



УДК 582.675.1: 57.086.83+581.143.6:633.8:615.32  
DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2020.2.11205>

## ОДЕРЖАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ КАЛЮСНОЇ МАСИ *DELPHINIUM ELATUM* L.

О. Хропот<sup>1</sup>, Є. Базавлук<sup>1</sup>, Р. Конечна<sup>1</sup>, І. Губицька<sup>1</sup>, Ю. Конечний<sup>2</sup>, І. Ясіцька-Місяк<sup>3</sup>, П. Вечорек<sup>3</sup>, В. Новіков<sup>1</sup>

Національний університет «Львівська політехніка»<sup>1</sup>

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького<sup>2</sup>

Опольський університет<sup>3</sup>, Республіка Польща

[egor.bazavluk@gmail.com](mailto:egor.bazavluk@gmail.com)

### ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:  
28.04.2020

Після доопрацювання / Revised:  
04.06.2020

Прийнято до друку / Accepted:  
10.06.2020

### Ключові слова:

*Delphinium elatum* L.;  
регулятори росту;  
калюс;  
фенольні сполуки;  
флавоноїди;  
екстракт;  
антимікробна активність;  
антиоксидантна активність.

### АНОТАЦІЯ

**Мета роботи.** Ввести в культуру *in vitro* *Delphinium elatum* L., дослідити вплив регуляторів росту на процеси росту рослинних клітин, визначити оптимальні умови культивування рослини в умовах *in vitro*. Одержати екстракти біомаси та рослинної сировини *D. elatum*, провести порівняльне дослідження вмісту біологічно активних сполук, антимікробної та антиоксидантної активностей.

**Матеріали і методи.** Культивування *D. elatum* проводили на модифікованому живильному середовищі Мурасіге–Скуга. Екстракти одержували методом мацерації, як екстрагент використовували водно-етанольні розчини в концентрації 20, 40, 70 та 90 %. Загальний вміст фенольних сполук в екстрактах визначали спектрофотометричним методом Фоліна–Чокальтеу, загальний вміст флавоноїдів – колориметричним методом з алюмінію хлоридом. Антимікробну активність досліджували на стандартних та клінічних штамів мікроорганізмів методом дифузії в агар, антиоксидантну активність – спектрофотометричним методом шляхом взаємодії зі стабільним хромоген-радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом.

**Результати й обговорення.** Підбрано оптимальну схему стратифікації та стерилізації насіння *D. elatum* з найбільшим виходом асептичних експлантів: почергові механічна обробка, змочування холодною стерильною водою, витримка в холодильнику, обробка 70 % етанолом, натрію гіпохлоритом та стерилізованою бідистильованою водою.

Визначено склад поживного середовища Мурасіге–Скуга, доповненого регуляторами росту БАП, 2,4-Д, на якому спостерігались найвищі значення індексу росту і найменший час подвоєння біомаси калюсів. Одержано калюсну біомасу після 35 днів культивування.

Досліджено загальний вміст флавоноїдів та фенольних сполук в екстрактах *D. elatum*. Встановлено, що екстракти як калюсної біомаси, так і рослинної сировини, одержані з 40 % водно-етанольним розчином, мають найбільший вміст фенольних сполук і флавоноїдів.

Встановлено протимікробну та протигрибкову активність екстрактів *D. elatum* щодо стандартних та клінічних штамів деяких мікроорганізмів. Визначено, що максимальну активність проявили екстракти *D. elatum*, одержані з 40 % та 70 % водно-етанольними розчинами.

**Висновки.** У результаті проведених досліджень встановлено, що калюсна біомаса *D. elatum* за вмістом фенольних сполук, флавоноїдів та фармакологічною активністю не поступається рослинній сировині і може бути використана як рівноцінна лікарська сировина.

**Вступ.** Для сучасної медицини одними з найважливіших є дослідження, які забезпечують розробку лікарських засобів на основі природної сировини, зокрема лікарських рослин. Актуальним завданням сьогодення для фармації є пошук перспективних рослин серед представників української флори. Рослинність Карпат надзвичайно багата та різноманітна, чимало представників карпатської флори мають корисні та цілющі властивості, тому протягом багатьох століть їх застосовують у народній медицині для приготування відварів, настоїв, мазей для лікування та профілактики багатьох захворювань. Серед рослин, які поширені в Карпатах, зустрічаються релікти, ендеміки, а також рідкісні та зникаючі види, що потребують охорони та заходів щодо їх збереження. Рослини родини *Ranunculaceae*, зокрема *D. elatum*, є представниками такої флори та перспективними об'єктами для досліджень.

*D. elatum* – унікальна, надзвичайно рідкісна, одна з найпопулярніших лікарських рослин Українських Карпат, яка активно використовується народною медициною. Ця багаторічна трав'яниста рослина 80–150 см заввишки, в Україні зустрічається лише на території Карпат, а саме в межах Мармароського масиву, Полонини Боржава, Чивчинських та Горганських гір [1].

Лікарською рослинною сировиною є трава та насіння, що здавна використовувалися в етномедицині для лікування зубного і головного болю, циститу, кон'юнктивіту, запалення легень, плевриту та захворювань шкіри. Насіння рослини має виражені антипаразитарні та кровоспинні властивості.

Аналіз літературних джерел свідчить про відсутність інформації щодо антимікробних та антиоксидантних властивостей *D. elatum*.

На українському ринку лікарських препаратів відсутні засоби на основі сировини *D. elatum*, оскільки це рідкісний гірський європейський вид, що знаходиться на межі вимирання та занесений до Червоної книги України. Обсяги лікарської рослинної сировини дуже обмежені та не підлягають комерційному використанню [1].

Альтернативним перспективним джерелом одержання біомаси є використання біотехнологічних методів вирощування *D. elatum* в умовах *in vitro* на штучному поживному середовищі. Отримана біомаса може містити повний комплекс біологічно активних сполук, притаманних цій рослині [2].

У літературних джерелах описано різноманітні способи введення в культуру *in vitro* *D. elatum*, а також варіанти культуральних середовищ, одержання культури ізольованих коренів, мікророзмноження рослини [3–5].

Мета роботи – ввести в культуру *in vitro* *D. elatum*, дослідити вплив регуляторів росту на процеси росту рослинних клітин, визначити оптимальні умови культивування рослини в умовах *in vitro*, одержати ек-

тракти біомаси та рослинної сировини *D. elatum*, провести порівняльне дослідження вмісту біологічно активних сполук, антимікробної та антиоксидантної активностей.

**Матеріали і методи.** Траву та насіння *D. elatum* заготовляли на схилах гори Ігровець (гірський масив Горгани, Богородчанський район, Івано-Франківська область) у липні–серпні 2017–2018 років на висоті 1200–1500 м над рівнем моря.

З метою покращення проростання насіння *D. elatum* проводили його передпосівну обробку 3 способами:

- схема № 1: обробка концентрованою сульфатною кислотою протягом однієї хвилини, далі занурення в холодну воду та витримка в холодильнику протягом 48 годин;
- схема № 2: обробка киплячою водою протягом двох хвилин і витримка в холодильнику протягом 48 годин;
- схема № 3: механічна обробка шляхом пошкодження оболонки насіння, змочування холодною стерильною водою та витримка в холодильнику протягом 48 годин.

Далі насіння занурювали в 70 % етанол на 2–3 хв, а потім витримували в різних стерилізуючих агентах: розчинах перекису водню (30 %), натрію гіпохлориту NaClO (10 %), сулеми HgCl<sub>2</sub> (0,1 %) при різній тривалості експозиції (10 і 20 хв) та промивали триразово у стерилізованій бідистильованій воді.

Потім насіння переносили в чашки Петрі на агаризоване поживне середовище Мурасіге–Скуга (МС) та інкубували при 16-годинному фотоперіоді та температурі +24±1°C, при освітленні 2000 лк і відносній вологості повітря 70 %. Впродовж 7 діб у кожному зі зразків визначали ефективність стерилізації (відсоток асептичного насіння відносно загального числа вихідних насінин) та ефективність проростання (відсоток насіння, яке після обробки стерилізуючими агентами утворювало життєздатні паростки).

Культивування *D. elatum* проводили на середовищі Мурасіге–Скуга [6] з додаванням регуляторів росту. Експлантами для ініціації калюсогенезу слугували сегменти асептично вирощених паростків, а саме корінці, меристематичні верхівки і гіпокотиль.

Для калюсогенезу використано кінетин, 6-бензиламінопурин (БАП), 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д) та нафтилоцтову кислоту (НОК) в різних концентраціях. Джерелом вуглецю була глюкоза (30 г/л). Культивування проводили впродовж 35 діб. Експланти культивували в наступних умовах: фотоперіод 16/8 год (світло/темрява), освітлення 2000 лк, температура 25°C (±2°C), відносна вологість 70 %. Частоту калюсогенезу було визначено як відношення кількості експлантів із калюсом до їх загальної кількості [6].

Всі дослідження відтворено тричі, отримані результати оброблено статистично. Калюсну масу клі-

тин визначали гравіметрично: спочатку їх знімали, потім висушували на листах пергаментного паперу при температурі  $55 \pm 2^\circ\text{C}$ . Сушу біомасу було використано для одержання екстрактів.

Індекс росту розраховано за формулою:

$$IP = \frac{M - m}{m},$$

де IP – індекс росту, M – маса через 20 діб, m – початкова вага [7, 8].

Порівняльний аналіз рослинної сировини та калюсної біомаси *D. elatum* було проведено за наступними показниками: вологість, загальна зола, не розчинна в HCl зола, загальний вміст екстрактивних речовин [9].

Екстракти рослинної сировини *D. elatum* та калюсної біомаси одержано методом мацерації, як екстрагент використано водно-етанольні розчини в концентрації 20, 40, 70 та 90 %. Співвідношення сировини та екстрагент становило 1:20 [9].

Проводили визначення вмісту біологічно активних сполук в одержаних екстрактах, зокрема фенольних сполук та флавоноїдів.

Загальний вміст фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом Фоліна–Чокальтеу [10]. 1 мл екстракту змішували з 4 мл відповідного розчинника (водно-етанольного розчину в концентраціях 20, 40, 70 та 90 %), 0,5 мл реактиву Фоліна–Чокальтеу та 1,5 мл 20 % розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Суміш витримували в темному місці впродовж 120 хв. Після цього вимірювали оптичну густину зразків при довжині хвилі 760 нм на спектрофотометрі Hitachi U-2810, контрольним зразком був етанол. Загальний вміст фенольних сполук виражено як кількість мг галової кислоти на 1 мл екстракту, всі виміри відтворено тричі.

Визначення загального вмісту флавоноїдів проводили колориметричним методом [11]. Змішували 0,2 мл екстракту з 0,8 мл відповідного розчинника (водно-етанольного розчину в концентрації 20, 40, 70 та 96 %) та 1 мл 10 % розчину  $\text{AlCl}_3$ . Суміш витримували протягом 60 хв. Після цього вимірювали оптичну густину зразків при довжині хвилі 420 нм на спектрофотометрі Hitachi U-2810, контрольним зразком була суміш етанолу та розчину  $\text{AlCl}_3$ . Загальний вміст флавоноїдів виражено як кількість мг кверцетину на 1 мл екстракту, всі виміри відтворено тричі.

Антимікробну активність екстрактів рослинної сировини та калюсної біомаси *D. elatum* визначено на стандартних штаммах мікроорганізмів *Candida albicans* (ATCC 885-653 та ATCC 668-853), *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 клінічних штаммах мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, резистентного до ністатину (*nis*) та *Candida albicans*, резистентного до азолів (кетоконазол – *ket*). Використовували по 5

штамів кожного типу клінічних штамів мікроорганізмів в п'яти серіях експерименту. Дослідження було проведено методом дифузії в агар та методом серійних розведень із застосуванням стандартних поживних середовищ (МПА, МПБ, середовище Сабуро). Оцінку антимікробної активності екстрактів здійснено з урахуванням бактерицидної дії етанолу [9].

Дослідження антиоксидантної активності екстрактів рослинної сировини та калюсної біомаси проведено із використанням модифікованого методу Meda et al. [11]. Змішували 1 мл екстракту з 4 мл етанольного розчину 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразулу (0,1 мМ), суміш витримували в темному місці протягом 30 хв. Після цього вимірювали оптичну густину зразків при довжині хвилі 517 нм на спектрофотометрі Hitachi U-2810, контрольним зразком був етанол. Антиоксидантну активність екстрактів розраховано за формулою:

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

де  $A_{\text{control}}$  – оптична густина вихідного розчину ДФПГ,  $A_{\text{sample}}$  – оптична густина суміші екстракту з розчином ДФПГ. Всі виміри відтворено тричі.

Одержані результати оброблено статистично за допомогою програми STATISTICA 8 та пакета статистичних функцій програми Microsoft Excel. Визначено середнє арифметичне значення M, середнє арифметичне відхилення m, кількість повторень n, t-критерій Стюдента [9].

**Результати й обговорення.** Підібрано схему передпосівної обробки та стерилізації насіння *D. elatum* з найбільшим виходом асептичних експлантів. У таблиці 1 представлено вихід життєздатних експлантів за різної передпосівної обробки насіння та застосування різних стерилізуючих агентів з різним часом експозиції.

Найоптимальнішою схемою передпосівної обробки та стерилізації насіння *D. elatum* для висаджування на середовищі Мурасіре–Скуга є наступна: механічна обробка шляхом пошкодження оболонки насіння, змочування холодною стерильною водою та витримка в холодильнику протягом 48 годин – 70 % етиловий спирт (2–3 хв) – 10 % розчин натрію гіпохлорит (20 хв) – стерилізована бідистильована вода тричі. За таких умов вихід життєздатних експлантів становив 84 %.

Наступним етапом було подальше культивування *D. elatum*.

Експлантами для ініціації калюсогенезу слугували сегменти асептично вирощених проростків, а саме корінці, меристематичні верхівки і гіпокотиль. Відомо, що до основних факторів, які впливають на індукцію калюсогенезу, належать склад культурального середовища та умови культивування [2]. Культивування проводили на середовищі МС з додаванням БАП у комбінації з іншими регуляторами росту: 2,4-Д, НОК.

Таблиця 1

Умови стратифікації та стерилізації насіння *D. elatum*

Схема передпосівної обробки <i>D. elatum</i>	Стерилізуючий агент	Час експозиції, хв	Вихід життєздатних експлантів, %
№1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	33
		20	65
	HgCl <sub>2</sub>	10	26
		20	47
	NaClO	10	36
		20	70
№2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	30
		20	61
	HgCl <sub>2</sub>	10	32
		20	59
	NaClO	10	39
		20	74
№3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	42
		20	71
	HgCl <sub>2</sub>	10	34
		20	65
	NaClO	10	46
		20	84

Варіанти живильного середовища МС з різним вмістом регуляторів росту представлено в таблиці 2. Культивування проводили впродовж 35 діб. Експланти культивували за таких умов: фотоперіод 16/8 год (світло/темрява), освітлення 2000 лк, температура 25 °С (±2°С), відносна вологість 70 %.

Під час культивування залежно від варіанту поживного середовища спостерігали значні відмінності в інтенсивності ростових процесів. Значення індексу росту, характерні для калюсної культури *D. elatum*, що культивувалась на досліджуваних поживних середовищах (МС1 - МС6), на 35 добу культивування представлено на рисунку 1.

Найнижчі значення індексу росту характерні для калюсної культури *D. elatum*, що культивувалась на поживному середовищі МС 1 з додаванням 1,0 мг/л БАП і 0,2 мг/л НОК. Найвище значення індексу росту спостерігали на середовищі МС 6 з додаванням 10 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д.

Досліджено час подвоєння біомаси *D. elatum*, яку культивували на різних варіантах живильного середовища (МС 1 – МС 6) до 35 доби культивування, результат представлено на рисунку 2.

Встановлено, що оптимальним серед протестованих середовищ є МС 6, на якому спостерігались найвищі значення індексу росту (рис. 1) і, відповідно, найменший час подвоєння біомаси калюсів (рис. 2).

Після 35 діб культивування одержали калюсну біомасу – пористу масу, відносно тверду, з нерівною поверхнею. Частинки розміром 0,5–1,3 см, невизначеної форми, жовтого кольору, зі специфічним запахом та кисло-солодким, терпким смаком. Маса калюсної біомаси становить 94 г на 1 л культурального середовища.

Результати аналізу калюсної маси і трави *D. elatum*, а також екстрактів на їх основі наведено в таблиці 3. Аналіз проводили за наступними показниками: вологість, загальна зола, зола не розчинна в HCl

Таблиця 2

Вміст регуляторів росту в живильному середовищі, мг/л

Регулятори росту	Середовище МС					
	МС 1	МС 2	МС 3	МС 4	МС 5	МС 6
БАП	1,0	10,0	5,0	10,0	10,0	10,0
НОК	0,2	–	0,6	–	1,0	–
2,4-Д	–	0,1	–	0,5	–	1,0

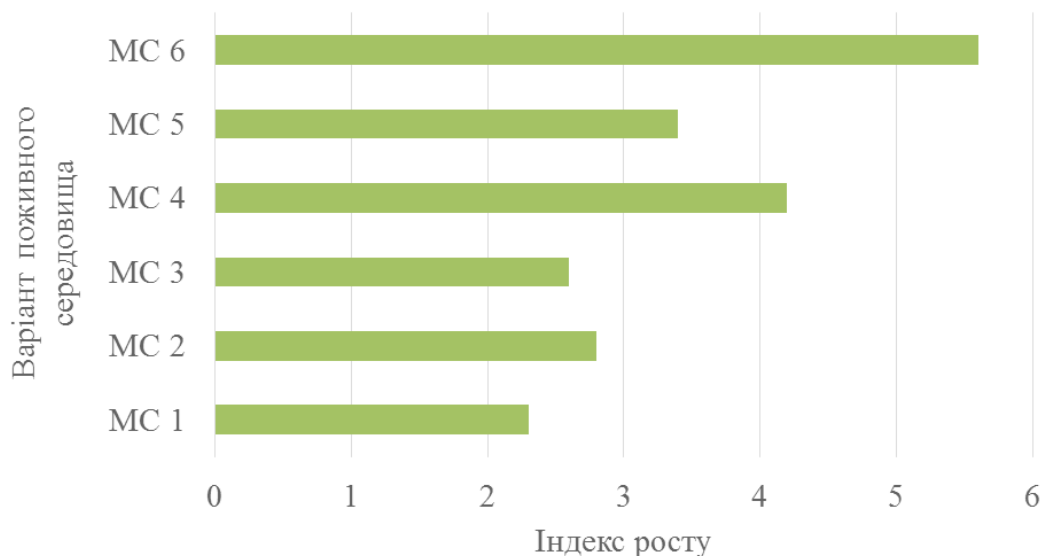


Рис. 1. Індекс росту калюсної біомаси *D. elatum* на різних варіантах живильного середовища на 35 добу культивування.

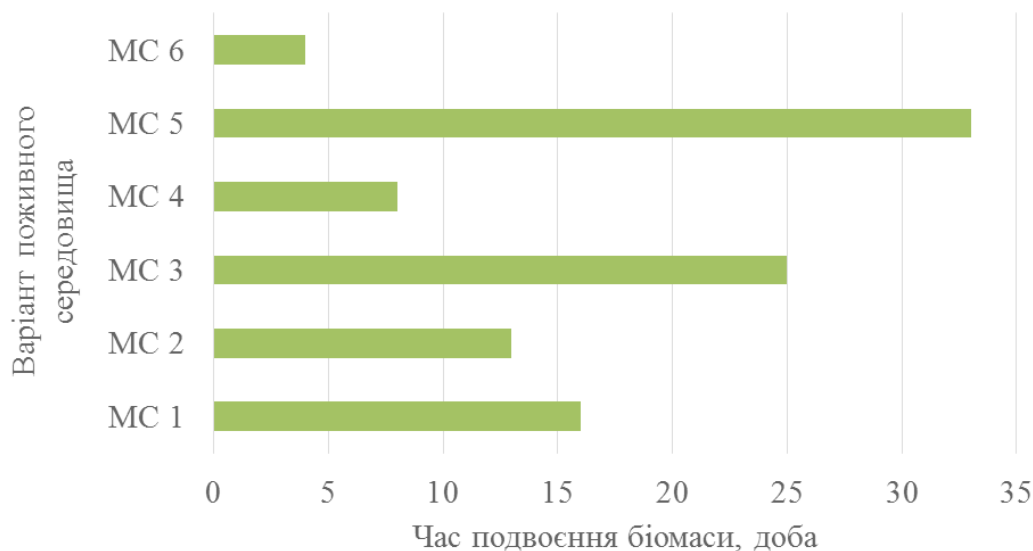


Рис. 2. Час подвоєння біомаси *D. elatum* на різних варіантах живильного середовища на 35 добу культивування.

та вміст екстрактивних речовин відповідно до вимог Державної Фармакопеї України [8].

Результати експериментальних досліджень свідчать, що калюсна біомаса, вирощена на агаровому середовищі, за основними показниками не поступається рослинній сировині (табл. 3).

На наступному етапі проводили визначення загального вмісту флавоноїдів та фенольних сполук в екстрактах *D. elatum*. Результати дослідження наведено в таблиці 4.

Одержані результати свідчать, що максимальний вміст фенольних сполук спостерігався у 40 % водно-етанольних екстрактах калюсної біомаси і рослинної сировини *D. elatum*. Максимальний вміст флавоноїдів встановлено в 40 % водно-етанольних

екстрактах калюсної біомаси і рослинної сировини *D. elatum*.

Дослідження радикал-поглинальної активності екстрактів рослинної сировини та калюсної біомаси *D. elatum* показало, що максимальну активність виявляють 40 % водно-етанольні екстракти калюсної біомаси і рослинної сировини *D. elatum*.

Встановлено протимікробну (табл. 5) та протигрибкову (табл. 6) активність екстрактів *D. elatum* щодо стандартних та клінічних штамів ряду мікроорганізмів. Екстракти *D. elatum* проявляють більшу активність щодо грибів роду *Candida* та Грам (+) бактерій, зокрема до стандартного штаму *Staphylococcus aureus*, ніж щодо інших видів досліджуваних мікроорганізмів. Найбільшу активність щодо референтних і до клінічних

Таблиця 3

Порівняльний аналіз калюсної біомаси та лікарської рослинної сировини (трави) *D. elatum*

Показник	КБ	ЛРС
Вологість, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	6,26	8,63
Загальна зола, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	9,93	6,45
Зола, нерозчинна в HCl, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	0,48	0,20
Екстракти рослинної сировини		
Концентрація етанолу, %	Вміст екстрактивних речовин (%), $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	
20	9,48	10,56
40	9,73	9,96
70	8,14	8,23
90	6,07	6,24

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина.

Таблиця 4

Загальний вміст фенольних сполук та флавоноїдів в екстрактах калюсної біомаси та рослинної сировини *D. elatum* та їхня антиоксидантна активність

	Досліджуваний водно-етанольний екстракт							
	20 %		40 %		70 %		90 %	
	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС
Загальний вміст фенолів (мг галової кислоти в мл), $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	1,3705	1,4963	1,9883	2,0389	1,3761	1,4491	1,3356	1,3945
Загальний вміст флавоноїдів (мг кверцетину в мл), $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	1,7880	1,8051	2,4478	2,6230	2,0096	2,1404	1,5467	1,6218
Антиоксидантна активність, ДФПГ (%), $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	40,7491	44,5733	73,1724	77,1637	70,0469	74,3454	61,0866	65,8105

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Таблиця 5

Протимікробна активність екстрактів *D. elatum* (метод дифузії в агар),  $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90 % екстракт		Контроль	70 % екстракт		Контроль	40 % екстракт		Контроль	20 % екстракт		Контроль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Стандартні штами												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (F-49)	18,0±0,2	18,0±0,3	13,0±0,2	14,5±0,4	14,0±0,3	14,0±0,3	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	16,0±0,3	17,0±0,4	12,0±0,2	15,0±0,2	14,0±0,2	14,0±0,6	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,0±0,2	8,0±0,25	12,2±0,4	12,0±0,3	13,0±0,25	12,0±0,6	0	0	0	0	0	0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Bacillus licheniformis ВКПМ-7038	14,0± 0,35	14,0± 0,4	11,0± 0,5	14,0± 0,4	14,5± 0,2	14,0± 0,5	0	0	0	0	0	0
Proteus vulgaris 152	13,0± 0,2	13,5± 0,2	10,0± 0,2	10,5± 0,2	11,0± 0,25	10,0± 0,35	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (F-51)	15,0± 0,3	15,0± 0,3	11,0± 0,6	12,7± 0,3	13,0± 0,3	12,0± 0,3	0	0	0	0	0	0
Клінічні штами												
Staphylococcus aureus	16,0± 0,25	16,0± 0,3	14,0± 0,2	13,0± 0,25	13,0± 0,2	12,0± 0,6	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli	12,0± 0,25	13,0± 0,35	10,0± 0,3	11,0± 0,3	13,0± 0,4	11,0± 0,25	0	0	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина.

**Таблиця 6**

Протирибкова активність екстрактів *D. elatum* (метод дифузії в агар),  $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90 % екстракт		Кон- троль	70 % екстракт		Кон- троль	40 % ек- стракт		Кон- троль	20 % ек- стракт		Кон- троль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
Стандартні штами												
Candida albicans ATCC 668-853	13,0± 0,4	14,0± 0,3	11,0± 0,6	11,0± 0,3	11,0± 0,2	0	7,0± 0,2	7,0± 0,4	0	0	0	0
Candida albicans ATCC 885-653	13,0± 0,3	14,0± 0,2	11,0± 0,4	11,0± 0,2	11,0± 0,2	0	7,0± 0,2	7,5± 0,4	0	0	0	0
Клінічні штами												
Candida albicans (ket) (N=9)	12,0± 0,3	12,0± 0,4	10,0± 0,7	9,0± 0,2	10,0± 0,2	0	0	0	0	0	0	0
Candida albicans (nis) (N=9)	11,5± 0,3	12,0± 0,4	10,0± 0,4	9,0± 0,2	10,0± 0,3	0	0	0	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина.

полірезистентних штамів грибів роду *Candida* проявили екстракти, одержані з 70 % та 90 % водно-етанольними розчинами. Мінімальна бактеріостатична та бактерицид-

на дії варіювали у розведеннях від 1:2 до 1:8 (табл. 7), найбільшу активність проявив екстракт *D. elatum* одержаний з 90 % водно-етанольним розчином.

**Таблиця 7**

Показники фунгібактерицидної активності екстрактів *D. elatum* (метод серійних розведень),  $p < 0,05$

Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту											
	90 % екстракт						70 % екстракт					
	1:2		1:8		1:16		1:2		1:8		1:16	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Candida albicans ATCC 668653	++	++	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Staphylococcus aureus ATCC 25923(F-49)	+	++	+	++	-	-	+	++	-	-	-	-
Staphylococcus epidermidis 191	++	++	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-
Escherichia coli ATCC 25922	++	++	+	++	-	-	+	+	-	-	-	-
Bacillus licheniformis ВКПМ-7038	++	++	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-
Proteus vulgaris 152	+	++	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (F-51)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту											
	40 % екстракт						20 % екстракт					
	1:2		1:8		1:16		1:2		1:8		1:16	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
Candida albicans ATCC 668653	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923(F-49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus epidermidis 191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus licheniformis ВКПМ-7038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteus vulgaris 152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (F-51)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Примітка:** наявність бактерицидних властивостей – «++», наявність бактеріостатичних властивостей – «+», відсутність бактерицидних і бактеріостатичних властивостей – «-»; КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина.

**Висновки.** Встановлено, що для культивування калюсної культури *D. elatum* оптимальним є живильне середовище Мурасіге–Скуга з додаванням 10,0 мг/л БАП та 1,0 мг/л 2,4-Д при температурі  $+24\pm 1^\circ\text{C}$ , освітленні 2000 лк і відносній вологості повітря 70 %, на якому спостерігались найвищі значення індексу росту і, відповідно, найменший час подвоєння біомаси калюсів.

Доведено, що калюсна маса за показниками вологості, загальної золи, золи не розчинної в НСІ та вмістом екстрактивних речовин є майже рівноцінною рослинній сировині *D. elatum*.

Проведено порівняльне дослідження вмісту фенольних сполук та флавоноїдів в екстрактах калюсної біомаси та рослинної сировини *D. elatum*. Визначено, що максимальний вміст фенольних сполук спостерігався в екстрактах калюсної біомаси і рослинної сировини *D. elatum*, виготовлених із використанням 40 % розчину етанолу, та становив

1,9883 та 2,0389 мг гальної кислоти в мл, відповідно. Максимальний вміст флавоноїдів встановлено в екстрактах калюсної біомаси і рослинної сировини *D. elatum*, виготовлених із використанням 40 % розчину етанолу, та становив 2,4478 та 2,6230 мг кверцетину в мл, відповідно. Вміст виявлених сполук в екстрактах рослинної сировини і в екстрактах калюсної біомаси *D. elatum* є практично однаковим, що дозволяє використовувати калюсну біомасу як альтернативну сировину для одержання біологічно активних речовин.

Досліджено антимікробну та антиоксидантну активність екстрактів калюсної біомаси та рослинної сировини *D. elatum*. Екстракти ЛРС та калюсної біомаси проявили рівну активність щодо клінічних та референтних ізолятів мікроорганізмів. Найактивнішу дію проявив екстракт ЛРС *D. elatum*, одержаний з використанням 90 % розчину етанолу, щодо Грам (+) мікроорганізмів та екстракт калюсної біомаси, виго-



товлений з використанням 90 % розчину етанолу, щодо грибів роду *Candida*.

Встановлено, що калюсна біомаса *D. elatum* за вмістом фенольних сполук та флавоноїдів, фармакологічною активністю не поступається рослинній си-

ровині і може бути використана як рівноцінна лікарська сировина при розробці нових фітозасобів.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflict of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

## FORMATION AND INVESTIGATION OF CALLUS MASS OF *DELPHINIUM ELATUM* L.

O. Khropot<sup>1</sup>, Ye. Bazavluk<sup>1</sup>, R. Konechna<sup>1</sup>, I. Hubytska<sup>1</sup>, Yu. Konechnyi<sup>2</sup>, I. Jasicka-Misiak<sup>3</sup>, P. Wieczorek<sup>3</sup>, V. Novikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lviv Polytechnic National University

<sup>2</sup>Danylo Halytsky Lviv National Medical University

<sup>3</sup>University of Opole, Poland

egor.bazavluk@gmail.com

**The aim of the work.** Introduce to culture *in vitro* *Delphinium elatum* L., investigate the effect of phytohormones on plant cell growth processes, determine optimal conditions of cultivation *in vitro*. Obtain extracts of biomass and plant materials of *D. elatum*, conduct a comparative study of biologically active compounds, antimicrobial and antioxidant properties.

**Materials and Methods.** Cultivation of *D. elatum* was performed on a modified Murashige and Skoog culture medium. Extracts were obtained by maceration method, as extractant used ethanol solutions in concentrations of 20, 40, 70 and 90 %. The total phenolic content was determined by spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent, the total flavonoid content – by colorimetric method with aluminium chloride. Antimicrobial activity was investigated on standard and clinical strains of microorganisms by diffusion in agar, antioxidant activity – by spectrophotometric method by interaction with stable chromogen radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

**Results and Discussion.** The optimal stratification scheme of *D. elatum* seeds with the highest yield of aseptic explants was selected: consecutive mechanical treatment, wetting with cold sterile water, refrigerator ageing, treatment with 70 % ethanol, sodium hypochlorite and sterilized bidistilled water.

The composition of the Murashige and Skoog culture medium, supplemented with phytohormones BAP and 2,4-D, where the highest specific growth rates and the shortest time of doubling the biomass of calluses were observed, was determined. The callus mass was obtained after 35 days of cultivation.

The total phenolic and flavonoids contents of *D. elatum* extracts were studied. It was determined that extracts of both callus biomass and plant material obtained with 40 % ethanol solution contain the highest number of phenolic compounds and flavonoids. Antimicrobial and antifungal activity of *D. elatum* extracts in relation to standard and clinical strains of some microorganisms was investigated. It was determined that maximum activity was shown by *D. elatum* extracts obtained with 40 % and 70 % ethanol solutions.

**Conclusions.** As a result of the research it was established that the *D. elatum* callus biomass in terms of content of phenolic compounds, flavonoids and pharmacological activity is not inferior to vegetable raw materials and can be used as an equivalent medicinal raw material.

**Key words:** *Delphinium elatum* L.; growth regulators; callus; phenolic compounds; flavonoids; extract; antimicrobial activity; antioxidant activity.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЛУСНОЙ МАССЫ *DELPHINIUM ELATUM* L.

O. Хропот<sup>1</sup>, Е. Базавлук<sup>1</sup>, Р. Конэчна<sup>1</sup>, И. Губицкая<sup>1</sup>, Ю. Конэчный<sup>2</sup>, И. Ясицка-Мисяк<sup>3</sup>, П. Вэчорэк<sup>3</sup>, В. Новиков<sup>1</sup>

Национальный университет «Львовская политехника»<sup>1</sup>

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого<sup>2</sup>

Опольский университет<sup>3</sup>, Польша

egor.bazavluk@gmail.com

**Цель работы.** Ввести в культуру *in vitro* *Delphinium elatum* L., исследовать влияние фитогормонов на процессы роста растительных клеток, определить оптимальные условия культивирования растения в условиях *in vitro*. Получить экстракты биомассы и растительного сырья *D. elatum*, провести сравнительное исследование содержания биологически активных соединений, антимикробных и антиоксидантных свойств.

**Матеріали и методи.** Культивування *D. elatum* проводили на модифіцированній поитательній середі Мурасиге–Скуга. Екстракти получали методом мацерации, як екстрагент использовали водно-етанольні розчини в концентраціях 20, 40, 70 и 90 %. Общее содержание фенольных соединений определяли спектрофотометрическим методом Фолина–Чокальтеу, общее содержание флавоноидов – колориметрическим методом с хлоридом алюминия. Антимикробную активность исследовали на стандартных и клинических штаммах микроорганизмов методом диффузии в агар, антиоксидантную активность – спектрофотометрическим методом путём взаимодействия со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом.

**Результаты и обсуждение.** Подобрано оптимальную схему стратификации семян *D. elatum* с наибольшим выходом асептических эксплантов: последовательные механическая обработка, смачивание холодной стерильной водой, выдержка в холодильнике, обработка 70 % этанолом, натрия гипохлоритом и стерелизированной бидистиллированной водой.

Определён состав поитательной среды Мурасиге–Скуга, дополненной фитогормонами БАП, 2,4-Д, на которой наблюдались наивысшие значения индекса роста и наименьшее время удвоения биомассы каллусов. Получено каллусную массу после 35 суток культивирования.

Исследовано общее содержание флавоноидов и фенольных соединений в экстрактах *D. elatum*. Определено, что экстракты как каллусной биомассы, так и растительного сырья, полученные с 40 % водно-етанольным раствором, содержат наибольшее количество фенольных соединений и флавоноидов.

Установлена противомикробная и противогрибковая активность экстрактов *D. elatum* по отношению к стандартным и клиническим штаммам некоторых микроорганизмов. Определено, что максимальную активность проявили экстракты *D. elatum*, полученные с 40 % и 70 % водно-етанольными растворами.

**Выводы.** В результате проведенных исследований установлено, что каллусная биомасса *D. elatum* по содержанию фенольных соединений, флавоноидов и фармакологической активности не уступает растительному сырью и может быть использована как равноценное лекарственное сырьё.

**Ключевые слова:** *Delphinium elatum* L.; регуляторы роста; каллус; фенольные соединения; флавоноиды; экстракт; антимикробная активность; антиоксидантная активность.

#### Список бібліографічних посилань

1. Червона книга України. Рослинний світ / Під ред. Дідуха Я. П. Київ : Глобалконсалтинг, 2009. 900 с.
2. Obtaining and research of callus mass of *Gentiana lutea* L. roots. R. T. Konechna, Yu. T. Konechnyi, R. O. Petrina et al. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2015. Vol. 6, No. 4. P. 1490–1495.
3. Plant regeneration from suspension cell culture of *Delphinium*. K. Shimizu, T. Yogai, F. Hashimoto, Y. Sakata. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 2004. Vol. 73. P. 435–440.
4. Hosokawa K., Koiwa H., Yamamura S. *In vitro* adventitious shoot formation on petioles of commercial cultivars of *Delphinium*. *Sci. Hortic.* 2001. Vol. 90. P. 143–150.
5. Increased 'growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. K. Murphy, J. M. Santamaria, W. J. Davibs, P. J. Lumsden. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 1998. Vol. 73. P. 725–729.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473-497.
7. Дослідження екстрактів калусної маси *Carlina acaulis* L. / P. Т. Конечна та ін. *Ukr. Biopharm. J.* 2015. № 4 (39). С. 57–61.
8. Kokotkiewicz A., Bucinski A., Luczkiewicz M. Light and temperature conditions affect bioflavonoid accumulation in callus cultures of *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush). *Plant Cell Tiss. Org.* 2014. Vol. 118, No. 3. P. 589-593.
9. Державна Фармакопея України. Доповнення 1 / Державне підприємство «Український науковий центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий центр якості лікарських засобів», 2009. 620 с.
10. Wilczyńska A. Phenolic content and antioxidant activity of different types of polish honey – A short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2010. Vol. 60, No. 4. P. 309-313.
11. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. A. Meda, Ch. Lamien, M. Romito et al. *Food Chem.* 2005. Vol. 91. P. 571-577.

#### References

1. Didukh YaP. Red Data Book of Ukraine. Flora [Червона книга України. Рослинний світ] Kyiv: Hlobalkonsaltingh; 2009. Ukrainian.
2. Konechna RT, Konechnyi YuT, Petrina RO, Shyukula RH, Wiczorek P, Jasicka-Misiak I, et al. Obtaining and research of callus mass of *Gentiana lutea* L. roots. *Res J Pharm Biol. Chem. Sci.* 2015;6(4): 1490-5.
3. Shimizu K, Yogai T, Hashimoto F, Sakata Y. Plant regeneration from suspension cell culture of *Delphinium* Hort J. 2004;73(5): 435-40. Available from: <https://doi.org/10.2503/jjshs.73.435>
4. Hosokawa K, Koiwa H, Yamamura S. *In vitro* adventitious shoot formation on petioles of commercial cultivars of *Delphinium*. *Sci Hortic.* 2001;90(1-2): 143-

50. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00249-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00249-1)
5. Murphy KP, Santamaria JM, Davibs WJ, Lumsden PJ. Ventilation of culture vessels. I. Increased 'growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. J. Horticult Sci Biotechnol. 1998;73: 725-9. Available from: <https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11511039>
  6. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. plant. 1962;15(3): 473-497. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
  7. Konechna RT, Petrino RO, Novikov VP, Konechnyi YuT, Shykula RH, Korniiuchuk OP. [Research of callus mass extracts *Carlina acaulis* L.]. Ukr Bioph J. 2015;4(39): 57-61.
  8. Kokotkiewicz A, Bucinski A, Luczkiewicz M. Light and temperature conditions affect bioflavonoid accumulation in callus cultures of *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush). РСТОС. 2014;118(3): 589-93. Available from: <http://dx.doi.org/10.15294/biosaintifika.v12i1.21704>
  9. State Pharmacopoeia of Ukraine. 1<sup>st</sup> edition. Appendix 1. [Державна Фармакопея України] Kharkiv: State Enterprise "Scientific Expert pharmacopoeia center"; 2004. Ukrainian.
  10. Wilczyńska A. Phenolic content and antioxidant activity of different types of Polish honey – A short report. Pol J Food Nutr Sci. 2010;6: 309-13.
  11. Meda A, Lamien Ch, Romito M, Millogo J, Nacoulma O. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem. 2005;91: 571-7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>

#### Відомості про авторів

**Хропот О. С.** – аспірант кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології, Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна. E-mail: Lvov.mp@gmail.com, ORCID 0000-0002-1985-3498.

**Базавлук Є. В.** – студент кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології, Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна. E-mail: egor.bazavluk@gmail.com, ORCID 0000-0003-0408-1605.

**Конечна Р. Т.** – канд. фармацевт. н., доцент кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології, Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна. E-mail: rkonechna@ukr.net, ORCID 0000-0001-6420-9063.

**Губицька І. І.** – канд. хім. н., доцент кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології, Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна. E-mail: ihubytka@gmail.com, ORCID 0000-0002-2552-0171.

**Конечний Ю. Т.** – аспірант кафедри мікробіології, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна. E-mail: yuliankonechnyi@gmail.com, ORCID 0000-0003-4789-1675.

**Ясіцька-Місяк І.** – габілітований доктор, професор кафедри аналітичної та екологічної хімії, Опольський університет, Ополь, Республіка Польща. E-mail: izajm@uni.opole.pl., ORCID 0000-0001-7788-5482.

**Вечорек П. П.** – габілітований доктор, професор, декан хімічного факультету, Опольський університет, Ополь, Республіка Польща. E-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl., ORCID 0000-0002-0016-0114.

**Новіков В. П.** – д. хім. н., професор, завідувач кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології, Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна. E-mail: volodymyr.p.novikov@lpnu.ua, ORCID 0000-0002-0485-8720.

#### Information about the authors:

**Khropot O. S.** – PhD student, Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology, Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine. E-mail: Lvov.mp@gmail.com, ORCID 0000-0002-1985-3498.

**Bazavluk Ye. V.** – student, Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology, Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine. E-mail: egor.bazavluk@gmail.com, ORCID 0000-0003-0408-1605.

**Konechna R. T.** – PhD (Pharmacy), Associate Professor of the Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology, Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine. E-mail: rkonechna@ukr.net, ORCID 0000-0001-6420-9063.

**Hubytka I. I.** – PhD (Chemistry), Associate Professor of the Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology, Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine. E-mail: ihubytka@gmail.com, ORCID 0000-0002-2552-0171.

**Konechnyi Y. T.** – PhD student, Department of Microbiology, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine. E-mail: yuliankonechnyi@gmail.com, ORCID 0000-0003-4789-1675.

**Jasicka-Misiak I.** – doctor habilitatus, Professor at the Department of Analytical and Ecological Chemistry, University of Opole, Poland. E-mail: izajm@uni.opole.pl, ORCID 0000-0001-7788-5482.

**Wieczorek P. P.** – doctor habilitatus, Professor, Dean of the Faculty of Chemistry, University of Opole, Poland. E-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl, ORCID 0000-0002-0016-0114.

**Novikov V. P.** – DS (Chemistry), Professor, Head of the Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology Department, Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine. E-mail: volodymyr.p.novikov@lpnu.ua, ORCID 0000-0002-0485-8720.