

Н

1

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.09. – МР. 1730 «С». 2021.10.13.10. ПЗ

ГРУШКІВСЬКИЙ ЄВГЕНІЙ ВАДИМОВИЧ

НУБІП України  
2022

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

НУБІП України

УДК 606:57.085:582

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету  
захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття

НУБІП України

Коломієць Ю.В.

(підпис)

Кваско О.Ю.

(підпис)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 р.

«\_\_» \_\_\_\_ 2022 р.

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему «Культивування в умовах *in vitro* рослин роду *Orthosiphon*»

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія  
(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика  
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

НУБІП України

Керівник магістерської роботи

доцент, к.б.н.,

(науковий ступінь та вчене звання)

Виконав

(підпис)

Лобова О.В.

(підпис)

(ІПБ)

Грушківський Є.В.

(ІПБ студента)

НУБІП України

НУБІП України

КИЇВ – 2022

НУБІП України  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

НУБІП України  
ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри

2022 р.

НУБІП України

ЗАВДАННЯ

НА ВИПУСКНУ

МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТА

НУБІП України  
Грушківського Євгеній  
Валдимовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування в умовах *in vitro* рослин роду *Orthosiphon*  
керівник роботи к.б.н., доцент Лобова  
О.В.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБІП України від «13» жовтня 2021 р. № 1730 «С»

НУБІП України  
2. Строк подання студентом роботи 31 жовтня  
2022

3. Вихідні дані до роботи орієнтовний список літературних джерел; перелік  
методик для введення в культуру *in vitro*; орієнтовний перелік поживних  
середовищ для культивування рослин роду  
*Orthosiphon*.

НУБІП України  
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно  
розробити) Вибір експантів для введення в культуру *in vitro* рослин роду  
*Orthosiphon*; Підбір схеми стерилізації рослин роду *Orthosiphon*; умови  
культивування рослин роду *Orthosiphon*.

НУБІП України

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	к.б.н., доц. Лобова О.В.	15.10.2021	15.10.2021
2	к.б.н., доц. Лобова О.В.	01.03.2022	01.03.2022
3	к.б.н., доц. Лобова О.В.	15.08.2022	15.08.2022
Висновки	к.б.н., доц. Лобова О.В.	29.09.2022	29.09.2022

6. Дата видані завдання 15 жовтня 2021 року

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№ з/п	Назва етапів випускної бакалаврської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Огляд літературних джерел згідно обраної тематики	1.03.2022	
2.	Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	10.05.2022	
3	Розділ 3. Результати дослідження	03.09.2022	
4.	Висновки та оформлення списку літератури	20.10.2022	

Студент

Грушківський С.В.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

**Керівник роботи**

Лобова О.В.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	5
1.1. Використання <i>Orthosiphon Stamineus</i> в якості природного діуретика та засобу для лікування сечокам'яної хвороби.....	5
1.2. Дослідження протизапальної та знеболюючої властивостей екстракту <i>Orthosiphon Stamineus</i> .....	6
1.3. Вивчення антиоксидантних властивостей <i>Orthosiphon Stamineus</i> .....	8
1.4. Перспективи використання <i>Orthosiphon Stamineus</i> у боротьбі з онкологічними захворюваннями.....	10
1.5. Екстракт <i>Orthosiphon Stamineus</i> як ефективний засіб лікування діабету.....	11
1.6. Дослідження антибактеріальної дії екстракту <i>Orthosiphon Stamineus</i> .....	14
1.7. Можливості застосування <i>Orthosiphon Stamineus</i> у косметології та дієтології.....	15
1.8. Вивчення потенційного токсикологічного впливу <i>Orthosiphon Stamineus</i> на живі організми.....	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	18
2.1. Матеріали дослідження.....	18
2.2. Умови поведінки в лабораторії.....	20
2.3. Стерилізація лабораторного посуду та інструментів.....	21
2.4. Стерилізація живильних середовищ.....	24
2.5. Стерилізація рослинних експлантів.....	24
РОЗДІЛ 3. ВВЕДЕННЯ <i>ORTHOSIPHON STAMINEUS</i> У КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> .....	28
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ВИСНОВКИ.....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	47

# НУБІП України

*Orthosiphon Stamineus* належить до родини *Lamiaceae*. У народів Південно-Східної Азії ця рослина користується неабиякою популярністю і

використовується у традиційній медицині, оскільки на сьогоднішній день

відомі дані про цілющі властивості даної рослини для лікування ревматоїдних захворювань, гіпертонії, цукрового діабету, гонореї, тонзиліту, епілепсії, сифілісу, порушення менструального циклу, подагри, гепатиту, сечокам'яної

хвороби, жовтяниці тощо. Листя *Orthosiphon Stamineus* були завезені до

Європи та Японії, в якості оздоровчого чаю. В Європейській фармакопеї

*Orthosiphon Stamineus* зареєстровано як діуретичний засіб, відомо, що сечогінний ефект цієї рослини значно сильніший, ніж в інших природних діуретиків. [1-3].

Традиційно *Orthosiphon Stamineus* розмножують вегетативно за

допомогою пагонів. Але оскільки через її цілющі властивості попит на дану рослину постійно зростає, власники чайних плантацій шукають нові способи швидкого отримання *Orthosiphon Stamineus*. Одним зі способів є насіннєве

вирощування даної рослини з використанням фітогормонів та інших

регуляторів росту. Однак значним недоліком цього методу є те, що для

вирощування потрібно задіяти велику кількість людських та земельних ресурсів. Із розвитком біотехнологій вирішення проблеми швидкового

наращування біомаси рослинних об'єктів є очевидним. Мікроклональне

розмноження рослин *in vitro* дозволяє швидко і масово вирощувати рослини за

короткий термін. Окрім цього розмноження рослинних культур *in vitro*

відкриває чудову можливість вирощування *Orthosiphon Stamineus* в помірних широтах, так як відомо, що в природних умовах дана рослина розповсюджена

лише в країнах Азії, оскільки є дуже вибагливою до кліматичних умов [4].

Численні дослідження свідчать про наявність в *Orthosiphon Stamineus* високого вмісту фенольних сполук, флавоноїдів, терпенів та інших цінних

речовин. Саме ці сполуки, за словами науковців, пояснюють лікувальні властивості даної рослини. Так розмаринована кислота, яка міститься в листках *Orthosiphon Stamineus* є потужним антиоксидантом, а сіненсетин – володіє протизапальною дією [5]. Зважаючи на це, метою даної роботи є глибокий аналіз літературних джерел задля кращого розуміння тих чи інших властивостей даної рослини, а також підбір оптимального складу поживного середовища для культивування *Orthosiphon Stamineus* в умовах *in vitro*.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

# НУБІП України

## 1.1. Використання *Orthosiphon Stamineus* в якості природного діуретика та засобу для лікування сечокам'яної хвороби

НУБІП України

Для того, щоб перевірити чи дійсно рослина *Orthosiphon Stamineus* володіє лікувальними властивостями, які їй приписують народи Азії, науковцями були проведені численні дослідження. Німецькі дослідники експериментально на щурах вивчали діуретичну, гіпоурикемічну дію

НУБІП України

*Orthosiphon Stamineus*, а також можливість лікування сечокам'яної хвороби за допомогою вищевказаної рослини. У ході дослідження було виявлено, що екстракт *Orthosiphon Stamineus*, у якому розчинником виступав 50% етанол мав істотно вищий сечогінний ефект, ніж відомий лікарський засіб

НУБІП України

«Фурасемід», у той час екстракт із 70% етанолом справляв на піддослідних щурів приблизно такий же діуретичний вплив, як і раніше зазначений фармацевтичний препарат. Такий результат пояснюється високою екстремією натрію та низькою втратою калію. Дослідники [11] зробили висновок, що у міру збільшення гідрофільності екстракту *Orthosiphon Stamineus* посилюється

НУБІП України

його сечогінний та урикозуричний ефекти, що пояснюється високим вмістом поліфенолів. Інша група дослідників, використовуючи сучасні методики, у ході експерименту вивчала властивість *Orthosiphon Stamineus* пригнічувати утворення оксалату кальцію – одного із типів, так званих, ниркових каменів

НУБІП України

[14]. Науковці повідомили, що тривалий пероральний прийом водно-спиртового екстракту *Orthosiphon Stamineus* у кількостях 500, 1000 та 2000 мг/кг спричиняє діуретичний, натрійуретичний, калійуретичний та гіпоурикемічний ефекти у піддослідних мишей.

НУБІП України

У регуляції швидкості потоку сечі та абсолютної екскреції натрію беруть участь рецептори аденозину А1. У ході дослідження виявили, що *Orthosiphon Stamineus* індукує діурез та натрійурез саме через антагонізм вже згадуваних

аденозинових рецепторів А1. Окрім цього, було виявлено залежність діуретичної активності від дози досліджуваної рослини у водному екстракті – зі збільшенням кількості *Orthosiphon Stamineus* підвищується виведення іонів калію та натрію. Так пероральний прийом водного екстракту із вмістом 5 мг/кг досліджуваного об'єкта сприяв незначному виведенню натрію та хлоридів з організму піддослідних щурів, в той же час помітне істотне виведення іонів калію; за перорального прийому екстракту із додаванням 10 мг/кг *Orthosiphon Stamineus* ефекти виведення зазначених раніше іонів помітно підсилювалися.

На фоні такої високої діуретичної дії відмічають негативний вплив *Orthosiphon Stamineus* на організм щурів – підвищений вміст сечовини в сироватці крові, збільшенню вмісту глюкози та креатиніну. Однак підвищення вказаних речовин було незначним – отримані значення знаходяться в межах норми. Варто відзначити, що саме такі (5 мг/кг та 10 мг/кг) форми екстрактів використовуються людьми. Концентрація *Orthosiphon Stamineus* є низькою, відповідно сечогінний ефект помітно нижчий, на відміну від інших поширених діуретичних засобів [15-16].

У ході роботи [21] перевіряли нефропротекторний ефект метанольних екстрактів *Orthosiphon Stamineus* (100 і 200 мг/кг). Отримані результати дають підставу вважати, що вищевказані екстракційні суміші покращують функціональні параметри нирок такі, як кількість креатиніну в сироватці крові, наявність білка в сечі та сечовини у крові, що було продемонстровано на гістопатологічних зрізах. Також науковці відмічають помітне покращення функцій нирок у щурів з нирковою недостатністю внаслідок перорального прийому метанольних екстрактів досліджуваної рослини.

## **1.2. Дослідження протизапальної та знеболюючої властивостей екстракту *Orthosiphon Stamineus***

У роботі [17] досліджували протизапальну та знеболюючу дію *Orthosiphon Stamineus*. Для цього використовували стандартизований 50%

метанольний екстракт досліджуваного об'єкта. В якості суб'єктів дослідження було обрано мишей та щурів. В ході експерименту було виявлено, що пероральне введення 1000 мг/кг екстракту спричиняло протизапальну дію, яка проявлялася у зменшенні набряку задньої лани у щурів, які попередньо отримували карагенен. Також перевіряли протизапальну дію екстракту досліджуваної рослини, де розчинником виступав хлороформ. Було виявлено, що при пероральному вживанні досліджуваного екстракту у піддослідних щурів спостерігалось зменшення проникності капілярів, зменшення набряків і запалення черевної порожнини. Фітохімічний скринінг екстракту показав, що в суміші містяться флавоноїди: єнінсетин, евпаторин і 3'-гідрокси-5,6,7,4'-тетраметоксифлавоон. Окрім цього, було досліджено знеболюючу дію *Orthosiphon Stamineus*. Після аналізу результатів експерименту, дослідники висловили припущення, що досліджувана рослина володіє ненаркотичною аналгетичною дією.

В іншому дослідженні [18] оцінювали можливий жарознижувачий ефект 50% метанольного екстракту *Orthosiphon Stamineus*. В якості суб'єктів обрали щурів із нормальною температурою тіла та щурів, які мали лихоманку, викликану певним штамом дріжджів. В ході роботи виявлено, що пероральний прийом 500 мг/кг та 1000 мг/кг метанольного екстракту *Orthosiphon Stamineus* не знижували нормальну температуру тіла щурів, в той час щурі, які мали лихоманку отримали значне полегшення пірексії. Жарознижувачий ефект спостерігався протягом чотирьох годин після введення екстракту. Цікаво зазначити, що дія екстракту була майже такою ж, як у парацетамолу.

У ході експерименту [19] було виявлено, що метаболіти, виділені з *Orthosiphon Stamineus* пригнічують вироблення оксиду азоту (NO) у щурів. Хоча оксид азоту є важливою сигнальною молекулою в організмі, його надмірне вироблення може викликати мошкодження тканин, внаслідок вивільнення прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин, інтерферон та інтерлейкін-1. Інгібування оксиду азоту було підтверджено за

допомогою макрофагоподібних клітин, активованих ліпополісахаридом.

Пригнічення вироблення оксиду азоту пояснюється наявністю у рослині *Orthosiphon Stamineus* унікальних речовин – ортосифолів А, В, D, X, H, K, M і N, а також гідроксиортосифолу, деоксоацетилортосифолу та інших.

Інгібуючу дію цих сполук вивчали в порівнянні із неселективними інгібіторами NO-синтази, такі як NG-монометил-L-аргінін, поліміксин В і дексаметазон.

Традиційне використання *Orthosiphon Stamineus* жителями Малайзії для лікування шлункових захворювань стало вагомим причиною для дослідження

гастропротекторних властивостей цієї рослини [22]. Оцінювали вплив 50% метанольного екстракту листків *Orthosiphon Stamineus* на виразки у щурів, спричинених дією етанолу. Вивчали виразковий індекс, гістологічні зміни

оболонки шлунка, склад слизу та інше. В ході експерименту було виявлено, що зміни, які відбуваються в організмі піддослідних щурів залежать від дози

введеного екстракту. В усіх досліджуваних зразках спостерігалася позитивна динаміка. Зниження виразкового індексу та ступінь пошкодження слизової оболонки шлунку оберненопропорційно залежать від збільшення дози введеного екстракту (125, 250, 500 і 1000 мг/кг). Вироблення шлункового соку

навпаки збільшується зі збільшенням дози екстракту *Orthosiphon Stamineus*.

Відповідно до отриманих результатів дослідники дійшли висновку, що вживання раніше зазначеної екстракційної суміші має позитивний вплив на

загоювання виразок, отже екстракт *Orthosiphon Stamineus* можна використовувати в медицині в якості гастропротектору.

### 1.3. Вивчення антиоксидантних властивостей *Orthosiphon Stamineus*

Група науковців [20] досліджувала антиоксидантну дію різних екстрактів *Orthosiphon Stamineus*: етилового, метанольного, водно-метанольного,

ацетонового та хлороформового. Було виявлено, що кожен з досліджуваних зразків володів антиоксидантними властивостями. Отримані результати

порівнювали з деякими стандартними антиоксидантами, зокрема такими, як кверцетин та бутил гідроксипропанол. Найбільшу антиокислюючу активність було зареєстровано у зразку, в якому в якості розчинника виступав ацетон.

Наступним йде зразок із екстрактом, екстрагентом якого був метанол. У досліджуваній суміші було помічено пригнічення окислення пероксиду водню.

Також виявлено, що антиоксидантна дія спиртових екстрактів *Orthosiphon Stamineus* підвищувала захист печінки у піддослідних щурів.

Спершу тваринам вводили препарати тіоацетаміду та парацетамолу, які пагубно впливають на роботу печінки. Гістологічні дослідження тканин

печінки показали, що піддослідні щури, яким було перорально введено досліджувані екстракти рослини *Orthosiphon Stamineus* не зазнали істотних пошкоджень внаслідок дії токсичних препаратів.

В той час як контрольна група, яка не отримувала ніяких додаткових речовин, окрім гепатотоксичних препаратів, мала значні зміни у морфологічній структурі печінки.

Після проведення експерименту, який був проведений у трикратній послідовності, науковці висловлюють припущення, що *Orthosiphon Stamineus* є

сильнодіючим гепатопротектором. Дослідники припускають, що спиртові екстракти пригнічують процеси некрозу тканин печінки, ймовірно завдяки

флавоноїдам, які знижують окиснювальну дію введених в організм токсичних препаратів.

Відмічається, що рівень захисту печінки залежав від дози екстрактів.

В роботі [25] науковці дійшли висновку, що водно-метанольний екстракт володіє антиапоптичною дією. Загибель клітин, викликана  $H_2O_2$  інгібувалась внаслідок їх попередньої обробки досліджуваним екстрактом.

Такий результат пояснюється великою кількістю фенолів та флавоноїдів, які містяться в *Orthosiphon Stamineus*.

Зазначені речовини володіють антиоксидантними властивостями, а також збільшують експресію гену *Bcl-2* та значно знижують

експресію гену *Bax*, що в підсумку призводить до зниження  $H_2O_2$ -індукованого апоптозу.

# НУБІП УКРАЇНИ

## 1.4. Перспективи використання *Orthosiphon Stamineus* у боротьбі з онкологічними захворюваннями

У роботі [23] вивчали антипроліферативну та цитотоксичну властивості *Orthosiphon Stamineus*. В ході дослідження виділили компоненти *Orthosiphon Stamineus*, екстрагуючи метанолом та хлороформом подрібнене листя рослини. Виявлено, що виділені метаболіти проявляють цитотоксичну активність щодо метастазів у печінці щурів, викликаних карциномою товстої кишки. Тонкошарова та колонкова хроматографія з силікагелем виявили наявність п'яти дитерпенів, а саме – стамінол А та ортосифоли F-I, які ймовірно, є причиною цитотоксичної дії *Orthosiphon Stamineus*. В подальших дослідженнях цією ж науковою групою було виділено з раніше згадуваної рослини дитерпени типу стамінану: стамінолактони А та В, а також норстамінолактон А. Зазначені речовини проявляють цитотоксичну активність проти ракових клітин карциноми товстої кишки. Для більш широкого розуміння лікувальних властивостей *Orthosiphon Stamineus* в ході експерименту використовували різні сорти рослини. Найбільшою протипухлинною дією з поміж досліджуваних сортів володіє в'єтнамський сорт ортосифону. Окрім вже зазначених вище дитерпенів, у рослини наявні сіненсетин, воміфоліол, вурантіаміду ацетат, розмаринова, кавова, олеанолова, урсолова та бетулінова кислоти, а також  $\beta$ -ситостерин. Ці сполуки виявили цитотоксичну дію не лише на ракові клітини карциноми щурів, а й на клітинні лінії фібросаркоми людини. Дослідили, що серед усіх виділених сполук, найпотужнішою антипроліферативною активністю володіє норстамінолактон А.

Одним із методів боротьби з раковими пухлинами є, так званий, антиангіогенез процес, який не дає утворюватися новим клітинам крові. Антиангіогенез включають до програм хімотерапії. У роботі [24] вивчали

антиангіогенезну активність різних екстрактів, отриманих із малайзійського сорту *Orthosiphon Stamineus*. Результати показали, що екстракт рослини в розчині метанолу володів найвищою антиангіогенезною активністю, порівняно з екстрактами, екстрагентами яких виступали хлороформ, петролейний ефір та вода. Припускають, що така активність екстрактів пояснюється антиоксидантними властивостями *Orthosiphon Stamineus*. Одним з можливих пояснень цьому є зниження рівня вільних радикалів та активація гену гіпоксії. Така дія, у свою чергу, пригнічує фактор росту ендотелію судин, який відповідає за ангіогенез.

Виявлено, що метанольний екстракт *Orthosiphon Stamineus* посилює дію синтетичного лікарського засобу тамоксифену, який є антагоністом рецепторів естрогену. В ході експерименту було виявлено, що антипроліферативна дія на ракові клітини молочної залози тамоксифену у парі з раніше зазначеним екстрактом збільшується у п'ять разів, відносно зразка, в якому екстракт не додавався. Також перевірили дію самого екстракту без тамоксифену і виявили, що *Orthosiphon Stamineus* не володіє істотною антипроліферативною дією проти ракових клітин молочної залози. Тому науковці припускають, що метанольний екстракт *Orthosiphon Stamineus* доцільно використовувати в якості допоміжного засобу для лікування певних форм раку.

### 1.5. Екстракт *Orthosiphon Stamineus* як ефективний засіб лікування діабету

Гіперглікемія є основним симптомом цукрового діабету і може призвести до ураження тканин та органів в організмі людей і тварин, викликаючи ендокринні захворювання різного типу. Оскільки в народній медицині східних країн Азії відвари листків *Orthosiphon Stamineus* вживають як протидіабетичний засіб, науковці вирішили перевірити у своїй роботі [29]

властивість даної рослини знижувати кількість глюкози у крові. Виявили, що 80% етанольний екстракт *Orthosiphon Stamineus* (680 мг/кг, 340 мг/кг і 170 мг/кг), після десятиденного перорального введення лабораторним мишам, пригнічував гіперглікемію. При більш довготривалому прийомі вищевказаного екстракту, а саме – протягом восьми тижнів, спостерігали такі ж результати.

В іншій роботі [30] через десять хвилин після перорального прийому піддослідними щурами 50% етанольного екстракту (200 мг/кг та 400 мг/кг)

*Orthosiphon Stamineus*, тваринам вводили велику кількість крохмалю або сахарози. Метою експерименту було дослідження впливу досліджуваної рослини на кількість глюкози у крові. Виявлено, що зазначений екстракт (1 г/кг) знижував гіперглікемію у діабетичних щурів, а також зменшував концентрацію глюкози у крові здорових щурів після введення як крохмалю, так і сахарози. Водний екстракт *Orthosiphon Stamineus* теж мав протидіабетичний ефект на піддослідних тварин. Виявлено [31], що після 14-денного перорального введення водного екстракту досліджуваної рослини (0,5 г/кг та 1 г/кг) у здорових щурів спостерігалось зниження концентрації глюкози у плазмі крові на 15% та 34% відповідно через годину після завантаження тварин глюкозою. У щурів, хворих на діабет антиглікемічний ефект тих же екстрактів перевіряли через три години після навантаження глюкозою і спостерігали зниження цього вуглеводу у плазмі крові на 21% та 24%.

Гіперглікемія та надлишок вільних жирних кислот можуть призводити до утворення великої кількості вільних радикалів, таких як активні форми кисню (АФК) та реактивні види азоту (RNS). Ці вільні радикали можуть викликати окислювальний стрес, порушувати структуру та функції острівцевих  $\beta$ -клітин і викликати дефіцит секреції інсуліну. На думку дослідників, антиоксидантна активність, якою володіє *Orthosiphon Stamineus* відкриває перспективу використання цієї рослини в якості лікарського засобу, який захищає Острівці Лангерганса, зокрема  $\beta$ -клітини, знешкоджуючи токсичні вільні радикали. Це

припущення підтверджує робота [32], в якій порівнювали вплив різних екстрактів *Orthosiphon Stamineus* та аскорбінової кислоти, як типового антиоксиданта на вільні радикали такі, як 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил (DPPH), 3-етилбензотіазолінб-сульфонат (ABTS). В ході дослідження виявлено, що 50% та 70% метанольні екстракти *Orthosiphon Stamineus* (500 мг/л) знешкоджували на 70-90% більше вільних радикалів, ніж аскорбінова кислота, 100 мл водного екстракту *Orthosiphon Stamineus* проявляли таку ж антиоксидантну властивість як 20 мг аскорбінової кислоти; 50% етанольний екстракт *Orthosiphon Stamineus* (50 мкг/мл) сприяв високому рівню знешкодженню внутрішньоклітинних АФК, що значно збільшує життєздатність клітин при окисному стресі в клітинах печінки.

Ферменти  $\alpha$ -амілаза і  $\alpha$ -глюкозидаза є двома ключовими у процесах перетравлення та всмоктування вуглеводів в організмі людини:  $\alpha$ -амілаза розщеплює довголанцюгові вуглеводи, а  $\alpha$ -глюкозидаза гідролізує глюкозидні зв'язки з вивільненням глюкози. Ці ферменти беруть безпосередню участь у метаболізмі крохмалю та глікогену. Очевидно, що пригнічення активності  $\alpha$ -амілази та  $\alpha$ -глюкозидази може зменшити вивільнення глюкози при гідролізі вуглеводів, уповільнити її всмоктування в тонкій кишці та ефективно зменшувати рівень глюкози в крові після прийому їжі. У роботі [33] досліджували інгібіторну активність *Orthosiphon Stamineus*, оскільки відомо, що дана рослина містить фенольні речовини, які, у свою чергу, здатні знижувати активність вищезазначених ферментів. В ході експерименту порівнювали гіпоглікемічну дію розповсюдженого лікарського засобу аскорбози, а також розмаринової та 2-кафеол-L-винної кислот, які були виділені з *Orthosiphon Stamineus*. Виявили, що 5 мг/мл розмаринової та 2-кафеол-L-винної кислот інгібували активність  $\alpha$ -глюкозидази відповідно на 71% та 69% ефективніше, ніж така ж доза акарбози. Ці результати підтверджує

інше дослідження [34], в ході якого виявили, що етанольний екстракт *Orthosiphon Stamineus* у концентрації 50 мкг/мл інгібував  $\alpha$ -глюкозидазу на

40,74%,  $\alpha$ -амілазу на 81,48% ефективніше, ніж вжигадувана акарбоза. Окрім цього дослідники перевіряли гіпоглікемічну активність сполуки сіненсетину, виділеної з *Orthosiphon Stamineus*. Відмічено, що сіненсетин на 36,7% знижує активність  $\alpha$ -амілази відносно контрольного зразка.

У людей, хворих на цукровий діабет порушується робота інсулінових рецепторів (IP) до інсуліну – вони втрачають свою чутливість до гормону. Інсулін зв'язується з IP на клітинній мембрані під час фосфоридування тирозину, яке регулюється ферментом протеїн-тирозинфосфатазою 1В (PTP1B). Висока активність PTP1B може призвести до дефосфорилування інсулінових рецепторів та послаблення передачі сигналу, внаслідок якого виробляється інсулін. Таким чином виникає, так звана, інсулінова резистентність, відповідно, щоб уникнути цього явища, потрібно посилити чутливість інсулінових рецепторів до гормону. У [35] виявили, що активні компоненти екстракту *Orthosiphon Stamineus*, зокрема ортосифоли та сифоноли, знижують активність протеїн-тирозинфосфатази 1В, що призводить до посилення чутливості інсулінових рецепторів й відповідно підвищують секрецію інсуліну.

#### 1.6. Дослідження антибактеріальної дії екстракту *Orthosiphon Stamineus*

Проблема резистентності бактерій до антибіотиків збільшується щороку через зловживання даними препаратами, тому зростає інтерес до пошуку та використання нових природних антибактеріальних засобів. Метою роботи [27] було дослідження антимікробної дії малайзійського сорту *Orthosiphon Stamineus*. В ході експерименту виявлено, що 50% метанольний екстракт листків вищевказаної рослини проявляв варіабельну антибактеріальну дію проти *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella enteritidis*,

*Salmonella typhimurium* та *Klebsiella pneumoniae*, які є збудниками різних хвороб і найчастіше надходять в організм людини при споживанні заражених морепродуктів. Отриманий протимікробний результат пояснюють наявністю розмаринової кислоти в листках ортосифону. Науковці знайшли найбільш ефективну та найбільш безпечну концентрацію екстракту *Orthosiphon Stamineus*, яку доцільно використовувати як антибактеріальний препарат для консервування харчових продуктів.

### 1.7. Можливості застосування *Orthosiphon Stamineus* у косметології

та дієтології

В ході експерименту [26] було встановлено, що *Orthosiphon Stamineus* володіє властивостями, які дозволяють знижувати жирність шкіри. Це пояснюється здатністю метаболітів рослини знижувати активність ферменту 5 $\alpha$ -редуктази, який запускає секрецію шкірного сала і прискічує синтез скваліну, який є важливим компонентом шкірного сала. Отримані дані свідчать про те, що *Orthosiphon Stamineus* має перспективи застосування у косметології. Також науковці відмічають, що додавання 2% водного екстракту листків *Orthosiphon Stamineus* до косметичної олії не тільки зменшує жирність шкіри, а й зменшує розмір пор, що має позитивний вплив на зовнішній вигляд людини.

У східній народній медицині перетерті висушені листки *Orthosiphon Stamineus* в комбінації із зеленим чаєм використовується як засіб проти ожиріння. Тому в роботі [28] науковці вирішили експериментально перевірити жироспалюючі властивості даної рослини. Виявили, що пероральний двотижневий прийом етанольного екстракту *Orthosiphon Stamineus* (450 мг/кг) може зменшувати апетит та масу вісцерального жиру. При регулярному вживанні даного екстракту підвищується експресія пептидів та гормонів, які відповідають за регуляцію апетиту, а також знижується кількість

нейропептиду  $Y$  у гіпоталамусі. Окрім цього було виявлено, що прийом екстракту підвищував експресію мРНК лептину у жировій тканині. Лептин найбільш відомий ліпостатичний сигнальний месенджер, який індукує експресію пропіомеланокортину та знижує нейропептид  $Y$  у гіпоталамусі. Ці результати свідчать про реальну жироспалюючу дію *Orthosiphon Stamineus*.

### 1.8. Вивчення потенційного токсикологічного впливу *Orthosiphon Stamineus* на живі організми

Окрім досліджень, в яких розглядали можливі позитивні властивості *Orthosiphon Stamineus* науковцями було проведено експеримент, метою якого було дослідження можливих токсичних ефектів різних екстрактів даної рослини. Токсичність оцінювали на піддослідних щурах шляхом спостереження та аналізу біохімічних параметрів. Тваринам протягом 28-ми днів перорально вводили різні дози (1250, 2500 і 5000 мг/кг) 50% метанольного та 50% етанольного екстрактів *Orthosiphon Stamineus*. Під час експерименту не було виявлено жодного летального випадку серед тварин, не спостерігали також ніяких відхилень від норми у роботі внутрішніх органів.

Також не було істотної різниці у зміні маси органів та маси тіла в цілому, однак відмічено незначне зниження активності ферментів печінки – трансаміназ. Зниження ферментативної активності не пізналося на загальному стані організму щурів. Згідно отриманих результатів вчені припустили, що вживання метанольного та етанольного екстрактів *Orthosiphon Stamineus* не має помітного токсичного впливу на організм, однак вчені не рекомендують зловживати прийомом *Orthosiphon Stamineus*.

В іншому дослідженні [36] дослідили ефекти водного екстракту на ембріони *Danio rerio*. Виявили, що 1 мг/мл *Orthosiphon Stamineus* не спричиняє жодного цитотоксичного впливу на піддослідний об'єкт. Водний екстракт *Orthosiphon Stamineus* (250, 500, 1000 і 2000 мг/кг) не спричиняв

жодного впливу на перебіг вагітності у самок щурів. Так самки на 6-20 днях вагітності не мали пренатальної затримки росту плоду або інших відхилень.

Також виявлено [37], що різні форми екстрактів *Orthosiphon Stamineus* не викликають ніяких змін на генетичному рівні. Екстракти додавали в живильне середовище, на якому вирощували різні штами бактерій роду *Salmonella*,

експеримент проводили, вивчаючи геном бактерій в декількох поколіннях. В жодному зразку не було відмічено можливості *Orthosiphon Stamineus*

індукувати генні мутації. Таким чином, доведено, що застосування водного екстракту *Orthosiphon Stamineus* не має генотоксичного ризику.

екстракту *Orthosiphon Stamineus* не має генотоксичного ризику.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Матеріали дослідження

Матеріалом для дослідження слугує *Orthosiphon Stamineus*, або, так званий, яванський чай — багаторічна трав'яниста рослина родини гладокропивових (*Dipterocarpaceae*), розповсюджена в тропічних регіонах, таких як Індія, Китай, Індонезія, Малайзія, Австралія, тихоокеанські острови, країни Східної Африки тощо. Висота *Orthosiphon Stamineus* коливається від 30 см до одного метра. Стебло прямостояче, чотиригранне, листки прості ланцетоподібні, еліптичні або ромбовидні, шириною 2–4 см, довжиною близько 7 см, розміщуються на стеблі супротивно. Квітки зигоморфні, п'ятичленні, зібрані у китцелоподібне суцвіття, мають світле забарвлення (рис. 1), однак існують також сорти фіолетового кольору (рис. 2), які за певними даними мають більше біологічно активних сполук. Окрім свого забарвлення рослини обох сортів морфологічно не мають істотних відмінностей між собою (див. табл. 10).



Рис. 2<sup>[57]</sup> фіолетовий *O. Stamineus*



Рис. 1<sup>[58]</sup> білий *O. Stamineus*

Чашолистки зрощені з трубочкою і утворюють двогубу чашечку, пелюстки теж зростаються між собою і утворюють двогубу кронку; нижня губа

гладенька, має увігнуту форму, верхня губа утворюється трьома або чотирма пелюстками. Від віночка-трубки відходять молири довгі незрошені тичинки, довжиною більше 2 см. Плід *Orthosiphon stamineus* складається з двох-чотирьох яйцеподібних горішків. [6-8].

Observation	Purple variety ± SD (n=3)	White-purple variety ± SD (n=3)
Color of the stem	Purple	Green
Leaf base	Asymmetry	Asymmetry
Leaf tip	Pointed	Pointed
leaf edge	Align	Align
Leaf color	Dark green	Light green
Petal color	Green-purple	Green
Crown color	Purple	White
Color of the stems of the pistil	Purple	White-purple
Color of stamens	Purple	White-purple
Plant height nine months (cm)	62±0.1	75±0.1
Stem circumference (cm)	1±0.05	1.2±0.05
Rod diameter (cm)	0.25±0	0.25±0.05
Leaf Length (cm)	4.33±0.12	4.36±0.28
Petiole length (cm)	0.83±0.23	0.73±0.02
Number of crowns	2.0±0.00	2.0±0.00
Number of stamens	5.0±0.00	5.0±0.00
Flower stem length (cm)	0.4±0.00	0.41±0.02
Flower Diameter (cm)	1.1±0.00	1.1±0.00

Табл. 10<sup>[54]</sup>

Рослини *Orthosiphon stamineus* багаті на вторинні метаболіти, які становлять неабияку цінність в біотехнології та медицині. Хімічний скринінг різних екстрактів листків *Orthosiphon stamineus* показав наявність у зазначеної рослини трьох видів фітохімічних речовин: поліметоксильованих флавоноїдів,

фенілпропаноїдів (похідних кавової кислоти) та терпеноїдів (головним чином дитерпенів та тритерпенів). Найбільш відомими флавоноїдами, виділеними з водно-спиртового екстракту є сіненсетин, евпаторин, сальвегенін, воміфоліол, ладанейн. У водному екстракті виявлено кавову, розмаринову та цикорову кислоти, а також дитерпени, такі як ортосіфолі, стамінолактони, норстамінолі, секоортосіфолі, сифонолі та тритерпени, серед яких урсолова, олеанолова, оливкову, бетулінову та гідроксидбетулінову кислоти. Окрім вищезазначених сполук було виявлено також деякі ефірні олії, зокрема *b*-каріофілен, каріофіллоксид, *a*-гумулен, *b*-бурбонен, камфен, лимонен тощо.

Серед інших класів природних компонентів у *Orthosiphon Stamineus* були виявлені глікозиди, зокрема сапоніни, вуглеводи, здебільшого гексози, стероїди та дубильні речовини [9-13]. Отже, зважаючи на це, *Orthosiphon Stamineus* є досить перспективним об'єктом у біотехнології.

## 2.2. Умови поведінки в лабораторії

Для того, щоб запобігти шкоди здоров'ю під час проведення будь-яких робіт у лабораторії, потрібно чітко дотримуватися правил техніки безпеки.

Слід обережно працювати з такими хімічними речовинами, які є токсичними, їдкими та мають канцерогенні та мутагенні властивості, також правильно використовувати легкозаймісті речовини, що можуть привести до утворення пожежі або вибуху.

Користуючись електричними приладами необхідно впевнитися у їх справності, щоб запобігти ураженню електричним струмом.

Працювати у біотехнологічній лабораторії самостійно є заборонено, у ній повинно знаходитися не менше двох осіб.

Не дозволено знаходитися у лабораторії без спецодягу. Перед виконанням будь яких робіт у лабораторій потрібно одягати халати, змінне взуття, якщо виникає потреба, то можна одягнути гумові рукавички, фартухи та ін. Волосся повинно бути зібране та прикрите.

Вживати їжу, користуватися косметикою, палити, зберігати особисті речі та будь-які харчові продукти - заборонено.

Робоче місце повинно завжди залишатися чистим, на ньому не повинні знаходитися реактиви, лабораторний посуд, інструменти, які не потрібні для виконання даної роботи. місці мають знаходитися лише потрібні для виконання конкретної роботи реактиви та матеріали, посуд, інструменти й обладнання. Використовувати лише ті реактиви, які знаходяться у посуді в якому можна їх зберігати, та з наявною етикеткою з назвою того чи іншого реактиву. Не використовувати реактивів, які не підписані, або ті які підписані нерозбірливо.

Використовувати для набирання і відмірювання розчинів, лише ті інструменти, які для цього призначені. Інші способи категорично заборонені.

У разі потрапляння на шкіру, слизові оболонки, або лабораторний стіл токсичної речовини, потрібно в негайному порядку виконати ряд дій для очищення забрудненої поверхні. Після завершення роботи слід прибрати за собою, вимити брудний посуд, інструменти. В кінці роботи вимити руки та при потребі використати дезінфікуючий засіб.

### **2.3. Стерилізація лабораторного посуду та інструментів**

Для отримання точних результатів та зниження ризику для здоров'я дослідника, перед початком та протягом роботи необхідно дотримуватися правил асептики. Для інактивації життєдіяльності та здатності до самовідтворення усіх форм мікроорганізмів використовують методи стерилізації. Стерилізуючі агенти (стерилізанти) за механізмом дії ґрунтуються на інактивації процесів, які відповідають за репродукцію клітин, їх ріст, інактивацію геному та денатурацію ферментів.

Стерилізуючі агенти можуть бути різноманітними, стерилізацію проводять методами кип'ятіння, пастеризації, автоклавування, тиндалізації, нагрівання у спеціальних сухожарових шафах, де температура може сягати

більше 120 градусів Цельсія, використовують токсичні хімічні сполуки, які мають бактерицидну дію, в залежності від об'єкту стерилізації застосовують також фізичні чинники, зокрема такі, як ультрафіолетове або іонізуюче випромінювання, яке за рахунок  $\gamma$ -променів є більш ефективним.

Для успішного проведення мікроклонального розмноження необхідним є асептичність приміщення, стерильність усіх робочих поверхонь, зокрема ламінар-боксу, відсутність будь-якого зараження живильного середовища, посадкового матеріалу, інструментів, які будуть використовуватися протягом роботи, різного роду допоміжних матеріалів, посуду тощо.

Перед початком роботи потрібно підготувати приміщення: помити усі поверхні, в тому числі підлогу, миючим дезінфікуючим засобом, після чого на 1-2 години лишити приміщення із ввімкненою ультрафіолетовою лампою. Для цього зазвичай використовують лампи ПРК-7 потужністю 1000 Вт або ПРК-4

з удвічі меншою потужністю – 500 Вт; після вимкнення ламп робота в приміщенні дозволена лише через дві години. Більшість ламінар-боксів обладнані УФ-лампами, тому їх стерилізація теж відбувається за допомогою ультрафіолетового випромінювання. Лампи можна залишати ввімкненими

протягом ночі для кращої стерилізації робочої поверхні. Безпосередньо перед початком роботи необхідно протерти робочу поверхню ламінар-боксу етиловим спиртом із концентрацією 96%.

Руки дослідника потрібно ретельно вимити мильним розчином, після чого обробити антисептичним засобом, яким зазвичай виступає 96% етиловий спирт.

Увесь лабораторний посуд має бути чистим та простерилізованим. Для промивання посуду, в залежності від матеріалу, з якого він зроблений, використовують спеціальні засоби, які не пошкоджують поверхню та добре змиваються. Добре вимитий посуд висушують і готують до стерилізації.

Найбільш поширеним методом знезараження виробів зі скла є їх замочування на тривалий час (близько шести годин) у розчині дихромату калію ( $K_2Cr_2O_7$ ) з

концентрованою сірчаною кислотою. Цей метод є найбільш розповсюдженим.

Посуд замочують у вищевказаній суміші на 4-6 годин.

Після зазначеної хімічної обробки посуд потрібно ретельно промити, використовуючи для цього спершу проточну, а після – дистильовану воду.

Надалі висушений посуд стерилізують сухим або гострим (в автоклаві) паром.

Температура та тривалість стерилізації залежить від матеріалів та виду посуду.

Іншим способом стерилізації посуду є лужний метод. Відносно хімічного є менш ефективним, оскільки на першому етапі відбувається промивка

звичайними миючими засобами. Надалі вимитий посуд необхідно висушити і

простерилізувати протягом 2-2,5 годин за допомогою сухої жару у

спеціальній шафі за температури 160-180°C, як альтернативу можна

використати автоклавуючий спосіб стерилізації тривалістю до 25 хвилин та

при сталому тиску в 1-12 атмосфер. Перед зазначеними маніпуляціями, посуд

необхідно загорнути у пергаментний папір.

Зберігання стерильного посуду відбувається у закритих шафах, які захищені від потрапляння пилу та інших забруднень, наприклад, слідів від хімічних речовин.

Фольга, папір, вироби із вати або силікону, целован, марля та інші

допоміжні матеріали автоклавують протягом 20-25 хвилин за сталого тиску в одну атмосферу.

Інструменти, виготовлені з металу, такі як скальпель, пінцет, голка,

ножиці тощо прожарюють в сушильній шафі протягом декількох годин за

температури близько 180 градусів Цельсія. Для знищення спор певних видів

бактерій, додатково проводять стерилізацію кип'ятінням у 2%-вому розчині натрій карбонату  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  тривалістю 10-20 хвилин [38].

#### **2.4. Стерилізація живильних середовищ**

Стерилізація рідких та твердих поживних середовищ відбувається за

допомогою методом автоклавування. Для цього живильне середовище

розливають у колби, пробірки або інший скляний посуд. Час стерилізації визначається в залежності від об'єму середовища (див. табл. 3).

### Режим автоклавування живильних середовищ

Об'єм середовища, мл	Час стерилізації (121°C, 1 атм) хв
20-50	15
75	20
150-500	25
1000	30
2000	40

Табл. 3

Часто живильне середовище може містити компоненти, які можуть коагулювати під час автоклавування. До таких компонентів належать ферменти, мутагени, антибіотики, амінокислоти та їх похідні. Стерилізація цих об'єктів проводиться механічним способом за допомогою бактерицидних фільтрів. Після використання скляні фільтри промивають хімічними речовинами, здебільшого використовують концентровану сірчану кислоту, далі декілька разів промивають проточною, а пізніше – дистильованою водою.

### 2.5 Стерилізація рослинних експлантів

Досить складним завданням є отримання асептичного рослинного матеріалу, оскільки досліднику необхідно ліквідувати сторонню мікрофлору, при цьому не пошкодивши тканину вибраного рослинного об'єкта.

Для уникнення контамінації поверхневих тканин, перед стерилізацією спершу необхідно очистити тканину від механічних забруднень (грунту та частинок пилу), позбавити її від засохлих частин. Для цього потрібно декілька разів промити досліджуваний об'єкт під проточною водою (можливо із застосуванням допоміжних інструментів, наприклад, щітки), а за тим – дистильованою водою.

В якості експланту можуть виступати усі органи рослини. Пагони промивають мильним розчином, після чого змивають його проточною та дистильованою водою. Процес відмивання зазвичай становить близько 30 хвилин.

В якості стерилізуючого агента рослинного матеріалу найчастіше використовують 70% розчин етанолу, яка пагубно впливає на бактерії, гриби та їх спори. Бруньки або листочки занурюють в розчин приблизно на 20 секунд; насіння, видозмінені пагони або корені потребують більш тривалого періоду стерилізації – до 5 хвилин у розчині 70% етанолу. Замість стерилізації вищевказаним спиртовим розчином подекуди доцільно використовувати абсолютний спирт. Використання етанольних розчинів має певні переваги, зокрема дозволяє стерилізуючим речовинам краще проникати в тканини, оскільки після обробки етанолом восковий наліт на листках руйнується.

Для поверхневої стерилізації тканин рослинного походження в якості стерилізуючих агентів, окрім етанолу, використовують також ртутні препарати (діюцид, 0,2-0,5% розчини сулеми, фалосент), 5-20% розчини пероксиду водню, калію перманганат та сполуки, які містять активний хлор.

Гіпохлорити натрію (0,5-5% розчини  $\text{NaClO}$ ) та кальцію (9% розчин  $\text{Ca(ClO)}_2$ ) зазвичай використовують для стерилізації надземних частин рослини, зокрема стебла, бруньок, плодів, квіток вцілому та їх окремих складових, наприклад, зав'язі, а також для підземних частин – бульб та насіння. Однак більш розповсюдженими стерилізаційними агентами для насіння є пероксид водню, який найменш пагубно впливає на рослинні тканини, а також швидко розкладається, що полегшує відмивання тканин від стерилізатора та концентрована сірчана кислота, оскільки вона робить насінні оболонки більш проникливими для води та повітря, що в свою чергу сприяє швидшому проростанню насіння.

Для того, щоб підвищити ефективність стерилізуючого агента необхідно до розчинів стериліантів додавати невелику кількість емульгатору. Як

емульгатор використовують твін-200 або твін-80. Доза цих речовин повина бути не більше як 1 крапля на 100 мл розчину.

Тривалість стерилізації рослинних експлантів встановлюється експериментальним шляхом і залежить від вибору стерилізуючого агента та досліджуваного об'єкта.

Для того, щоб запобігти отруєнню культури стериліантом, необхідно промити експлант не менше чотирьох разів з періодичністю між циклами у 15 хвилин. Якщо режим видалення стерилізуючого агента з тканин експланту порушений, то, як наслідок, може виникати заторможення ростових процесів рослини або ж повна її загибель.

Якщо тканина досліджуваної рослини заражена внутрішньою інфекцією, поверхневої стерилізації буде недостатньо для отримання асептичного матеріалу. В такому випадку доцільно використовувати розчини антибіотиків, стерилізованих через мембранні фільтри. Найбільш ефективними антибактеріальними агентами є розчини клафорану, ністатину, ампіциліну, стрептоміцину. Досліджуванний рослинний матеріал поміщають на 3 години у водний розчин одного із зазначених препаратів, найчастіше у концентрації 500 мг антибіотику на літр води, після чого відбувається висаджування

вибраного об'єкта на тверде агаризоване живильне середовище, яке у свою чергу, містить таку ж концентрацію антибіотику. Однак, варто зазначити, що ці препарати негативно відображаються на процесах калусогенезу та ренегерації рослини [39].

Перед тим як відкрити колбу або пробірку із знезараженим живильним середовищем, їх поверхню протирають ватним диском, попередньо змоченим у 96% розчині етилового спирту. При цьому верхню частину посудини (горловину) прокалюють над полум'ям спиртівки або газового пальника.

Висадження посадкового матеріалу має відбуватися поблизу полум'я спиртівки чи газового пальника, при цьому посудину, в якій знаходиться експлант необхідно тримати під кутом до напрямку полум'я. Після

завершення посадки досліджуваного об'єкта, необхідно обпакувати полум'ям ватну пробку або ковпачок із фольги і швидко закрити посудину. Безпосереднє отримання експлантів із рослинного матеріалу, тобто розділення його на фрагменти, зручно проводити, використовуючи невисокі чашки Петрі, в яких поміщають стерильні серветки із фільтрувального паперу.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

### РОЗДІЛ 3.

## ВВЕДЕННЯ *ORTHOSIPHON STAMINEUS* У КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Культура *in vitro* — це метод, який застосовують для росту та розвитку рослинних клітин, тканин та органів на спеціальних живильних середовищах у контрольованих асептичних умовах. Цей метод дає можливість отримувати в лабораторних умовах рослини, які не ростуть в природних умовах у певному регіоні, підтримувати колекції зникаючих видів рослин, отримання цінних вторинних метаболітів, які в подальшому можна використовувати для різних потреб, зокрема у медицині та фармакологічній промисловості тощо.

На сьогодні існує три основні системи культури *in vitro*: органогенез (наприклад, ембріогенез, пряма та непряма регенерація пагонів), ризогенез та калюсогенез. Калюсна культура відносно двох інших володіє певними перевагами: генетичні маніпуляції з калюсом відбуваються значно легше, оскільки немає потреби в регенерації трансєнних рослин; соматоклональні варіації, які зазвичай спостерігаються у калюсній культурі можуть викликати зміни метаболічних шляхів і подекуди призводити до отримання нових метаболітів. У свою чергу соматоклональна варіація може бути результатом інтерференції ВНК, модифікації гістонів, ремодельовання хроматину, метилювання ДНК та спонтанної мутації. Ще однією перевагою є те, що культуру калюсу можна відносно легко збільшити в різних біореакторних системах. Окрім цього культивування калюсу вважається стійким і екологічно чистим процесом [51].

Отже при введенні *Orthosiphon Stamineus* у культуру *in vitro* важливо враховувати, яка форма є найбільш оптимальною: суспензійна культура, культура органів рослин чи коренева культура.

Так існують дані [40], що клітинні культури *Orthosiphon Stamineus* володіють генетичною варіабельністю, що ймовірно відбувається за рахунок мутацій або епігенетичних змін, викликаних фізіологічними умовами. У свою

чергу, це може спричинити уповільнення продуктивності культури. Однак генетично нестабільних клітин можна позбутися шляхом скринінгу та їх подальшим видаленням з клітинної популяції.

Кореневі культури *Orthosiphon Stamineus*, отримані шляхом агробактеріальної трансформації, на відміну від клітинних, відзначалися стабільністю геному та стрімким ростом навіть без використання фітогормонів та інших ростових регуляторів. Варто зазначити, що культура трансформованих коренів відзначалася у шість з половиною разів ефективнішим нарощуванням біомаси, ніж культура ізольованих коренів.

Окрім цього, ще однією перевагою зазначеної культури є інтенсивний синтез фенольних сполук, які, як відомо, в природі у значній кількості містяться в наземній частині *Orthosiphon Stamineus*. Це явище насамперед зумовлене трансформацією коренів клітин *Agrobacterium rhizogenes*, оскільки процес регулюється генами *rol A*, *rol B* та *rol C*, які згідно даних [41] здатні активізувати біологічний синтез вторинних метаболітів. Ключову роль у цьому процесі відіграє *rol C*.

Високою здатністю до накопичення біомаси та вторинних метаболітів володіють культури пагонів, одержані внаслідок прямого органогенезу. Окрім цього зазначені культури характеризуються високою генетичною стабільністю і вмістом органічних сполук, близьким до такого, який зустрічається в *Orthosiphon Stamineus*, вирощених у природних умовах [42].

Аналіз динаміки нагромадження біомаси *Orthosiphon Stamineus* у культурі *in vitro* демонструє, що культури пагонів володіють помітно вищою продуктивністю, у порівняння з кореневими та клітинними [50] (рис. 5).

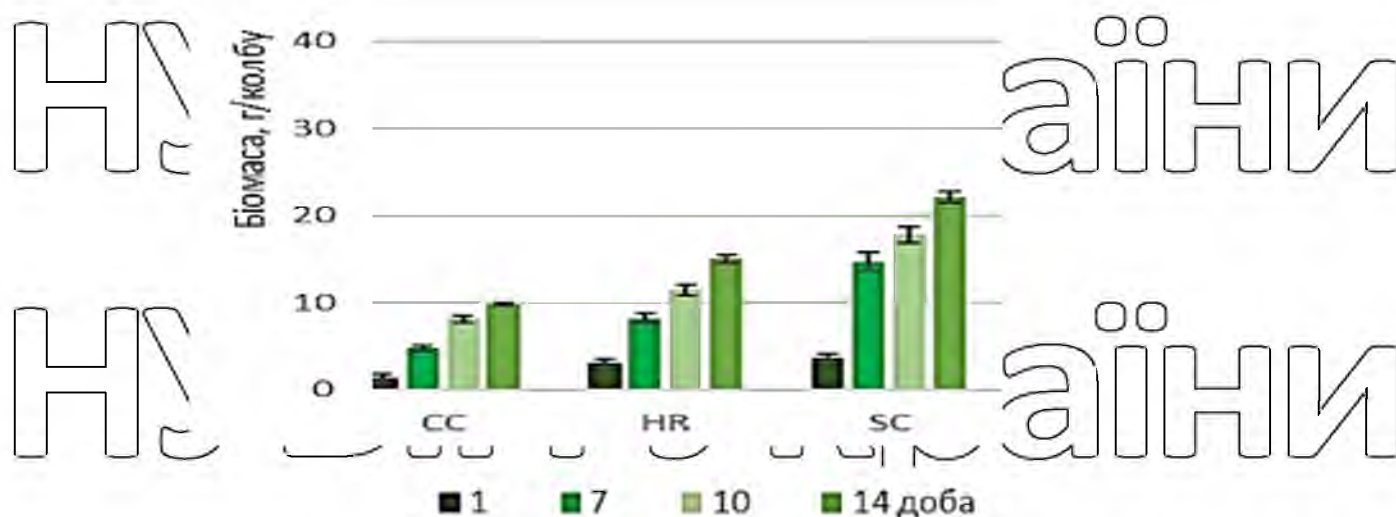


Рис. 5 [50], де CC – клітинні культури, HR кореневі культури, SC – пагонові культури)

У роботі [43] в якості експланту використовували частини листків *Orthosiphon Stamineus*. Експланти промивали фунгіцидним препаратом – бавістином протягом 20-ти хвилин з наступним промиванням стерильною бідистильованою водою. Надалі експланти обробляли під ламінар-боксом 0,01% хлоридом ртуті протягом п'яти хвилин з наступним триразовим промиванням стерильною бідистильованою водою, щоб переконатися, що не залишилося слідів стерилізуючого агенту. Щоб позбутися зайвої вологи, експланти поміщали на стерильні ватні диски, після чого скальпелем розрізали їх на невеликі шматочки, розміром однієї квадратного сантиметру.

Підготовлені стерильні експланти інокулювали на середовище Мурасіге-Скуга з 3% вмістом сахарози. В якості загущувача використовували 0,8% агар. Середовище Мурасіге-Скуга є одним із найпоширеніших живильних середовищ і є оптимальним для вирощування *Orthosiphon Stamineus* у культурі *in vitro*. Для приготування даного середовища першочергово готують концентровані маточні розчини мікро- та макросолей, регуляторів росту, вітамінів та інших речовин, які є обов'язковими компонентами. Підготовлені маточні розчини необхідно тримати в холодильнику в непрозорому (краще

темному) посуді за температури від двох до чотирьох градусів Цельсія протягом 4-6 тижнів.

Спочатку готують концентровані розчини макросолей, до яких входять такі солі, як  $KNO_3$ ,  $CaCl_2$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Концентрація даних сполук розраховується в міліграмах на літр і вказана у таблиці 7.

**Концентрація макросолей для приготування маточного розчину**

Хімічна сполука	Кількість мг/л
$KNO_3$	1900
$NH_4NO_3$	1650
$KH_2PO_4$	170
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
$CaCl_2$	440

Табл. 7<sup>[59]</sup>

Ще одним, не менш важливим, етапом є приготування маточних розчинів мікросолей, до яких входять солі  $H_3BO_3$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ . Ці речовини додаються у значно меншій концентрації ніж макросолі (див. табл. 8)

**Концентрація мікросолей для приготування маточного розчину**

Хімічна сполука	Кількість мг/л
$H_3BO_3$	6,2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025

Табл. 8<sup>[59]</sup>

Окрім мікро- та макросолей важливим компонентом середовища Мурасіге-Скуга є розчин ферум-хелату. Для його приготування відміряють 557 мг сполуки  $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 745 мг  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  і розчиняють в дистильованій воді. Вищевказані концентрації речовин розраховані на 100 мл розчину. Також необхідно приготувати розчини вітамінів. Їх готують у концентрації 1 мг/мл і зберігають у замороженому стані доти, доки вони не будуть додані до середовища.

Усі наважки необхідних компонентів живильного середовища зважують на аналітичних вагах. Макро- та мікросолі розчиняють у дистильованій воді.

Коли розчини усіх необхідних компонентів готові, переходять безпосередньо до приготування середовища, повний склад якого наведений у таблиці 9.

Склад середовища МС

Компонент	Кількість на 1 л середовища	Кількість на 0,5 л середовища
Макросолі	100 мл	50 мл
Мікросолі	1 мл	0,5 мл
Розчин Fe-хелату	5 мл	2,5 мл

Вітаміни	1 мл	0,5 мл
Міо-інозитол	100 мг	50 мг
Сахароза	30 г	15 мг

# НУБІП УКРАЇНИ

Табл. 9<sup>[59]</sup>

Безпосередньо до середовища додають органічні добавки та вуглеводи (найчастіше – сахарозу). Відомо, що для індукції колусогенезу та стимулювання росту багатьох клітинних ліній у живильне середовище потрібно додавати також регулятори росту. Ці речовини необхідно ретельно підбирати, зважаючи на особливості виду та морфологічної будови об'єкта дослідження, оскільки в залежності від хімічного складу та концентрації фітогормонів може спостерігати різні ефекти: ризогенез, калусоутворення, синтез метаболітів тощо [52].

Як правило, ауксини вносять на живильне середовище у кількості від 0,1 до 50 мкМ. Перед додаванням до середовища фітогормони цього класу розчиняють в етанолі, підігрівають та змішують з дистильованою водою.

Підвищення концентрації ауксинів сприяє поділу та диференціації клітин, а також індукує калусогенез. Найбільш широко ауксини використовують у вигляді 2,4-D, IAA, NAA. Варто зазначити, що внесення 2,4-D у живильне середовище досить часто проявляє інгібуючу дію на синтез вторинних метаболітів [44]. Однак у роботі [45] дійшли висновку, що додавання 2,4-D позитивно впливає на кількість розмаринової кислоти у рослин роду *Lamiaceae*, що робить логічним використання даного фітогормону як одного з компонентів живильного середовища для введення *in vitro Orthosiphon*

*Stamineus*.

Іншим класом речовин, який стимулюють ріст рослин є цитокиніни. Їх зазвичай вносять у живильне середовище у кількості від 0,1 до 10 мкМ.

# НУБІП УКРАЇНИ

Цитокиніни відповідають за поділ клітин, а їх співвідношення із ауксинами може індукувати або ж навпаки інгібувати калусогенез. У роботі [46], виявили, що додавання 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (BAP) та 2 мг/л 2,4-D сприяє накопиченню розмаринової кислоти у рослин родини глухокроповових. Отже BAP теж є сполукою, яку можна додавати до живильного середовища для мікроклонального розмноження *Orthosiphon stamineus*.

Згідно даних [43] ауксини, у вигляді нафтилоцтової (NAA) та індолілоцтової (IAA) кислот істотно гірше впливають на утворення калусної тканини, ніж 2,4-D. Відмічено, що додавання 2,4-D до живильного середовища у кількості 3-5 мг/л стрияло найбільш ефективному калусогенезу, ніж у зразках із додаванням такої кількості решти вищезгаданих ауксинів. Також високу індукцію калусу відмічено при додаванні 6-бензиламінопурину (BAP) у кількості 2,5 мг/л (див. табл. 1).

Table 1. Effect of auxins on callusing of leaf explants of *O. aristatus*

Concentration (mg/l)	Callusing % response of leaf explant			
	2,4-D	NAA	IAA	BAP
0.5	50	30	30	00
1.0	60	25	25	20
1.5	65	20	25	25
2.0	70	20	15	30
2.5	65	15	10	40
3.0	80	05	04	35
4.0	80	--	--	30
5.0	82	--	--	25

--No callus. data was collected after 3 weeks with number of explants callused/total number of explants inoculated x100

Табл. 1<sup>[43]</sup>

Table 2. Effect of BAP in combination with NAA and IAA on callusing of leaf explants of *O. aristatus*

Concentration mg/l	% response of leaf explants		
	BAP + 2,4-D	BAP+NAA	BAP+IAA
1+0.5	45	20	15
3+1.5	35	30	70
5+2.5	25	35	25

Data was collected after 3 weeks with number of explants callused/total number of explants x100

Також було виявлено, що інтенсивному калусогенезу сприяє внесення у живильне середовище ауксинів в поєднанні з цитокнінами. Так, згідно результатів, отриманих в роботі [43] комбінація 6-бензиламінопурину з індолілоцтовою кислотою (BAP+IAA) у кількості 3мг/л та 1,5 мг/л відповідно сприяла найбільш інтенсивному калусоутворенню порівняно з іншими досліджуваними зразками (див. Табл. 2).

У роботі [45] відмічають ініціювання калусогенезу на 8-10 день після інокуляції. Через два тижні після індукції калусу на середовищі доповненому 8 мг/л бензиламінопурином (BAP) та 2 мг/л індолілоцтової кислоти (IAA) зафіксовано утворення дванадцяти пагонів: у зразку, в якому до живильного середовища додавали таку ж кількість бензиламінопурину (BAP), але замість індолілоцтової (IAA) використовували 2 мг/л нафтилоцтову кислоту (NAA) спостерігали менш інтенсивний пагоногенез – 8 новоутворень. Через три тижні після індукції калусогенезу зразки мали досить добре розвинені пагони і були пересаджені на середовище Мурасіге-Скуга (МС) із різною концентрацією індолілмасляної кислоти (IBA). Найбільший відсоток укорінення відмічено у досліджуваних зразках, пересаджених на живильне середовище із 3,0 мг/л індолілмасляної кислоти (IBA).

В якості експланту можливе також використання пазушних бруньок. Дослідники [53] відмивали досліджуваний матеріал від забруднення мийним засобом, ополіскували його проточною, а після – дистильованою водою. Очищені бруньки занурювали на 30 хвилин у фунгіцидний та бактерицидний розчин, концентрація яких становила 0,25 г діючої речовини на 200 мл води. Подальше забезпечення асептичності культури відбувалось за рахунок занурення експланта на 4 години у розчин антибіотика рифампіцину у кількості 2,25 мг препарату на 100 мл води та триразового занурення досліджуваного об'єкта у розчин хлоридної кислоти у різних концентраціях. Відмивання бруньок від хімічних сполук відбувалось за рахунок дворазової

промивки стерильною бідистильованою водою. Після усіх вищевказаних маніпуляцій ексеплант висаджували на живильне середовище Мурасіге-Скуга із додаванням фітогормонів. Інкубація рослини відбувалася за температури 18-20°C та інтенсивністю освітлення флюорисцентної лампи 2000 лк з фотоперіодом у 16 годин. Відмічено, що найбільш інтенсивний калюсогенез спостерігався у зразку, до живильного середовища якого додавали 1,5 мг L-1 ВАР, де що перший результат отримано у пробі з додаванням 2,5 мг L-1 ВАР. Так індукція калюсогенезу становила 10% і 7,14% відповідно у порівнянні з контрольним зразком, який був висаджений на середовище без вмісту фітогормонів. Зазначають також, що на 14 день експерименту спостерігали найбільший розвиток пагонів із калюсної культури у зразках, які містили 2 мг L-1 ВАР – у зазначеній пробі відмічено 47 пагнових новоутворень; у зразку із вмістом 2,5 мг L-1 ВАР помічено 33 новоутворених пагони. В обох зразках пагони мали хорошу життєздатність, про що свідчить утворення багатьох листків зеленого кольору (рис.6).



Рис. 6<sup>[53]</sup>

Окрім непрямого органогенезу шляхом утворення калюсів, розмноження *Orthosiphon stamineus* також було досягнуто методом прямого органогенезу на середовищах Мурасіге-Скуга (МС), доповнених п'ятьма різними концентраціями бензиламінопурина ВАР (рис. 7, табл. 4).

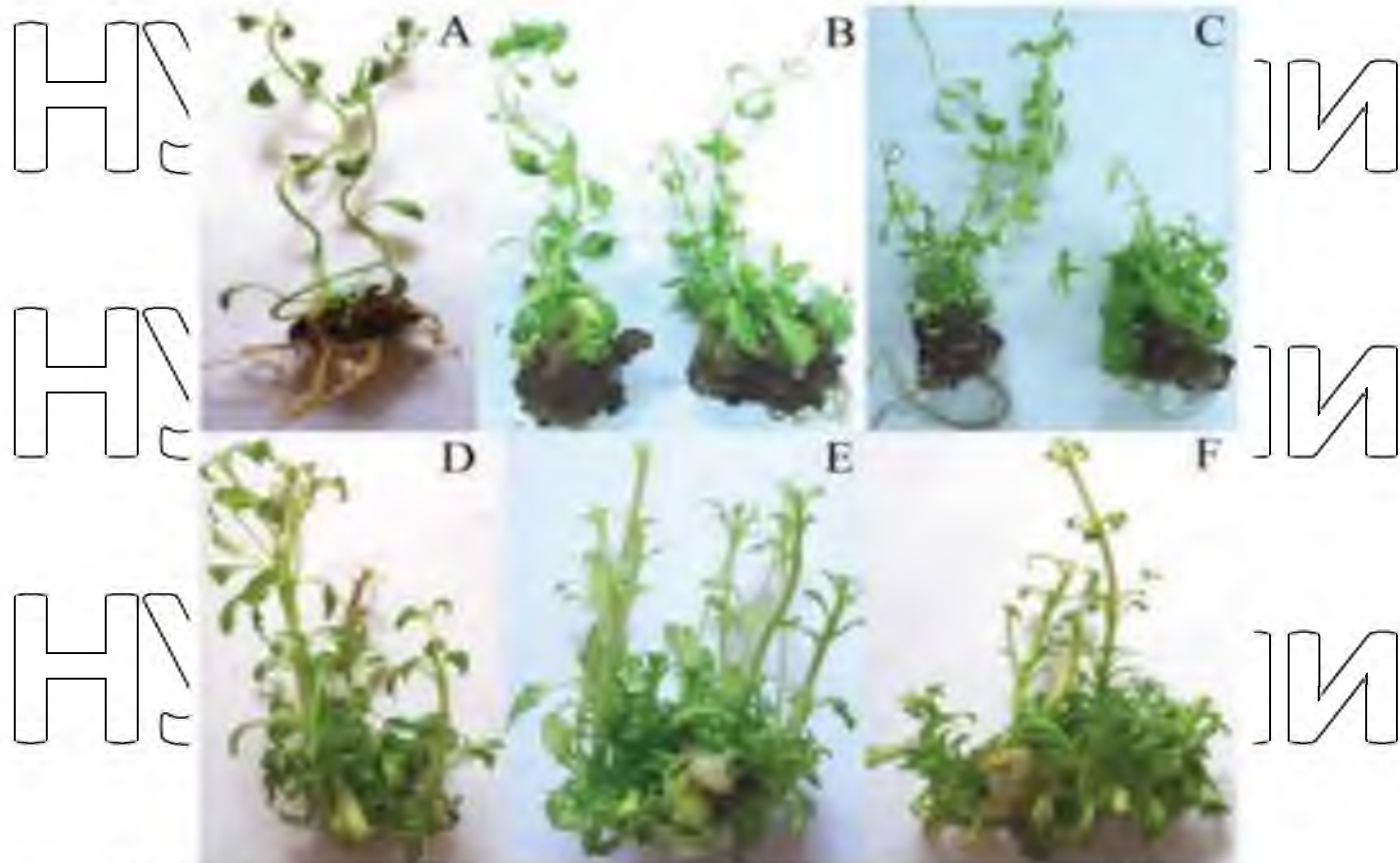


Рис. 7<sup>[53]</sup>

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Media	Number of shoots	Number of leaves	Plant's height
T0 = MS + 0 mg L <sup>-1</sup> BAP	1.64 ± 0.74 <sup>a</sup>	28.43 ± 9.35 <sup>a</sup>	7.34 ± 2.20 <sup>c</sup>
T1 = MS + 0.5 mg L <sup>-1</sup> BAP	4.00 ± 1.07 <sup>ab</sup>	42.60 ± 13.44 <sup>ab</sup>	4.43 ± 1.81 <sup>ab</sup>
T2 = MS + 1 mg L <sup>-1</sup> BAP	6.50 ± 1.93 <sup>bc</sup>	49.20 ± 13.79 <sup>b</sup>	3.89 ± 1.74 <sup>a</sup>
T3 = MS + 1.5 mg L <sup>-1</sup> BAP	6.14 ± 3.48 <sup>bc</sup>	41.19 ± 19.94 <sup>ab</sup>	5.81 ± 1.75 <sup>bc</sup>
T4 = MS + 2 mg L <sup>-1</sup> BAP	9.00 ± 4.42 <sup>cd</sup>	58.36 ± 18.92 <sup>b</sup>	6.27 ± 1.32 <sup>c</sup>
T5 = MS + 2.5 mg L <sup>-1</sup> BAP	10.33 ± 5.83 <sup>d</sup>	57.13 ± 24.35 <sup>b</sup>	6.03 ± 1.88 <sup>bc</sup>

Табл. 4<sup>[53]</sup>

Відмічено, що кількість новоутворених пагонів тим більша, чим вища концентрація BAP була додана у живильне середовище. Так найвище значення пагонів зафіксоване у зразку із вмістом 2,5 мг бензиламінопурину й становило 10,33±5,8 пагонів на експлант, відповідно найменшу кількість пагонів відмітили у пробі із додаванням 0,5 мг бензиламінопурину, де число новоутворень рівне 4±1,07. У свою чергу варто зазначити, що даний зразок у 2,5 рази перевищує контроль, де у живильне середовище не було додано жодної концентрації фітогормонів. Також помітно, що додавання до живильного середовища 2 мг L<sup>-1</sup> BAP має позитивний вплив на утворення листків. У цьому зразку відмічається 58,36 ± 18,92 листків на експлант, що, у свою чергу, незначно відрізняється від пробі із 2,5 мг L<sup>-1</sup> BAP у живильному середовищі, де кількість новоутворених листків становить 57,13±24,35. Найменша кількість листків спостерігається у зразку із додаванням 1,5 мг

бензиламінопурину до живильного середовища і становила  $41,19 \pm 19,94$ , що у свою чергу майже у півтора рази вище відносно контрольного зразка. Найвище середнє значення висоти рослини спостерігалось у зразках із найменшим вмістом бензиламінопурину, тобто при додаванні 0,5 мг та 1,0 мг мг L-1 BAP.

Також було вивчено можливість прямого органогенезу шляхом додавання до живильного середовища нафтилоцтової кислоти (NAA) що вображено у таблиці 5.

Media	Number of shoots	Number of leaves	Plant's height
T0 = MS + 0 mg L <sup>-1</sup> NAA	1.64 ± 0.74 <sup>a</sup>	28.43 ± 9.35 <sup>c</sup>	7.34 ± 2.20 <sup>ab</sup>
T1 = MS + 0.5 mg L <sup>-1</sup> NAA	1.92 ± 1.31 <sup>a</sup>	11.67 ± 5.50 <sup>ab</sup>	5.25 ± 1.60 <sup>a</sup>
T2 = MS + 1 mg L <sup>-1</sup> NAA	1.36 ± 0.50 <sup>a</sup>	9.55 ± 4.34 <sup>a</sup>	8.95 ± 2.23 <sup>b</sup>
T3 = MS + 1.5 mg L <sup>-1</sup> NAA	1.73 ± 0.65 <sup>a</sup>	17.27 ± 6.92 <sup>b</sup>	9.41 ± 3.69 <sup>b</sup>
T4 = MS + 2 mg L <sup>-1</sup> NAA	1.31 ± 0.60 <sup>a</sup>	11.38 ± 4.98 <sup>ab</sup>	8.06 ± 3.35 <sup>ab</sup>

Табл. 5<sup>[53]</sup>

Як і очікувалося, ауксин не сприяє розмноженню пагонів через утворення пазушних бруньок, а радше посилює апікальне домінування. Таким чином, середнє значення кількості пагонів у зразках, вирощених на цьому живильному середовищі було нижчим, ніж на середовищі, яке містило бензиламінопурину (BAP). На противагу цьому у зразках, до живильного середовища яких додавали нафтилоцтову кислоту у концентраціях 1 мг, 1,5 мг та 2 мг довжина рослин була помітно вищою, ніж у кожному із запропонованих зразків, вирощених на середовищі із додаванням бензиламінопурину (L-1 BAP).

Важливим показником якості калюсної культури є її колір та текстура, тому у роботі [54] особливу увагу приділяли дослідженню саме цих ознак. Відзначають, що на 7 день після введення *Orthosiphon stamineus* у культуру *in vitro* на середовище Мурасіге-Скуга додавання будь-якої із досліджуваних концентрацій 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) дало позитивний вплив на налісоутворення, повторне спостереження на 21 день від початку мікроклонального розмноження дало змогу дослідити візуальні показники якості калюсної культури. Відзначають, що при додаванні до живильного середовища 0,5 мг/л та 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) утворена калюсна маса мала білий колір із кремовим відтінком. За додавання до цього ж середовища 1,5 мг/л, 2 мг/л та 3 мг/л вищевказаного фітогормону спостерігали блідо-зелене забарвлення калюсної культури (див. табл. 6).

PGR (2,4 D)	Callus day seen	Color of Callus		Texture of callus
		21 Day's	28 Day's	
0,5ppm	7 Day	Cream white	Dirty white	Compact
1ppm	7 Day	Cream white	Dirty white	Compact
1,5ppm	7 Day	Pale green	Dirty white	Compact
2ppm	7 Day	Pale green	Dirty white	Compact
3ppm	7 Day	Pale green	Dirty white	Compact

Табл. 6<sup>[54]</sup>

Як помітно з таблиці, на 28 день експерименту у всіх досліджуваних зразках колір культури змінився на брудно-білий. Окрім кольору, як вже було зазначено вище, важливим індикатором при оцінці якості калюсної культури є її структура. Калюс може бути компактним (щільним) або ж крихким. У ході даного дослідження експериментатори отримали калюс компактною структури, що свідчить про значний вміст вторинних метаболітів у досліджуваних зразках, адже саме кількість вторинних метаболітів безпосередньо впливає на зовнішній вигляд культури *in vitro*.

Попри це існують дані [55] про мікроклональне розмноження *Orthosiphon stamineus*, де в ході дослідження спостерігали утворення крихкого калюсу. Як

зазначають дослідники, така розбіжність результатів, ймовірно, спричинена тим, що підбір компонентів живильного середовища, зокрема співвідношення регуляторів росту, не було ідентичним. Окрім цього на якість калюсу може впливати вік рослини, яка була відібрана в якості посадкового матеріалу, частина, яку було взято як експлант, її розмір тощо.

Важливість використання фітогормонів для мікроклонального розмноження *Orthosiphon Stamineus* підтверджують також у роботі [47], де в якості експлантів виступали тканини частин черешків, стебла та листків.

Виявили, що найбільш інтенсивно калюсоутворення відбувається з експлантів листків на середовищі Мурасіге-Скуга (МС) із додаванням 1,0 мг/л 2,4-D та 1,0 мг/л NAA. В подальшому дану калюсну культуру використовували для отримання суспензійної культури. Після 24-денної інокуляції маса суспензійної культури накопичувала 0,31 г сухої та 8,6 г сирової речовини. На 10-ту добу на поживному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) із вмістом 1,0 мг/л 2,4-D клітинні культури досягнули стаціонарної фази росту, в той час як на середовищі Мурасіге-Скуга (МС) із кількістю 1,0 мг/л нафтилоцтової (NAA) та 1,0 мг/л 2,4-D стаціонарної фази клітинні культури досягли на 8 днів пізніше (тобто на 18 день інокуляції). Відповідно, оптимальним поживним середовищем для отримання клітинних суспензійних культур *Orthosiphon Stamineus* є МС із вмістом 1,0 мг/л 2,4-D, а найбільш прийнятною тривалістю культивування, на думку дослідників, 14-денний період.

В іншій роботі [48] в якості експланту використовували насіння *Orthosiphon Stamineus*, яке спершу відмивали милом від часточок ґрунту та інших забруднень, далі протягом години промивали проточною водою, після цього закінчували етап промивки дистильованою водою. Далі під ламінар-боксом на 15 хвилин експланти поміщали в стерилізуючий розчин, де в якості стерилізуючої речовини виступав 0,2% водний розчин «Діоніду», до складу якого входять хлориди ртуті та цетилпіридинію. Від стерилізуючого розчину

рослинний матеріал тричі промивали стерильною водою. Результати показали, що 0,2% водний розчин «Діоциду» діє досить ефективно, оскільки ефективність стерилізації становила 97%, окрім цього близько 93% стерильного насіння були здатними до росту. В якості живильного середовища використовували середовище Гамборга (B5) [49], де джерелом вуглеводів виступала 3% сахароза. В якості регуляторів росту до середовища додавали цитокиніни у вигляді 6-бензиламінопурину (BAP) та зеатину, а також нафтилоцтову кислоту (NAA) у якості ауксинів.

Як свідчать результати, насіння почало проростати через 6-8 днів після посіву, а через 20 днів спостерігали добре зростаючі культури *in vitro*. Відмічають, що вже на 5 день після введення культури на живильне середовище з цитокинінами помічено розвиток пазушних бруньок, а на 10 день – інтенсивне галуження пагонів, за рахунок чого рослина суттєво розрослася

вширину. Результати експерименту показали, що обидва цитокиніни, як 6-бензиламінопурин (BAP) так і зеатин позитивно впливали на утворення додаткових бруньок та активацію пазушних меристем. Зазначають, що форма та характер росту бруньок залежали від концентрації вищевказаних фітогормонів. Найбільший позитивний ефект на розвиток аксиларних

меристем спостерігали при внесенні в живильне середовище 5 мкм 6-бензиламінопурину, середня кількість пазушних бруньок становила 9,5 одиниць (рис. 3). Другим по ефективності виявився зеатин у кількості 5 мкм, так число пазушних бруньок відповідало 8,2 одиницям. Також позитивний вплив на культуру спостерігався при додаванні 15 мкм 6-бензиламінопурину (BAP) у парі з нафтилоцтовою кислотою (NAA) у кількості 3 мкм (рис. 4).



Рис. 4 [46]

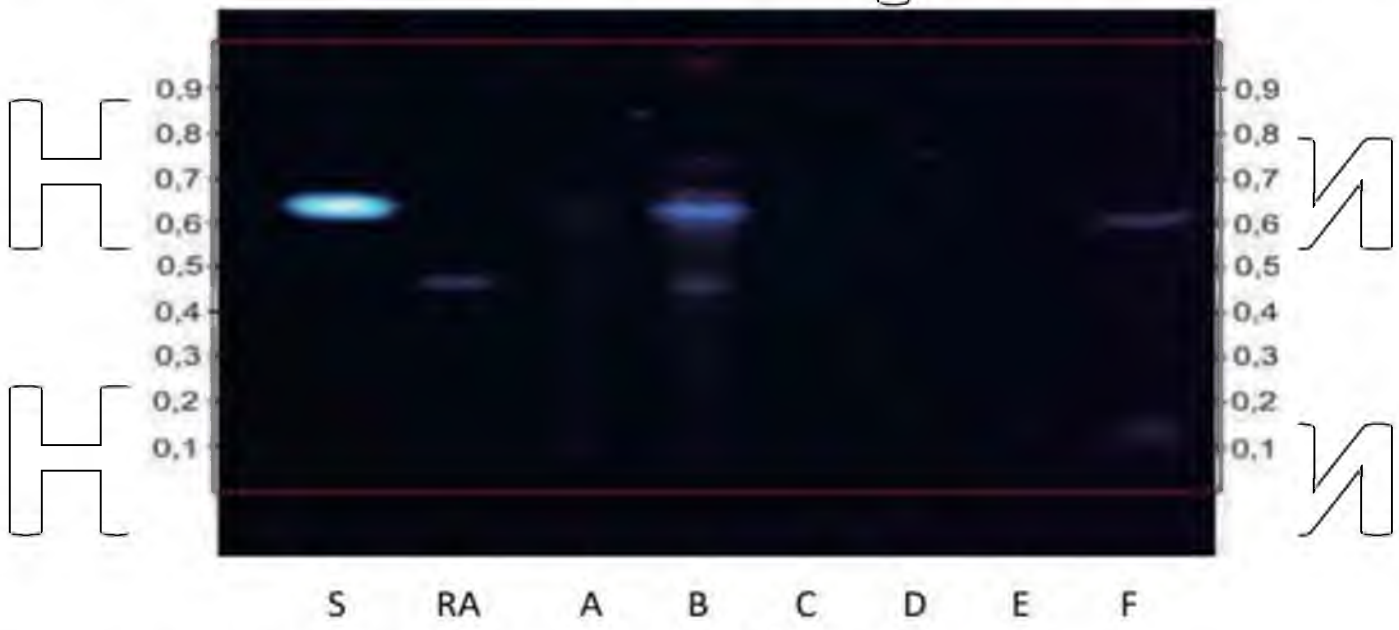
Оскільки існує два сорти *Orthosiphon stamineus*, в залежності від мети дослідження варто враховувати, який з них є більш оптимальним. Різниця між білим та фіолетовим сортами здебільшого лише в морфологічній структурі квітки. В обох сортів відмічають [56] індукцію калусогенезу після внесення експлантів на живильне середовище Мурасіге-Скуга із доданням від 0,4 до 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти. Вихід сухої калусної маси сорту *Orthosiphon stamineus* з білим забарвленням чашечки на 20% вищий, ніж у фіолетового сорту (див. табл. 11). Усі інші показники якості калусу не мають помітних розходжень.

Growth regulator	Time formed callus (days) n = 5 ± SD	Texture (14 days)	Color (14 days)	Callus response(%) N=5 ± SD	Dry weight (g) N=5 ± SD
<b>Purple variety</b>					
MS + 2,4-D 0.4 mg/L	9 ± 0,00	Friable	White-yellow	100 ± 0.00	2.00 ± 0,06 <sup>(a)</sup>
MS + 2,4-D 1.0 mg/L	9 ± 0,00	Semi friable	White-brown	100 ± 0.00	0,92 ± 0,12 <sup>(b)</sup>
MS + 2,4-D 2 mg/L	12 ± 0.0	Semi friable	White-brown	100 ± 0.00	1,32 ± 0,03 <sup>(c)</sup>
<b>White-purple variety</b>					
MS + 2,4-D 0.4 mg/L	6 ± 0,00	Friable	White-yellow	100 ± 0.00	2.40 ± 0,01 <sup>(d)</sup>
MS + 2,4-D 1.0 mg/L	10 ± 0,47	Semi friable	White-brown	100 ± 0.00	1,56 ± 0,15 <sup>(e)</sup>
MS + 2,4-D 2.0 mg/L	12 ± 0,94	Semi friable	White-brown	100 ± 0.00	1,61 ± 0,03 <sup>(e)</sup>

Note: The mean value with superscript letters shows a significant difference (p < 0.05)

Табл. 11 [56]

Однак метод тонкошарової хроматографії показав, що сорти *Orthosiphon*  
*Stamineus* відрізняються між собою вмістом вторинних метаболітів, що чітко  
 видно на *рис. 8*



*Рис. 8* [56],

Де, S – сіненсетин (контрольний зразок), RA – розмаринова кислота  
 (контрольний зразок), A – ацетоновий екстракт *Orthosiphon Stamineus* білого  
 сорту (*O.S.БС*), B – ацетоновий екстракт *Orthosiphon Stamineus* фіолетового  
 сорту (*O.S.ФС*), C – етил-ацетатний екстракт *O.S.БС*, D – етил-ацетатний  
 екстракт *O.S.ФС*, E – етанольний екстракт *O.S.БС*, F – етанольний екстракт  
*O.S.ФС*

Так, виходячи з діаграми, досить чітко помітно, що зразки B та F, в яких  
 містилися ацетоновий та етанольний екстракти *Orthosiphon Stamineus*  
 фіолетового сорту мають значно вищу концентрацію сіненсетину, ніж в  
 зразках досліджуваної рослини із білим забарвленням чашечки. Теж саме  
 стосується і вмісту розмаринової кислоти.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ВИСНОВКИ

НУБІП УКРАЇНИ

Отже, проаналізувавши результати численних досліджень, можна констатувати, що *Orthosiphon Stamineus* дійсно володіє лікувальними властивостями і може використовуватися в якості лікарського засобу або біологічно активної добавки. Це пов'язано насамперед з наявністю в даній рослині високого вмісту вторинних метаболітів, зокрема флавоноїдів, фенольних сполук та терпенів. Рослина виступає перспективним джерелом для виділення розмаринової та кавової кислот.

НУБІП УКРАЇНИ

При введенні *Orthosiphon Stamineus* у культуру *in vitro* особливу увагу необхідно приділити формі культури: для істотного нарощування біомаси рослини, найбільш доречним є використання культури пагонів, зокрема листків, якщо необхідно отримати значну кількість вторинних метаболітів, зокрема розмаринової кислоти, в такому разі варто використовувати культуру трансформованих коренів. Окрім цього доведено, що вміст розмаринової

НУБІП УКРАЇНИ

кислоти та сінсепіну вищий у сорту *Orthosiphon Stamineus* з фіолетовим забарвленням квітки.

НУБІП УКРАЇНИ

При введенні *Orthosiphon Stamineus* у культуру *in vitro* для інтенсивного калюсогенезу як експлант доцільно використовувати частини листків, черешків, бруньок та тканин стебла; в якості регуляторів росту, до живильного середовища доцільно додавати ауксини у вигляді 2,4-D. Інтенсивний калюсогенез також спостерігається при додаванні до живильного середовища цитокініну 6-бензиламінопурину (BAP) у поєднанні з нафтилофтовою кислотою (NAA) у співвідношенні 2:1.

НУБІП УКРАЇНИ

Встановлено, що для отримання рослин з інтенсивно розгалуженими пагонами можна використовувати метод прямого органогенезу. При цьому до живильного середовища необхідно додавати 6-бензиламінопурин (BAP) у кількості від 1 до 5 мкМ; в якості базового середовища доцільно використовувати середовище MS або Гамборга.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

Варто зазначити, що вибір експлантів, підбір оптимальної концентрації фітогормонів та інших компонентів, необхідних для додавання в живильне середовище в більшості відбувається шляхом візуального спостереження за реакцією експлантатів на основі численних проб і помилок. Адже теоретично прораховані дані не завжди збігаються із результатами реальних експериментів. Тому ефективність введення *Orthosiphon stamineus* у культуру *in vitro* на запропонованих вище середовищах потребує практичного підтвердження.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Vinothiya, K., Ashokkumar, N. Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats.

*Biomed Pharm.* 2017, Vol.87, P. 640–652.

2. Song, Y., Wu, T., Yang, Q., Chen, X., Wang, M., Wang, Y., Peng, X., Ou, S. Ferulic acid alleviates the symptoms of diabetes in obese rats. *J. Funct. Foods.*

2014, Vol. 9, P.141–147.

3. Mushtaq, N.; Schmatz, R.; Ahmed, M.; Pereira, L.B.; da Costa, P.; Reichert, K.P.; Dalenogare, D.; Pelinson, L.P.; Vieira, J.M.; Stefanello, N.; et al. Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Physiol. Biochem.* 2015, Vol. 71, P.743–

751.

4. li, H.; Musa, I.F.; Abu Bakar, N.A.; Karsani, S.A.; Yaacob, J.S. *In Vitro* Regeneration and ISSR-Based Genetic Fidelity Analysis of *Orthosiphon Stamineus* Benth. *Agronomy* 2019, Vol. 9, P. 778.

5. Hunaefi D, Smetanska I. The effect of lactic acid fermentation on rosmarinic acid and antioxidant properties of *in vitro* shoot culture of *Orthosiphon aristatus* as a model study. *Food Biotechnology* 2013, Vol. 27, P.152–177.

6. Ali, H.; Musa, I.F.; Abu Bakar, N.A.; Karsani, S.A.; Yaacob, J.S. *In Vitro* Regeneration and ISSR-Based Genetic Fidelity Analysis of *Orthosiphon Stamineus* Benth. *Agronomy* 2019, Vol. 9, P. 778.

7. Sheena, E. V., and Jothi, G. Y. *In Vitro* Propagation of *Orthosiphon stamineus* Benth (*Lamiaceae*) an Important Medicinal Plant using nodal and leaf explants. *The Pharma Innovation Journal.* 2015, Vol. 4 (7), P.06-10.

8. Awale S., Tezuka Y., Banskota A.H., Shimoji S., Taira K., Kadota S. Norstaminane and isopimarane-type diterpenes of *O. stamineus* from Okinawa.

*Tetrahedron* 2002, Vol. 58, P.5503–5512.

9. Farhan M., Razak S.A., Pin K.Y., Chuah A.L. Antioxidant activity and phenolic content of different parts of *Orthosiphon stamineus* grown under different light intensities. *J Trop Forest Sci.* 2012, Vol.24, P.173-7.

10. Hollman P.C., Katan M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol.* 1999, Vol.37, P.937-942.

11. Olah N.K., Radu L., Mogosan C., Hanganu D., Gocan S. Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth. (*Lamiaceae*) hydroalcoholic extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 2003, Vol.33, P.117-123.

12. Loon Y.H., Wong J.W., Yap S.P., Yuen K.H. Determination of flavonoids from *Orthosiphon stamineus* in plasma using a simple HPLC method with ultraviolet detection. *J Chromatogr.* 2005, Vol. 816, P.161-166.

13. Masuda T., Masuda K., Nakatani N. Orthosiphon A, a highly oxygenated diterpene from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Tetrahedron Lett.* 1992, Vol.33, P.945-946.

14. Dharmaraj S., Hossain M.A., Zhari S., Harn G.L., Ismail Z. The use of principal component analysis and self-organizing map to monitor inhibition of calcium oxalate crystal growth by *Orthosiphon stamineus* extract. *Chemomet Intell Lab Syst.* 2006, Vol.81, P. 21-28.

15. Arafat O.M., Tham S.Y., Sadikun A., Zhari I., Haughton P.J., Asmawi M.Z. Studies on diuretic and hypouricemic effects of *Orthosiphon stamineus* methanol extracts in rats. *J Ethnopharmacol.* 2008, Vol. 118, P.354-360.

16. Khatib A., Yuliana N.D., Jinap S., Sarker M.Z.I., Jaswir I., Wilson E.G., Chung SK, Verpoorte R. Identification of possible compounds possessing adenosine A1 receptor binding activity in the leaves of *Orthosiphon stamineus* using TLC and multivariate data analysis. *J Liquid Chromatogr Relat Technol.* 2009, Vol. 32, P.2906-2916.

17. Adam Y., Somchit M.N., Sulaiman M.R., Nasaruddin A.A., Zuraini A., Bustaman A.A., Zakaria Z.A. Diuretic properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. *J Ethnopharmacol.* 2009, Vol.124, P.154-158.

18. Yam M.F., Asmawi M.Z., Basir R. An investigation of the antiinflammatory and analgesic effects of *Orthosiphon stamineus* leaf extract. *J Med Food*. 2008, Vol.11, P.362–368.

19. Awale S., Tezuka Y., Kobayashi Y., Ueda J.Y., Kadota S. Neoorthosiphonone A; a nitric oxide (NO) inhibitory diterpene with new carbon skeleton from *Orthosiphon stamineus*. *Tetrahedron Lett*. 2004, Vol.35, P.1359–1362.

20. Akowuah G.A., Zhari I., Norhayati I., Sadikun A., Khamsah S.M. Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chem*. 2004, Vol.87, P.559–566.

21. Mohamed E.A., Lim C.P., Ebrika O.S., Asmawi M.Z., Sadikun A., Yam M.F. Toxicity evaluation of a standardised 50% ethanol extract of *Orthosiphon stamineus*. *J Ethnopharmacol*. 2011, Vol.133, P. 358–363.

22. Takeda Y., Matsumoto T., Terao H., Shingu T., Futatsuishi Y., Nohara T., Kajimoto T. Orthosiphonol D and E, minor diterpenes from *Orthosiphon stamineus*. *Phytochemistry*. 1993, Vol.33, P.411–415.

23. Stampoulis P., Tezuka Y., Banskota A.H., Tran K.Q., Saiki I., Kadota S. Staminol A, a novel diterpene from *Orthosiphon stamineus*. *Tetrahedron Lett* 1999, Vol.40, P.4239–4242.

24. Sahib H.B., Ismail Z., Orhman N.H. *Orthosiphon stamineus* Benth. methanolic extract enhances the anti-proliferative effects of tamoxifen on human hormone dependent breast cancer. *Int J Pharmacol* 2009, Vol. 5, P.273–276.

25. Abdelwahab S.I., Mohan S., Elhassan M.M., Al-Mekhlafi N., Mariod A.A., Abdul A.B., Abdulla M.A., Alkharfy K.M. Antiapoptotic and antioxidant properties of *Orthosiphon stamineus* Benth (cat's whiskers): intervention in the Bcl-2-mediated apoptotic pathway. *Alternat Med*. 2011.

26. Vogelgesang B., Abdul-Malak N., Reymermier C., Altobelli C., Saget J. On the effects of a plant extract of *Orthosiphon stamineus* on sebum-related skin imperfections. *Int. J. Cosmetic Sci*, 2011, Vol. 33, P.44–52.

27. Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J Food Compos Anal*. 2006. Vol.19. P.531–537.

28. Son J.Y., Park S.Y., Kim J.Y., Won K.C., Kim Y.D., Choi Y.J., Zheng M.S., Son J.K., Kim Y.W. *Orthosiphon stamineus* reduces appetite and visceral fat in rats. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2011. Vol. 54. P.200–205.

29. Luo, Y.; Liu, Y.; Wen, Q.; Feng, Y.; Tan, T. Comprehensive chemical and metabolic profiling of anti-hyperglycemic active fraction from *Clerodendranthi Spicati* Herba. *J. Sep. Sci*. 2021. Vol.44. P.1824–1832.

30. Seyedan, A.; Alshawsh, M.A.; Alshagga, M.A.; Mohamed, Z. Antiobesity and Lipid Lowering Effects of *Orthosiphon stamineus* in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Planta Med*. 2017, Vol.83, P.684–692.

31. Deetae, P.; Parichanon, P.; Trakunleewatthana, R.; Chanseetis, C.; Lertsiri, S. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. *Food Chem*. 2012, Vol.133, P.953–959.

32. Kothari, V.; Galdo, J.A.; Mathews, S.T. Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity. *J. Inflamm. Res* 2016, Vol. 9, P. 27–38.

33. Shori, A.B. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. *J. Integr. Med* 2015, Vol.13, P. 297–305.

34. Batubara, I.; Komariah, K.; Sandrawati, A.; Nurcholis, W. Genotype selection for phytochemical content and pharmacological activities in ethanol extracts of fifteen types of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. leaves using chemometric analysis. *Sci. Rep* 2020, Vol. 10.

35. Sharma, B.; Xie, L.; Yang, F.; Wang, W.; Zhou, Q.; Xiang, M.; Zhou, S.; Lv, W.; Jia, Y.; Pokhrel, L.; et al. Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *Eur. J. Med. Chem*. 2020, P. 199.

36. Ismail, H.F.; Hashim, Z.; Soon, W.T.; Rahman, N.S.A.; Zainudin, A.N.; Majid, F.A.A. Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. *J. Tradit. Complement. Med.* 2017, Vol.7, P.452–465.

37. Muhammad, H.; Gomes-Carneiro, M.R.; Poça, K.S.; De-Oliveira, A.C.A.X.; Afzan, A.; Sulaiman, S.A.; Ismail, Z.; Paumgarten, F.J.R. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 2011, Vol.133, P.647–653.

38. Н. В. Прозоркіна, П. А. Рубашкіна. Основи мікробіології, вірусології та імунології, 2002.

39. В.В. Маннур. Підбір стерилізатора, введення в культуру та розмноження рослинного матеріалу виду *Anantus altissima* (Mill.). *Науковий вісник НЛТУ України*. 2017.

40. Klyachenko O.L., Sitnik I. Selection resistant callus lines rape (*Brassica napus* L.) to stressful factors. *Biotechnology, agriculture and the food industry. Nova Science Publishers*, 2005 P. 169-172

41. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpenchenko T.Y., Vereshchagina Y.V. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes* derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013, Vol.134, P.1-22.

42. Smetanska I. Development on the methods in food biotechnology concerned the recovery of the valuable plant metabolites. *XXXVII Annual ESNA Meeting*. 2007.

43. P. Dorothy, M. S. Sudarshana, Nissar Reshi, H. V. Girish. In vitro Cytological Studies of Leaf Callus Cultures of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. *British Biotechnology Journal*. 2016. Vol.13. P.1-6

44. Sircar D., Mitra A. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota*: confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. *J Plant Physiol* 2013. Vol 166. P.1370-1380.

45. Hunaefi D., Ravichandran K., Saw N.M., Cai Z.h., Riedel H., Smetanska I. The effect of different solvents and fermentation on anthocyanin content in red cabbage. *The Impact of Metabolomics on the Life Sciences. Weihenstephan*, 2010, Vol.133. P.2727-2775.

46. Gan R.Y., Kuang L., Xu X.R., Zhang Y.A., Xia E.Q., Song F.L., Li H.B. Screening of natural antioxidants from traditional chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecules*. 2010. Vol.15 (9), P. 5988-5997.

47. Lee W.L., Chan L. Establishment of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for cell growth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2004. Vol.78. P.101-106.

48. Nana Zarnadze, Inga Diasamidze, Natela Varshanidze, Tsiala Bolkvadze. In vitro reproduction of Kidney Tea (*Orthosiphon stamineus* Bents). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018.V.6.

49. Gamborg, G. L., Miller, R. A., and Ojima, K. "Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells." *Exp. Cell Res.* 1968. Vol.50, P.151.

50. Сметанська І. М. Фізіолого-біохімічні основи біотехнології отримання фенольних сполук в культурі *in vitro* рослин. *Національний університет біоресурсів і природокористування України*. 2021.

51. Omid Norouzi, Mohsen Hesami, Marco Pepe, Animesh Dutta & Andrew Maxwell P. Jones. *In vitro* plant tissue culture as the fifth generation of bioenergy. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12.

52. Слободян В.О. Основи біотехнології: Навчальний посібник. 2002. – с. 188.

53. Nesti Fromika Sianipar, Ika Mariska. Micropropagation of *Orthosiphon stamineus* through indirect and direct organogenesis. *Jurnal Teknologi*. Vol.82.

54. Wahyu Widayat, Muhammad Satyo Pradana, Mirhansyah Ardana. Effect of Media Types on the Growth of Callus Culture in Kumis Kueing *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq J. *Trop. Pharm. Chem.* 2020. Vol 5 p. 2087-2099.

55. Kamaludin Rashid, Arash Nezhada, Roihan Mohsin, Shamrul Azhar, Shahril Efzueni. *In Vitro* Propagation of Medicinal Plant *Orthosiphon Stamineus* (Misai Kucing) through axillary branching and callus culture. *Life Science Journal*. 2012. Vol. 9.

56. Fahrauk Faramayuda, Totik Sri Mariani, Elfahmi, Sukrasno. Short Communication: Callus induction in purple and white-purple varieties of *Orthosiphon aristatus* (Blume). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2020. Vol. 21. P. 4967-4972.

57. Hsu, C.L., et al., Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Orthosiphon aristatus* and its bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58(4). P. 2150-2156.

58. Arafat O. Studies on diuretic and hypouricemic effects of *Orthosiphon stamineus* methanol extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008. Vol. 118(3). P. 354-360.

59. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин: навчально-методичний посібник. Одеський національний університет імені І. І. Мечникова. 2015. с. 84.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України