

## МЕТОД ВЫРАЩИВАНИЯ КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО (*HYPERICUM PERFORATUM* L.) С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ И ГИПЕРИЦИНОВ

В.С. Заяц<sup>1</sup>, А.Э. Юницкий<sup>1</sup>, И.В. Налетов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ЗАО «Струнные технологии», Минск

<sup>2</sup>Белорусская государственная орденов Октябрьской революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия, Горки

С давних времён люди использовали растительные продукты в качестве источников фармацевтических препаратов. Даже сегодня почти все население мира зависит от продуктов растительного происхождения. В последнее время биотехнология открывает привлекательные возможности для производства растительных культур *in vitro* (например, каллусных культур, клеточных суспензионных культур и культур органов) с целью облегчения получения желаемых растений и продукции [1].

Растения адаптируются к абиотическим и биотическим стрессам, используя свою пластичность для самовосстановления, а также путём генерации вторичных метаболитов, которые активируются элиситорами и высвобождаются в качестве защитных реакций [2]. Генерация химических соединений в результате вторичного метаболизма может быть вызвана внешними стрессовыми сигналами (например, возбудителями патогенов, окислительным стрессом и т. д.). Вторичные метаболиты не только проявляют защитные функции, но и обладают лекарственной ценностью для человека. Таким образом, культуры растительных клеток представляют собой интересные источники для простого и масштабируемого производства вторичных метаболитов. Разработаны подходы к оптимизации условий культивирования и увеличению выхода вторичных метаболитов в культурах растений *in vitro*.

Зверобой продырявленный L. (*Hypericum perforatum* L.) – многолетнее травянистое растение, ценится за его важные биологические и химические свойства, а его использование при лечении инфекционных заболеваний описано в этноботанических справочниках. Зверобой продырявленный (*H. perforatum* L.) включает в себя важные биологически активных соединения: гиперфорин и кверцитин. Первый действует как естественный антидепрессант, второй считается мощным противораковым препаратом и полезным соединением для лечения болезни Альцгеймера [3,4]. Лечебные свойства зверобоя, а именно его антидепрессивная активность, связаны с его фенольным составом и, в частности, с гипериперинами, гиперфоринами и флавоноидами. Спиртовые экстракты *H. perforatum* содержат множество фенольных соединений, а именно флавоноиды и фенольные кислоты, что позволяет предположить, что они обладают антиоксидантными свойствами.

Эксплантаты, взятые из растительных тканей, медленно растут *in vitro* в клеточную массу, которая варьируется от аморфной и бесцветной до бледно-коричневой, если они получены в стерильных условиях, избегающих микробной инфекции, и культивируются на твёрдой агаризованной среде, дополненной гормонами роста [5,6]. Объектом исследования служили растения зверобоя продырявленного, произрастающие на Крестьянско-фермерского хозяйства «Юницкого». В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали листья предварительно обеззараженные

Для стимуляции каллусогенеза у зверобоя продырявленного была использована стандартная питательная среда Мурашиге-Скуга, дополненная фитогормонами в различных концентрациях, представленными в таблице 1.

Таблица 1. – Варианты питательных сред каллусогенеза Зверобоя продырявленного

Варианты среды	Содержание фитогормонов, мг/л
1	$\alpha$ -НУК – 1,5; кинетин – 1
2	2,4-Д – 1; 6- БАП – 0,5
3	2,4-Д – 0,5; 6- БАП – 0,5
4	$\alpha$ -НУК – 0,5; кинетин – 1
5	$\alpha$ -НУК – 0,5; кинетин – 0,5
6	2,4-Д – 1,5; 6- БАП – 0,5
7	2,4-Д – 0,5; 6- БАП – 1,5
8	$\alpha$ -НУК – 1; кинетин – 1

Примечание –  $\alpha$ -НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота; 2,4-Д – 2,4- ; 6- БАП – 6-бензиламинопурин.

Определение содержания суммы флавоноидов в пересчёте на рутин проводили спиртовой экстракцией измельчённого сырья и дальнейшим измерением оптической плотности соединения при реакции со спиртовым раствором хлорида алюминия. Определение содержания суммы гиперидинов проводили также спектрофотометрически с тетрагидрофураном. Содержание флавоноидов и суммы гиперидинов в выращенных на территории крестьянско-фермерского хозяйства «Юницкого» растениях составило 2,1% и 0,15% соответственно [7]. В пассированных каллусных тканях были получены результаты, представленные в таблице 2.

*Hypericum perforatum* L. характеризуется различными типами секреторных структур, которые специализируются на хранении метаболитов и распространены во всех репродуктивных и вегетативных тканях растения. Бледные железы (рис. 1) сконцентрированы в листовой пластинке и содержат большое количество гиперфорина. Эти железы, располагаясь на листе, пронизывают паренхиму и ограничиваются двумя слоями клеток эпидермиса.

Таблица 2. – Содержание флавоноидов в каллусных тканях Зверобоя продырявленного

Варианты среды	Флавоноиды, % / рутин	Сумма гиперидинов, % / гиперидин
1	1,5	0,08
2	0,4	0,03
3	0,9	0,06
4	1,8	0,1
5	1,0	0,07
6	0,3	<0,01
7	0,4	<0,01
8	1,1	0,07

Тёмные железы содержат гиперидин, морфологически располагаются по всему растению равномерно и погружены в мезофилл двумя слоями уплощённых клеток. Схизогенные железы содержат эпителиальный слой из плотно сомкнутых выделительных клеток сплюсненной формы или почти изодиаметрических, но снабжённых сочковидными выступами в полость железы. Клеточные оболочки тонкостенные, клетки содержат зернистую цитоплазму, крупное ядро. Внутри эпителиальных клеток образуются эфирные масла, выделяющиеся в полость железы [8].

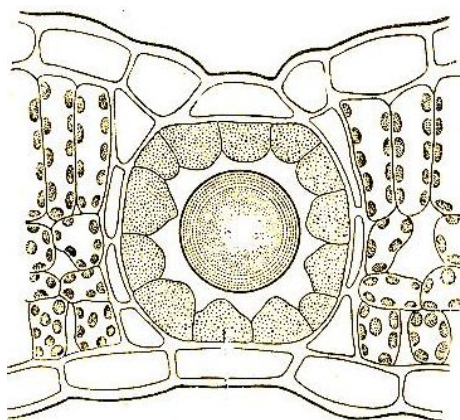
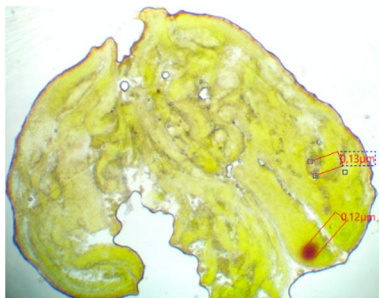


Рисунок 1. – Схизогенное вместилище эфирных масел на поперечном срезе листа зверобоя продырявленного

В пассировании каллуса зверобоя (рис. 2) удалось получить синтез этих желёз в структуре каллуса, с накоплением большого количества флавоноидов, превышающих в 1,3 раза требуемую норму по Государственной фармакопее РБ (1,8 %) и 0,1 % сумма гиперидинов в пересчёте на гиперидин (норма по ГФ РБ – 0,08%).



**Рисунок 2. – Расположение желёз в каллусе зверобоя**

Каллус зверобоя не останавливался в росте на 30-е сутки и продолжал расти, сохранив активное деление. Таким образом, каллусогенез как методика получения биологически активных соединений находит своё применение при производстве некоторых лекарственных веществ из растений. Данная технология, предполагает задействование минимальных площадей и получение выхода действующих веществ хоть и ниже, чем в исходном сырье, однако соответствующим требованиям ГФ РБ.

#### **Список использованных источников**

1. Efferth, T. Biotechnology applications of plant callus cultures / T. Efferth // Engineering. – 2019. – Vol. 5. – №. 1. – P. 50-59.
2. Saddiqe Z., Naeem I., Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L // Journal of ethnopharmacology. – 2010. – Т. 131. – №. 3. – С. 511-521.
3. Карпухин, М. Ю. Продуктивное долголетие зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) / М. Ю. Карпухин, А.В. Абрамчук // Аграрный вестник Урала. – 2018. – №. 8 (175). – С. 35-40.
4. Буданцев, А. Л. Биологическая активность *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): обзор // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9. – №. 1. – С. 17-31.
5. Tusevski, O. et al. Callus cultures of *Hypericum perforatum* L. a novel and efficient source for xanthone production / O. Tusevski [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2016. – Vol. 125. – P. 309-319.
6. Kirakosyan, A. The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) / A. Kirakosyan [et al.] // Biotechnology and applied biochemistry. – 2004. – Vol. 39. – №. 1. – P. 71-81.
7. Гарифуллина, Г. Г. Гиперицин как ингибитор радикально-цепной реакции окисления органических веществ / Г. Г. Гарифуллина // Башкирский химический журнал. – 2019. – Т. 26. – №. 2. – С. 61-65.
8. Налетов, И. В. Каллусогенез как альтернативный способ получения биологически активных веществ в замкнутой экосистеме / И. В. Налетов, В. С. Заяц // Сборник материалов V международной научно-технической конференции «Безракетная индустриализация ближнего космоса: проблемы, идеи, проекты». – ООО «Астроинженерные технологии», 2022. – №. 1. – С. 96-99.