

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 582.929:615.322:579.61

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ **Олена КВАСКО**
« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Антимікробна активність екстрактів з «бородатих» коренів
Mentha piperita L. »**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук, доцент,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО
(підпис)

Керівник бакалаврської роботи

Кандидат біологічних наук, доцент,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО
(підпис)

Виконав

_____ Олександр ГОДЛЕВСЬКИЙ
(підпис)

КИЇВ-2025

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
екобіотехнології
та біорізноманіття

к.б.н., доцент _____ Олена КВАСКО
« ____ » _____ 2025 р.

З А В Д А Н Н Я

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту

Годлевському Олександрю Юрійовичу

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: «Антимікробна активність екстрактів з «бородатих» коренів *Mentha piperita* L.»

затверджена наказом ректора НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. № 1880 «С».

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 року.

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: пагони *M. piperita*, штам A4 *Agrobacterium rhizogenes*, протоколи введення в культуру *in vitro*, *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, полімеразно-ланцюгової реакції, методу паперових дисків.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Ввести в культуру *in vitro* рослини *M. piperita*.
2. Отримати культуру «бородатих» коренів *M. piperita* та підтвердити їх трансгенну природу методом полімеразно-ланцюгової реакції.
3. Дослідити антимікробну активність екстрактів з «бородатих» коренів *M. piperita*

Дата видачі завдання 23 жовтня 2024 року

Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи

_____ Олена КВАСКО
(підпис)

Завдання прийняв до виконання

_____ Олександр ГОДЛЕВСЬКИЙ
(підпис)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота виконана на тему «Антимікробна активність екстрактів з «бородатих» коренів *Mentha piperita*» в обсязі 56 сторінок комп'ютерного тексту формату А4, містить 5 рисунків, 1 таблицю, 78 використаних джерела. Складається з наступних розділів:

1. Огляд літератури;
2. Матеріали та методи дослідження;
3. Результати дослідження та їх обговорення.

Метою даної роботи було дослідити антимікробну активність екстрактів з «бородатих» коренів *Mentha piperita* щодо ряду тест-культур мікроорганізмів.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Ввести в культуру *in vitro* рослини м'яти перцевої.
2. Отримати культуру «бородатих» коренів *M. piperita* та підтвердити їх трансгенну природу методом полімеразно-ланцюгової реакції.
3. Дослідити антимікробну активність екстрактів з «бородатих» коренів *M. piperita*.

Об'єктом дослідження є антимікробна активність екстрактів «бородатих» коренів м'яти перцевої щодо тест-культур мікроорганізмів.

Предметом дослідження є екстракти з «бородатих» коренів м'яти перцевої.

В роботі застосовано такі **методи дослідження** як біотехнологічні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, а також статистичні.

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Загальна характеристика роду <i>Mentha</i> та виду <i>Mentha piperita</i> L.	9
1.2. Культура "бородатих" коренів як система для продукування вторинних метаболітів.	19
1.3. Антимікробні та противірусні властивості <i>Mentha piperita</i> L.	25
1.4. Методи визначення антимікробної активності рослинних екстрактів	29
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	32
2.1. Вихідний матеріал та отримання асептичних рослин <i>M. piperita</i> L.	32
2.2. Отримання культури "бородатих" коренів рослин м'яти перцевої	34
2.3. Виділення ДНК та молекулярно-генетичний аналіз "бородатих" коренів	35
2.4. Приготування екстрактів та визначення їх антимікробної активності	37
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	39
3.1. Введення в культуру <i>in vitro</i> та отримання бородатих коренів м'яти перцевої	39
3.2. Антимікробна активність екстрактів з «бородатих» коренів <i>M. piperita</i> щодо тест-культур мікроорганізмів	43
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	47

ВСТУП

Проблема резистентності патогенних мікроорганізмів до традиційних синтетичних антибіотиків залишається актуальною протягом останніх десятиліть, вирішення даної проблеми постає перед сучасною системою охорони здоров'я. Тому надзвичайно важливим є розробка альтернативних засобів з антибіотичною та антимікробною активністю, причому особлива увага надається пошуку нових ефективних продуцентів антимікробних речовин, особливо природного походження. Окреме місце в розробці таких речовин займають біологічно активні речовини, отримані з лікарських рослин [1, 2].

Сучасна фармакологія та біотехнологія активно шукають нові джерела біологічно активних сполук, здатних протидіяти резистентності мікроорганізмів до синтетичних антибіотиків. Так, останнім часом значного розвитку набуває розробка технологій отримання біологічно активних речовин рослинного походження, зокрема лікарських рослин, що привертають увагу науковців у галузі медицини, харчової хімії, фармації та агротехнологій.

Особливий інтерес викликає м'ята перцева (*Mentha piperita* L.) - багаторічна ароматична рослина, що належить до родини Губоцвіті (Lamiaceae) та є гібридом *Mentha aquatica* L. та *Mentha spicata* L. Ця рослина має високий фармакологічний потенціал, оскільки синтезує значну кількість вторинних метаболітів, таких як ментол, ментон, терпеноїди, фенольні кислоти, флавоноїди та інші сполуки з антимікробною, антиоксидантною, протизапальною, протівірусною, антигіпертензивною та навіть протипухлинною дією. Завдяки своєму характерному аромату та біологічній активності *M. piperita* є однією з найпоширеніших у фітотерапії рослин і широко використовується у виробництві харчових продуктів, косметичних засобів та лікарських форм. Близько 55% ефірної олії м'яти у

світі використовується у виробництві жувальної гумки, а ще 34% — у засобах для догляду за ротовою порожниною [3-8].

Унікальні властивості м'яти перцевої, а також її здатність синтезувати цінні метаболіти, обумовлюють актуальність застосування біотехнологічних підходів для підвищення продуктивності рослинної сировини. Одним з таких підходів є використання трансформованих "бородатих" коренів, що можуть бути отримані внаслідок інфікування рослин ґрунтовою бактерією *Agrobacterium rhizogenes*. Ці культури здатні швидко рости на безгормональних середовищах, мають високу стабільність та потенціал для накопичення біологічно активних сполук у високих концентраціях. Використання цієї технології для отримання сировини на основі коренів *M. piperita* відкриває нові можливості для створення ефективних антимікробних препаратів природного походження.

Таким чином, дослідження антимікробної активності екстрактів із "бородатих" коренів *Mentha piperita* є надзвичайно актуальним для розвитку нових підходів до створення ефективних природних засобів антимікробної дії, що можуть знайти застосування в медицині, фармакології та інших галузях.

Враховуючи вище зазначене, **метою даної роботи** було дослідити дослідити антимікробну активність екстрактів з «бородатих» коренів *M. piperita* щодо ряду тест-культур мікроорганізмів.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Ввести в культуру *in vitro* рослини м'яти перцевої.
2. Отримати культуру "бородатих" коренів *M. piperita* та підтвердити їх трансгенну природу методом полімеразно-ланцюгової реакції.
3. Дослідити антимікробну активність екстрактів з «бородатих» коренів *M. piperita*.

Об'єктом дослідження є антимікробна активність екстрактів "бородатих" коренів м'яти перцевої щодо тест-культур мікроорганізмів.

Предметом дослідження є екстракти з “бородатих” коренів м’яти перцевої.

В роботі застосовано такі методи дослідження як біотехнологічні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, а також статистичні.

Практична значущість даної роботи полягає у використанні отриманих результатів для розробки нових антимікробних препаратів природного походження.

Робота виконувалась на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика роду *Mentha* та виду *Mentha piperita* L.

Рід *Mentha* (родина Lamiaceae) налічує приблизно 25-30 видів банаторічних ароматичних трав'янистих рослин, поширених переважно в країнах північної півкулі, зокрема в Європі, Азії та Північній Америці [6]. Види цього роду синтезують ефірні олії у високих концентраціях. До складу цих олій входять біологічно активні компоненти з характерним ментоловим запахом. Представники роду *Mentha* широко застосовуються в традиційній та сучасній медицині, фармацевтиці, косметологічній, харчовій промисловості та сільському господарстві [7, 9, 10].

M. piperita L. (м'ята перцева) є міжвидовим гібридом *M. aquatica* L. та *M. spicata* L., що поєднує в собі морфологічні та біохімічні ознаки обох батьківських форм. Рослина має прямостояче, чотиригранне, червонувате, розгалужене стебло з поодинокими волосками, досягає висоти до 60–90 см. Листки супротивні, ланцетної або овальної форми, з пильчастим краєм, має короткі черешки. Рослина має квітки дрібні, лілово-фіолетові, зібрані в несправжні колосовидні суцвіття, розміщені у верхній частині пагонів [7, 11].

Таксономічна система роду *Mentha* є складною і зазнавала численних змін. Наразі прийнято, що рід включає приблизно 42 види, 15 гібридів та велику кількість підвидів, форм і культиварів. За сучасною класифікацією, представників роду поділяють на п'ять секцій: *Mentha*, *Pulegium*, *Preslia*, *Eriodontes* та *Audibertia*. Систематизація роду базується на поєднанні морфологічних, генетичних та фітохімічних ознак, а також молекулярно-генетичних досліджень [7, 14].

Рослина має широке географічне розповсюдження - вирощується у країнах Європи, Північної Америки, Азії та Північної Африки. Її культивують як у відкритому ґрунті, так і в умовах контрольованого

середовища, зокрема за допомогою методів культивування рослинних клітин та тканин *in vitro* для отримання біомаси та виділення вторинних метаболітів [12]. *M. piperita* широко використовується у фармацевтичній промисловості (препарати для лікування застуди, розладів шлунково-кишкового тракту, головного болю), у косметичних засобах (лосьйони, зубні пасти, шампуні) та у харчовій продукції (трав'яні чаї, жувальні гумки, кондитерські вироби) [11, 12, 14].

Біотехнологічні підходи до культивування *Mentha piperita*, зокрема індукція трансформованих («бородатих») коренів, викликають значний інтерес завдяки здатності цих культур до біосинтезу антимікробних вторинних метаболітів. Важливою властивістю *M. piperita* є високий вміст ефірної олії - не менше ніж 12 мл/кг у сухому цілому листі та 9 мл/кг у подрібненому [15]. Ці олії складаються зі складної суміші летких сполук - переважно терпенів, які синтезуються у спеціалізованих структурах, таких як залозисті трихоми [16, 17], та відіграють захисну роль проти біотичних стресових факторів і мають значний фармакологічний потенціал [6, 17, 18].

Основними компонентами ефірної олії *M. piperita* є ментол, ментон, ізоментон, піперітон і 1,8-цинеол. Крім того, до її складі містяться флавоноїди (лютеолін, апігенін, гесперидин), фенольні кислоти (розмаринова, кавова, хлорогенова) і терпеноїди [8-10]. Ефірну олію традиційно добувають паровою дистиляцією із надземної частини рослини в період цвітіння [6, 19]. З метою поліпшення якості проводять ректифікацію з видаленням небажаних домішок, зокрема сірковмісних сполук [20]. Вихід ефірної олії з сухої рослинної маси зазвичай становить 0,1–1%, іноді досягаючи 4% [21], і залежить від генотипу, агрокліматичних умов та методу ізоляції [6, 16, 18, 21]. Склад олії включає L-ментол (38–70%), ментон (0,4–35%), ізоментон (1,5–10%), ментилацетат (0–20%), ментофуран (0,1–21%), пулегон (до 7%) та інші сполуки [6, 15, 18]. Завдяки такому комплексному складу, екстракти м'яти виявляють суттєву

антиоксидантну, антимікробну, протизапальну, спазмолітичну та інші фармакологічні активності [10-12]. Якість ефірної олії визначається співвідношенням основних компонентів: вищий вміст ментолу та ментону при мінімальній кількості ментофурану й пулегону вважається сприятливим [22].

Левоментол ((-)-ментол) є домінуючим ізомером у складі олії (30–55%) [15], забезпечує охолоджувальний ефект завдяки активації рецепторів TRPM8 [32], і трапляється поряд з неоментолом (2,5–6,5%) та ізоментолом (0,3–4%) [15, 31, 32]. Концентрація ментолу значною мірою варіює залежно від фази вегетації [24], екологічних умов [24, 25] та регіону вирощування [26].

У процесі дозрівання рослини ментон (40–55%) поступово перетворюється на ментол (20–30%), досягаючи піку під час цвітіння [27]. У цей період також зростає вміст ментофурану й пулегону — потенційно токсичних сполук, синтез яких активується під дією стресових факторів [27]. Ментофуран може бути маркером автентичності олії *M. piperita*, оскільки він не синтезується рослинами споріднених видів [6, 25, 28].

Допустимий вміст ментофурану в олії згідно з Європейською Фармакопеею - 1,0-8,0% [29], а за Регламентом ЄС EC1334/2008 добова норма споживання пулегону та ментофурану не має перевищувати 0,1 мг/кг маси тіла [27, 30]. Максимальні рівні цих сполук у харчових продуктах обмежено - від 20 до 1000 мг/кг залежно від категорії [30].

Ментон утворюється шляхом відновлення пулегону за участі пулегонредуктази [33], а сам пулегон, попередник кількох ключових сполук, характеризується гепатотоксичністю [27, 30].

Отже, ефірна олія *M. piperita* повинна мати високий вміст левоментолу, помірний — ментону, та мінімальні рівні пулегону і ментофурану [27], що є визначальними для її якості та безпечності застосування. Вона широко використовується у фармацевтичній та

косметичній промисловості [6, 19, 34–36], входить до фармакопейних монографій [20, 37] і згадується у документах ВООЗ [38].

Водно-спиртові та інші екстракти *Mentha piperita* L. містять широкий спектр флавоноїдів (епікатехін, рутин, кверцетин, кемпферол, апігенін, нарингенін, нарингенін-7-О-глюкозид, гесперидин, еріоцитрин, лютеолін, лютеолін-7-О-глюкозид), фенольних кислот (кавова, розмаринова, хлорогенова, р-кумарова, ферулова, галова, сириngoва), а також тритерпеноїдів, зокрема урсолову кислоту [36, 39–43, 45–48]. Кількісний та якісний склад біоактивних сполук залежить насамперед від типу розчинника. Зокрема, метанол виявився найефективнішим екстрагентом, тоді як вода – найменш ефективною [41, 43]. Серед найпоширеніших компонентів екстрактів виділяють еріоцитрин (2,7–182,6 мг/г), лютеолін-7-О-глюкозид (3,2–90,8 мг/г) та розмаринову кислоту (10,6–176,8 мг/г), у той час як нарингенін-7-О-глюкозид виявлявся лише у незначних кількостях (0,8 мг/г) [43].

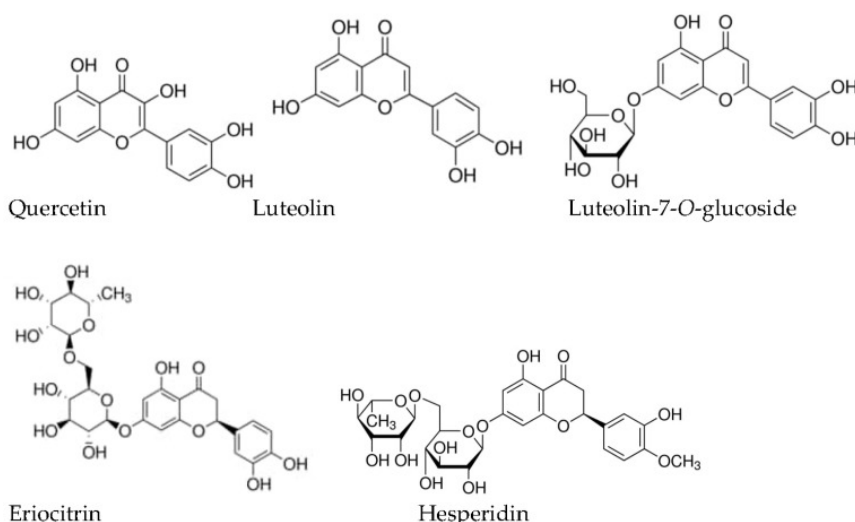


Рис. 1.1.1. Хімічна структура основних флавоноїдів *M. piperita*.

Процес сушіння також впливає на вміст поліфенолів: загальна кількість флавоноїдів у висушеній сировині знаходиться у межах 29,2–53,2 мг

катехінових еквівалентів на грам сухої маси [43]. У тестах на антиоксидантну активність (FRAP, DPPH, ABTS, β -каротин-лінолева кислота) найвищу активність показують ацетонітрильні, етилацетатні та водні екстракти [41, 43]. Водночас, фармакопейні обмеження щодо токсичних розчинників, таких як метанол, ацетонітрил і дихлорметан, зумовлюють переважно теоретичне значення таких даних у лікарському застосуванні [44].

У водних настоях і мацератах м'яти виявлені такі фенольні сполуки, як гесперидин (до 18,64 мг/100 мл), розмаринова кислота, еріоцитрин, лютеолін-7-О-глюкуронід, а також хлорогенова та бензойна кислоти [41, 45]. Встановлено, що додавання β -циклодекстрину до водного екстрагенту сприяє підвищенню вмісту фенолів, зокрема еріоцитрину, лютеолін-7-О-рутинозиду та розмаринової кислоти [46]. Зразки можуть додатково містити синапінову кислоту, епігаллокатехін, галову кислоту та кверцетин-рамно-ди-гексозид [47].

Основними хімічними маркерами для ідентифікації екстрактів м'яти перцевої запропоновано вважати кавову кислоту, розмаринову кислоту, еріоцитрин, гесперидин, лютеолін-7-О-глюкуронід та лютеолін-7-О-рутинозид, які можуть бути виявлені з використанням спектрофотометрії, тонкошарової або високоефективної рідинної хроматографії [41, 46, 49]. Крім того, наявність розмаринової кислоти, гесперидину та похідних лютеоліну може бути пов'язана з протизапальними й противірусними властивостями рослини [5].

Серед основних фармакологічних властивостей екстрактів і ефірної олії *Mentha piperita* слід виділити антиоксидантну [5, 6, 10, 28], протизапальну [10], імуномодулюючу [40], гепаторенопротекторну [50] та антимікробну активності [5]. Найбільшу увагу привертає антиоксидантна властивість, що опосередковує інші біологічні ефекти, включаючи протизапальний потенціал [5, 6, 10, 28, 43, 50, 24, 35]. Дослідження

підтверджують здатність препаратів, розроблених на основі екстрактів з рослин *M. piperita* знешкоджувати вільні радикали, гальмувати перекисне окиснення ліпідів *in vitro* та *in vivo* [6, 35, 50], що актуально для профілактики патологій, пов'язаних із оксидативним стресом — діабету, серцево-судинних, онкологічних та нейродегенеративних захворювань [50].

Рослинні антиоксиданти, отримані з рослин *M. piperita* здатні зменшувати ушкодження клітин, пригнічуючи активацію фагоцитів і знижуючи утворення активних форм кисню (АФК) [4, 5, 6, 36, 42, 43, 45]. Ефірна олія м'яти перцевої також показала виражену антиоксидантну активність у тестах TEAC та FRAP на моделі *Caenorhabditis elegans*, де у концентрації 5 мкг/мл вона демонструвала максимальний ефект. Проте при підвищенні концентрації до 200 мкг/мл проявлялася прооксидантна дія, що вказує на дозозалежний характер активності [45]. Інші дослідження підтверджують подібні властивості в тестах ABTS, пероксидазної активності та DPPH, де ефірна олія та хлороформний екстракт перевищували водний за ефективністю [45]. Найвища антиоксидантна активність та вміст фенольних сполук є у *M. piperita* порівняно з іншими видами м'яти, із значенням $IC_{50} = 13,32$ мкг/мл у DPPH-тесті та $TPC = 433,60 \pm 19,62$ мкг/мг [52]. Також показано гепато- та нефропротекторну дію олії в умовах CCl_4 -індукованого оксидативного стресу: знижувалися рівні печінкових та ниркових маркерів, підвищувалась активність антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, глутатіонпероксидази) [50]. Виділена з *M. piperita* розмаринова кислота проявила понад 95% активності у тесті DPPH та 87,83% у тесті H_2O_2 , пригнічуючи автоокиснення ліпідів [43]. Антиоксидантні властивості зберігаються і в рослин, вирощених *in vitro*, де вміст TPC, TFC і розмаринової кислоти залишався високим, що дозволяє розглядати такі клони як альтернативу природним популяціям м'яти перцевої [42].

Загалом екстракти та ефірна олія *M. piperita* характеризуються суттєвою антиоксидантною активністю як *in vitro*, так і *in vivo*. Її ефективність залежить від хімічного складу, типу тест-системи та дози, що зумовлює необхідність подальших досліджень механізмів дії та потенційних прооксидантних ефектів.

Останніми роками зросла увага до екстрактів лікарських рослин і ефірних олій як альтернативи нестероїдним протизапальним препаратам (НПЗП), що нерідко спричиняють серйозні побічні ефекти [5, 6, 10, 24, 35, 53]. НПЗП діють шляхом інгібування ферменту циклооксигенази (ЦОГ), який бере участь у біосинтезі простагландинів з арахідонової кислоти [105]. Проте їх застосування асоціюється з ризиком розвитку гастроінтестинальних, серцево-судинних та ниркових ускладнень [24, 53]. Тому перспективною є розробка комбінованих засобів, які поєднують синтетичні компоненти з природними екстрактами, що мають протизапальну та антиоксидантну дію. Зокрема, екстракти з рослин м'яти перцевою показують виражену протизапальну активність [5, 10, 24, 53]. Експерименти на макрофагальній лінії RAW 264.7 показали, що етанольний екстракт *M. piperita* достовірно знижує продукцію NO, TNF- α , IL-6 і PGE₂, індуковану ліпополісахаридом (LPS), що частково зумовлено високим вмістом фенольних сполук і флавоноїдів [5]. Аналогічну дію виявлено в ефірній олії цієї рослини - у моделі LPS-індукованого запалення та моделі кротонового набряку вушної раковини у мишей [10]. Крім того, крем із 0,5% ефірної олії *M. piperita* сприяв загоєнню ран у мишей, що підтверджено гістологічно: спостерігалось посилене відкладення колагену та епітелізація [10]. У моделі карагенанового набряку лапи пероральне введення олії також зменшувало запальну реакцію, що пов'язують із дією ментолу - основного компонента ефірної олії [10].

Окрім протизапальної та ранозагоювальної активності, ефірна олія *M. piperita* виявляє імуномодулюючі властивості. Дослідження італійських

сортів олії продемонстрували її вплив на функціональну активність поліморфноядерних лейкоцитів та мононуклеарних клітин периферичної крові. У високих концентраціях ($\geq 0,1$ мкг/мл) олія виявляла цитотоксичність, тоді як у межах $0,0001$ – $0,01$ мкг/мл деякі зразки стимулювали утворення активних форм кисню та проліферацію клітин, а також знижували рівень інтерлейкіну-4 (IL-4), що свідчить про потенційну здатність до модулювання імунної відповіді [40].

Водно-спиртовий екстракт *M. piperita* також впливає на макрофагальні запальні реакції: активує антиоксидантні ферменти та знижує рівні супероксиду (O_2^-) і пероксиду водню (H_2O_2). У разі стимуляції клітин ліпополісахаридом екстракт у низьких концентраціях підтримував їх життєздатність, тоді як високі концентрації виявляли цитотоксичність за відсутності стимуляції [40]. Це свідчить про можливість селективного впливу залежно від умов запалення.

Імуномодулювальні та протипаразитарні ефекти також встановлено для препарату, що містив 30–55% ментолу та 14–32% ментону. У моделі шистосомозу у мишей після 60-денного лікування спостерігалось зниження рівнів IL-4 і IL-10, кількості еозинофілів, а також зменшення гранульом і кількості яєць паразитів у печінці та брижі. Ці ефекти перевищували ефективність стандартного препарату празиквантелу [40].

Крім того, ефірна олія *M. piperita* демонструє анальгезивні властивості, що, ймовірно, пов'язані з її протизапальною дією потенціалом. У тесті оцтовокислого скручування у мишей вона зменшувала больову реакцію в дозозалежний спосіб, зі зниженням кількості скручувань на 22,87–32,13%, що порівнювано з ефектом флоглюцинолу [24]. Подібну дію встановлено також для *M. spicata* [53].

Таким чином, ефірна олія та екстракти *Mentha piperita* мають багатовекторну біологічну активність (протизапальну, імуномодулювальну, протипаразитарну, анальгезивну), що робить їх перспективними

компонентами фітопрепаратів для зовнішнього та системного застосування.

Особливу увагу привертають рослини *Mentha piperita* завдяки потенційній протипухлинній активності [10,17,35,36,53]. Ефірні олії цих рослин, з огляду на їх ліпофільність, здатні проникати крізь клітинні мембрани та досягати внутрішньоклітинних мішеней, що є перевагою у протираковій терапії [17,18,53]. Хлороформний та етилацетатний екстракти *M. piperita* мають виражену дозо- та часово залежну цитотоксичність щодо шести ліній ракових клітин (HeLa, MCF-7, Jurkat, T24, HT-29, MIAPaCa-2), індукуючи арешт клітинного циклу в G1-фазі, апоптоз мітохондріальним шляхом, окислювальний стрес, активацію білків p53 та p21, експресію Вах та індукцію клітинного старіння. Екстракти також знижували активність глутатіонредуктази та підвищували рівень прозапальних цитокінів [53].

Цитотоксичність ефірних олій чотирьох видів м'яти, включаючи *M. piperita*, була виявлена щодо клітин MCF-7 та LNCaP із IC₅₀ у межах 10–100 мкг/мл [53]. При цьому олія *M. piperita* пригнічувала життєздатність HeLa-клітин на понад 90% у низьких концентраціях (0,00125–0,02 мкл/мл) [53]. Пероральне введення водного екстракту тваринам з індукованим канцерогеном бензопіреном зменшувало частоту пухлин легень з 67,92% до 26,31% [53]. Водночас деякі дослідження не підтвердили суттєвої цитотоксичності. Зокрема, ефірна олія не проявила значного впливу на клітини НСТ 116 та BEL-7402, а також не індукувала апоптоз у лейкозних клітинах; нормальні клітини (HaCaT, HEK-293, IMR-90) залишалися життєздатними [10, 17, 53].

Отже, препарати *M. piperita* демонструють різноспрямовану протипухлинну активність залежно від типу екстракту, клітинної лінії та умов експерименту, що підкреслює доцільність подальших досліджень щодо їх потенційного використання у комплексній протираковій терапії.

Препарати на основі *M. piperita* виявляють гіпотензивну, вазорелаксуючу та антиагрегантну дію, що зумовлює їх потенціал у профілактиці серцево-судинних захворювань, пов'язаних із хронічним запаленням [53]. У клінічному дослідженні за участю 25 добровольців встановлено, що щоденне вживання соку *M. piperita* протягом 30 днів сприяло зниженню рівня глюкози, холестерину, тригліцеридів, ферментів печінки, сечовини, маси тіла та артеріального тиску, а також підвищенню рівня ЛПВЩ [53]. У досліджах на тваринах водний екстракт м'яти перцевої знижував гіперліпідемію, викликану надлишком фруктози, нормалізував вміст ліпідів у крові та сприяв підвищенню рівня глутатіону в печінці, що вказує на антиоксидантну активність такого екстракту. Ефірна олія м'яти перцевої також демонструвала здатність знижувати рівень сечової кислоти та впливати на ліпідний профіль. Ймовірним механізмом її гіпотензивної дії є зменшення тону судинної стінки. Крім того, розмаринова кислота, один з основних компонентів м'яти, у тваринній моделі інфаркту міокарда проявляла кардіопротекторну дію через активацію антиоксидантної системи та регуляцію кальцієвого обміну [53].

Комплексні кардіозахисні властивості *M. piperita* пояснюються її антиоксидантною активністю, впливом на судинний тонус і нормалізацією ліпідного обміну [53]. Препарати м'яти також демонструють нейропротекторні, гепаторенопротекторні, гастропротекторні та спазмолітичні ефекти [36, 50, 53]. Крім того, ефірна олія *M. piperita* виявляє токсичність щодо *Artemia salina* та ефективна проти комарів (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*), перевищуючи ефективність деяких синтетичних репелентів у формі наногелю. Завдяки своїм біоактивним властивостям, екстракти м'яти використовуються в нанотехнологіях для синтезу срібних наночастинок з меншою токсичністю порівняно з хімічними методами [53].

Таким чином, рослини *M. piperita* виявляють широкий спектр лікарських, фармакологічних властивостей, зокрема, антиоксидантну, протизапальну, анальгезивну, гепатопротекторну, нейропротекторну, протипухлинну та інші активності, що робить ці рослини перспективним об'єктом біотехнологічних досліджень та розробки технологій синтезу біологічно активних речовин.

1.2. Культура "бородатих" коренів як система для продукування вторинних метаболітів.

Культура "бородатих" коренів може бути отримана за допомогою генетичної трансформації рослинних тканин ґрунтовою грамнегативною бактерією *Agrobacterium rhizogenes*, яку нині класифікують як *Rhizobium rhizogenes*. Цей мікроорганізм має Ri-плазмиду, що містить T-ДНК, здатну інтегруватися в геном рослини-господаря. T-ДНК включає гени *rol* (зокрема, *rolA*, *rolB* і *rolC*), які активують низку сигнальних шляхів, відповідальних за стимуляцію утворення сильно розгалужених, швидкорослих та генетично стабільних коренів. Такі трансформовані корені, як правило, демонструють автотрофний ріст *in vitro*, не потребуючи екзогенних фітогормонів [54,55].

Процес отримання "бородатих" коренів передбачає кілька стандартних етапів. Насамперед готують асептичний рослинний матеріал (експланти) - переважно листові пластинки, гіпокотилі, стеблові сегменти або інші вегетативні частини. Потім проводять інфікування експлантів бактеріальною суспензією *R. rhizogenes*, зазвичай у логарифмічній фазі росту. Кокультивація триває від 24 до 72 годин у темряві на безгормональному середовищі. Після цього експланти переносять на селективне живильне середовище з додаванням антибіотиків (наприклад,

цефотаксим, кліндаміцин, карбеніцилін) для елімінації бактерій, але з одночасним збереженням життєздатності трансформованих клітин [56-58].

Ключовим етапом є ідентифікація трансформованих коренів. Вони зазвичай мають характерну фенотипову морфологію: високу густоту розгалужень, відсутність або мінімальний вміст бічних кореневих волосків, а також здатність до швидкого автономного росту. Ці корені відбирають і переводять на нове стерильне живильне середовище для субкультивування.

Для культивування "бородатих" коренів використовують як тверді (агаризовані), так і рідкі живильні середовища. Найбільш популярним є середовище Мурасиге та Скуга, хоча в окремих випадках застосовують середовища Андерсона, Гамборга або інші варіанти зі зміненим мінеральним складом. До складу середовища додають джерело вуглецю (зазвичай сахарозу 3–6%) та регулюють рН (оптимально 5,6–5,8). Для оптимізації росту використовують незначне освітлення (або повну темряву), температурний режим 22–25 °С, а в рідких системах забезпечують безперервну аерацію та помірну агітацію (50–110 об/хв) [59, 60].

У промислових масштабах для масового культивування "бородатих" коренів застосовують різні типи біореакторів: зануреного типу (середовище вільно циркулює), повітряного типу (аерація через барботаж) або тимчасового занурення. Біореактори дозволяють досягти високого рівня біомаси та стабільного продукування біологічно активних сполук, включаючи вторинні метаболіти (фенольні сполуки, алкалоїди, терпеноїди, флавоноїди тощо).

Серед переваг цієї системи на основі культури "бородатих" коренів - генетична стабільність трансформованих ліній, відсутність потреби у фітогормонах, швидке нарощування біомаси та здатність до накопичення цільових сполук у високих концентраціях. Завдяки цим властивостям культура "бородатих" коренів використовуються для виробництва фармакологічно важливих речовин, таких як берберин (*Berberis spp.*),

резвератрол (*Vitis vinifera*), рутін (*Fagopyrum esculentum*), тартаринові глікозиди (*Glycyrrhiza spp.*) тощо. Також такі системи слугують моделлю для дослідження метаболічних шляхів або біоінженерних маніпуляцій (наприклад, еліцитація або редагування геному для посилення біосинтезу цільових метаболітів).

Таким чином, система "бородатих" коренів є потужним інструментом сучасної біотехнології рослин, що відкриває широкі можливості для фармацевтичної промисловості, метаболічної інженерії та фундаментальних досліджень у галузі фітохімії.

"Бородаті" корені, як одна з форм трансформованих рослинних культур, демонструють низку важливих переваг над традиційними системами культивування *in vitro*, такими як калусні, суспензійні культури чи цілі рослини. Ці переваги зумовлюють їхнє широке використання у фармацевтичній, аграрній та біотехнологічній промисловості. До таких переваг можна віднести такі як:

1. Генетична та біохімічна стабільність. Трансформовані корені, отримані за допомогою *Rhizobium rhizogenes*, зберігають стабільний геном і морфотип навіть після багатьох пасажів субкультивування. Це суттєво відрізняє їх від калусних культур, у яких часто спостерігається виникнення соматональних варіацій, що призводять до втрати здатності продукувати вторинні метаболіти або до змін у їхньому профілі [57, 61]. Така стабільність є критичною для комерційного виробництва біологічно активних речовин, де потрібна відтворюваність і сталість хімічного складу.

2. Висока швидкість росту без потреби у фітогормонах. "Бородаті" корені здатні до автономного росту на безгормональному середовищі завдяки експресії генів *rol*. Це спрощує умови культивування, зменшує вартість живильних середовищ і усуває ризики, пов'язані з гормональною нестабільністю, які характерні для калусних культур або клітинних суспензій, що вимагають додавання ауксинів і цитокінінів для проліферації [54, 59].

Крім того, відсутність гормонального тиску зменшує ризик спонтанних морфогенетичних змін.

3. Інтенсивний біосинтез вторинних метаболітів. У багатьох випадках трансформовані корені демонструють вищу здатність до синтезу вторинних метаболітів, ніж цілі рослини або інші типи культур. Наприклад, у "бородатих" коренях *Artemisia annua* виявлено підвищений рівень артемісініну, а в коренях *Glycyrrhiza glabra* — вищу концентрацію гліциризинової кислоти порівняно з натуральною рослиною. Це пояснюється активною експресією коренеспецифічних шляхів біосинтезу та відсутністю тканинної диференціації, що дозволяє зосередити метаболічний потік на синтезі цільових сполук [62].

4. Високий вихід біомаси у короткі терміни. "Бородаті" корені швидко нарощують біомасу, зазвичай утворюючи густі кластери розгалужених кореневих структур протягом кількох тижнів. На відміну від калусної тканини або цілої рослини, що можуть вимагати місяці для досягнення аналогічної маси, трансформовані корені досягають виробничих рівнів біомаси значно швидше, що скорочує виробничий цикл.

5. Зручність культивування у біореакторах. Однією з головних переваг є придатність "бородатих" коренів до масштабування у різних типах біореакторів - зануреного типу, повітряного, барабанного або систем тимчасового занурення. Це дає можливість вирощувати корені у строго контрольованих умовах, регулюючи рН, температуру, подачу кисню, швидкість перемішування тощо. На відміну від вирощування цілої рослини у тепличних чи польових умовах, біореактори дозволяють уникнути сезонності, коливань клімату і забруднення, що є ключовими факторами для фармацевтичного виробництва [60, 63].

6. Придатність до еліситації та біоінженерії. Система "бородатих" коренів добре реагує на еліситори (метилжасмонат, саліцилову кислоту, хітин, Ag^+ , UV-B), які можуть значно підвищити продукцію цільових

метаболітів. Крім того, культура “бородатих” коренів є ефективною моделлю для вбудовування додаткових генів за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, що дозволяє направлено змінювати метаболічні шляхи (наприклад, підвищення продукції алкалоїдів, терпенів або фенольних сполук).

7. Менші потреби у просторі та ресурсах. На відміну від традиційного вирощування рослин, яке вимагає великих площ, складного агротехнічного обслуговування та великого об’єму води, культура “бородатих” коренів може бути реалізована в лабораторних або промислових умовах з мінімальним використанням ресурсів. Це робить систему економічно ефективною, екологічно чистою та зручною для масштабування.

Отже, система “бородатих” коренів поєднує в собі швидкість, стабільність та високу біосинтетичну активність, що робить її надзвичайно цінною для виробництва фітопрепаратів, вивчення метаболізму та створення нових біоінженерних стратегій. У поєднанні з сучасними методами геномного редагування та метаболічного профілювання, культура “бородатих” коренів є перспективним біоплатформним рішенням у галузі зеленої біотехнології.

Система трансформованих “бородатих” коренів виявилася надзвичайно ефективною платформою для виробництва цінних вторинних метаболітів, що мають значний фармакологічний потенціал. Завдяки високій стабільності, швидкому росту та здатності до масштабування, культура “бородатих” коренів широко застосовуються у фармацевтичній біотехнології як альтернатива класичному вирощуванню лікарських рослин. Прикладами успішного використання культури “бородатих” коренів для синтезу вторинних метаболітів можуть бути:

1. *Atropa belladonna* (беладонна) - один із класичних прикладів використання культури “бородатих” коренів для продукування тропанових

алкалоїдів - гіосциаміну та скополаміну. Трансформація рослин *A. belladonna* за допомогою бактерій *Rhizobium rhizogenes* значно підвищує рівень вторинного метаболізму. У дослідженнях встановлено, що вміст скополаміну в трансформованих коренях може у 3–5 разів перевищувати його концентрацію в дикій рослині, що відкриває нові можливості для фармакологічного виробництва антиму斯卡ринових препаратів [64]. Застосування еліситаторів, зокрема метилжасмонату, ще більше активує синтез алкалоїдів у культурі "бородатих" коренів.

2. *Panax ginseng* (женьшень). Трансформовані корені женьшеню активно продукують гінзенозиди - тритерпенові сапоніни, що показують широкий спектр біологічної активності, включаючи імуномодулюючу, нейропротекторну, адаптогенну та протипухлинну. Відомо, що рівень гінзенозидів типу Rg1, Rb1 та Rd у "бородатих" коренях може бути значно вищим, ніж у природних коренях женьшеню, що робить цю систему цінною для фармацевтичного виробництва біологічно активних добавок і фітопрепаратів [65, 66].

3. *Artemisia annua* (полин однорічний). Ця рослина є джерелом артемізиніну - сесквітерпену з вираженою протималарійною активністю. Культивування трансформованих коренів *A. annua* дозволяє одержувати артемізинін у контрольованих умовах без необхідності вирощування всієї рослини. Оскільки природна концентрація артемізиніну в рослині є низькою, використання "бородатих" коренів значно підвищує ефективність виробництва, особливо в комбінації з генетичними модифікаціями або еліцитацією [67].

4. *Salvia miltiorrhiza* (шалфей червоний). У трансформованих коренях цієї рослини інтенсивно синтезуються таншінони - фенольні дитерпеноїди з антиоксидантною, ангіопротекторною, гепатопротекторною та кардіозахисною дією. "Бородаті" корені *S. miltiorrhiza* не лише продукують високі концентрації таншінону ПА, а й демонструють стабільний

метаболический профиль навіть після багаторазового субкультивування [68]. Це робить систему зручною для створення стандартизованих лікарських форм.

5. *Mentha piperita* (м'ята перцева). Хоча трансформація цієї рослини менш поширена порівняно з вищезгаданими видами, дослідження показують, що культура "бородатих" коренів *Mentha piperita* потенційно може продукувати підвищені концентрації ментолу, ментону та інших моно- й сесквітерпенів. У культурі *in vitro* створюються оптимальні умови для дослідження регуляції біосинтезу ефірної олії, а також вивчення впливу факторів середовища (наприклад, складу живильного середовища або еліситаторів) на якісний та кількісний склад терпеноїдів [69]. Такий підхід є цінним як для аналітичних цілей, так і для створення інженерних ліній з підвищеною продуктивністю.

Таким чином, культура "бородатих" коренів є універсальним біотехнологічним інструментом для масового отримання фармакологічно важливих речовин без залежності від сезонності чи кліматичних факторів; дослідження метаболічних шляхів, включаючи регуляцію ферментів, локалізацію проміжних продуктів і вплив стресових чинників; генетичної інженерії рослин, оскільки корені можна додатково трансформувати для перенаправлення метаболічного потоку чи синтезу нових сполук. Поєднання високої продуктивності, біохімічної стабільності та придатності до масштабування робить hairy root cultures перспективною платформою для отримання складних природних речовин у промислових масштабах.

1.3. Антимікробні та противірусні властивості *Mentha piperita* L.

Екстракти та ефірна олія *Mentha piperita* відзначаються вираженою антимікробною та противірусною активністю [5, 53], що дозволяє розглядати їх як перспективний продуцент для виробництва засобів для

профілактики та допоміжного лікування інфекційних захворювань. Завдяки цим властивостям, препарати на основі *M. piperita* можуть стати основою для створення нових протимікробних лікарських засобів. З огляду на обмежений арсенал ефективних протівірусних препаратів та зростання стійкості вірусів до них [53], рослинні засоби, зокрема на основі *M. piperita*, можуть використовуватись як альтернативні або допоміжні засоби у лікуванні вірусних респіраторних та інших інфекцій. Етанольний екстракт *M. piperita*, з високим вмістом поліфенольних та флавоноїдних сполук, має протівірусну активність проти респіраторно-синцитіального вірусу в культурі клітин Нер-2. Значення IC_{50} становило 10,4 мкг/мл, а індекс селективності – 21,83, що перевищує відповідні показники для рибавірину, що свідчить про потенціал *M. piperita* як джерела біологічно активних сполук із протівірусною дією. Крім того, даний екстракт знижував продукцію прозапальних медіаторів (NO, TNF- α , IL-6 та PGE₂) у клітинах RAW 264.7, стимульованих ліпополісахаридом, що вказує на його протизапальні властивості [5].

Ефірна олія *M. piperita* не проявляє протівірусної активності проти SARS-CoV-2 [53]. При цьому визначалися ефективні концентрації (EC_{50}), які інгібували цитопатичну дію вірусу на 50%. Монотерпени карвон та карвакрол виявили помірну активність, з EC_{50} значеннями $80,23 \pm 6,07$ мкМ та $86,55 \pm 12,73$ мкМ відповідно. Інші компоненти, зокрема 1,8-цинеол, ментофуран і пулегон, мали нижчу активність ($IC_{50} \geq 100$ мкМ), тоді як ментол і ментон були неактивними. Встановлено, що присутність кетогрупи (в карвоні) та гідроксильної групи (в карвакролі) корелює з антивірусною активністю. Найвищу активність виявила ефірна олія *M. villosa*, багата на карвон ($EC_{50} = 127,0 \pm 4,63$ ppm), тоді як ефірні олії *M. piperita* різних сортів ('Perpeta', 'Citrata', 'Bergamot'), а також *Thymus vulgaris* та *Satureja montana* проявили слабку активність ($EC_{50} \geq 140$ ppm). Зазначено також, що деякі сполуки, такі як карвакрол, ментофуран, тимол,

а також ефірні олії з високим вмістом цих компонентів, викликали підвищену цитотоксичність у клітин Vero. Крім того, деякі представники родини *Lamiaceae* мають віруліцидну активність проти вірусів простого герпесу типів 1 і 2 (HSV-1, HSV-2), а також вірусу імунодефіциту людини типу 1 (HIV-1) [53]. Зокрема, ефірна олія *M. piperita* повністю інгібує ріст HSV-1 *in vitro* при концентрації 1% [53], що свідчить про її потенціал у лікуванні герпетичних інфекцій. Водні екстракти *Melissa officinalis*, *M. piperita* та *Salvia officinalis* також виявили здатність значно знижувати інфекційність вірусів HIV-1 при нецитотоксичних концентраціях у різних клітинних моделях (лінії Sup-T1, C8166 та макрофаги, отримані з моноцитів людини). Один із можливих механізмів дії полягає в збільшенні щільності віріонів до їх взаємодії з клітинами-мішенями.

Результати численних досліджень свідчать про здатність ефірної олії та екстрактів *Mentha piperita* пригнічувати ріст певних бактерій і грибів, що вказує на її перспективність як антимікробного засобу [17, 45, 51, 25, 26, 35]. Антимікробну активність ефірної олії *M. piperita* досліджували за допомогою методу дифузії в агаровому середовищі. Зона інгібування при застосуванні 20 мкл олії становила: 26,3 мм для *Candida albicans* ATCC 10231, 15,3 мм для *Escherichia coli* ATCC 25922, 16,3 мм для *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, 15,0 мм для *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та 8,3 мм для *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Було також показано, що олія чинить бактерицидну дію на *S. aureus* і *E. coli* [25]. Інше дослідження зафіксувало найбільшу зону інгібування саме для *Staphylococcus aureus* - $31,1 \pm 0,2$ мм [26]. Інші дослідження показали, що ефірна олія *M. piperita* проявляє найвищу активність проти ізолятів *Staphylococcus aureus* (зона інгібування $12,0 \pm 0,1 - 19,2 \pm 0,1$ мм), а також має фунгіцидну активність щодо *C. albicans* (11,7 мм) [15]. Варто зазначити, що грампозитивні бактерії виявляли більшу чутливість до ефірних олій, ніж грамнегативні (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp.), ймовірно, через особливості будови

клітинної стінки останніх [16]. У ще одному дослідженні мінімальні інгібуючі концентрації для ефірної олії *M. piperita* становили: 0,32 мг/мл для *S. aureus* МТСС 902, 5,12 мг/мл для *E. coli* МТСС 443, 0,08 мг/мл для *C. albicans* АТСС 90028. Для клінічних ізолятів *S. aureus* МІС коливались у межах 64–256 мг/мл, а для АТСС 29213, MRSA 2985 та MRSA 3701 — 128 мг/мл. Крім того, є дані щодо того, що ефірна олія *M. piperita* демонструвала антимікробну активність, порівнянну з антибіотиком гентаміцином. Значення мінімальної інгібуючої концентрації становили 0,4–0,7% об./об., а зони інгібування для об'єму 10 мкл — $17,2 \pm 0,9$ мм (*S. aureus*), $13,1 \pm 0,7$ мм (*S. pyogenes*), $5,1 \pm 0,4$ мм (*E. coli*), $12,4 \pm 0,7$ мм (*K. pneumonia*), тоді як гентаміцин давав відповідно: $14,7 \pm 0,4$, $18,9 \pm 0,7$, $19,7 \pm 0,3$ та $21,2 \pm 0,6$ мм [18]. Мінімальні інгібуючі концентрації ефірних олій *M. piperita* та *M. arvensis* проти *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger* і *Aspergillus fumigatus* методом серійних розведень у межах 1,25–2,50 мкг/мл [45]. Також є дані про фунгістатичну та фунгіцидну активність ментолу, основного компонента м'ятної олії (мінімальна інгібуюча концентрація: 0,25–1,5 мкл/мл в етанолі, 0,05–1,0 мкл/мл у Tween).

Найвираженішу антибактеріальну дію олія *M. piperita* виявляла щодо *Streptococcus pyogenes* (зона інгібування — 33,33 мм, МІС — 1,25 мкг/мл, МВС — 10 мкг/мл), а найменшу — проти *P. aeruginosa* (11,33 мм при 10 мкг/мл). Протигрибкова активність проти *C. albicans* та *C. parapsilosis* також була суттєвою (мінімальна інгібуюча концентрація — 1,25 мкг/мл; МФС — 10 мкг/мл) [17]. За іншими даними, наногель з вмістом ефірної олії *M. piperita* (5000 мкг/мл) зменшував ріст *E. coli* та *S. aureus* на 100% та 65% відповідно [52]. Мінімальна інгібуюча концентрація олії за порядком зростання була такою: *Propionibacterium acnes* (0,03% об./об.) > *S. aureus* (0,08%) = *C. albicans* > *E. coli* (0,15%) > *Pitrosporium ovale* (0,22%) > *P. Aeruginosa* (0,92%). В іншому дослідженні встановлено високий рівень

активності ефірної олії *M. piperita* проти *P. aeruginosa* (6,25 мкл/мл) та *E. coli* (50 мкл/мл), проти *Candida* spp. були в межах 12,5–100 мкл/мл [53].

Таким чином, ефірна олія *M. piperita* є перспективним джерелом природних антимікробних речовин для створення лікарських форм для зовнішнього застосування при шкірних захворюваннях, зумовлених грампозитивними бактеріями (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) та грибами. Окрім цього, ефірна олія *M. piperita* має потенціал для використання в стоматології з метою запобігання демінералізації зубних тканин. Однією з головних причин карієсу є мікробний біоплівковий наліт, утворений *Streptococcus mutans*, що синтезує глюкани під дією глюкозилтрансфераз (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*), сприяючи адгезії бактерій до поверхні зубів. Зменшення біоплівкоутворення розглядається як ефективний профілактичний підхід проти карієсу. Наногель на основі хітозану з ефірною олією *M. piperita* пригнічує експресію генів глюкозилтрансфераз, що свідчить про потенційне застосування таких форм у зубних пастах чи ополіскувачах як профілактичних засобів проти карієсу. Інше дослідження також підтвердило значну активність проти *Streptococcus mutans* - зона інгібування: 21,7–31,7 мм, мінімальна інгібуюча концентрація - 0,625–1,25 мкг/мл [17].

1.4. Методи визначення антимікробної активності рослинних екстрактів

Антимікробна активність рослинних екстрактів оцінюється з метою виявлення потенційно ефективних природних сполук проти патогенних мікроорганізмів. Існує низка валідованих лабораторних методів для визначення цієї активності, серед яких найбільш поширеними є дифузійні методи, метод серійних розведень та визначення мінімальної інгібуючої

концентрації (МІК), мінімальної бактерицидної (МБК) або фунгіцидної концентрації (МФК).

Дисково-дифузійний метод (або метод дифузії в агар) є одним із найпростіших та найчастіше застосовуваних способів первинного скринінгу антимікробної активності [70]. У цьому методі стерильні паперові диски, просочені досліджуванним екстрактом, розміщуються на поверхні живильного середовища, засіяного тест-культурою мікроорганізму. Після інкубації визначають наявність і діаметр зони затримки росту навколо дисків. Чим більша зона, тим вища антимікробна активність зразка. Метод підходить як для бактеріальних, так і для грибкових культур, проте не дозволяє визначити точну концентрацію, необхідну для інгібування росту мікроорганізмів.

Іншим методом є метод дифузії в лунки, за якого в попередньо зроблені отвори (лунки) в агарі додають екстракт. Цей метод подібний до дискового, однак дозволяє внести більший об'єм зразка та є зручним для порівняння ефективності декількох концентрацій [71].

Метод двократних серійних розведень у рідкому середовищі дозволяє визначити мінімальну концентрацію екстракту, що пригнічує видимий ріст мікроорганізму. У стерильних лунках мікротитраційної планшетки готують послідовні розведення екстракту в бульйоні, після чого до кожної лунки додають стандартну кількість мікробної суспензії [73]. Після інкубації визначають мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) — найнижчу концентрацію, за якої не спостерігається видимого росту. Це дає кількісне уявлення про ефективність препарату.

Метод може проводитися як вручну, так і з використанням автоматизованих приладів. Для оцінки росту використовують візуальний огляд, спектрофотометричне вимірювання мутності або біохімічні індикатори (наприклад, ТТС або резаурин), що змінюють колір при метаболічній активності мікроорганізмів [74].

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) визначає найнижчу концентрацію антимікробного агента, за якої повністю пригнічується ріст мікроорганізму в умовах *in vitro*. Це важливий показник для порівняння потенцій різних екстрактів або компонентів [75].

Мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) — це найнижча концентрація речовини, яка повністю вбиває досліджуваний мікроорганізм. Для її визначення після встановлення МІК проводять висів 10 мкл вмісту з безростових лунок на агарове середовище. За відсутності колоній після інкубації можна зробити висновок, що концентрація є бактерицидною [72]. Аналогічно, мінімальна фунгіцидна концентрація (МФК) визначається для грибів. Загалом, якщо $\text{МБК/МІК} \leq 4$, вважають, що речовина діє бактерицидно; якщо >4 — переважно бактеріостатично [74]. Визначення співвідношення МБК/МІК важливе для подальшого фармакологічного моделювання потенційного препарату.

Таким чином, вибір методу для оцінки антимікробної активності рослинних екстрактів залежить від мети дослідження. Дифузійні методи придатні для попереднього скринінгу, тоді як методи серійних розведень та визначення МІК/МБК є більш інформативними при детальному дослідженні активності та механізмів дії. Комбіноване застосування методів дозволяє отримати комплексне уявлення про потенціал рослинних екстрактів як антимікробних агентів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Вихідний матеріал та отримання асептичних рослин *M. piperita L.*

У якості вихідного матеріалу в дослідженні використовували пагони м'яти перцевої, зібрані на території Фастівського району Київської області. Відібрані в природному середовищі рослини було перенесено до тепличних умов, де вони пройшли карантин тривалістю 30 діб. Після завершення карантинного періоду рослини було ретельно оглянуто з метою виявлення ознак зараження бактеріальними, грибковими чи вірусними патогенами. Лише здорові пагони були залучені до введення в *in vitro* культуру.

Пагони черенкували на окремі фрагменти, які попередньо промивали в проточній воді з додаванням незначної кількості мильного розчину протягом 10 хвилин. Далі матеріал поміщали у стерильні ємності для подальшої стерилізації. Обробка експлантів здійснювалась за наступною схемою: занурення у 70% етанол на 2 хвилини, дворазове промивання стерильованою дистильованою водою, обробка 1% розчином гіпохлориту натрію з додаванням краплі 20% розчину Tween20 протягом 3 хвилин, після чого експланти чотири рази промивали стерильною дистильованою водою.

Після завершення стерилізації фрагменти перенесли на стерильний фільтрувальний папір для видалення залишкової вологи, а потім – на живильне середовище Мурасиге і Скуга (МС), яке не містило регуляторів росту.

Склад живильного середовища Мурасиге та Скуга [75]:

Макроелементи:

1. NH_4NO_3 – 33 г/л
2. KNO_3 – 38 г/л
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 7.4 г/л
4. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 8.8 г/л
5. KH_2PO_4 – 3.4 г/л

Мікроелементи:

6. KI – 1.7 г/л
7. H_3BO_3 – 1.24 г/л
8. $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4.4 г/л
9. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.7 г/л
10. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.05 г/л
11. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.05 г/л
12. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.05 г/л

Розчин хелатованого заліза:

13. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 55.6 г/л
14. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 74.6 г/л

Вітаміни:

15. Тіамін В6 – 0.1 г/л
16. Піридоксин – 0.1 г/л
17. Нікотинова кислота – 0.1 г/л
18. Кальцій пантотенат – 0.001 г/л
19. Біотин – 0.001 г/л
20. Міоїнозит – 10 г/л

Інші компоненти:

21. Сахароза – 30 г/л
22. Агар-агар – 10 г/л

Культивування експлантів тривало протягом двох тижнів, під час яких вели облік кількості життєздатних і стерильних зразків у відношенні до загальної кількості введених у культуру. На наступному етапі рослини вирощували на безгормональному поживному середовищі МС із регулярним пасажуванням кожні 14 днів.

2.2. Отримання культури «бородатих» коренів рослин м'яти перцевої

Для отримання культури «бородатих» коренів використовували листові пластинки та фрагменти стебел стерильних рослин м'яти перцевої, а також нічну культуру бактерій *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4), що була попередньо вирощена на рідкому середовищі Лурія-Бертані (LB), яке містило: 10 г триптон, 5 г дріжджового екстракту та 10 г NaCl на 1 літр поживного середовища [76]. Для приготування суспензії бактеріальних клітин культура *A. rhizogenes* була осаджена шляхом центрифугування при 6000 об/хв протягом 15 хвилин, після чого отриманий осад ресуспендували у 5 мл рідкого середовища МС.

З метою підвищення ефективності інфікування, на поверхні експлантів створювали дрібні надрізи. Підготовлений рослинний матеріал поміщали в бактеріальну суспензію та проводили кокультивування протягом 30 хвилин. Після цього експланти переносили на стерильне живильне середовище Мурасиге та Скуга зі зменшеним у два рази вмістом макроелементів ($\frac{1}{2}$ МС) і витримували в темряві при температурі 28 °С.

Через 48 годин експланти переміщували на середовище $\frac{1}{2}$ МС, доповнене 600 мг/л цефотаксиму для знищення залишків агробактерій. Подальше спостереження дозволяло фіксувати утворення трансформованих коренів, які вирізнялися типовими морфологічними ознаками: значне галуження та негативний геотропізм. Частоту трансформації визначали як відсоткове співвідношення кількості експлантів з утвореними коренями до загальної кількості оброблених зразків.

2.3. Виділення ДНК та молекулярно-генетичний аналіз “бородатих” коренів

Із трансгенних коренів проводили виділення геномної ДНК, після чого виконували полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) із застосуванням специфічних праймерів до гена *rolB*. Геномну ДНК із трансформованих коренів ізолювали за допомогою методу, основанийого на використанні ЦТАБ. Для цього з кожної трансформованої лінії відбирали по 100 мг кореневого матеріалу, а також 100 мг коренів вихідної (нетрансформованої) рослини як контрольний зразок.

Зібраний рослинний матеріал гомогенізували у 1,5 мл буфера для екстракції ДНК. Отриману суспензію інкубували при температурі 56 °С протягом 20 хвилин, після чого проводили депротеїнізацію за допомогою органічного розчинника - суміші хлороформу та ізоамілового спирту (у співвідношенні 24:1). Після центрифугування при 14 000 об/хв відокремлювали верхній водний шар, який містив ДНК, та піддавали його повторному очищенню тією ж сумішшю хлороформу та ізоамілового спирту.

Очищену водну фазу переносили в нові пробірки, куди додавали буфер для осадження ДНК. Суміш витримували при кімнатній температурі протягом 20–60 хвилин (залежно від інтенсивності осадження у кожному окремому випадку). Осадження ДНК здійснювали шляхом центрифугування при 14 000 об/хв протягом 5 хвилин. Отриманий осад розчиняли у 200 мкл стерильного буфера з концентрацією NaCl 1,2 М, після чого осаджували ДНК повторно шляхом додавання дворазового об'єму 96% етанолу та витримки протягом 12–16 годин. Далі нуклеїнові кислоти осаджували центрифугуванням (14 000 об/хв, 5 хв), двічі промивали 70% етанолом, підсушували та остаточно розчиняли у 50 мкл стерильної деіонізованої води.

Склад ЦТАБ-буферу (x2) для екстракції рослинної ДНК (V=100 мл):

1М Трис-НСl рН 8.0 - 10 мл

5М NaCl - 28 мл

0,5М Na-ЕДТА - 4 мл

ЦТАБ - 29 г

2-меркаптоетанол - 280 мл

Склад ЦТАБ-буферу (1%) для осадження (V=100 мл):

1М Трис-НСl рН 8.0 - 5 мл

0,5М Na-ЕДТА - 2 мл

ЦТАБ - 4 г

Для підтвердження трансгенної природи отриманих «бородатих» коренів використовували раніше ізольовану геномну ДНК у реакції полімеразно-ланцюгової ампліфікації (ПЛР) із застосуванням специфічних праймерів до гена *rolB* (5' – atggatccsaattgctattccttcaccga – 3', 5' – ttagcctctttcttcaggtttactgcagc – 3'). У якості позитивного контролю застосовували тотальну ДНК штаму *Agrobacterium rhizogenes*.

З метою перевірки достовірності результатів та виключення ймовірності хибнопозитивних сигналів, пов'язаних із залишками бактеріального контамінанта, додатково проводили ампліфікацію з використанням праймерів, специфічних до бактеріального гена *virG* (5'-ggtcgctatgcggcatc-3' 5'cctgagattaagtgccagtcag-3'). Такий підхід дозволяв відрізнити справжні трансгенні корені від тих, що могли бути інфіковані *A. rhizogenes*, але не інтегрували Т-ДНК у геном.

Полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням термоциклера Mastercycler Personal. Реакційний об'єм становив 20 мкл і включав наступні компоненти:

- 2 мкл (приблизно 100 нг) загальної рослинної ДНК,

- 2 мкл буфера для реакції, що містив 10 мМ Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl та 0,01% Тритону X-100,
- 2 мкл суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (dNTPs) у кінцевій концентрації 200 мкМ кожного,
- 0,5 мкл кожного з праймерів (із концентрацією 0,2 мкМ),
- 0,5 мкл Taq-ДНК-полімерази,
- 13 мкл стерильної деіонізованої води для доведення об'єму до 20 мкл.

Протокол ампліфікації включав:

- початкову денатурацію при 94 °С протягом 3 хвилин,
- 30 циклів ампліфікації (94 °С — 30 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 30 с),
- фінальну елонгацію при 72 °С протягом 5 хвилин.

Отримані амплікони аналізували методом горизонтального електрофорезу у 1% агарозному гелі, використовуючи Трис-ацетатну буферну систему. У якості негативного контролю застосовували ДНК, ізольовану з нетрансформованих коренів м'яти перцевої, тоді як позитивним контролем слугувала тотальна ДНК *Agrobacterium rhizogenes*.

2.4. Приготування екстрактів та визначення їх антимікробної активності

Для приготування екстрактів використовували 3 лінії “бородатих” коренів *M. piperita*, які вирощувались на рідкому живильному середовищі 1/2МС протягом 30 діб в темряві в умовах постійної аерації. Рослинний матеріал було відфільтровано від живильного середовища, ретельно промито проточною водою, після чого висушено в затінку при кімнатній температурі протягом 15 діб до постійної маси. Після висушування корені подрібнювали до порошкоподібного стану. Для екстракції сухий порошок рослинної сировини настоювали окремо в таких розчинниках як

дистильована вода, етанол та метанол. Сировину заливали відповідним розчинником у співвідношенні 1:10 (м/об) у окремі скляні колби та екстрагували протягом 3 діб за безперервного помішування на лабораторному шейкері. Після завершення екстракції рідини фільтрували через чотиришарову марлю. Усі отримані екстракти використовували для подальшого аналізу антимікробної активності [77].

У дослідженні як тест-організми використовували представників грампозитивних та грамнегативних бактерій: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* та *Pseudomonas aeruginosa*. Для підготовки інокуляту мікроорганізми висівали на поживний бульйон, що містив 0,5% пептону, 0,5% хлориду натрію та 0,15% дріжджового екстракту (рН 7,4), після чого інкубували при температурі 37 °С протягом 24 годин.

Антибактеріальну активність екстрактів “бородатих” коренів *Mentha piperita* визначали за допомогою методу дифузії в агарові лунки. Стерильний поживний агар попередньо інокулювали бактеріальними культурами методом рівномірного розподілу інокуляту по поверхні середовища. У шарі агару за допомогою стерильного коркового бура формували лунки діаметром 5 мм, які заповнювали дослідними рослинними екстрактами. Як негативний контроль використовували відповідні чисті розчинники, у яких були приготовані екстракти, а як позитивний контроль — стандартний антибіотик хлорамфенікол у концентрації 100 мкг/мл. Чашки Петрі інкубували при температурі 37 °С протягом 24 годин. Оцінювання антибактеріальної активності проводили шляхом вимірювання діаметра зон затримки росту навколо лунок. Для кожного зразка аналіз проводили у трикратній повторності. Розмір зони інгібування обчислювали як різницю між загальним діаметром зони пригнічення росту та діаметром самої лунки (5 мм) [78].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Введення в культуру *in vitro* та отримання бородатих коренів м'яти перцевої

Рослини м'яти перцевої було успішно введено в культуру *in vitro* шляхом проведення процедури стерилізації пагонів. Загалом у дослідженні було використано 15 пагонів м'яти перцевої для ініціації культури. Після стерилізаційної обробки 11 рослин залишалися життєздатними та асептичними, що відповідало загальному рівню ефективності 75 %. Разом з тим, 25 % рослин загинули внаслідок фітотоксичної дії стерилізуючих агентів, а рівень мікробної контамінації становив 15 %.

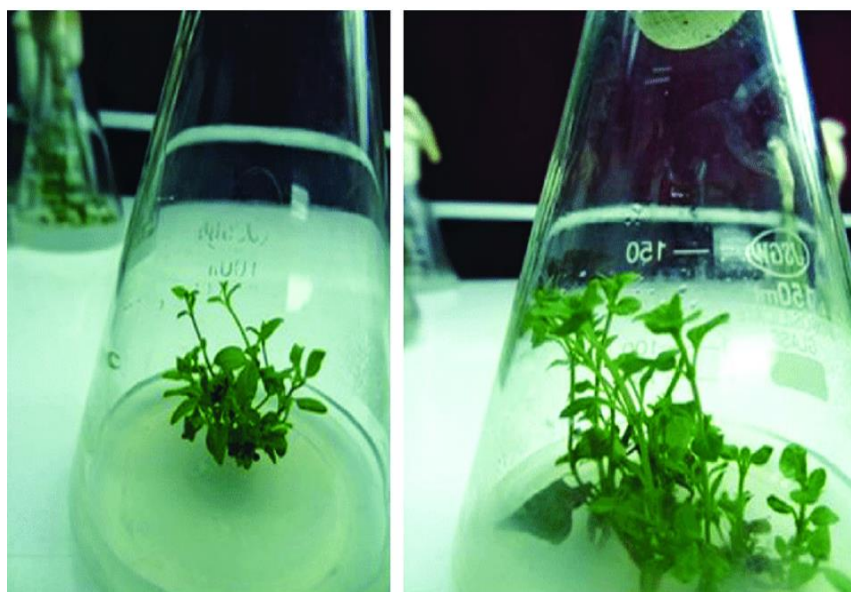


Рис. 3.1.1. Рослини м'яти перцевої в культурі *in vitro*.

Такі результати свідчать про належний баланс між антимікробною ефективністю застосованого стерилізаційного протоколу та мінімальним ушкодженням тканин рослини. Таким чином, ефективність стерилізації, розрахована як частка асептичних і життєздатних зразків, становила 60 %. Отриманий відсоток безконтамінованих пагонів м'яти перцевої можна

вважати достатньо високим для подібних методик введення в культуру *in vitro*. Це дає підстави вважати використаний протокол обробки перспективним та придатним для ефективного стерилізування вихідного матеріалу м'яти перцевої.

Отримані асептичні рослини м'яти перцевої було використано для проведення *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації з метою індукції культури «бородатих» коренів. Як експланти застосовувалися як фрагменти листків, так і сегменти стебел. Перші ознаки утворення трансформованих коренів спостерігались у період між 12–16 добою після кокультивації з *A. rhizogenes*. Зокрема, при використанні стеблових експлантів утворення коренів відмічалось в середньому на 12-й день, тоді як при використанні листкових сегментів - на 16-й день, що свідчить про швидшу реакцію стеблових тканин на



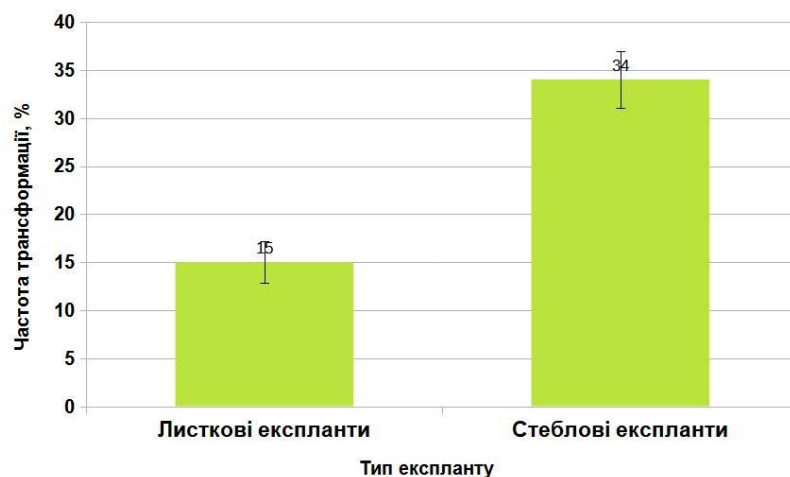
трансформаційний вплив.

Рис. 3.1.2. Культура «бородатих» коренів рослин м'яти перцевої.

Таким чином, результати експерименту вказують на залежність ефективності формування «бородатих» коренів м'яти перцевої від типу

використаного експланту. Частота трансформації при застосуванні стеблових сегментів сягала 34 %, тоді як при використанні листкових — лише 15 %. Крім того, візуальна оцінка якості кореневих ліній, отриманих зі стеблових експлантів, засвідчила їх вищу морфологічну однорідність і життєздатність порівняно з лініями, отриманими з листкових сегментів. Ймовірно, така різниця зумовлена підвищеною чутливістю клітин стеблової тканини до трансформації або більш активною проліферацією після впливу бактерії.

З огляду на це, для подальших досліджень було відібрано три найбільш активно ростучих ліній трансформованих коренів, отриманих зі стеблових експлантів. Отже, при отриманні культури «бородатих» коренів м'яти перцевої доцільно використовувати саме стеблові фрагменти як вихідний матеріал для досягнення високого рівня трансформації, що



становить 34 %.

Рис. 3.1.3. Частота трансформації рослин м'яти перцевої в залежності від типу експланту

Отримані «бородаті» корені демонстрували типові морфологічні ознаки трансформованої культури: інтенсивне галуження, негативний геотропізм та здатність до росту на середовищі без додавання

фітогормонів. Втім, для остаточного підтвердження їхньої трансгенної природи необхідним є молекулярно-генетичний аналіз, зокрема проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням специфічних праймерів до гена *rolB*. З метою виключення наявності залишкової контамінації *Agrobacterium rhizogenes*, також було здійснено ПЛР із праймерами, комплементарними до бактеріального гена *virG*.

Для аналізу було виділено геномну ДНК з п'яти ліній «бородатих» коренів, а також із коренів нетрансформованої (контрольної) рослини. Ампліфікацію проводили з використанням тотальної ДНК *A. rhizogenes* як позитивного контролю.

Результати електрофорезу ПЛР-продуктів засвідчили наявність специфічного фрагмента довжиною 780 пар нуклеотидів у зразках геномної ДНК трансформованих ліній та в позитивному контролі. У ДНК нетрансформованих коренів зазначений фрагмент не виявлено. Крім того, відсутність ампліфікату, що відповідає *virG*, у ДНК «бородатих» коренів підтверджує відсутність бактеріального забруднення культури.

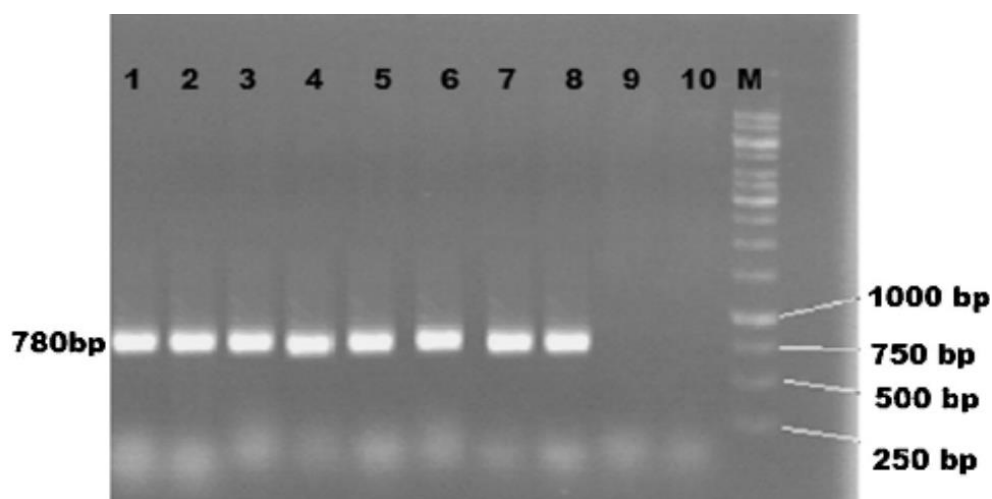


Рис. 3.1.3. Результати електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації геномної ДНК «бородатих» коренів рослин м'яти перцевої з використанням праймерів до *rolB* гена: 1- позитивний контроль, сумарна ДНК *A. rhizogenes*; 2-8 - сумарна ДНК «бородатих коренів»; 9-10 – ДНК

вихідної нетрансформованої рослини; M –маркер O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Таким чином, результати молекулярно-генетичних досліджень підтверджують успішну інтеграцію гена *rolB* у геном трансформованих ліній м'яти перцевої та відсутність залишкової контамінації бактерією *Agrobacterium rhizogenes*. Отримані результати вказують на ефективність проведеної *A. rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації та формування стабільних культур трансформованих («бородатих») коренів. Виявлення фрагмента ДНК довжиною 780 пар нуклеотидів, що відповідає гену *rolB*, є прямим свідченням трансгенної природи отриманих кореневих ліній м'яти перцевої.

3.2. Антимікробна активність екстрактів з «бородатих» коренів *M. piperita* щодо тест-культур мікроорганізмів

Антимікробну активність водного, етанолового та метанолового екстрактів коренів *Mentha piperita* оцінювали проти представників грампозитивних (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) та грамнегативних (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерій методом дифузії в агарові лунки. Отримані результати свідчать про наявність вираженої антимікробної активності у всіх типів екстрактів, однак ступінь інгібування варіював залежно від типу екстрагенту та чутливості мікроорганізмів.

Найбільші зони інгібування були зафіксовані для метанольного екстракту, зокрема проти *S. aureus* ($15,2 \pm 0,5$ мм) та *B. subtilis* ($14,6 \pm 0,7$ мм). Етанольний екстракт виявив помірну активність, причому найбільшу також щодо грампозитивних мікроорганізмів *S. aureus* ($11,0 \pm 0,6$ мм) та *B. subtilis* ($10,5 \pm 0,4$ мм). Водний екстракт показав найнижчий рівень антимікробної дії, причому проти *Pseudomonas aeruginosa* та *Proteus*

vulgaris спостерігалось незначне або відсутнє пригнічення росту бактерій (табл.3.2.1.).

Таблиця 3.2.1.

Антимікробна активність (середній діаметр зони інгібування росту, мм) екстрактів “бородатих” коренів *Mentha piperita* (без урахування діаметру лунки - 5 мм)

Тест-культура	Водний екстракт	Етанольний екстракт	Метанольний екстракт	Хлорамфенікол (100 мкг/мл)
Грамположитивні:				
<i>B. subtilis</i>	6,1 ± 0,3 мм	10,5 ± 0,4 мм	14,6 ± 0,7 мм	21,3 ± 0,5 мм
<i>S. aureus</i>	6,7 ± 0,4 мм	11,0 ± 0,6 мм	15,2 ± 0,5 мм	22,0 ± 0,4 мм
Грамнегативні:				
<i>E. coli</i>	5,2 ± 0,3 мм	7,8 ± 0,5 мм	10,1 ± 0,6 мм	20,6 ± 0,6 мм
<i>P. vulgaris</i> ,	0,0	4,3 ± 0,2 мм	6,9 ± 0,4 мм	18,9 ± 0,7 мм
<i>P. aeruginosa</i>	0,0	3,1 ± 0,2 мм	5,4 ± 0,3 мм	17,4 ± 0,6 мм

Як видно з таблиці 3.2.1, метанол виявився найефективнішим розчинником для екстракції сполук з антимікробною активністю із “бородатих” коренів *Mentha piperita*. Антибактеріальна активність екстрактів загалом була вищою проти грампозитивних бактерій у порівнянні з грамнегативними.

Отримані результати свідчать про наявність антимікробної активності екстрактів “бородатих” коренів *Mentha piperita* проти як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій, що узгоджується з даними попередніх досліджень щодо антибактеріальних властивостей представників роду *Mentha* [77].

Найвищу інгібуючу активність показали метанольні екстракти, особливо щодо грампозитивних штамів *S. aureus* та *B. subtilis*. Така активність, імовірно, зумовлена високою екстракційною здатністю метанолу до полярних біологічно активних сполук, зокрема флавоноїдів,

фенольних кислот та терпенів, які добре відомі своїми антимікробними властивостями. Разом з тим, водний екстракт мав найменшу активність або взагалі не спричинював інгібування росту *P. aeruginosa* та *P. vulgaris*. Це може бути пов'язано як із меншою здатністю води екстрагувати біологічно активні компоненти, так і з природною стійкістю грамнегативних бактерій до ряду фітокомпонентів через наявність зовнішньої ліпополісахаридної мембрани [1].

Етанолові екстракти показали помірну антимікробну активність, займаючи проміжне положення між водними та метаноловими. Це ще раз підкреслює важливість полярності розчинника для ефективного вилучення антимікробно активних речовин з рослинної сировини.

Усі екстракти виявили вищу активність проти грампозитивних бактерій порівняно з грамнегативними. Така тенденція є типовою для рослинних екстрактів і пояснюється структурними особливостями клітинної стінки: грампозитивні бактерії мають товстий шар пептидоглікану, однак відсутній зовнішній мембранний бар'єр, що спрощує проникнення активних сполук [6].

Порівняння з позитивним контролем (хлорамфеніколом) засвідчило, що хоча активність екстрактів поступалася стандартному антибіотику, вона все ж може вважатися значною з огляду на природне походження та потенційно меншу токсичність компонентів. Важливо зазначити, що антимікробна активність екстрактів у поєднанні з їх біосумісністю може мати перспективу для використання у фармацевтичній та харчовій промисловості.

Отже, результати підтверджують ефективність метанольних і етанольних екстрактів коренів *Mentha piperita* як потенційних природних антимікробних агентів. Подальші дослідження доцільно спрямувати на хімічну ідентифікацію активних сполук, вивчення їх механізмів дії, а також оцінку синергії з антимікробними засобами, що існують.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження дозволяють зробити наступні висновки:

1. Показано, що асептичну культуру рослин м'яти перцевої (*Mentha piperita*) можна отримати шляхом поверхневої стерилізації пагонів із ефективністю 75%
2. Визначено, що для отримання “бородатих” коренів рослин м'яти перцевої доцільно використовувати стеблові експланти, які виявилися ефективнішими за листові як за частотою трансформації (34 та 15% відповідно), так і за морфологічними характеристиками отриманих кореневих ліній.
3. Показано, що молекулярно-генетична ідентифікація трансформованих коренів підтверджує інтеграцію гена *rolB* та відсутність залишкової бактеріальної контамінації, що свідчить про успішну стабільну трансформацію і перспективність створеної культури для біотехнологічних досліджень.
4. Виявлено, що екстракти з “бородатих” коренів *Mentha piperita* виявили значну антимікробну активність, особливо у випадку використання метанолу як екстрагента, з більш вираженим ефектом проти грампозитивних бактерій. Це відкриває перспективи використання трансформованих коренів м'яти як джерела природних антимікробних сполук для фармацевтичної та харчової промисловості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pouran F., Mahdavian A., Aghazadeh H., Navidinia M. Antimicrobial Agents Based on Natural Compounds: The Key to Solving the Current Crisis // *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 12, No. 4. – Article ID: e146195.
2. Su T., Qiu Y., Hua X., Ye B., Luo H., Liu D., Qu P., Qiu Z. Novel Opportunity to Reverse Antibiotic Resistance: To Explore Traditional Chinese Medicine With Potential Activity Against Antibiotics-Resistance Bacteria // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – Article No. 610070.
3. Shanaida M., Hudz N., Białoń M., Kryvtsova M., Svydenko L., Filipaska A., Wiczorek P.P. Chromatographic profiles and antimicrobial activity of the essential oils obtained from some species and cultivars of the Menthaeae tribe (Lamiaceae) // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2021. – Vol. 28. – P. 6145–6152.
4. El-Lateef Gharib F.A., da Silva J.A.T. Composition, total phenolic content and antioxidant activity of the essential oil of four Lamiaceae herbs // *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 7. – P. 19–27.
5. Li Y., Liu Y., Ma A., Bao Y., Wang M., Sun Z. In vitro antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of *Mentha piperita* L. // *Food Science and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 26. – P. 1675–1683.
6. Wu Z., Tan B., Liu Y., Dunn J., Martorell Guerola P., Tortajada M., Cao Z., Ji P. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – Article No. 2825.

7. Ahmad R. Sh., Imran A., Arshad M. S., Hussain M. B., Waheed M., Safdar S., Yasmin Z. Introductory chapter: *Mentha piperita* (a valuable herb): Brief overview // *In: Herbs and Spices*. – 2020. – [S.l.]: IntechOpen. – Режим доступа: <https://www.intechopen.com/chapters/73040>

8. Bomfim Y.G., Queiroz B.S., dos Santos M.S. In vitro antimicrobial activity evaluation of *Mentha piperita* and *Citrus limon* essential oils against pathogenic strains // *Research, Society and Development*. – 2023. – Vol. 12, № 10. - e81121043430.

9. Abbas S., Sultana S., Chishti A.W., Akram M., Ali Shah S.M.A., Sareen A., Siddique S., Aftab A. *Mentha piperita*: Medicinal uses and pharmacological properties // *International Journal of Scholarly Research in Biology and Pharmacy*. – 2022. – Vol. 1. – P. 41–45.

10. Sun Z., Wang H., Wang J., Zhou L., Yang P. Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grown in China // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 12. – e114767.

11. Kiełtyka-Dadasiewicz A. Morphological and genetic diversity among peppermint (*Mentha × piperita* L.) cultivars // *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. – 2017. – Vol. 16. – P. 151–161.

12. Kamatou G. P., Vermaak I., Viljoen A. M. *Mentha piperita* (Lamiaceae): A review of its phytochemistry, biological activities and applications // *Phytother. Res*. – 2013. – Vol. 27, № 4. – P. 633–638.

13. McKay D. L., Blumberg J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.) // *Phytother. Res*. – 2006. – Vol. 20, № 8. – P. 619–633.

14. Lawrence B.M. *Mint: The Genus Mentha*. Boca Raton (FL): CRC Press, 2006. – 414 p.

15. ESCOP – European Scientific Cooperative on Phytotherapy. *ESCOP Monographs: Menthae Piperitae Folium*. ESCOP Monographs, 2019. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://escop.com>
16. El Hassani F.Z. Characterization, activities, and ethnobotanical uses of *Mentha* species in Morocco // *Heliyon*. – 2020. – Vol. 6. – Article e05480.
17. Dolghi A., Coricovac D., Dinu S., Pinzaru I., Dehelean C.A., Grosu C., Chioran D., Merghes P.E., Sarau C.A. Chemical and antimicrobial characterization of *Mentha piperita* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and in vitro potential cytotoxic effect in human colorectal carcinoma cells // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – Article 6106.
18. Arrahmouni R., Ouazzani C., Er-Ramly A., Moustaghfir A., Dami A., Ballouch L. Chemical composition of Moroccan commercial essential oils of mint: *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, and *Mentha pulegium* // *Tropical Journal of Natural Product Research*. – 2023. – Vol. 7. – P. 2708–2712.
19. Taylan O., Cebi N., Sagdic O. Rapid screening of *Mentha spicata* essential oil and L-menthol in *Mentha piperita* essential oil by ATR-FTIR spectroscopy coupled with multivariate analyses // *Foods*. – 2021. – Vol. 10. – Article ID: 202.
20. Rachwalik R., Kurowski G., Vogt E., Vogt O. *Technologies of Essential Oils*. – Kraków: Wydawnictwo PK, 2020.
21. Çolak E.B., Çobanoğlu Ö., Tepecik M., Öztürk B., Anaç D. Yield, essential nutrients and essential oils of peppermint (*Mentha × piperita* L.) grown under organic farming conditions // *Journal of Agriculture*. – 2015. – Vol. 29. – P. 29–36.
22. Tepecik M., Esetlili B.Ç., Öztürk B., Anaç D. Effect of different fertilizers on peppermint—Essential and non-essential nutrients, essential oils and yield // *Italian Journal of Agronomy*. – 2022. – Vol. 17, № 1. – Article ID: 1921.

23. Verma R.S., Rahman L.U., Verma R.K., Chauhan A., Yadav A.K., Singh A. Essential oil composition of menthol mint (*Mentha arvensis*) and peppermint (*Mentha piperita*) cultivars at different stages of plant growth from Kumaon region of Western Himalaya // *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. – 2010. – Vol. 1. – P. 13–18.

24. Kehili S., Boukhatem M.N., Belkadi A., Ferhat M.A. Peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil as a potent anti-inflammatory, wound healing and anti-nociceptive drug // *European Journal of Biological Research*. – 2020. – Vol. 10. – P. 132–149.

25. Kizil S., Haşimi N., Tolan V., Kiliç E., Yüksel U. Mineral content, essential oil components and biological activity of two *Mentha* species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.) // *Turkish Journal of Field Crops*. – 2010. – Vol. 15. – P. 148–153.

26. Hamad Al-Mijalli S., Elsharkawy E.R., Abdallah E.M., Hamed M., El Omari N., Mahmud S., Alshahrani M.M., Mrabti H.N., Bouyahya A. Determination of volatile compounds of *Mentha piperita* and *Lavandula multifida* and investigation of their antibacterial, antioxidant, and antidiabetic properties // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2022. – Vol. 2022. – Article ID: 9306251.

27. Mahmoud S.S., Croteau R.B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2003. – Vol. 100. – Article ID: 14481.

28. Gonçalves R.S., Battistin A., Pauletti G., Rota L., Serafini L.A. Antioxidant properties of essential oils from *Mentha* species evidenced by electrochemical methods // *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*. – 2009. – Vol. 11. – P. 372–382.

29. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). – 11th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2020.

30. Lin S., Wang Y., Wu K., Yu G., Liu C., Su C., Yi F. Study on the effect of *Mentha × piperita* L. essential oil on electroencephalography upon stimulation with different visual effects // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – Article ID: 4059.

31. Kalembe D., Synowiec A. Agrobiological interactions of essential oils of two menthol mints: *Mentha piperita* and *Mentha arvensis* // *Molecules*. – 2019. – Vol. 25. – Article ID: 59.

32. Wińska K., Mączka W., Łyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—Myth or real alternative? // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – Article ID: 2130.

33. Liu C., Gao Q., Shang Z., Liu J., Zhou S., Dang J., Liu L., Lange I., Srividya N., Lange B.M. та ін. Functional characterization and structural insights into stereoselectivity of pulegone reductase in menthol biosynthesis // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – Vol. 12. – Article 780970.

34. Łyczko J., Piotrowski K., Kolasa K., Galek R., Szumny A. *Mentha piperita* L. micropropagation and the potential influence of plant growth regulators on volatile organic compound composition // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – Article 2652.

35. Wei H., Kong S., Jayaraman V., Selvaraj D., Soundararajan P., Manivannan A. *Mentha arvensis* and *Mentha × piperita* – vital herbs with myriads of pharmaceutical benefits // *Horticulturae*. – 2023. – Vol. 9. – Article 224.

36. Eftekhari A., Khusro A., Ahmadian E., Dizaj S.M., Hasanzadeh A., Cucchiarini M. Phytochemical and nutra-pharmaceutical attributes of *Mentha* spp.: a comprehensive review // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2021. – Vol. 14. – Article 103106.

37. American Botanical Council. Expanded Commission E Monographs. Peppermint Oil [Электронный ресурс]. – 2023. – Режим доступа: <https://www.herbalgram.org/resources/herbalgram/expanded-commission-e-monographs/peppermint-oil/>
38. World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 2. – Geneva: World Health Organization, 2002. – 296 с.
39. Mahendran G., Rahman L. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on peppermint (*Mentha piperita*)—A review // *Phytotherapy Research*. – 2020. – Vol. 34. – P. 2088–2139.
40. Arruda M.O., Mendes S.J., Teixeira S.A., de Mesquita L.S., de Sousa Ribeiro M.N., de Galvão S., Muscará M.N., Fernandes E.S., Monteiro-Neto V. The hydroalcoholic extract obtained from *Mentha piperita* L. leaves attenuates oxidative stress and improves survival in lipopolysaccharide-treated macrophages // *Journal of Immunology Research*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–9.
41. Tsioutsiou A., Chorianopoulou A., Zoumpoulakis P., Heskia D., Heskidou E., Halabalaki M. Antioxidant activity of mint (*Mentha piperita* L.) of Greek flora and identification of its bioactive compounds // *Organic & Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 11.
42. Mallick B., Sinha S., Roy D. Evaluation of antioxidative potential of field grown and tissue culture derived *Mentha piperita* L. plants // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2016. – Vol. 5. – P. 382–391.
43. Aldoghachi F.E.H., Noor Al-Mousawi U.M., Shari F.H. Antioxidant activity of rosmarinic acid extracted and purified from *Mentha piperita* // *Archives of Razi Institute*. – 2021. – Vol. 76, № 5. – P. 1279–1287.
44. Grodowska K., Parczewski A. Organic solvents in the pharmaceutical industry // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 3–12.

45. Nilo M.C.S., Riachi L.G., Simas D.L.R., Coleho G.C., da Silva A.J.R., Costa D.C.M., Alviano D.S., Alviano C.S., De Maria C.A.B. Chemical composition and antioxidant and antifungal properties of *Mentha × piperita* L. (peppermint) and *Mentha arvensis* L. (cornmint) samples // *Food Research*. – 2017. – Vol. 1. – P. 147–156.

46. Athanasiadis V., Palaiogiannis D., Bozinou E., Lalas S.I., Makris D.P. B-cyclodextrin-aided aqueous extraction of antioxidant polyphenols from peppermint (*Mentha × piperita* L.) // *Oxygen*. – 2022. – Vol. 2. – P. 424–436.

47. Jamshed A., Jabeen Q. Pharmacological evaluation of *Mentha piperita* against urolithiasis: An in vitro and in vivo study // *Dose-Response*. – 2022. – Vol. 20. – Article ID: 155932582110730.

48. Alexa E., Danciu C., Radulov I., Obistioiu D., Sumalan R.M., Morar A., Dehelean C.A. Phytochemical screening and biological activity of *Mentha × piperita* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. extracts // *Analytical Cellular Pathology*. – 2018. – Article ID: 2678924.

49. Hudz N., Makowicz E., Shanaida M., Białoń M., Jasicka-Misiak I., Yezerska O., Svydenko L., Wieczorek P.P. Phytochemical evaluation of tinctures and essential oil obtained from *Satureja montana* herb // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – Article ID: 4763.

50. Bellassoued K., Ben Hsouna A., Athmouni K., van Pelt J., Makni Ayadi F., Rebai T., Elfeki A. Protective effects of *Mentha piperita* L. leaf essential oil against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats // *Lipids in Health and Disease*. – 2018. – Vol. 17. – Article ID: 9.

51. Singh R., Shushni M.A.M., Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2015. – Vol. 8. – P. 322–328.

52. Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. – 2008. – Vol. 7. – P. 203–209.

53. Anwar F., Abbas A., Mehmood T., Gilani A., Rehman N. Mentha: A genus rich in vital nutra-pharmaceuticals—A review // *Phytotherapy Research*. – 2019. – Vol. 33. – P. 2548–2570.
54. Christey M.C. Use of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation systems to produce transgenic plants // *Plant Cell Reports*. – 2001. – Vol. 20, № 8. – P. 759–768.
55. Guillon S., et al. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2006. – Vol. 9, № 3. – P. 341–346.
56. Georgiev V., et al. Hairy root type plant in vitro systems as a platform for production of useful metabolites // *Biotechnology Advances*. – 2007. – Vol. 25, № 6. – P. 524–534.
57. Banerjee S., et al. Hairy root cultures: a sustainable tool for biomass and metabolite production // *Biotechnology Advances*. – 2012. – Vol. 30, № 6. – P. 1091–1104.
58. Gutierrez-Valdes N., et al. Hairy roots for the production of high-value metabolites // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2020. – Vol. 40, № 4. – P. 461–474.
59. Srivastava S., Srivastava A.K. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2007. – Vol. 27, № 1. – P. 29–43.
60. Sharma M., Pati P.K. Production of secondary metabolites from hairy root cultures: current status and future perspectives // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2012. – Vol. 110. – P. 1–13.
61. Bulgakov V.P., et al. The *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* modulate plant defense signaling pathways // *Biotechnology Advances*. – 2008. – Vol. 26, No. 4. – P. 318–324.
62. Giri A., Narasu M.L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // *Biotechnology Advances*. – 2000. – Vol. 18, № 1. – P. 1–22.

63. Häkkinen S.T., et al. Bioreactor production of plant-derived bioactive compounds: challenges and opportunities // *Engineering in Life Sciences*. – 2016. – Vol. 16, № 6. – P. 505–523.

64. Bonhomme V., et al. Tropane alkaloid production by hairy root cultures of *Atropa belladonna* // *Plant Cell Reports*. – 2000. – Vol. 19, № 9. – P. 910–914.

65. Kim O.T., et al. Enhanced biosynthesis of ginsenosides in transgenic hairy roots of *Panax ginseng* co-transformed with squalene synthase and dammarenediol synthase // *Plant Cell Reports*. – 2009. – Vol. 28, № 9. – P. 1431–1440.

66. Bae K., et al. Production of bioactive ginsenosides using hairy root cultures of *Panax ginseng* // *Journal of Ginseng Research*. – 2020. – Vol. 44, № 4. – P. 536–543.

67. Dilshad E., et al. Artemisinin and its derivatives: current status and perspectives in phytochemistry and plant biotechnology // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 99, № 13. – P. 5827–5840.

68. Yan Q., et al. Production of tanshinones in transformed root cultures of *Salvia miltiorrhiza* and their antimicrobial activity // *Plant Cell Reports*. – 2005. – Vol. 24, № 7. – P. 434–440.

69. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2009. – Vol. 3, № 13. – P. 1222–1239.

70. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review // *J. Pharm. Anal.* – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 71–79.

71. Valgas C., de Souza S.M., Smânia E.F.A., Smânia A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products // *Braz. J. Microbiol.* – 2007. – Vol. 38, № 2. – P. 369–380.

72. Essawi T., Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity // *J. Ethnopharmacol.* – 2000. – Vol. 70, № 3. – P. 343–349.

73. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.* – M07-A11. – Wayne, PA: CLSI, 2021.

74. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // *Nat. Protoc.* – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 163–175.

75. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum.* – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473–497.

76. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

77. Essawi T., Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2000. – Vol. 70, № 3. – P. 343–349.

78. Perez C., Pauli M., Bazerque P. An antibiotic assay by agar well diffusion method // *Acta Biol. Med. Exp.* – 1990. – Vol. 15, № 1. – P. 113–115.

ДОДАТОК А
АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ