

УДК 582.998:57.086.83+581.143.6:633.8:615.3

Р. Т. Конечна<sup>1</sup>, Р. О. Петріна<sup>1</sup>, В. П. Новіков<sup>1</sup>, Ю. Т. Конечний<sup>2</sup>,  
Р. Г. Шикун<sup>2</sup>, О. П. Корнійчук<sup>2</sup><sup>1</sup> Національний університет «Львівська політехніка»<sup>2</sup> Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

## ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСТРАКТІВ КАЛУСНОЇ МАСИ *CARLINA ACAULIS L.*

Наведені результати введення в культуру *in vitro* *Carlina acaulis L.* Досліджено вплив фітогормонів на ростові процеси рослинних клітин, визначені та підібрані оптимальні умови для культивування *Carlina acaulis L.* Одержано екстракт біомаси та проведено його дослідження на вміст біологічно активних речовин та антимікробну активність.

**Ключові слова:** відкасник без стебловий; *Carlina acaulis L.*; калусогенез; фітогормони; калус; експлант; екстракт

### ВСТУП

Лікарська рослинна сировина та лікарські засоби на її основі чинять м'яку, ефективну дію на організм, мають низьку токсичність та все частіше застосовуються у медичній практиці. Лікарські рослини є джерелом отримання більше третини всіх фармакологічних препаратів. Розширення арсеналу фітопрепаратів, підвищення вимог до якості препаратів на основі рослинної сировини потребують і нових підходів до аналізу, стандартизації та всебічного дослідження лікарських рослин. На особливу увагу при розробці нових фітопрепаратів заслуговують лікарські рослини вітчизняної флори, зокрема лікарські рослини, притаманні західному регіону України. Наукову і практичну цінність мають ендемічні види рослин, які є частиною безцінного генофонду природної флори. У даному аспекті перспективним є дослідження відкасника безстеблового *Carlina acaulis L.*

Відкасник безстебловий *Carlina acaulis L.* (рід *Carlina L.*, родина *Asteraceae*) – гірський вид європейського типу ареалу. В Україні він поширений у Карпатах від лісового до альпійського поясу – на луках, галювинах, узліссях. Є продуцентом унікального комплексу біологічно активних сполук, зокрема корінь *Carlina acaulis L.* містить дубильні і смолисті речовини, інулін (18-22%), пігменти, ефірну олію (1,5-2,1%) та цукри. Листя містить флавоноїди: 7-глікозид апігеніну, орієнтин, гомоорієнтин, вітексин, ізошафтозид [6]. Препарати *Carlina acaulis L.* у медицині використовують при загальній загальмованості функцій кори головного мозку, дисфункції вищої нерво-

вої діяльності, пов'язаної з вагітністю [6, 9]. Ці препарати не токсичні, не викликають побічних дій та за впливом на нервову систему аналогічні дії вітаміну В<sub>2</sub>. У народній медицині *Carlina acaulis L.* використовують при запаленні сечостатевого органу, ниркових набряках, як протиглистний засіб. Зовнішньо – при лишаях, для загоювання ран та у ветеринарній практиці [6, 9]. Проте антимікробні властивості *Carlina acaulis L.* є маловивченими, тому дослідження в даному напрямку є перспективним та актуальним для фармацевтичної та медичної науки. Також *Carlina acaulis L.* застосовують як оригінальну декоративну рослину, що може бути окрасою кам'янистих садів, гірок, розаріїв [9].

Вплив антропогенних факторів, необмежений збір лікарської сировини *Carlina acaulis L.* призводять до значного скорочення його ареалу та природних запасів. Тому альтернативним джерелом є вирощування лікарських рослин методом культури клітин і тканин. Цей метод має деякі переваги порівняно зі збором лікарської сировини в природі і вирощуванням рослин на полях [1, 2, 9]. Технологія *in vitro* дозволяє регулювати ріст рослинних клітин і накопичення ними біологічно активних речовин, оптимізуючи поживне середовище.

Введення *Carlina acaulis L.* в культуру *in vitro* відкриває перспективу цілорічного отримання рослинного матеріалу в якості можливого джерела біологічно активних сполук. У науковій літературі відомостей про введення в культуру *in vitro* представників роду *Carlina* недостатньо [1]. Тому використання методу культури клітин, тканин та органів для одержання біомаси *Carlina acaulis L.* – джерела біологічно активних сполук є надзвичайно актуальним

Таблиця 1

## СКЛАД ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ОСНОВІ МУРАСИГЕ І СКУГА

Фітогормони, мг/л	Варіанти поживного середовища				
	I	II	III	IV	V
2,4-Д	–	1,0	1,0	–	–
ІОК	–	3,0	2,0	3,0	3,0
НОК	0,1	–	0,5	0,5	0,1
БАП	0,5	0,5	–	–	–
кінетин	–	–	0,5	0,5	0,5

та перспективним для медичної та фармацевтичної промисловості.

Актуальним та перспективним напрямком для одержання біологічно активних сполук на теперішній час є використання біомаси лікарської рослинної сировини. В Україні в багатьох науково-дослідних лабораторіях проводяться дослідження з введення рослин у культуру, зокрема і лікарських [1, 10, 12]. Щодо лікарської рослини *Carlina acaulis L.*, то на теперішній час є небагато публікацій по введенню рослини в культуру *in vitro* [1, 4, 8, 15].

Метою роботи було одержання біомаси *Carlina acaulis L.*, одержання екстрактів з біомаси та їх дослідження.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

У роботі використано насіння *Carlina acaulis L.*, зібране з природних місць зростання (полонини гори Клива Тарничкова, Богородчанський район, Івано-Франківська область) у липні-серпні 2013 р.

Поверхневу стерилізацію проведено 70 % етиловим спиртом (2-3 хв) і 10 % гіпохлоритом Na з наступним трикратним промиванням у стерильній дистильованій воді. Стерилізацію насіння проводили в стерильних хімічних склянках, накритих чашками Петрі.

Насіння пророщували на агаризованому поживному середовищі Мурасиге-Скуга (МС). Для культивування експлантів (6-8 тижневі рослини) використано середовище МС, доповнене різними регуляторами росту: бензиламінопурином (БАП) (0,5; 1,0; 3,0 мг/л), 2,4-дихлорофеноксіоцтовою кислотою (2,4-Д) (1 мг/л), індолілоцтовою кислотою (ІОК) (2,0; 3,0 мг/л),  $\alpha$ -нафтил-1-оцтовою кислотою (НОК) (0,1; 0,5; 1,0 мг/л) та кінетином (0,5 мг/л). Джерелом вуглецю була глюкоза (30 г/л). Тривалість пасажу складала 14 діб [2, 3, 4, 10, 11].

Експланти культивували в таких умовах: фотоперіод – 16/8 год (світло/темрява), освітлення – 2000 лк, температура – 23 °С ( $\pm$  2-3 °С), відносна вологість – 60-70 %.

Усі експерименти проводили в 2-3 кратній повторюваності. Результати досліджень опрацьовували статистично.

Біомасу клітин визначали ваговим методом. Одержану калусну масу спочатку знімали, потім висушували на листах при температурі  $58 \pm 2$  °С. Час висушування біомаси залежить: від початкової волого-

сті біомаси; товщини шару біомаси; температури сушіння. Суха маса повинна бути пухкою, легко розсіпатись при продавлюванні між пальцями і мати забарвлення від жовтого до коричневого кольору. Залишкова вологість біомаси після висушування – не більше 12 %. Сушу біомасу використовували для одержання екстрактів.

Для цього суху біомасу подрібнювали та екстрагували методом вичерпної екстракції в апараті Сокслета. Як екстрагент використали 20 % (екстракт № 1) та 70 % (екстракт № 2) етиловий спирт. Одержані екстракти фільтрували та провели якісний аналіз біологічно активних сполук (дубильних речовин, сапонінів, флавоноїдів, полісахаридів, кумаринів, антраценпохідних) [7, 5].

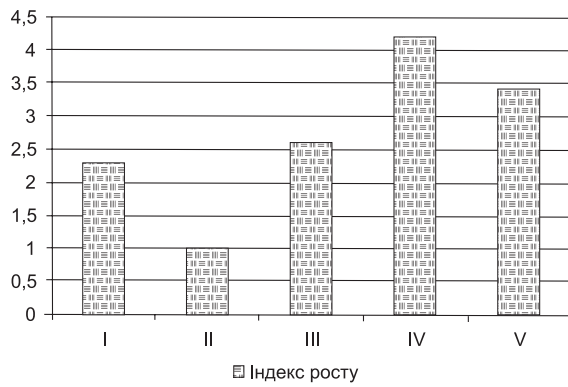
Дослідження антимікробної активності одержаних екстрактів проводили методом дифузії в агар та методом серійних розведень із застосуванням стандартних поживних середовищ (МПБ, МПА, Сабуро). Оцінку антимікробної активності екстрактів проводили із врахуванням бактерицидної дії етилового спирту.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

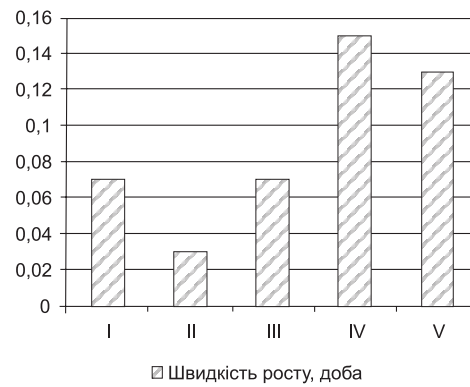
Важливим при отриманні експлантів в умовах *in vitro* є вибір стерилізуючого агента та часу експозиції. Вказаний режим поверхневої стерилізації є ефективним, так як вихід неінфікованих експлантів в середньому складав 80 %, з них 77 % були життєздатними. Протягом 14 діб утворилися невеличкі рослини 1,0-1,5 см.

Сегменти асептично вирощених проростків слугували експлантами для ініціації калусогенезу, а саме корінці, меристематичні верхівки і гіпокотиль. Культивування проводили на середовищі Мурасиге-Скуга з додаванням фітогормонів. Велике значення мають концентрація і співвідношення фітогормонів у середовищі. Використані різні варіанти поживного середовища Мурасиге і Скуга, які відрізнялися вмістом фітогормонів (табл. 1). Культивування проводилось протягом 35 діб.

Під час культивування в залежності від варіанту поживного середовища спостерігалися значні відмінності в інтенсивності ростових процесів (рис. 1). Встановлено, що найоптимальнішим серед протестованих середовищ є варіант IV, на якому спостеріга-



**Рис. 1.** Індекс росту калусної біомаси *Carlina acaulis* L. на різних варіантах поживного середовища на 35 добу культивування.



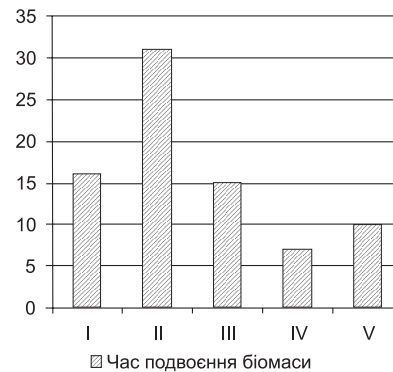
**Рис. 2.** Питома швидкість росту калусної біомаси *Carlina acaulis* L. на різних варіантах поживного середовища на 35 добу культивування.

лись найвищі значення питомої швидкості росту (рис. 2) і відповідно найменший час подвоєння біомаси калусів (рис. 3). Найнижчі значення індексу росту та питомої швидкості росту характерні для калусної культури *Carlina acaulis* L., що культивувалась на варіанті II поживного середовища.

Одержану через 35 днів культивування пористу масу, відносно тверду, з бугристою поверхнею; шматочки розміром 0,5-1,5 см невизначеної форми було висушено і використано для подальших досліджень.

Суху біомасу подрібнювали та використовували для одержання екстрактів методом вичерпної екстракції в апараті Сокслета. Як екстрагент використали 20 % (екстракт № 1) та 70 % (екстракт № 2) етиловий спирт. Одержані екстракти фільтрували та провели якісний аналіз таких біологічно активних сполук: дубильних речовин, сапонінів, флавоноїдів, полісахаридів, кумаринів, антраценпохідних [7, 5, 11]. Результати наведені в табл. 2.

Для дослідження антимікробної активності одержаних екстрактів використовували тест-культури таких стандартних штамів мікроорганізмів: *Candida al-*



**Рис. 3.** Час подвоєння біомаси *Carlina acaulis* L. на різних варіантах поживного середовища на 35 добу культивування.

*bicans* (ATCC 668653), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 (F-49)), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 (F-51)), *Staphylococcus epidermidis* (191), *Proteus vulgaris* (152), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus licheniformis* (ВКПМ-7038) та по 1 клінічному штаму мікроорганізмів: *Candida albicans* (виділений зі спинки язика,

Таблиця 2

**ЯКІСНИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЕКСТРАКТУ КАЛУСНОЇ МАСИ *CARLINA ACAULIS* L.**

Біологічно активні речовини	Якісні реакції	Екстракт калусної маси	
		екстракт № 1	екстракт № 2
Дубильні речовини	<ul style="list-style-type: none"> <li>реакції з залізоамонієвими галунами</li> <li>реакція з бромною водою</li> </ul>	+	+
Вуглеводи	<ul style="list-style-type: none"> <li>змочування порошку розчином амонію гідроксиду</li> <li>реакція Моліша</li> </ul>	+	+
Флавоноїди	<ul style="list-style-type: none"> <li>реакція з плюмбум ацетатом і борно-лимоннокислим реактивом</li> <li>ціаніди – нова реакція</li> </ul>	+	+
Сапоніни	<ul style="list-style-type: none"> <li>реакція з хлороформом та концентрованою сульфатною кислотою</li> <li>реакція з розчином ваніліну та концентрованою сульфатною кислотою</li> </ul>	-	-
Кумарини	<ul style="list-style-type: none"> <li>лактонна проба</li> </ul>	-	-
Антраценпохідні	<ul style="list-style-type: none"> <li>реакція мікропереганяння</li> <li>Реакція з 10 % спиртовим розчином натрію гідроксиду</li> </ul>	-	-

резистентний до азолів), *Staphylococcus aureus* (виділений з гною при фурункульозі, поліантибіотикорезистентний), *Escherichia coli* (кишкового походження, поліантибіотикорезистентний). При цьому використовували метод дифузії в агар (методом «колодязів») із застосуванням стандартних поживних середовищ (середовище Сабуро). Антимікробну активність досліджуваного зразка визначали за зоною затримки росту навколо «колодязя» (діаметр «колодязя» – 6 мм). Оцінку антимікробної активності екстрактів проводили із врахуванням бактерицидної дії етилового спирту [7].

В результаті проведених досліджень нами виявлено антимікробну дію екстракту № 1 по відношенню до стандартних штамів мікроорганізмів *B. Licheniformis* (11 мм), *S. Aureus* (9 мм), *P. Aeruginosa* (9 мм) та клінічного штаму *E. Coli* (10 мм). Антимікробної дії екстракту № 2 по відношенню до вказаних штамів мікроорганізмів не було виявлено.

### ВИСНОВКИ

Отже, у культуру *in vitro* введено *Carlina acaulis* L. Підібрано схему стерилізації насіння з найбільшим виходом асептичних експлантів – 65 %. Вибрано середовище МС для проростання насіння, оскільки на ньому спостерігається найбільша життєздатність (50 %) і швидке проростання насіння – 14 діб. Первинні калуси отримано з корінців, меристематичних верхівок та гіпокотилу насінневих проростків. У результаті проведених експериментів встановлено склад поживного середовища та інші умови, які дозволяють отримати максимальний приріст біомаси. Приріст калусу залежав від концентрації фітогормонів, умов освітлення та від походження експланта. Провели дослідження якісного складу екстрактів калусної маси *Carlina acaulis* L. та виявили дубильні речовини, флавоноїди та вуглеводи.

Одержані дані експериментальних досліджень показали, що досліджувані екстракти калусної маси *Carlina acaulis* L. мають антимікробну активність по відношенню до стандартних та клінічних штамів ряду мікроорганізмів, що дає можливість продовжувати дослідження в даному напрямку.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Біологічні особливості росту і розвитку видів роду *CARLINA* L. EX SITU / [О. О. Єфремова, М. І. Скибіцька, І. Г. Мелешко та ін.] // Лісництво і агролісомеліорація. – Х.: Укр НДІГА, 2009. – Вип. 115. – С. 245-249.
2. Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. В. И. Негрука; с предисл. Р. Г. Бутенко. – М., 1987.
3. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М., 1962.
4. Введення в культуру *in vitro* відкасника безстеблевого / [Р. О. Петріна, Р. Т. Конечна, О. Р. Побігушка та ін.] // Вісник Нац. ун-ту «Львівська політехніка». Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2013. – № 761. – С. 169-172.
5. Георгиевский В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Я. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.
6. Гродзінський А. М. Енциклопедичний довідник / А. М. Гродзінський. – К.: Голов. ред. УРЕ, 1990. – 544 с.
7. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – I-е вид. – Х.: РІПЕГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – 520 с.
8. Конечна Р. Т. Пошук альтернативних антимікробних засобів природного походження / [Р. Т. Конечна, В. П. Новіков, Ю. Т. Конечний та ін.] // Матер. міжнар. наук.-практ. конф.: [Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика]. м. Одеса, 6-7 лютого 2015 р. – Одеса, 2015. – С. 158-160.
9. Нестерук Ю. Рослинний світ українських Карпат: Чорногора. Екологічні мандрівки. – Львів: БАК, 2003. – 520 с.
10. Петріна Р. О., Маснюк Я. Т. Калусогенез у культурі *in vitro* арніки гірської // Вісник Нац. ун-ту «Львівська політехніка». Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2008. – № 609. – С. 151-155.
11. Солодовніченко Н. М., Журавльов М. С., Ковальов В. М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати. – Х.: МТК-книга, 2003.
12. Тусик О., Дробик Н. Введення в культуру *in vitro* арніки гірської // Вісник Київськ. Нац. ун-ту ім. Т. Шевченка. Серія: Біологія, інтродукція та збереження рослинного різномайття. – 2011. – С. 66-70.
13. Kumlehn J., Schieder O., Lorz H. In vitro development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture // Plant Cell Reports. – 1997. – Vol. 16, № 10. – P. 663-667.
14. Murashige T. // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1974. – Vol. 25. – P. 147-148.
15. Trejgell A., Bendarek M., Tretyn A. Micropropagation of *Carlina acaulis* L. // Acta Biol. Cracoviensia. – 2009. – Vol. 51, № 1. – P. 97-103.

**УДК 582.998:57.086.83+581.143.6:633.8:615.3**

**Р. Т. Конечна, Р. О. Петрина, В. П. Новиков, Ю. Т. Конечный, Р. Г. Шыкула, О. П. Корнийчук**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТОВ КАЛЛУСНОЙ МАССЫ *CARLINA ACAULIS L.***

Приведены результаты введения в культуру *in vitro* *Carlina acaulis L.* Исследовано влияние фитогормонов на ростовые процессы растительных клеток, определены и подобраны оптимальные условия для культивирования *Carlina acaulis L.* Получен экстракт биомассы и проведено его исследование.

**Ключевые слова:** колючник бесстебельный; *Carlina acaulis L.*; каллусогенез; фитогормоны; каллус; эксплант; экстракт

**UDC 582.998:57.086.83+581.143.6:633.8:615.3**

**R. T. Konechna, R. O. Petrina, V. P. Novikov, Y. T. Konechnyi, R. G. Shykula, O. P. Kornijchuk**

**RESEARCH OF CALLUS MASS EXTRACTS *CARLINA ACAULIS L.***

The results of introduction to the culture *in vitro* *Carlina acaulis L.* are provided. The influence of phytohormones on growth processes of plant cells is researched, the optimal conditions for cultivation of *Carlina acaulis L.* are defined and chosen. Biomass extract is obtained and is researched on the presence in it the biologically active substances and antimicrobial activity.

**Key words:** *Carlina acaulis L.*; callusogenesis; phytohormones; callus; explant; extract

Адреса для листування:

Тел. (067) 342-37-46. E-mail: rkonechna@ukr.net.

Національний університет «Львівська політехніка»

Надійшла до редакції

16.06.2015 р.