

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 216 «С». 2023.15.02. 13 ПЗ

НУБІП України

СТЕЦЕНКО ОЛЕКСИЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

2023 р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 57.085.23

НОГОДЖЕНО
Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та
екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувача кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

Коломієць Ю.В. 2023 р. Кваско О.Ю. 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему «Мікроклональне розмноження *Mellisa officinalis* L. *in vitro*»
Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)
Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми
д. с.-г. наук, професор
(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.
(ПІБ)

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи
д. с.-г. наук, професор
(науковий ступінь та вчене звання)

Коломієць Ю.В.
(ПІБ)

Виконав
Стеценко О.В.
(ПІБ студента)

Київ-2023

НУБІП України

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

НУБІП України

2023 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

НУБІП України

Стеценка Олексія Володимировича
(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

НУБІП України

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Мікроклональне розмноження *Melissa officinalis* L. *in vitro*»

Затверджена наказом ректора НУБІП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

НУБІП України

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи регулятори росту, живильні середовища, рослини

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Морфогенетична реакція експлантів на етапі ініціації культури *in vitro*
2. Вплив типу та концентрації цитокініну на проліферацію пагонів *in vitro*
3. Вплив типу та концентрації ауксину на укорінення пагонів *in vitro*
4. Адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*

Перелік графічного матеріалу:

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

НУБІП України

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Реферат

Робота виконана на 43 сторінках, містить 3 розділи, 6 рисунки, 4 таблиці, 32 використаних джерел.

Метою нашої роботи було розробити протокол розмноження *M. officinalis in vitro* з використанням апексів і одноузлових фрагментів як експлантів.

Меліса лікарська (*Melissa officinalis* L.) – багаторічна трав'яниста ефірно-лікарська рослина, яка широко використовується у фармакології, парфумерно-косметичній, лікєро-горілчаній та харчовій промисловості.

Низький вміст ефірної олії в сировині меліси обумовлює селекційну роботу, спрямовану на створення високоолійних сортів. Використання методу клонального мікророзмноження *in vitro* підвищить ефективність цього процесу та прискорить розмноження перспективних селекційних зразків.

Найвищу швидкість розмноження (4,4 пагонів/експлант) було отримано на середовищі MS з додаванням 3 мг/л БАП. Середовище MS з половинним вмістом макро і мікроелементів з додаванням 1 мг/л НОЖ було найефективнішим для вкорінення мікропагонів меліси *in vitro*.

Мікророзмножені рослини, перенесені *ex vitro*, показали нормальну морфологію та 93% рівень виживання під час адаптації. Результати, отримані протягом етапів регенерації *in vitro*, підтверджують, що культура тканин *in vitro* є ефективним методом розмноження *M. officinalis*.

Вступ

ЗМІСТ

НУБІП України

6

Розділ 1. Огляд літератури 10

1.1. Таксономія *Melissa officinalis* L 10

НУБІП України

1.2. Фітохімічний склад *Melissa officinalis* L 13

1.2.1. Летючі сполуки 13

НУБІП України

1.2.2. Тритерпени 18

1.2.3. Поліфенольні сполуки 20

1.3. Фармакологічна дія 23

НУБІП України

Розділ 2. Об'єкти і методи досліджень 28

2.1. Процедура стерилізації рослинного матеріалу 28

НУБІП України

2.2. Приготування живильних середовищ 29

2.3. Етап ініціації культури *in vitro* 30

2.4. Етап власне розмноження *in vitro* 31

НУБІП України

2.5. Етап укорінення *in vitro* 31

2.6. Етап адаптації 32

Розділ 3. Результати досліджень 33

НУБІП України

3.1. Морфогенетична реакція експлантів на етапі ініціації
культури *in vitro* 33

НУБІП України

3.2. Вплив типу та концентрації цитокініну на проліферацію
пагонів *in vitro* 34

НУБІП України

3.3. Вплив типу та концентрації ауксину на укорінення пагонів *in vitro* 37

НУБІП України

3.4. Адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro* 39

Висновки 41

Список використаних джерел 42

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Melissa officinalis L. (меліса лимонна) трав'яниста багаторічна рослина родини губоцвітих (Lamiaceae), що походить із північного Середземномор'я, відома своїми медоносними та цілющими властивостями.

Надземна частина рослини містить від 0,05 до 0,15% ефірної олії (яка містить цитронеллаль, цитраль, гераніол, ліналоол), поліфенолів, дубильних речовин (3-6%), слизу (12%), гірких речовин тощо. Насіння містить жирну олію, що складається з ліноленової, лінолевої, олеїнової, пальмітинової і стеаринової кислоти. Основна дія його активних компонентів, особливо ефірної олії

меліси, є спазмолітичною, заспокійливою, антисептичною, вітрогонною, жовчогінною, м'якою проносною, шлунково-кишковою, заспокійливою, жовчогінною та інсектицидною.

M. officinalis природно розмножується насінням або вегетативно і легко росте на фермі, але його популяція не є гомозиготною, і врожайність надзвичайно низька. Тому його виробництво шляхом вирощування місцевих популяцій традиційними методами не є економічним. Культура ароматичних і лікарських рослин *in vitro* виявилася важливою альтернативою для швидкого розмноження вибраних генотипів. Рослини, регенеровані *in vitro*, часто є

здоровішими, ніж їхні клони, розмножені в полі, головним чином завдяки омолодженню, і вони часто є рослинами, вільними від хвороб. Проліферація пагонів з верхівок або пазушних бруньок для отримання кількох пагонів із утворенням коренів тепер визнана життєздатною технікою розмноження

рослин. Мікророзмноження є цінним методом для великомасштабного розмноження багатьох видів рослин, але відповідне використання, тип і концентрація регуляторів росту та комбінація солей культурального середовища, що забезпечує швидкий і ефективний розвиток початкових експлантів, є вирішальними в методах культивування тканин. Кілька

дослідників працюють над стандартизацією оптимальних концентрацій регуляторів росту для проліферації пагонів і регенерації меліси лимонної.

Відомо, що сировина *M. officinalis* містить низьку кількість ефірної олії (0,02-0,30 % від сухої маси) [5, 6]. Селекційна робота, спрямована на створення високоолійних сортів *M. officinalis* [6]. Для підвищення ефективності

селекційного процесу необхідно розробити методика прискореного відтворення цінних генотипів: гібридів, селекційних зразків, отриманих *in vitro* рослин-регенерантів тощо. В даний час перспективним є використання таких біотехнологічних методів, як клональне мікророзмноження *in vitro*.

Процес мікророзмноження *in vitro* має багато переваг перед традиційним насіннєвим і вегетативним розмноженням: він не залежить від сезону, не

потребує великих площ, дає можливість отримувати генетично стабільний і здоровий посадковий матеріал, має більш високий коефіцієнт розмноження, а також забезпечує можна створювати колекції генетичної плазми *in vitro*.

Для вирішення прикладних завдань селекції та насінництва основних сільськогосподарських, декоративних і плодово-ягідних культур активно використовуються біотехнологічні методи прискореного розмноження [7-9].

Проте розробці біотехнологічних методів отримання ефіроолійних і лікарських рослин присвячено незначну кількість досліджень [10-12]. У

літературі знайдено не так багато досліджень щодо культивування

M. officinalis in vitro. Так, досліджено деякі питання індукції калосу та морфогенезу при культивуванні різних органів і тканин [13, 14]. Більшість публікацій стосується розробки методів клонального мікророзмноження

меліси [15-17]. Є відомості про особливості морфогенезу при культивуванні

різних типів експлантів (відрізки стебла з вузлом, верхівки пагонів, міжвузля,

а також фрагменти листя чи кореня) [15]. Є дані про вплив генотипу на

мікророзмноження меліси [13]. Численні дослідження присвячені оптимізації

культуральних середовищ для різних етапів мікророзмноження *in vitro* [13, 15,

18, 19].

Так, Meftanizade et al. спостерігали максимальну кількість пагонів (3,2-4,1 шт. на експлант) при культивуванні мікропагонів меліси на культуральному середовищі з вмістом 3,0 мг/л БАП або 1,0 мг/л НАК [14].

Найкращі показники морфогенезу експлантів відмічено в іншому дослідженні на живильному середовищі з 2,0 мг/л ІОК (довжина пагона – 15,98 см, кількість вузлів – 9,6 шт. на пагін) [15]. Є дані про те, що додавання 1,0 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК до середовища MS сприяло формуванню множинних пагонів (до 4 шт. на експлант) [18].

Однак у цих дослідженнях часто наводяться суперечливі дані, а крім того, недостатньо вивчені питання укорінення *in vitro* та адаптації *ex vitro* мікророслин *M. officinalis*. Тим не менш, ці етапи важливі для розмноження *in vitro*, оскільки ефективність техніки клонального мікророзмноження залежить від успіху їх впровадження.

На індукцію ризогенезу *in vitro* впливають гормональний склад культурального середовища, генотип та інші фактори. Для утворення коренів вміст мінеральних солей і цукрів у живильному середовищі часто знижують у 2-4 рази; крім того, іноді для укорінення використовують безгормональне середовище [7, 20]. Наприклад, укорінення декоративних троянд проводили на середовищі $\frac{1}{2}$ або $\frac{1}{4}$ MS з 0,004-0,1 мг/л НОК. Для утворення коренів регенерантів троянд автори використовували середовище $\frac{1}{2}$ MS з додаванням 0,5 мг/л НОК та 6% сахарози. Деякі види троянд укорінювали з додаванням 2,0

мг/л ІОК. Дослідники відзначили сортоспецифіку під час укорінення троянд: міні-троянди мали максимальний відсоток укорінення (100%); Найгірше вкорінюються пагони чайно-гібридних троянд [7]. Для укорінення

мікропагонів *Rosa damascena in vitro* до живильного середовища $\frac{1}{2}$ MS додавали ІМК з активованим вугіллям [21]. Найбільш ефективним середовищем для вкорінення гібридних сортів троянди ефіроолійної була $\frac{1}{2}$ MS з 0,5 мг/л НОК [11]. Показано, що додавання активованого вугілля до ризогенних середовищ пригнічує процес мікророзмноження *M. officinalis* [13].

Г.І. Гюргіта відзначив високу частоту укорінення мікропагонів меліси при культивуванні на середовищі з кінетином і НОК, що дозволяло виключити третю стадію клонального мікророзмноження [18]. С.М. Шакері та ін.

запропонував для мікророзмноження *M. officinalis* використовувати безгормональне живильне середовище [19].

Адаптація *ex vitro* є одним із найскладніших етапів розмноження.

Рослини піддаються стресу через зміну штучних умов культивування *in vitro* (постійна температура, живильне середовище, вологість, асептика) на більш

жорсткі умови культивування *ex vitro* [20]. Крім того, у пробіркових рослин порушується діяльність продихового апарату, що призводить до втрати великої кількості води, погіршується поглинання води та мінеральних речовин

із ґрунту через утворення малої кількості корневих волосків або навіть їх відсутність [8]. Висока генетична залежність процесів морфогенезу *in vitro*

часто вимагає оптимізації умов культивування окремо для кожного сорту або селекційного зразка.

Метою наших досліджень було вивчити вплив умов культивування на ризогенез і адаптацію меліси лікарської *in vitro* та *ex vitro*.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Таксономія *Melissa officinalis* L

Використання лікарських трав і фітопрепаратів є давньою традицією, і останній прогрес у сучасній терапії стимулював використання натуральних продуктів у всьому світі для різноманітних недуг і захворювань [1]. У традиційній медицині народ по-різному використовував лікарські рослини для лікування хвороб [2]. Народна медицина популярна в усіх регіонах світу, і її застосування стрімко поширюється навіть у розвинених країнах [3]. Наприклад, у Китаї на традиційні рослинні препарати припадає від 30% до 50% загального споживання лікарських засобів, і зараз щорічний світовий ринок фітотерапії становить понад 60 мільярдів доларів США. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, понад 80% людей у країнах, що розвиваються, покладаються на традиційні засоби, такі як трави, для задоволення своїх щоденних потреб, а близько 855 традиційних піків включають сирі рослинні екстракти. Це означає, що близько 3,5-4 мільярдів населення планети покладаються на рослинні ресурси для отримання ліків. Проле традиційне використання лише деяких із цих лікарських рослин було досліджено *in vitro* та клінічними дослідженнями [4].

Фактично, рослинні ліки, що містять природні основні хімічні сполуки в своєму профілі, можуть задовольнити першочергові потреби людей і передумови для лікування їхніх хвороб [2]. Повідомлялося, що натуральні продукти, їх похідні та аналоги становлять понад 50% усіх лікарських засобів у клінічному застосуванні, у яких натуральні продукти, отримані з вищих рослин, становлять близько 25% від загальної кількості. Різноманітність природних сполук у травах та їх різні функції у профілактиці та лікуванні різних захворювань, з одного боку, та їх властивість бути природними та комфортними для організму та не мати негативних наслідків за умови їх правильного використання спонукають людей до їх споживання; Свічені

громадські та медичні працівники мають величезний інтерес до вивчення цих трав та діагностики їхніх терапевтичних властивостей, але існує велика плутанина щодо їх ідентифікації, ефективності, терапевтичного дозування, токсичності, стандартизації та регулювання [3]. Щоб досягти цієї мети, було

проведено багато досліджень, щоб зосередитися на ідентифікації лікарських трав, що створює економічно чудові шанси для фермерів, а також пов'язаних з цим культивуванням, збиранням і агрономічними умовами трави для створення сприятливого хімічного та фармакологічного профілю

[4]. Економічно вирощування *меліси лікарської* є рентабельним, і порівняно з

економічними показниками традиційних культур, вирощених на удобрених землях, ця трава дає значно вищі прибутки [5]. Ця оглядова стаття спрямована не лише на ознайомлення з *мелісою лікарською* (умови її росту, її хімічні сполуки та традиційне використання), але й на детальний огляд її антиоксидантних властивостей.

Меліса лікарська (*Melissa officinalis* L.), також відома як *меліса*, *меліса медонос*, — багаторічна трав'яниста рослина. Це член сімейства *Lamiaceae* (м'ята), а *меліса лікарська* (*Melissa officinalis*) належить до роду, який включає 5

видів багаторічних трав, що походять з Європи, Центральної Азії. Хоча *Melissa officinalis* походить переважно з Південної Європи, зараз вона натуралізована по всьому світу, від Північної Америки до Нової Зеландії. *Меліса* зустрічається в природі в гірських і чагарникових місцевостях, але також повідомлялося, що вона росте на вологих пустках, на висотах від рівня моря до гір.

Таксономічна класифікація цієї рослини така:

Царство: Plantae;

Відділ: Tracheophyta;

Підрозділ: Spermatophyta;

Клас: Magnoliopsida;

Надряд: Asterales;

Порядок: Lamiales;

НУБІП УКРАЇНИ

Родина: *Lamiaceae*;
 Рід: *Melissa*;
 Вид: *Melissa officinalis* L.

Melisa лікарська (*Melissa officinalis* L.) цю рослину також називають мелісою,

мелісою або мелісою м'ятою; це їстівна лікарська рослина, що належить до сімейства м'ятних губоцвітих (*Lamiaceae*) і підродини непетових (*Nepetoideae*)

[5]. Це рослина, яка живе не менше трьох років; він кушистий і прямостоячий, досягаючи висоти від 60 до 100 см [6]. М'яке опушене листя має довжину від

2 до 8 см; вони темно-зелені і мають форму серця. Поверхня листка груба і з

глибокими жилками, край листка фестончастий або зубчастий [7], багатий на

біологічно активні речовини; таким чином, екстракти підкреслюють конкретні властивості (рис. 1.1)

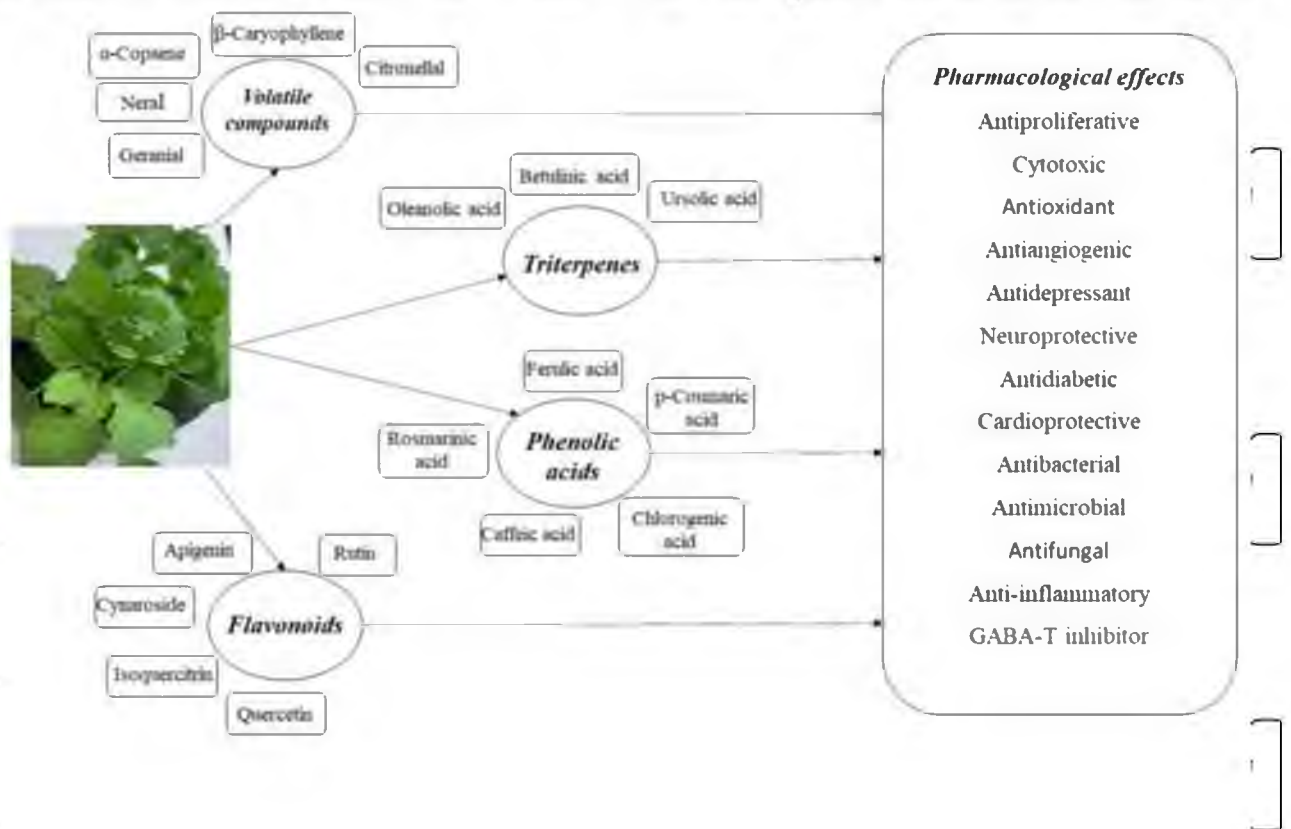


Рис. 1.1. Склад меліси лікарської та її фармакологічна дія.

Melisa лікарська має волосисту кореневу систему, що робить рослину більш пристосованою до різних умов навколишнього середовища, але верхні частини рослини на початку зими відмирають і знову з'являються на початку

весни [7]. Це одна з трав, яку найпростіше вирощувати, і вона поширюється настільки легко, що деякі садівники вважають її бур'яном [8].

1.2. Фітохімічний склад *Melissa officinalis* L.

Хімічні дослідження складу *меліси лікарської* показали, що вона містить переважно флавоноїди, терпеноїди, фенолкарбонові кислоти, дубильні речовини та ефірну олію [9]. Основними діючими речовинами *меліси лікарської* є фітонциди (гераніал, нерал, цитронелал і гераніол), тритерпени (урсолова кислота і олеанолова кислота), фенольні сполуки (розмаринова кислота, кафова кислота і протокатехінова кислота) і флавоноїди (кверцетин, рамноцитрин, лютеолін) [8, 10]. Ефірна олія зазвичай вважається відповідальним терапевтичним принципом для більшості біологічних дій, але поліфеноли також залучені.

Ефірна олія меліси лікарської, отримана зі свіжих або висушених квіток, листя та гілок цієї рослини шляхом дистиляції водяною парою або хімічної екстракції, характеризується свіжим лимонним запахом світло-жовтим кольором [11].

1.2.1. Летючі сполуки

Летюча олія, отримана з листя *меліси лікарської*, важлива завдяки своїм фармакологічним ефектам і одержується в невеликих кількостях, на відміну від інших рослин родини губоцвітих. Основний і допоміжний компоненти ефірної олії висушеного листя *меліси лікарської* є леткими сполуками, які містяться в різних концентраціях (табл. 1.1).

Ковальський та ін. [19] повідомили про вміст ефірної олії 0,17%, що було дуже низьким, на відміну від рослин того ж сімейства. Дослідження Seidler-Łożykowska et al. [16] показали, що вміст ефірної олії коливався від 0,08 до 0,20% через коливання погодних умов протягом років досліджень. Для мінливості вмісту ефірної олії та її складу Кітлер та ін. [20] досліджували набір із 28 зразків *меліси*.

Таблиця 1.1.

Компоненти ефірної олії, отриманої з висушеного листа меліси лікарської

| Назва компонента | Концентрація компонентів ефірної олії, % |
|--|--|
| Мажоритарні компоненти | |
| (E)-Каріофілен | 1.06–6.8 |
| Каріофілен оксид | 1,3–43,55 |
| Цитронелаль | 0,4–20,3 |
| Гераніальна (цитральна А) | 6.22–51.21 |
| Геранілацетат | 0,5–19,3 |
| Нераль (цитраль Б) | 4.28–35.02 |
| α -кадинол | 5.64 |
| α -копаїн | 0,1–7,02 |
| β -каріофілен | 1,3–29,14 |
| Компоненти меншості (<5%) | |
| (2E)-Нонен-1-ал | 0,2 |
| (E)-Неролідол | 0,2 |
| (E)- α -бергамотен | 1,24 |
| (E)- β -іонон | 0,9 |
| (E)- β -Оцимен | 0,1–0,5 |
| (EE)-геранілліналоол | 1,59 |
| (Z)- β -Оцимен | 0,1 |
| 1,2-бензолдикарбонова кислота, бутил-2-метилопропіловий ефір | 0,6 |
| 1,8-дегідро-цинеол | 0,1 |
| 14-Гідрокси-9-епі-(E)-каріофілен | 0,2 |
| 1-октен-3-ол | 0,2–0,3 |
| 3,5-гептадієнал,2-етіліден-6-метил | 0,4 |
| 3-октанон | 0,2 |
| 6-Метил-5-гептен-2-ол | 0,2–1,7 |
| Бензол ацетальдегід | 0,3 |
| Камфен | 0,38–1,38 |
| Камфора | 0,1–0,4 |
| Карвакрол | 0,3–1 |
| Каріофіленол | 0,5–2,23 |
| цис-2Н-3а-метил-октагідро-інден-2-он | 4,7 |
| Цис-Хризантенол | 0,7–1,7 |
| Цис-розовий оксид | 0,1–0,2 |

Продовження таблиці 1.1.

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| цитронелол | 0,4-1,88 |
| цитронеллиацетат | 0,1 |
| Дигідроцитронеллолу ацетат | 0,3 |
| Гераніол | 0,6-0,7 |
| Гермакрен Д | 0,2-2,0 |
| Епоксид гумулену II | 0,2-1,29 |
| iso Aromadendren epoxide | 0,46 |
| Ізогераніальний | 1,4-2,0 |
| Ізоментол | 2,4 |
| Ліналоол | 0,3-0,5 |
| Ліналоол + транс-сабінен гідрат | 0,5-0,8 |
| ментол | 0,3 |
| Метилцитронеллат | 0,5-2,78 |
| Метилевгенол | 0,1 |
| Метилгеранат | 0,2-0,4 |
| Мірцен | 0,1-0,3 |
| н-ейкозан | 0,6 |
| Нерол | 0,2 |
| Нерилацетат | 0,1 |
| н-генейкозан | 0,4 |
| н-нонанал | 0,1-0,4 |
| пара-Мента-1(7),8-дієн | 0,1 |
| р-цимен | 0,1 |
| фітол | 3,64 |
| Епоксид розфурану | 0,6-0,7 |
| Сабінене | 0,4 |
| тимол | 0,1-3,1 |
| т-Мууролол | 0,59 |
| транс-лимоненоксид | 0,6 |
| транс-пара-Мента-1(7),8-дієн-2-ол | 2,3 |
| Транс-Роуз оксид | 0,1 |
| валентний | 0,1 |
| α-гумулен | 0,2-2,6 |
| α-калакорен | 0,76 |
| α-Кубебене | 0,42-1,23 |
| β-кубебен | 0,1 |
| β-пінену оксид | 1,1 |
| β-сесквіфелландрен | 0,97 |
| γ-кадинен | 0,76-1,77 |
| γ-Терпінен | 0,3-0,5 |

Вони отримали вміст ефірної олії, який коливався від 0,01 до 0,72%, і з'ясували — на основі статистичного аналізу складу ефірної олії — що існує два хемотипи ефірної олії: хемотип цитраль і хемотип гермакрен D. Як відомо,

з літератури виділяють два підвиди рослини *меліси*

лікарської: *лікарська* і *альтиссіма*. Різниця між двома підвидами визначається

складом ефірної олії, так що підвид *officinalis* містить велику кількість цитралю та/або нералю, але підвид *altissima* містить лише сліди Баства та ін. [21] у дослідженні складу ефірної олії *меліси лікарської* в Греції повідомили про

відсутність основних компонентів цитралю та цитронеллалу. Souihі та ін. [14]

у порівняльному дослідженні *Melissa officinalis* з Тунісу (з двох різних міст),

Німеччини та Франції повідомили про відсутність цитралю, але велику присутність гермакрену D.

Цитрусовий аромат *меліси лікарської* зумовлений наявністю ізомерів

цитралю, а також меншої кількості цитронелалу та геранілацетату

[10]. Цитраль є ациклічним монотерпеновим альдегідом, який складається з рацемічної суміші двох ізомерів: гераніалу (транс-цитраль або цитраль А) і нералю (цис-цитраль або цитраль В); це основна сполука в ефірній олії *меліси*

лікарської, підвиду *лікарської*. У дослідженні, проведеному на рослинах

сімейства *Lamiaceae*, Kowalski et al. [19] повідомили про найвищий вміст гераніалу (23,3%), потім нералю (16,0%) і каріофіленоксиду (15,8%) у *Melissa officinalis*.

Нуржинська-Вердак та ін. [13] досліджували зміни хімічного складу

висушеної олії висушеного листа *меліси лікарської* з Польщі на першому та

другому році зростання. Гідродистиляцією з висушених на повітрі листків

вони одержали 0,3% ефірної олії; шляхом аналізу за допомогою GC-MS та GC-

FID вони виділили 106 сполук, серед яких переважаючими компонентами

були гераніаль (45,2% і 45,1%) і нераль (32,8% і 33,8%). Баракат та ін. [22]

досліджували хімічний склад йорданської ефірної олії *меліси лікарської* та

виявили, що вона значно відрізняється від складу ефірної олії *меліси лікарської* з інших країн.

У порівняльному дослідженні, проведеному Souihi et al. [14] було виявлено, що ефірна олія населення Франції показала нижчі рівні гераніалу (7,12%) і нералю (4,29%), ніж ефірна олія населення Німеччини, яка містить 39,31% гераніалу, 27,71% нералю та 12,23% β -каріофілен. Nouri та ін. [12] провели дослідження складу ефірної олії та розмаринової кислоти в *Melissa officinalis*, вирощеної в південному Ірані, і отримали загальний вихід 0,37% (об.мас.), багатий на герань і нералю, порівняно з іншими дослідженнями, вони виявили високий вміст розмаринової кислоти.

В іншому дослідженні ефірна олія, отримана з листя *меліси лікарської*, що росте в Алжирі, була досліджена на предмет її хімічного складу та антимікробної активності *in vitro* [15]. В ефірній олії, отриманій шляхом гідродистиляції та проаналізованій за допомогою ГХ-МС та ГХ-ФІД, було виявлено 63 сполуки, що становить 94,10% від загальної кількості олії, а вихід становив 0,34%. Основним компонентом був гераніал (44,20%), а іншими переважаючими компонентами були нераль (30,20%) і цитронелал (6,30%).

Seidler-Lożykowska та ін. [16] у своєму дослідженні вказали, що основні компоненти, нераль і гераніал, мали більш високі концентрації при вищій інсоляції. П'ятьма найбільш активними компонентами, виявленими в ефірних оліях, вилягнутих з рослинних матеріалів, були гераніальна, нералева, цитронеллальна, каріофіленоксид і β -каріофілен. У цьому дослідженні були отримані наступні результати: вміст гераніалу коливався від 6,22% до 21,49%, рівень нералу коливався від 4,28% до 15,08%, вміст цитронелла коливався від 2,80% до 19,74%, рівень каріофіленоксиду варіював від 20,86% до 41,72%, і спостерігалися високі рівні β -каріофілену, коливаючись від 12,08% до 29,14%.

На основі результатів, отриманих Said-Al Akl та ін. [18], було виявлено, що час збирання впливає на вміст ефірної олії та якість *меліси лікарської*. Найбільший вихід ефірних олій отримано при збиранні у вересні, серпні та жовтні, а найменший – у січні, лютому та березні. Відповідно до цих результатів, рекомендується збирати врожай у теплі місяці, щоб отримати високий вміст ефірної олії. Виділено гераніальний (23,8–51,2%) та неральний

(20,1–35,0%) вміст ефірної олії, екстрагованої зі свіжого листя меліси лікарської для різних місяців збору врожаю.

Хімічний склад ефірної олії має високу варіабельність і залежить від походження рослини, кліматичних відмінностей, географічних умов, умов культивування, часу збору врожаю та методів, що застосовуються для екстракції [10, 13]

1.2.2. Тритерпени

Тритерпени – це нелеткі компоненти, що витягуються з рослин, і є одним із найбільших класів натуральних рослинних продуктів із більш ніж двадцятьма тисячами різних тритерпенів (табл. 1.2) [23, 24]. Деякі тритерпени містять різну кількість сульфатних груп, пов'язаних із цукром або глюкозами [10].

Таблиця 1.2

Тритерпени з екстрактів меліси лікарської

| Назва компонента | Вміст*, мкг/г | Частина |
|--|------------------|-----------------------|
| Бетулінова кислота | 12,85–169,88 | надземні частини |
| Олеанолова кислота | 915,03–6151,67 | надземні частини |
| Урсолова кислота | 3577,00–11234,97 | надземні частини |
| 23-Сульфатний ефір ніга-іхігозиду F1 | на | листя і стебла |
| 3 β ,16 β ,23-тригідрокси-13,28-епоксиурс-11-ен-3-O- β -D-глюкопіранозид | на | сушені листя і стебла |
| 3,23-дисульфатний ефір 2 α ,3 β ,19 α ,23-тетрагідроксиурс-12-ен-28-оїкової кислоти | на | сушені листя і стебла |
| 3,23-дисульфатний ефір 2 α ,3 β ,19 α ,23-тетрагідроксиурс-12-ен-28-оїкової кислоти 28-O- β -D-глюкопіранозиду | на | сушені листя і стебла |
| 3,23-дисульфатний ефір 2 α ,3 β ,23,29-тетрагідроксиолеан-12-ен-28-оїкової кислоти | на | сушені листя і стебла |

Найбільш поширеними тритерпенами в екстрактах меліси лікарської є урсолова кислота та олеанолова кислота. У дослідженнях Ghilardi et al. [4] і

Ібарра та ін. [27], урсолову кислоту та олеанолову кислоту екстрагували разом із поліфенольними сполуками, щоб показати біологічні властивості рослини. Використовуючи різні умови екстрагування, можна отримати різні екстракти з різним складом і, отже, різною активністю. Першу екстракцію отримували шляхом мацерації протягом 9 днів у 70% етанолі, другу отримували шляхом мацерації в 96% етанолі протягом 24 годин при безперервному перемішуванні, а третю екстрагували обробкою ультразвуком у 80% метанолі протягом однієї години. У трьох екстракціях була отримана найбільша кількість урсолової кислоти, потім олеанолова кислота та невелика кількість бетулінової кислоти. Порівнюючи значення отриманих концентрацій, екстракція в метанолі за допомогою обробки ультразвуком є найбільш сприятливою, отримуючи найкращі результати: урсолова кислота (11234,97 мкг/г), олеанолова кислота (6151,67 мкг/г) і бетулінова кислота (169,88 мкг/г).

Існує дуже мало досліджень щодо летких компонентів *melissa лікарської*. Менчеріні та ін. [24, 26] виявили п'ять дисульфатованих тритерпєнів урсену та глікозид урсену з екстракту висушених стебел і листя, а також два сульфатованих тритерпєни в екстракті свіжого листя та стебел.

У недавньому дослідженні Abdel-Naime та ін. [25] ідентифікували три тритерпєнові глікозиди урсену та відомий ефір 23-сульфатного тритерпєноїдного глікозиду ніга-ічігозиду F1, який був виділений раніше Менчеріні та ін. [24]. Три відкриті тритерпєнові глікозиди урсену були Melissioside AC.

Тритерпєни містяться в *Melissa officinalis* у високих концентраціях разом із численними поліфенольними сполуками.

1.2.3. Поліфенольні сполуки

Поліфенольні сполуки - це група вторинних метаболітів, яка включає флавоноїди (наприклад, антоціани, флаволи, ізофлаволи) та фенольні кислоти, які мають багато біологічних властивостей (табл. 1.3) [28].

Таблиця 1.3.

Основні поліфенольні сполуки з екстрактів меліси лікарської

| Назва групи | Назва сполуки | Вміст*, мкг/г | Частина заводу |
|------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| Фенольні кислоти | кавова кислота | 39.38–860.72 | Висушене листя |
| | Кафтарова кислота | 1,85–344,34 | Висушене листя |
| | Хлорогенова кислота | 0,62–75,529 | Висушене листя |
| | Ферулова кислота | 1.03–45.489 | Висушене листя |
| | Гентизинова кислота | 10.40–60.48 | Висушене листя |
| | | 1.06–20.72 | Висушене листя |
| | p-кумарова кислота | 13,37 ± 2,84 | Надземні частини |
| | | 3515,60–86 637,60 | Висушене листя |
| | Розмаринова кислота | 6914,1 ± 779 | Надземні частини |
| | | 0,66–84,53 | Висушене листя |
| флавоноїди | апігенін | 41,71 ± 20,6 | Надземні частини |
| | Цинарозид | 408,13 ± 30,0 | Надземні частини |
| | Дайдзейн | 51,25 ± 8,07 | Надземні частини |
| | Гіперозид | 3.30–16.240 | Висушене листя |
| | Ізокверцетин | 6,82–162,40 | Висушене листя |
| | Кемферол | 21.84 | Висушене листя |
| | Лютеолін | 0.81–26.32 | Висушене листя |
| | мірицетин | 3.45–17.92 | Висушене листя |
| | кверцетин | 153,46 | Висушене листя |
| | Кверцетрол | 5.72–33.60 | Висушене листя |
| | Рутин | 8.11–1462.99 | Висушене листя |

Фенольні кислоти складають велику групу природних сполук, які виявляють широкий спектр біологічної активності. Флавоноїди — це клас поліфенольних сполук, класифікованих відповідно до їхньої хімічної структури на флавоноли, флаволи, флаванони, ізофлаволи, катекіни, антоціанідини та халкони [31]. Фенольні кислоти та флавоноїди містять

хімічні структурні елементи, які відповідають за антиоксидантний процес, і їх антиоксидантна активність була добре встановлена біохімічно. Фенольні кислоти є важливими біологічно активними компонентами меліси лікарської, серед яких розмаринова, кавова, хлорогенова та ферулова кислоти. Дотримуючись фенольних профілів трьох типів екстрактів у дослідженні, проведеному Ghiulai et al. [4], було помічено, що розмаринова кислота була отримана в найбільшій кількості (86637,60 мкг/г). Екстракція метанолом за допомогою обробки ультразвуком сприяла вилученню всіх шуканих фенольних сполук; Таким чином, можна спостерігати, що залежно від техніки екстракції деякі сполуки можуть бути у високих концентраціях, а інші неможливо виявити.

Баррос та ін. [28] провели порівняльне дослідження фенольних профілів комерційних зразків і зразків, вирощених у саду, приготованих шляхом настоювання. У зразках були ідентифіковані розмаринова кислота, як основний компонент, і похідні кавової кислоти (тримери: літоспермінова кислота, сальвіанолова кислота А, С і F і юнанесва кислота F; тетрамери: сальвіанолова кислота В і сагерінова кислота). Незважаючи на схожий профіль, який спостерігався у всіх досліджених зразках меліси лимонної, знайдені кількості кожної сполуки були різними. Культивовані зразки та зразки, культивовані *in vitro*, показали найменшу кількість фенольних сполук (59,59 та 30,21 мг/г настою), тоді як комерційні зразки показали найвищий вміст (109,24 мг/г для пакетика чаю та 101,03 мг/г для гранульованого зразка).

За допомогою методів екстракції — екстракції за допомогою ферментів і рідинної екстракції під тиском — Мірон та ін. [32] отримали екстракти з *Melissa officinalis*, які були дуже багаті кавовою кислотою та похідними розмаринової кислоти, деякі з яких були ідентифіковані вперше в цій рослині, такі як: сальвіанолова кислота H/I, сальвіанолова кислота E, сальвіанолова кислота L та ізомер L сальвіанолової кислоти.

Галова кислота є однією з біологічно активних фенольних кислот, про яку повідомлялося в дослідженні Ferreira et al. [33] як важливу фенольну

кислоту для антиоксидантної та антихолінестеразної активності *Melissa officinalis*.

У дослідженні семи лікарських рослин (з п'яти родин рослин), вирощених у Словаччині, Gayibov et al. [30] досліджували вміст поліфенолів та вміст флавоноїдів, а також антиоксидантну та антимікробну активність. Це

дослідження включало три рослини сімейства *Lamiaceae*: *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* і *Thymus pannonicus*. Отриманий вміст

поліфенолів є досить подібним ($20,90 \pm 1,06$, $20,01 \pm 0,71$ і $23,98 \pm 1,37$ мг еквівалентів галової кислоти/г зразка), але вміст флавоноїдів незначно

змінювався ($11,56 \pm 0,15$, $14,35 \pm 0,49$ і $19,35 \pm 1,22$ мг кверцетину) /г

зразка). У цьому дослідженні було виявлено, що *Melissa officinalis* містить найбільший вміст розмаринової кислоти ($6914,1 \pm 779$), але деякі з наступних сполук були відсутні.

Спиридон та ін. [34] провели порівняльне дослідження вмісту поліфенолів у деяких важливих лікарських рослинах Румунії, що походять із південно-східного регіону, таких як орегано (*Origanum vulgare*), лаванда (*Lavandula angustifolia*) та меліса (*Melissa officinalis*). У цьому дослідженні

вихід екстракції для рослин, розрахований на суху вагу сировини, був таким:

7,89% для лаванди, 11,38% для орегано і 11,93% для меліси. У мелісі загальний вміст фенольних сполук ($54,9 \pm 2,14$ мг екв. галової кислоти/г) і флавоноїдів ($25,8 \pm 6,26$ мг розмаринової кислоти/г) був вищим, ніж у лаванді, але нижчим,

ніж у орегано.

В іншому дослідженні, проведеному на *Melissa officinalis*, вирощеному в Румунії, Fierascu et al. [29] висвітлили фітохімічний склад спиртового екстракту з висушеного листа, отриманого прискореною екстракцією розчинником. У цьому дослідженні високі значення були отримані для хлорогенової кислоти ($72,529 \pm 0,24$ мг/кг), ферулової кислоти ($45,489 \pm 0,15$ мг/кг), кверцетину ($153,465 \pm 0,32$ мг/кг) і рутину ($1462,997 \pm 1,24$ мг/кг).

Меліса лікарська – це рослина, яка багата поліфенольними сполуками, але залежно від методу екстракції та використованого розчинника можна

отримати різні композиції екстрактів; це сильно впливає на біологічну активність.

1.3. Фармакологічна дія

Згідно з багатьма біологічними дослідженнями, рослинні екстракти та ефірні олії відомі багатьма корисними діями для людського організму. *Melissa лікарська* вважається лікарською рослиною завдяки численним фармакологічним ефектам, пов'язаним з її хімічним складом.

Деякі фармакологічні дії можуть бути пов'язані з поліфенольними сполуками, що містяться в мелісі лікарській, зокрема фенольні кислоти та флавоноїди [45, 58]. Більшість досліджень зосереджено на екстрактах листя меліси лікарської, отриманні фенольних профілів, пов'язаних із антипроліферативними [39], антиангіогенними [4], протівірусними [55, 59], антиоксидантними [41, 42], протизапальними [45], антидепресантними [45], проти хвороби Альцгеймера [53], нейропротекторну [46], кардіопротекторну [43], протигрибову [56, 57] та антибактеріальну [42] дію. Моака та ін. [58] провели порівняльне дослідження між екстрактами стебел і листя, щоб оцінити антиоксидантну активність, загальний вміст фенолів, а також цитотоксичні та антипроліферативні ефекти. У цьому дослідженні було виявлено, що хороша антиоксидантна активність корелює з високим загальним вмістом поліфенолів в етанольному екстракті листя (32,76 мг екв. галової кислоти/г) на відміну від етанольного екстракту насіння (8,4 мг екв. галової кислоти/г). Отримані екстракти продемонстрували інший профіль цитотоксичної дії на клітини раку молочної залози, MDA-MB-231, але зі значною протипухлинною активністю для майбутніх досліджень *in vitro*. Ghiulai та ін. [4] досліджували потенціал ангіопротекції та хіміопротекції раку молочної залози за допомогою різних екстрактів меліси лікарської. Антиоксидантну активність і вплив *in vitro* на життєздатність клітин оцінювали на двох лініях клітин раку молочної залози, MCF7 і MDA-MB-231. На основі оцінки *in ovo* за допомогою тесту на

хорошо встановлено, що 96% спиртовий екстракт є найсильнішим хіміопротективним засобом.

Етанольний екстракт меліси лікарської продемонстрував антипроліферативну дію на лінію клітин раку товстої кишки людини (HCT-116) [39], а також сильну протипухлинну дію на клітинні лінії пухлин людини MCF-7, AGS і NCI-H460 [40].

Багато досліджень показали хорошу антиоксидантну активність екстрактів меліси лікарської, що є важливим кроком у визначенні різноманітних корисних впливів на організм людини. Перрейра та ін. [41]

припустив, що цю рослину можна використовувати як потенційний засіб для профілактики різних неврологічних захворювань, пов'язаних з окислювальним пошкодженням, повідомляючи про найкращу антиоксидантну активність і найвищий вміст відновників порівняно з *Matricaria recutita* та *Cymbopogon citratus*.

Дослідження *in vitro* показали потенційну фармакологічну дію екстрактів меліси лікарської на конкретні клітини або тканини, але для підтвердження цих ефектів необхідні дослідження на тваринах *in vivo*.

Результати досліджень *in vivo* на мишах показали, що екстракт меліси лікарської можна вважати захисним засобом при різних неврологічних захворюваннях, пов'язаних з ішемічним ураженням головного мозку [46], і може пригнічувати тривогу та депресію [45].

Дослідження *in vivo* показали фармакологічні ефекти доз екстракту меліси лікарської на тваринах. Щоб розробити нові ліки, необхідно перейти від еквівалентної дози для тварин до еквівалентної дози для людини. Існують різні моделі розрахунку для оцінки еквівалентної дози для людей на основі існуючих досліджень. Оцінка еквівалентної дози для людини є важливим кроком у розробці нового рослинного лікарського засобу з метою подальшої оцінки токсичних або безпечних аспектів.

На підставі розрахункових еквівалентних доз для людини можна зробити висновок, що антигіперглікемічна активність забезпечується при дозі

0,38–1,5 мг/людина/день, тоді як кардіопротекторна активність може бути забезпечена при дозі 253,8–1014 мг/людина/добу, а анксиолітична активність може бути забезпечена при застосуванні 234–703 мг/людина/добу, ці значення

можна порівняти з ліками, доступними на ринку. У разі нейропротекції оцінена еквівалентна доза людини становить 501–4000 мг/людина/добу, що

близько до значення для фенобарбіталу, який вводять у дозі 40 мг/кг. Анальгетичну дію можна забезпечити лише за допомогою 52–207 мг/людину/день, що у багато разів менше, ніж добова доза для інших

доступних препаратів; однак для гіпнозу необхідна значно вища оціночна доза, наприклад 888–3554 мг/людина/день. У всіх випадках оцінку добової

дозми проводили для середньої маси тіла 60 кг. Однак слід враховувати, що біохімічні процеси різняться між видами, і необхідні клінічні випробування,

щоб переконатися, що новий препарат є ефективним і безпечним.

В таблиці 1.4. представлені деякі з найважливіших компонентів екстракту меліси лікарської, а також їх задокументована протимікробна, антиоксидантна або протизапальна дія. Біологічний профіль ефірної олії або екстрактів меліси лікарської є прямим результатом присутності цих

сполук. Однією з природних успішних стратегій посилення властивості, будь

то антиоксидантної чи протимікробної активності, є поєднання кількох сполук із бажаною властивістю. Синергізм дозволить проявити більш високий рівень,

антибактеріальної активності, наприклад, при збереженні низької концентрації. Це також успішна стратегія боротьби з набутою стійкістю

мікробів.



Таблиця 1.4

Основні компоненти меліси лікарської та їх дія



| Речовина | дія |
|---------------------------|---|
| Гераніальна (цитральна А) | Антибактеріальний, протигрибковий |
| Нераль (цитраль Б) | Антибактеріальний, протигрибковий |
| Цитронелаль | Протимікробну, інсектицидну |
| β -каріофілен | Протизапальну, антиоксидантну, антибактеріальну |
| α -кадинол | Протигрибковий, гепатопротекторний |
| Геранілацетат | Антибактеріальний, інсектицидний |
| Бетулінова кислота | Противірусний, протизапальний, протипухлинний |
| Олеанолова кислота | Противірусний, гепатопротекторний |
| Урсолова кислота | Антибактеріальний, антиоксидантний |
| кавова кислота | Антиоксидантний, протизапальний |
| Кафтарова кислота | Антиоксидант |
| Розмаринова кислота | Антиоксидантний, протизапальний |
| Ферулова кислота | Антиоксидант |
| Хлорогенова кислота | Антидіабетичний, антиоксидантний |
| p-кумарова кислота | Антиоксидантний, протизапальний |
| Цинарозид | Антиоксидантний, протизапальний |
| Рутин | Антиоксидантний, протизапальний |

Синергічна активність була добре задокументована в літературі для кількох класів ліків/речовин, причому деякі з цих ефектів уже розглядалися

для антибіотиків і рослинних екстрактів/ефірних масел навіть у мультирезистентних стафілококах.

Melissa officinalis та інші рослинні екстракти (*Iberis amara*, *Silybum marianum* і суміш *Angelica archangelica* і *Carum carvi*) були оцінені разом із

STW5, добре відомим фіксованим трав'яним багатокомпонентним препаратом, рекомендованим, принаймні, німецькими рекомендаціями щодо

лкування деяких шлунково-кишкових захворювань. Закорювання в

незапальному та запальному стані. Було виявлено, що лише екстракт рослини *Melissa officinalis* виявляв сильний синергетичний ефект, коли розглядалися клітини гладких м'язів кишечника. Пероральне застосування настою меліси лікарської також може бути корисним для радіологічного персоналу, оскільки зменшується окислювальний стрес і пошкодження ДНК. На даний момент було повідомлено лише про декілька досліджень синергії між мелісою лікарською та іншими рослинами. Завдяки легким сполукам в ефірній олії меліси лікарської повідомлялося про такі ефекти: протигрибковий, антиоксидантний, протидіабетичний, антибактеріальний та протимікробний ефекти. Ці ефекти також були виявлені в різних екстрактах меліси лікарської.

У деяких дослідницьких статтях проводилися дослідження *in vitro* та *in vivo*, щоб приписати фармакологічні ефекти меліси лікарської, але необхідні додаткові дослідження, щоб співвіднести біологічну активність із наявністю певних компонентів і, нарешті, щоб мати можливість розробити конкретні композиції, щоб отримати бажану біологічну активність.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Процедура стерилізації рослинного матеріалу

Матеріалом для досліджень були тканини та органи трьох сортів меліси лікарської («Зразок 1», «Зразок 2», «Зразок 3»). Рослини-донори вирощували в теплиці. Усі роботи з введення в культуру та мікрорізання пагонів *in vitro* проводили в ламінарному боксі Ламінар-С з дотриманням асептичних умов.

Експерименти проводили за загальноприйнятими в біотехнології рослин методами культури тканин і органів [7, 22]. Для знищення екзогенної інфекції під час стерилізації експлантів використовували 70% етиловий спирт (1 хв) та 2,5% гіпохлорит натрію (10 хв).

Для введення культури *in vitro* використовували пазушні бруньки (розміром 0,8–1,0 мм). Бруньки розрізали під стереоскопічним мікроскопом в асептичних умовах у ламінарному боксі. На 2-му етапі мікророзмноження (власне мікророзмноження) як експланти використовували одновузлові сегменти стебла (5–8 мм), отримані шляхом мікрорізання пагонів, що розвинулися з бруньок. Раніше оптимізоване для мікророзмноження *M. officinalis* культуральне середовище Murashige and Skoog (MS) [23] з додаванням 6-бензиламінопурину та гіберелінової кислоти використовувалося для введення *in vitro* та подальшого субкультивування [17, 24].

Експланти *in vitro* культивували в пробірках (150 × 16 мм), закритих ватно-марлевими пробками з 10 мл середовища. Відрізки стебла та мікророслини на другому та третьому етапах розмноження вирощували в скляних банках об'ємом 200 мл, закритих плівкою, з 35–40 мл середовища. Відрізки стебла з двома вузлами, виділені з пагонів, отриманих на другому етапі мікророзмноження, використовували для укорінення *in vitro*. Їх культивували на середовищі MS з додаванням регуляторів росту рослин: α -нафтилоцтової кислоти (НОК), β -індол-3-оптової кислоти (ІОК) або індол-3-масляної кислоти (ІМК) (Sigma, США).

Ізольовані бруньки та пагони культивували за $26 \pm 2^\circ\text{C}$, відносної вологості повітря 70 %, 16-годинного фотоперіоду з освітленням 2-3 клк. Мікропагони довжиною 40-60 мм з добре розвинутою кореневою системою відбирали та висаджували в пластикові стаканчики (200 мл) зі стерильним субстратом різного складу (торф, перліт, пісок, керамзит у різних комбінаціях) для адаптації *ex vitro*. Рослини вирощували за $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 16-годинного фотоперіоду з освітленістю 2-3 клк. Полив проводили після підсихання субстрату, підтримуючи вологість повітря в перші 14 днів на рівні 90%, а в подальшому – не менше 70-80%. Рослини адаптувалися протягом 30-45 днів.

Потім їх пересадили в польові умови.

Аналіз морфометричних показників проводили на 30–35-ту добу культивування. При цьому визначали частоту ризогенезу (%), довжину пагона (мм), кількість (шт. на пагін) і довжину кореня (мм), а також кількість адаптованих мікропагонів (%). Частоту ризогенезу (%) розраховували як відношення кількості мікропагонів з корінням до загальної кількості досліджуваних пагонів, помножене на 100. Досліди проводили в трикратній повторності. У кожному варіанті було проаналізовано 20 експлантів або мікророслин. Дані оброблено за допомогою програмного пакету Microsoft Office (Excel 2010). Статистичну значущість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента при $p < 0,05$.

2.2. Приготування живильних середовищ

Для пророщування насіння поміщали на середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) $\frac{1}{2}$ міцності з додаванням 3% сахарози та 0,7% агару. Культури витримували при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ при 16-годинному денному освітленні з інтенсивністю 10-20 мкмоль/мс протягом різного періоду 10, 15, 20 і 25 днів.

Перший експеримент був проведений для оцінки ефективності двох цитокінінів, включаючи ВАР і кінетин, для проліферації пагонів. Для цього кінчики пагонів, відібрані як експланти, поміщали на середовища MS і B5, доповнені 0,7% агаром і різними цитокінінами з їх різними концентраціями,

включаючи ВАР (1,0, 1,5, 2,0 і 3,0 мг/л) і кінетин (0,5, 1,5, 2,0 і 3,0 мг/л).

Потенціал розмноження кінчиків пагонів оцінювали в первинній культурі та двох послідовних субкультурах з 3-тижневими інтервалами. Досліджуваними

параметрами були відсоток експлантів, що утворюють пагони, швидкість розмноження (тобто середня кількість пагонів на експлант наприкінці періоду

культивування) та середня довжина пагонів після двох послідовних пересадок (3 тижні кожна). Культивування продовжували на середовищах MS і B5, доповнених 3 мг/л ВАР і 1,5 мг/л NAA протягом 5 місяців. В іншому

експерименті в якості експлантів використовувалися гіпокотилі. Їх вирізали з

10, 15, 20 і 25-денних сіянців різних місцевих сортів. Усі експланти,

культивовані на середовищах MS і B5 для оцінки впливу комбінації цитокинінів/ауксину на індукцію калюсу, швидкість росту та розмноження,

частоту формування пагонів (тобто відсоток експлантів, які утворюють

додаткові пагони), здатність до формування пагонів (SFC) індекс, визначений

як $(\text{кількість пагона на експлант}) \times (\% \text{ експлантів, що утворюють пагін}) / 100$

(Martinez-pulido et al., 1992), і додаткову обробку без регуляторів росту вводили як контроль. Експланти інокулювали в темряві при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом

20 днів. Кожна обробка містить 4 повтори з 20 експлантатами на реплікацію

(планшети). Отриманий калос висівали в середовища MS і B5, доповнені

різними типами цитокиніну з різними концентраціями (ВАР: 0, 0,5, 1 і 1,5 мг/л),

кінетином (0, 0,5, 1, 1,5 і 2 мг/л) до викликати сходи

2.3. Етап ініціації культури *in vitro*

Експланти, використані для ініціації культур *in vitro*, складалися з верхівок і одновузлових фрагментів від активно зростаючих пагонів маткових

рослин *M. officinalis*. Пагони спочатку промивали у водопровідній воді та

стерилізували в 6% розчині гіпохлориту кальцію протягом 10 хвилин, потім

тричі промивали стерильною дистильованою водою. Потім сегменти стебла

розрізали стерильним лезом скальпеля на менші сегменти (1-1,5 см

завдовжки), кожен з одним вузлом, який використовується як експлант.

Експланти поміщали вертикально на звичайне середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) і зберігали як культури верхівок пагонів і одиничних вузлів, доки рослинного матеріалу не було достатньо для подальших експериментів.

Інокуляцію експлантів проводили в асептичних умовах з використанням ламінарної витяжки. На цьому етапі експерименту, як і на наступних етапах, у

середовище подавали 40 г/л глюкози, 32 мг/л NaFeEDTA (джерело заліза) і 7 г/л агару (для затвердіння культуральних середовищ). Культуральні середовища стерилізували в автоклаві при 120°C протягом 20 хвилин. Перед

автоклавуванням рН середовища доводили до 5,6-5,8 за допомогою 1N KOH

або 1N HCl. Усі культури переносили в кімнату для вирощування з контрольованими умовами при 22-24 °C, 16-годинний фотоперіод при 3000 лк.

2.4. Етап власне розмноження *in vitro*

Проліферацію пагонів індукували на повноцінному середовищі MS, доповненому різними типами цитокінінів (БАП-бензиламінопурин, КІУ-кінетин) у різних концентраціях (0,1, 1,5, 2 та 3 мг/л). Субкультуру проводили

кожні чотири тижні. Кількість пагонів на експлант і довжину пагонів

контролювали як параметри росту. Кожну обробку проводили в трьох повторах.

2.5. Етап укорінення *in vitro*

Окремі мікропагони переносили в середовище MS половинної міцності, доповнене трьома різними ауксинами (НОК-нафтилactoва кислота, ІОК-індоліactoва кислота, ІМК-індоліlмасляна кислота) у концентрації 0, 0,5 та 1

мг/л. Через чотири тижні культивування оцінювали укорінюваність

(співвідношення кількості пагонів, у яких відбувався процес ризогенезу, до

загальної кількості пагонів, перенесених на живильне середовище для укорінення). Кожну обробку проводили в трьох повторах.

2.6. Етап адаптації

Укорінені in vitro саджанці видаляли з культурального середовища, їх коріння промивали проточною водопровідною водою, а потім пересаджували в таблетки торфу (Jiffy) для акліматизації до умов ex vitro. Оскільки листя меліси дуже чутливі до втрати води, а втрата вмісту води в саджанцях є незворотною, необхідно було забезпечити високу вологість, помістивши рослини під тунель із пластикової фольги та обприскуючи їх водою, доки вони не почнуть тверднути. Відсоток акліматизованих рослин (співвідношення між кількістю життєздатних рослин і загальною кількістю рослин, перенесених ex vitro) розраховували через чотири тижні. Потім акліматизовані рослини пересаджували в пластикові горщики об'ємом 0,5 л для збагачення та зберігали в не-обігріваєтьса теплиця для подальшого росту і розвитку.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Морфогенетична реакція експлантів на етапі ініціації культури

in vitro

Ініціація культури є найважливішим етапом мікророзмноження різних видів рослин. Однією з важливих умов, від яких залежить успіх ініціації та підтримки культури клітин, є забезпечення асептики. Спосіб стерилізації біологічного матеріалу варіюється в залежності від походження матеріалу, фізіологічного стану та типу експлантату. У цьому дослідженні для ініціації культивування *in vitro* використовувалися як апікальні експлантів, так і однієвузлові фрагменти, відібрані з активно зростаючих пагонів. Наші спостереження підкреслили той факт, що включення меліси в цю культуральну систему не викликає особливих проблем, використання гіпохлориту кальцю (6% розчин протягом 10 хвилин) для стерилізації біологічного матеріалу виявилось ефективним. Використання простого базового середовища MS індукувало успішний розвиток пагонів і виробництво мікророслин, які потім використовували для експериментів з експлантатами *M. officinalis* для морфогенетичної реакції на різні концентрації цитокінінів (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Мікророслини *M. officinalis*, регенеровані на середовищі MS, через чотири тижні після початку культивування *in vitro*

3.2. Вплив типу та концентрації цитокініну на проліферацію пагонів

in vitro

Поточні експерименти проводилися з використанням 6-бензиламінопурину (БАП) і кінетину (КІН). БАП показав кращу реакцію щодо розвитку пагонів, ніж кінетин. Кінетин продукував меншу кількість пагонів на експлант і меншу довжину пагонів порівняно з лікуванням БАП. Стримані результати показали, що максимальну кількість пагонів на експлант було отримано на середовищі MS з додаванням 3 мг/л БАП (4,3 пагонів/експлант), а потім на середовищі з 2 мг/г БАП (4,2 пагонів/експлант)

(рис. 3.2).

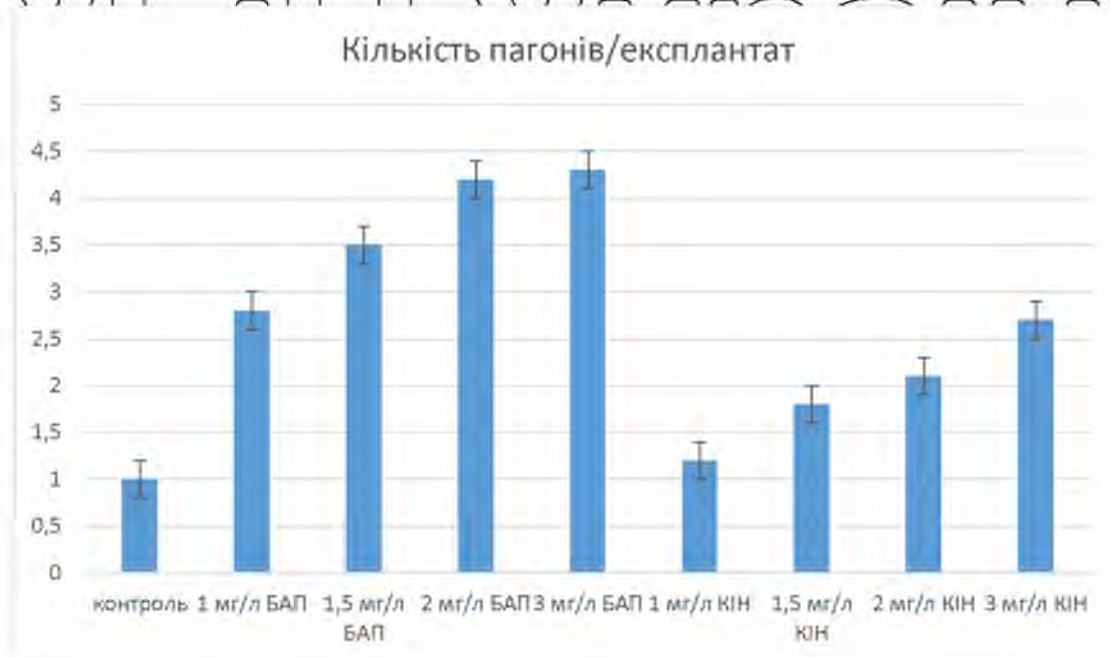


Рис. 3.2. Вплив типу та концентрації цитокініну на кількість пагонів на експлант *M. officinalis*.

Це збігається з попередніми спостереженнями, які показують, що збільшення концентрації БАП дало найбільшу ефективність у кількості пагонів (Tavares et al., 2016; Sato et al., 2015).

Висока ефективність БАП у проліферації пагонів призведе до кількох видів лікарських рослин, які наведені в літературі (Міхлік, 2010; Rout та ін.,

2010; Fracaro та Echeverrigary, 2011; Kamstaityte та Stanys V., 2014; Rout, 2014; Балогун та ін., 2017; Бохідар та ін., 2018; Калімуту та ін., 2010).

Цей факт можна пояснити тим, що цитокініни, особливо у високих концентраціях, долають апікальне домінування та пригнічують вплив апікального росту на бічні бруньки, стимулюючи проліферацію пазушних пагонів із цих бруньок (Mikulik, 2019; Fracaro and Echeverrigary, 2011).

Таварес та ін. (2016) також повідомили, що більша висока концентрація БАП викликала більше, але менших пагонів, що свідчить про зворотне співвідношення між кількістю пагонів та їх подовженням. Обробка 3 мг/л БАП викликала найбільшу кількість і найдовші сходи.

Ці результати узгоджуються з результатами, отриманими Gulati і Jaiwal (2014), які повідомили про пряму залежність між кількістю пагонів та їх подовженням у *M. officinalis*.

На середовищах, що містять цитокінін, середня довжина пагонів зростала зі збільшенням концентрації цитокініну. В усіх варіантах дослідження оцінюваний показник фіксував суттєві відмінності порівняно з контролем при $P < 0,05$, за винятком варіанта, в якому в культуральне середовище додавали 3 мг/л БАП. У присутності регуляторів росту довжина пагона була меншою (між 2,7 і 6,0 см) у всіх випадках порівняно з контролем (6,4 см) (рис. 3.3).

Саріхані та ін. (2010) досягли хороших результатів при регенерації меліси з використанням культурального середовища MS без гормонів та індукованої поліплоїдії.

Ардакані та ін. (2013) регенерували мікророслини *M. officinalis* з використанням культурального середовища MS, доповненого кінетинном (0,2 мг/л), ІОК (1 мг/л), 2,4-Д (1 мг/л) і кокосовим соком (15%).

Описані результати показують, що середовище MS з додаванням 3 мг/л БАП було найефективнішим для регенерації пагонів *M. officinalis*, причому регенеровані пагони були довгими та енергійними (рис. 3.4).

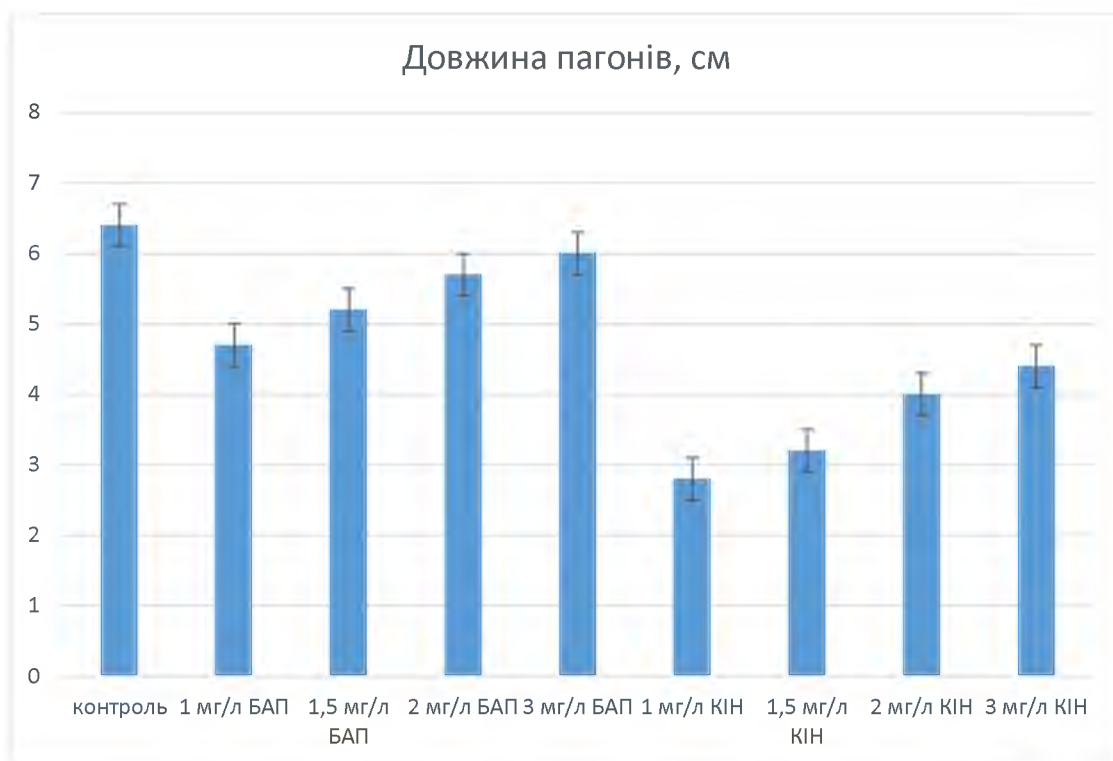


Рис. 3.3. Вплив типу та концентрації цитокініну на довжину пагонів *M. officinalis*.



Рис. 3.4. Проліферація пазушних пагонів *M. officinalis in vitro* за використання середовища MS з додаванням 3 мг/л БАП

Через чотири тижні регенеровані мікропагони були перенесені на свіже культуральне середовище, яке підтримувало регенераційні процеси шляхом визначення гарної проліферації пагонів. З якісної точки зору біологічний матеріал, отриманий в результаті регенерації експлантів, мав нормальну морфологію без аспектів вітрифікації, некроз або диференціація калюсу.

3.3. Вплив типу та концентрації ауксину на укорінення пагонів *in vitro*

Відомо, що в культурах *in vitro* ауксини відповідають за стимулювання розвитку коренів і подовження клітин. Вплив ауксинів на формування коренів було добре задокументовано у кількох видів рослин (Blakesley and Constantine, 2012; Fracaro and Echeverrigary, 2011). Ауксини окремо або в поєднанні з дуже низькою концентрацією цитокінінів були ефективними в індукції кореневих зачатків (Pierik, 2017). Однак високі концентрації ауксинів впливають на розвиток калюсу та пригнічення розвитку кореня.

У поточному дослідженні експериментували з шістьма варіантами середовища для вкорінення з використанням НОК, ІОК та ІМК з концентрацією 0,5 та 1 мг/л плюс контроль із використанням базового середовища MS з половинним вмістом макро і мікроелементів. Через чотири тижні оцінювали вплив типу і концентрації ауксину на утворення коренів *M. officinalis*.

Швидкість укорінення всіх обробок призвела до значного збільшення порівняно з контролем при $P < 0,05$. Найвище значення укорінення (95,4 %) було отримано при 1 мг/л НОК. Застосування ІМК або ІОК призвело до зниження відсотка вкорінення. Для всіх використаних ауксинів швидкість укорінення зростала зі збільшенням концентрації, але коріння також розвивалися в середовищі, вільному від ауксину (38,4 % укорінених пагонів) (рис. 3.5 і 3.6). Це могло бути пов'язано з наявністю великої кількості ауксинів у тканині меліси в порівнянні з іншими лікарськими рослинами.

Результати узгоджувалися з результатами, отриманими Tavares (2016), який повідомив, що для формування коренів необхідна присутність НОК у культуральному середовищі. Meftahizade et al. (2010b) повідомили про розвиток коренів на рівні 96%, використовуючи 1 мг/л НОК, тоді як при використанні гормону ІМК було утворено лише 64% коренів.



Рис. 3.5. Вплив типу та концентрації ауксину на здатність мікропагонів *M. officinalis* до укорінення *in vitro*.

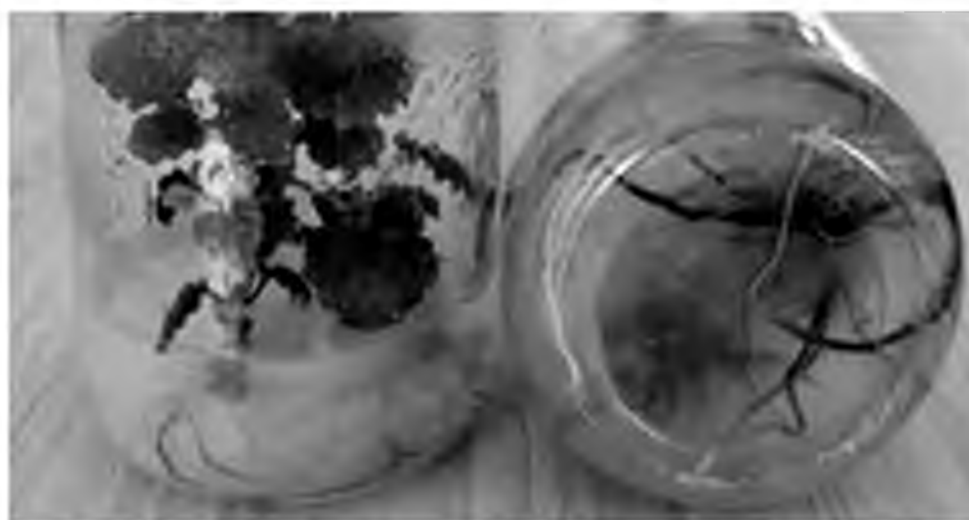


Рис. 3.6. Укорінення мікропагонів *M. officinalis* на середовищі $\frac{1}{2}$ MS з додаванням 1 мг/л НОК.

Мікророслини, регенеровані *in vitro*, характеризуються довгими коренями з вторинними відгалуженнями, що дозволяє їх пересаджувати в умови *ex vitro*.

3.4. Адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*

Акліматизація – завершальний, але найважливіший і необхідний етап для всіх видів мікророзмноження рослин. Незалежно від обраного методу культивування *in vitro*, його успіх залежить від здатності перевести рослини *ex vitro* на прийнятний економічний рівень. Це передбачає адаптацію рослин *in vitro* до нових умов навколишнього середовища, таких як: нижча відносна вологість, вища інтенсивність освітлення, коливання температури та стрес, спричинений різними захворюваннями.

Регенеровані *in vitro* рослини мали потужну кореневу систему, що сприяло успішному проходженню до фази акліматизації.



Рис. 3.7. Регенеровані *in vitro* рослини *M. officinalis* в горщиках.

Через тонке листя рослини часто зазнають втрат води, і це є причиною того, що їх акліматизацію нелегко здійснити, вимагаючи більш вологої атмосфери та контрольованої температури, оскільки слід уникати великих

температурних змін. Вищевказані умови дозволили більш легкий період акомодатії та зменшили втрати біологічного матеріалу, ефективність акліматизаційних рослин, регенерованих *in vitro*, становила 94%.

Після акліматизації та зміцнення в горщиках рослини пересаджували в теплицю для продовження росту та розвитку. Рослини, отримані методом розмноження *in vitro*, зберегли морфологічні ознаки маточних рослин (рис. 3.7).

Ми зробили висновок, що результати, отримані протягом всіх етапів регенерації *in vitro*, підтверджують, що для *M. officinalis* техніка мікророзмноження є вигідною альтернативою класичним методам розмноження, що дозволяє швидко та масово розмножувати високоякісні клонові рослини.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

1. Найвищу швидкість розмноження (4,4 пагонів/експлант) було отримано на середовищі MS з додаванням 3 мг/л БАП.

2. Середовище MS з половинним вмістом макро і мікроелементів з додаванням 1 мг/л НОК було найефективнішим для вкорінення мікропагонів меліси *in vitro*.

3. Мікророзмножені рослини, перенесені *ex vitro*, показали нормальну морфологію та 93% рівень виживання під час адаптації.

4. Результати, отримані протягом етапів регенерації *in vitro*, підтверджують, що культура тканин *in vitro* є ефективним методом розмноження *M. officinalis*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Süntar, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: Role of medicinal plants. *Phytochem. Rev.* 2020, 19, 1199–1209.

2. Bonifácio, B.V.; Silva, P.B.; Ramos, M.A.; Negri, K.M.; Bauab, T.M.; Chorilli, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. *Int. J. Nanomed.* 2014, 9, 1–15.

3. Wang, W.; Xu, J.; Fang, H.; Li, Z.; Li, M. Advances and challenges in medicinal plant breeding. *Plant Sci.* 2020, 298, 110573.

4. Ghiulai, R.; Avram, S.; Stoian, D.; Pavel, I.Z.; Coricovac, D.; Oprean, C.; Vlase, L.; Farcas, C.; Mioc, M.; Minda, D.; et al. Lemon Balm Extracts Prevent Breast Cancer Progression In Vitro and In Ovo on Chorioallantoic Membrane Assay. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2020, 2020, 6489159.

5. Abdel-Naime, W.A.; Fahim, J.R.; Fouad, M.A.; Kamel, M.S. Antibacterial, antifungal, and GC-MS studies of *Melissa officinalis*. *S. Afr. J. Bot.* 2019, 124, 228–234.

6. Mokhtarzadeh, S.; Demirci, B.; Goger, G.; Khawar, K.M.; Kirimer, N. Characterization of volatile components in *Melissa officinalis* L. under in vitro conditions. *J. Essent. Oil Res.* 2017, 29, 299–303.

7. Moradkhani, H.; Sargsyan, E.; Bibak, H.; Naseri, B.; Sadat-Hosseini, M.; Fayazi-Barjin, A.; Meftahizade, H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *J. Med. Plants Res.* 2010, 4, 2753–2759.

8. Miraj, S.; Rafieian-Kopaei, M.; Kiani, S. *Melissa officinalis* L: A Review Study with an Antioxidant Prospective. *J. Evid.-Based Integr. Med.* 2017, 22, 385–394.

9. Zarei, A.; Ashtiyani, S.C.; Taheri, S.; Rasekh, F. Comparison between effects of different doses of *Melissa officinalis* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. *Avicenna J. Phytomed.* 2014, 4, 15–23.

10. Shakeri, A.; Sahebkar, A.; Javadi, B. *Melissa officinalis* L.—A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 2016, 188, 204–228.

11. Bagdat, R.B.; Cosge, B. The essential oil of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. *J. Fac. Agric. OMU* 2006, 21, 116–121.

12. Nouri, A.; Mirabzadeh, M.; Safari, N.; Ebadi, M.T. Evaluation of Essential Oil Composition and Rosmarinic Acid Content in Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Cultivated in South of Iran. *J. Med. Plants By-Prod.* 2020, 9, 159–166.

13. Nurzyńska-Wierdak, R.; Bogucka-Kocka, A.; Szymczak, G. Volatile Constituents of *Melissa officinalis* Leaves Determined by Plant Age. *Nat. Prod. Commun.* 2014, 9, 703–706.

14. Souihi, M.; Amri, I.; Souissi, A.; Hosni, K.; Ben Brahim, N.; Annabi, M. Essential oil and fatty acid composition of *Melissa officinalis* L. *Prog. Nutr.* 2020, 22, 253–258.

15. Abdellatif, F.; Boudjella, H.; Zitouni, A.; Hassani, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *EXCLI J.* 2014, 13, 772.

16. Seidler-Łożykowska, K.; Zawirska-Wojtasiak, R.; Wojtowicz, E.; Bocianowski, J. Essential oil content and its composition in herb of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) breeding strains. *J. Essent. Oil Res.* 2017, 29, 351–356.

17. Taherpour, A.; Maroofi, H.; Rafie, Z.; Larijani, K. Chemical composition analysis of the essential oil of *Melissa officinalis* L. from Kurdistan, Iran by HS/SPME method and calculation of the biophysicochemical coefficients of the components. *Nat. Prod. Res.* 2012, 26, 152–160.

18. Ahl, H.A.S.-A.; Sabra, A.S.; Gendy, A.S.; Astatkie, T. Essential Oil Content and Concentration of Constituents of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) at Different Harvest Dates. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 2018, 21, 1410–1417.

19. Kowalski, R.; Kowalska, G.; Jankowska, M.; Nawrocka, A.; Kałwa, K.; Pankiewicz, U.; Włodarczyk-Stasiak, M. Secretory structures and essential oil composition of selected industrial species of lamiaceae. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 2019, 18, 53–69.

20. Kittler, J.; Krüger, H.; Lohwasser, U.; Ulrich, D.; Zeiger, B.; Schütze, W.; Böttcher, C.; Gudi, G.; Kästner, U.; Marthe, F. Evaluation of 28 balm and lemon balm (*Melissa officinalis*) accessions for content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2018, 65, 745–757.
21. Basta, A.; Tzakou, O.; Couladis, M. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* s. l. from Greece. *Flavour Fragr. J.* 2005, 20, 642–644.
22. Barakat, S.A.; Hudaib, M.; Burns, D.T. Composition of Volatile Oil and Methanolic Extract of Jordanian *Melissa officinalis* L. and Actions against Human Cancer Cell Lines. *Orient. J. Chem.* 2016, 32, 2355–2362.
23. Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O’Maille, P.; Osbourn, A. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014, 65, 225–257.
24. Mencherini, T.; Picerno, P.; Scesa, C.; Aquino, R. Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 1889–1894.
25. Abdel-Naime, W.; Fahim, J.; Abdelmohsen, U.; Fouad, M.; Al-Footy, K.; Abdel-Lateff, A.; Kamel, M. New antimicrobial triterpene glycosides from lemon balm (*Melissa officinalis*). *S. Afr. J. Bot.* 2019, 125, 161–167.
26. Mencherini, T.; Picerno, P.; Russo, P.; Meloni, M.; Aquino, R. Composition of the Fresh Leaves and Stems of *Melissa officinalis* and Evaluation of Skin Irritation in a Reconstituted Human Epidermis Model. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1512–1515.
27. Ibarra, A.; Feuillere, N.; Roller, M.; Lesburgere, E.; Beracochea, D. Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine* 2010, 17, 397–403.
28. Barros, L.; Dueñas, M.; Dias, M.I.; Sousa, M.J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem.* 2013, 136, 1–8.
29. Fierascu, I.; Georgiev, M.I.; Ortan, A.; Fierascu, R.C.; Avramescu, S.M.; Ionescu, D.; Sutan, A.; Brinzan, A.; Ditu, L.M. Phytomediated metallic nano-

architectures via *Melissa officinalis* L.: Synthesis, characterization and biological properties. *Sci. Rep.* 2017, 7, 12428.

30. Gayibova, S.; Ivanišová, E.; Árvay, J.; H'rstková, M.; Slávik, M.; Petrová, J.; Hleba, L.; Tóth, T.; Kačániová, M.; Aripov, T. In vitro screening of antioxidant and antimicrobial activities of medicinal plants growing in Slovakia. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2019, 8, 1281–1289.

31. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* 2016, 5, e47.

32. Miron, T.; Herrero, M.; Ibanez, E. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* 2013, 1288, 1–9.

33. Pereira, R.P.; Boligon, A.A.; Appel, A.S.; Fachinetto, R.; Ceron, C.S.; Tanus-Santos, J.E.; Athayde, M.L.; da Rocha, J.B.T. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. *Ind. Crop. Prod.* 2014, 53, 34–45.

34. Spiridon, I.; Colceru, S.; Anghel, N.; Teaca, C.A.; Bodirlau, R.; Armatu, A. Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Nat. Prod. Res.* 2011, 25, 1657–1661.

35. Ashori, A.; Hamzeh, Y.; Amani, F. Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Stalk: Chemical Composition and Fiber Morphology. *J. Polym. Environ.* 2011, 19, 297–300.

36. Komes, D.; Belščak-Cvitanović, A.; Horžić, D.; Rusak, G.; Likić, S.; Berendika, M. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochem. Anal.* 2011, 22, 172–180.

37. Dias, M.I.; Barros, L.; Sousa, M.J.; Ferreira, I.C. Systematic comparison of nutraceuticals and antioxidant potential of cultivated, in vitro cultured and commercial *Melissa officinalis* samples. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 1866–1873.

38. Moacă, E.A.; Farcaș, C.; Ghițu, A.; Coricovac, D.; Popovici, R.; Cărăba-Meiță, N.L.; Ardelean, F.; Antal, D.S.; Dehelean, C.; Avram, S. A Comparative Study of *Melissa officinalis* Leaves and Stems Ethanolic Extracts in terms of Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Potential. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* 2018, 2018, 7860456.
39. Encalada, M.A.; Hoyos, K.M.; Rehecho, S.; Berasategi, I.; De Ciriano, M.G.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Navarro-Blasco, I.; Cavero, R.Y.; Calvo, M.I. Anti-proliferative Effect of *Melissa officinalis* on Human Colon Cancer Cell Line. *Mater. Veg.* 2011, 66, 328–334.
40. Magalhães, D.B.; Castro, I.; Lopes-Rodrigues, V.; Pereira, J.M.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R.; Xavier, C.P.R.; Vasconcelos, M.H. *Melissa officinalis* L. ethanolic extract inhibits the growth of a lung cancer cell line by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis. *Food Funct.* 2018, 9, 3134–3142.
41. Pereira, R.P.; Fachinetto, R.; Prestes, A.; Puntel, R.; Da Silva, G.N.S.; Heinzmann, B.M.; Boschetti, T.K.; Athayde, M.L.; Bürger, M.E.; Morel, A.F.; et al. Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem. Res.* 2009, 34, 973–983.
42. Ehsani, A.; Alizadeh, O.; Hashemi, M.; Afshari, A.; Aminzare, M. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. *Vet. Res. Forum Int. Q. J.* 2017, 8, 223–229.
43. Sedighi, M.; Faghihi, M.; Rafieian-Kopaei, M.; Rasoulilian, B.; Nazari, A. Cardioprotective effect of ethanolic leaf extract of *Melissa officinalis* L. against regional ischemia-induced arrhythmia and heart injury after five days of reperfusion in rats. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* 2019, 18, 1530–1542.
44. Hasanein, P.; Riahi, H. Antinociceptive and Antihyperglycemic Effects of *Melissa officinalis* Essential Oil in an Experimental Model of Diabetes. *Med. Princ. Pract.* 2015, 24, 47–52.
45. Ghazizadeh, J.; Hamedeyazdan, S.; Torbati, M.; Farajdokht, F.; Fakhari, A.; Mahmoudi, J.; Araj-khodaei, M.; Sadigh-Eteghad, S. *Melissa officinalis* L.

hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. *Exp. Physiol.* 2020, 105, 707–720.

46. Bayat, M.; Tameh, A.A.; Ghahremani, M.H.; Akbari, M.; Mehr, S.E.; Khanavi, M.; Hassanzadeh, G. Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo. *DARU J. Pharm. Sci.* 2012, 20, 42.

47. Awad, R.; Muhammad, A.; Durst, T.; Trudeau, V.L.; Arnason, J.T. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother. Res.* 2009, 23, 1075–1081.

48. Cunha, F.; Tintino, S.R.; Figueredo, F.; Barros, L.; Duarte, A.E.; Gomez, M.C.V.; Coronel, C.C.; Rolón, M.; Leite, N.; Sobral-Souza, C.E.; et al. HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*. *Pharm. Biol.* 2016, 54, 1664–1670.

49. Rastegarian, A.; Abedi, H.; Jahromi, H.K.; Zarei, S.; Nematollahi, A.; Mansouri, E.; Sameni, H. Analgesic Effect of Intrathecal *Melissa officinalis* in the Rat Model of Hot-Water and Formalin-Induced Pain. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 2020, 13, 19–24.

50. Hajhashemi, V.; Safaei, A. Hypnotic effect of *Coriandrum sativum*, *Ziziphus jujuba*, *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* extracts in mice. *Res. Pharm. Sci.* 2015, 10, 477–484.

51. Chung, M.J.; Cho, S.-Y.; Bhuiyan, M.J.H.; Kim, K.H.; Lee, S.-J. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Br. J. Nutr.* 2010, 104, 180–188.

52. Shin, Y.; Lee, D.; Ahn, J.; Lee, M.; Shin, S.S.; Yoon, M. The herbal extract ALS-L1023 from *Melissa officinalis* reduces weight gain, elevated glucose levels and beta-cell loss in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *J. Ethnopharmacol.* 2020, 264, 113360.

53. Gürbüz, P.; Martinez, A.; Pérez, C.; Martínez-González, L.; Göger, F.; Ayran, İ. Potential anti-Alzheimer effects of selected Lamiaceae plants through

polypharmacology on glycogen synthase kinase-3 β , β -secretase, and casein kinase
18. Ind. Crop. Prod. 2019, 138, 111431.

54. Aubert, P.; Guinobert, I.; Blondeau, C.; Bardot, V.; Ripoché, I.; Chalard, P.; Neunlist, M. Basal and Spasmolytic Effects of a Hydroethanolic Leaf Extract of *Melissa officinalis* L. on Intestinal Motility: An Ex Vivo Study. J. Med. Food 2019, 22, 653–662.

55. Astani, A.; Reichling, J.; Schnitzler, P. *Melissa officinalis* Extract Inhibits Attachment of Herpes Simplex Virus in vitro. Chemotherapy 2012, 58, 70–77.

56. Araújo, S.G.; Lima, W.G.; Pinto, M.E.A.; Morais, M.; de Sá, N.P.; Johann, S.; Rosa, C.A.; Lima, L.A.R.D.S. Pharmacological prospection in-vitro of Lamiaceae species against human pathogenic fungi associated to invasive infections. Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019, 21, 101345.

57. El Ouadi, Y.; Manssouri, M.; Bouyanzer, A.; Majidi, L.; Bendaif, H.; Elmsellem, H.; Shariati, M.; Melhaoui, A.; Hammouti, B. Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. Microb. Pathog. 2017, 107, 321–326.

58. Patora, J.; Klimek, B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). Acta Pol. Pharm. Drug Res. 2002, 59, 139–144.

59. Astani, A.; Navid, M.H.; Schnitzler, P. Attachment and Penetration of Acyclovir-resistant Herpes Simplex Virus Are Inhibited by *Melissa officinalis* Extract. Phytother. Res. 2014, 28, 1547–1552.

60. Nair, A.B.; Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J. Basic Clin. Pharm. 2016, 7, 27–31.

61. Cheng, A.Y.Y.; Fantus, I.G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. Can. Med. Assoc. J. 2005, 172, 213–226.

62. Sutter, J.D.; Mendes, M.; Franco, O.H. Cardioprotective drugs. In The ESC Textbook of Preventive Cardiology; Oxford University Press: Oxford, UK, 2017; p. 251.

63. Motelica, L.; Fikai, D.; Fikai, A.; Tru,scă, R.-D.; Ilie, C.-I.; Oprea, O.-C.; Andronescu, E. Innovative Antimicrobial Chitosan/ZnO/Ag NPs/Citronella Essential Oil Nanocomposite—Potential Coating for Grapes. *Foods* 2020, 9, 1801.

64. Motelica, L.; Fikai, D.; Oprea, O.-C.; Fikai, A.; Ene, V.-L.; Vasile, B.-S.; Andronescu, E.; Holban, A.-M. Antibacterial Biodegradable Films Based on Alginate with Silver Nanoparticles and Lemongrass Essential Oil—Innovative Packaging for Cheese. *Nanomaterials* 2021, 11, 2377.

65. Zheng, Y.; Shang, Y.; Li, M.; Li, Y.; Ouyang, W. Antifungal Activities of cis-trans Citral Isomers against *Trichophyton rubrum* with ERG6 as a Potential Target. *Molecules* 2021, 26, 4263.

НУБІП | УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ