

<https://doi.org/10.15407/frg2023.04.344>

УДК 604.6:577.13:615.322:615.076.8

ОТРИМАННЯ БІОБЕЗПЕЧНОГО ФЛАВОНОЇДОВМІСНОГО ЕКСТРАКТУ З «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ *ARTEMISIA TILESII* LEDEB.

Т.А. БОГДАНОВИЧ, Н.А. МАТВЄЄВА

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: bogdanovych_tais@ukr.net

Створення нових ліків з екстрактів «бородатих» коренів рідкісних лікарських рослин, які використовуються у традиційній медицині, допоможе розв'язати одразу три важливі проблеми біотехнології: пошук природних продуцентів біологічно активних сполук, пошук нових продуктів та можливість інтенсифікації виробництва. У зв'язку з цим ми поставили собі за мету отримання комплексу біофлавоноїдів у вигляді сухого екстракту «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. з наступним оцінюванням його біобезпечності. Обрано лінію «бородатих» коренів полину Тилезіуса, яка характеризується швидким ростом і чутливістю до метилжасмонату як еліситора, що було показано у попередніх дослідженнях. Встановлено, що двоетапне культивування з метилжасмонатом концентрацією 100 мкМ дає можливість збільшити вміст флавоноїдів у 3,3 раза (до $27,56 \pm 2,52$ мг RE/г сухої речовини), що важливо для інтенсифікації процесу. Вміст сухої речовини в 1 г коренів, отриманих у результаті такого вирощування, становив 0,15 г, або 14,8 %. З 1 г ліофілізованих коренів отримано 270 мг сухого етанольного екстракту з вмістом флавоноїдів 95,53 мг RE/г сухого екстракту, тобто 9,56 % його сухої речовини. Таким чином, зі 100 г коренів, що виростили, можна отримати 4 г сухого екстракту із загальним вмістом флавоноїдів 382,12 мг RE. Результати визначення біобезпечності флавоноїдовмісної композиції з використанням *in vitro* культури *Lemna minor* L. показали, що кількість і приріст маси листців ряски були навіть більшими, ніж у контрольних зразках (кількість листців збільшилася на 26,0 %, приріст їх маси — на 35,5 %) та зразках, культивованих зі стандартними флавоноїдами (фісетин, кемпферол, епікатехін і кверцетин для порівняння). Такі результати свідчать про нетоксичність та біобезпечність препарату для рослин. Крім нетоксичності виявлено рістстимулювальну дію отриманого комплексу сполук. Отже, запропонований спосіб отримання флавоноїдовмісного комплексу з «бородатих» коренів *A. tilesii* можна використовувати як основу для розроблення нових біобезпечних препаратів цінних біоактивних сполук.

Ключові слова: *Artemisia tilesii* Ledeb., флавоноїди, біобезпечність, нетоксичність.

Цитування: Богданович Т.А., Матвєєва Н.А. Отримання біобезпечного флавоноїдовмісного екстракту з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *Фізіологія рослин і генетика*. 2023. 55, № 4. С. 344–354. <https://doi.org/10.15407/frg2023.04.344>

Рослини роду *Artemisia* здавна застосовують різні народи світу у традиційній медицині для лікування запалення, кашлю, застуди, малярії, лихоманки, грипу, астми, діабету; для загоєння ран, полегшення свербіжжю та лікування укусів павуків; як сечогінний, противиразковий, жовчогінний і гепатопротекторний засіб; для вигнання паразитів; при порушеннях менструального циклу; під час хронічної втоми та больових синдромів [1–11]. Найчастіше використовують *A. annua* [12], *A. absinthium* [13], *A. dracuncululus* [4] та *A. herba-alba* [14]. Таке різноманіття застосування полинів різних видів пов'язане з наявністю у рослинах біоактивних сполук. Ефірні олії полину містять терпени та їх похідні (евкаліптол, борнеол, α -туйон), терпеноїди (камфора), терпінени та їх похідні (терпінен-4-ол, γ -терпінен), поліароматичні вуглеводні (аценафтен) [3, 15–20]. У полинах також накопичуються інші біологічно активні речовини, зокрема, фенольні кислоти (кавова, хлорогенова, розмаринова, артемізінова, кумарова, галова), флавоноїди (кверцетин, рутин, катехін, лютеолін, кемпферол, опігенін) та їх глікозиди, фенілпропаноїди (скополетин), сесквітерпенові лактони (артемізинін, артеануїн), фітостерини (β -ситостерол), а також моно- (галактоза, арабіноза, фруктоза) та полісахариди (інулін, поліфруктани).

Створення нових ліків з рослин *A. tilesii* Ledeb. актуальне, оскільки дає можливість розв'язати одразу декілька завдань, які стоять перед біотехнологами:

- 1) пошук природних продуцентів біологічно активних сполук;
- 2) пошук нових продуцентів;
- 3) можливість інтенсифікації виробництва.

Дійсно, по-перше, нині більшість препаратів отримують хімічним або напівхімічним синтезом і вони мають низку побічних ефектів. По-друге, *A. tilesii* є маловивченою арктичною рослиною [7, 21–22] з вузьким природним ареалом, багатою на поліфеноли і флавоноїди, що мають протизапальну, антиатеросклеротичну, протидіабетичну, нейропротекторну, гепатопротекторну та протипухлинну (цитостатичну) активності [19] та протидіють небажаним ефектам окиснювального стресу. Отже, комплекс біофлавоноїдів може мати більше фармакологічно цінних властивостей, ніж одна конкретна синтезована сполука. По-третє, синтез та різноманіття цільових сполук можливо підвищити методами генетичної трансформації — створенням ліній-надпродуцентів з культур «бородатих» коренів, отриманих *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованою трансформацією. Такі лінії характеризуються більшим вмістом біоактивних речовин внаслідок активнішого синтезу вторинних метаболітів після перенесення *rol* генів у рослинний геном [23–27]. Більше того, «бородаті» корені можна вирощувати цілорічно в біореакторах і додатково активізувати синтез вторинних метаболітів, використовуючи еліситори, такі як метилжасмонат [28–29].

Метою нашої роботи була оптимізація способу отримання екстракту з високим вмістом комплексу біофлавоноїдів у вигляді сухого екстракту «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. з наступним оцінюванням його біобезпечності.

Методика

Отримання флавоноїдовмісного препарату з «бородатих» коренів полину Тилезіуса. «Бородаті» корені *A. tilioides* (5 точок росту) вирощували на рідкому середовищі Мурасіге—Скуга [30] (Duchefa, Netherlands) зі зменшеним удвічі вмістом компонентів (1/2 МС) та сахарозою концентрацією 20 г/л за постійного перемішування на шейкері Clim-O-Shake system Kuhner IRC-1-U (Німеччина) при температурі 25 °С. Через 18 діб додавали метилжасмонат концентрацією 100 мкМ (у 70 %-му етанолі) як еліситор і культивували ще 7 діб за постійного перемішування. Біомасу «бородатих» коренів відділяли від середовища, промивали дистильованою водою та висушували фільтрувальним папером. Після цього «бородаті» корені ліофілізували, подрібнювали на Retsch MM400 (Німеччина) та додавали 70 %-й етанол у співвідношенні 1 : 100 (суха маса коренів, г/об'єм етанолу, мл). Екстрагували протягом 2 діб при постійному перемішуванні на шейкері, далі фільтрували, надосадову рідину збирали і випарювали на роторному випарювачі. 50 мг отриманого сухого екстракту з «бородатих» коренів розчиняли в 1 мл 70 %-го етанолу, отриманий розчин використовували для подальших досліджень.

Визначення загального вмісту флавоноїдів. Вміст флавоноїдів визначали за методикою [31]. Реакційна суміш містила 0,25 мл екстракту, 1 мл деіонізованої води, 0,075 мл 5 %-го розчину NaNO_2 . Через 5 хв додавали 0,075 мл 10 %-го розчину AlCl_3 , перемішували і залишали ще на 5 хв, після чого добавляли 0,5 мл 1 М NaOH та 0,6 мл деіонізованої води. Абсорбцію визначали за $\lambda = 510$ нм на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Загальний вміст флавоноїдів обчислювали в еквіваленті рутину та перераховували на грам сухого екстракту (СЕ) за формулою

$$C = C_1 \cdot V/m,$$

де C — концентрація флавоноїдів у 1,0 г сухого екстракту «бородатих» коренів за калібрувальним графіком, мг РЕ/г СЕ; C_1 — концентрація флавоноїдів у спиртовому розчині СЕ за калібрувальним графіком, мг/мл; V — об'єм спирту, що використовувався для приготування розчину СЕ; m — маса СЕ.

Дослідження біобезпечності отриманого комплексу. Культуру ряски малої брали з *in vitro* колекції рослин лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Для проведення дослідження ряску культивували з препаратом (50 мг СЕ в 1 мл) та стандартами флавоноїдів концентрацією 1 мг/мл (фісетин, кемпферол, епікатехін, кверцетин для порівняння) (Merck, Німеччина). У кожну чашку Петрі відбирали по 20 листеців ряски, додавали по 20 мл рідкого середовища МС з сахарозою концентрацією 30 г/л; у контрольні чашки додавали 100 мкл 70 %-го етанолу, у інші чашки — по 100 мкл приготованого етанольного розчину препарату або по 100 мкл етанольних розчинів флавоноїдів. Культивували 3 тижні за температури +24 °С та освітлення 16 год на добу. Після культивування визначали кількість листеців ряски та приріст їх маси.

Статистичний аналіз. Усі аналізи проводили у трьох повторностях. Результати обчислювали у Microsoft Excel та представляли як середнє значення \pm довірчий інтервал (з урахуванням коефіцієнта Стьюдента). Відносна похибка відповідає умові $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Розробка препаратів на основі флавоноїдів є актуальною та нагальною, адже доведено можливість застосування цих біологічно активних сполук для лікування і профілактики багатьох захворювань. Відомо, що ці поліфенольні сполуки здатні підвищувати активність ферментативних антиоксидантних систем та вміст неферментативних антиоксидантів, послаблювати запальні реакції, знижувати рівень глікованого гемоглобіну та посилювати апоптоз ракових клітин [19]. Саме тому проведена робота полягала в отриманні сухого екстракту з полину, що мав би високий вміст біофлавоноїдів.

Ми обрали лінію «бородатих» коренів *A. tilesii* через її швидкий ріст і чутливість до метилжасмонату, що було встановлено раніше [32]. Виявлено, що двоетапне культивування з метилжасмонатом (рис. 1, *a–в*) дає можливість збільшити вміст флавоноїдів у 3,3 раза (до $27,56 \pm 2,52$ мг RE/г сирової речовини порівняно з контролем без жасмонату), що важливо для інтенсифікації процесу. Такий результат



Рис. 1. Етапи отримання комплексу біофлавоноїдів з «бородатих» коренів полину *Artemisia tilesii* Ledeb.:

a — початок культивування «бородатих» коренів на рідкому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з 20 г/л сахарози; *б* — «бородаті» корені після 18 діб культивування за постійного перемішування на шейкері; *в* — «бородаті» корені після 7 діб культивування з додаванням 100 мкМ жасмонату за постійного перемішування на шейкері; *г*, *д* — нативні та подрібнені корені; *е* — надосадова рідина, отримана після 2-добової етанольної екстракції подрібнених ліофілізованих коренів; *ж* — сухий флавоноїдовмісний екстракт після висушування на роторному випарювачі

підтверджує вплив жасмонату як еліситору, що дослідники показали раніше [33–37].

Встановлено, що вміст сухої речовини у 1 г коренів, отриманих після такого вирощування, становив 0,15 г, або 14,8 %. З 1 г ліофілізованих коренів отримано 270 мг сухого екстракту (СЕ). Вміст флавоноїдів в отриманому сухому екстракті (див. рис. 1, *з–е*) становив 95,53 мг RE/г СЕ, тобто 9,56 % сухої речовини СЕ. Таким чином, з 100 г коренів, що вирости, можна отримати 4 г сухого екстракту із загальним вмістом флавоноїдів 382,12 мг RE.

Після отримання флавоноїдовмісної композиції оцінено її біобезпечність за кількістю листеців ряски *Lemna minor* L. та приросту їх маси (рис. 2). Таке визначення нетоксичності отриманого комплексу сполук є доцільним, адже різні види ряски здавна використовуються як біоіндикатори для вивчення токсичності препаратів та інших сполук [38–40], а також як модельні організми для дослідження фітореMediaції [41–44].

Перед початком культивування ряски з додаванням розчинника (контроль), препарату і стандартів флавоноїдів (див. рис. 2, *а*) у кожній чашці Петрі було по 20 шт. листеців загальною масою $0,018 \pm 0,001$ г. Через 3 тижні культивування (рис. 3) у контрольних чашках кількість листеців становила у середньому $195,50 \pm 2,94$ шт. (див. рис. 2, *б*), у чашках з препаратом — на 26 % більше, у середньому $246,330 \pm 6,16$ шт. (див. рис. 2, *в*). Маса листеців у чашках з препаратом збільшилась на 35,5 % порівняно з контролем ($0,064 \pm 0,003$ г) — $0,088 \pm 0,012$ г (рис. 4). Такі результати свідчать про нетоксичність та біобезпечність препарату для рослин, адже кількість

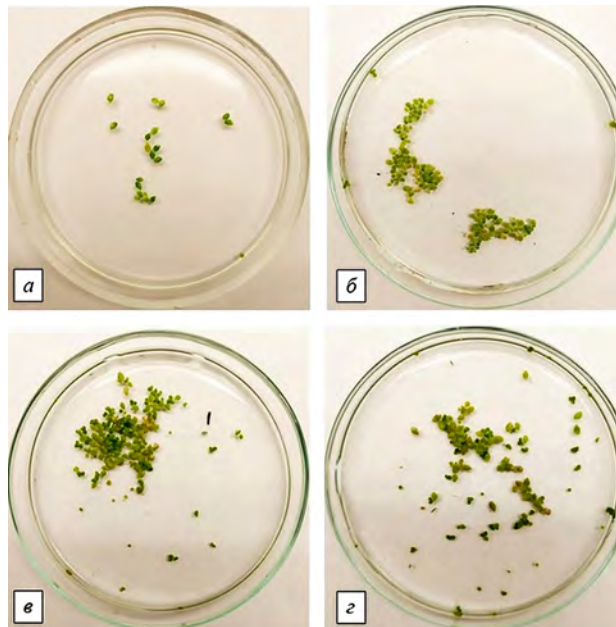


Рис. 2. Ріст ряски *Lemna minor* L. до (*а*) та після 3 тижнів культивування на рідкому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з додаванням 70 %-го етанолу (*б*), етанольного розчину отриманого препарату (*в*) та кемпферолу (*з*)

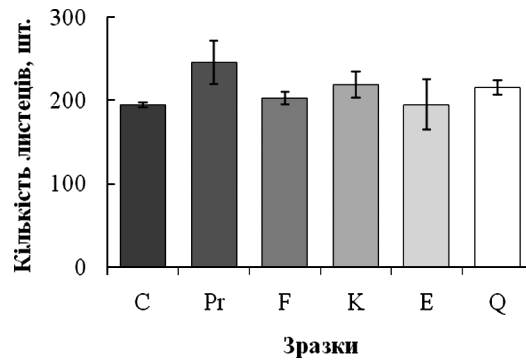


Рис. 3. Кількість листеців ряски *Lemna minor* L. після 3 тижнів культивування на рідкому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з додаванням 70 %-го етанолу (контроль, С), етанольного розчину отриманого препарату (Pr), фісетину (F), кемпферолу (K), епікатехіну (E), кверцетину (Q)

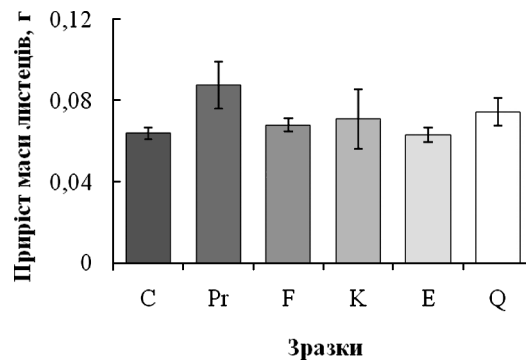


Рис. 4. Приріст маси листеців ряски *Lemna minor* L. після 3 тижнів культивування на рідкому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з додаванням 70 %-го етанолу (контроль, С), етанольного розчину отриманого препарату (Pr), фісетину (F), кемпферолу (K), епікатехіну (E), кверцетину (Q)

листеців та їх маса не зменшилися порівняно з контрольним зразком. Більше того, ріст ряски малої був активнішим у чашках з доданим препаратом. Таким чином, крім нетоксичності виявлено рістстимулювальну дію отриманого комплексу сполук на основі сухого етанольного екстракту «бородатих» коренів полину на ріст і накопичення біомаси ряски.

Оскільки отриманий препарат має високий вміст флавоноїдів, тому ми вирішили перевірити вплив стандартів флавоноїдів на ріст ряски (див. рис. 3, 4) за таких самих умов. Для дослідження обрали 4 сполуки: фісетин, кемпферол, кверцетин (належать до класу флавонолів) та епікатехін (клас флаванолів). Через 3 тижні культивування (див. рис. 2, з) кількість листеців була у середньому від $195,50 \pm 30,38$ шт. (за культивування з епікатехіном) до $219,00 \pm 15,68$ шт. (за культивування з кемпферолом). Тобто в усіх дослідних зразках їх кількість була порівняною або трохи більшою, ніж в контролі, але на 11–21 % меншою, ніж у зразках після культивування з дослідним препаратом. Так само приріст маси листеців ряски після культивування становив від $0,063 \pm 0,003$ г (за культивування з епікатехіном) до $0,075 \pm 0,007$ г

(за культивування з кверцетином). Таким чином, приріст маси листців ряски після культивування з розчинами стандартів флавоноїдів був також порівняним або трохи вищим, ніж у контролі, але на 15,02—27,85 % меншим, ніж у зразках з дослідним препаратом. Такий результат може свідчити про рістстимулювальну дію флавоноїдів у їх сукупності, в якій вони є в комплексі, отриманому з «бородатих» коренів. Тому, імовірно, існує синергічний ефект різних флавоноїдів — компонентів екстракту, а також можлива наявність у тестованому екстракті інших біоактивних сполук.

На сьогодні є декілька препаратів на основі флавоноїдів, які використовують у світовій практиці, зокрема, Accuvit® (Ache), Soyfit® (Janssen Cilag) та Ginkgo® (Herbarium). У складі першого препарату біофлавоноїди цитрусових, другого — ізофлавоноїди сухого екстракту *Glycine max* (L.) Merr., третього — стандартизований екстракт *Ginkgo biloba* L. Перший і другий препарати зарекомендували себе як ліки з високою біоактивністю проти малярійного плазмодія (*Plasmodium falciparum*) [45], тоді як стандарти флавоноїдів гесперидин та геністеїн неактивні проти цього патогену. Лише кверцетин мав таку активність. Отримані результати підтверджують, що саме комплекс певних флавоноїдів у їх сукупності може мати кращу біоактивність, ніж кожен флавоноїд окремо.

Пропонований спосіб підвищення вмісту флавоноїдів у «бородатих» коренях полину Тілесіуса та екстрагування флавоноїдів може бути використаний для розроблення технології отримання цінних біоактивних сполук. Результати дослідження біобезпечності отриманого комплексу свідчать про відсутність токсичності флавоноїдовмісної композиції. Цей екстракт є біобезпечним та може слугувати як основа для розроблення лікарських засобів, що містять біофлавоноїди.

Дослідження частково підтримано фондом SAIA, грант № 42526.

REFERENCES

1. Boudreau, A., Richard, A.J., Harvey, I. & Stephens, J.M. (2022). *Artemisia scoparia* and metabolic health: untapped potential of an ancient remedy for modern use. *Front. Endocrinol.*, 12, p. 727061. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.727061>
2. Dogra, S., Singh, J., Koul, B. & Yadav, D. (2023). *Artemisia vestita*: a folk medicine with hidden herbal fortune. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28, No. 6, p. 2788. <https://doi.org/10.3390/molecules28062788>
3. Ekiert, H., Klimek-Szczykutowicz, M., Rzepiela, A., Klin, P. & Szopa, A. (2022). *Artemisia* species with high biological values as a potential source of medicinal and cosmetic raw materials. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27, No. 19, p. 6427. <https://doi.org/10.3390/molecules27196427>
4. Ekiert, H., Świątkowska, J., Knut, E., Klin, P., Rzepiela, A., Tomczyk, M. & Szopa, A. (2021). *Artemisia dracunculoides* (tarragon): a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Front. Pharmacol.*, 12, p. 653993. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.653993>
5. Ekiert, H., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Ślesak, H. & Szopa, A. (2020). Significance of *Artemisia vulgaris* L. (Common Mugwort) in the history of medicine and its possible contemporary applications substantiated by phytochemical and pharmacological studies. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25, No. 19, p. 4415. <https://doi.org/10.3390/molecules25194415>
6. Native American Ethnobotany Database [Electronic resource]. (2022). Retrieved from <http://naeb.brit.org/uses/search/?string=artemisia+tilesii>

7. Alaska ethnobotany [Electronic resource]. (2023). Retrieved from <https://alaskaethnobotany.community.uaf.edu/artemisia-moon-plants-for-women>
8. Suh Nchang, A., Shinyuy, L.M., Noukimi, S.F., Njong, S., Bambara, S., Kalimba, E.M., Kamga, J., Ghogomu, S.M., Frederich, M., Talom, J.L.L., Souopgui, J. & Robert, A. (2023). Knowledge about asymptomatic malaria and acceptability of using Artemisia afra tea among health care workers (HCWs) in Yaoundé, Cameroon: a cross-sectional survey. *Int. J. Env. Res. Publ. Health*, 20, No. 13, p. 6309. <https://doi.org/10.3390/ijerph20136309>
9. Septembre-Malaterre, A., Lalarizo Rakoto, M., Marodon, C., Bedoui, Y., Nakab, J., Simon, E., Hoarau, L., Savriama, S., Strasberg, D., Guiraud, P., Selambarom, J. & Gasque, P. (2020). Artemisia annua, a traditional plant brought to light. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, No. 14, p. 4986. <https://doi.org/10.3390/ijms21144986>
10. Feng, X., Cao, S., Qiu, F. & Zhang, B. (2020). Traditional application and modern pharmacological research of Artemisia annua L. *Pharmacol. & Therapeut.*, 216, p. 107650. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107650>
11. Ivanov, M., Gašić, U., Stojković, D., Kostić, M., Mišić, D. & Soković, M. (2021). New evidence for Artemisia absinthium L. application in gastrointestinal ailments: ethnopharmacology, antimicrobial capacity, cytotoxicity, and phenolic profile. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2021, p. 9961089. <https://doi.org/10.1155/2021/9961089>
12. Shinyuy, L.M., Loe, G.E., Jansen, O., Mamede, L., Ledoux, A., Noukimi, S.F., Abenwie, S.N., Ghogomu, S.M., Souopgui, J., Robert, A., Demeyer, K. & Frederich, M. (2023). Secondary metabolite isolated from Artemisia afra and Artemisia annua and their anti-malarial, anti-inflammatory and immunomodulating properties-pharmacokinetics and pharmacodynamics: a review. *Metabolites*, 13, No. 5, p. 613. <https://doi.org/10.3390/metabo13050613>
13. Sohail, J., Zubair, M., Hussain, K., Faisal, M., Ismail, M., Haider, I., Mumtaz, R., Khan, A.A. & Khan, M.A. (2023). Pharmacological activities of Artemisia absinthium and control of hepatic cancer by expression regulation of TGFβ1 and MYC genes. *PLoS One*, 18, No. 4, p. e0284244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284244>
14. Mohamed, T.A., Abd El-Razek, M.H., Saleh, I.A., Ali, S.K., Abd El Aty, A.A., Paré, P.W. & Hegazy, M.F. (2023). Artemisia herba-alba sesquiterpenes: in silico inhibition in the ATP-binding pocket. *RSC advances*, 13, No. 28, pp. 19530-19539. <https://doi.org/10.1039/d3ra02690f>
15. Alamgir, A.N.M. (2018). Biotechnology, in vitro production of natural bioactive compounds, herbal preparation, and disease management (treatment and prevention). *Therapeutic use of medicinal plants and their extracts. Vol. 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds*, 74, pp. 585-664. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_7
16. Rolnik, A. & Olas, B. (2021). The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, No. 6, p. 3009. <https://doi.org/10.3390/ijms22063009>
17. Kshirsagar, S.G. & Rao, R.V. (2021). Antiviral and immunomodulation effects of artemisia. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57, No. 3, p. 217. <https://doi.org/10.3390/medicina57030217>
18. Trendafilova, A., Moujir, L.M., Sousa, P.M.C. & Seca, A.M.L. (2020). Research advances on health effects of edible Artemisia species and some sesquiterpene lactones constituents. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10, No. 1, p. 65. <https://doi.org/10.3390/foods10010065>
19. Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Semwal, P., Painuli, S., Badoni, H., Ezzat, S. M., Farid, M.M., Merghany, R.M., Aborehab, N.M., Salem, M.A., Sen, S., Acharya, K., Lapava, N., Martorell, M., Tynybekov, B., Calina, D. & Cho, W.C. (2022). Artemisia spp.: an update on its chemical composition, pharmacological and toxicological profiles. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, p. 5628601. <https://doi.org/10.1155/2022/5628601>
20. Kamarya, Y., Lijie, X. & Jinyao, L. (2022). Chemical constituents and antitumor mechanisms of artemisia. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 22, No. 10, pp. 1838-1844. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210708125230>
21. Royal Botanic Gardens, Plants of the world online [Electronic resource]. (2023). Retrieved from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:20769-2>

22. Saarela, J.M., Sokoloff, P.C., Gillespie, L.J., Bull, R.D., Bennett, B.A. & Ponomarenko, S. (2020). Vascular plants of Victoria Island (Northwest Territories and Nunavut, Canada): a specimen-based study of an Arctic flora. *PhytoKeys*, 141, pp. 1-330. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.141.48810>
23. Sathasivam, R., Choi, M., Radhakrishnan, R., Kwon, H., Yoon, J., Yang, S.H., Kim, J.K., Chung, Y.S. & Park, S.U. (2022). Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*. *Front. Plant Sci.*, 13, p. 983776. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.983776>
24. Yeo, H.J., Kwon, M.J., Han, S.Y., Jeong, J.C., Kim, C.Y., Park, S.U. & Park, C.H. (2023). Effects of carbohydrates on rosmarinic acid production and in vitro antimicrobial activities in hairy root cultures of *Agastache rugosa*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12, No. 4, p. 797. <https://doi.org/10.3390/plants12040797>
25. Wang, H., Wang, A., Pu, H., Yang, Y., Ling, Z., Xu, H., Xu, J., Yu, H. & Wu, X. (2023). Induction, flavonoids contents, and bioactivities analysis of hairy roots and true roots of *Tetragium hemsleyanum* diels et gilg. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28, No. 6, p. 2686. <https://doi.org/10.3390/molecules28062686>
26. Kowalczyk, T., Merez-Sadowska, A., Rijo, P., Isca, V.M.S., Picot, L., Wielanek, M., Śliwiński, T. & Sitarek, P. (2021). Preliminary phytochemical analysis and evaluation of the biological activity of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br transformed roots extracts obtained through *Rhizobium rhizogenes*-mediated transformation. *Cells*, 10, No. 5, p. 1242. <https://doi.org/10.3390/cells10051242>
27. Wojciechowska, M., Owczarek, A., Kiss, A.K., Grąbkowska, R., Olszewska, M.A. & Grzegorzczak-Karolak, I. (2020). Establishment of hairy root cultures of *Salvia bulleyana* Diels for production of polyphenolic compounds. *J. Biotech.*, 318, pp. 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.002>
28. Krzemińska, M., Owczarek, A., Gonciarz, W., Chmiela, M., Olszewska, M.A. & Grzegorzczak-Karolak, I. (2022). The antioxidant, cytotoxic and antimicrobial potential of phenolic acids-enriched extract of elicited hairy roots of *Salvia bulleyana*. *Molecules*, 27, No. 3, p. 992. <https://doi.org/10.3390/molecules27030992>
29. Gharari, Z., Bagheri, K., Danafar, H. & Sharafi, A. (2020). Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Scutellaria bornmuelleri* by elicitor induced over-expression of MYB7 and FNSII2 genes. *Plant Physiol. Biochem.*, 148, pp. 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.002>
30. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, No. 3, pp. 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
31. Pełal, A. & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7, pp. 1776-1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
32. Bogdanovych, T.A. & Matveeva, N.A. (2023, March). The use of methyl jasmonate as an elicitor to increase the synthesis of secondary metabolites in «bearded» roots of wormwood. *Materials of the 3rd International scientific-pract. internet conference «Problems and achievements of modern biotechnology»* (pp. 113-114). Kharkiv: NFAU [in Ukrainian].
33. Hassini, I., Rios, J.J., Garcia-Ibañez, P., Baenas, N., Carvajal, M. & Moreno, D.A. (2019). Comparative effect of elicitors on the physiology and secondary metabolites in broccoli plants. *J. Plant Physiol.*, 239, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.05.008>
34. Horbowicz, M., Wiczowski, W., Góraj-Koniarska, J., Miyamoto, K., Ueda, J. & Saniewski, M. (2021). Effect of methyl jasmonate on the terpene trilactones, flavonoids, and phenolic acids in *Ginkgo biloba* L. leaves: relevance to leaf senescence. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26, No. 15, p. 4682. <https://doi.org/10.3390/molecules26154682>
35. Wang, C., Zhang, J., Lv, J., Li, J., Gao, Y., Patience, B.E., Niu, T., Yu, J. & Xie, J. (2022). Effect of methyl jasmonate treatment on primary and secondary metabolites and antioxidant capacity of the substrate and hydroponically grown chinese chives. *Front. Nut.*, 9, p. 859035. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.859035>
36. Sohn, S.I., Pandian, S., Rakkammal, K., Largia, M.J.V., Thamilarasan, S.K., Balaji, S., Zoclanclounon, Y.A.B., Shilpha, J. & Ramesh, M. (2022). Jasmonates in plant growth

- and development and elicitation of secondary metabolites: an updated overview. *Front. Plant Sci.*, 13, p. 942789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.942789>
37. Vergara-Martínez, V.M., Estrada-Soto, S.E., Valencia-Díaz, S., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L.M., Arellano-García, J.J. & Perea-Arango, I. (2021). Methyl jasmonate enhances ursolic, oleanolic and rosmarinic acid production and sucrose induced biomass accumulation, in hairy roots of *Lepechinia caulescens*. *PeerJ*, 9, p. e11279. <https://doi.org/10.7717/peerj.11279>
 38. Park, J., Yoo, E.J., Shin, K., Depuydt, S., Li, W., Appenroth, K.J., Lillicrap, A.D., Xie, L., Lee, H., Kim, G., Saeger, J., Choi, S., Kim, G., Brown, M.T. & Han, T. (2021). Interlaboratory validation of toxicity testing using the duckweed *Lemna minor* root-regrowth test. *Biology*, 11, No. 1, p. 37. <https://doi.org/10.3390/biology11010037>
 39. Rozman, U. & Kalčíková, G. (2022). The response of duckweed *Lemna minor* to microplastics and its potential use as a bioindicator of microplastic pollution. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11, No. 21, p. 2953. <https://doi.org/10.3390/plants11212953>
 40. Huang, W., Kong, R., Chen, L. & An, Y. (2022). Physiological responses and antibiotic-degradation capacity of duckweed (*Lemna aequinoctialis*) exposed to streptomycin. *Front. Plant Sci.*, 13, p. 1065199. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1065199>
 41. Ziegler, P., Appenroth, K.J. & Sree, K.S. (2023). Survival strategies of duckweeds, the world's smallest angiosperms. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12, No. 11, p. 2215. <https://doi.org/10.3390/plants12112215>
 42. Sikorski, L., Beś, A. & Warmiński, K. (2023). The effect of quinolones on common duckweed *Lemna minor* L., a hydrophyte bioindicator of environmental pollution. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 20, No. 6, p. 5089. <https://doi.org/10.3390/ijerph20065089>
 43. Zhou, Y., Stepanenko, A., Kishchenko, O., Xu, J. & Borisjuk, N. (2023). Duckweeds for phytoremediation of polluted water. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12, No. 3, p. 589. <https://doi.org/10.3390/plants12030589>
 44. Acosta, K., Appenroth, K.J., Borisjuk, L., Edelman, M., Heinig, U., Jansen, M.A.K., Oyama, T., Pasaribu, B., Schubert, I., Sorrels, S., Sree, K.S., Xu, S., Michael, T.P. & Lam, E. (2021). Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. *Plant Cell*, 33, No. 10, pp. 3207-3234. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab189>
 45. Penna-Coutinho, J., Aguiar, A.C. & Krettli, A.U. (2018). Commercial drugs containing flavonoids are active in mice with malaria and in vitro against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113, No. 12, p. e180279. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180279>

Received 25.09.2023

PREPARATION OF A BIOSAFE FLAVONOID-RICH EXTRACT FROM THE «HAIRY» ROOTS OF *ARTEMISIA TILESII* LEDEB.

T.A. Bohdanovych, N.A. Matvieieva

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine
e-mail: bogdanovych_tais@ukr.net

The creation of new drugs based on extracts of the «hairy» roots of rare medicinal plants used in traditional medicine can help solve three important problems of biotechnology at once: the search for natural producers of biologically active compounds, the search for new products, and the possibility of intensification of production. Therefore, the aim of this work was to obtain a complex of bioflavonoids in the form of a dry extract of the «hairy» roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. followed by an assessment of its biosafety. For this, a line of «hairy» roots of *Tilesius*' wormwood, which has fast growth and sensitivity to methyl jasmonate as an elicitor, that was shown earlier, was chosen. Two-stage cultivation with methyl jasmonate at a concentration of 100 μ M revealed the possibility of increasing the content of flavonoids by 3.3 times (up to 27.56 ± 2.52 mg RE/g of FW), which is important for the intensification

of the process. The content of dry matter in 1 g of roots obtained after such cultivation was 0.15 g or 14.8 %. From 1 g of lyophilized roots, 270 mg of dry ethanolic extract was obtained with a flavonoid content of 95.53 mg RE/g of dry extract, i.e. 9.56 % of its dry weight. Thus, 4 g of dry extract with a total flavonoid content of 382.12 mg RE can be obtained from 100 g of «hairy» roots. The results of determining the biosafety of the flavonoid-containing composition using the in vitro culture of *Lemna minor* L. showed that the duckweed leaves number and mass increase was even greater than in the control samples (the number of leaves was 26 % greater and their mass increase was by 35.50 %) and in samples cultivated with flavonoid standards (fisetin, kaempferol, epicatechin, and quercetin for comparison). Such results indicate the non-toxicity and biosafety of the preparation for plants. In addition to non-toxicity, the obtained complex of compounds has been shown to have a growth-stimulating effect. Therefore, the proposed method of obtaining a flavonoid-containing complex based on the «hairy» roots of *A. tilesii* can be used as a basis for the development of new biosafe preparations of valuable bioactive compounds.

Key words: *Artemisia tilesii* Ledeb., flavonoids, biosafety, non-toxicity.

ORCID

Т.А. БОГДАНОВИЧ — Taisa Bohdanovych <https://orcid.org/0000-0002-1834-523X>

Н.А. МАТВЄЄВА — Nadiia Matvieieva <https://orcid.org/0000-0002-4877-5222>