software*). Pēc tam tika izveidota morfoloģiska attēlu datu bāze. Par katru attēlu tika uzkrāta informācija – par dziļumu paraugā, lāzeru intensitāti, emisijas diapazonu, gaismas filtriem, optisko griezumu izmēriem, biezumu un skaitu. Attēlos tika spektrofotometriski noteikta relatīvā hlorofila fluorescence. Katrs no paraugiem tika pilnībā pārskatīts vai ir redzamas izteiktas morfoloģiskas atšķirības. Tika izvēlētas vismaz trīs dažādas vietas attēlu saglabāšanai datu bāzē. Katram eksperimenta variantam tika iegūti vismaz 500 attēli. Katrā variantā tika apskatīti trīs dažādi paraugi un vismaz trīs dažādās parauga zonās. Katrā variantā tika kontrolēta – hlorofila fluorescence ūdens vidē, propīdija jodīda caurlaidība ūdens vidē, fiksētie paraugi ar propīdija jodīda iekrāsotas šūnas.

2.3.5. Anabiozes stāvokļa pārbaude 72 h MS barotnē

Lapas tika 1h rehidratētas krāna ūdenī, Petri traukos. Uz filtrpapīra sterilos apstākļos izgriezti 3 paraugi 5x5 mm. Paraugi tika ievietoti Petri traukos un kultivēti 72h 25°C

temperatūrā MS bazālā barotnē ar Gamborga vitamīniem (*Sigma, M0404*). Tumsas un gaismas režīms bija $0\text{W}/\text{m}^2$ un $0,5\text{W}/\text{m}^2$. Tika novērtētas paraugu morfoloģiskās pazīmes un šūnu dzīvotspēja līdzīgi iepriekš aprakstītajām.

2.4. Datu apstrādes metodes

Maģistra darbam tika apstrādāti un analizēti attēli no konfokālā lāzerskenējošā mikroskopa (*Leica confocal Software*) un tika izveidota morfoloģiska datu bāze. Katrs attēls ir viens optiskais griezumus vienā krāsu kanālā vai arī rediģēts (krāsu kodētas 3D projekcijas) attēls. No mikroskopa iegūtie spektrofotometriskie dati tika apstrādāti ar *Microsoft Excel* programmu un atspoguļoti diagrammas un tabulas veidā. Kā arī darbā tika noteikts rezultātu būtiskuma līmenis (rezultātus atzina par statistiski nozīmīgiem, ja rādītājs $p < 0,05$).

2.5. Drogu kvalitātes novērtēšanas metodes

- Svaigu un rehidratētu paraugu hloroplastu hlorofila fluorescences noteikšana un novērtēšana.
- Svaigu un rehidratētu paraugu šūnu dzīvotspējas noteikšana izmantojot PI krāsojumu.
- Hloroplastu un kodolu morfoloģisko pazīmju izmantošana programmētās šūnu nāves un nekrozes (šūnu dzīvotspējas) novērtēšanā.
- Lapu rehidratācijas metode (apstākļi cik ilgā laikā (2h)) un kādā vidē (ūdens vidē istabas temperatūrā) un kādā izmērā gabaliņi).
- Kultivēšanas ilgums 48-96 h un optimāls MS barotnes sastāvs.
- Optimālie mikroskopēšanas parametri fluorescentā signāla novērtēšanai.

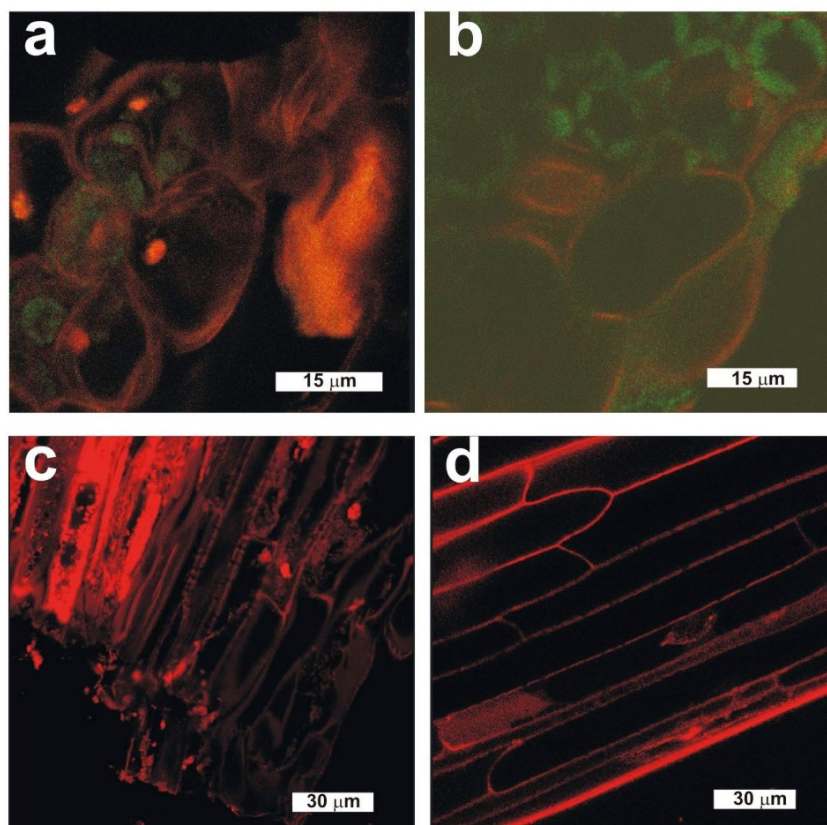
3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI

Maģistra darba ietvaros visos eksperimenta variantos ir analizēti 6089 attēli, kurus ieguva izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu. Attēlu un iegūto datu apkopojums ir atspoguļots darbā.

3.1. Svaigu *T. pratense*, *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums

Visām trim sugām lapu šūnās novēroja apaļus un eliptiskus kodolus ar diametru no 4 līdz 6 μm . Eihromatīna klātbūtne novērojama visos trīs paraugos (3. att. b, 1. pielikums b, 2. pielikums b). *Ch. angustifolium* paraugu kodolos bija raksturīgi arī kodoliņi. Visās trīs sugās epidermas šūnās konstatēja sīkus un eliptiskus hloroplastus ar diametru 2 μm . Parenhīmas šūnās hloroplasti bija lēcveidīgi un to diametrs bija no 4 līdz 6 μm (3. att. a, 1. pielikums a, 2. pielikums a). Svaigu lapu šūnu plazmatisko membrānu propīdija jodīds nebija šķērsojis (3. att. a, 1. pielikums a, 2. pielikums a). Tāpēc citoplazma un kodoli nav nokrāsojušies. Krāsojums bija redzams vienīgi šūnu sienīnās vai arī mehāniski pārgrieztās šūnās.

T. pratense un *Ch. angustifolium* ziedu vainaglapu šūnās novēroja apaļus un eliptiskus kodolus ar diametru no 5 līdz 6 μm (3. att. c, 2. pielikums c). *D. moldavica* paraugā kodolam bija saplacināta, trīsstūrveida forma ar diametru no 5 līdz 6 μm (1. pielikums c). Visos gadījumos kodolos bija redzams mazs eihromatīna laukums. Svaigu ziedu vainaglapu šūnās propīdija jodīds nebija iekļuvis. Krāsojumu redzēja griezuma vietā (3. att. d, 1. pielikums d, 2. pielikums d).



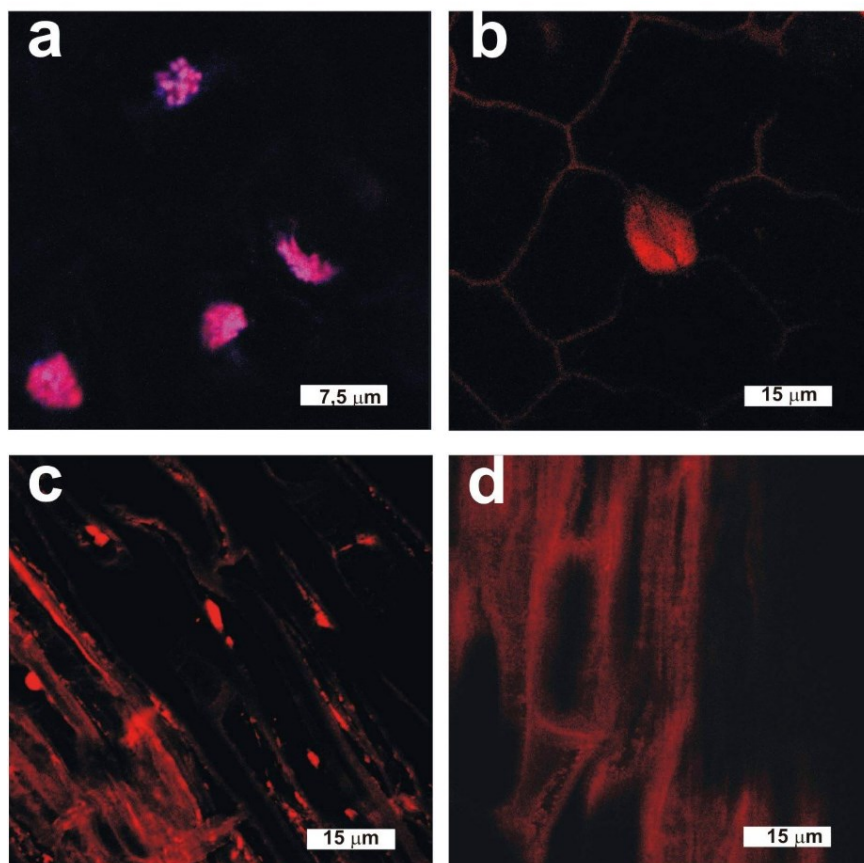
3. attēls. Svaigu *T. pratense* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d – nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas. Zaļš krāsojums – hlorofila autofluorescence, sarkans krāsojums – PI.

Figure 3. Morphological characteristics of fresh *T. pratense* plant leaf and flower petal cells: a - fixed leaf cells, b - non-fixed leaf cells, c - fixed flower petal cells, d - non-fixed flower petal cells. Green color - chlorophyll autofluorescence, red color - PI.

3.2. 22°C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums

Divām sugām lapu šūnās konstatēja apaļus kodolus ar diametru no 3 līdz 5 μm (3. pielikums a, 4.pielikums a). Atsevišķos *T. pratense* kodolos novēroja proliferāciju, to kodolu forma nebija apaļa un diametrs variēja no 3,5 līdz 4,5 μm (4.att. a). No visām trim sugām tikai *T. pratense* lapu šūnu kodolos visbiežāk konstatēja eihromatīnu (4. att. a). *T. pratense* lapu šūnās hloroplastiem bija vājāka fluorescences un tos bija grūti saskatīt, toties parējās divās sugās varēja redzēt neskaidras formas hloroplastus (4.att. a, 3. pielikums a, 4.pielikums a). Visu trīs sugu 22°C temperatūrā dehidratētu lapu šūnu plazmatiskajā membrānā propīdija jodīds nebija iekļuvis. Tāpēc šūnas un citoplazma nav bijusi nokrāsota, propīdija jodīda krāsojumu novēroja vienīgi mehāniski pārgrieztajās šūnās (4. att. b, 3. pielikums b, 4. pielikums b).

T. pratense ziedu vainaglapu šūnās varēja redzēt gan apaļus, gan gareniskos kodolus ar diametru no 5 līdz 7 μm (4. att. c). *D. moldavica* ziedu šūnās kodoli bija apaļi un to diametrs bija 5 μm (3. pielikums c). *Ch. angustifolium* ziedu šūnās kodoli bija trīsstūrveida ar diametru no 4 līdz 6 μm (4. pielikums c). Visās trīs sugās ziedu vainaglapu šūnās nebija konstatēts eihromatīns un nebija redzami membrānas bojājumi, jo propādijs jodīds nebija to šķērsojis.



4. attēls. 22° C temperatūrā dehidratētu un 2 h rehidratētu *T. pratense* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas. Sarkans krāsojums – PI.

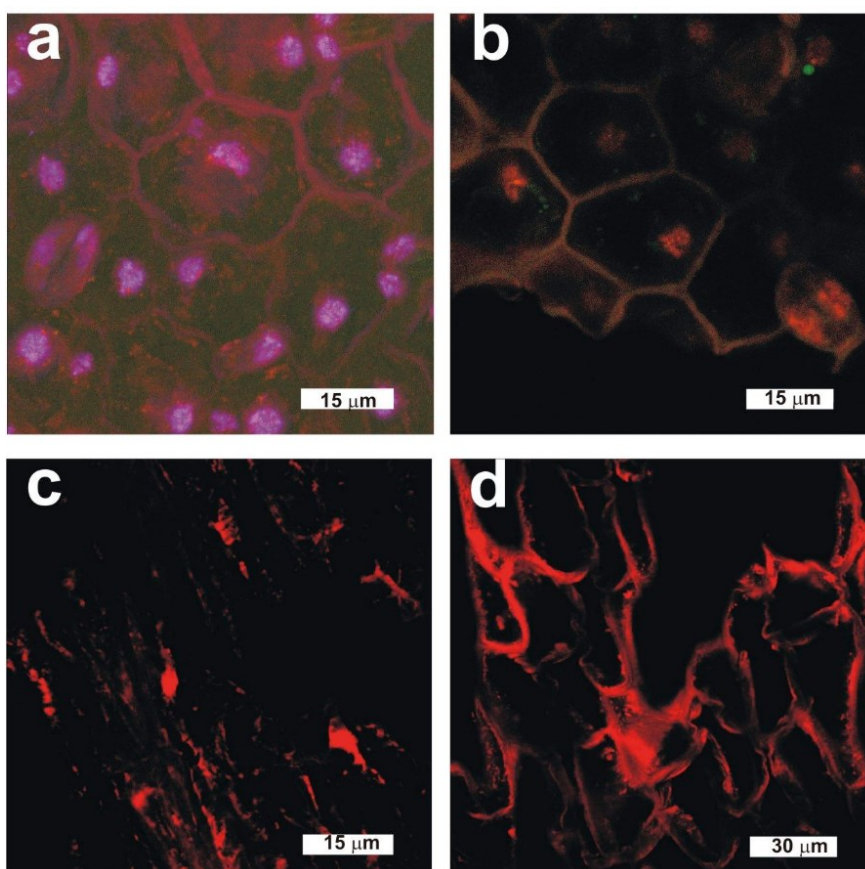
Figure 4. Morphological characteristics of leaves and flower petals of *T. pratense* dehydrated and rehydrated for 2h at 22° C: a - fixed leaf cells, b - non-fixed leaf cells, c - non-fixed flower petal cells, d – non-fixed flower petal cells. Red color - PI.

3.3. 45° C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums

Visām trim sugām bija redzami apaļi kodoli ar diametru 6 μm (5. att. a, 5. pielikums a, 6. pielikums a). *T. pratense* un *D. moldavica* kodolos novēroja eihromatīnu (5. att. b, 5. pielikums b). Visu trīs sugu lapu šūnās konstatēja hloroplastus, kuru diametrs variēja no 4 līdz 6 μm (5. att. b, 5. pielikums b, 6. pielikums b). Visu trīs sugu lapu šūnu plazmatiskajā membrānā un

citoplazmā propīdija jodīds nebija iekļūvis. Propīdija jodīda krāsojumu varēja redzēt tikai lapu šūnu griezumā vietā.

T. pratense ziedu vainaglapu šūnās bija redzami slikti rehidratēti un bezformas kodoli ar diametru no 6 līdz 7 μm (5. att. c). *D. moldavica* ziedu šūnās novēroja izstieptas formas kodolus, kuru diametrs bija 7 μm un *Ch. angustifolium* ziedu šūnās konstatēja apaļus kodolus ar 5 μm diametru (5. pielikums c un 6. pielikums c). Membrānas un citoplazmas bojājumus novēroja *T. pratense* ziedu vainaglapu šūnās, jo dažās no tām bija iekļūvis propīdija jodīds (5. att. d). Savukārt pārējo divu sugu ziedu vainaglapu šūnu plazmatisko membrānu un citoplazmu propīdija jodīds nebija šķērsojis (5. pielikums d un 6. pielikums d).



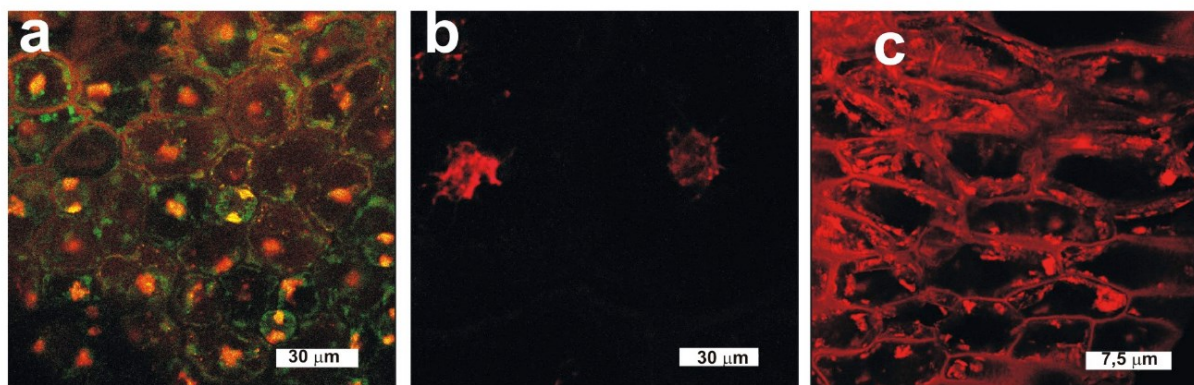
5. attēls. 45° C temperatūrā dehidratētu un 2 h rehidratētu *T. pratense* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas. Sarkans krāsojums – PI.

Figure 5. Morphological characterization of leaf and flower petal cells of *T. pratense* dehydrated and rehydrated for 2h at 45° C: a - fixed leaf cells, b - non-fixed leaf cells, c - fixed flower petal cells, d – non-fixed flower petal cells. Red color – PI.

3.4. 120°C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums

Visām trim sugām lapu šūnās bija redzami kodoli ar asām un robainām malām. Kodoli bija izplūduši un to diametrs variēja no 5 līdz 7 μm . Neraugoties uz rehidratāciju, citoplazmā saglabājās lieli organoīdu agregāti. (6. att. a un b, 7. pielikums a, 8. pielikums a). Visu trīs sugu lapu šūnās eihromatīns un atsevišķi hloroplasti nebija redzami. *T. pratense* un *D. moldavica* lapu šūnās atsevišķās vietās novēroja neskaidrus un degradētus hlorofila sakopojumus (6. att. a, 7. pielikums a). Visām trim sugām lapu šūnās konstatēja citoplazmas un plazmatiskās membrānas bojājumus, jo šūnās iekļuva propīdija jodīds, kurš tās iekrāsoja (6. att. a, 7. pielikums a un 8. pielikums a).

T. pratense ziedu vainaglapu šūnās novēroja lielus trīsstūrveida kodolus, kuru diametrs bija 7 μm (6. att. c). *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* ziedu vainaglapu šūnās varēja redzēt nenoteiktas formas kodolus ar 5 μm diametru (7. pielikums b un 8. pielikums b). Atsevišķās *D. moldavica* ziedu vainaglapu šūnās konstatēja sīkus, nenoteiktas formas hloroplastu sakopojumus (7. pielikums b). Propīdija jodīds bija šķērsojis visu trīs sugu ziedu šūnas, jo iekrāsojās to plazmatiskā membrāna un citoplazma (6. att. c, 7. pielikums b un 8. pielikums b).



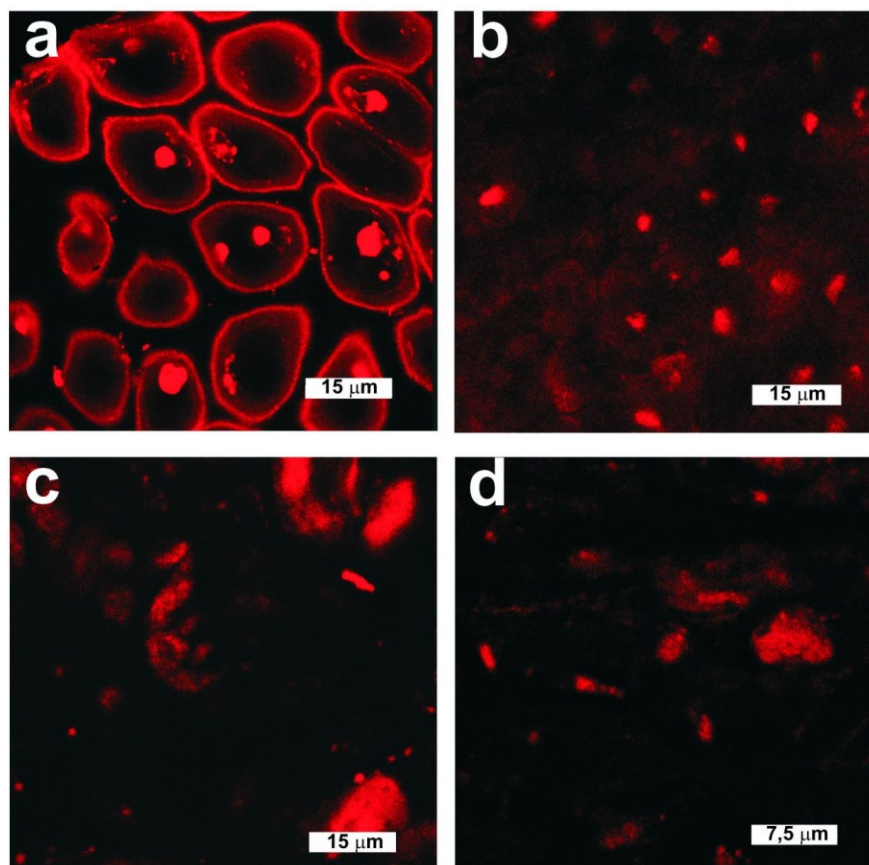
6. attēls. 120° C temperatūrā dehidratētu un 2 h rehidratētu *T. pratense* augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a – fiksētas lapas šūnas, b – fiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas. Zaļš krāsojums – hlorofila autofluorescence, sarkans krāsojums – PI.

Figure 6. Morphological characteristics of leaves and flower petals of *T. pratense* plants dehydrated and rehydrated for 2h at 120° C: a - fixed leaf cells, b - fixed leaf cells, c - fixed flower petal cells. Green color - chlorophyll autofluorescence, red color - PI.

3.5. PVO vadlīnijām neatbilstoši uzglabāto un dzeltējošo *T. pratense* lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums

T. pratense lapu šūnās, kas bija PVO rekomendācijām neatbilstoši uzglabātas 24 mēnešus un 30 dienas ārā novembrī, novēroja dažādas formas samazinātus kodolus ar asām un

robainām malām (7. att. a un b). Kodolu diametrs variēja no 3 līdz 5 μm . Turklāt lapu šūnās, kas bija uzglabātas 24 mēnešus varēja novērot programmēto šūnu nāvi un nekrozi, t.i. saplacinātus kodolus un kodolus ar bojātu struktūru. Dzeltējošās un uzglabātas 6 mēnešus 20% gaisa relatīvajā mitrumā lapu šūnās novēroja sīkus, apaļus un gareniskos kodolus, kuru diametrs bija no 2 līdz 4 μm (7. att. c un d). Rehidratācijas laikā visos *T. pratense* paraugos lapu krāsa nomainījās no zaļas uz brūnu krāsu, bija notikusi nekroze. Nevienā neatbilstoši uzglabātā paraugā nebija redzams eihromatīns. Lapu šūnās, kas bija uzglabātas 24 mēnešus nevarēja saskatīt hloroplastus (7. att. a). Savukārt lapu šūnās, kas bija neatbilstoši uzglabātas 30 dienas ārā, dzeltējošās un uzglabātas 6 mēnešus 20% gaisa relatīvajā mitrumā varēja konstatēt nelielus un nenoteiktas formas hloroplastu – gerontoplastu sakopojumus (7. att. b, c un d). Visās PVO rekomendācijām neatbilstoši uzglabātās un dzeltējošās lapu šūnās varēja novērot citoplazmas un plazmatiskās membrānas bojājumus, jo visās šūnās bija iekļūvis propīdija jodīds un iekrāsoja nefiksēto šūnu kodolus.



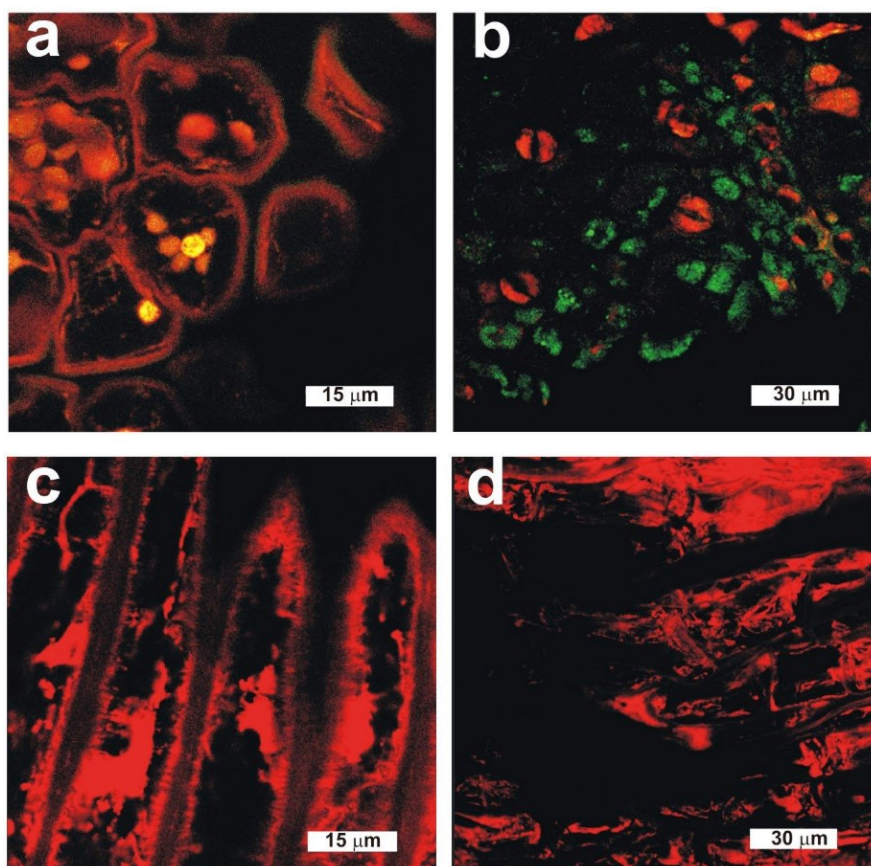
7. attēls. PVO rekomendācijām neatbilstoši uzglabāto un dzeltējošo *T. pratense* lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a – 24 mēnešus uzglabātas fiksētas lapas šūnas (2016.g.), b – uzglabātas 30 dienas ārā zem jumta nefiksētas lapas šūnas, c – dzeltējošas nefiksētas lapas šūnas, d – uzglabātas 6 mēnešus 20% mitrumā nefiksētas lapas šūnas. Sarkans krāsojums – PI. Figure 7. Morphological characterization of *T. pratense* leaf cells stored and yellowing in violation of WHO guidelines: a - fixed leaf cells stored for 24 months, b - leaf cells unopened

for 30 days outdoors, c - yellowing non-fixed leaf cells, d - stored for 6 months at 20% moisture-free leaf cells. Red color – PI.

3.6. 2018. gada *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums

Visām trim sugām tējas lapu šūnās bija redzami apaļas formas lieli kodoli, kuru diametrs bija no 5 līdz 7 μm (8. att. a, 9. pielikums a un 10. pielikums a). Visām trim sugām tējas lapu šūnās novēroja eihromatīna klātbūtni. *T. pratense* tējas lapu šūnās varēja saskatīt lielus eliptiskus un lēcveida hloroplastus ar diametru no 7 līdz 9 μm (8. att. b). *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* tējas lapu šūnās bija vērojami neskaidras formas atsevišķi hloroplastu agregāti ar diametru no 4 līdz 6 μm (9. pielikums b, 10. pielikums b). Atsevišķās *T. pratense* tējas lapu šūnās iekļuva propīdija jodīds, jo bija nokrāsojusies citoplazma, šūnas sienas un daži kodoli (8. att. b). Propīdija jodīds bija šķērsojis *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* visu tējas lapu šūnu plazmatisko membrānu un citoplazmu, jo tajās iekrāsojās kodoli (9. pielikums b un 10. pielikums b).

T. pratense tējas ziedu vainaglapu šūnās saskatīja nenoteiktas formas kodolus ar asām malām un to izmērs bija 7 μm . Kodolos bija redzamas programmētās šūnu nāves pazīmes (8. att. c). *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* tējas ziedu vainaglapu šūnās novēroja apaļas formas kodolus ar robainu malu. Kodolu diametrs variēja no 4 līdz 7 μm (9. pielikums c un 10. pielikums c). *T. pratense* ziedu vainaglapu šūnās nebija šķērsojis propīdija jodīds, tāpēc citoplazma un kodoli nebija nokrāsoti. Krāsojumu vareja redzēt tikai šūnu sienās vai mehāniski pārgrieztajās šūnās (8. att. d). *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* ziedu vainaglapu šūnu kodoli, citoplazma un plazmatiskā membrāna bija nokrāsota, jo šūnās iekļuva propīdija jodīds (9. pielikums d un 10. pielikums d).



8. attēls. 2018. g. *T. pratense* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d – nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas. Zaļš krāsojums – hlorofila autofluorescence, sarkans krāsojums – PI.

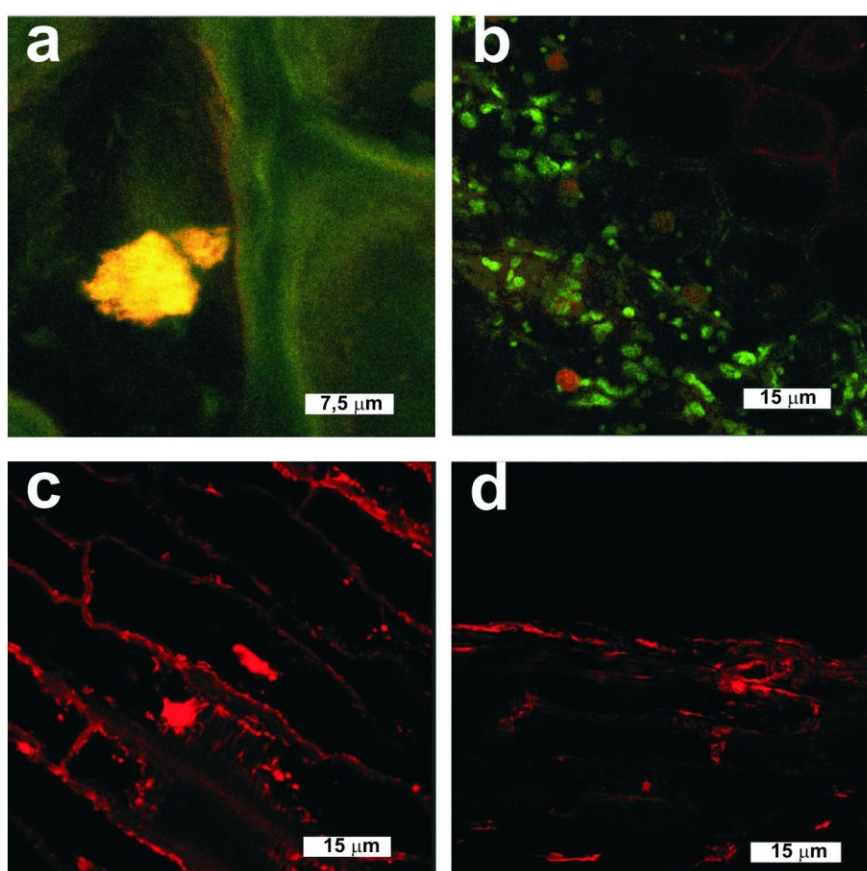
Figure 8. Morphological characteristics of year 2018 of *T. pratense* tea leaf and flower petal cells: a - fixed leaf cells, b - non-fixed leaf cells, c - fixed flower petal cells, d - non-fixed flower petal cells. Green color - chlorophyll autofluorescence, red color - PI.

3.7. 2019. gada *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums

T. pratense tējas lapu šūnās bija redzams trīsstūrveida formas kodols ar robainām malām. Kodola diametrs bija 4 µm. Bija notikusi kodola fragmentācija – programmēta šūnas nāve (9. att. a). *D. moldavica*. un *Ch. angustifolium* tējas lapu šūnās saskatīja apaļas formas kodolus ar diametru no 4 līdz 6 µm (11. pielikums a un 12. pielikums a). Nevienu no trim sugām tējas lapu šūnās nebija novērots eihromatīns. *T. pratense* un *Ch. angustifolium* tējas lapu šūnās varēja redzēt lielus un eliptiskus hloroplastus ar diametru no 3 līdz 4 µm (9. att. b un 12. pielikums b). Turklāt *Ch. angustifolium* tējas lapu šūnās varēja novērot fluorescējošus pilienus (12. pielikums b). *D. moldavica* tējas lapu šūnās hloroplasti nebija redzami (11. pielikums b). *T. pratense* un *Ch. angustifolium* tējas lapu šūnu plazmatisko membrānu un citoplazmu propīdija jodīds nebija

šķērsojis. Krāsojums bija redzams vienīgi mehāniski pārgrieztajās šūnās (9. att. b un 12. pielikums b). Toties *D. moldavica* lapu šūnās ar propīdija jodīdu bija nokrāsojušies atsevišķie kodoli (11. pielikums b).

T. pratense un *Ch. angustifolium* tējas ziedu vainaglapu šūnās novēroja jaunus apaļus kodolus ar diametru no 3,5 līdz 5 μm . *T. pratense* tējas ziedu šūnās pie kodoliem bija pievienotas sīkas plastīdas (9. att. c un 12. pielikums c). *D. moldavica* tējas ziedu vainaglapu šūnās varēja redzēt novecojušos trīsstūrveida un gareniskos kodolus ar diametru 4 μm (11. pielikums c). Visām trim sugām tējas ziedu vainaglapu šūnās neiekļuva propīdijas jodīds, jo nebija iekrāsojušies kodoli, plazmatiskā membrāna un citoplazma (9. att. d, 11. pielikums d un 12. pielikums d).

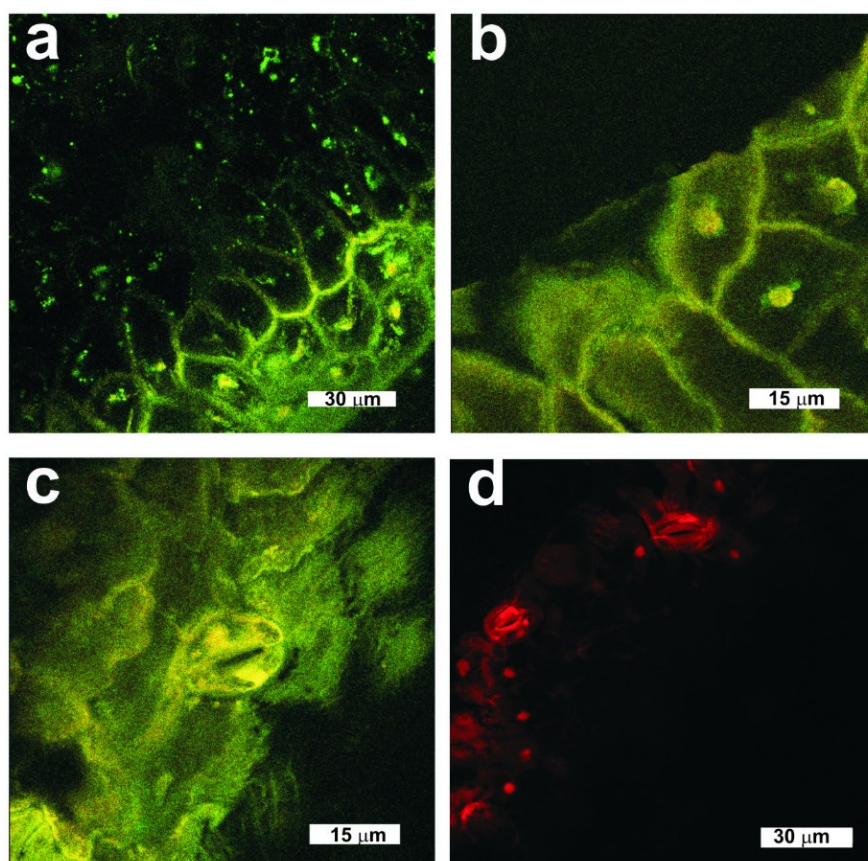


9. attēls. 2019. g. *T. pratense* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d – nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas. Zaļš krāsojums – hlorofila autofluorescence, sarkans krāsojums – PI.

Figure 9. Morphological characteristics of year 2019 of *T. pratense* tea leaf and flower petal cells: a - fixed leaf cells, b - non-fixed leaf cells, c - fixed flower petal cells, d - non-fixed flower petal cells. Green color - chlorophyll autofluorescence, red color - PI.

3.8. Dažādās temperatūrās dehidratētu *Ch. angustifolium* un 2019. gada nefiksētu tējas lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums pēc 72h kultivēšanas MS barotnē

Ch. angustifolium lapu šūnās, kas bija dehidratētas 22°C un 45°C temperatūrā, kā arī tējas lapu šūnās propīdija jodīds nebija šķērsojis, jo šūnu plazmatiskā membrāna un citoplazma nebija nokrāsojusies. Krāsojumu novēroja tikai mehāniski pārgrieztajās šūnās (10. att. a, b un d). Savukārt lapu šūnās, kas bija dehidratētas 120° C temperatūrā nokļuva propīdija jodīds un nokrāsoja plazmatisko membrānu un citoplazmu (10. att. c).

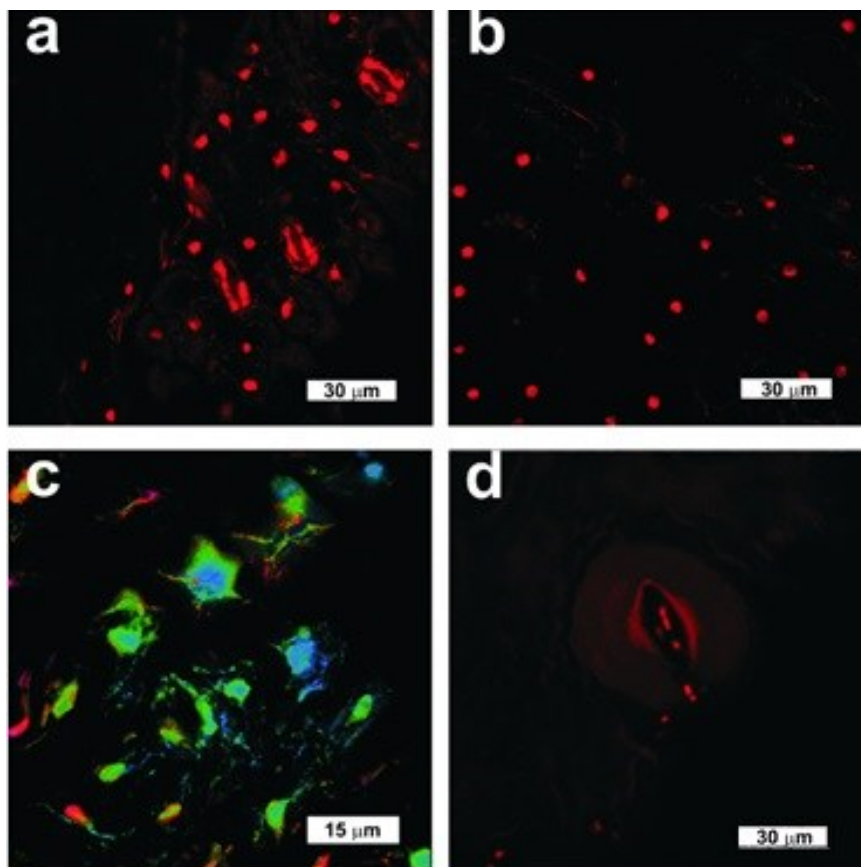


10. attēls. Nefiksētu, dažādās temperatūrās dehidratētu un 72h MS barotnē kultivētu *Ch. angustifolium* lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a - 22° C lapu šūnas, b – 45° C lapu šūnas, c – 120° C lapu šūnas, d – 2019. gada tējas lapu šūnas. Zaļš krāsojums – hlorofila autofluorescence, sarkans krāsojums – PI.

Figure 10. Unfixed, dehydrated at various temperatures and cultured in 72h MS medium morphological characteristics of *Ch. angustifolium* leaf cells: a - 22° C leaf cells, b - 45° C leaf cells, c - 120° C leaf cells, d - 2019 tea leaf cells. Green color - chlorophyll autofluorescence, red color - PI.

3.9. Dažādās temperatūrās dehidratētu *Ch. angustifolium* un 2019. gada fiksētu tējas lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums pēc 72h kultivēšanas MS barotnē

Ch. angustifolium lapu šūnās, kas bija dehidratētas 22° C un 45° C temperatūrā varēja redzēt apaļas formas kodolus, kuru diametrs variēja no 3,5 līdz 5 μm (11. att. a un b). Savukārt lapu šūnās, kas bija dehidratētas 120° C temperatūrā varēja novērot trīsstūrveida formas kodolus ar asām un robainām malām (11. att. c). Kodolu diametrs bija 6 μm. *Ch. angustifolium* tējas lapu šūnās nevarēja redzēt kodolus (11. att. d). Nevienā no eksperimenta variantiem nevarēja redzēt eihromatīnu un hloroplastus.

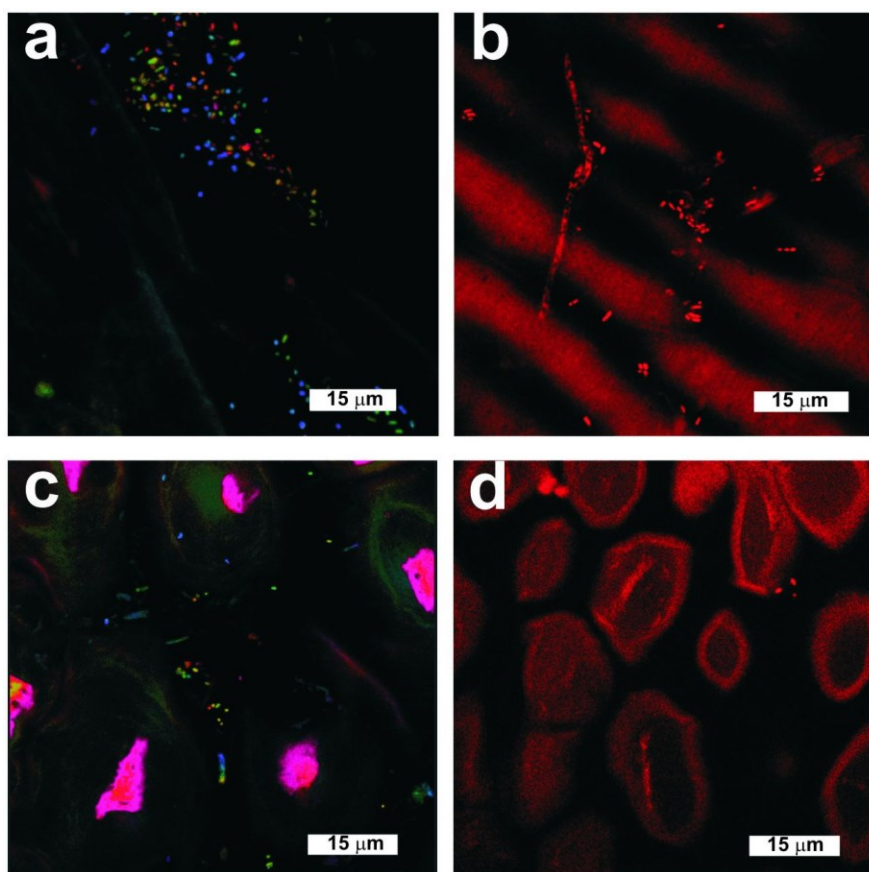


11. attēls. Fiksētu, dažādās temperatūrās dehidratētu un 72h MS barotnē kultivētu *Ch. angustifolium* lapu šūnu morfoloģiskais raksturojums: a - 22° C lapu šūnas, b – 45° C lapu šūnas, c – 120° C lapu šūnas (krāsu kodēta 3D projekcija, zila ir parauga augšpuse, zaļa – vidējā daļa un sarkana – apakšējā daļa), d – 2019. gada tējas lapu šūnas.

Figure 11. Fixed, dehydrated at various temperatures and cultured in 72h MS medium. Morphological characteristics of *angustifolium* leaf cells: a - 22° C leaf cells, b - 45° C leaf cells, c - 120° C leaf cells (color – coded 3D projection, blue is the top of the sample, green is the middle part and red is the bottom part), d – 2019 year tea leaf cells.

3.10. *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* lapu un ziedu vainaglapu šūnu baktēriju raksturojums

T. pratense ziedu vainaglapu šūnas, kas bija dehidratētas 22° C temperatūrā un 2019. gada tējas ziedu vainaglapu šūnās bija redzamas baktēriju kolonijas (12. att. a un b). Līdzīgi *D. moldavica* 2019. gada tējas lapās varēja novērot nūjiņveida baktēriju kolonijas (11. pielikums b). Toties *T. pratense* 2019. g. tējas lapu šūnās un lapu šūnās, kas bija uzglabātas 30 dienas ārā novēroja atsevišķas baktērijas (12. att. c un d). Pēc *Ch. angustifolium* dažādās temperatūrās dehidratēto drogu 72 h kultivēšanas MS barotnē lapu šūnās varēja saskatīt baktēriju kolonijas (13. pielikums a, b, c, d). Toties pēc *Ch. angustifolium* 2019. gada tējas drogu 72 h kultivēšanas MS barotnē lapu šūnās varēja redzēt gan baktērijas, gan viensūnas sēnes un to hifas (13. pielikums e, f, g, h).



12. attēls. *T. pratense* fiksētu lapu un ziedu vainaglapu šūnu baktēriju raksturojums: a – 22° C temperatūrā dehidratētu ziedu vainaglapu šūnas, b – 2019. g. tējas ziedu vainaglapu šūnas, c – 2019. g. tējas lapas šūnas, d – uzglabātas 30 dienas ārā zem jumta lapas šūnas. A un c – krāsu kodēta 3D projekcija, zila ir parauga augšpuse, zaļa – vidējā daļa un sarkana – apakšējā daļa, b un d – sarkans, PI krāsojums.

Figure 12. Characteristics of *T. pratense* fixed leaf and flower petal cell bacteria: a - 22°C dehydrated flower petal cells, b – 2019 year tea flower crown cells, c – 2019 year tea leaf cells, d - stored for 30 days outdoors under a roof leaf cell. A and c – color coded 3D projection, blue

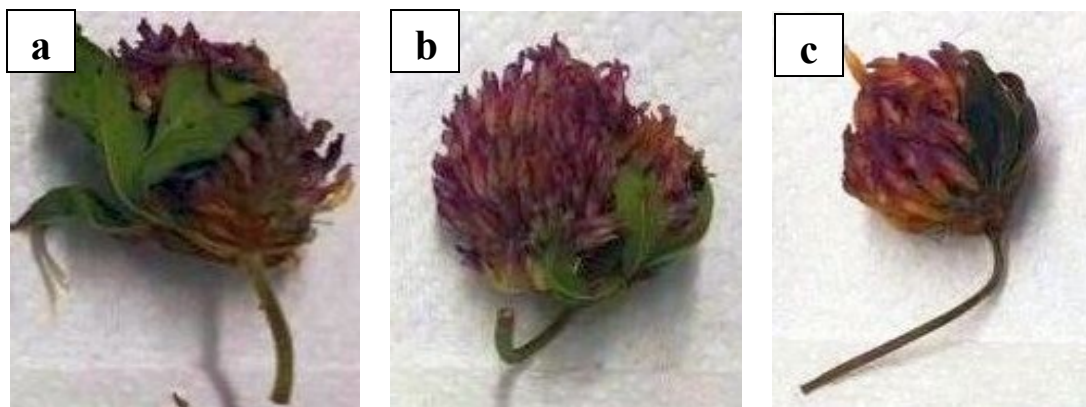
is the top of the sample, green - the middle part and red - the bottom part, b and d – red, PI color.

3.11. *T. pratense* svaigu un dažādās temperatūrās dehidratētu lapu šūnu hloroplastu hlorofila vidējā fluorescences

Analizējot svaigu un dažādās temperatūrās dehidratētu *T. pratense* lapu šūnu vidējo hloroplastu hlorofila fluorescenci, iegūtie rezultāti uzrādīja statistiski nozīmīgas atšķirības (14. pielikums). Dati liecināja, ka svaigam un 22°C temperatūrā dehidratētam *T. pratense* lapu šūnām vidējās hloroplastu hlorofila fluorescences bija viszemākās un savā starpā būtiski neatšķirās ($p > 0,05$). Statistiski nozīmīga atšķirība starp vidējo hloroplastu hlorofila fluorescenci ir bijusi *T. pratense* lapu šūnās, kas bija dehidratētas 22°C un 45°C temperatūrā ($p < 0,05$). (14. pielikums). Visaugstākā vidējā hloroplastu hlorofila fluorescences bija vērojama dehidratējot *T. pratense* lapu šūnas 120°C temperatūrā. Turklāt dzeltējošās lapu šūnas, kuras bija dehidratētas 22°C temperatūrā un, kuros novēroja programmēta šūnu nāvi, uzrādīja salīdzinoši augstus vidējās hloroplastu hlorofila fluorescences rādītājus ($p < 0,05$) (14. pielikums).

3.12. *T. pratense* 2018. gada, 2019. gada tējas un dažādās temperatūrās dehidratētu lapu un ziedu vainaglapu šūnu organoleptiskais novērtējums

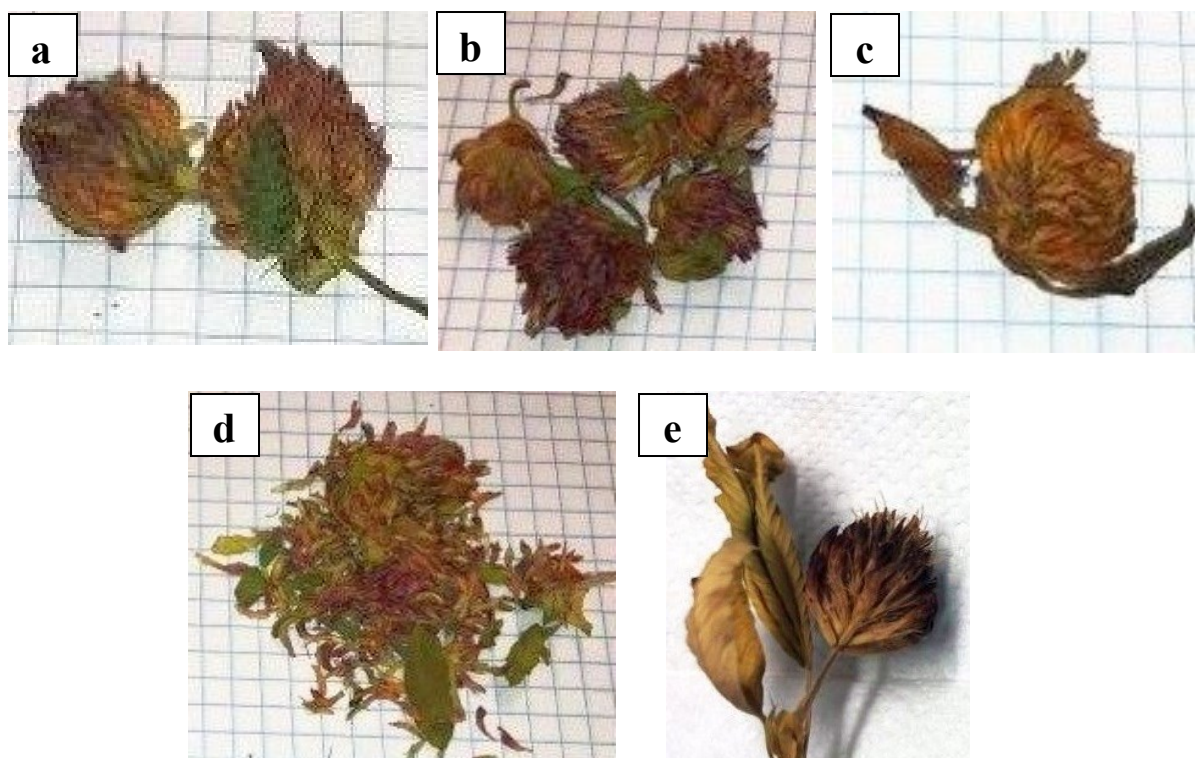
Balstoties uz 13. attēlā redzamo informāciju varēja secināt, ka *T. pratense* paraugiem, kas bija dehidratēti 22°C un 45°C temperatūrā krāsa līdzinājās svaigajam *T. pratense* augam. Abos paraugos lapu krāsa bija zaļa un ziedu krāsa violeta (13. att. a un b). *T. pratense* paraugam, kas bija dehidratēts 120°C temperatūrā lapu krāsa mainījās no zaļas uz brūnu, kā arī ziedu krāsa palika brūnākā (13. att. c). Izteiktāks medāns aromāts bija izjūsts pārbaudot 22°C temperatūrā dehidratēto *T. pratense* paraugu. Pārbaudot 45°C temperatūrā dehidratētu *T. pratense* paraugu aromāts bija jūtams daudz mazāk, nekā paraugam, kas bija dehidratēts 45°C temperatūrā. Turklāt 120°C temperatūrā dehidratētam paraugam smarža praktiski nebija jūtama.



13. attēls. Dažādās temperatūrās dehidratēto *T. pratense* lapu un ziedu vainaglapu šūnu organoleptiskais novērtējums: a – 22°C, b – 45°C, c – 120°C.

Figure 13. Organoleptic evaluation of dehydrated *T. pratense* leaf and flower petal cells at different temperatures: a - 22°C, b - 45°C, c - 120°C.

Analizējot dažādā vecuma un atšķirīgos apstākļos uzglabātu *T. pratense* auga lapu un ziedu vainaglapu šūnu organoleptiskos rādītājus varēja secināt, ka gan auga vecums, gan uzglabāšanas apstākļi ietekmēja lapu un ziedu krāsu un smaržu. No 14. attēla varēja redzēt, ka *T. pratense* parauga, kas uzglabāts 6 mēnešus lapas bija tumši zaļā krāsā un ziedi violeti – brūnā krāsā (14. att. a). Lapu un ziedu krāsa atkarīga ne tikai no auga vecuma, bet arī no uzglabāšanas apstākļiem. Piemēram, varēja redzēt atšķirības starp 6 mēnešus veciem *T. pratense* paraugiem, kas bija uzglabāti 30 dienas ārā un, kas bija uzglabāti 20% gaisa relatīvajā mitrumā. No attēliem varēja redzēt, ka *T. pratense* paraugam, kas bija uzglabāts 30 dienas ārā, lapu krāsa bija tumši zaļa un ziedi violeti – brūnā krāsā, bet paraugam, kas uzglabāts 20% gaisa mitrumā lapu krāsa mainījās no zaļās uz melno un ziedu krāsa mainījās no violeti – brūnas uz brūni – melno krāsu (14. att. b un c). Salīdzinot dažāda vecuma *T. pratense* drogas varēja secināt, ka 2019. gada tējas krāsa, kas bija uzglabāta 18 mēnešus līdzīga drogām, kas bija 6 mēnešus vecas. Pārsvārā 2019. gada tējas lapu krāsa bija tumši zaļa, bet varēja redzēt arī atsevišķas nobrūnējušas lapas, bet ziedi bija violeti – brūnā krāsā (14. att. d). Izteikto krāsas maiņu varēja novērot *T. pratense* drogām, kas bija uzglabātas 24 mēnešus. Gan lapas, gan ziedi pēc 24 mēnešus ilgas uzglabāšanas palika dzelteni – brūnā krāsā (14. att. d). *T. pratense* auga raksturīgs aromāts nebija jūtams nevienā no paraugiem. Turklāt, paraugam, kas bija uzglabāts 30 dienas ārā mitrā gaisā un zemā temperatūrā varēja just pelējuma smaku.



14. attēls. Dažāda vecuma un atšķirīgos apstākļos uzglabātu *T. pratense* lapu un ziedu vainaglapu šūnu organoleptiskais novērtējums: a – 6 mēnešus vecs, b – 6 mēnešus vecs, uzglabāts ārā novembrī 30 dienas (mitrumā), c – 6 mēnešus vecs, uzglabāts 20% gaisa relatīvajā mitrumā, d – 18 mēnešus vecs (2019. g. tēja), e – 24 mēnešus vecs.

Figure 14. Organoleptic evaluation of the leaves and flower petals of *T. pratense* at different ages and under different conditions: a - 6 months old, b - 6 months old, stored in humidity for 30 days (outdoors), c - 6 months old, stored in 20% relative air moisture, d - 18 months old (2019 year tea), e - 24 months old.

4. DISKUSIJA

T. pratense, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* drogu kvalitāti var novērtēt izmantojot dažādas metodes. Viena no tām ir organoleptiskā metode ar kuru nosaka drogu ārējo izskatu, krāsu, smaržu un garšu. Pārējās metodes ir laboratoriskās un tās ietver fizikālās, ķīmiskās, mikrobioloģiskās un fizioloģiskās metodes. Viena no salīdzinoši jaunām kvalitātes novērtēšanas metodēm, kas pieder pie laboratoriskām ir konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija. Ar šīs metodes palīdzību var novērtēt lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiju, dzīvotspēju un proliferācijas spējas. Līdz šim metodi izmantoja lai novērtētu piparmētras lapu kvalitāti, taču ir svarīgi saprast izvēlētas metodes universalitāti un atbilstību citām pēc struktūras un īpašībām atšķirīgām augu sugām un to drogām (Melbārde – Vāvere, 2018).

Ārstniecības augu drogu krāsu ietekmē gan uzglabāšanas apstākļi, gan uzglabāšanas laiks. PVO vadlīnijām neatbilstošas un ilgstošas uzglabāšanas laikā 22°C temperatūrā dehidratēto *T. pratense* lapu krāsa mainījās no zaļas uz brūno un ziedu krāsa no violetas uz violeti – brūno. Izteikto krāsas maiņu novēroja dehidratētam *T. pratense* drogām, kas bija uzglabātas 24 mēnešus. Pētījumi rāda, ka drogu ilgstoša uzglabāšana negatīvi ietekmē viegli oksidējamo polifēnolu saturu. Oksidācijas procesa rezultātā polifēnoli zaudē savas vērtīgās īpašības un veidojas polimerizētās vielas, kuras sekmē drogu kvalitātes pasliktināšanos, izraisot krāsas maiņu (Manach et al., 2004).

4.1. Laboratorijā dehidratēto *T. pratense*, *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* drogu šūnu morfoloģisko pazīmju salīdzinājums ar ražošanas procesā iegūtām drogām

Svaigo *T. pratense*, *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* lapu un ziedu šūnu morfoloģija ir pamats, uz kuru balstoties var salīdzināt dažādu dehidratācijas temperatūru un uzglabāšanas apstākļu radītās morfoloģiskās izmaiņas. Svaigo un rehidratēto *T. pratense*, *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* lapu šūnām bija raksturīgi apaļi un eliptiski kodoli, kuros redzēja eihromatīnu, kā arī epidermā un parenhīmā novēroja eliptiskus hloroplastus. Turklāt *T. pratense* un *D. moldavica* hloroplasti bija mazāki, nekā *Ch. angustifolium*, jo tiem lapas pieguļas cieši ziedkopai. Līdzīgu ainu konstatēja pārbaudot visu trīs sugu ziedu vainaglapu šūnas. *T. pratense* un *Ch. angustifolium* ziedu vainaglapu šūnu kodoli bija apaļi un eliptiski, visos gadījumos redzēja eihromatīnu. Iepriekš minētās šūnu morfoloģiskās pazīmes uzrādīja to, ka šūnas ir dzīvotspējīgas. Atšķirības konstatēja svaigām *D. moldavica* ziedu vainaglapu šūnām, kurās redzēja sarautos trīsstūrveida kodolus. Kodolu morfoloģija raksturo auga ievākšanas laiku un attīstības stadiju. Atbilstošā laikā ievāktām drogām ir apaļi kodoli. Novecojošos augos kodoli ir saplacināti. Šo pazīmi nevar izmantot ziedu vainaglapu ievākšanas raksturošanai, jo šūnas

strauji diferencējās un kodoli kļūst saplacināti. Veiktajā darbā šūnu kodolu formas maiņa un saraušanās norādīja uz programmēto šūnu nāvi, kas iespējams bija saistīta ar auga noziedēšanu.

Dehidratācijas laikā auga šūnas tiek pakļautas stresam. Ja dehidratācija notiek pakāpeniski, tad šūnas organoīdi spēj pielāgoties šim procesam un pēc rehidratācijas ieņemt stāvokli kāds ir bijis pirms dehidratācijas. Visu trīs sugu lapu un ziedu vainaglapu šūnas, kas bija dehidratētas 22°C un 45°C temperatūrā, kā arī 2018. gadā tējas lapu un 2019. gada tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija līdzinājās svaigo šūnu morfoloģijai. Pie tam 22°C temperatūrā dehidratētos *T. pratense* lapu šūnu kodolos novēroja proliferāciju. Literatūras avotos norādīts, ka pareizi dehidratējot augu lapas, šūnas saglabā dzīvotspēju un lapās var notikt šūnu dalīšanās (Sablowski and Dornelas, 2013).

Svarīgi ir tas, ka ziedu drogu kvalitāti ietekmē ne tikai izvēlēta dehidratācijas temperatūra, bet arī uzglabāšanas ilgums. Analizējot visu trīs sugu 2018. gadā ievāktas un dehidratētas drogas atklāja, ka visām trīs sugām ziedu vainaglapu šūnās ir izmainīta morfoloģija. Piemēram, plazmatiskās membrānas nespēja atjaunot šūnu virsmas spraugumu pēc rehidratācijas un nenoteiktas formas kodoli ar asām malām, kuros redzamas nekrozes pazīmes. Dehidratācija augu materiālā izraisa virkni fizikālo un ķīmisko izmaiņu, kas galvenokārt rodas augu materiālam oksidējoties un paaugstinātās temperatūras dēļ. Kā rezultātā var novērot lapu un ziedu vainaglapu šūnu lieluma un formas deformāciju, krāsas maiņu, mehānisku īpašību izmaiņas un dehidratētā auga materiāla nespēju rehidratēties (Lewicki and Pawlak, 2003).

Visu trīs sugu 120°C temperatūrā dehidratētas lapu un ziedu vainaglapu šūnās, kā arī 2018. gada tējas drogās, izņemot *T. pratense* ziedu vainaglapu šūnas, novēroja nekrozes pazīmes. Par nekrozi šūnās liecināja izplūduši kodoli ar asām un robainām malām, lieli organoīdu agregāti citoplazmā, hloroplastu degradācija un membrānas bojājumi. Līdzīgus secinājumus savā pētījumā izvirzīja Jackson ar autoru kolektīvu, norādot, kā paaugstinātās temperatūras ietekmē lapu šūnās samazinās hloroplasti, hlorofila saturs un hlorofila molekulu sadalīšanās var būt saistīta ar reaktīvo skābekļa daļiņu veidošanos (Jackson et al., 2014).

Pārāk augsta dehidratācijas temperatūra, radot izmaiņas šūnu morfoloģijā, ietekmē ne tikai augu kvalitātes īpašības, bet arī bioloģiski aktīvo vielu saturu, piemēram, kopējo fenolu, flavonoīdu, alkaloidu, vitamīnu, glikozīdu, miecvielu, kā arī galaprodukta antioksidantu aktivitāti (Roshanak, et al., 2016; Chan, 2009). Kopējo fenolu un flavonoīdu noārdīšanās variē atkarībā no dehidratācijas temperatūras un ilguma. Davey ar autoru kolektīvu ziņoja, ka termiskās apstrādes laikā fitoķīmiskās vielas samazinās, termiski sadaloties. Kā rezultātā tiek ietekmēta šūnas struktūras integritāte, kas veicina aktīvo komponentu migrāciju radot zudumus dažādu ķīmisku reakciju rezultātā, iesaistot fermentus, gaismu un skābekli. Mazākos fenolu un flavonoīdu zudumus konstatēja dehidratējot lapas 50°C temperatūrā (Davey, et al., 2002). Pēc

Rabeta un autoru kolektīva veiktā pētījuma atklāja, ka dehidratācijas temperatūra, kas ir augstākā par 50°C auga materiālā samazina ēterisko eļļu daudzumu un kopējo fenolu saturu (Rabeta and Lai, 2013).

Apkopojot iepriekš minēto informāciju var secināt, ka optimāls dehidratācijas temperatūras diapazons *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* drogām ir no 22°C līdz 45°C. Šādās temperatūrās robežās drogas varēja dehidratēt bez ievērojamiem augu aktīvo vielu zudumiem un ar minimālām morfoloģisko īpašību izmaiņām. Taču tā kā *T. pratense* drogai pārsvarā vāc ziedus, tad tos drīkst dehidratēt tādā temperatūrā, pie kuras netiek izmainīta to morfoloģija. No pētījuma izriet, ka 45°C dehidratācijas temperatūra ir pārāk augsta *T. pratense* sugai, jo ziedu vainaglapu šūnās varēja novērot nekrozi, savukārt 22°C dehidratācijas temperatūra ir pieņemama.

4.2. Laboratorijā dehidratēto *T. pratense*, *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* drogu šūnu dzīvotspējas salīdzinājums ar ražošanas procesā iegūtām drogām

Vienā pētījumā ziņoja, ka dehidratācijas temperatūra un ātrums lielā mērā ietekmē šūnu izturību. Pārāk augsta temperatūra var izraisīt auga šūnas bojāeju, kas var izpausties rehidratācijas laikā. Rezultātā izmainās šūnas plazmatiskās membrānas caurlaidība, ko var pārbaudīt iekrāsojot eksperimenta variantus ar propīdija jodīdu (Carvalho et al., 2012).

Dehidratācijas temperatūras ietekmi uz šūnu vitalitāti un veselumu novēroja arī veiktajā pētījumā. Visu trīs sugu svaigas, laboratorijā dehidratētas 22°C un 45°C temperatūrā lapu un ziedu vainaglapu šūnas bija funkcionāli aktīvas, jo propīdija jodīds nav šķērsojis plazmatisko membrānu. Līdzīgus secinājumus izvirzīja vienā pētījumā, norādot, ka propīdija jodīds neieklūst veselas šūnas plazmatiskā membrānā un neiekrāso kodolus (Cooder, 2001).

Toties visu sugu 120°C temperatūrā dehidratētas lapu un ziedu vainaglapu šūnas nebija dzīvotspējīgas, jo propīdija jodīds ieķļuva plazmatiskajā membrānā. Augsta dehidratācijas temperatūra maina plazmatiskās membrānas funkcijas, ietekmējot tās selektīvo caurlaidību. Salīdzinot visu trīs sugu 2018. gada tējas drogas varēja redzēt, ka propīdija jodīds šķērsoja visu sugu lapu un ziedu vainaglapu šūnu plazmatisko membrānu, izņemot *T. pratense* ziedu un atsevišķas lapu šūnas. Iespējams, ka šūnas bojājumi radās drogu ilgstošas uzglabāšanas rezultātā. Savukārt 2019. gada tējas lapu un ziedu šūnas bija funkcionāli aktīvas, izņemot *D. moldavica* lapu šūnas, kurās bija nokrāsojušies atsevišķie kodoli.

Runājot par visām neatbilstošos apstākļos uzglabātām *T. pratense* drogām varēja secināt, ka visas lapu šūnas nav dzīvotspējīgas, jo tajās bija redzama nekroze.

Balstoties uz iepriekš minēto informāciju var secināt, ka kvalitatīvas un uzturā lietojamās drogas ir tās, kuru šūnās nebija vērojami plazmatiskās membrānas bojājumi augstas

dehidratācijas temperatūras dēļ. Tas ir visu trīs paraugu svaigas drogas, 2019. gada tējas drogas, 22°C un 45°C dehidratētas un atbilstoši uzglabātas drogas. Izņēmums ir 45°C temperatūrā dehidratētās *T. pratense* ziedu vainaglapu šūnas, kurās bija vērojamas nekrozes pazīmes un 2019. gada *D. moldavica* tējas drogas.

4.3. Hlorofila vidējās fluorescences salīdzinājums svaigās un dehidratētās *T. pratense* lapu šūnās

Hloroplastu hlorofila fluorescences norāda uz morfoloģiski veselām šūnām un to spēju veikt fotosintēzi. Fluorescences intensitāte ir apgriezti proporcionālā fotosintēzes efektivitātei. Analizējot auga hlorofila fluorescenci var gūt priekšstatu ne tikai par fotosintēzes efektivitāti, bet arī par lapu veselību. Ir zināms, ka fotosintēzes process ir viens no visjutīgākajiem un specifiskākajiem fizioloģiskajiem procesiem augos. (Guo et al., 2006).

Maģistra darbā konstatēja, ka svaigas *T. pratense* lapas fluorescences statistiski nozīmīgi neatšķiras no 22°C temperatūrā dehidratētas lapas fluorescences. Toties salīdzinot ar 45°C temperatūrā dehidratēto lapu, svaigas lapas fluorescences intensitāte statistiski nozīmīgi atšķiras un ir mazāka. Tas rāda, ka hloroplastos notika intensīva fotosintēze. Savukārt 45°C temperatūrā dehidratētām lapām hlorofila fluorescences bija daudz intensīvākā, nekā 22°C dehidratētām lapām. 22°C temperatūrā dehidratētiem dzeltējošiem un 120°C temperatūrā dehidratētiem *T. pratense* lapu fragmentiem hlorofila fluorescences intensitāte bija uz pusi lielākā, nekā 45°C temperatūrā dehidratētām lapām. Kā viens no izskaidrojumiem varētu būt dažādu autoru pētījumi, kuros konstatēja, ka hlorofils ir jutīgs pret karstumu un tā saglabāšanās hloroplastos ir atkarīga no temperatūras, termiskās apstrādes un uzglabāšanas ilguma. Piemēram, Chen savā pētījumā pārbaudot dažādu dehidratācijas temperatūru ietekmi uz pirkstainā citrona (*Citrus medica* var. *sarcodactylis*) fotosintēzi un antioksidantu aktivitāti izvirzīja sekojošos secinājumus. Pirkstainā citrona pakļaušana 40°C un 45°C dehidratācijas temperatūrai ievērojami samazināja fotosintēzes ātrumu, karboksilēšanas efektivitāti, fotosistēmas II maksimālo fotoķīmisko efektivitāti un ar gaismas enerģiju piesātināto fotosintēzes ātrumu. Fotosintēzes spējas nebija ietekmētas pakļaujot augu dehidratācijas temperatūrai, kas ir zemākā par 40°C (Chen, et al., 2012). 45°C un augstākās temperatūrās dehidratētās lapās samazinās hlorofila saturs un fotosintēzes aktivitāte. Lapu hloroplastos parādās bojātas šūnas, kuras nespēj veikt fotosintēzi (Murchie and Lawson, 2013; Roshnak et al., 2016). Pārāk augsta dehidratācijas temperatūra lapu šūnās izraisa oksidatīvos bojājumus. Rezultātā veidojās brīvie radikāļi, piemēram, superoksīda radikāļi, H₂O₂ un citas reaktīvās skābekļa daļiņas, kas traucē veiksmīgu metabolisko procesu norisi un iznīcina hloroplastu

struktūru, degradējot hlorofilu, bojājot lipīdus un pigmentus, kā arī denaturējot proteīnus (Guo et. al., 2006).

4.4. Kultivēto *Ch. angustifolium* un *T. pratense* lapu šūnu proliferācijas spēju salīdzinājums dažādās dehidratācijas temperatūrās

Pēc 72 h *Ch. angustifolium* paraugu kultivēšanas bija konstatēts, ka 22°C, 45°C temperatūrā dehidratēto un 2019. gada tējas lapu paraugos, atskaitot 120°C temperatūrā dehidratēto lapu paraugu, šūnas ir dzīvotspējīgas. Tas pierāda, ka augu drogas dehidratējot un uzglabājot atbilstoši PVO vadlīnijām šūnas nonāk anabiozes stāvoklī un pēc rehidratācijas atjaunojās to fizioloģiskās funkcijas. Kā zināms pilnībā izaugušās augu lapās lielākā daļa šūnu ir diferencētas. Lielākoties cilmes šūnas atrodas augšējā epidermā un pie dzīslām. Tāpēc šūnu dalīšanos var novērot reti. Pie tam biotehnoloģiskajās laboratorijās dalīšanās biežumu palielināšanai piemeklē atbilstošas barības vielu un hormonu kombinācijas. Lielākajā daļā pētījumu par augu augšanu *in vitro* ziņoja, ka citokīniem ir izšķiroša loma reprodiktīvo dzinumu veidošanā un diferenciacijā (Nhut et al., 2006). Eksperimenta sākumā bija izmantota bazālā barotne bez augu hormoniem, tāpēc varēja sagaidīt, ka tiks novērotas dzīvotspējīgas šūnas un reta šūnu dalīšanās. Līdz ar to, lai precizētu eksperimenta apstākļus būtu nepieciešams atkārtots eksperiments.

Eksperiments ar *T. pratense* pierāda, ka kultivēšanas eksperimentālā pieeja ir laba, lai varētu parādīt uzglabāšanas apstākļu izraisītu šūnu nekrozi. Visi paraugi parādīja tipiskas nekrozes pazīmes, kuras pēc rehidratācijas izpaudās kā lapu melnēšana un hloroplastu fluorescences zudums. Tas pierādīja, ka drogās šūnās nav bijušas dzīvotspējīgas, jo iestājās šūnu nāve. PVO vadlīnijās ir minēts, ka drogās mitruma saturam nevajadzētu pārsniegt 12% (World Health Organization, 2018). *T. pratense* uzglabāšanas gadījumā gaisa un drogu mitrums bija 20%. Tas pierāda, ka vismaz šai sugai mitrums ir pārāk mazs un izraisa būtiskus membrānu bojājumus. Turklāt to, ka rezultāti parāda uzglabāšanas trūkumus, pierāda tas, ka līdzīgi rezultāti bija ne tikai laboratorijā dehidratētām *T. pratense* drogām, bet arī ražošanas procesā iegūtām tējas drogām.

Tehnisku iemeslu dēļ kultivēšanas eksperimentam neizdevās noskaidrot optimālo MS barotni, kultivēšanas laiku un pārbaudīt visas augu sugas.

4.5. Laboratorijā dehidratēto *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* drogu šūnu mikrobioloģiskā piesārņojuma salīdzinājums ar ražošanas procesā iegūtām drogām

Kā zināms visiem augiem uz virsmas var novērot mikroorganismus. Dažos pētījumos augu virsmu pat uzskata par ekosistēmu. Pirms novākšanas augi var būt pakļauti mikroorganismu piesārņojumam no augsnes. Ārstniecības augu mikrobiālo piesārņojumu var veicināt arī

apkārtējas vides faktori, piemēram, temperatūra, gaisa mitrums un nokrišņu daudzums pirms un pēc ražas novākšanas, kā arī apstrādāto drogu uzglabāšanas apstākļi (Gonzaga de Freitas and Baubab, 2012). Drogu sagatavošanas procesā mikroorganismu vairošanās tiek pārtraukta un atbilstoši uzglabātās drogās tie neairojas. Veiktajā pētījumā nūjiņveida baktēriju kolonijas bija redzamas *T. pratense* ziedu vainaglapu šūnās, kuras dehidratēja 22°C temperatūrā, 2019. gada tējas ziedu vainaglapu šūnās un *D. moldavica* 2019. gada tējas lapu šūnās. Atbilstošais organoleptiskais vērtējums un baktēriju klātbūtne liecina par to savairošanos pirms dehidratācijas. Iespējams, ka dehidratācijas sākumā drogas bija pārāk mitras. Sakarā ar to, ka *T. pratense* ir lielas ziedkopas, tās var ilgi saglabāt un piesaisīt apkārtējās vides mitrumu, kas var veicināt baktēriju vairošanos. Savukārt 2018. gada *T. pratense* tējas drogās baktērijas nebija novērotas. Tas liecina par to, ka drogu mitrums novākšanās brīdī bija atbilstošs vadlīnijām. Pierādīts, ka pelējuma sēnes, baktērijas un raugi spēj aktīvāk attīstīties augu materiālā, kurš tiek uzglabāts gaisa mitrumā, kas ir lielāks par 70% (Bogers et al., 2006). Iepriekš minētie pierādījumi apstiprinājās arī veiktajā pētījumā, jo *T. pratense* drogām, kas bija uzglabātas novembrī 30 dienas ārā, kur gaisa mitrums pārsniedza 80% konstatēja atsevišķas baktērijas un varēja just pelējuma smaku.

Pēc 72 stundām dažādās temperatūrās dehidratēto *Ch. angustifolium* drogu un 2019. gada tējas kultivēšanas, lapu šūnās novēroja ne tikai baktēriju kolonijas, bet arī sēnes un to hifas. Tas izskaidrojams ar to, ka pelējuma sēnes ir plaši izplatītas augu piesārņotājas. Kā arī daudzas baktērijas, piemēram, *Bacillus* un *Clostridium spp.* veido sporas, kas ir izturīgas pret dehidratāciju un sausiem apstākļiem un nonākot labvēlīgā vidē, piemēram, mitrumā, spēj tālāk aktīvi attīstīties (Gonzaga de Freitas Araujo and Bauab, 2012).

Lietojot ar mikroorganismiem piesārņotas drogas var kaitēt veselībai, jo var saindēties. Īpaši vajadzētu uzmanīties no drogām, kas satur pelējuma sēnes. Kā zināms labvēlīgos apstākļos pelējuma sēnes var sintezēt toksiskus metabolītus – mikotoksīnus. Starp zināmajiem mikotoksīniem, bīstamākie un toksiskākie ir aflatoksīni, ko sintezē *Aspergillus flavus* un *Aspergillus parasiticus* sugas (Gonzaga de Freitas Araujo and Bauab, 2012).

4.5. Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopijas metode kā universālā drogu kvalitātes nepilnību novērtējuma metode

Izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopiju var novērtēt svaigo un dehidratēto *T. pratense*, *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* lapu un ziedu vainaglapu kvalitāti. Viens no auga kvalitātes rādītājiem ir veselās lapu un ziedu šūnās bez ievērojamām morfoloģiskām izmaiņām. Šūnās morfoloģija ietver pareizo kodolu formu un lielumu, pareizo hloroplastu formu un lielumu, eihromatīna klātbūtni, kā arī plazmatiskās membrānas un citoplazmas

bojājumu neesamību. Vesela un morfoloģiski neizmainīta šūnu morfoloģija liecina par šūnu dzīvotspēju. Ar konfokālā mikroskopa palīdzību var pārbaudīt dzīvotspējīgo šūnu proliferācijas spējas. Šūnas morfoloģijas izmaiņas var norādīt uz programmēto nāvi vai nekrozi. Auga drogas, kuru šūnas nav dzīvotspējīgas nav lietojamas uzturā, jo no uzturzinātnes viedokļa tās ir nekvalitatīvas.

Konfokālo lāzerskenējošo mikroskopijas metodi var pielietot, lai pārbaudītu dažādu dehidratācijas temperatūru ietekmi uz augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiju. Pateicoties tam var redzēt, vai augu drogas ir kvalitatīvas un dehidratētas atbilstošā temperatūrā. Analizējot maģistra darbam izvēlētos augus var secināt, ka *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* drogām atbilstošs dehidratācijas temperatūras diapazons, pie kura nav redzamas būtiskas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskās izmaiņas un šūnas bija dzīvotspējīgas ir no 22°C līdz 45°C. Turklāt balstoties uz pētījumos pieejamo informāciju 45°C temperatūru var uzskatīt par dehidratācijas robežu, kurā nav konstatējami būtiski augu aktīvo vielu zudumi. Toties *T. pratense* drogām atbilstošā dehidratācijas temperatūra ir 22°C. Šādā temperatūrā dehidratējot augu nebija vērojamas būtiskas ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiskās izmaiņas un arī tās bija dzīvotspējīgas.

Augu lapās hloroplasti ir vieni no svarīgākajām šūnām, kas norāda uz auga veselību. Veselā augā hloroplasti ir apaļi vai eliptiski. Hloroplastu iekšpusē atrodas hlorofils, kas veic nozīmīgu lomu auga fotosintēzē. Dehidratējot augu pārāk augstā temperatūrā hloroplasti samazinās vai pilnībā izzūd un hlorofils degradējas. Šī iemesla dēļ auga šūnas nespēj veikt fotosintēzi un iet bojā. Izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu svaigās un dažādās temperatūrās dehidratētās drogās var pārbaudīt hloroplastu hlorofila fluorescenci. Hlorofila fluorescences intensitāte arī var norādīt uz drogu kvalitāti. Neatbilstošā temperatūrā dehidratētās un neatbilstošos apstākļos uzglabātās drogās hlorofila fluorescences ir intensīvākā un nozīmē to, ka drogas nav kvalitatīvas un lietojamas uzturā. Balstoties uz maģistra darba eksperimentu var secināt, ka drogas, kas ir dehidratētās 120°C ir nekvalitatīvas, jo tām hlorofila fluorescences ir visintensīvākā.

Konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija var atbrīvot no nepieciešamības veidot mikroorganismu kvantitatīvo novērtēšanu uzsējumos, jo baktēriju klātbūtne un koloniju veidošanās un lielums ir redzams mikroskopiskajos preparātos. Tas ļauj no viena preparāta sniegt komplekso atbildi par drogu sagatavošanās un uzglabāšanas apstākļiem.

Turpmākajos pētījumos būtu nepieciešams pārbaudīt:

- Visu variantu – 2018. un 2019. gada *T. pratense* tējas drogu, svaigo, 22°C, 45°C, 120°C temperatūrā dehidratēto lapu, kā arī 2018. un 2019. gada *Ch. angustifolium* un *D.*

moldavica tējas drogu hlorofila fluorescences mērījumus konfokālā lāzerskenējošā mikroskopā.

- Visu variantu – svaigo, 22°C, 45°C, 120°C temperatūrā dehidratēto lapu, kā arī 2018. un 2019. gada *T. pratense*, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* tējas drogu kultivēšanu MS barotnē, lai novērtētu MS barotnē ievietotajās lapās esošo cilmes šūnu dzīvotspēju, proliferāciju un fotosintēzi. Kā arī, lai noskaidrotu visu augu sugu kultivēšanai optimālo barotni un kultivēšanas laiku no 48 līdz 96 stundām.

SECINĀJUMI

1. Izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu, var novērtēt augu lapu un ziedu vainaglapu šūnu dzīvotspēju un šūnu organoīdu morfoloģiju.
2. Šūnu dzīvotspēju un organoīdu morfoloģiju var izmantot kā kritēriju drogu kvalitātes novērtēšanā, un spriest par bioloģiski aktīvo vielu esamību.
3. Izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu, var redzēt dažādu dehidratācijas temperatūru ietekmi uz lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģiju un šūnu dzīvotspēju. Pieaugot dehidratācijas temperatūrai, pieaug šūnu bojājumu pakāpe, kas izpaužas kā šūnu organoīdu izmaiņas, membrānas selektīvās caurlaidības palielinājums, programmēta nāve un nekroze.
4. *T. pratense*, *D. moldavica* un *Ch. angustifolium* drogām atbilstošā dehidratācijas temperatūra ir 22°C. Šādā temperatūrā dehidratējot augus, nevēro būtiskas lapu un ziedu vainaglapu šūnu dzīvotspējas un morfoloģijas izmaiņas.
5. Hloroplastu hlorila fluorescences metode parāda dehidratācijas temperatūras un uzglabāšanas ietekmi uz lapu šūnām. Visintensīvākā fluorescences ir *T. pratense* drogām, kas ir dehidratētas 120°C temperatūrā un uzglabātas 24 mēnešus.
6. Drogu 72 h kultivēšanas metode MS barotnē parāda dzīvotspējīgas šūnas, kas var proliferēt. Nepieciešams lielāks eksperimentu atkārtojumu skaits, lai dzīvotspējīgās šūnās novērotu mitozī.
7. Visas 2019. gadā ražošanas procesā iegūtas tējas drogas atbilst darbā izstrādātajiem kvalitātes novērtēšanas standartiem.
8. Darba 1. hipotēze, ka “dažādu augu sugu optimālos apstākļos dehidratētām un uzglabātām drogām derīguma termiņa ietvaros šūnas saglabā dzīvotspēju un proliferācijas spējas, kuras ir iespējamās dehidratācijas izraisītas anabiozes gadījumā” visām pārbaudītām sugām pilnībā apstiprinājās.
9. Darba 2. hipotēze, ka “PVO vadlīnijām neatbilstoši sagatavotām un uzglabātām drogām būs raksturīga hloroplastu un hlorofila degradācija, programmēta šūnu nāve, nekroze un mikrobioloģiskais piesārņojums, ko var pārbaudīt izmantojot fluorescentus marķierus un konfokālās lāzerskenējošās mikroskopijas metodes” visām pārbaudītām sugām pilnībā apstiprinājās.

PRIEKŠLIKUMI

1. Izmantot metožu kopumu, lai rekomendētu lapu un ziedu drogu (zāļu tēju) piemērotību praktiskai izmantošanai.
2. Optimizēt fluorescences novērtēšanas un rehidratēto paraugu kultivēšanas metodes.

PATEICĪBAS

Vēlētos izteikt pateicību Dr. biol. asoc. prof. Tūram Selgam par atbalstu, veltīto laiku un ieguldījumu maģistra darba tapšanā.

Paldies arī asoc. prof. Līgai Ozoliņai – Mollai par maģistra darba recenzēšanu.

Paldies arī pārējiem, nepieminētajiem cilvēkiem, kas veikuši tiešu vai netiešu ieguldījumu darba veikšanā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI

1. Abba D., Inabo H. I., Yakubu S. E., Olonitola O. S. 2009. Contamination of herbal medicinal products marketed in Kaduna Metropolis with selected pathogenic bacteria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 6: 70-77.
2. Abdalbasit A. G. M., Ruijin Y., Issoufou A., Xiao H. 2014. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf: effect of drying method. *Trop J Pharm Res*. 13(1): 61–65.
3. Adeyemi S. B., Ogundele K. O., Animasaun M. A. 2014. Influence of drying methods on the proximate and phytochemical composition of *Moringa oleifera* Lam. *Glob J Med Plant Res*. 2(1):1–5.
4. Akhtaruzzaman M., Ali M. R., Rahman M. M., Ahamed M. S. 2013. Drying tea in a Kilburn vibro fluid bed dryer. *J Bangladesh Agric Univ*. 11(1):153–8.
5. Alwakeel S. S. 2008. Microbial and heavy metals contamination of herbal medicines. *Research Journal of Microbiology*. 3(12): 683-691.
6. Ameisen J. C. 2004. Looking for death at the core of life in the light of evolution. *Cell Death Differ*. 11:4–10.
7. American Herbal Pharmacopoeia, 2017. http://pharmaguri.co.il/_Uploads/dbsAttachedFiles/AHPTrifoliumMonograph.pdf
8. An K. S. Ding H., Tao D., Zhao X., Wang Z., Wang, X. H. 2013. Response surface optimisation of osmotic dehydration of Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) slices. *Int. J. Food Sci. Technol*. 48:28–34.
9. Arun Prabhu R., Rajan A. P., Santhalia S. 2011. Comparative analysis of preservation techniques on *Moringa oleifera*. *Asian J Food Agro-Ind*. 4(02):65–80.
10. Asai T., Stone J. M., Heard J. E., Kovtun Y., Yorgey P., Sheen J., Ausubel F. M. 2000. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*. 12:1823–1835 96.
11. Asta J. 2020. Lichens, surprising pioneering organisms. Encyclopedia of the environment. <https://www.encycopedie-environnement.org/en/life/lichens-pioneering-organisms/>
12. Ataei A. S. M., Morteza S., Babak B., Naser H. 2015. Vibro-fluidized bed heat pump drying of mint leaves with respect to phenolic content, antioxidant activity and color indices. *Chem Ind Chem Eng Q*. 21(2):239–47.

13. Atkinson C., Compston J. E., Day N. E., Dowsett M., Bingham S. A. 2004a. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 79:326-33.
14. Babua A. K., Kumaresanb G., Aroul Raja A. V., Velraj R. 2018. Review of leaf drying: Mechanism and influencing parameters, drying methods, nutrient preservation, and mathematical models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 90: 536 – 556.
15. Baert N., Kim J., Karonen M., Salminen J. P. 2017. Interpopulation and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of *Epilobium angustifolium*. *Phytochemistry.* 134: 54- 63.
16. Baker N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology.* 59, 89–113.
17. Bansal S., Choudhary S., Sharma M., Kumar S. S., Lohan S., Bhardwaj V., Syan N., Jyot S. 2013. Tea: A nature source of antimicrobial agents. *Food research international.* 53(2):
18. Barenes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. 2007. Herbal medicines. Third edition. Published by the Pharmaceutical Press. 498-499.
19. Bartfay W. J., Bartfay E., Johnson J. G. 2012. Gram-negative and Gram-positive antibacterial properties of the whole plant extract of willow herb (*Epilobium angustifolium*). *Biol Res Nurs.* 14(1): 85-9.
20. Battinelli L., Tita B., Evandri M. G., Mazzanti G. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *Il Farmaco.* 56: 345-348.
21. Bei G., Xiaoshuang L., Daoyuan Z., Yuqing L., Honglan Y., Moxian C., Yuanming Z., Jianhua Z., Andrew J. W. 2017. Desiccation tolerance in bryophytes: The dehydration and rehydration transcriptomes in the desiccation-tolerant bryophyte. *Bryum argenteum. Scientific Reports.* 7:7571.
22. Bent S. 2008. Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation. *J Gen Intern Med.* 23(6): 854–859.
23. Boccara M., Schwartz W., Guiot E., Vidal G., De Paepe R., Dubois A., Boccara A.C. 2007. Early chloroplastic alterations analysed by optical coherence tomography during a harpin-induced hypersensitive response. *Plant J.* 50(2):338-46.
24. Bogers R. J., Craker L. E., Lange D. et al. 2006. Medicinal and Aromatic Plants. *Springer.* 237-252.
25. Borchardt J. R., Wyse D. L., Sheaffer C. C., Kauppi K. L., Fulcher R. G., Ehlke N. J., Biesboer D. D., Fulcher R. G. 2008. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *J Med Plants Res.* 2(5): 98-110.

26. Bugno A., Almodovar A. A. B., Pereira C. A., Andreoli Pinto T., Sabino, M. 2006. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Journal of Microbiology*. 37: 47-51.
27. Carvalho R. C., Catala M., Silva J. M., Branquinho C., Barreno E. 2012. The impact of dehydration rate on the production and cellular location of reactive oxygen species in an aquatic moss. *Ann Bot*. 110 (5): 1007 – 1016.
28. Chan E. W. C., Lim Y. Y., Wong S. K., Lim K. K., Tan S. P., Lianto F. S., Yong M. Y. 2009. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and of ginger species. *Food Chem*. 113:166–72.
29. Chandana B. C., Kumari Nagaveni H. C., Heena M. S., Shashikala S., Kolakar D., Lakshmana D. 2018. Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 246 – 251.
30. Chen G., Mujumdar A. S. 2006. Drying of herbal medicines and tea. Handbook of industrial drying. Third edition LLC: CRC Press.
31. Chen W. R., Zheng J. S., Li Y. Q., Guo W. D. 2012. Effects of high temperature on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, chloroplast ultrastructure, and antioxidant activities in fingered citron. *Russian Journal of Plant Physiology*. 59: 732–740
32. Claxton N. S., Fellers T. J., Davidson M. W. 2006. Florida: The Florida State University, Department of Optical Microscopy and Digital Imaging. National High Magnetic Field Laboratory. 37.
33. Cooder D. M. 2001. Assesement of cell viability. *Curr Protoc Cytom*. Chapter 9: Unit 9.2.
34. Coskun D., Britto D. T., Yuel-Kai J., Schulze L. M., Becker A., Kronzucker H. J. 2012. Silver ions disrupt K⁺ homeostasis and cellular integrity in intact barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany*. 63 (1) 151–162.
35. Courtland R. 2008. Water bears' are first animal to survive space vacuum. *Current Biology*. <https://www.newscientist.com/article/dn14690-water-bears-are-first-animal-to-survive-space-vacuum/>
36. Daems F., Decruyener V., Agneessens R., Lognany G., Romnee J. M., Froidmont E. 2016. Changes in the isoflavone concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) during ensiling and storage in laboratory-scale silos. *Anim Feed Sci Technol*. 217: 36-44.
37. Danso-Boateng E. 2013. Effect of drying methods on nutrient quality of basil (*Ocimumviride*) leaves cultivated in Ghana. *Int Food Res J*. 20(4):1569–73.

38. Davay M. W., Von –Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A. et al. 2002. Plant L – ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric.* 80: 825 – 860.
39. Debabandya M., Kumar G. S., Suresh P., Abhijit K., Prabhat K. N. 2014. Vacuum-microwave drying characteristics of spearmint leaves. *J Food Res Technol.* 2(2):87–92.
40. Denecker G., Vercammen D., Declecq W., Vandenabeele P. 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci.* 58(3): 356 – 370.
41. Diamond M., Reape T. J., Rocha O., Doyle S. M., Kacprzyk J., Doohan F. M., McCabe P. F. 2013. The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol can inhibit plant apoptosis-like programmed cell death. *PLoS ONE.* 8: e69542.
42. Dominguez F, Cejudo F. J. 2014. Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Front Plant Sci.* 5:366.
43. Ducrey B., Marston A., Goehring S., Hartmann R. W., Hostettman K. 1997. Inhibition of 5-alpha-reductase and aromatase by the ellagitannins oenothin A and oenothin B from *Epilobium*. *Planta Medica.* 63: 111-114.
44. Dwivedy S., Rayaguru K., Sahoo G. R. 2012. Effect of drying methods on quality characteristics of medicinal Indian borage (*Coleus aromaticus*) leaves. *J Food Process Technol.* 3(11).
45. Dziki D., Mis A., Gladyszewska B., Laskowski J., Kwiatkowski I. S., Gawlik –Dziki U. 2013. Physicochemical and grinding characteristics of dragonhead seeds. *International Agrophysics.* 27: 403-408.
46. Dzyubinskaya E. V., Kiselevsky D. B., Bakeeva L. E., Samuilov V. D. 2006. Programmed cell death in plants: effects of protein synthesis inhibitors and structural changes in pea guard cells. *Biochem (Moscow).* 71:395–405.
47. Ebadi M.T., Azizi M., Sefidkone F., Ahmadi N. 2015. Influence of different drying methods on drying period, essential oil content and composition of *Lippiacitriodora* Kunth. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 182 – 187.
48. Ehsanpour S., Salehi K., Zolfaghari B., Bakhtiari S. 2012. The effects of red clover on quality of life in post-menopausal women. *Iran J Nurs Midwifery Res.* 17: 34-40.
49. Elmore S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495 – 516.
50. EMA, 2019. *Epilobii herba.* <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/epilobiiherba>, Accessed date: 20 September 2019.

51. Engelhardt R. F., Riedl C. R. 2008. Effects of One-Year Treatment with Isoflavone Extract from Red Clover on Prostate, Liver Function, Sexual Function, and Quality of Life in Men with Elevated PSA Levels and Negative Prostate Biopsy Findings. *Urology*. 71(2):185-90.
52. European Pharmacopoeia. 6th edition. 2007. https://estudijas.lu.lv/pluginfile.php/398133/mod_resource/content/1/2008_6th_Edition_6.0_Volume_1_E.pdf
53. Feng H, Yin Y., Tang J. 2012. Microwave drying of food and agricultural materials: basics and heat and mass transfer modeling. *Food Eng Rev*. 4(2):
54. Festjens N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 1757:1371–1387.
55. Francesco M., Zhang Lu., Lyng J. G. 2009. Radio frequency treatment of foods: review of recent advances. *J Food Eng*. 91:497–508.
56. Gadjev I., Stone J. M., Gechev T. S. 2008. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Int Rev Cell Mol Biol*. 270: 87-144.
57. Garcia-Pascual P., Sanjuan N., Bon J., Carreres J. E., Mulet A. 2005. Rehydration process of *Boletus edulis* mushroom: characteristics and modelling. *J. Sci. Food Agric*. 85:1397–1404.
58. Genoud T., Buchala A. J., Chua N. H., Métraux J. P. 2002. Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *Plant J*. 31:87–95.
59. GidadoLiman M., Abdullahi A. S., Maigoro A. A. L., Umar K. 2014. Effects of three drying techniques on mineral composition of some leafy garden vegetables. *IOSR J Appl Chem*. 7(1 Ver.11):38–42.
60. Golstein P., Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 32: 37–43.
61. Gonzaga de Freitas Araujo M., Bauab T. M. 2012. Microbial quality of medicinal plant materials. Latest Research into Quality Control, Isin Akyar, IntechOpen.
62. Gorakh W. S., Ramchandra P. K., Ramling T. 2017. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria ananassa*) var. Camarosa. *Global Journal of Bioscience and Biotechnology*. 6 (2): 309–13.
63. Gounden T., Moodley R., Jonnallaqadda S. B. 2018. Elemental analysis and nutritional value of edible *Trifolium* (clover) species. *J Environ Sci Health B*. 53 (8):487-492.

64. Guo Y.P., Zhou H.F., Zhang L.C. 2006. Photosynthetic Characteristics and Protective Mechanisms against Photooxidation during High Temperature Stress in Two Citrus Species. *Sci. Hort.* 108: 260–267.
65. Gutierrez J., Gonzalez-Perez S., Garcia-Garcia F., Daly C. T., Lorenzo O., Revuelta J. L., McCabe P. F., Arellano J. B. 2014. Programmed cell death activated by Rose Bengal in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures requires functional chloroplasts. *J Exp Bot.* 65:3081-95.
66. Gyamfi E. T., Kwarteng I. K., Ansah M.O., Anim A.K., Ackah M., Lebene K., Bentil N. O. 2011. Effects of processing on *Moringa oleifera*. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci.* 1(3–4):179–85.
67. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E. M. 2012. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Second Edition. Elsevier.
68. Hidalgo L. A., Chedraui P. A, Morocho N., Ross S., San Miguel G. 2005. The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Gynecol Endocrinol.* 21: 257-64.
69. Idu M., Erhabor J. O., Idele S. O. 2011. Microbial load of some medicinal plants sold in local markets of Benin City, Nigeria. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* 1(3): 272-277.
70. Jackson M., Ford-Lloyd B., Parry M. 2014. High temperature stress. CAB International 2014. Plant Genetic Resources and Climate Change 201.
71. Jamshidi-Kia F., Lorigooini Z., Amini-Khoei H. 2018. Medicinal plants: Past history and future perspective. *J Herbmed Pharmacol.* 7(1): 1-7.
72. Jarred R.A. et al. 2002. Induction of apoptosis in low to moderate-grade human prostate carcinoma by red clover-derived dietary isoflavones. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention.* 11: 1689–1696.
73. Jones L., McQueen-Mason S. 2004. A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Lett.* 559 (1-3):61-5.
74. Jonsson K. L., Rabbow E., Schill, R. O. Harms-Ringdahl M., Rettberg P. 2008. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology.* 18 (17): R729–R731.
75. Kakasy A. Z., Lemberkovics É. Simándi B., Lelik L., Héthelyi É., Antal I., Shoke E. 2006. Comparative study of traditional essential oil and supercritical fluid extracts of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Flavour Fragr J.* 21(4): 598-603.

76. Kārklīņa V., Kulamena V. 2017. Augu hidrolāti veselībai, labsajūtai un uzturam. Liepāja: LiePa, 244.
77. Kaškonienė V., Maruška A., Akuņeca I., Stankevičius M., Ragažinskienė O., Bartkuvienė V. et al. 2016. Screening of antioxidant activity and volatile compounds composition of *Chamerion angustifolium* (L.) Holub ecotypes grown in Lithuania. *Nat Prod Res.* 30(12): 1373-81.
78. Keikhaie K.R., Jahantigh H.R., Bagheri R., Kehkhaie A. R. 2018. The effects of the ethanol extract of *Dracocephalum moldavica* (Badrashbu) against strains of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Infection.* 5: e65295.
79. Kianinodeh F., Tabatabaei S. M., Alibakhshi A., Gohari M., Tari K. 2017. Anti-tumor Effects of Essential Oils of Red Clover and Ragweed on MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Multidiscip Cancer Invest.* 1:4.
80. Kim C., Meskauskiene R., Zhang S., Lee K. P., Lakshmanan- Ashok M., Blajacka K., Herrfurth C., Feussner I., Apel K. 2012. Chloroplasts of *Arabidopsis* are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *Plant Cell.* 24:3026-39.
81. Kiss A., Kowalski J., Melzig M. F. 2006. Effect of *Epilobium angustifolium* L. extracts and polyphenols on cell proliferation and neutral endopeptidase activity in selected cell lines. *Pharmazie.* 61: 66-6.
82. Kolodziejczyk – Czepas J. 2012. *Trifolium* species – derived substances and extracts – biological activity and prospects for medicinal applications. *J Ethopharmacol.* 143: 14-23.
83. Kosalec I., Cvek J., Tomic S. 2009. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology.* 60: 485-501.
84. Krenn L., Paper D.H., 2009. Inhibition angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine.* 16: 1083–1088.
85. Krokida M. K., Marinos-Kouris D. 2003. Rehydration kinetics of dehydrated products. *J. Food Eng.* 57:1–7.
86. Kulshrestha R., Gupta C. P., Shukla G., Kundu M. G., Bhatnagar S. P., Katiyar C. K. 2008. The effect of water activity and storage temperature on the growth of *Aspergillus flavus* in medicinal herbs. *Planta Medica.* 74: 1308-1315.
87. Kunle O. F., Egharevba H. O., Ahmadu P. O. 2012. Standardization of herbal medicines- A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation.* 4: 101-112.

88. Kusturee J., Mudtapha Y., Phadungsak R. 2010. Design and analysis of the commercialized drier processing using a combined unsymmetrical double-feed microwave and vacuum system (case study: tea leaves). *Chem Eng Process.* 49:89–95.
89. Lakimova E. T., Woltering E. J. 2018. The wound response in fresh-cut lettuce involves programmed cell death events. *Protoplasma.* 255(4): 1225–1238.
90. Laloi C., Apel K., Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol.* 7:323–328.
91. Lam A.N.C. et al. 2004. Effect of red clover isoflavones on COX-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. *Nutrition and Cancer.* 49: 89–93.
92. Lam E. 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(4): 305 – 315.
93. Lemeziene N., Padarauskas A., Butkute B., Ceseviciene J., Taujenis L., Norkeviciene E., Mikaliuniene J. 2015. The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage. *Zemdirbyste- Agriculture.* 102: 443-8.
94. Lesuisse D., Berjonneau J., Ciot C., Devaux P., Doucet B., Gourvest J. F., Khemis B. Lang, C., Legrand R., Lowinsk M., Maquin P., Parent A., Schoot B., Teutsh G. 1996. Determination of oenothem B as the active-5-alpha-reductaseinhibiting principle of the folk medicine *Epilobium parviflorum*. *J Nat Prod.* 59:490-492.
95. Lewicki P. P., Pawlak G. 2003. Effect of Drying on Microstructure of Plant Tissue. *Drying Technology.* 21(4): 657 – 683.
96. Lipovac M. et al. 2011. Effect of red clover isoflavones over skin, appendages, and mucosal status in postmenopausal women. *Obstetrics and Gynecology International.* 2011:949302.
97. Locato V., De Gara L., 2018. Programmed Cell Death in Plants: An Overview. *Methods Mol Biol.* 1743: 1 – 8.
98. Lu. Y., Hu Y., Snyder R. S., Kent E. R. 2019. Tea leaf's microstructure and ultrastructure response to low temperature in indicating critical damage temperature. *Information processing in Agriculture.* 6(2): 247 – 254.
99. Luther W. R., Suter Dwayne A., Brusewitz Gerald H. 2004. Drying and dehydration. Chapter 10F in food & process engineering technology: 259–284. St. Joseph, Michigan: ASAE© American Society of Agricultural Engineers.
100. Manach C., Scalbert A., Morand Ch., Rémésy Ch., Jime´nez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727–47.
101. Martínez-Vázquez M., Estrada-Reyes R., MartínezLaurrabaquio A., López-Rubalcava C., Heinze G. 2012. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L.

- (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 141(3):908-17.
102. Martins H. M., Martins M. L., Dias M. I., Bernardo F. 2001. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. *International Journal of Food Microbiology.* 68, 149-153.
103. Melbārde – Vāvere R. 2018. Piparmētras lapu drogu kvalitātes kontrole izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu. Maģistra darbs. Rīga. 2018. 63 lpp.
104. Mueller M., Hobiger S., Jungbauer A. 2010. Red clover extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide – stimulated macrophages. *Menopause.* 17:379-87.
105. Mullineaux P. M., Baker N. R. 2010. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiol.* 154:521–525 94.
106. Mullineaux P., Karpinski S. 2002. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr Opin Plant Biol.* 5:43–48.
107. Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum.* 15 (3): 473–497.
108. Murchie E. H., Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany.* 64 (13): 3983–3998.
109. Najafi M., Ghasemian E., Fathiazad F., Garjani A. 2009. Effects of total extract of *Dracocephalum moldavica* on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and infarct size in the isolated rat heart. *Iran J Basic Med Sci.* 11(4): 229-35.
110. Nantawan T., Weibiao Z. 2009. Characterization of microwave vacuum drying and hot air drying of mint leaves (*Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen). *J Food Eng.* 91:482–9.
111. Nascimbene J., Nimis P. L. 2006. Freshwater lichens of the Italian Alps: a review. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 42 (1), 27-32.
112. Negi P. S., Roy S. K. 2001. Effect of drying conditions on quality of green leaves during long term storage. *Food Res Int.* 34:283–7.
113. Nhut D. T., Nguyen T. D., Nguyen V. H. 2006. Advanced technology in micropropagation of some important plants.
114. Nikitina S. A., Popova O. I., Ushakova L. S., Chmakova V. V., Ivanova L. I. 2008. Studies of the essential oil of *Dracocephalum moldavica* cultivated in the stavropol region. *Pharm Chem J.* 42(6):351-3.

- 115.Okpala L. C., Ekechi A. C. 2014. Rehydration characteristics of dehydrated West African pepper (*Piper guineense*) leaves. *Food Sci Nutr.* 2(6): 664–668.
- 116.Omasa K., Konishi A., Tamura H., Hosoi F. 2009. 3D Confocal Laser Scanning Microscopy for the Analysis of Chlorophyll Fluorescence Parameters of Chloroplasts in Intact Leaf Tissues. *Plant Cell Physiol.* 50(1): 90–105.
- 117.Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095410916>
- 118.Paddock S. W. Fellers T. J., Davidson, M. 2018. Introductory Confocal Concepts. Available from: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts>
- 119.Pereira R. R., Evandro de Castro M., Jacinto D. M., Lourenco R. L., Heder B. 2012. Effect of drying air velocity on the quality of essential oil from lemon grass. *Glob Sci Technol.* 05(01):23–31.
- 120.Phillipson J. D. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry.* 56(3):237-43.
- 121.Poomsa-ad N., Deejing K., Wiset L. 2011. Performance of heat pump dryer for Kaffir lime leaves and quality of dried products under different temperatures and media. *World Acad Sci Eng Technol.* 5.
- 122.Potisate Y., Phoungchandang S., Kerr W. L. 2014. The effects of predrying treatments and different drying methods on phytochemical compound retention and drying characteristics of Moringa leaves (*Moringaoleifera* Lam.). *Dry Technol: Int J.* 32(16):1970–85.
- 123.Prasad K., Manohar P., Kavita Y. 2018. A Review on Phytopharmacopial Potential of *Epilobium angustifolium*. *Pharmacog J.* 10(6):1076-8.
- 124.Pūtaiao P. A. 2013. Vegetative plant propagation. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1662-vegetative-plant-propagation>.
- 125.Qasem A., Hussam M., Enrique B. C., Vicente M., Mulet A., Vicente J., Pérez G. 2013. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Res Int.* 50:189–96.
- 126.Rabeta M., Lai S. 2013. Effects of drying, fermented and unfermented tea of *Ocimumtenuiflorum* Linn. on the antioxidant capacity. *Int Food Res J.* 20: 1601–1608.
- 127.Ramchandra Pawar, K., Waghmare, S. G., Tabe, R., Patil, A., Ambavane, A. R. 2017. In vitro regeneration of *Saccharum Officinarum* var. co 92005 using shoot tip explant. *International Journal of Science and Nature.* 8 (1): 154 – 157.

- 128.Ramos G. P., Apel M. A., Morais C., Ceolato P. C., Schapoval E. E. S., Agnol M. D., Zuanazzi J. A. S. 2012. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of red clover *Trifolium pratense* dry extract. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22(1): 176-180.
- 129.Rasool Hassan, B. A. 2012. Medicinal plants (importance and uses). *Pharmaceut Anal Acta*. 3:10.
- 130.Ravikumar Ch. 2014. Review on Herbal Teas. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6 (5): 236 – 238.
- 131.Reape T. J., Molony E. M., McCabe P. F. 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J Exp Bot*. 59(3): 434 – 444.
- 132.Rijke E., Zafra-Gomez A. Ariese F., Brinkman U. A., Gooijer C. 2001. Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. *J Chromatog*. 932: 52-64.
- 133.Rocha R. P., Melo E. C., & Radünz L. L. 2011. Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(33): 7076-7084.
- 134.Rogers D. R., 2014. Fireweed - a treasured medicine of the boreal forest. *Discovery Phytomedicine*. 1: 10 – 15.
- 135.Roshanak S., Rahimalek M., Hossein Goli S. A. 2016. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. *J Food Sci Technol*. 53(1):721–729.
- 136.Rubine H., Eniņa V. 2004. Ārstniecības augi. Ieteikumi ārstniecības augu vākšanā un lietošanā. Apgāds: Zvaigzne ABC, Rīga. 344 lpp.
- 137.Sablowski R., Dornelas C. M. 2013. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of Experimental Botany*. 65 (10): 2703–2714.
- 138.Sagrin S. M., Chong G. H. 2013. Effects of drying temperature on the chemical and physical properties of *Musa acuminata* Colla (AAA group) leaves. *Ind Crops Prod*. 45:430–4.
- 139.Sallon S. E., Cohen Y., Korchinsky R., Egli M, Woodhatch I., Simchoni O., Kislev M. et al. 2008. *Germination, Genetics, and Growth of an Ancient Date Seed*. *Science*. 320 (5882): 1464.
- 140.Samuilov V. D., Lagunova E. M., Dzyubinskaya E. V., Izyumov D. S., Kiselevsky D. B., Makarova Y. V. 2002. Involvement of chloroplasts in the programmed death of plant cells. *Biochem Biokhimiia*. 67:627-34.

141. Samuilov V. D., Lagunova E. M., Kiselevsky D. B., Dzyubinskaya E. V., Makarova Y. V., Gusev M. V. 2003. Participation of chloroplasts in plant apoptosis. *Biosci Rep.* 23:103-17.
142. Saviranta N. M., Anttonen M. J., von Wright A., RO K. 2008. Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part, and cultivar. *J Sci Food Agr.* 8: 125-32.
143. Schepetkin I. A., Ramstead A. G., Kirpotina L. N., Voyich J. M., Jutila M. A., Quinn M. T. 2016. Therapeutic Potential of Polyphenols from *Epilobium Angustifolium* (Fireweed). *Phytotherapy research.* 30(8):1287-1297.
144. Schmalko M. E., Scipioni P. G., Ferreyra D. J. 2005. Effect of water activity and temperature in color and chlorophylls changes in Yerba mate leaves. *Int J Food Prop.* 8(2):313–22.
145. Scott P. 2000. Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany.* 85: 159 – 166.
146. Seo S., Okamoto M., Iwai T., Iwano M., Fukui K., Isogai A., Nakajima N., Ohashi Y. 2000. Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. *Plant Cell.* 12:917–932.
147. Shaw M., Meda V., Tabil Jr. L., Opoku A. 2007. Drying and color characteristics of coriander foliage using convective thin layer and microwave drying. *J Microw Power Electromagn Energy.* 41(2): 59-68.
148. Singh P., Singh S., Singh B. R., Singh J., Singh S. K. 2014. The drying characteristics of amaranth leaves under greenhouse type solar dryer and open sun. *Greener J Agric Sci.* 4(6):281–7.
149. Snow J. Inc/ DELIVER in collaboration with the World Health Organization. 2003. 57 page. Guidelines for the Storage of Essential Medicines and Other Health Commodities. <https://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4885e/s4885e.pdf>
150. Sorensen D. C. 2019. Plant propagation. [https://extension.umaine.edu/gardening/manual/propagation/plant-propagation\](https://extension.umaine.edu/gardening/manual/propagation/plant-propagation/)
151. Stevic T., Pavlovic S., Stankovic S., Savikin K. 2012. Pathogenic microorganisms of medicinal herbal drugs. *Archives of biological sciences.* 64(1): 49-58.
152. Sultan A., Bahang Aisa H. A., Eshbakova K. A. 2008. Flavonoids from *Dracocephalum moldavica*. *Chem Nat Compd.* 44(3):366-7.
153. Sun Y., Liu T., Dai X., Jiang Z., Gao Z., Zhang M., Wang D., Zheng Q. 2014. Neuroprotective effect of *Dracocephalum moldavica* L. total flavonoids in transient cerebral ischemia in rats. *Annual Research and Review in Biology.* 4: 1915-1926.

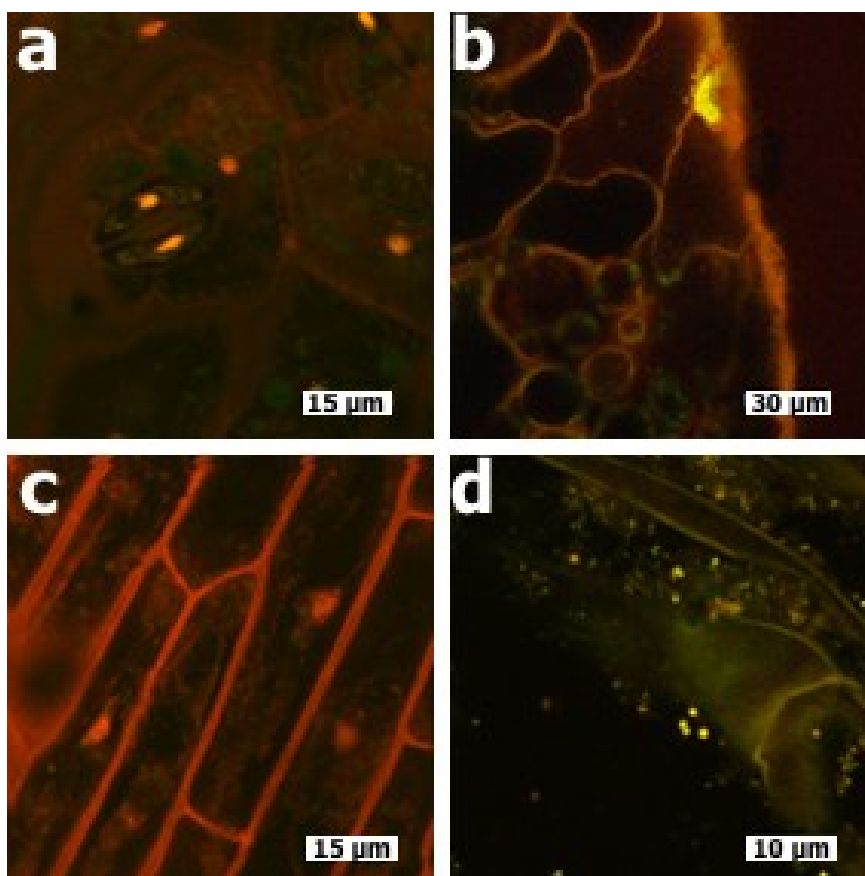
- 154.Swinny E. E., Ryan K. G. 2005. Red clover *Trifolium pratense* L., phytoestrogens: UV-B radiation increases isoflavone yield, and postharvest drying methods change glucoside conjugate profiles. *J Agric Food Chem.* 53: 8273-8.
- 155.Taavoni S., Shakeri F., Haghani H. Gooshegir S. 2012. Effect of red clover on vasomotor symptoms and heart discomfort of menopausal women. *CMJA.* 3: 32-40.
- 156.Takuya K., Yoko T., Mari S., Toshimichi F., Yukikazu Y. 2009. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morusalba* L.) leaves. *Food Chem.* 113:964–9.
- 157.Tea Board India. Quality Control Laboratory. 2020. <http://www.teaboard.gov.in/TEABOARDPAGE/MjJwNQ==>
- 158.Terzic M. M., Dotlic J., Maricic S., Mihailovic T., Tosic-Race B. 2009. Influence of red clover-derived isoflavones on serum lipid profile in postmenopausal women. *J. Obstet. Gynaecol.* 35(6): 1091–1095.
- 159.Tiwari A. 2016. A review on solar drying of agricultural produce. *J Food Process Technol.* 7:623.
- 160.Tomaszewski D., Górzowska A. 2016. Is shape of a fresh and dried leaf the same? *PLoS One.* 11(4):e0153071.
- 161.Trump B. F., Berezesky I. K., Chang S. H., Phelps P. C. 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol.* 25(1): 82 – 88.
- 162.Tsai R., Papadopoulos Y., Yang R., Young J. C., McRae K. 2006. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *J Agric Food Chem.* 54: 5797-805.
- 163.Tuncay G., Vedat D., Ebru H., Arif H. 2005. Mathematical modelling of drying of bay leaves. *Energy Convers Manag.* 46:1667–79.
- 164.Uzunova-Doneva T., Donev T. 2004 – 2005. Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of culture collections.* 4.(1): 17 – 28.
- 165.Vaivare M., Lūkina B., Kučere A. 2006. Labas higiēnas prakses vadlīnijas kaltētu garšaugu, tējas un ārstniecības augu pirmapstrādei, pārstrādei un realizācijai bioloģiskajā lauksaimniecībā. Latvijas Bioloģiskās lauksaimniecības asociācija. https://www.zm.gov.lv/public/files/CMS_Static_Page_Doc/00/00/00/19/83/vadl_3_kal_tetas_tejas.pdf
- 166.Verma S., Singh S. P. 2008. Current and future status of herbal medicines. *Vet World.* 1(11):347-50.
- 167.Wilkinson S., Davies W. J. 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment.* 25, 195–210.

168. World Health Organization. 2003. WHO guidelines on good Agricultural and Collection practices (GACP) for medicinal plants. <https://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4928e/s4928e.pdf>
169. World Health Organization. 2007. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. 118 pages. <http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s14878e/s14878e.pdf>
170. World Health Organization. 2011. Quality control methods for herbal materials. 187 pages. <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>
171. World Health Organization. 2018. WHO guidelines on good herbal processing practices for herbal medicines. 72 pages. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23449en/s23449en.pdf>
172. Xiangyang L., Lijing Z., Hanwu L., Hong Z., Yanling Ch., Rongbi Z. et al. 2010. Effect of drying technologies on quality of green tea. *Int Agric Eng J.* 19(3).
173. Yang L.N., Xing J.G., He CH., Wu T. 2014. The phenolic compounds from *Dracocephalum moldavica* L. *Biochem Syst Ecol.* 54:19–22.
174. Zainab O., Taiwo A. Ch., Babatunde O., Aderoju A. A. 2015. Effects of drying temperature on the nutrients of *Moringa (Moringaoleifera)* leaves and sensory attributes of dried leaves infusion. *Direct Res J Agric Food Sci (DRJAFS)*. 3(5):117–22.
175. Zeier J., Pink B., Mueller M. J., Berger S. 2004. Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta.* 219:673–683.
176. Zeiss C. J., 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 40(3): 481 – 495.
177. Zeng Q., Jin H. Z., Fu J. J., Qin J. J., Hu X. J., Liu J. H. 2010. Chemical constituents of plants from the genus *Dracocephalum*. *Chem Biodivers.* 7(8):1911- 29.
178. Zhang S., Apel K., Kim C. 2014. Singlet oxygen-mediated and Executer -dependent signalling and acclimation of *Arabidopsis thaliana* exposed to light stress. *Philosophical Trans Royal Soc London Series B, Biol Sci.* 369:20130227.
179. Zurbriggen M. D., Carrillo N., Hajirezaei M. R. 2010. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signaling Behav.* 5:393- 6.

PIELIKUMI

Svaigu *D. moldavica* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

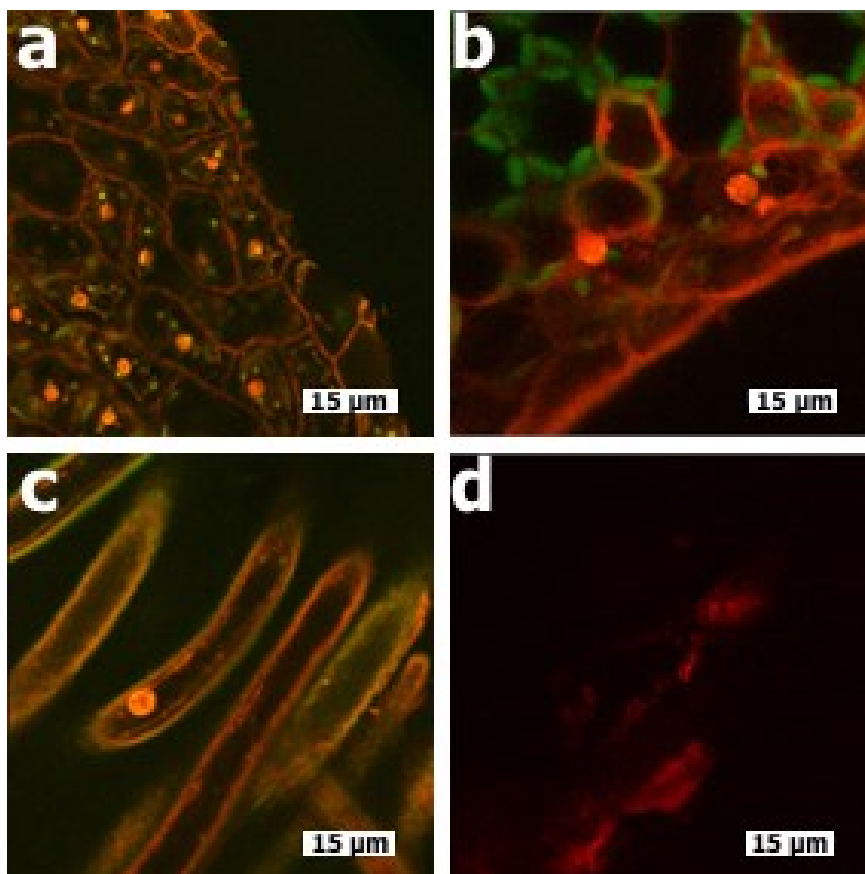
Morphology of fresh *D. moldavica* leaf and flower petal cells



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

Svaigu *Ch. angustifolium* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

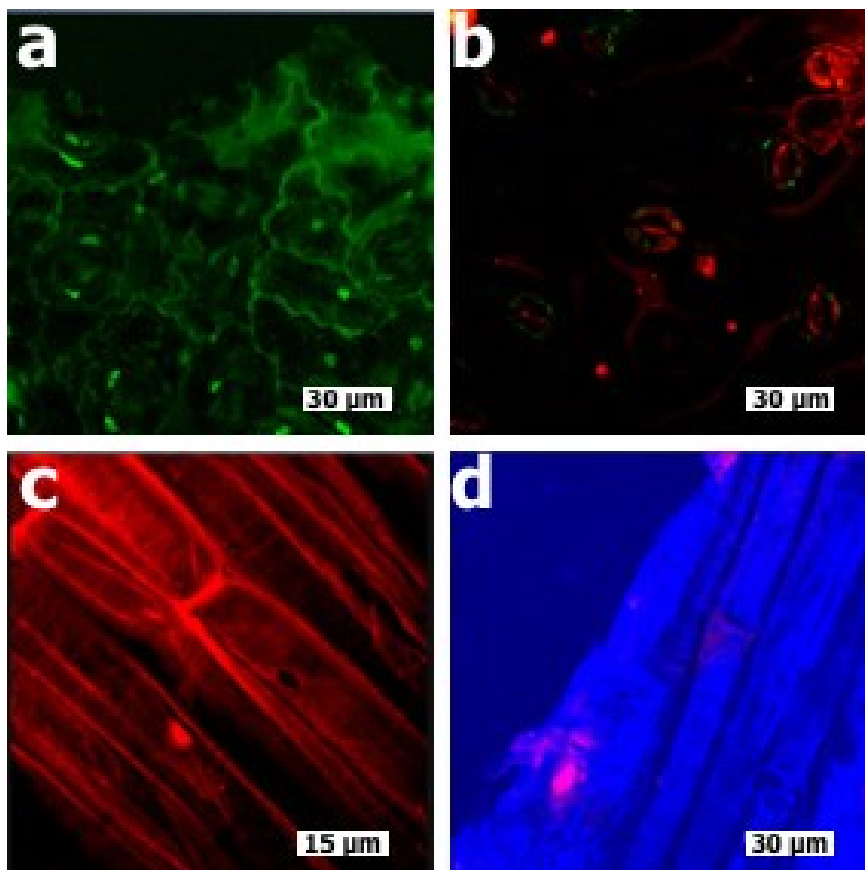
Morphology of fresh *Ch. angustifolium* leaf and flower petal cells



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

22° C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *D. moldavica* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

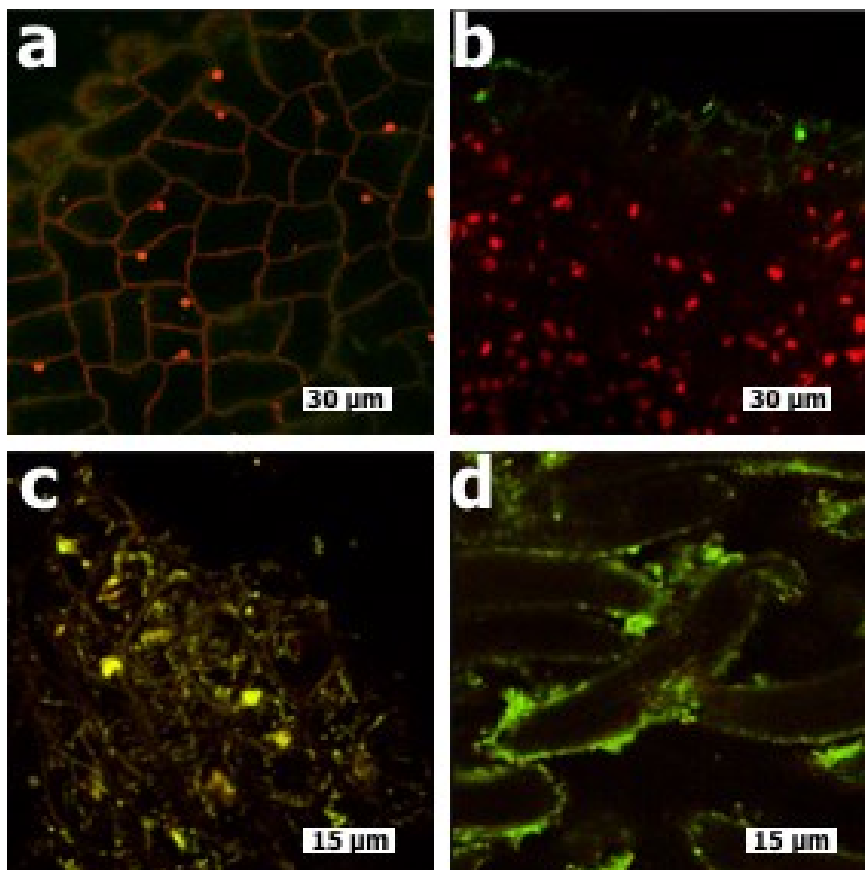
Morphology of *D. moldavica* leaf and flower petal cells dehydrated at 22° C and 2h rehydrated



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

22° C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *Ch. angustifolium* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

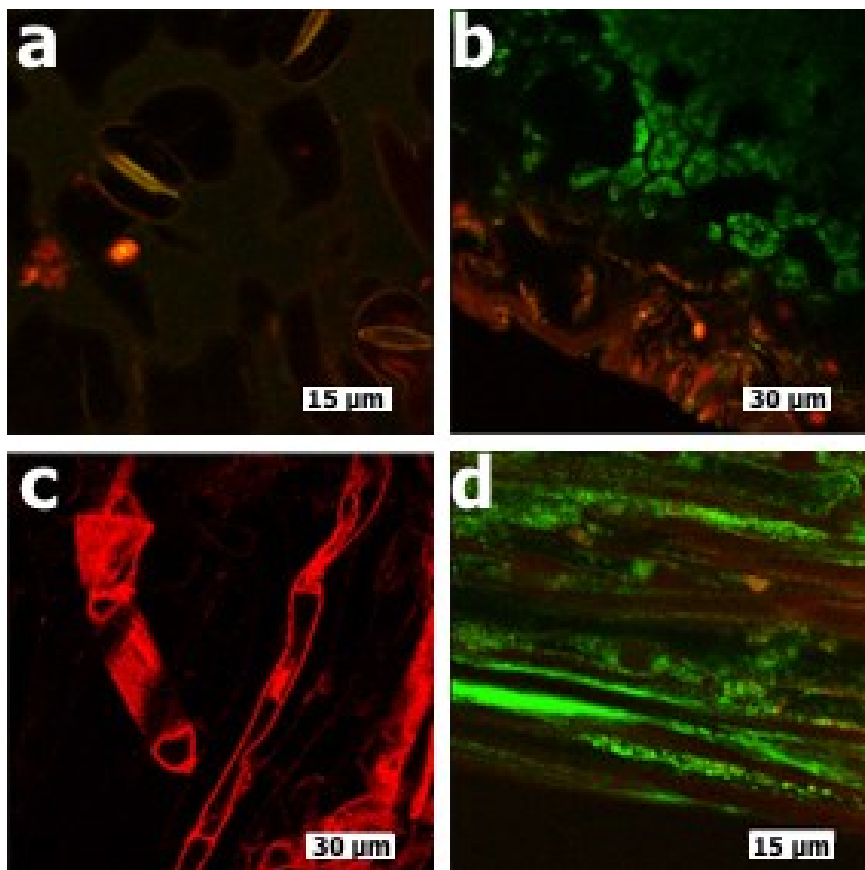
Morphology of *Ch. angustifolium* leaf and flower petal cells dehydrated at 22° C and 2h rehydrated



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

45° C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *D. moldavica* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

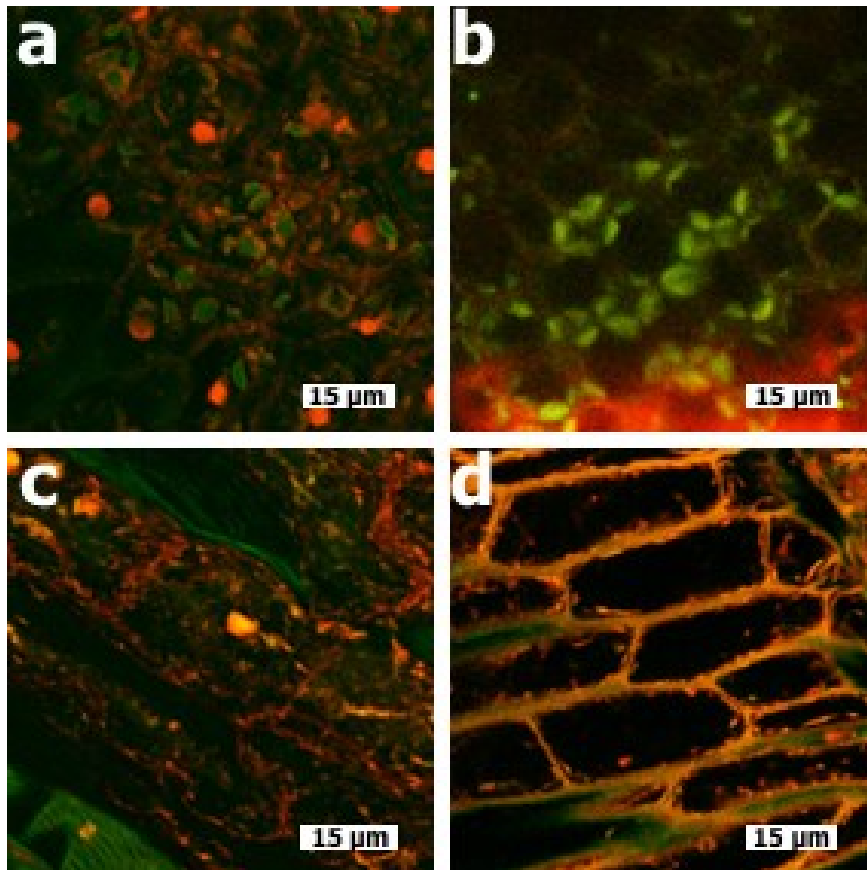
Morphology of *D. moldavica* leaf and flower petal cells dehydrated at 45° C and 2h rehydrated



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

45° C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *Ch. angustifolium* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

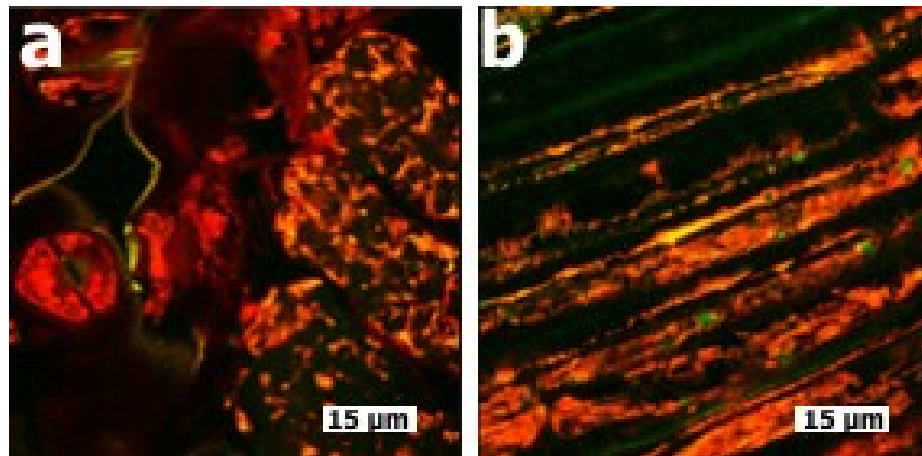
Morphology of *Ch. angustifolium* leaf and flower petal cells dehydrated at 45° C and 2h rehydrated



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

120° C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *D. moldavica* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

Morphology of *D. moldavica* leaf and flower petal cells dehydrated at 120° C and 2h rehydrated

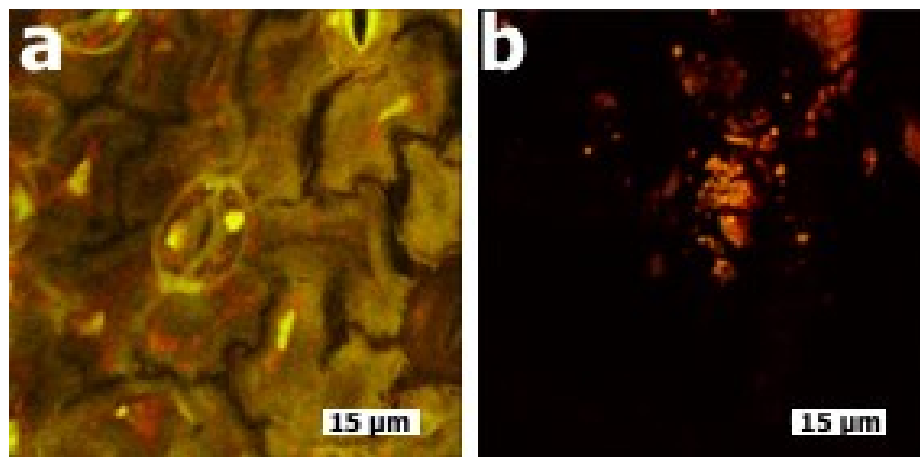


a – fiksētas lapas šūnas, b – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

8. pielikums

120° C temperatūrā dehidratētu un 2h rehidratētu *Ch. angustifolium* lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

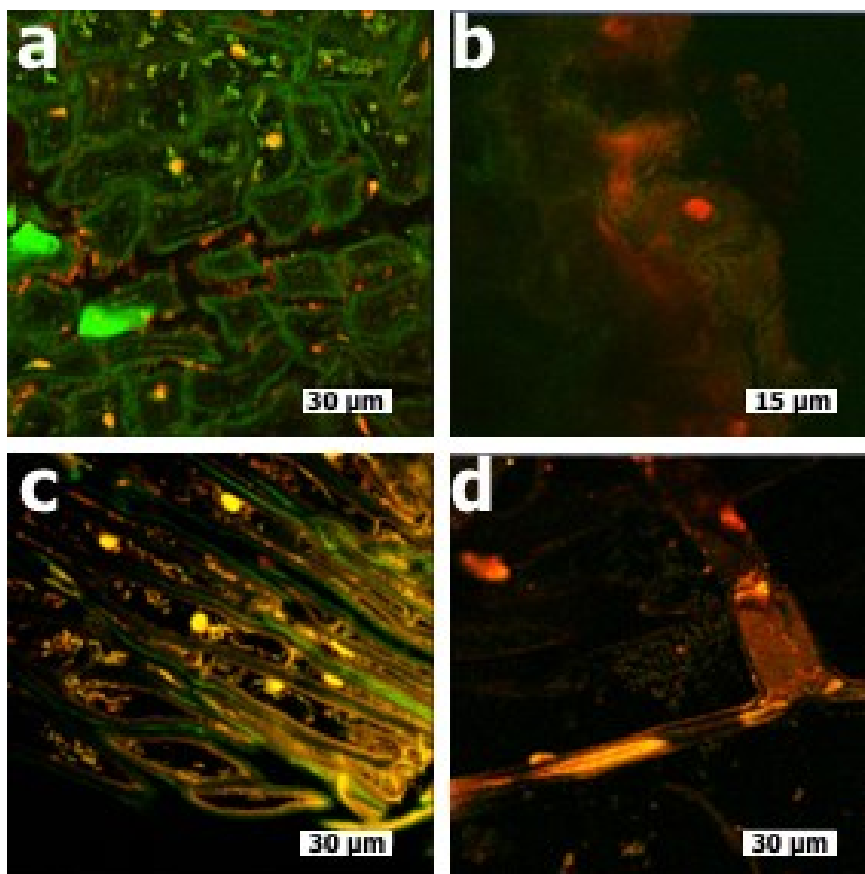
Morphology of *Ch. angustifolium* leaf and flower petal cells dehydrated at 120° C and 2h rehydrated



a – fiksētas lapas šūnas, b – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

2018. gada *D. moldavica* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

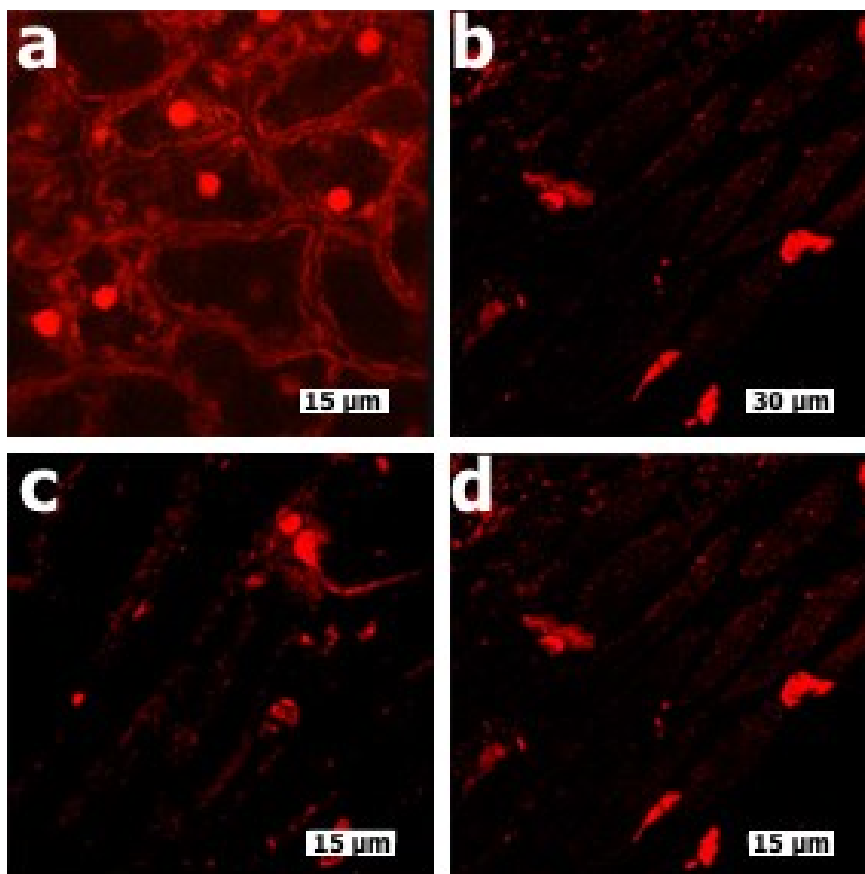
Cell morphology of *D. moldavica* 2018 year tea leaves and flower petal



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

2018. gada *Ch. angustifolium* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

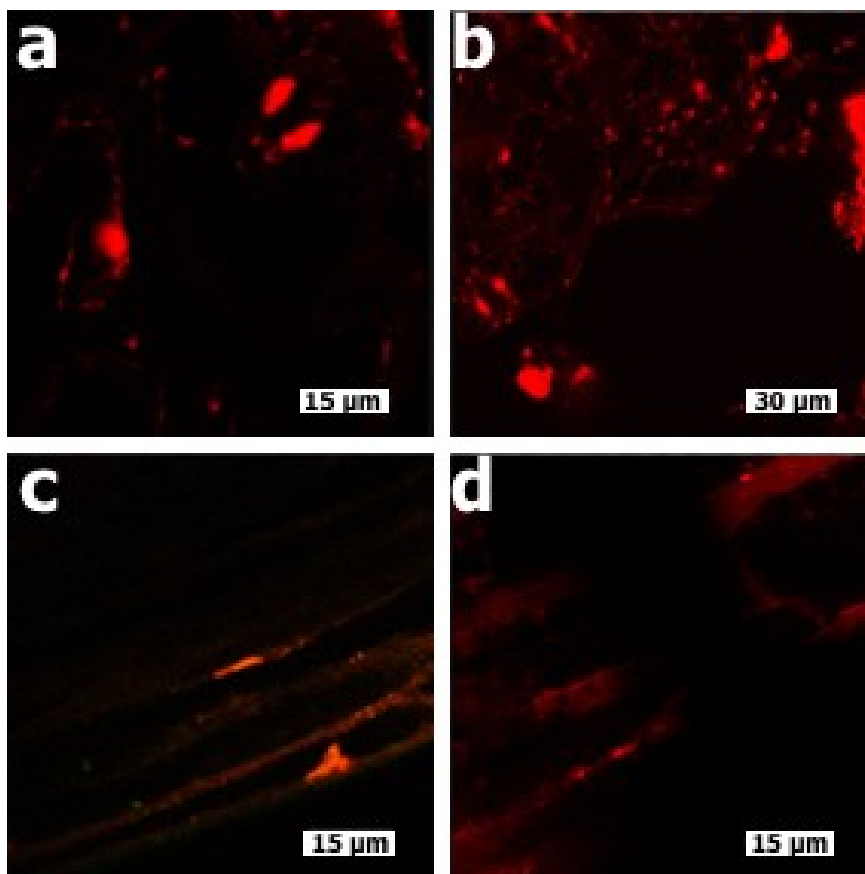
Cell morphology of *Ch. angustifolium* 2018 year tea leaves and flower



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

2019. gada *D. moldavica* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

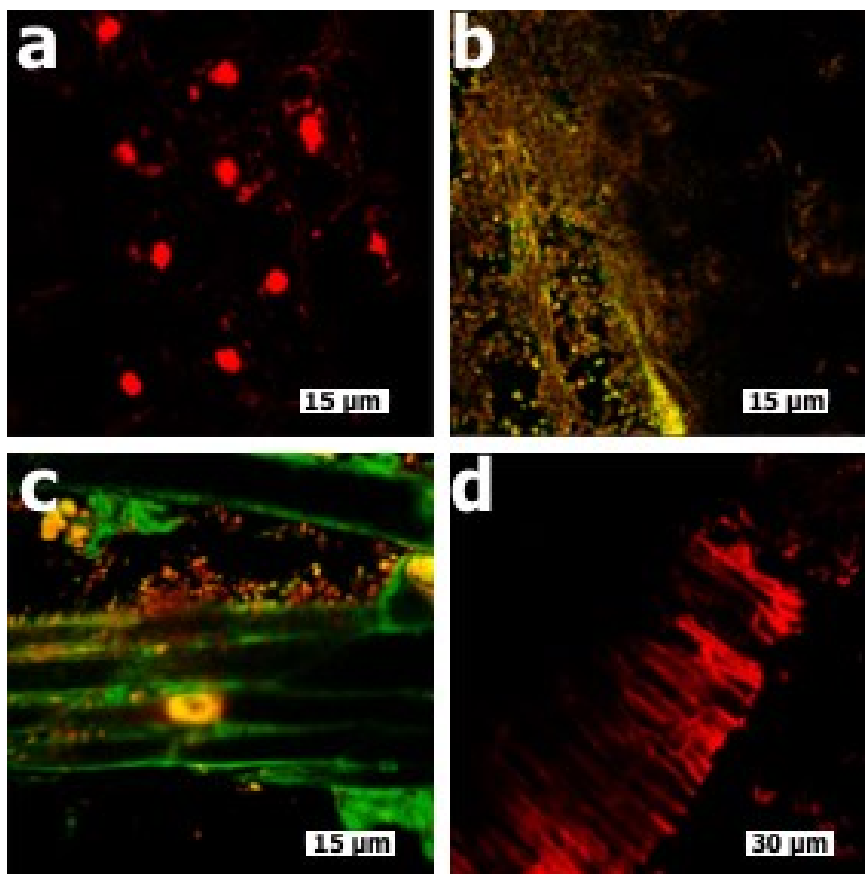
Cell morphology of *D. moldavica* 2019 year tea leaves and flower petal



a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

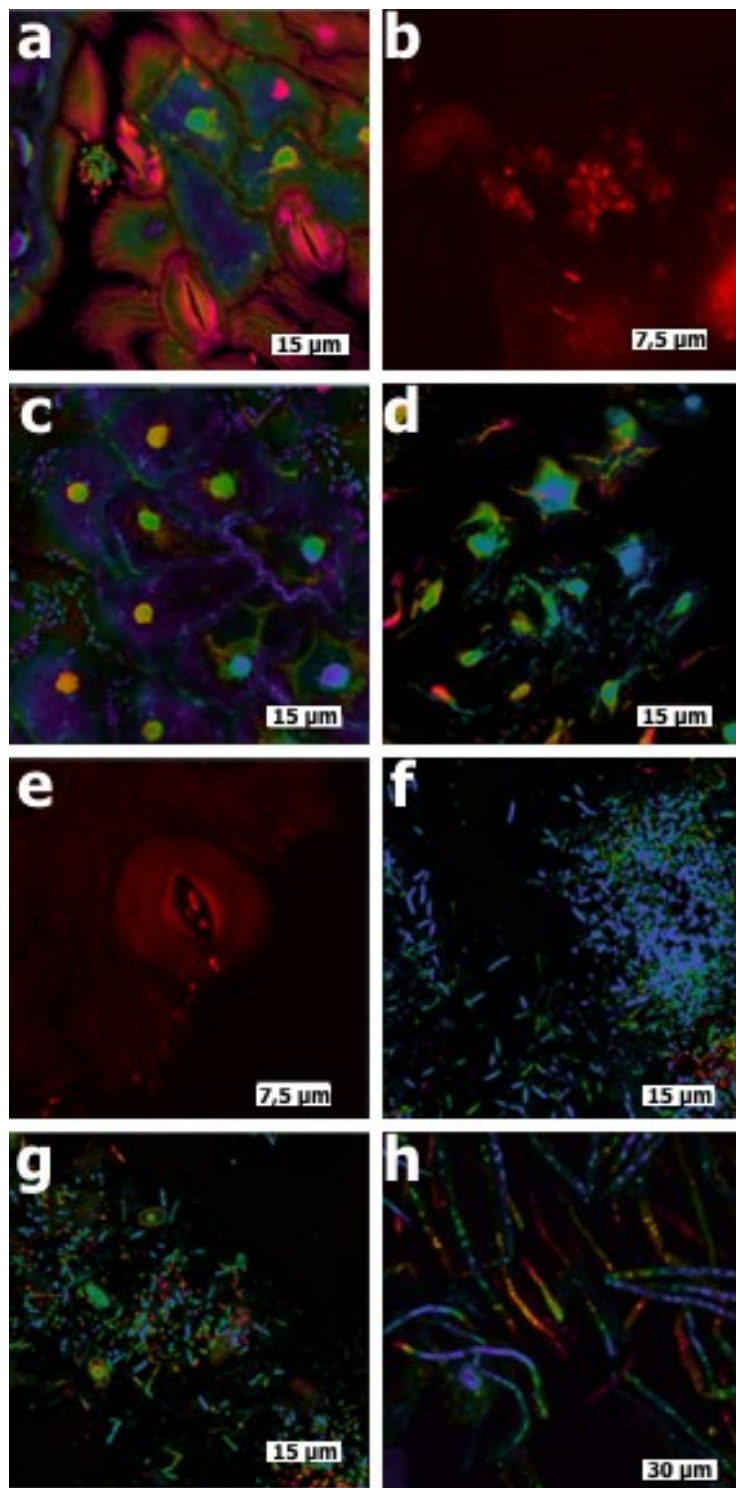
2019. gada *Ch. angustifolium* tējas lapu un ziedu vainaglapu šūnu morfoloģija

Cell morphology of *Ch. angustifolium* 2019 year tea leaves and flower



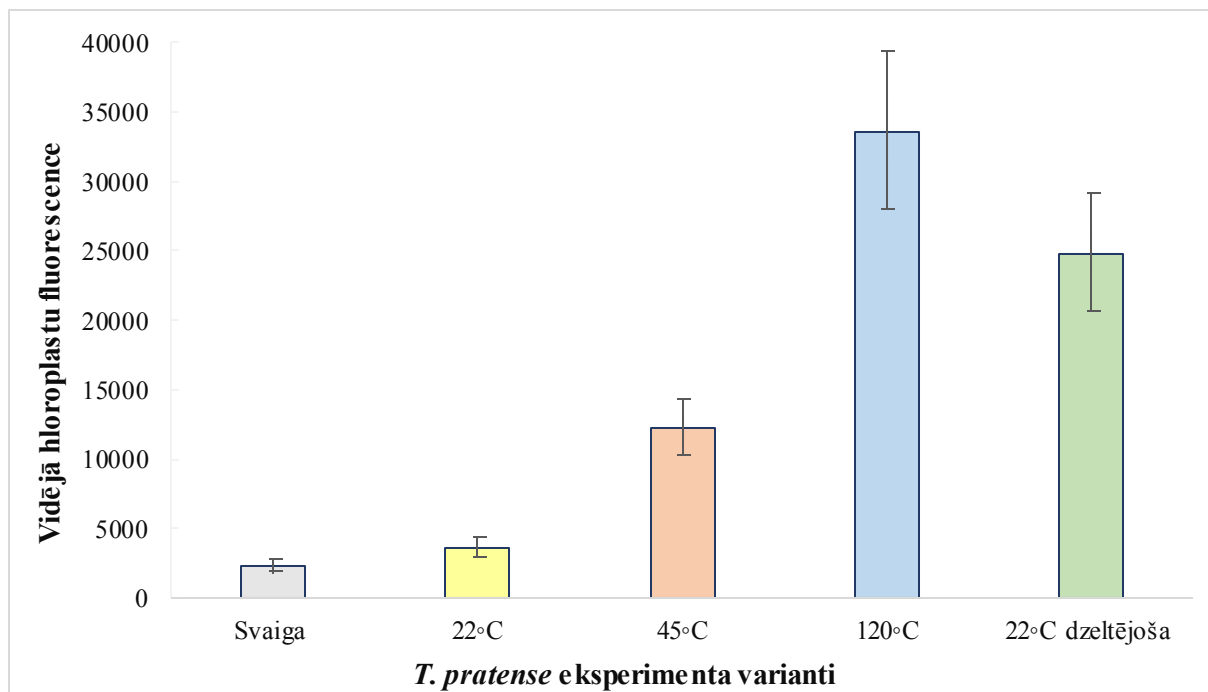
a – fiksētas lapas šūnas, b – nefiksētas lapas šūnas, c – fiksētas ziedu vainaglapas šūnas, d - nefiksētas ziedu vainaglapas šūnas.

Dažādās temperatūrās dehidratēto, fiksēto un 72 h MS barotnē kultivēto
Ch. angustifolium lapu un tējas mikroorganismu morfoloģija
 Morphology of *Ch. angustifolium* leaves and tea microorganisms dehydrated at different
 temperatures, fixed and cultured in 72 h MS medium



a – 22°C lapu šūnu baktērijas, b, c - 45°C lapu šūnu baktērijas, d - 120°C lapu šūnu baktērijas,
 e, f – 2019. g. tējas lapu šūnu baktērijas, g - 2019. g. tējas lapu šūnu baktērijas un vienkšūnas
 sēnes, h - 2019. g. tējas lapu šūnu sēņu hifas.

Svaigu, 22°C, 45°C, 120°C temperatūrā dehidratētu un dzeltējošo *T. pratense* lapu šūnu hloroplastu hlorofila vidējā fluorescences atkarībā no dehidratācijas apstākļiem. Chlorophyll mean fluorescence of fresh *T. pratense* leaf cell chloroplasts dehydrated and yellowed at 22°C, 45°C, 120°C depending on dehydration conditions.



Paraugiem fluorescences intensitātes atšķirība $p < 0,05$, salīdzinot, 22°C temperatūrā dehidratēto lapu fluorescenci ar svaigo lapu fluorescenci, kur $p > 0,05$ un, salīdzinot, 120°C temperatūrā dehidratēto lapu fluorescenci ar 22°C temperatūrā dehidratēto dzeltējošo lapu fluorescenci, kur $p > 0,05$.

T. pratense, *Ch. angustifolium* un *D. moldavica* lapu un ziedu vainaglapu šūnu dzīvotspēja, izmantojot propīdija jodīda dzīvotspējas testu.

T. pratense, *Ch. angustifolium* and *D. moldavica* leaf and flower crown cell viability using the propidium iodide viability test.

Eksperimenta varianti	Augu sugas nosaukums					
	<i>T. pratense</i>		<i>Ch. angustifolium</i>		<i>D. moldavica</i>	
	Lapa	Zieds	Lapa	Zieds	Lapa	Zieds
Svaiga	-	-	-	-	-	-
dehidratēta 22°C temperatūrā	-	-	-	-	-	-
dehidratēta 45°C temperatūrā	-	+	-	-	-	-
dehidratēta 120°C temperatūrā	+	+	+	+	+	+
2018. gada tēja	+/-	-	+	+	+	+
2019. gada tēja	-	-	-	-	+/-	-
Dzeltējoša	+	N	N	N	N	N
6 mēnešus veca 30 dienas mitrumā	+	N	N	N	N	N
6 mēnešus veca 20% gaisa relatīvajā mitrumā	+	N	N	N	N	N
24 mēnešus veca	+	N	N	-	N	N
dehidratēta 22°C temperatūrā un 72 h kultivēta MS barotnē	N	N	-	N	N	N
dehidratēta 45°C temperatūrā un 72 h kultivēta MS barotnē	N	N	-	N	N	N
dehidratēta 120°C temperatūrā un 72 h kultivēta MS barotnē	N	N	+	N	N	N
2019. gada tēja 72 h kultivēta MS barotnē	N	N	-	N	N	N

“+” – propīdija jodīda pozitīva šūna, nekroze

“-” – propīdija jodīda negatīva šūna, funkcionāli aktīva

“N” – nav pārbaudīta

Maģistra darbs “Sarkanā āboliņa, Moldāvijas pūķgalves un šaurlapu ugunspuķes kvalitātes kontrole izmantojot konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu” 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: Renata Mukāne

datums

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol. Tūrs Selga

datums

Recenzents: Asoc. prof., Līga Ozoliņa – Molla

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē

datums

Metodiķis: _____

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē
28.05.2020. prot. Nr. ____, vērtējums _____

Komisijas sekretāre: _____