





Изучение физико-химических свойств и биологической активности экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro*

Йонг Янг¹, Л. К. Асякина², О. О. Бабич³, Л. С. Дышлюк², С. А. Сухих^{3,*},
А. Д. Попов³, Н. В. Костюшина³



¹ Цицикарский университет,
161006, Китай, г. Цицикар, ул. Венхуа, 42

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»,
650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6

³ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»,

236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14

Дата поступления в редакцию: 29.06.2020
Дата принятия в печать: 28.08.2020

*e-mail: stas-asp@mail.ru



© Йонг Янг, Л. К. Асякина, О. О. Бабич, Л. С. Дышлюк, С. А. Сухих, А. Д. Попов, Н. В. Костюшина, 2020

Аннотация.

Введение. Одной из актуальных проблем медицины и биологии является использование растительных объектов в качестве промышленных продуцентов целевых метаболитов *in vitro*. Цель работы: состояла в изучении физико-химических свойств и биологической активности экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro*.

Объекты и методы исследования. Лекарственные растения, произрастающие в Сибирском федеральном округе. Физико-химические свойства, такие как содержание золы, тяжелых металлов, органических растворителей, определялись стандартными методиками. Антимикробные свойства *in vitro* экстрактов определялись диффузионным методом и методом, основанным на измерении оптической плотности. В качестве условно-патогенных и патогенных тест-штаммов микроорганизмов использовались: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. vulgaris* ATCC 63, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ЭМТК 34. Используя МТТ-колориметрический метод, проводили определение количества жизнеспособных раковых клеток.

Результаты и их обсуждение. В работе представлены результаты исследования физико-химических свойств, показателей безопасности, антиоксидантной активности, антимикробной активности и противоопухолевых свойств экстрактов комплекса биологически активных веществ из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro*. Доказано, что максимальные антимикробные и цитотоксические свойства характерны для экстрактов из высушенной биомассы корневых культур *in vitro* лекарственных растений. Установлено, что они способны снижать выживаемость раковых клеток до 24,8–36,8 %.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракты из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* левзеи сафлоровидной (*Leuzea carthamoides* L.), родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* L.), шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* L.), шлемника обыкновенного (*Scutellaria galericulata* L.), лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) и женьшеня (*Panax* L.) могут быть использованы для производства фармацевтических препаратов и биологически активных добавок противоопухолевого, антимикробного и антиоксидантного действия.

Ключевые слова. Лекарственные растения, биологически активные добавки, клетки растений, культура клеток, бактерии

Финансирование. Работа выполнена в рамках реализации соглашения № 075-15-2019-1362 от 14.06.2019 с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) по программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы». Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57718X0285.

Для цитирования: Изучение физико-химических свойств и биологической активности экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro* / Йонг Янг, Л. К. Асякина, О. О. Бабич [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 3. – С. 480–492. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-480-492>.

Physicochemical properties and biological activity of extracts of dried biomass of callus and suspension cells and *in vitro* root cultures

Yong Yang¹, Lyudmila K. Asyakina², Olga O. Babich³, Lyubov S. Dyshlyuk², Stanislav A. Sukhikh^{3,*}, Alexander D. Popov³, Nina V. Kostyushina³

¹ Qiqihar University,
42, Wenhua Str., Qiqihar, 161006, China

² Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia

³ Immanuel Kant Baltic Federal University,
14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia

Received: June 29, 2020

Accepted: August 28, 2020

*e-mail: stas-asp@mail.ru



© Yong Yang, L.K. Asyakina, O.O. Babich, L.S. Dyshlyuk, S.A. Sukhikh, A.D. Popov, N.V. Kostyushina, 2020

Abstract.

Introduction. One of the urgent problems of medicine and biology is the use of plant objects as industrial producers of target metabolites *in vitro*. *In vitro* cells can be used as pharmaceutical preparations.

Study objects and methods. The present research featured medicinal plants that grow in the Siberian Federal district and are a popular source of medicinal raw materials. The physicochemical properties, e.g. total ash content in extracts, the content of heavy metals, the content of organic solvents in the extracts, and the mass loss upon drying was determined by standard methods. The antimicrobial properties of *in vitro* extracts were determined by the diffusion method and the method based on optical density measurement. The list of opportunistic and pathogenic test strains included the following microorganisms: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. vulgaris* ATCC 63, *P. aeruginosa* ATCC 9027, and *C. albicans* EMTC 34. The number of viable cancer cells was determined using the MTT colorimetric method.

Results and discussion. The paper describes the physicochemical properties, safety indicators, antioxidant activity, antimicrobial activity, and antitumor properties of extracts of a complex of biologically active substances obtained *in vitro* from the dried biomass of callus and suspension cell cultures and root cultures. The root extracts proved to have the maximum antimicrobial and cytotoxic properties. They could reduce the survival rate of cancer cells to 24.8–36.8 %.

Conclusion. The research featured extracts obtained from the dried biomass of callus and suspension cell cultures and root cultures *in vitro* of safflower leuzea (*Leuzea carthamoides* L.), *Rhodiola rosea* (*Rhodiola rosea* L.), various sorts of skullcap (*Scutellaria baicalensis* L., *Scutellaria andrachnoides* L., *Scutellaria galericulata* L.), *Potentilla alba* (*Potentilla alba* L.) and ginseng (*Panax* L.). The results showed that the extracts can be used for the production of pharmaceuticals and biologically active additives with antitumor, antimicrobial, and antioxidant properties.

Keywords. Medicinal plants, biologically active additives, plant cells, cell culture, bacteria

Funding. The research is part of agreement No. 075-15-2019-1362 dated June 14, 2019, with the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauka), program “Research and Development in Priority Areas of Development of the Scientific and Technological Complex of Russia for 2014–2020”, unique project identifier RFMEFI57718X0285.

For citation: Yang Y, Asyakina LK, Babich OO, Dyshlyuk LS, Sukhikh SA, Popov AD, et al. Physicochemical properties and biological activity of extracts of dried biomass of callus and suspension cells and *in vitro* root cultures. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(3):480–492. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-480-492>.

Введение

Состояние здоровья и среды обитания, качество продуктов питания и лекарственных препаратов не удовлетворяют потребности современного человека. В России неуклонно растет число лиц, страдающих или склонных к различным неинфекционным заболеваниям NCD (болезни сердца и сосудов, рак, бронхиальная астма, сахарный диабет и др.), которые имеют длительную продолжительность

и являются результатом сочетания генетических, физиологических, экологических и поведенческих факторов [1].

Известно, что до 70 % лекарственных противоопухолевых препаратов либо полностью растительного происхождения, либо содержат компоненты растительного происхождения. Однако, в связи с неблагоприятной экологической обстановкой, а также интенсивно возрастающим

уровнем потребности в лекарственном сырье, возникает его дефицит. Новым решением является использование в качестве альтернативного источника возобновляемого экологически чистого сырья культур клеток и органов (бородатых корней, hairy roots) высших растений [2].

Культура клеток высших растений представляет собой уникальную, экспериментально созданную биологическую систему – популяцию растительных соматических клеток. В результате фундаментальных исследований было показано, что клетки *in vitro* по ряду характеристик отличаются от клеток интактного растения. Это касается интенсивности роста клеток, а также особенностей синтеза и накопления в них биологически активных веществ [3–5]. Клетки в культуре интенсивно делятся. При оптимальных условиях выращивания продуктивность по биомассе суспензионных культур может составить более грамма сухой биомассы с литра среды за сутки. Качественный и количественный состав вторичных метаболитов в клетках *in vitro* может отличаться от подобного состава интактных растений [6–9]. В культуре клеток содержание этих веществ может быть ниже, чем в целых растениях. Однако известны примеры, когда клетки *in vitro* в несколько раз превосходили по содержанию биологически активных веществ интактные растения (стероидные гликозиды в культуре клеток диоскореи дельтовидной, шиконин в культуре клеток воробейника краснокорневого, берберин в культуре клеток барбариса и др.) [10–13].

В плане практическое использование культур клеток и органов в растительной промышленной биотехнологии. К настоящему времени в мире известно лишь несколько эффективных биотехнологических производств, основанных на крупномасштабном выращивании культур клеток и органов высших растений. На фирме CBN Biotech организовано крупномасштабное выращивание адвентивных корней женьшеня настоящего в биореакторах объемом 10000 литров. По сравнению с культурой клеток адвентивные корни *in vitro* растут медленнее. Однако композиция биологически активных веществ в органах *in vitro* близка к подобной у интактных органах. В Германии крупномасштабное производство биомассы культуры клеток тиса организовано на фирме Phyton (г. Аренсбург), где создана промышленная линия с конечным биореактором объемом 75000 литров [14–16].

Адвентивные корни являются медленно растущими. Поэтому ряд западных фирм (французская Root Lines Technology, швейцарская ROOTec) предпочитают использовать не адвентивные корни, а быстрорастущие бородатые корни (hairy roots). Однако большинство коммерческих разработок вышеназванных фирм засекречены [17, 18].

Использование технологии hairy roots выгодно и с экономической точки зрения. Например, артемизинин – сесквитерпен растительного происхождения – еще в 1994 г. был рекомендован Всемирной организацией здравоохранения в качестве высокоэффективного препарата для борьбы с малярией, которая является весьма распространенным и опасным заболеванием. По данным ВОЗ, например, в 2010 г. число заболевших малярией в мире превысило 200 млн. человек и смертельных исходов зафиксировано более 655 тысяч. В связи с этим необходимо иметь действенное средство от этой болезни [19]. Однако содержание артемизинина в полыни однолетней невелико (от 0,01 до 0,42 %), что делает его экстракцию нерентабельной. Химический синтез артемизинина весьма сложен, многостадийен и характеризуется крайне низким выходом. Попытки увеличить содержание природного артемизинина в культурах тканей, в том числе каллусных, особого успеха не имели. Культура «hairy roots» обеспечила повышенный выход данного вторичного метаболита – лекарственного препарата. В связи с этим разными авторами из многих стран с помощью разных штаммов *A. rhizogenes* созданы многочисленные культуры *Artemisia annua*, отличающиеся по эффективности накопления целевого продукта.

Культуры клеток и органов растений могут быть использованы также как сырье для химического синтеза важных продуктов фармацевтики. Например, для лечения онкологических заболеваний используется паклитаксел (коммерческое название «Таксол»). Это вещество терпеноидной природы содержится в крайне малых количествах (менее 0,1 %) в коре ряда видов тиса *Taxus* – медленно растущих хвойных деревьев. Для проведения только одного курса химиотерапии необходимо уничтожение 8–10 взрослых дерева тиса. В Германии на фирме Phyton организовано крупномасштабное производство биомассы культуры клеток тиса в биореакторах объемом 75000 литров [5–7]. Однако содержание паклитаксела в культуре клеток также невысоко и стоимость конечного продукта (паклитаксела) составляет \$2–3 млн. за 1 кг. Обсуждается вариант биотехнологического производства не конечного продукта, а его предшественников (например, баккатина III) в суспензионной культуре клеток тиса ягодного. При этом стоимость конечного продукта планируется снизить до \$600 тыс за 1 кг. В настоящее время наиболее рентабельным производством паклитаксела считается наработка в культуре растительных клеток его предшественника – 10-деацетилбаккатина III, который методом полусинтеза превращают в пакли-таксел. В настоящее время имеются сообщения о создании трансгенных растений араби-допсиса *Arabidopsis thaliana* и томата *Solanum lycopersicum*, в которых введенные гены изменяют пути метаболизма изопреноидов.

Это привело к наработке различных таксадиенов – предшественников паклитаксела [8, 9].

В России до сих пор не уделяется должного внимания *in vitro* культурам высших растений – продуцентам биологически активных соединений. Лишь несколько научных групп по всей России ведут фундаментальные и прикладные исследования, используя в качестве модельных объектов каллусные культуры. При этом успешно реализованные в этой области коммерческие проекты в России практически отсутствуют. К настоящему времени известен лишь один пример производства на основе биомассы суспензионной культуры клеток парафармацевтического препарата «Витагмал», который был создан усилиями сотрудников Института физиологии растений РАН (Отдел биологии клетки и биотехнологии под руководством А. М. Носова) и коммерческой фирмой «БИОФАРМОС» (Санкт-Петербург). Препарат имеет выраженное антигератогенное действие. В Институте физиологии растений РАН созданы коллекции культур клеток – продуцентов биологически активных веществ (ВРКК РФ) и культивируемых *in vitro* корней, полученных от более чем 40 видов растений, относящихся к 20 семействам.

Известно, что биологически активные вещества, содержащиеся в лекарственных растениях, обладают широким спектром физиологической активности, в частности антимикробной, антиоксидантной и противоопухолевой. Так, показан иммуномодулирующий, антимикробный и антимикотический эффект кофейной кислоты, а также ее способность к поглощению супероксидного радикала, образующегося в ходе аутоокисления адреналина *in vitro* [16]. Кофейная кислота при пероральном применении ингибирует рост и выживаемость линий опухолевых клеток у кроликов, обладает гепатопротекторным действием у крыс, наряду с феруловой кислотой оказывает кардиопротекторный эффект, увеличивая время жизни у крыс с аритмией [6, 20, 24]. В исследовании Х. Ли с соавторами кофейная кислота дозозависимо подавляет бактериальные активности *E. coli* и *P. aeruginosa* как в интактных клетках, так и в цитозольных экстрактах желудочно-кишечного тракта человека [14].

Рутин, относящийся к классу флавоноидов, обладает широким спектром биологической активности, в основе которой находятся ярко выраженные антиоксидантные свойства [2, 16, 19]. В разных модельных системах *in vitro* рутин проявляет антирадикальную активность, сравнимую или превосходящую активность таких природных антиоксидантов, как витамины Е и С [21]. В то же время в исследованиях *in vivo* в условиях окислительного стресса разной этиологии было обнаружено, что антиоксидантная активность

рутина связана не только с его антирадикальными свойствами, но и со способностью активировать антиоксидантные ферменты [12, 13, 16, 22].

Встречающийся во многих растениях флаваноид кверцетин относится к полифенольным соединениям и является вторичным метаболитом. Способность кверцетина захватывать пероксинитриты и гидроксильные радикалы, обладающие высокой реакционной способностью, является доказательством обладания протекторного свойства [7, 23]. Кверцетин – это один из самых мощных антиоксидантов среди полифенолов [5, 18, 24]. Также были продемонстрированы его противовирусные, антибактериальные, противораковые и противовоспалительные эффекты [3, 8]. Антисканцерогенные свойства кверцетина проявляются за счет его значительного воздействия на увеличение апоптоза в мутантных клетках, ингибирование синтеза ДНК, ингибирование роста раковых клеток, снижение и модификация сотовой сигнальной трансдукции [25].

Мангиферин обладает высокой биологической активностью, что подтверждают современные зарубежные исследования. Выявлена иммунопротекторная, радиопротекторная, антиоксидантная активность [10, 11, 17, 26]. Мангиферин обладает протекторной функцией при индуцированном инфаркте миокарда, восстанавливая антиоксидантные свойства ферментов сердечной ткани. Отмечено высокоэффективное действие мангиферина в предотвращении сердечно-сосудистых дисфункций благодаря антиоксидантным и кардиотоническим свойствам [27].

Цель данной работы – изучить физико-химические свойства и биологическую активность экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro*.

В задачи исследований входило определение массовой доли влаги, массовой доли сухой золь, убыли массы при высушивании, остаточного растворителя, антимикробной и цитотоксичной активности экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro* лекарственных растений.

Новизна данной работы заключается в разработке научно обоснованных подходов к исследованию *in vitro* изолированных клеток и «бородатых корней» лекарственных растений Сибирского региона с целью доказательства цитотоксических, антимикробных и антиоксидантных свойств, востребованных фармацевтическими предприятиями. Полученные культуры *in vitro* характеризуются такими преимуществами, как быстрый прирост биомассы, контролируемые условия выращивания, стабильные ростовые характеристики, синтез целевых биологически активных веществ, возможность культивирования в биореакторе, что позволяет получать растительное сырье круглогодично.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования в работе выбраны лекарственные растения, произрастающие в Сибирском федеральном округе и широко востребованные для получения лекарственного сырья: левзея сафлоровидная (*Leuzea carthamoides* L.), родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.), шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* L.), шлемник андрахновидный (*Scutellaria andrachnoides* L.), шлемник обыкновенный (*Scutellaria galericulata* L.), лапчатка белая (*Potentilla alba* L.) и женьшень (*Panax* L.)

Процесс экстрагирования биологически активных веществ (БАВ) осуществлялся следующим образом. Навеску 3,0 г сухого растительного сырья, взвешенную с точностью до 0,001 г, помещали в пластиковую пробирку объемом 50 мл, добавляли 40 мл соответствующего растворителя, помещали в шейкер и перемешивали в течение 60 мин. Сухую массу отделяли от раствора фильтрованием. Фильтрат дополнительно центрифугировали при 3900 об/мин для удаления взвешенных частиц. Растворитель из экстракта упаривали при пониженном давлении из предварительно взвешенной колбы объемом 100 мл. Колбу взвешивали и определяли выход экстракта. Остаток растворяли в минимальном количестве подходящего растворителя и фракционный состав полученного раствора исследовали методом тонкослойной хроматографии. Полученные результаты ТСХ для каждого растения архивировали и анализировали на предмет наличия веществ свидетелей, которыми выступали: кверцетин, мангиферин, лютеолин, рутин, кверцетин-2-D-глюкозид, кофейная кислота, коричная кислота, феруловая кислота, синапиновая кислота и мальвидин [6].

Пластинку помещали в камеру для тонкослойной хроматографии (ТСХ), в которую добавляли соответствующий элюент. В случае использования ТСХ на силикагеле без модификации хроматографию проводили в градиентном режиме в системе CH₂Cl₂:MeOH с градиентом метанола 0–10 % с шагом в 1 %. В случае обращенно-фазовой хроматографии использовали элюентную систему H₂O:MeCN с градиентом ацетонитрила 0–20 % с шагом 2 %. В качестве модификатора использовали трифторуксусную кислоту, которую добавляли в количестве 0,1 %.

После экстракции образцы БАВ сушили с помощью инфракрасной сушильной камеры при температуре 40 °С в течение 30 мин. Данная щадящая сушка позволяет сохранить весь набор индивидуальных БАВ, выделенных из каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro*.

Далее проводился анализ физико-химических свойств и показателей безопасности экстрактов из

высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* лекарственных растений. В качестве физико-химических показателей выбраны массовая доля влаги, массовая доля сухой золы, убыль массы при высушивании, остаточный растворитель и антиоксидантная активность. В качестве основного показателя, по которому проводили оценку безопасности экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro*, выбрано содержание тяжелых металлов.

Содержание общей золы в экстрактах определяли по методу, описанному в ОФС.1.2.2.2.0013.15. Содержание тяжелых металлов устанавливали по методу, описанному в ОФС.1.2.2.2.0012.15. Содержание органических растворителей в экстрактах определяли по методу ОФС.1.1.0008.15. Потерю массы при высушивании оценивали согласно методике ОФС.1.2.1.0010.15. Для проведения анализа используют бюксы высотой 35 мм и диаметром 25 мм. Точную навеску 0,15–0,20 г испытуемого образца помещают в бюкс и высушивают с открытой крышкой при температуре 60 ± 1 °С и остаточном давлении, не превышающем 0,667 кПа (5 мм рт. ст.), в течение 3 ч. Открытый бюкс вместе с крышкой помещают в эксикатор для охлаждения на 40 мин, после чего закрывают крышкой и взвешивают.

Потерю в массе при высушивании (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\%$$

где m_1 – масса бюкса, доведенного до постоянной массы, г;

m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г;

m_3 – масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

Определение содержания свинца, кадмия, мышьяка, ртути, хрома, олова проводили по ГОСТ Р 55447-2013. Содержание меди, цинка, кобальта устанавливали, используя ГОСТ Р 56372-2015. Определение ртути проводили согласно ГОСТ 34427-2018. Содержание тяжелых металлов и мышьяка в растительных экстрактах выявляли по ОФС.1.5.3.0009.15.

Навеску высушенного экстракта массой 0,2–0,5 г, взятую с точностью до 0,0001 г, помещали в тefлоновый сосуд, добавляли 5 мл концентрированной азотной кислоты и 2 мл 30 % перекиси водорода и подвергали мокрому озолению в микроволновом минерализаторе MARS 6. Полученный раствор после минерализации разбавляли в мерной колбе до 50 мл и проводили анализ тяжелых металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ОФС.1.2.1.1.0006.15) с использованием ламп селективного излучения

методом внешнего стандарта. При определении ртути применяли беспламенную атомную абсорбцию с использованием установки получения свободного пара ртути.

Определение содержания остаточных пестицидов в растительных экстрактах проводили согласно методу, описанному в ОФС.1.5.3.0011.15. Остаточное количество растворителя в экстрактах определяли с использованием метода газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ОФС.1.2.1.1.0008.15) и масс-спектрометра типа MALDI-TOF (Bruker, Германия),

В качестве стандартов использовались ГСО стандарты растворителей, используемых при получении экстрактов: ГСО ацетон, ГСО этиловый спирт, ГСО метанол, ГСО эфир диэтиловый, ГСО изопропанол, ГСО этилацетат. ГСО были использованы в качестве внешнего стандарта и для построения калибровочной кривой. Идентификацию остаточных растворителей проводили, сопоставляя времена удерживания стандартных веществ и анализируемой пробы, а также с помощью масс-селективного детектора. Параметры настройки ГХ/МС при проведении анализа: скорость потока газа носителя 1 мл/мин, температура канала ввода пробы 250 °С, градиент температуры термостата от 50 до 150 °С за 10 мин, интерфейс ввода, устройство дозирования равновесного пара, температура интерфейса 90 °С, разогрев пробы в виале до 120 °С, уравнивание давления до 2 бар, скорость потока газа в линии носителя 5 мл/мин. Детектирование MS ионизация, электронный удар, диапазон детектирования 50–300 Мз, напряжение ФЭУ 3 кВ, режим сканирования – общий ионный ток + SEMI.

Антимикробные свойства *in vitro* экстрактов определялись в отношении роста условно-патогенных и патогенных тест-штаммов микроорганизмов диффузионным методом и методом, основанным на измерении оптической плотности.

В качестве условно-патогенных и патогенных тест-штаммов микроорганизмов использовали следующие медицинские и природные тест-штаммы: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. vulgaris* ATCC 63, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ЭМТК 34. Выбор тест-штаммов для исследования антимикробной активности экстрактов лекарственных растений обусловлен тем, что тестируемые штаммы вызывают заболевания у человека. *Escherichia coli* – условно-патогенная бактерия, вызывающая гастроэнтерит. *Staphylococcus aureus* – патогенная бактерия, вызывающая пневмонию, менингит, остеомиелит, эндокардит, инфекционно-токсический шок и сепсис. *Proteus vulgaris* – условно-патогенная бактерия, вызывающая кишечные инфекции. *Pseudomonas aeruginosa* – условно-патогенная бактерия, вызывающая нозокомиальные инфекции. *Candida albicans* – микроскопический гриб, возбудитель оппортунистических инфекций.

Диффузионный метод определения антимикробной активности экстрактов лекарственных растений заключался в следующем. Тест-штамм высевался на агаризованную питательную среду газонем и одновременно на газон помещали анализируемые экстракты. В качестве контроля использовался бумажный диск с питательной средой, препарата сравнения – диск с антибиотиком ципрофлоксацином (из стандартного набора). Чашки Петри инкубировались при температуре, соответствующей оптимальной температуре роста каждого тест-штамма, в течение 24 часов. Результаты учитывались по наличию и размеру (в мм) прозрачной зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска [13].

В случае использования второго метода для оценки антимикробного действия экстрактов проводили совместное инкубирование клеточных культур с исследуемыми экстрактами в 96-луночных планшетах для культивирования. Ночные бульонные культуры ресуспендировали в среде Мюллера-Хинтона (*Candida albicans* – в среде Сабуро), доводя количество микроорганизмов до посевной дозы $\sim 10^5$ КОЕ/мл. В лунки одновременно вносили клеточную суспензию и исследуемые экстракты в количестве 1/10 общего объема. Контроль – MRS. Препарат сравнения – ципрофлоксацин (10 мкг/мл). Общий объем суспензии в лунке – 200 мкл. Количество повторов – 2. Инкубировали при 35 °С на качалке (580 об/мин). Через 24 ч проводили измерение оптической плотности (ОП) на мультиридере при длине волны 595 нм. Наличие бактерицидности оценивали по изменению ОП в сравнении с контролем. В лунках, где рост клеток остановился или замедлился, ОП была ниже, чем в лунках с нормальным ростом микроорганизмов.

Фотометрия позволяет сравнить и оценить, насколько происходит изменение значения оптической плотности исследуемого раствора по отношению к контролю с изменением числа жизнеспособных клеток. На таких раковых клеточных линиях, как рак поджелудочной железы человека PANC-1, лимфома Беркитта ЛБР2 осуществлялось тестирование экстрактов *in vitro*. Для этого в специализированной среде RPMI 1640, которая в своём составе содержит фетальную бычью сыворотку с концентрацией 10 % от общего объема, 2 мМ L-глутамин и в равных концентрациях пенициллин и сульфат стрептомицин (100 мкг/мл), осуществляли культивирование раковых клеток при температурном режиме 37 °С. Осуществляли световую микроскопию при изучении клеток. Клеточную жизнеспособность определяли с использованием камеры Горяева.

При достижении раковыми клетками логарифмической фазы роста осуществляли их распределение в 96-луночные микропланшеты («Costar») с концентрацией 5×10^4 – $6,5 \times 10^4$ клеток

на каждую лунку. После этого рассредоточенные клетки по лункам инкубировали в течение суток, прежде чем добавить к ним исследуемые экстракты лекарственных растений, при условиях, что концентрация углекислого газа составляла около 5 %, а температура при этом поддерживалась на уровне 37 °С. По истечении 24 ч исследуемые экстракты добавляли в лунки с раковыми клетками и проводили культивирование на протяжении 48 ч. Используя МТТ-колориметрический метод, проводили определение количества жизнеспособных клеток после завершения инкубационного периода [11].

Цитотоксичность тестируемых экстрактов оценивали по формуле:

$$C=1 - \frac{N_o}{N_k} \cdot 100 \%$$

где N_o – оптическая плотность в опытных пробах;

N_k – оптическая плотность в контроле.

Результаты и их обсуждение

В результате исследования эффективности различных экстракционных систем получены максимальные по выходу тотальные экстракты из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro*.

Результаты исследования физико-химических свойств и показателей безопасности экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* лекарственных растений приведены в таблицах 1–3.

Результаты исследования физико-химических свойств экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы каллусных культур клеток лекарственных растений (табл. 1) показывают, что все исследуемые образцы характеризуются низким содержанием влаги. Также показано, что в полученных экстрактах практически не содержится органический растворитель. Для всех исследуемых образцов значение показателя остаточного растворителя составляет менее 0,003 мкг/кг. Результаты свидетельствуют о том, что экстракты комплекса БАВ проявляют антиоксидантную активность. Так, экстракты комплекса БАВ из высушенной биомассы каллусных культур клеток лапчатки белой характеризуются высокой антиоксидантной активностью. Значение показателя антиоксидантной активности у данных экстрактов составляет от 1,14 до 4,08 мгDPPH/кг.

Анализ результатов, характеризующих физико-химические свойства экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы суспензионных культур клеток лекарственных растений (табл. 2), свидетельствует о том, что уровень влаги в полученных экстрактах находится от 1,31 до 2,87 %. Массовая доля золы полученных экстрактов комплекса не превышает 1,51 %. Также показано, что в полученных экстрактах практически не содержится органический растворитель. Данный показатель не превышает 0,003 мкг/кг. Подробное изучение показателя антиоксидантной активности позволило сделать вывод о том, что все исследуемые экстракты обладают высокой антиоксидантной активностью. Максимальной антиоксидантной активностью

Таблица 1. Результаты исследования физико-химических свойств и показателей безопасности экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы каллусных культур клеток лекарственных растений

Table 1. Physicochemical properties and safety indicators of extracts of the BAS complex obtained from the dried biomass of callus cell cultures of medicinal plants

Наименование показателя	Значение показателя для экстрактов, полученных из биомассы каллусных культур лекарственных растений						
	Левзея сафлоровидная	Родиола розовая	Шлемник байкальский	Шлемник андрахновидный	Лапчатка белая	Женьшень	Шлемник обыкновенный
Массовая доля влаги, %	2,08 ± 0,10	1,71 ± 0,09	1,23 ± 0,06	1,31 ± 0,07	1,87 ± 0,09	2,31 ± 0,12	1,47 ± 0,07
Массовая доля золы, %	0,41 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,63 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,79 ± 0,04
Убыль массы при высушивании, %	0,09 ± 0,010	0,11 ± 0,010	0,13 ± 0,010	0,05 ± 0,003	0,07 ± 0,004	0,07 ± 0,010	0,06 ± 0,003
Содержание остаточного растворителя, мкг/кг	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003
Антиоксидантная активность, мгDPPH/кг	1,14 ± 0,06	1,47 ± 0,07	1,35 ± 0,07	1,08 ± 0,05	3,55 ± 0,18	1,25 ± 0,06	1,71 ± 0,09
Содержание свинца, мг/кг	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Содержание кадмия, мг/кг	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
Содержание меди, мг/кг	1,54 ± 0,08	1,21 ± 0,06	1,34 ± 0,07	1,47 ± 0,07	1,17 ± 0,06	3,27 ± 0,16	1,87 ± 0,09
Содержание цинка, мг/кг	0,43 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,81 ± 0,04	0,53 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,63 ± 0,03
Содержание железа, мг/кг	1,21 ± 0,06	1,41 ± 0,07	1,74 ± 0,09	1,52 ± 0,08	1,81 ± 0,09	1,78 ± 0,09	1,51 ± 0,08
Содержание мышьяка, мг/кг	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Содержание ртути, мг/кг	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Таблица 2. Результаты исследования физико-химических свойств и показателей безопасности экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы суспензионных культур клеток лекарственных растений

Table 2. Physicochemical properties and safety indicators of extracts of the BAS complex obtained from the dried biomass of suspension cultures of medicinal plant cells

Наименование показателя	Значение показателя для экстрактов, полученных из биомассы суспензионных культур лекарственных растений						
	Левзея сафлоровидная	Родиола розовая	Шлемник байкальский	Шлемник андрахновидный	Лапчатка белая	Женьшень	Шлемник обыкновенный
Массовая доля влаги, %	2,21 ± 0,11	1,51 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,97 ± 0,10	1,41 ± 0,07	2,87 ± 0,14	1,12 ± 0,06
Массовая доля золы, %	0,79 ± 0,04	1,12 ± 0,06	1,04 ± 0,05	0,98 ± 0,05	1,51 ± 0,08	0,52 ± 0,03	0,49 ± 0,03
Убыль массы при высушивании, %	0,17 ± 0,01	0,85 ± 0,04	0,67 ± 0,03	0,98 ± 0,05	0,26 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,55 ± 0,08
Содержание остаточного растворителя, мкг/кг	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003
Антиоксидантная активность, мгDPPH/кг	10,47 ± 0,52	5,31 ± 0,27	4,02 ± 0,20	3,04 ± 0,15	3,47 ± 0,17	10,22 ± 0,51	3,12 ± 0,16
Содержание свинца, мг/кг	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Содержание кадмия, мг/кг	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
Содержание меди, мг/кг	1,31 ± 0,07	1,27 ± 0,06	1,61 ± 0,08	1,21 ± 0,06	1,11 ± 0,06	2,21 ± 0,11	1,33 ± 0,07
Содержание цинка, мг/кг	0,63 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,96 ± 0,05	0,21 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,36 ± 0,02
Содержание железа, мг/кг	1,01 ± 0,05	1,27 ± 0,06	1,47 ± 0,07	1,25 ± 0,06	1,18 ± 0,06	1,21 ± 0,06	1,15 ± 0,06
Содержание мышьяка, мг/кг	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Содержание ртути, мг/кг	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Таблица 3. Результаты исследования физико-химических свойств и показателей безопасности экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы корневых культур *in vitro* лекарственных растений

Table 3. Physicochemical properties and safety indicators of extracts of the BAS complex obtained from the dried biomass of *in vitro* root cultures of medicinal plants

Наименование показателя	Значение показателя для экстрактов, полученных из биомассы корневых культур <i>in vitro</i> лекарственных растений						
	Левзея сафлоровидная	Родиола розовая	Шлемник байкальский	Шлемник андрахновидный	Лапчатка белая	Женьшень	Шлемник обыкновенный
Массовая доля влаги, %	1,12 ± 0,06	1,71 ± 0,09	1,32 ± 0,07	1,13 ± 0,06	1,63 ± 0,08	1,73 ± 0,09	1,87 ± 0,09
Массовая доля золы, %	0,71 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,69 ± 0,03
Убыль массы при высушивании, %	0,03 ± 0,001	0,08 ± 0,010	0,10 ± 0,005	0,01 ± 0,005	0,06 ± 0,003	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001
Содержание остаточного растворителя, мкг/кг	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003
Антиоксидантная активность, мгDPPH/кг	4,32 ± 0,22	6,71 ± 0,34	8,78 ± 0,44	9,14 ± 0,46	14,57 ± 0,73	5,81 ± 0,29	10,47 ± 0,52
Содержание свинца, мг/кг	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Содержание кадмия, мг/кг	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
Содержание меди, мг/кг	1,14 ± 0,06	1,72 ± 0,09	1,16 ± 0,06	1,18 ± 0,06	1,67 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,87 ± 0,09
Содержание цинка, мг/кг	0,71 ± 0,04	0,43 ± 0,02	0,76 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,76 ± 0,04
Содержание железа, мг/кг	1,08 ± 0,05	1,37 ± 0,07	1,72 ± 0,09	1,34 ± 0,07	1,12 ± 0,06	1,11 ± 0,06	1,65 ± 0,08
Содержание мышьяка, мг/кг	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Содержание ртути, мг/кг	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

обладают экстракты комплекса БАВ из высушенной биомассы суспензионных культур клеток женьшеня и левзеи сафлоровидной.

Наибольшей антиоксидантной активностью обладают экстракты комплекса БАВ из высушенной биомассы корневых культур *in vitro* лекарственных растений (табл. 3).

Подробный анализ результатов изучения показателей безопасности экстрактов комплекса БАВ из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* лекарственных растений, приведенных в таблицах 1–3, свидетельствует о том, что полученные экстракты безопасны, поскольку их показа-

Таблица 4. Результаты определения антимикробной активности экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* лекарственных растений диффузионным методом

Table 4. Antimicrobial activity of extracts obtained from dried biomass of callus and suspension cell cultures and *in vitro* root cultures of medicinal plants: diffusion method

Лекарственное растение	Диаметр зоны ингибирования разных тест-штаммов, мм, для экстрактов каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур <i>in vitro</i> лекарственных растений				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. vulgaris</i> ATCC 63	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. albicans</i> ЭМТК 34
Левзея сафлоровидная	14,0 ± 0,7	17,0 ± 0,9	16,0 ± 0,8	15,0 ± 0,8	16,0 ± 0,8
	16,0 ± 0,8	13,0 ± 0,7	14,0 ± 0,7	14,0 ± 0,7	15,0 ± 0,8
	21,0 ± 1,1*	19,0 ± 1,0	22,0 ± 1,1	23,0 ± 1,2	21,0 ± 1,2
Родиола розовая	12,0 ± 0,6	15,0 ± 0,8	14,0 ± 0,7	17,0 ± 0,9	16,0 ± 0,8
	11,0 ± 0,6	14,0 ± 0,7	15,0 ± 0,8	18,0 ± 0,9	16,0 ± 0,8
	20,0 ± 1,0	19,0 ± 1,0	21,0 ± 1,1	22,0 ± 1,1	21,0 ± 1,1
Шлемник байкальский	18,0 ± 0,9	13,0 ± 0,7	16,0 ± 0,8	14,0 ± 0,7	15,0 ± 0,8
	17,0 ± 0,9	12,0 ± 0,6	17,0 ± 0,9	15,0 ± 0,8	16,0 ± 0,8
	22,0 ± 1,1	20,0 ± 1,0	21,0 ± 1,1	23,0 ± 1,2	22,0 ± 1,2
Шлемник андрахновидный	15,0 ± 0,8	12,0 ± 0,6	14,0 ± 0,7	17,0 ± 0,9	16,0 ± 0,8
	14,0 ± 0,7	11,0 ± 0,6	13,0 ± 0,7	16,0 ± 0,8	17,0 ± 0,9
	22,0 ± 1,1	20,0 ± 1,0	21,0 ± 1,1	22,0 ± 1,1	21,0 ± 1,1
Шлемник обыкновенный	16,0 ± 0,8	14,0 ± 0,7	15,0 ± 0,8	13,0 ± 0,7	16,0 ± 0,8
	18,0 ± 0,9	16,0 ± 0,8	14,0 ± 0,7	12,0 ± 0,6	14,0 ± 0,7
	23,0 ± 1,2	20,0 ± 1,0	19,0 ± 1,0	22,0 ± 1,1	21,0 ± 1,1
Лапчатка белая	16,0 ± 0,8	13,0 ± 0,7	14,0 ± 0,7	14,0 ± 0,7	15,0 ± 0,8
	18,0 ± 0,9	15,0 ± 0,8	15,0 ± 0,8	13,0 ± 0,7	15,0 ± 0,8
	21,0 ± 1,1	19,0 ± 1,0	20,0 ± 1,0	23,0 ± 1,2	22,0 ± 1,1
Женьшень	14,0 ± 0,7	12,0 ± 0,6	16,0 ± 0,8	15,0 ± 0,8	14,0 ± 0,7
	17,0 ± 0,9	14,0 ± 0,7	15,0 ± 0,8	16,0 ± 0,8	13,0 ± 0,7
	21,0 ± 1,1	20,0 ± 1,0	21,0 ± 1,1	22,0 ± 1,1	21,0 ± 1,1
Контроль	0	0	0	0	0
Ципрофлоксацин	23,0 ± 1,2	21,0 ± 1,1	22,0 ± 1,1	24,0 ± 1,2	23,0 ± 1,2

* первая строка – каллусные культуры; вторая строка – суспензионные культуры; третья строка – корневые культуры *in vitro*.

* line 1 – callus cultures; line 2 – suspension cultures; line 3 – *in vitro* root cultures.

Таблица 5. Результаты определения противоопухолевых свойств экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* лекарственных растений

Table 5. Antitumor properties of extracts obtained from dried biomass of callus and suspension cell cultures and *in vitro* root cultures of medicinal plants

Лекарственное растение	Выживаемость раковых клеток разных клеточных линий, %					
	PANC-1			ЛБР2		
	1	2	3*	1	2	3
Левзея сафлоровидная	45,6 ± 2,3	49,5 ± 2,5	33,2 ± 1,7	51,6 ± 2,6	53,2 ± 2,7	36,5 ± 1,8
Родиола розовая	48,4 ± 2,4	50,1 ± 2,5	32,8 ± 1,6	50,9 ± 2,5	52,0 ± 2,6	35,2 ± 1,8
Шлемник байкальский	46,8 ± 2,3	47,6 ± 2,4	33,9 ± 1,7	52,3 ± 2,6	53,5 ± 2,7	35,0 ± 1,8
Шлемник андрахновидный	44,1 ± 2,2	43,2 ± 2,2	35,6 ± 1,8	52,2 ± 2,6	54,1 ± 2,7	36,8 ± 1,8
Шлемник обыкновенный	47,2 ± 2,4	45,0 ± 2,3	34,1 ± 1,7	54,0 ± 2,7	48,7 ± 2,4	33,2 ± 1,7
Лапчатка белая	45,0 ± 2,3	44,1 ± 2,2	32,0 ± 1,6	51,9 ± 2,6	52,7 ± 2,6	35,7 ± 1,8
Женьшень	43,6 ± 2,2	47,8 ± 2,4	28,7 ± 1,4	48,9 ± 2,4	50,7 ± 2,5	32,4 ± 1,6

* 1 – каллусные культуры; 2 – суспензионные культуры; 3 – корневые культуры *in vitro*.

* 1 – callus cultures; 2 – suspension cultures; 3 – *in vitro* root cultures.

тели не превышают установленные нормативные значения.

Результаты определения антимикробных свойств экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур

in vitro лекарственных растений диффузионным методом представлены в таблице 4.

Данные таблицы 4 свидетельствуют о том, что все исследуемые экстракты обладают антимикробными свойствами в отношении тестируемых штаммов.

Максимальные антимикробные свойства характерны для экстрактов высушенной биомассы корневых культур *in vitro* лекарственных растений. Полученные результаты коррелируют с результатами определения антимикробных свойств экстрактов, полученных при использовании метода, основанного на измерении оптической плотности.

В работе исследовались цитотоксические свойства каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro*.

Результаты определения противоопухолевых свойств экстрактов лекарственных растений приведены в таблице 5.

В контрольных вариантах (без добавления экстрактов) выживаемость обеих тестируемых клеточных линий (PANC-1, ЛБР2) составила 100 %

Из табличных данных следует, что все экстракты лекарственных растений характеризуются наличием противоопухолевых свойств в отношении тестируемых клеточных линий, т. к. вызывают снижение выживаемости раковых клеток. Следует отметить, что наиболее выраженными цитотоксическими свойствами обладают экстракты из высушенной биомассы корневых культур *in vitro* лекарственных растений, поскольку они способны снижать выживаемость раковых клеток до 24,8–36,8 %.

Выводы

В работе изучена *in vitro* биологическая активность (цитотоксическая, антимикробная, антиоксидантная) экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* лекарственных растений,

произрастающих в Сибирском федеральном округе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракты из высушенной биомассы каллусных, суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* левзеи сафлоровидной (*Leuzea carthamoides* L.), родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* L.), шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* L.), шлемника обыкновенного (*Scutellaria galericulata* L.), лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) и женьшеня (*Panax* L.) могут быть использованы для производства фармацевтических препаратов и биологически активных добавок противоопухолевого, антимикробного и антиоксидантного действия.

Критерии авторства

Фактический вклад каждого автора: Йонг Янг – 13 %, Л. К. Асякина – 18 %, О. О. Бабич – 13 %, Л. С. Дышлюк – 28 %, С. А. Сухих – 13 %, А. Д. Попов – 5 %, Н. В. Костюшина – 10 %.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Contribution

Each of the authors is responsible for the following part of research: Y. Yang – 13%, L.K. Asyakina – 18%, O.O. Babich – 13%, L.S. Dyshlyuk – 28%, S.A. Sukhikh – 13%, A.D. Popov – 5%, N.V. Kostyushina – 10%.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients / V. Georgiev, A. Slavov, I. Vasileva [et al.] // Engineering in Life Sciences. – 2018. – Vol. 18, № 11. – P. 779–798. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201800066>.
2. Shikonin production by callus culture of *Onosma bulbotrichom* as active pharmaceutical ingredient / F. Bagheri, R. Tahvilian, N. Karimi [et al.] // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. – 2018. – Vol. 17, № 2. – P. 495–504.
3. Espinosa-Leal, C. A. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds / C. A. Espinosa-Leal, C. A. Puente-Garza, S. García-Lara // Planta. – 2018. – Vol. 248, № 1. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>.
4. High production of bioactive depsides in shoot and callus cultures of *Aronia arbutifolia* and *Aronia × prunifolia* / A. Szopa, P. Kubica, A. Snoch [et al.] // Acta Physiologiae Plantarum. – 2018. – Vol. 40, № 3. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2623-x>.
5. Effect of plant growth regulators on coloured callus formation and accumulation of azadirachtin, an essential biopesticide in *Azadirachta indica* / S. Ashokhan, R. Othman, M. H. A. Rahim [et al.] // Plants. – 2020. – Vol. 9, № 3. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9030352>.
6. Plants of the Russian Federation pharmacopeia: an unexhausted natural products research opportunity? / E. Chupakhin, O. Babich, A. Prosekov [et al.] // Natural Product Research. – 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1727474>.
7. Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia *Astragalus danicus* in different regions / O. Babich, A. Prosekov, A. Zaushintsena [et al.] // Heliyon. – 2019. – Vol. 5, № 8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02245>.
8. Extracts of *Rhodiola rosea* L. and *Scutellaria galericulata* L. in functional dairy products / A. V. Zaushintsena, E. N. Bruhachev, O. V. Belashova [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 163–170. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-163-170>.

9. *Maackia amurensis* agglutinin discriminates between normal and chronic leukemic human lymphocytes / M. Benallal, H. Zotter, R. M. Anner [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1995. – Vol. 209, № 3. – P. 921–929. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1586>.
10. Two isoprenoid-substituted isoflavans from roots of *Maackia tenuifolia* / J.-F. Zeng, G.-L. Li, X. Xu [et al.] // *Phytochemistry*. – 1996. – Vol. 43, № 4. – P. 893–896. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00294-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00294-4).
11. Absolute configuration of (–)-lusanine, a new lupin alkaloid in *maackia* species / K. Saito, T. Yoshino, S. Tsai [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1987. – Vol. 35, № 3. – P. 1308–1310. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.35.1308>.
12. Lupin alkaloids from Chinese *Maackia hupehensis* / Y.-H. Wang, J.-S. Li, H. Kubo [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1999. – Vol. 47, № 9. – P. 1308–1310. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.47.1308>.
13. Cytotoxic prenylated flavonoids from the stem bark of *Maackia amurensis* / X. Li, D. Wang, M. Xia [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2009. – Vol. 57, № 3. – P. 302–306. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.57.302>.
14. Li, X. A new cytosine-type alkaloid from the stem bark of *Maackia amurensis* / X. Li, D. Wang, Z. Cui // *Natural Product Research*. – 2010. – Vol. 24, № 16. – P. 1499–1502. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410903265561>.
15. Isoflavonoid composition of a callus culture of the relict tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim / S. A. Fedoreyev, V. P. Bulgakov, O. V. Grishchenko [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 56, № 16. – P. 7023–7031. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf801227q>.
16. Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP *in vitro* culture: Its biochemical and antioxidant properties / A. B. M. Sharif Hossain, I. Haq, N. A. Ibrahim [et al.] // *Data in Brief*. – 2016. – Vol. 6. – P. 214–220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.061>.
17. Efferth, T. Biotechnology applications of plant callus cultures / T. Efferth // *Engineering*. – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 50–59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>.
18. Study of callus induction and cell culture to secondary metabolite production in *Hyssopus officinalis* L. / G. Pakseresht, D. Kahrizi, M. Mansouri [et al.] // *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – Vol. 5, № 2. – P. 104–111.
19. Production of callus biomass and antioxidant secondary metabolites in black cumin / A. Bibi, M. A. Khan, M. Adil [et al.] // *Journal of Animal and Plant Sciences*. – 2018. – Vol. 28, № 5. – P. 1321–1328.
20. Ali, A. M. A. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors / A. M. A. Ali, M. E. M. El-Nour, S. M. Yagi // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 16, № 2. – P. 677–682. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.003>.
21. Ainsworth, E. A. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent / E. A. Ainsworth, K. M. Gillespie // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2, № 4. – P. 875–877. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.
22. Determination of flavonoids as complexes with Al³⁺ in microemulsion media by HPLC method with fluorescence detection / A. Pirogov, L. Sokolova, E. Sokerina [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. – 2016. – Vol. 39, № 4. – P. 220–224. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1147462>.
23. Antioxidant potential in callus culture of *Artemisia amygdalina* Decne / R. Rasool, B. A. Ganai, A. N. Kamili [et al.] // *Natural Product Research*. – 2012. – Vol. 26, № 22. – P. 2103–2106. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.617749>.
24. Antioxidative effects of hesperetin against lead acetate-induced oxidative stress in rats / J. Wang, H. Zhu, Z. Yang [et al.] // *Indian Journal of Pharmacology*. – 2013. – Vol. 45, № 4. – P. 395–398. DOI: <https://doi.org/10.4103/0253-7613.115015>.
25. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases / A. Roohbakhsh, H. Parhiz, F. Soltani [et al.] // *Life Sciences*. – 2015. – Vol. 124. – P. 64–74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.030>.
26. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models / H. Parhiz, A. Roohbakhsh, F. Soltani [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 2015. – Vol. 29, № 3. – P. 323–331. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.5256>.
27. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats / K. M. Kamel, O. M. Abd El-Raouf, S. A. Metwally [et al.] // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2014. – Vol. 28, № 7. – P. 312–319. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbt.21567>.

References

1. Georgiev V, Slavov A, Vasileva I, Pavlov A. Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences*. 2018;18(11):779–798. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201800066>.
2. Bagheri F, Tahvilian R, Karimi N, Chalabi M, Azami M. Shikonin production by callus culture of *Onosma bulbotrichom* as active pharmaceutical ingredient. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2018;17(2):495–504.
3. Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018;248(1). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>.
4. Szopa A, Kubica P, Snoch A, Ekiert H. High production of bioactive depsides in shoot and callus cultures of *Aronia arbutifolia* and *Aronia × prunifolia*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2018;40(3). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2623-x>.

5. Ashokhan S, Othman R, Rahim MHA, Karsani SA, Yaacob JS. Effect of plant growth regulators on coloured callus formation and accumulation of azadirachtin, an essential biopesticide in *Azadirachta indica*. *Plants*. 2020;9(3). DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9030352>.
6. Chupakhin E, Babich O, Prosekov A, Asyakina L, Gureev M, Krasavin M. Plants of the Russian Federation pharmacopeia: an unexhausted natural products research opportunity? *Natural Product Research*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1727474>.
7. Babich O, Prosekov A, Zaushintsena A, Sukhikh A, Dyshlyuk L, Ivanova S. Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia *Astragalus danicus* in different regions. *Heliyon*. 2019;5(8). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02245>.
8. Zaushintsena AV, Bruhachev EN, Belashova OV, Asyakina LK, Kurbanova MG, Vesnina AD, et al. Extracts of *Rhodiola rosea* L. and *Scutellaria galericulata* L. in functional dairy products. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(1):163–170. DOI: <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-163-170>.
9. Benallal M, Zotter H, Anner RM, Lacotte D, Moosmayer M, Anner BM. *Maackia amurensis* agglutinin discriminates between normal and chronic leukemic human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;209(3):921–929. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1586>.
10. Zeng J-F, Li G-L, Xu X, Zhu D-Y. Two isoprenoid-substituted isoflavans from roots of *Maackia tenuifolia*. *Phytochemistry*. 1996;43(4):893–896. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00294-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00294-4).
11. Saito K, Yoshino T, Tsai S, Murakoshi I, Ohmiya S, Kubo H, et al. Absolute configuration of (–)-lusitanine, a new lupin alkaloid in maackia species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1987;35(3):1308–1310. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.35.1308>.
12. Wang Y-H, Li J-S, Kubo H, Higashiyama K, Komiya H, Ohmiya S. Lupin alkaloids from Chinese *Maackia hupehensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1999;47(9):1308–1310. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.47.1308>.
13. Li X, Wang D, Xia M, Wang Z, Wang W, Cui Z. Cytotoxic prenylated flavonoids from the stem bark of *Maackia amurensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2009;57(3):302–306. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.57.302>.
14. Li X, Wang D, Cui Z. A new cytosine-type alkaloid from the stem bark of *Maackia amurensis*. *Natural Product Research*. 2010;24(16):1499–1502. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410903265561>.
15. Fedoreyev SA, Bulgakov VP, Grishchenko OV, Veselova MV, Krivoschekova OE, Kulesh NI, et al. Isoflavonoid composition of a callus culture of the relict tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(16):7023–7031. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf801227q>.
16. Sharif Hossain ABM, Haq I, Ibrahim NA, Aleissa MS. Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP *in vitro* culture: Its biochemical and antioxidant properties. *Data in Brief*. 2015;6:214–220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.061>.
17. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*. 2019;5(1):50–59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>.
18. Pakseresht G, Kahrizi D, Mansouri M, Ghorbani T, Kazemi N. Study of callus induction and cell culture to secondary metabolite production in *Hyssopus officinalis* L. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. 2016;5(2):104–111.
19. Bibi A, Khan MA, Adil M, Mashwani ZUR. Production of callus biomass and antioxidant secondary metabolites in black cumin. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 2018;28(5):1321–1328.
20. Ali AMA, El-Nour MEM, Yagi SM. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018;16(2):677–682. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.003>.
21. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2007;2(4):875–877. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.
22. Pirogov A, Sokolova L, Sokerina E, Tataurova O, Shpigun O. Determination of flavonoids as complexes with Al³⁺ in microemulsion media by HPLC method with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2016;39(4):220–224. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1147462>.
23. Rasool R, Ganai BA, Kamili AN, Akbar S. Antioxidant potential in callus culture of *Artemisia amygdalina* Decne. *Natural Product Research*. 2012;26(22):2103–2106. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.617749>.
24. Wang J, Zhu H, Yang Z, Liu Z. Antioxidative effects of hesperetin against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 2013;45(4):395–398. DOI: <https://doi.org/10.4103/0253-7613.115015>.
25. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sciences*. 2015;124:64–74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.030>.
26. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*. 2015;29(3):323–331. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.5256>.


27. Kamel KM, Abd El-Raouf OM, Metwally SA, Abd El-Latif HA, El-sayed ME. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2014;28(7):312–319. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbt.21567>.

Сведения об авторах


Янг Йонг

профессор колледжа пищевой промышленности и биоинженерии, Цицикарский университет, 161006, Китай, Цицикар, ул. Венхуа, 42, тел.: +7 (613) 020-002-853, e-mail: yangyong7904@163.com


Асякина Людмила Константиновна

канд. техн. наук, доцент кафедры бионанотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-68-73, e-mail: alk_kem@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-4988-8197>


Бабич Ольга Олеговна

д-р техн. наук, директор Института живых систем, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: olich.43@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-4921-8997>

Дышлюк Любовь Сергеевна

канд. био. наук, доцент кафедры бионанотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-68-73, e-mail: soldatovals1984@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-7333-8411>

Сухих Станислав Алексеевич

канд. техн. наук, заведующий лабораторией, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: stas-asp@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>

Попов Александр Дмитриевич

научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: ADpopov@kantiana.ru

Костюшина Нина Владеленовна


доцент, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (921) 260-55-52, e-mail: NiKostiushina@kantiana.ru

Information about the authors


Yong Yang

Professor of the College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, 42, Wenhua Str., Qiqihar, 161006, China, phone: +7 (613) 020-002-853, e-mail: yangyong7904@163.com


Lyudmila K. Asyakina

Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor of the Department of BioNano-technology, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-73, e-mail: alk_kem@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-4988-8197>


Olga O. Babich

Dr.Sci.(Eng.), Director of the Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: olich.43@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-4921-8997>

Lyubov S. Dyshlyuk

Dr.Sci.(Bio.), Associate Professor of the Department of BioNano-technology, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-73, e-mail: soldatovals1984@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-7333-8411>

Stanislav A. Sukhikh

Cand.Sci.(Eng.), Head of the Laboratory, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: stas-asp@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>

Alexander D. Popov

Research, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: ADpopov@kantiana.ru

Nina V. Kostyushina

Associate Professor, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (921) 260-55-52, e-mail: NiKostiushina@kantiana.ru