

АСПЕКТИ БІОТЕХНОЛОГІЇ У ВИКОРИСТАННІ *PULSATILLA ALBA* ЯК ПОТЕНЦІЙНОГО ДЖЕРЕЛА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

Конечна Р. Т.

Вступ

Сьогодні укріплюється тенденція до використання натуральних інгредієнтів рослинного походження у фармацевтичній промисловості. Значна кількість лікарських засобів світового фармацевтичного ринку містить у своєму складі натуральні рослинні інгредієнти¹. Саме тому пошук нових джерел біологічно активних сполук є актуальним питанням сучасної фармації.

Лікарські рослини, представники родини *Ranunculaceae*, містять ряд біологічно активних сполук, а їх лікарська рослинна сировина може бути використана як сировинне джерело для їх отримання. Родина *Ranunculaceae* включає близько 2500 видів рослин, здебільшого трав'янистих. На території України зростає біля 150 видів цієї родини. Значна частина цінних лікарських рослин вказаної родини зростають у високогірних районах, знаходиться під загрозою зникнення, окремі види занесені до Червоної книги України та й інших країн, їхні природні запаси вичерпуються через ряд чинників, зокрема антропогенний вплив та втрачають здатність до природнього відновлення².

Вирішити проблеми сировинних ресурсів цінних рідкісних лікарських рослин можливо, застосувавши біотехнологічні методи. Біотехнологія використовує клітини, живі організми та біологічні процеси з метою одержання високоефективної продукції з заданими властивостями. Тому актуальним на даний час є одержання біомаси лікарських рослин в асептичних умовах *in vitro* на штучних живильних середовищах та використання її як сировинного джерела біологічно

¹ Дослідження вітчизняного ринку лікарських засобів рослинного походження / В. М. Мінарченко, А. Ю. Бутко // Фармацевтичний журнал. – 2017. – № 1. – С. 30–36.

² Рослинний світ Українських Карпат: Чорногора / Ю. Нестерук // Екологічні мандрівки. – Львів : БАК, 2003. – 520 с.

активних сполук. Даний біотехнологічний напрям є перспективним аспектом фармакогностичних досліджень³.

Яскравим представником родини *Ranunculaceae* є рослина роду *Pulsatilla* – *Pulsatilla alba*, що тривалий час використовувалася в народній медицині України та й різних європейських країн⁴. Це рідкісний вид, що знаходиться під загрозою зникнення, проте має широкий спектр лікувальних властивостей.

Метою роботи було провести аналіз літературних даних щодо ботанічного опису, ареалу поширення, вмісту біологічно активних сполук, використання в фармації *Pulsatilla alba* та здійснити дослідження щодо можливостей отримання методом культури клітин і тканин в умовах *in vitro* альтернативного джерела сировини для фармації – калусної біомаси, дослідити вміст біологічно активних сполук та фармакологічної дії.

Таким чином, представники родини *Ranunculaceae* становлять потенційний інтерес для дослідження та отримання фармацевтичних інгредієнтів. Використання методу *in vitro* забезпечить можливість одержання альтернативної сировини, як джерела біологічно активних сполук у промислових масштабах в Україні не ставлячи під загрозу зникнення видів з природних місць зростання.

1. *Pulsatilla alba*. Аналітичний огляд поширення, хімічного складу, біологічної активності та медичного застосування

Pulsatilla alba, Сон білий (рис. 1) багаторічна трав'яниста рослина родини *Ranunculaceae*. Синонімічні назви: сон-трава біла, праліска альпійська, перелета, дрімота, сон альпійський, сон Шерфеля, сон-зілля, сонник, вітроцвіт та інші.

Pulsatilla alba росте на луках і скелястих місцевостях субальпійського та альпійського поясів на висотах 1650–1960 м над рівнем моря. Рослина росте в умовах помірного зволоження (мезофіт), на схилах, на слабо задернованих ділянках, кам'янистих відслоненнях та осипищах в асоціаціях з *Cystopteridetum fragilis*, *Salicetum herbaceae*, *Salicetum retuso-reticulatae*, *Festucetum pictae*, *Primulo (minimae)*-

³ Гриців С., Хропот О., Конечна Р., Петріна Р. Культивування рослин родини *Ranunculaceae* // Біотехнологія XXI століття : матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) (Київ, 21 квітня 2017 р.). – 2017. – С. 24.

⁴ Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Прогнозування біологічної активності та drug-like сполук родини *Ranunculaceae* як пошук нових ефективних діючих речовин. Вчені записки ТНУ імені В. І. Вернадського. Серія: Технічні науки. Том 29 (68). Ч. 2. № 6, 2018. С. 70–76.

Caricetum curvulae, *Caricetum sempervirentis* та ін.^{5,6}. Популяції *Pulsatilla alba* невеликі за розмірами (до 100 м²). Чисельність складає 1–5 рослин на 1 м². *Pulsatilla alba* в природних місцях зростання зображено на рис. 1⁷.



Рис. 1. *Pulsatilla alba*

Ареал поширення простягається від Північної Іспанії до Сербії та Карпат, високогір'я Європейських гір (Альп, частково Балкан, Південні та Східні Карпати). На сьогодні відомі місцезростання в Українських Карпатах: вершини Чорногори, Свидівця, Горган, Мармароського масиву, Буковинських Карпат. Поширення рослини представлено на рис. 2⁸.

Pulsatilla alba занесено до Червоної книги України, як високогірний рідкісний вид. Рослина неофіційна.

Скорочення чисельності зумовлено обмеженістю відповідних субстратів, вузькою еколого-ценотичною амплітудою та господарською діяльністю людини⁹. Значний вплив на скорочення чисельності має пошкодження трав'янистого покриву гір через антропогенний вплив, зокрема надмірні відвідування Карпат протягом останнього

⁵ Червона книга України. URL: <https://redbookua.org/item/pulsatilla-scherfelii/>

⁶ Кияк В. Г. Малі популяції рідкісних видів рослин високогір'я Українських Карпат. Львів : Ліга-Прес, 2013. С. 73.

⁷ PULSATILLA ALPINA subsp. ALBA Zamelis et Paegle – koniklec alpinsky biły/poniklec biely. Gabriela Leugnerová. 5.7.2007. URL: <https://botany.cz/cs/pulsatilla-austriaca/> (дата звернення: 20.02.2021).

⁸ Wikimedia Commons. File: Pulsatilla_alba_(Kastelberg).jpg. Florian Grossir. 6 May 2011. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pulsatilla_alba_\(Kastelberg\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pulsatilla_alba_(Kastelberg).jpg) (дата звернення: 20.02.2021).

⁹ Кияк В., Штупун В., Білонога В. (2016). Кліматогенні загрози популяціям рідкісних і ендемічних видів рослин високогір'я Українських Карпат. Вісник Львівського університету. Серія біологічна, (74), 104–115.

десятиліття, що призвело до порушення структури привершинних популяцій як *Pulsatilla alba*, так і інших видів рослин¹⁰.



Рис. 2. Поширення *Pulsatilla alba* в Україні

Pulsatilla alba – гемікриптофіт (на час несприятливих умов: посуха, низька температура, бруньки відновлення перебувають на рівні ґрунту). Рослина розвиває потужний стрижневий корінь і численні відгалуження каудекса, від якого розходяться столоноподібні підземні пагони. Генеративні пагони повзучі, сягають до 25 см.

Листки з'являються наприкінці цвітіння, на довгих черешках і з глибоко 2-розділними загостреними частками, прикореневі листки довгочерешкові з тричі трійчасто-складними пластинками. Характерною ознакою є квітки з дзвоникоподібною оцвітинею, білі, мають жовту серединку, пелюстки довжиною 2–2,5 см. Листки, пагони, пелюстки з зовнішнього боку є густо опушені. Плід багатогорішок¹¹.

Розмножуються переважно насінням, проте можливим є але не рідким є і вегетативне розмноження за допомогою стolonів.

Pulsatilla alba цвіте переважно в квітні-травні. Найкраще розвивається в місцях з легким затіненням, хоча добре росте і на відкритих місцях. Дослідження хімічного складу рослин роду *Pulsatilla*

¹⁰ Poznyuch, I. S., Savitska, A. G. (2010). Особливості флори судинних і мохоподібних рослин ландшафтного заказника “Грофа” (Українські Карпати, масив Горгани). *Biosystems Diversity*, 18(2), 69–75.

¹¹ Krvavych A., Reviakina N., Zhurakhivska L., Hubytska I., Konechna R. (2021). *Pulsatilla alba*: analytical review of spread, chemical composition, biological activity and medical application. *ScienceRise: Biological Science*, 4 (29), 10–14.

присвячені в більшій мірі наступним видам: *Pulsatilla nigricans*, *Pulsatilla ambigua*, *Pulsatilla chinensis*, *Pulsatilla dahurica*, *Pulsatilla koreana*, *Pulsatilla turczaninowii*^{12, 13}.

Pulsatilla alba є рідкісним видом і дослідження, що представлені в літературі більше спрямовані на збереження виду, культивування, одержанню синтетичних аналогів біологічно активних речовин, що містяться в рослині, а також біотехнологічним методам отримання біомаси з *Pulsatilla alba* та її комплексному дослідженню.

Pulsatilla alba містить комплекс біологічно активних сполук, що робить її фармакологічно цінною сировиною. Слід відмітити у складі рослини також значну кількість танінів, фітонцидів, сапонінів (гедерагенін, патензин), органічних кислот та флавоноїдів^{14, 15}. Рослина багата на глікозид ранункулін, який може розщеплюватись на глюкозу і протоанемонін, який у свою чергу при сушінні лікарської рослинної сировини розкладається на анемонін (анемонова камфора), а потім на неактивну анемонову кислоту¹⁶. Глікозид протоанемонін володіє антимікробними та фунгіцидними властивостями, має антимуtagenну, седативну дію, активізує макрофаги в організмі¹⁷. У складі листків даної рослини виявлено органічні кислоти, сліди алкалоїдів, вітаміни, зокрема аскорбінову кислоту, камфору, смолисті та дубильні речовини, близько 20 різних макро- і мікроелементів та глікозид ранункулін. Насіння містить жирні олії. Трава містить ефірні олії, γ -лактони (ранункулін, протоанемонін), тритерпеноїди (ацетат рамірину), стерини (ситостерин), хелідонову кислоту, сапоніни, кумарини.

Як лікарську сировину використовують коріння та листки.

¹² Weryszko-Chmielewska E., Sulborska A., Żuraw B., Chyżewska R., & Sawidis T. (2017). Ecological aspects of the floral structure and flowering in *Pulsatilla* species. *Acta Agrobotanica*, 70 (3).

¹³ Jia R., Song X., Guo Y., Yin Z., Liu F., Xiong J. et. al. (2017). Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of modified pulsatilla granules. *Journal of Integrative Agriculture*, 16 (3), 671–678. DOI: [http://doi.org/10.1016/s2095-3119\(16\)61401-6](http://doi.org/10.1016/s2095-3119(16)61401-6)

¹⁴ Strzałkowska-Abramek M., Jachula J., Dmitruk M., & Pogroszewska E. (2016). Flowering phenology and pollen production of three early spring *Pulsatilla* species. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 15 (6), 333–346.

¹⁵ Ye W., Ji N. N., Zhao S., Che C. T. A new cytotoxic saponin from *Pulsatilla patens* var. *multifida*. *Pharm Biol.* 2001; 39 (1) 7–10.

¹⁶ Müller M. B., Bertrams J., Stintzing F. C. (2020). Stability of protoanemonin in plant extracts from *Helleborus niger* L. and *Pulsatilla vulgaris* Mill. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 188. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113370>

Pulsatilla alba застосовується в народній медицині внутрішньо як протипухлинний, снодійний, протимікробний, протигрибковий засіб¹⁸. Відвари трави або коріння використовують при лікуванні невралгії, мігрені, безсоння, катаракти, глаукоми, запалення внутрішнього вуха. Спиртова настоянка застосовується при екземі, грибкових ураженнях шкіри, лікуванні бронхіту, астми, подагри, ревматизму^{19, 20}.

Окремі дослідження вказують, що спиртові екстракти трави *Pulsatilla alba* проявляють протизапальну активність на карагеніновій моделі запального набряку лапи білого щура. Найкращу антиексудативну активність проявляє 70 % водно-етанольний екстракт трави *Pulsatilla alba*.

В косметології рослину використовують для виготовлення масок при запаленнях шкіри і акне як заспокійливий засіб, що знімає почервоніння.

Настоянки *Pulsatilla alba* використовують також у ветеринарії як фунгіцидний, протизастудний та бактерицидний засіб²¹.

У країнах Сходу відваром *Pulsatilla alba* лікують дизентерію, набряки ниркового і серцевого походження, туберкульоз легень, зубний біль, венеричні хвороби. Вважають, що відвар даної рослини полегшує пологи.

Проте дана рослина має ряд протипоказань, які потрібно враховувати при її використанні. Важливо пам'ятати, що *Pulsatilla alba* – отруйна рослина. Безконтрольне застосування та самолікування можуть призвести до передозування та гострого отруєння. Навіть вдихання парів свіжої трави може бути небезпечним для здоров'я.

При вживанні внутрішньо слід дотримуватися обережності, так як свіжа рослинна сировина може викликати запалення слизової оболонки кишечника чи нирок. При гломерулонефриті протипоказано вживання внутрішньо відварів та настоянок *Pulsatilla alba*.

Проведено ряд досліджень на визначення гострої токсичності етанольних екстрактів трави *Pulsatilla alba* на білих щурах. Результати

¹⁸ Shafaghat A. Antimicrobial activity and volatile constituents of the essential oil of *Pulsatilla albana* from Iran. *Nat Prod Commun.* 2010; 5 (8) 1299–1300.

¹⁹ Liu Q., Chen W., Jiao Y., Hou J., Wu Q., Liu Y., & Qi X. (2014). *Pulsatilla saponin A*, an active molecule from *Pulsatilla chinensis*, induces cancer cell death and inhibits tumor growth in mouse xenograft models. *Journal of surgical research*, 188 (2), 387–395.

²⁰ Goyal S., Chawla R., & Kumar S. RECENT ADVANCES AND SPORADIC PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL REVIEW ON POTENTIAL HERBS OF THE GENUS “PULSATILLA”.

²¹ Kolb Y., Konechna R., Hropot O. S., Novikov V. P. Possibility of using *Pulsatilla alba* in cosmetology and pharmacy // Scientific and technical progress and optimization of technological processes of drug use: materials 6 Scientific and practical conferences with international participation (November 10–11, 2016. Ternopil), 2016. С. 284.

свідчать про відсутність будь яких токсичних проявів при внутрішньошлунковому введенні в дозах 5000, 10 000 та 15 000 мг/кг, що дозволяє віднести екстракти *Pulsatilla alba* до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини) та створює можливість застосування даної рослини в медицині.

Проаналізовані дані свідчать про цінність *Pulsatilla alba* для фармації та доцільність подальших комплексних її досліджень.

2. Введення в культуру *in vitro* *Pulsatilla alba*

Актуальним для детального вивчення і подальшого впровадження в практику деяких перспективних видів лікарських рослин родини *Ranunculaceae* є використання біотехнологічних підходів, зокрема методу культури тканин та клітин в умовах *in vitro*. Враховуючи особливі умови місцезростання та природоохоронний статус цих рослин доцільно застосувати метод, який сучасна фармацевтична наука використовує як альтернативний спосіб одержання біологічно активних речовин, – вирощування культури клітин і тканин в умовах *in vitro*. Використання даного методу дозволяє цілорічно, незалежно від пори року та кліматичних умов, отримати сировинний матеріал в якості джерела біологічно активних сполук²². Перевагою даного методу є можливість стандартизувати та оптимізувати умови вирощування, накопичення біологічно активних речовин в лабораторних умовах, регулювання росту рослинних клітин та підвищити продуктивність клітинних ліній. Слід зазначити, що біомаса культивованих клітин є джерелом сировини з контрольованою, належною якістю, що збагачена необхідними біологічно активними речовинами^{23, 24}.

Метою наступного етапу дослідження було ввести в культуру *in vitro* *Pulsatilla alba*; підібрати оптимальні умови отримання асептичних проростків, як джерела вихідних експлантів для культури тканин і органів; дослідити особливості морфогенезу *Pulsatilla alba* в культурі ізольованих меристем *in vitro* та підібрати ефективні регулятори росту; одержати калюсну біомасу; визначити подальші

²² Kolb Y. I., Hrytsiv S. V., Hropot O. S., Konechna R. T., Petrina R. O., Novikov V. P. Promising results of callus biomass *Pulsatilla alba* in pharmacy. Medicines are people. Modern problems of pharmacotherapy and adherence to drugs. – Vol. 2. – Kharkiv, NUPh. 2017. – P. 165–166.

²³ Колб Ю. І., Гавриш Ю. І., Гамада В. Р., Кривач А. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П. Вплив регуляторів росту на морфогенез *Pulsatilla alba* в умовах *in vitro*. Матеріали XV Міжнародної науковопрактичної конференції Київ, 25–29 червня 2019 року. С. 59–61.

²⁴ Kolb Y., Hrytsiv S., Serivko B., Konechna R., Petrina R. The ratio of biomass of rare *Ranunculaceae* for the use of biotechnological method. Youth and the progress of biology. Collection of abstracts. Lviv, 2017. WITH. 103–104.

перспективи використання калусної маси як альтернативного джерела активних речовин.

З метою введення в культуру *in vitro* використали насіння *Pulsatilla alba*, яке заготовляли з природних місць зростання у липні-серпні 2019–2020 років. Здійснювали передпосівну обробку за допомогою холодової стратифікації протягом 60–90 діб.

Асептичний матеріал для біотехнологічних досліджень отримували завдяки стратифікації та стерилізації насіння за різних умов та визначали оптимальні, які дозволяють одержати максимальну кількість асептичних експлантів для індукції калусогенезу.

Стратифікацію проводили використовуючи: розчин гіберелової кислоти у різних концентраціях (1,0 г/л; 0,1 г/л; 0,01 г/л; 0,001 г/л), протягом однієї доби. Стерилізацію здійснювали 98 % розчином етанолу протягом 5 хв з подальшою обробкою 15 %, 20 % і 30 % розчинами H_2O_2 протягом 10 чи 20 хв. Далі тричі промивали дистильованою водою та висаджували у стерильні чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасиге – Скуга по 10–12 насінин у кожную чашку. Насіння пророщено за умов: освітлення – 1000–2000 лк, вологість – 80 %, фотоперіод – 16 год, температура – 22–24 °С, а також у термостатичних умовах при цій же температурі, але за відсутності освітлення.

За результатами дослідження встановлено наступні оптимальні умови (рис. 3):

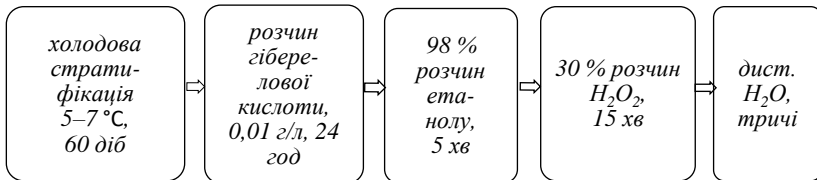


Рис. 3. Оптимальні умови стратифікації та стерилізації насіння *Pulsatilla alba*

Проростання насіння спостерігалось протягом 3–4 тижнів, на живильному середовищі Мурасиге Скуга при температурі 24–26 °С і освітленні 2000 лк. Ефективність стерилізації при використанні зазначених умов становила 99,3 %.

Аналізуючи результати дослідження слід зауважити, що насіння *Pulsatilla alba* проростає краще в умовах освітлення, а його схожість підвищує холодова стратифікація протягом 2 місяців та передпосівна обробка розчином гіберелової кислоти.

Одержані стерильні рослини використали як експланти для культивування. Гіпокотиль, корінець та апікальні меристеми використовували окремо, висаджували на середовище Мурасиге Скуга з додаванням регуляторів росту в різних комбінаціях і концентраціях. Регуляторами росту служили: кінетин (К), 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д), 6-бензинамінопурин (БАП) та нафтилоцтова кислота (НОК) в різних концентраціях. Глюкоза була джерелом вуглецю (водний розчин з концентрацією 30 г/л).

Культивування проводили за умов: фотоперіод 16/8 год, освітлення 2000 лк, температура 25±2 °С, відносна вологість 60–70 %, тривалість – 3 діб. Частоту калусогенезу визначали через 21 день культивування, як співвідношення кількості експлантів з калюсом до загальної кількості. Культури інкубували у темряві при 24 °С (±2–3 °С). Їхнє субкультивування проводили через кожні 3 тижні. Одержані результати опрацьовували статистично.

За результатами дослідження встановлено, що приріст калюсу *Pulsatilla alba* залежить від концентрації і співвідношення регуляторів росту та типу експланту.

Правильно підібрана концентрація та співвідношення цитокинів та ауксинів дають можливість отримувати максимальний приріст калусної біомаси за короткий час.

Культивування калусної культури *Pulsatilla alba* здійснювали на живильних середовищах Мурасиге Скуга, приготовлених у чотирьох композиціях: МС-1, МС-2, МС-3, МС-4. Регулятори росту використано в наступних концентраціях: К – 0,2–1,0 мг/л, БАП – від 2,0 до 6,0 мг/л, НОК – від 1,0 до 4,0 мг/л, 2,4-Д від 0,1 до 1,0 мг/л.

Вміст регуляторів росту у різних композиціях модифікованих живильних середовищ Мурасиге Скуга для культивування *Pulsatilla alba* представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

**Модифіковані живильні середовища Мурасиге-Скуга
з регуляторами росту для одержання калусної біомаси
*Pulsatilla alba***

Регулятори росту, мг/л	Композиції модифікованих живильних середовищ Мурасиге Скуга			
	МС-1	МС-2	МС-3	МС-4
К	–	1,0	0,5	0,2
БАП	5,0	–	2,0	4,0
НОК	2,0	4,0	–	1,0
2,4-Д	1,0	0,1	0,5	–

Результати проведеного дослідження свідчать, що зміни в інтенсивності ростових процесів залежать від якісного та кількісного вмісту регуляторів росту у живильних середовищах під час культивування.

Встановлено, що за умови присутності у середовищі 0,1 мг/л 2,4-Д вже на 4–5 добу (середовище МС-2) спостерігали формування світло-жовтого, калюсу пухкої консистенції. Менш ефективним було використання 2,4-Д у концентраціях 0,5 мг/л та 1,0 мг/л – калюс утворювався лише на 21–23 добу культивування, мав щільну консистенцію та жовто-коричнєве забарвлення. Слід зазначити, що при поєднанні у складі середовищ 2,4-Д і БАП у різних концентраціях та співвідношеннях формування калюсу не відбувалося або проходило досить повільно з утворенням нежиттєздатного калюсу щільної консистенції, що швидко некротував.

Оптимальним було використання у складі композиції поєднання регуляторів росту: розчинів НОК (2–10 мг/л), і К (0,2–1 мг/л), оскільки усі комбінації концентрацій цих регуляторів росту стимулювали утворення калюсу на експлантах *Pulsatilla alba*. На середовищах з концентраціями НОК 1–2 мг/л та К 0,2–0,5 мг/л через 10–15 діб розпочинався калюсогенез. Підвищення концентрацій НОК до 4 мг/л і К до 1 мг/л дало можливість пришвидшити процес калюсогенезу до 5–7 діб. Найвищий відсоток калюсогенезу склав 78,3 % на листових експлантах. Одержані калюси *Pulsatilla alba* мали пухку консистенцію, світло-жовте забарвлення та характеризувалися проліферативною активністю. Тривалість пасування становила 3 тижні для усіх калюсів.

Оптимальним із протестованих живильних середовищ, яке дозволило отримати найвищу частоту калюсогенезу, тобто спостерігалось утворення калюсу у максимальній кількості різних типів експлантів *Pulsatilla alba* було середовище МС, що містило 4 мг/л НОК, 1 мг/л К та 0,1 мг/л 2,4-Д за умов: температура 24 ± 1 °С, освітлення 2000 лк, фотоперіод 16/8 год і відносна вологість повітря 70 %. Тривалість становила 40 діб.

Максимальний приріст калюсної біомаси *Pulsatilla alba* склав 68 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 40 добу культивування. Калюсна біомаса *Pulsatilla alba* це субстанція жовтого забарвлення та пухкої консистенції, яку висушували, подрібнювали та використовували для подальших досліджень.

Згідно результатів експериментальних досліджень введено в культуру *in vitro* лікарську рослину *Pulsatilla alba*, яка була ініційована з стерилізованого насіння зібраного з природніх місць існування. Підібрано оптимальні умови отримання асептичних проростків, як джерела вихідних експлантів. Досліджено особливості

морфогенезу *Pulsatilla alba* в культурі ізольованих меристем *in vitro*, підібрано ефективні регулятори росту та одержано калюсну біомасу.

3. Дослідження калюсної біомаси *Pulsatilla alba* та екстрактів на її основі

Аналіз калюсної біомаси *Pulsatilla alba* було проведено за наступними показниками: вологість, загальна зола, не розчинна в HCl зола, загальний вміст екстрактивних речовин (рис. 4).

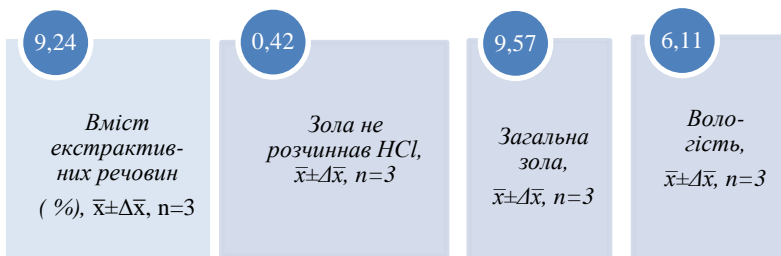


Рис. 4. Показники якості одержаної калюсної біомаси *Pulsatilla alba*

Результати експериментальних досліджень свідчать, що одержана калюсна біомаса *Pulsatilla alba*, вирощена на агаровому середовищі, за основними показниками не поступається вимогам, що ставляться до рослинної сировини.

Екстракти калюсної біомаси *Pulsatilla alba* одержували методом мацерації. Водно-етанольний розчин в концентрації 40 % використано як екстрагент, час екстракції 120 хв, співвідношення між сировиною та екстрагентом 1:20.

Визначали вміст біологічно активних сполук в одержаних екстрактах. Загальний вміст фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом Фоліна-Чокальтеу: 1 мл екстракту змішували з 4 мл 40 % водно-етанольного розчину, 0,5 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу та 1,5 мл 20 % розчину Na_2CO_3 . Суміш витримували в темному місці впродовж 120 хв та вимірювали оптичну густану зразків при довжині хвилі 760 нм на спектрофотометрі Hitachi U-2810, контрольним зразком був етанол. Загальний вміст фенольних сполук виражено як кількість мг гальної кислоти в 1 мл екстракту, всі виміри відтворено тричі²⁵.

²⁵ Rojas-Ocampo E., Torrejón-Valqui L., Muñoz-Astecker L. D., Medina-Mendoza M., Mori-Mestanza D., Castro-Alayo E. M. Antioxidant capacity, total phenolic content and phenolic compounds of pulp and bagasse of four Peruvian berries. *Heliyon*, 7 (8), e07787. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07787>

Загальний вміст флавоноїдів визначали колориметричним методом: змішували 0,2 мл екстракту з 0,8 мл 40 % водно-етанольного розчину та 1 мл 10 % розчину $AlCl_3$. Одержану суміш витримували 60 хв та вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 420 нм на спектрофотометрі Hitachi U-2810. Суміш етанолу та розчину $AlCl_3$ була контрольним зразком. Загальний вміст флавоноїдів виражено як кількість мг кверцетину в 1 мл екстракту, всі виміри проводили тричі. Результати проведених досліджень представлено в таблиці 2.

Таблиця 2

**Кількісний вміст біологічно активних сполук
у екстракті калюсної біомаси *Pulsatilla alba***

Досліджуванний екстракт	Загальний вміст біологічно активних сполук	
	фенолів (мг галової кислоти в мл), $\bar{x} \pm A\bar{x}$, $n=3$	флавоноїдів (мг кверцетину в мл), $\bar{x} \pm A\bar{x}$, $n=3$
40 % водно-етанольний екстракт	3,94±0,03	2,97±0,03

Одержані результати експериментального дослідження щодо кількісного вмісту фенолів та флавоноїдів у досліджуваному водно-етанольному екстракті калюсної маси *Pulsatilla alba* свідчать про значний вміст зазначених сполук, що дозволяє використовувати калюсну біомасу як їх сировинне джерело.

Дослідження антиоксидантної активності екстрактів калюсної біомаси *Pulsatilla alba* провели із використанням модифікованого методу Meda et al.: до 1 мл 40 % водно-етанольного екстракту додавали 4 мл етанольного розчину 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (0,1 мМ). Одержану суміш протягом 30 хв витримували в темному місці. оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі Hitachi U-2810 при довжині хвилі 517 нм. Етанол використовували як контрольний зразок²⁶.

Антиоксидантну активність екстрактів розраховано за формулою:

$$\%_{\text{inhibition}} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100 \%$$

де A_{control} – оптична густина розчину 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу, A_{sample} – оптична густина екстракту з розчином 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу. Всі виміри проведено тричі. Результати експериментальних досліджень вивчення антиоксидантної активності представлено в таблиці 3.

²⁶ Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., & Nacoulma O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91 (3), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>

**Антиоксидантна активність екстракту калусної біомаси
*Pulsatilla alba***

	Досліджуваний об'єкт		
	40 % водно-етанольний екстракт	аскорбінова кислота	кверцетин
Антиоксидантна активність,ДФПГ (%), $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$, n=3	76,5869	79,9147	81,0364

Результати проведеного дослідження свідчать про належний рівень антиоксидантної активності екстракту калусної біомаси *Pulsatilla alba* у порівнянні з відомими антиоксидантними засобами – аскорбіновою кислотою і кверцетином.

Вивчали гостру токсичність одержаного екстракту калусної біомаси *Pulsatilla alba*. Зазначене дослідження проведено на 60 білих безпородних щурах двох статей масою 190–220 г. Експериментальні тварини утримувались у стандартних умовах віварію відповідно до санітарно-гігієнічних норм на стандартному раціоні. При проведенні експериментальних досліджень тварини перебували у звичайних умовах згідно з нормами і принципами Директиви Ради ЄС з питань захисту хребетних тварин, які застосовують для наукових досліджень. Екстракт вводили одноразово внутрішньошлунково в дозах 5000, 10 000 та 15 000 мг/кг. По одній дозі екстракту отримували 5 груп тварин. Одна група щурів (n=6) була інтактною. Після отримання дози препарату тварини утримувались без їжі з доступом до води протягом 4 год. Спостереження за тваринами проводили 2 тижні. Фіксували прояви порушень фізіологічного стану щурів, динаміку маси тіла та виживаність²⁷. Результати проведеного дослідження свідчать про відсутність будь-яких токсичних проявів. Не встановлено жодної загибелі щурів. Поведінка тварин та споживання ними їжі та води не відрізнялось від інтактних щурів. Отже 40 % етанольний екстракт калусної маси *Pulsatilla alba* можна віднести до малотоксичних засобів (IV класу токсичності).

ВИСНОВКИ

Проаналізовано дані літературних джерел щодо поширення, хімічного складу, біологічної активності та медичного застосування *Pulsatilla alba*. Встановлено, що *Pulsatilla alba* є цінною лікарською рослиною завдяки вмісту біологічно активних сполук та

²⁷ Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*). Фармацевтичний часопис. 2019. № 2. С. 60–66.

фармакологічною сировиною, дослідження якої варто продовжувати. *Pulsatilla alba* не входить до складу лікарських засобів, які представлені на вітчизняному фармацевтичному ринку, проте здавна використовується народною медициною у лікуванні багатьох захворювань, чим викликає зацікавлення.

В результаті проведених досліджень введено в культуру *in vitro* *Pulsatilla alba* та одержано калюсну біомасу. Підібрано схему стерилізації насіння з найбільшим виходом асептичних експлантів. Встановлено, що усі експланти формують калус на середовищі Мурасиге-Скуга з додаванням регуляторів росту: α -нафтил-1-оцтової кислоти (4 мг/л), кінетину (1 мг/л) та 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (0,1 мг/л). Визначено оптимальні умови культивування: температура 24 ± 1 °С, освітлення 2000 лк, фотоперіод 16/8 год і відносна вологість повітря 70 %. Тривалість становила 40 діб. Встановлено, що приріст калусу залежить від концентрації і співвідношення фітогормонів та типу експланту. Одержані дані вказують на перспективність дослідження *Pulsatilla alba* в системі *in vitro*. З огляду на загрозливий статус виду культура *in vitro* *Pulsatilla alba* є важливою в аспекті охорони, ресурсозбереження, а також як потенційне джерело синтезу цінних вторинних метаболітів.

Вивчено вміст фенольних сполук та флавоноїдів у екстрактах одержаної калусної біомаси *Pulsatilla alba*. Загальний вміст фенольних сполук в екстракті склав – 3,94 мг/мл. Загальний вміст флавоноїдів – 2,97 мг/мл. Одержані результати свідчать про можливість використання калусної біомаси *Pulsatilla alba* як альтернативного сировинного джерела для виробництва фітопрепаратів.

Визначили радикал-поглинальну активність екстракту калусної біомаси *Pulsatilla alba* та встановили, що досліджуваний екстракт проявляє антиоксидантну дію.

Досліджено гостру токсичність екстракту. Встановлено, що за показниками гострої токсичності екстракт калусної біомаси *Pulsatilla alba* при внутрішньошлунковому введенні є відносно нешкідливою речовиною (VI клас токсичності).

Визначено подальші перспективи використання калусної маси як альтернативного джерела активних речовин.

АНОТАЦІЯ

Pulsatilla alba це рідкісний вид родини *Ranunculaceae*, що тривалий час використовується в народній медицині України та й різних європейських країн, має широкий спектр лікувальних властивостей, проте знаходиться під загрозою зникнення. Біотехнологічний напрям одержання біомаси лікарських рослин

в асептичних умовах *in vitro* на штучних живильних середовищах дозволяє одержати альтернативне сировинне джерело біологічно активних сполук. В результаті проведених досліджень введено в культуру *in vitro Pulsatilla alba* та одержано калусну біомасу. Вивчено вміст фенольних сполук та флавоноїдів у екстракті одержаної калусної біомаси *Pulsatilla alba*. Досліджено антиоксидантну дію, гостру токсичність екстракту та визначено подальші перспективи використання калусної маси *Pulsatilla alba* як альтернативного джерела активних речовин у фармації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дослідження вітчизняного ринку лікарських засобів рослинного походження / В. М. Мінарченко, А. Ю. Бутко // Фармацевтичний журнал. – 2017. – № 1. – С. 30–36. – Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/pharmazh_2017_1_5
2. Рослинний світ Українських Карпат: Чорногора / Ю. Нестерук // Екологічні мандрівки. – Львів : БаК, 2003. – 520 с.
3. Гриців С., Хропот О., Конечна Р., Петріна Р. Культивування рослин родини Ranunculaceae // Біотехнологія XXI століття: матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) (Київ, 21 квітня 2017 р.). – 2017. – С. 24.
4. Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Прогнозування біологічної активності та drug-like сполук родини *Ranunculaceae* як пошук нових ефективних діючих речовин. Вчені записки ТНУ імені В. І. Вернадського. Серія: технічні науки. Том 29 (68). Ч. 2. № 6, 2018. С. 70–76.
5. Червона книга України. URL: <https://redbookua.org/item/pulsatilla-scherfelii/> (дата звернення: 20.02.2021).
6. Кияк В. Г. Малі популяції рідкісних видів рослин високогір'я Українських Карпат. Львів : Ліга-Прес, 2013. С. 73.
7. PULSATILLA ALPINA subsp. ALBA Zamelis et Paegle – koniklec alpinsky bily/poniklec biely. Gabriela Leugnerová. 5.7.2007. URL: <https://botany.cz/cs/pulsatilla-austriaca/> (дата звернення: 20.02.2021).
8. Wikimedia Commons. File:Pulsatilla_alba_(Kastelberg).jpg. Florian Grossir. 6 May 2011. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pulsatilla_alba_\(Kastelberg\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pulsatilla_alba_(Kastelberg).jpg) (дата звернення: 20.02.2021).
9. Кияк В., Штупун В., Білонога В. Кліматогенні загрози популяціям рідкісних і ендемічних видів рослин високогір'я Українських Карпат. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 2016, (74), 104–115.

10. Pozynych I. S., Savitska A. G. Особливості флори судинних і мохоподібних рослин ландшафтного заказника “Грофа” (Українські Карпати, масив Горгани). *Biosystems Diversity*, 2010, 18 (2), 69–75.

11. Krvavych A., Reviakina N., Zhurakhivska L., Hubytska I., Konechna R. *Pulsatilla alba*: analytical review of spread, chemical composition, biological activity and medical application. *ScienceRise: Biological Science*, 2021, 4 (29), 10–14. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2021.249850>

12. Weryszko-Chmielewska E., Sulborska A., Żuraw B., Chyżewska R., & Sawidis T. Ecological aspects of the floral structure and flowering in *Pulsatilla* species. *Acta Agrobotanica*, 2017, 70 (3). DOI: <https://doi.org/10.5586/aa.1715>

13. Jia R., Song X., Guo Y., Yin Z., Liu F., Xiong J. et. al. Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of modified *Pulsatilla* granules. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16 (3), 671–678. DOI: [http://doi.org/10.1016/s2095-3119\(16\)61401-6](http://doi.org/10.1016/s2095-3119(16)61401-6)

14. Strzałkowska-Abramek M., Jachūła J., Dmitruk M., & Pogroszewska E. Flowering phenology and pollen production of three early spring *Pulsatilla* species. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 2016, 15 (6), 333–346.

15. Ye W., Ji N. N., Zhao S., Che C. T. A new cytotoxic saponin from *Pulsatilla patens* var. *multifida*. *Pharm Biol.* 2001; 39 (1) 7–10. URL: <https://doi.org/10.1076/phbi.39.1.7.5951>

16. Müller M. B., Bertrams J., Stintzing F. C. Stability of protoanemonin in plant extracts from *Helleborus niger* L. and *Pulsatilla vulgaris* Mill. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 188. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113370>

17. Shafaghat A. Antimicrobial activity and volatile constituents of the essential oil of *Pulsatilla albana* from Iran. *Nat Prod Commun.* 2010; 5 (8): 1299–1300. DOI: 10.1177/1934578X1000500832

18. Liu Q., Chen W., Jiao Y., Hou J., Wu Q., Liu Y., & Qi X. (2014). *Pulsatilla* saponin A, an active molecule from *Pulsatilla chinensis*, induces cancer cell death and inhibits tumor growth in mouse xenograft models. *Journal of surgical research*, 188 (2), 387–395. DOI: 10.1016/j.jss.2014.01.026

19. Goyal S., Chawla R., & Kumar S. Recent advances and sporadic phytochemical and pharmacological review on potential herbs of the genus “*Pulsatilla*”.

20. Kolb Y., Konechna R., Hropot O. S., Novikov VP Possibility of using *Pulsatilla alba* in cosmetology and pharmacy.// Scientific and technical progress and optimization of technological processes of drug use: materials 6 Scientific and practical conferences with international participation (November 10–11, 2016. Ternopil). 2016. C. 284.

21. Колб Ю. І., Гавриш Ю. І., Гамада В. Р., Крвавич А. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П. Вплив регуляторів росту на морфогенез *Pulsatilla alba* в умовах *in vitro*. Матеріали XV Міжнародної науковопрактичної конференції. Київ, 25–29 червня 2019 року. С. 59–61.

22. Kolb Y. I., Hrytsiv S. V., Hropot O. S., Konechna R. T., Petrina R. O., Novikov V. P. Promising results of callus biomass *Pulsatilla alba* in pharmacy. Medicines are people. Modern problems of pharmacotherapy and adherence to drugs. – Vol. 2. – Kharkiv, NUPh. 2017. – P. 165–166.

23. Kolb Y., Hrytsiv S., Serivko B., Konechna R., Petrina R. The ratio of biomass of rare Ranunculaceae for the use of biotechnological method. Youth and the progress of biology. Collection of abstracts. – Lviv, 2017. – P. 103–104.

24. Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*). Фармацевтичний часопис. 2019. № 2. С. 60–66. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2019.2.10189>

25. Rojas-Ocampo E., Torrejón-Valqui L., Muñóz-Astecker L. D., Medina-Mendoza M., Mori-Mestanza D., Castro-Alayo E. M. Antioxidant capacity, total phenolic content and phenolic compounds of pulp and bagasse of four Peruvian berries. *Heliyon*, 7 (8), e07787. URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07787>

26. Meda A., Lamien C. E., Romito M., Millogo J., & Nacoulma O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91(3), 571–577. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>

Information about the authors:

Konechna Roksolana Tarasivna,

Candidate of Pharmaceutical Sciences,

Associate Professor at the Department of Technology
of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

Lviv Polytechnic National University

12, Bandera str., Lviv, 79013, Ukraine