

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кафедра молекулярної біотехнології та біоінформатики
Зав. кафедри к.б.н., доц. Нипорко О. Ю.
Протокол № _____ засідання кафедри
від « _____ » _____ 2023 р.

**РОЗРОБЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО
РОЗМНОЖЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИНИ *RHODIOLA ROSEA L.***

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності
162 Біотехнологія та біоінженерія
ОП «Високі технології (Біотехнологія)»
Каленчука Миколи Сергійовича

Науковий керівник від кафедри
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
д.б.н. **Солдаткін Олексій Петрович**

Робота виконана в лабораторії адаптаційної біотехнології
інституту клітинної біології та генної інженерії НАН України
під керівництвом д.б.н. **Н.А. Матвєєва**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Нещодавно проведені дослідження з використанням екстрактів з рослини *Rhodiola rosea* L. та її активних сполук продемонстрували широкий спектр лікарських властивостей, як для покращення нормальних фізіологічних функцій, так і для боротьби з негативними факторами, що погіршують здоров'я та імунітет. Результати цих досліджень підтверджують перспективу цієї лікарської рослини для подальших досліджень, а також для створення фармакологічних препаратів з використанням екстрактів цієї рослини.

Досягнення в індукції органогенних та калусних культур, регенерації та мікророзмноженні на поживних середовищах з фіторегуляторами і добавками були основою для альтернативного синтезу *in vitro* щодо розробки ефективних систем мікроклонального розмноження для збереження цього виду.

В роботі було досліджено метод біотехнології мікроклонального розмноження лікарської рослини *R. rosea*. Для проведення дослідження використовували надрізані листкові експланти та пагони лікарської рослини *R. rosea*, що були поміщені в чашки Петрі з поживним середовищем Мурасіге-Скуга (MS) для перевірки регенерації з утворенням пагонів та ризогенезу. Зразки з поживним середовищем MS мали різний вміст таких регуляторів росту: 2,4-дихлорфеноксиоцетова кислота (2.4-Д), 6-Бензиламінопурин (BAP), кінетин (кін), гетероауксин або β -індолілоцетова кислота (IAA) та 3-індолбутирова кислота (IBA).

Аналіз результатів проводили за допомогою порівняння зразків протягом певного часу, порівнянням середніх мас пагонів та коренів зразків, а також з використанням спектрофлюориметра для виявлення загального вмісту флавоноїдів за довжини хвилі 510 нм. Дослідженнями встановлено, що ефективність мікроклонального розмноження значно вища у експлантів, які культивувались на поживних середовищах з регуляторами росту.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, регулятори росту, пагоноутворення, ризогенез.

ABSTRACT

Recently conducted studies using extracts from the plant *Rhodiola rosea* L. and its active compounds have demonstrated a wide range of medical properties to improve normal physiological functions and combat negative factors that affect health and immunity. The results of these studies confirm the perspective of this medical plant for further research, as well as for the creation of pharmacological preparations using extracts of this plant.

Advances in the induction of organogenic and callus cultures, regeneration and micropropagation on nutrient media with phytohormones and additives were the basis for alternative *in vitro* synthesis for the development of efficient microclonal propagation systems for the conservation of this species.

The research investigated the method of biotechnology of microclonal reproduction of the medical plant *R. rosea*. It was conducted using cut leaf explants and shoots of the plant, which were placed in Petri dishes with Murashige-Skoog (MS) nutrient medium to check regeneration with the formation of shoots and rhizogenesis. Samples with MS nutrient medium had different contents of the following growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-Benzylaminopurine (BAP), kinetin (kin), heteroauxin or β -indolylacetic acid (IAA) and 3-indolebutyric acid (IBA).

The analysis of the results was carried out using the comparison of the samples over a certain time, a comparison of the average mass of the shoots and roots of the samples, as well as with the use of a spectrofluorometer to detect the total content of flavonoids at a wavelength of 510 nm. Research has established that the efficiency of microclonal reproduction is significantly higher in explants cultivated on nutrient media with growth regulators.

Key words: microclonal reproduction, growth regulators, shoot formation, rhizogenesis.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Унікальна біологічна активність <i>Rhodiola rosea L.</i>	11
1.1. Різноманітні дослідження біологічної активності екстрактів та окремих активних сполук <i>Rhodiola rosea L.</i> та їх характерних ефектів.....	11
1.2. Особливості мікроклонального розмноження лікарської рослини <i>Rhodiola rosea L.</i>	17
1.3. Специфічні властивості лікарської рослини <i>Rhodiola rosea L.</i> та способи їх використання.....	20
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	24
2.1. Рослинний матеріал.....	24
2.2. Приготування живильних середовищ.....	24
2.3. Визначення впливу регуляторів росту на виживаність листкових експлантів, формування пагонів та коренеутворення.....	25
2.4. Визначення вмісту флавоноїдів.....	27
2.5. Визначення частоти та ефективності регенерації пагонів та коренеутворення.....	27

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень.....	28
3.1. Визначення оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції регенерації пагонів та коренеутворення зразків № 1-6, № 9, № 10 <i>Rhodiola rosea L.</i>	28
3.2. Визначення оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції коренеутворення зразків № 7, № 8 та № К <i>Rhodiola rosea L.</i>	41
3.3. Дослідження частоти та ефективності регенерації пагонів та коренеутворення зразків лікарської рослини <i>Rhodiola rosea L.</i> на середовищах з регуляторами росту.....	45
3.4. Визначення вмісту флавоноїдів в розчинах з додаванням екстрактів з пагонів з листками лікарської рослини <i>Rhodiola rosea L.</i> зразків № 7, № 8 та № К.....	48
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ВСТУП

Результати нещодавно проведених досліджень продемонстрували широкий спектр лікарських властивостей рослини *Rhodiola rosea* L., які включають протизапальну, антистресову, антиоксидантну, протиракову та антивікову дію [1,2]. До специфічних властивостей родіоли рожевої також відносять її вплив на підвищення імунітету з посиленням протівірусної активності [1-3], посилення репарації ДНК та модулювання адаптації до гіпоксії та ангиогенезу [2,3].

Родіола рожева є рідкісною та дуже цінною лікарською трав'янистою рослиною, що походить із високогірних регіонів Азії, Європи та Північної півкулі [4]. Екстракти родіоли рожевої ще давно використовувалися для неспецифічного підвищення стійкості організму для боротьби з втомою та депресією, підвищення фізичної та розумової працездатності, покращенням фізичної та емоційної стійкості до стресу в людей [4,5].

Rhodiola, також має назву «золотий корінь», і є одним із імуномодуляторів, який відомий вже понад декількох тисяч років. Проводяться величезні дослідження, щоб розкрити його різноманітні ролі у зміцненні імунітету та виявити інші, не менш важливі застосування, як наприклад, стимуляція ЦНС та нервової діяльності загалом [1,2,4].

R. rosea є однією з найкорисніших лікарських рослин, яка була ретельно вивчена та визнана «адаптогеном», який забезпечує неспецифічну

резистентність шляхом інгібування фізичних, хімічних та біологічних стресів [4-6]. Активні сполуки виділено переважно з кореневища, яке виявляє різноманітні лікувальні властивості, і воно є підземним стеблом, що містить переважно такі сполуки як салідрозид, каніфоль, розавін і тирозол [1].

Адаптогени є модифікаторами реакції на стрес, що мають важливий вплив на активність цитокінів та імунну відповідь. Як приклад, вченими було проведено дослідження з виявленням впливу *R. rosea*, природного адаптогену, на експериментальний аутоімунний енцефаломієліт, тваринну модель розсіяного склерозу [6]. В експерименті було виявлено, що *R. rosea* зменшує тяжкість цього захворювання, як оцінюють клінічні та гістопатологічні показники. *R. rosea* сприяла зниженню IL-6, sIL-6R, IFN- γ та IL-17A як у сироватці крові, так і в супернатантах спленоцитів, тоді як підвищувала IL-4 у супернатантах спленоцитів мишей з енцефаломієлітом. Зразок *R. rosea* також модулював T-клітинну відповідь шляхом інгібування клітин Th1 і Th17, відновлення клітин Treg у селезінці, пахових лімфатичних вузлах, головному та спинному мозку мишей [6]. Таким чином результати дослідження дійсно підтвердили адаптогенну властивість *R. rosea*.

Родіола рожева має чудові імунорегуляційні ефекти та послаблює запальне пошкодження при різних захворюваннях шляхом регуляції диференціювання імунних клітин, активації запальних сигнальних шляхів і секреції факторів запалення [7,8]. Наприклад, салідрозид, одна з найважливіших сполук *R. rosea*, може послаблювати симптоми астми та запальні реакції, спричинені церебральною ішемією, шляхом регуляції балансу хелперних T-клітин (Th1/Th2) [9] або поляризації макрофагів [9-11]. Будучи важливим імуномодулятором, *R. rosea* та її активні сполуки виявляють різноманітні фармакологічні ефекти в різних випадках діабету 2 типу (T2D) [12], включаючи інгібування глюконеогенезу в печінці, пригнічення адипогенезу та перекисного окислення ліпідів, підвищення виживаності острівцевих B-клітин тощо, через протизапальну дію [13]. Клінічні та експериментальні дослідження показали, що *R. rosea*

також має хорошу терапевтичну дію на діабетичні ускладнення, включаючи діабетичну нефропатію, серцево-судинні захворювання, нейропатичний біль та остеопороз тощо.

Численні дослідження показали, що *R. rosea* має протиракову дію. Механізм полягав у двох аспектах, а саме прямій дії на ракові клітини та частковому зниженні ангиогенезу через регуляцію запалення [14]. Експеримент *in vitro* показав, що полісахарид *R. rosea* справляв прямий цитотоксичний ефект на ріст клітин S-180, а також ріст пухлини клітин саркоми 180 (S-180) в трансплантованих мишей. Рівень IL-2, TNF α , IFN γ та CD4+/CD8+ Т-лімфоцитів підвищувався після лікування [15]. Лікування салідрозидом суттєво пригнічувало проліферацію клітин раку молочної залози людини (MCF-7), утворення колоній, міграцію та інвазію, а також індукований апоптоз клітин і зупинку клітинного циклу на фазі G0/G1 *in vitro*, а також ріст пухлини на моделі мишей. Крім того, салідрозид також пригнічує утворення внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК) і активацію мітоген-активованих протеїнкіназ (МАПК), що може частково сприяти пригніченню росту пухлини раку молочної залози [16].

Як правило, стрес не вважають за перешкоду що може вплинути на природне зачаття, хоча відомо, що стрес може зупинити діяльність гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи (ендокринного комплексу, який включає гіпоталамус, гіпофіз і гонадні залози), що контролює репродуктивну систему [17]. Через управління стресом та створення реакції для розслаблення, щоб запобігти порушення зв'язку між мозком і яєчниками без спричинення затримки менструацій або відсутності овуляції, можна допомогти повернути або вилікувати порушену фізіологію, яка спричиняє безпліддя [18]. Численні джерела інформації повідомляли, що корені *R. rosea* надавались молодим парам, що мешкали в Сибірі для підвищення їх фертильності. Також повідомлялося, що у деяких гірських селах Республіки Грузія, букет коренів до сих пір дарують парам перед одруженням, для того аби забезпечити народження здорових дітей та

підвищити народжуваність [19,20]. На даний момент клінічних випробувань, які підтверджують ці ефекти *R. rosea*, ще дуже мало, проте вони все ж показали, що екстракти з цієї рослини здатні відновлювати овуляцію у жінок з втратою менструального циклу, і більш того лікарі-репродуктологи повідомляли про випадки, коли жінки мали більший шанс завагітніти після прийому *R. rosea* [21].

До хімічного складу родіоли рожевої входять такі поліфеноли, як флавоноїди, проантоціанідини, тирозол, салідрозид, розавін а також глікозиди, органічні кислоти, ефірні олії, цукри, жири, спирти та білки. Вміст поліфенолів у родіоли рожевої становить приблизно 41 %. Салідрозид та його аглікони тирозол є основними сполуками родіоли рожевої, і вміст цих двох сполук часто використовується як критерій при оцінці якості сирих препаратів родіоли рожевої [22].

Оскільки салідрозид є основним біологічно активним компонентом

R. rosea, він поширений у всіх частинах рослини та має різноманітну біологічну активність. Зокрема відомі дослідження із застосуванням салідрозиду та екстракту родіоли для лікування захворювань, пов'язаних зі старінням.

Вченими було проведено різноманітні дослідження з впливу салідрозиду та екстракту родіоли на хворобу Альцгеймера. Хвороба Альцгеймера є віковим нейродегенеративним розладом, який проявляється у вигляді дисфункцій навчання та пам'яті на ранній стадії та з часом розвивається в когнітивний розлад. Ключовим фактором ризику розвитку цієї хвороби є вік [23]. Механізми хвороби Альцгеймера скоріше за все можуть бути пов'язані з відкладенням β -амілоїдного ($A\beta$) пептиду та внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків, що складаються з гіперфосфорильованого білка tau, які є важливими характеристиками що можуть призвести до послідовної втрати нейронів і атрофії мозку [24].

Салідрозид зменшував нейродегенерацію у tau-трансгенної дрозофіли та гальмував втрату нейронів шляхом активації фосфорильованого GSK-3 β (p-GSK-3 β) та зниження регуляції фосфорильованого tau-білку. Він також знижував рівні і відкладення GSK-3 β в мозку за рахунок підвищення регуляції сигналів фосфатидилінозитид 3-кінази (PI3K)/АКТ, таким чином зменшуючи А β -індуковані когнітивні порушення у щурів [25]. У клітинах SH-SY5Y салідрозид також послаблював спричинену гіпоксією аномальну переробку білка-попередника амілоїду (APP), що є ще одним фактором ризику хвороби Альцгеймера, оскільки аномальна APP генерує значну кількість β -амілоїдного пептиду.

Фармакологія деяких традиційних застосувань родіоли рожевої була підтверджена в останніх дослідженнях, хоча ці дослідження в основному проводилися *in vitro*. Тому ефекти цих сполук потребують перевірки *in vivo*. Приблизно 200 хімічних сполук було виділено з видів родіоли, але досліджено лише кілька сполук, включаючи салідрозид, флавоноїди та полісахариди. Екстракти родіоли рожевої та салідрозид можуть надавати великих покращень для метаболізму, подібним до ефекту позитивного втручання у спосіб життя. Фармакологічні властивості екстрактів родіоли рожевої та салідрозиду та їх механізми дії дуже різноманітні [2,4,5,6,22-26]. На відміну від поганої біодоступності більшості природних сполук, салідрозид є водорозчинною сполукою, яка швидко всмоктується при пероральному прийомі та має високу біодоступність. Салідрозид виводиться нирками і виділяється в сечі у високій концентрації. В такому випадку сечовий міхур може бути ідеальним органом для хіміопрофілактики раку за допомогою екстрактів родіоли рожевої та салідрозиду.

Хоча також важливо звернути увагу на безпеку цих компонентів у клінічній практиці оскільки існує досить мало токсикологічних досліджень цих екстрактів і сполук *in vitro* та *in vivo*, і різні за величиною дози цих речовин можуть бути неприйнятними для людей.

Загалом в традиційній китайській медицині *R. rosea* зазвичай використовується з іншими травами, і багато досліджень показали, що ця лікарська рослина сама по собі має позитивні фармакологічні ефекти.

Метою нашої роботи було розроблення та дослідження біотехнологічного методу мікроклонального розмноження лікарської рослини *R. rosea* з використанням листкових експлантів, культивованих на поживних середовищах з використанням регуляторів росту.

РОЗДІЛ 1

УНІКАЛЬНА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ *RHODIOLA ROSEA L.*

Унікальна біологічна активність екстрактів родіоли рожевої та її активних сполук, як для покращення нормальних фізіологічних функцій так і для боротьби з негативними факторами, що погіршують здоров'я та імунітет, підтверджує перспективу цієї лікарської рослини для подальших досліджень, а також для створення фармакологічних препаратів з використанням екстрактів цієї рослини.

Молекулярні механізми дії екстракту родіоли рожевої вивчені головним чином разом з однією з його біоактивних сполук, салідрозидом. Різноманітні компоненти екстрактів родіоли рожевої та салідрозид мають молекулярні механізми впливу на рак і фізіологічні функції організму людини та тварин. Також дослідження ізольованих органів, тканин, клітин і ферментів показали, що препарати на основі екстрактів родіоли рожевої виявляють адаптогенну дію, включаючи нейропротекторну, протипухлинну, кардіопротекторну, противтомну, антидепресивну, анксиолітичну, ноотропну, збільшують тривалість життя та стимулюють центральну нервову систему.

1.1. Різноманітні дослідження біологічної активності екстрактів та окремих активних сполук *Rhodiola rosea L.* та їх характерних ефектів

З результатів нещодавніх досліджень стало відомо про велику різноманітність біологічної активності активних сполук *R. rosea*, які включають антивікову, протизапальну, антистресову, антиоксидантну, противірусну та навіть протиракову дію, а також багато інших. Більш того певні дослідження довели, що активні сполуки родіоли рожевої впливають на підвищення імунітету, посилення репарації ДНК, а також впливу на центральну нервову систему [2,4,9,17,20,23].

Унікальна біологічна активність екстрактів родіоли рожевої, або її активних сполук, як для покращення нормальних фізіологічних функцій, так і проти ракових ефектів, підтверджує їхню перспективу для подальших досліджень хіміопрофілактики раку та виявлення хімотерапевтичних препаратів, які можуть бути створені на основі екстрактів родіоли рожевої.

Було доведено що фармакологічні та лікувальні властивості родіоли є видозалежними явищами, внаслідок того що різноманітність фітохімічних компонентів, що зустрічаються в рослині, може відповідати за їх унікальну фармакологічну активність в різних видів *Rhodiola* [27,28].

З коренів і кореневищ різних видів родіоли було виділено понад 140 сполук, включаючи монотерпенові спирти та їх глікозиди, фенілпропаноїди та їх глікозиди, ціаногенглікозиди, арилглікозиди, фенілетаноїди, флавоноїди, флавонолігнани, проантоціанідини та похідні галової кислоти. Певні сполуки, зокрема розарин, розавін, каніфоль, салідрозид, тирозол, родонін, катехін і галову кислоту, були запропоновані в якості еталонних маркерів для відмінності видів родіоли від інших рослин [29].

Відомо що салідрозид присутній у всіх видах роду *Rhodiola* і в широкому спектрі видів за межами цього роду, тоді як розавіні (розарин, розавін, каніфоль) є специфічними компонентами *R. rosea* [27-29]. Природне співвідношення каніфолі та її похідних до салідрозиду було оцінено

приблизно як 3:1, тому як стандартизовані екстракти родіоли рожевої містять мінімум 3% каніфолі та її похідних і 0,8–1% салідрозиду з результатів більшості експериментальних досліджень що були опрацьовані. Проте з усіх видів родіоли *R. rosea* була одним з основних предметів фітохімічних досліджень, а також досліджень на тваринах і людині.

Проантоціанідини, що становлять досить велику частину екстрактів родіоли (приблизно 30% від 70% ацетонового сухого сирого екстракту) [28], також були відзначені своєю значною біоактивністю, яка включала антиоксидантну, протиракову, протизапальну, протиалергічну, антивікову, а також загальне покращення функціонування печінки.

Одні з основних фармакологічних ефектів екстрактів та активних сполук *R. rosea* згідно більшості проведених досліджень:

- Адаптогенна дія та стресопротекторний ефект (а саме, нейрокардіо- і гепатопротекторний);
- Протизапальний та протиалергічний ефекти;
- Стимулюючий ефект на центральну нервову систему;
- Антиоксидантний ефект;
- Кардіопротекторні ефекти;
- Противтомна дія;
- Антидепресивна та анксиолітична дії;
- Ефект спрямований на нормалізацію ендокринної діяльності;
- Ефект, який впливає на збільшення тривалості життя.

Адаптогенна дія лікарської рослини *R. rosea* була підтверджена в багатьох дослідженнях через характерну здатність екстрактів цієї рослини підвищувати стійкість до різних хімічних, біологічних і фізичних факторів стресу [4,6,11,18] і її вплив на підвищення працездатності у людей [30].

Адаптогенна активність родіоли рожевої в центральній нервовій системі можуть бути пов'язані з її впливом на рівні та активність моноамінів і опіюїдних пептидів, таких як бета-ендорфіни [31].

Було досліджено, що стресопротекторні ефекти екстрактів родіоли рожевої впливають на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову систему (ГГНС) [32] і кілька ключових медіаторів стресових реакцій, таких як білки теплового шоку (heat-shock proteins - HSP), які виробляються клітинами у відповідь на стресові умови [33], активована стресом c-JUN N-кінцева протеїнкіназа 1 (c-Jun N-terminal kinase 1) [34], кортизол [34], оксид азоту [34] і бета-ендорфін [35]. Салідрозид як переважна сполука в екстрактах родіоли рожевої слугував протектором від бета-амілоїдного (А-бета) пептиду, індукованого окислювальним стресом, інгібуючи його опосередковане фосфорилування JNK і p38 MAP-кінази, але не ERK1/2, що свідчить про високу стресопротекторну активність салідрозиду [34].

Екзогенні антиоксиданти можуть запобігти окислювальному стресу, що виникає під час фізичних вправ, внаслідок збільшення виробництва активних форм кисню (АФК). Ці екзогенні антиоксиданти очищають АФК, що утворюються під час фізичних вправ, а також здатні підвищувати загальну фізичну витривалість та противтомлюваність [36].

Хімічні структури основних біоактивних сполук в екстрактах *R. rosea*, каніфолі та її похідних і салідрозиду містять фенольні гідроксильні групи та ненасичені зв'язки. В дослідженні було показано, що ці сполуки є ефективними в поглинанні АФК.

Також в дослідженні повідомлялося про те що салідрозид підвищує витривалість під час фізичної активності і підвищує рівень глікогену в печінці щурів після виснажливих фізичних вправ, таких як плавання [36]. Крім того, салідрозид знижував рівень малонового діальдегіду (MDA) і посилював активність антиоксидантних ферментів таких як каталаза, супероксиддисмутаза (SOD) і пероксид глутатіону в тканині печінки щурів лінії Спрег-Доулі (SD).

В ряді проведених досліджень було підтверджено, що екстракти родіоли рожевої можуть подовжити тривалість життя в ряді модельних організмів, таких як *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* та

Saccharomyces cerevisiae [37-39]. В одному з досліджень було продемонстровано, що стандартизований екстракт родіоли рожевої SHR-5 збільшує середню та максимальну тривалість життя плодової мушки до 24% та 31% [37].

Екстракти родіоли рожевої можуть подовжити тривалість життя при різних рівнях калорійності. Вплив екстрактів *R. rosea* на тривалість життя не залежав від сигнальних шляхів, пов'язаних з обмеженням споживання калорій, включаючи білки SIR2, сигналізацію інсуліну та інсуліноподібного фактора росту та TOR у плодових мушок [37], але залежав від складу раціону (зокрема, співвідношення білка до вуглеводів або вміст сахарози) та експресії регуляторних білків Msn2/Msn4 та Yap1 [40].

Водні екстракти родіоли рожевої також продемонстрували залежну від концентрації дію на довготривале виживання та стійкість до стресу на брунькування дріжджів *S. cerevisiae*. При низькій концентрації екстракту, тривалість життя дріжджів збільшувалась, тоді як при високих концентраціях відбувалося скорочення тривалості життя дріжджів [38]. Згідно проведеного дослідження на модельному організмі *B. mori*, було доведено що екстракт *R. rosea* підвищував активність основних антиоксидантних ферментів, глутатіон-S-трансферази та каталази, а також змінював вміст глутатіону та малонового діальдегіду [39]. Екстракти родіола рожевої підвищували експресію регулятора *BmFoxO*, який є нижнім регулятором сигнального шляху інсуліну/IGF-1 (IIS) у шовкопрядів. Відомо, що тепловий стрес, окислювальний стрес та обмеження калорійності впливають на транскрипційну активність гену *FoxO*.

Експресія *BmPI3K* і *BmFoxO*, двох ключових елементів шляху IIS, була знижена та активована під впливом екстрактів *R. rosea*. Таким чином, було припущення, що до того що шлях IIS може бути залучений до регуляції довголіття, викликаного *R. rosea*. Отримані результати підтвердили, що екстракти *R. rosea* подовжують тривалість життя, в якій може бути задіяний шлях IIS, викликають антиоксидантну дію і підвищують стресостійкість у

шовкопряда [39].

Також було підтверджено одна з біоактивних сполук *R. rosea*, а саме салідрозид, блокував індуковане D-галактозою підвищення рівня кінцевого продукту глікації в сироватці крові у мишей C57BL/6J [41]. Він скасовував індуковані D-галактозою ефекти старіння в нервовій та імунній системах, покращував рухову активність, збільшував час затримки пам'яті та посилював мітогенез лімфоцитів і виробництво інтерлейкіну-2 (IL-2) [41]. Крім того, салідрозид знижував підвищену експресію гліального фібрилярного білка та білку нейротрофіну-3 (NTF3) у мишей [41].

Обробка водним екстрактом родіоли рожевої мононуклеарних клітин периферичної крові людини збільшила виробництво IL-6 і фактора некрозу пухлини-альфа (TNF- α) через фосфорильований ферментний комплекс I κ B і фактор транскрипції NF- κ B, що мало імуностимулюючий потенціал [42]. Екстракт *R. rosea* у концентрації 250 мкг/мл підвищував експресію p-I κ B і впливав на активацію ядерної транслокації NF- κ B у мононуклеарних клітинах периферичної крові людини. Результати дослідження свідчать про те, що екстракт родіоли рожевої активував прозапальні медіатори через фосфорилування інгібіторного κ B і фактора транскрипції NF- κ B [42].

Також була проведена низка досліджень для виявлення протизапального ефекту з використанням екстрактів *R. rosea*. Було виявлено, що екстракт настоянки з родіоли рожевої пригнічував активність ферментів, пов'язаних із запаленням, включаючи циклооксигеназу-1 (ЦОГ-1), ЦОГ-2 і ліпопротеїн-асоційовану фосфоліпазу A2 (Lp-PLA2) [43]. Інгібування індукованого ністатином набряку та Lp-PLA2 свідчить про те, що стабілізація мембрани є найбільш імовірним механізмом протизапальної дії екстракту [43].

В наступному дослідженні було доведено, що екстракт *R. rosea* інгібував запальний C-реактивний протеїн і експресію креатинфосфокінази (КФК) в крові здорових нетренованих добровольців після виснажливих фізичних вправ [44], що вказує на те, що екстракт має протизапальну дію та захищає

м'язову тканину під час активної фізичної діяльності.

Було здійснено декілька досліджень, які підтверджували що екстракти родіоли рожевої функціонували як антимуутагени, зменшували число хромосомних аберацій, впливали на утворення мікроядер і позапланового синтезу ДНК, які були індуковані циклофосфамідом і нітрозамінами, зокрема N-нітрозоз-N-метилсечовиною [45,46]. Крім того, було виявлено, що салідрозид підсилює активність полі(АДФ-рибоза)полімерази 1 (PARP-1), щоб запобігти сповільненню циклу гемопоетичних стовбурових клітин, спричиненого окислювальним стресом [46]. Подальше дослідження тієї ж групи продемонструвало зв'язування салідрозиду з багатим на триптофан-гліцин-аргінін доменом PARP-1 [46].

1.2. Особливості мікроклонального розмноження лікарської рослини *Rhodiola rosea L.*

Rhodiola rosea L. — лікарський вид, що знаходиться під загрозою зникнення, і має обмежене поширення, зокрема високогірні регіони Азії, Європи та Північної півкулі. Родіола рожева має виняткове значення для фармацевтичної промисловості для профілактики та лікування раку, захворювань серця та нервової системи тощо. Попри великий інтерес та широкі дослідження щодо цієї лікарської рослини в галузі фітохімії, біотехнологія цієї рослини є менш дослідженою та використовуваною. Досягнення в індукції органогенних та калусних культур, регенерації та мікророзмноженні були різними, але вони були основою для альтернативного синтезу *in vitro* бажаних метаболітів і для розробки ефективних систем мікроклонального розмноження для збереження виду [47,48]. Використання для регенерації *R. rosea* в існуючих меристемах верхівок пагонів дозволяє отримати рослини, генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу з необхідними ознаками. Крім того, техніка мікроклонального розмноження може збільшити швидкість розмноження

рослин. Зокрема для регенерації саджанців *in vitro*, ініціюються нетрансформовані та трансформовані культури «бородатих» коренів.

У випадку культивування калусу (недиференційованого чи диференційованого) та регенерації органів, біосинтез вторинних метаболітів за допомогою різноманітних методів залежить не лише від генотипів, але й від епігенетичних факторів (наприклад, фізіологічних, фізичних) [49].

До характерних переваг методу мікроклонального розмноження лікарської рослини *R. rosea* відносять:

- отримання генетично однорідного посадкового матеріалу;
- звільнення рослин від вірусів;
- наявність високого коефіцієнту розмноження;
- прискорення переходу рослин до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження та культивація рослини, що важко розмножується традиційними способами;
- можливість розмноження протягом цілого року, без урахування впливу пір року;
- економія площ, необхідних для вирощування посадкового матеріалу.

Вибір типу експланта є вирішальним фактором успішної реалізації морфогенного потенціалу ізольованих клітин. Тип експланту може визначити органогенну та генетичну стабільність наступних зразків після клонування. Це є причиною великої кількості експлантів, які використовуються для ініціації культур *in vitro* в *R. rosea*.

Згідно проведених досліджень, листки або листкові диски були кращими експлантатами для формування калусу, бруньок та пагонів [49-51]. Менш використовуваними експлантами були пазушні бруньки [52], сегменти стебла [51,53], верхівки пагонів і бруньки [47,54], а також бруньки вузлів і

кореневищ [47,55], вирізані з рослин, що росли в природному середовищі та *in vitro*. Також верхівкові бруньки та вузли стебла з саджанців *in vitro* були об'єктом інших досліджень [47,54, 55].

До основних методів мікроклонального розмноження належать:

- Активація вже існуючих в рослині меристем (апекс стебла, пазушні та сплячі бруньки стебла);
- утворення адвентивних пагонів безпосередньо тканинами експлантів;
- індукція соматичного ембріогенезу;
- диференціація адвентивних бруньок в первинній та пересадковій калусній тканині.

Також дуже важливими факторами, що впливають на процеси утворення калюсу, органогенезу, регенерації та розмноження *in vitro*, є поживні середовища та фіторегулятори. Хімічний склад середовища та його фізичні властивості повинні відповідати вимогам кожного етапу розвитку культури [56]. Перевірка різних поживних середовищ Murashige-Skoog (MS), Linsmaer- Skoog, Gamborg, White і Nitsch-Nitsch показала, що останній був найкращим для розвитку рослини з кінчиків пагонів, тоді як середовище MS допускало різні реакції від різних типів експлантів [49]. Також середовище MS порівняно з White виявилось кращим для оцінки морфогенного потенціалу *R. rosea* [57], а також для калусних культур і регенерації [58].

Для культур *R. Rosea in vitro* найчастіше за все використовують поживне середовище Мурасіге-Скуга (MS). Зазвичай його доповнюють різними регуляторами росту в різних комбінаціях і концентраціях. В різноманітних дослідженнях найбільш широко використовувалися такі регулятори росту як: 6-бензиламінопурин (BAP), індол-3-оцтова кислота (IAA), індол-3-масляна кислота (IBA), 1-нафтил оцтова кислота (NAA), 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-D), зеатину, 2-

диметиламінопурину (2-іР), кінетину та тидіазурону (TDZ) [47,49-53,58].

Велика кількість проведених досліджень підтвердила, що отримання кращих результатів з виявлення морфогенетичного потенціалу можна досягти за допомогою відповідного балансу між типами експлантів і поживними середовищами, збагаченими відповідною концентрацією фіторегуляторів та інших поживних добавок.

Також у одному з проведених досліджень отримані *in vitro* лікарської рослини *R. rosea* фітохімічно досліджували на наявність біологічно активних речовин, яких не було виявлено в достатній кількості в коренях місячних регенерантів у пробірках. Однак салідрозид утворювався в кореневищах і коренях одно- і дворічних регенерантів, вирощених як у горах [59], так і в теплиці. Результати були багатообіцяючими, оскільки вміст салідрозиду в регенерантах був вищим, ніж у диких рослинах.

1.3. Специфічні властивості лікарської рослини *Rhodiola rosea* L. та способи їх використання

Рослини родіоли давно використовуються як лікарські та їстівні рослини в Європі та Азії. Одним з найвідоміших видів родіоли є *R. rosea*, також відомий як рожевий корінь, рожевий корінь, золотий корінь і арктичний корінь. Екстракти *R. rosea* у вигляді відвару або спирту широко використовувалися в традиційній медицині Скандинавії та інших країн сходу та півночі протягом багатьох століть для усунення втоми, підвищення фізичної активності, полегшення висотної хвороби у високогірній місцевості.

В наш час через стрімке зростання попиту на продукти на основі родіоли на ринку протягом останніх кількох років, у багатьох країнах родіола вважається зникаючим видом рослин.

Шведським трав'яним інститутом (SHI, Гетеборг, Швеція) був виготовлений стандартизований екстракт лікарської рослини *R. rosea*, під назвою SHR-5. Екстракт SHR-5 пройшов широкі

токсикологічні дослідження та був сертифікований як безпечний як для тварин, так і для людей [60, 61]. З 1985 року SHR-5 був комерціалізований, і було проведено численні клінічні випробування SHR-5 які показали, що SHR-5 покращує розумову працездатність, зокрема здатність концентруватися, підвищує рівень уваги в когнітивних функціях при втомі після одноразового та повторного введення [62,63], а також запобігає фізичному, емоційному та розумовому виснаженню у пацієнтів із синдромом вигорання та втоми. У клінічних випробуваннях було також показано, що SHR-5 ефективний у лікуванні легкої та помірної депресії та загальної стривоженості [63].

Відомо, що препарат можна застосовувати як допоміжний засіб при нервово-психічних захворюваннях, неврозах, невротичних розладах і психопатіях. У психіатричній практиці екстракти родіоли рожевої показані для корекції неврологічних побічних ефектів, пов'язаних з психофармакологічною терапією, а також для інтенсифікації та стабілізації ремісії у хворих на шизофренію астенічного та апатично-абулічного типу [64]. Одне з проведених досліджень продемонструвало ефективність стандартизованого екстракту SHR-5 при застосуванні суб'єктам, які страждали від легкої до помірної депресії, безсоння, емоційної нестабільності та певного рівня соматизації. Інтенсивність цих симптомів депресії, як визначено в підгрупах за індикаторами симптомів за Шкалою Гамільтона для оцінки депресії (HAM-D) були подібними в групах лікування та в групах з плацебо до початку лікування [65].

Ефективність екстракту SHR-5 щодо депресивних індикаторів та скарг оцінювали в дні 0 і 42 періоду дослідження за загальними і специфічними підгруповими балами HAM-D. Для осіб у групах А та В загальна депресія разом із безсонням, емоційною нестабільністю, значно покращилися після прийому ліків, тоді як група плацебо не показала таких покращень. Жодних серйозних побічних ефектів не було зареєстровано в жодній із груп. Зроблено висновок, що стандартизований екстракт SHR-5 демонструє антидепресивну

дію у пацієнтів із легкою та помірною депресією при застосуванні в дозах 340 або 680 мг/день протягом 6-тижневого періоду [65].

У процесі промислового збору лікарських рослин *R. rosea* в культурі *in vitro*, більший інтерес представляють коріння та кореневища (підземна частина), як засіб, що знімає втому і підвищує працездатність, а також для лікування хвороб шлунково-кишкового тракту, нервової системи і головним чином для покращення здоров'я в цілому, проте також відбирають надземні органи (трави). Листя, квіти і стебла також можуть бути корисними джерелами біоактивних метаболітів і, на відміну від коренів і кореневищ, їх збір не призводить до знищення природних запасів.

Родіола традиційно використовується як нетоксичний препарат, що було підтверджено результатами досліджень як на тваринах, так і на людях. Клінічні дослідження різних екстрактів родіоли показали, що родіола добре переноситься з відсутністю або з невеликою кількістю побічних ефектів, які спостерігаються у здорових людей або пацієнтів із симптомами життєвого стресу, ішемічної хвороби серця або неврологічних розладів [66,67]. Лише кілька звітів вказують на повторні дози родіоли що спричиняли легке запаморочення та шлунково-кишковий дискомфорт. Проте, чи пов'язані ці побічні ефекти з родіолою чи пацієнтами, не було підтверджено. Згідно з відомими токсикологічними даними досліджень на тваринах, родіола, включаючи *R. rosea*, *R. heterodonta*, *R. imbricate*, *R. fastigiata*, *R. sacra* та *R. kirilowii*, загалом доведена як безпечна, та з відсутністю гострої та хронічної токсичності в умовах експерименту в терапевтичних цілях. Крім того, дослідження показали, що салідрозид, як один із основних активних компонентів родіоли, не призводить до материнської чи ембріональної токсичності в дозах 0,5, 0,25 та 0,125 г/кг у щурів [68] і не є токсичним у дозах до 1,5 г/кг у мишей [69].

Було проведено дослідження з оцінкою впливу екстракту лікарської рослини *R. rosea* на самооцінку тривоги, стресу, когнітивних функцій та інших симптомів настрою [70]. Згідно експерименту, 80 учасників із

помірним рівнем тривоги були розподілені в довільному порядку у дві різні групи. Одна з груп приймала лікування препаратами на основі екстракту *R. rosea*

(2 таблетки по 200 мг дози препарату *Vitano Rhodiola tablets*, 1 таблетка перед сніданком і 1 таблетка перед обідом) та контрольна група (без лікування). Через 14 днів есперименту, були проведені когнітивні тести та звіти з самооцінкою учасників. Порівняно з контрольною групою, експериментальна група продемонструвала значне зниження рівня тривоги, стресу, гніву та депресії через 14 днів, а учасники групи лікування звітували про значне покращення загального настрою. Жодних істотних відмінностей у когнітивних показниках між групами не спостерігалось. Також було підтверджено, що препарат *Vitano Rhodiola tablets* показав сприятливий та безпечний вплив на учасників. Хоча це було неплацебо-контрольоване дослідження, малоймовірно, що результати були результатом ефекту плацебо, оскільки зміни виявилися поступовими та були специфічними для певних психологічних показників.

Дослідження, які були проведені для виявлення протипухлинної дії екстрактів родіоли рожевої показали, що ці екстракти можуть пригнічувати ріст трансплантованих аденокарциноми Ерліха та лімфосаркоми Плісса [71], зменшують їх метастази в печінці та збільшують час виживання щурів із пухлинами. Крім того, екстракти родіоли рожевої в поєднанні з протипухлинним засобом циклофосфамідом призвели до посилення протипухлинної та протиметастатичної ефективності медикаментозного лікування, а також до зниження індукованої лікарськими засобами токсичності [72].

У дослідженнях клітинних культур *R. rosea* пригнічує клітинну проліферацію та індукує клітинний апоптоз у різних клітинах і клітинних лініях, включаючи клітинні лінії раку сечового міхура людини [73], клітинні лінії раку молочної залози [74], клітини раку легенів [75] і саркоми [76]. Клітинні лінії раку молочної залози з негативним рецептором естрогену

MDA-MB-231 і лінія клітин раку легенів A549 виявилися більш чутливими до цитотоксичного ефекту салідрозиду з IC50 10,7 і 14,3 мкМ відповідно [77].

Враховуючи, що дані про протипухлинну дію *in vivo* екстрактів родіоли рожевої та салідрозиду наразі дуже обмежені, проте фармакологічні властивості та механізми їх дії надзвичайно різноманітні. На відміну від поганої біодоступності більшості природних сполук, салідрозид є водорозчинною сполукою, яка швидко всмоктується при пероральному прийомі та має високу біодоступність. Салідрозид виводиться нирками і виділяється в сечі у високій концентрації. Сечовий міхур може бути ідеальним органом для хіміопрофілактики раку за допомогою екстрактів *R. rosea* та салідрозиду.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

У роботі були використані отримані листкові експланти та пагони з листками з використанням заготовленого зразку лікарської рослини *Rhodiola rosea* L.

2.2. Приготування живильних середовищ

Для приготування живильних середовищ використовували базове живильне середовище Мурасіге-Скуга (MS) до якого додавали різний вміст наступних регуляторів росту: 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота

(2.4-Д), 6-Бензиламінопурин (ВАР), кінетин (кін), гетероауксин або β -індолілоцтова кислота (ІАА) та 3-індолбутирова кислота (ІВА).

Для дослідження було приготовано 1 л рідкого базового середовища Мурасіге-Скуга. Базове середовище було рівномірно розподілене на 10 баночок по 100 мл в кожній. До кожної ємкості з рідким середовищем було додано 0,8 мг агар-агару та відповідний вміст задіяних в дослідженні термостабільних регуляторів росту (див. табл. 2.1).

Далі була проведена стерилізація готових середовищ на автоклаві за температури 80 °С протягом 20 хвилин після початку кипіння.

Після стерилізації рідкі середовища були розлиті в чашки Петрі згідно маркування зразків для подальшого застигання. Також був відібраний один зразок тільки з базовим MS середовищем в якості контролю, в якому були відсутні регулятори росту.

Таблиця 2.1

Живильні середовища з додаванням регуляторів росту

№ середовища	Базове середовище	Вміст регуляторів росту мг/л				
		2.4-Д	ВАР	кін	ІАА	ІВА
1	MS	2,5	1	-	-	-
2	MS	1	2,5	-	-	-
3	MS	-	2,5	-	-	-
4	MS	2,5	-	-	-	-
5	MS	-	1	-	-	-

6	MS	1	-	-	-	-
7	MS	-	-	-	0,5	-
8	MS	-	-	-	-	0,5
9	MS	2,5	-	1	-	-
10	MS	1	-	2,5	-	-
K	MS	-	-	-	-	-

2.3. Визначення впливу регуляторів росту на виживаність листкових експлантів, формування пагонів та коренеутворення

Для проведення дослідження з виявленням впливу регуляторів росту на виживаність листкових експлантів, утворення пагонів та ризогенез було відібрано листкові експланти заготовленого зразку лікарської рослини *Rhodiola rosea L.*

Для середовищ № 1,2,3,4,5,6,9,10 було відібрано по 10 листкових експлантів на яких попередньо було здійснено по 3-4 надрізи скальпелем. Далі ці листкові експланти було посаджено по 10 листкових пластинок на 1 зразок попередньо підготовленого застиглому середовища в чашках Петрі.

Середовища № 1,2,3,4,5,6,9,10 були відібрані для перевірки регенерації листкових пластинок з утворенням пагонів та коренів (див. табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Відібрані зразки для перевірки регенерації листкових експлантів з утворенням пагонів та коренів

№ зразку	1	2	3	4	5	6	9	10
----------	---	---	---	---	---	---	---	----

Вміст регуляторів росту мг/л	2,5 2.4-Д	2,5 ВАР	2,5 ВАР	2,5 2.4-Д	1 ВАР	1 2.4-Д	2,5 2.4-Д	2,5 кін
	1 ВАР	1 2.4-Д					1 кін	1 2.4-Д

Для зразків на середовищах № 7,8 та К (контроль) було відібрано по 6 зрізаних пагонів з листками та бруньками на кожний зразок. Ці зразки були взяті для перевірки коренеутворення (див. табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Відібрані зразки пагонів для перевірки коренеутворення

№ зразку	7	8	К
Вміст регуляторів росту мг/л	0,5 ІАА	0,5 ІВА	Без регуляторів росту

2.4. Визначення вмісту флавоноїдів

Для визначення вмісту флавоноїдів було взято по 5 кювет для середовищ № 7, № 8 та № К (контроль). Змішували по 250 мкл екстракту, 1 мл дистильованої води та 75 мкл 5 % розчину NaNO_2 . Після цього розчини перемішували та залишали на 5 хвилин за кімнатної температури. Далі додавали 75 мкл 10 % AlCl_3 і знову перемішували та залишали на 5 хвилин. Потім додавали 0,5 мл 1 М NaOH та 0,6 мл H_2O .

Також було взято 1 кювету для контрольного зразку, в яку замість 250 мкл екстракту було додано 250 мкл H_2O .

Також було проведено калібрування розчином рутину в 5 кюветах, в яких замість розчину екстракту було додано 250 мкл рутину різної

концентрації: 0,5 мг/мл; 0,25 мг/мл; 0,125 мг/мл; 0,062 мг/мл та 0,031 мг/мл.

Розчини перемішували та визначали на спектрофлюориметрі поглинання за фіксованої довжини хвилі 510 нм.

2.5. Визначення частоти та ефективності регенерації пагонів та коренеутворення

Для визначення частоти та ефективності регенерації пагонів, а також коренеутворення було взято по 5 окремих рослин (включаючи пагони з листками, бруньками та корінцями) від кожного з середовищ № 7, № 8 та № К (контроль).

Пагони та корінці, які механічно очищувались від залишків поживного середовища, зважувалися на вагах та були порівняні між зразками з різних середовищ за масою. Для визначення співвідношення частоти та ефективності регенерації пагонів та коренеутворення між зразками порівнювалися середні маси пагонів та коренів зразків.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для проведення дослідження надрізані листкові експланти та пагони лікарської рослини *Rhodiola rosea* L. були поміщені в чашки Петрі з поживним середовищем Мурасіге-Скуга (MS). Зразки з поживним середовищем MS мали різний вміст таких регуляторів росту (відповідно до табл. 2.1): 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2.4-Д), 6-Бензиламінопурин (BAP), кінетин (кін), гетероауксин або β -індолілоцтова кислота (IAA) та 3-

індолбутирова кислота (ІВА).

Поживні середовища № 1,2,3,4,5,6,9,10 містили по 10 листкових експлантів для перевірки регенерації з утворенням пагонів. Середовища № 7,8 та К (контроль) мали по 6 зрізаних пагонів з листками та бруньками на кожний зразок і були відібрані для перевірки ризогенезу.

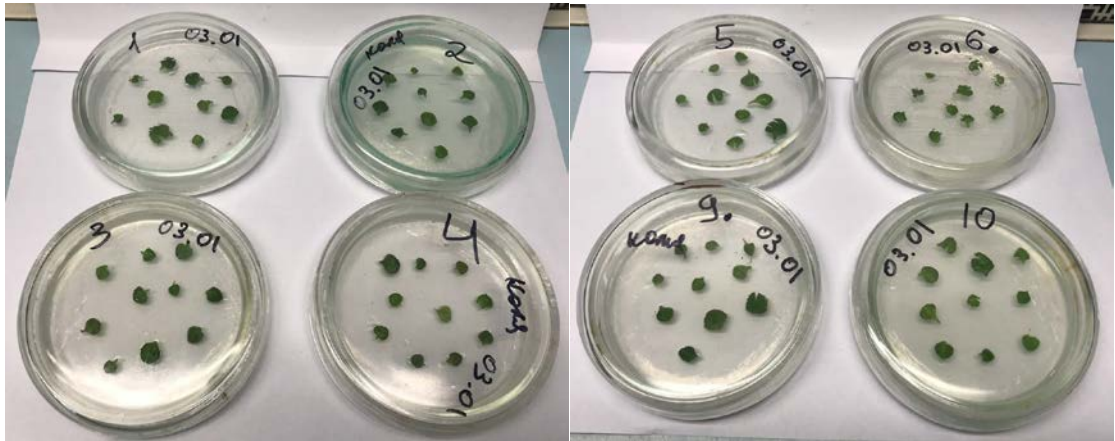
Перевірка ходу дослідження була зосереджена на видимих змінах в зразках впродовж часу, а саме регенерації з утворенням пагонів, зміні забарвлення листків, почорнінні надрізів, утворенні калусу, ініціюванні ризогенезу чи появі інших непередбачуваних змін.

3.1. Визначення оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції регенерації пагонів та коренеутворення зразків № 1-6, № 9, № 10

Rhodiola rosea L.

Середовища № 1,2,3,4,5,6,9,10 містили по 10 надрізаних листкових експлантів, в кожне середовище був доданий різний вміст регуляторів росту (таблиця 2.1). Ці зразки були відібрані для порівняння інтенсивності регенерації з утворенням пагонів та визначенням найкращої концентрації для регенерації пагонів.

На початку культивування (0 діб) були зроблені декілька знімків всіх середовищ зі зразками для підтвердження того що ніяких змін не відбулося в перші години культивації (рис 3.1).



а

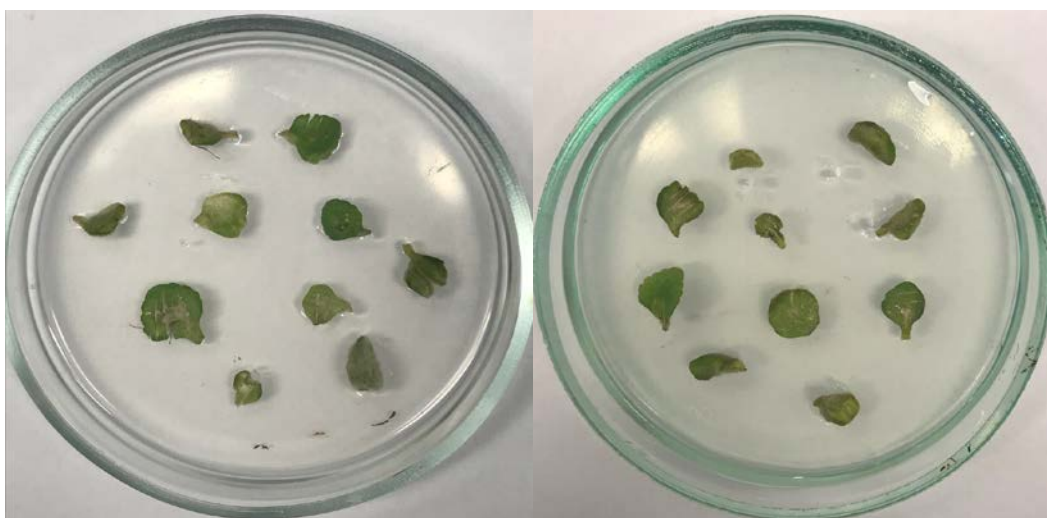
б

Рис. 3.1. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 1,2,3,4 (а) та № 5,6,9,10 (б) одразу на початку культивування (0 діб).

В середовищах № 1 та № 2 був використаний такий вміст регуляторів росту відповідно: 2,5 мг/л 2.4-Д + 1 мг/л ВАР та 1 мг/л 2.4-Д + 2,5 мг/л ВАР.

Після 7 діб культивації були зроблені знімки експлантів на цих середовищах (рис 3.2), які підтверджують те що колір листкових пластинок залишився зеленим, це свідчить про зберігання життєздатності листкових пластинок протягом тижня на середовищі MS з даним вмістом регуляторів росту ВАР та 2.4-Д для обох зразків. Також помітно що місця надрізів в зразках не почорніли. Регенерація та утворення калусу відсутні в зразках, проте наявна видима ворсинчастість поодиноких листкових пластинок в обох середовищах, хоча в середовищі № 1 вона більш помітна ніж в № 2.

Після 14 діб культивації на отриманих знімках середовищ № 1 та № 2 помітна ініціація регенерації (рис. 3.3).

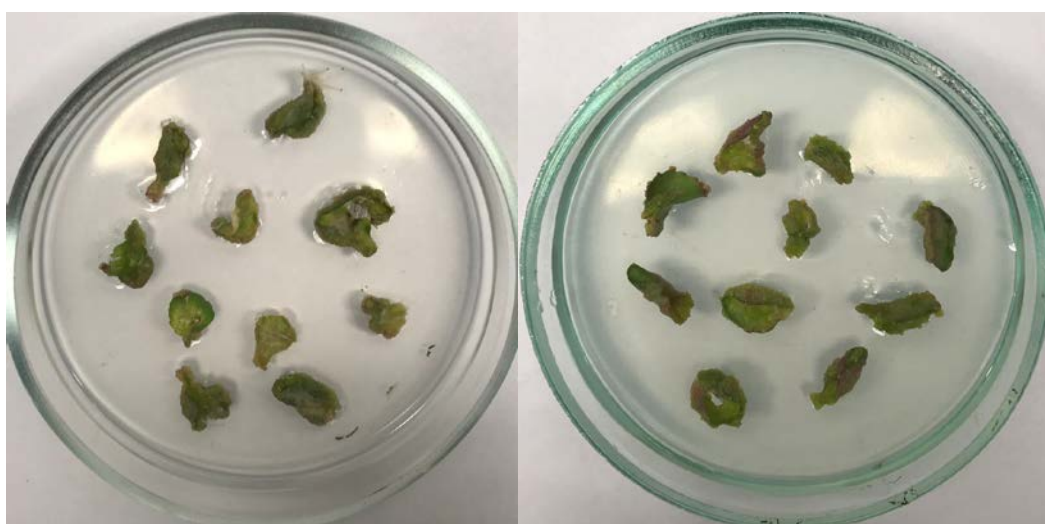


а

б

Рис. 3.2. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 1 (а) та № 2 (б) після 7 днів культивування.

Крім того, видно що колір листків залишився зеленим, листки збільшилися в розмірах та місця надрізів не почорніли. На даному етапі ворсинчастість листкових експлантів обох зразків непомітна. Також варто зазначити, що регенерація другого зразку більш проявлена, ніж зразку № 1.

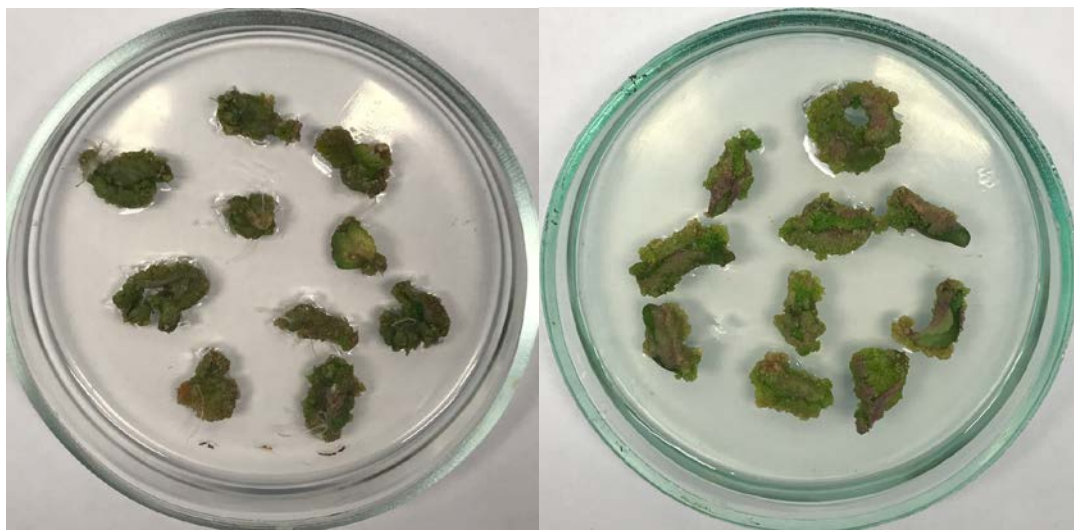


а

б

Рис. 3.3. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 1 (а) та № 2 (б) після 14 днів культивування.

Вже через 21 добу помітна 100%-ва регенерація всіх листкових експлантів зразків № 1 та № 2 (рис. 3.4). Більш того, регенерація зразку № 2 є більш інтенсивнішою, ніж в першому зразку. Листкові експланти мають зелений колір, а надрізи на них не почорніли. Також спостерігається утворення поодиноких коренів в зразку № 1, хоча в другому зразку ризогенез не наявний. Листкові пластинки обох зразків значно збільшені в розмірах, хоча листки зразку № 2 значно більші ніж першого зразку.

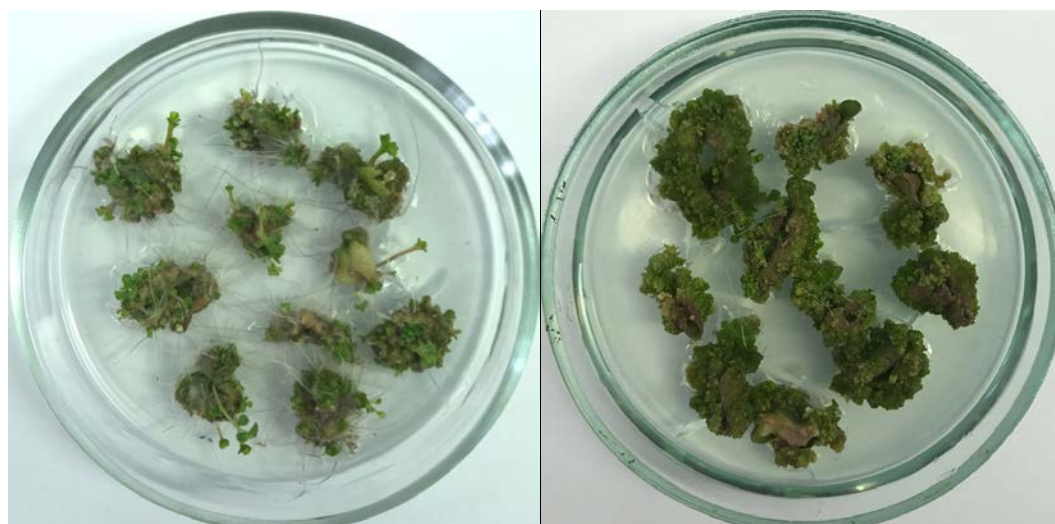


а

б

Рис. 3.4. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 1 (а) та № 2 (б) після 21 доби культивування.

На 35 добу культивування всі листкові експланти зразків № 1 та № 2 значно збільшилися в розмірах і залишилися зеленими (рис. 3.5). Регенерація по всій поверхні листків зразку № 2 є більш інтенсивнішою, ніж в першому зразку, хоча висота жодного з пагонів не досягає 10 мм. В зразку № 1 наявні поодинокі пагони висотою більше 10 мм, а також помітне інтенсивне коренеутворення всіх листкових пластинок якого майже немає в зразку № 2.

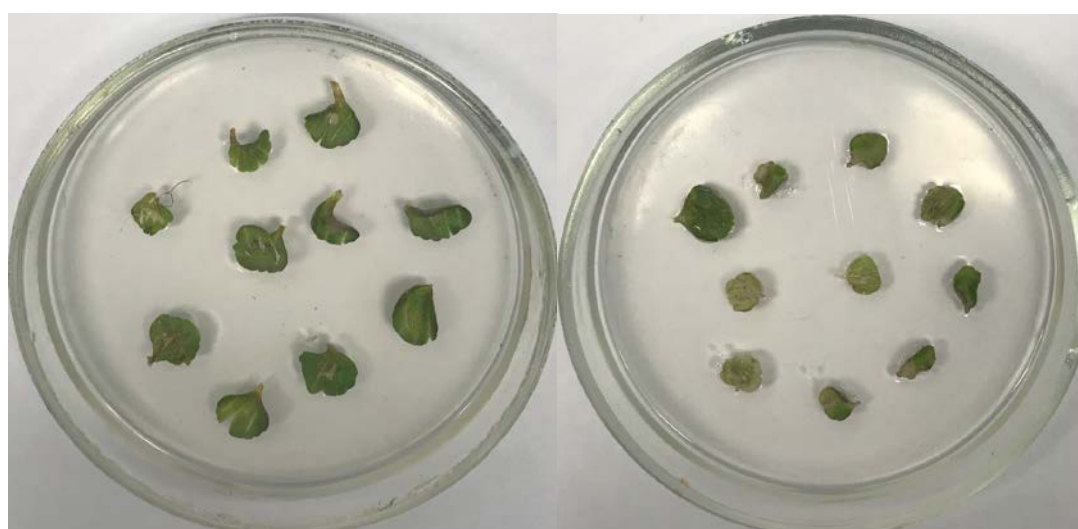


а

б

Рис. 3.5. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 1 (а) та № 2 (б) після 35 діб культивування.

Листкові експланти в зразках № 3 та № 4 (рис 3.6) були поміщені на поживні середовища MS з використанням таких регуляторів росту відповідно: 2,5 мг/л ВАР та 2,5 мг/л 2.4-Д.



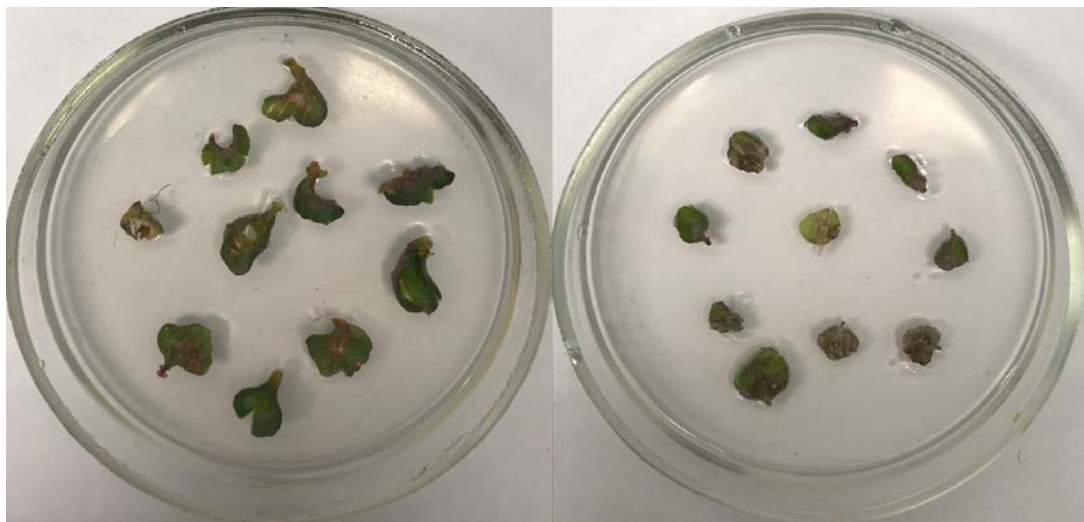
а

б

Рис. 3.6. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 3 (а) та № 4 (б) після 7 діб культивування.

Знімки цих зразків після 7 діб культивації (рис 3.6), показують що колір листкових пластинок є зеленим, проте в зразку № 4 з використанням регулятора росту, 2,4-дихлорфеноксиоцітової кислоти (2.4-Д), спостерігається часткове побіління листкових експлантів та незначна опушеність. Помітно що місця надрізів в зразках не почорніли. Регенерації та утворення калусу немає.

На 14-й день культивування листкові експланти зразку № 3 зберігали зелений колір та збільшилися в розмірах, в той час як в 40 % листків зразку № 4 потемнішали і не змінилися в розмірах (рис. 3.7). В обох зразках колір надрізів не змінився на чорний. Утворення калусу було ледь помітно в зразку № 3. Поява регенерації не спостерігалася. Опушеності зразків не було помітно.



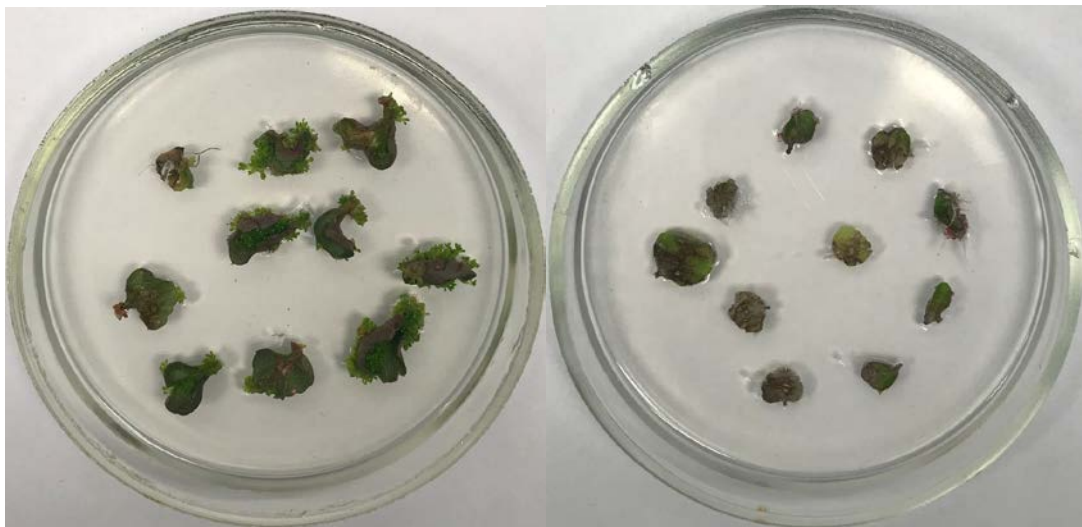
а

б

Рис. 3.7. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 3 (а) та № 4 (б) після 14 діб культивування.

Поява інтенсивної 100 %-ї регенерації в зразку № 3 спостерігалася на 21 добу культивування в ході якої було чітко видно окремі пагони (рис. 3.8).

Регенерація зразку № 3 була більш проявленою ніж у зразках № 1 та № 2. Колір листкових експлантів в зразку № 3 залишився зеленим, хоча 70 % листків зразку № 4 потемнішали. З іншого боку, частота коренеутворення усіх листкових експлантів зразку № 4 дорівнювала 60%, а також була ледве помітна ініціація регенерації з пагоноутворенням на окремих листкових експлантах.



а

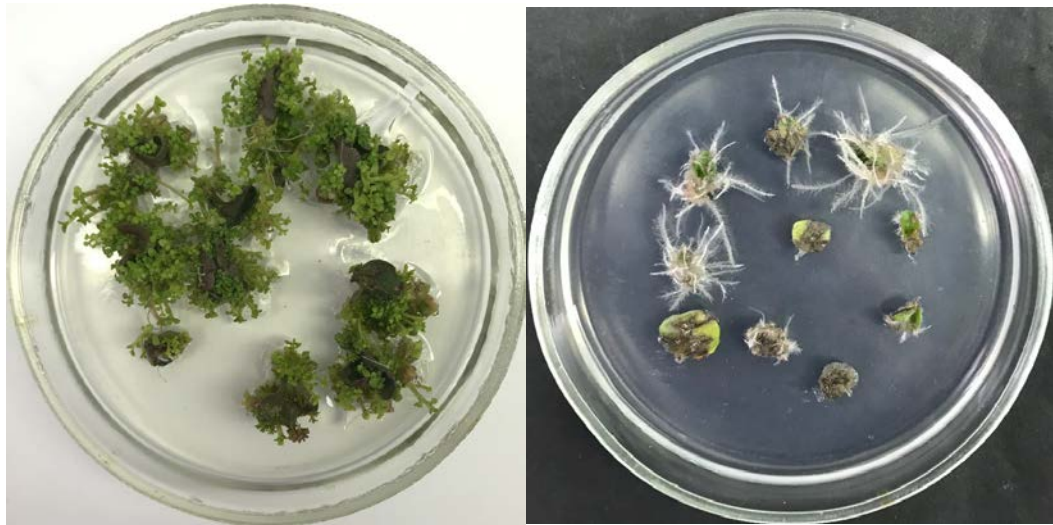
б

Рис. 3.8. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 3 (а) та № 4 (б) після 21 доби культивування.

Після 35 діб культивування чітко помітно інтенсивну масову регенерацію листкових експлантів зразку № 3 (рис. 3.9, а). Регенерація зразку № 3 призвела до утворення значно більшої кількості пагонів ніж в зразках № 1 та № 2. Велика кількість пагонів має висоту більшу ніж 10 мм. Помітна ініціація ризогенезу у 40 % листкових експлантів.

У зразку № 4 регенерація та утворення калусу не спостерігаються

(рис. 3.9, б). До 80 % листків майже повністю потемнішали. Наявне коренеутворення у 70 % листкових експлантів зразку № 4.



а

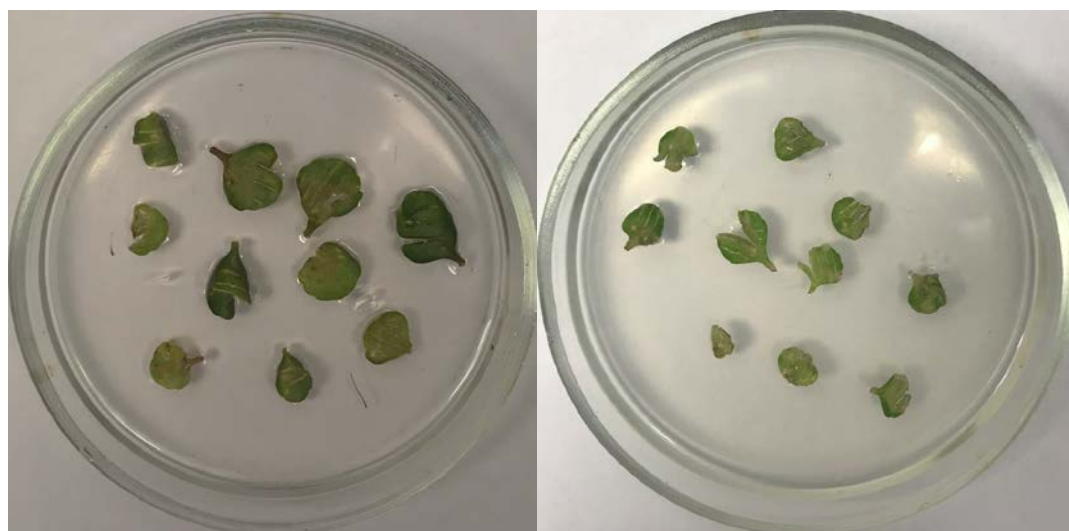
б

Рис. 3.9. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 3 (а) та № 4 (б) після 35 діб культивування.

В свою чергу листкові експланти зразків № 5 та № 6 знаходилися на середовищах MS в яких склад регуляторів росту був подібний до складу зразків № 3 та 4 відповідно, проте вміст регуляторів росту був менший за величиною: 1 мг/л ВАР та 1 мг/л 2.4-Д.

В ході 7-ї доби культивування листкові пластинки обох зразків залишилися зеленими і не мали потемніння місць надрізів. Також не було виявлено ініціації регенерації та утворення калусу (рис 3.10).

Після 14 діб культивування листки зразку № 5 значно збільшилися в розмірах та залишилися зеленими, на відміну від листкових експлантів зразку № 6, які пожовтіли та втратили інтенсивний зелений колір, але не потемнішали як в зразку № 4 (рис. 3.11).

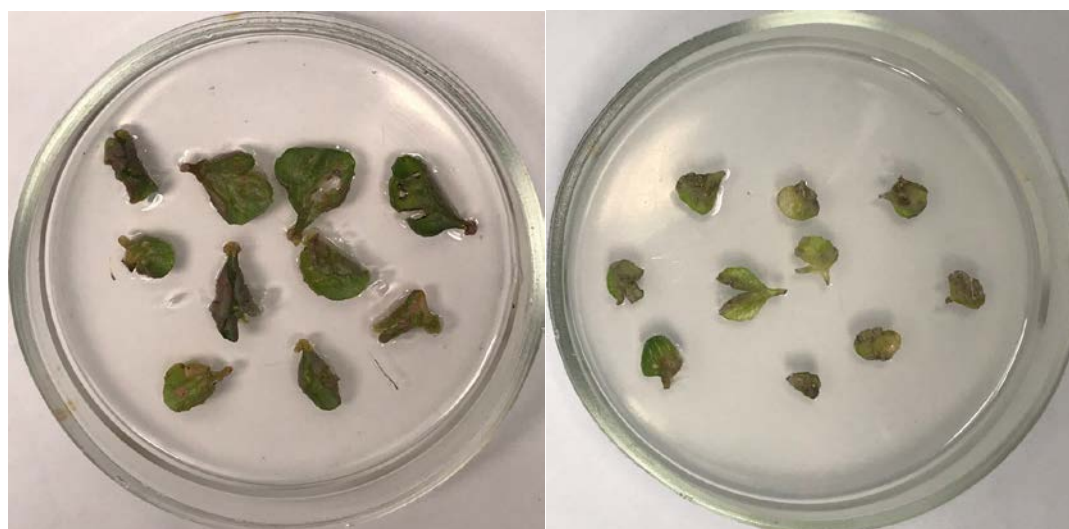


а

б

Рис. 3.10. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 5 (а) та № 6 (б) після 7 діб культивування.

В зразку № 5 була помітна початкова регенерація у поодиноких листкових пластинок (рис. 3.11, б), а також наявне потемніння надрізів, хоча в зразку № 6 був наявний початок проростання коренів на декількох листкових пластинках. Утворення калусу не спостерігалось в обох зразках.

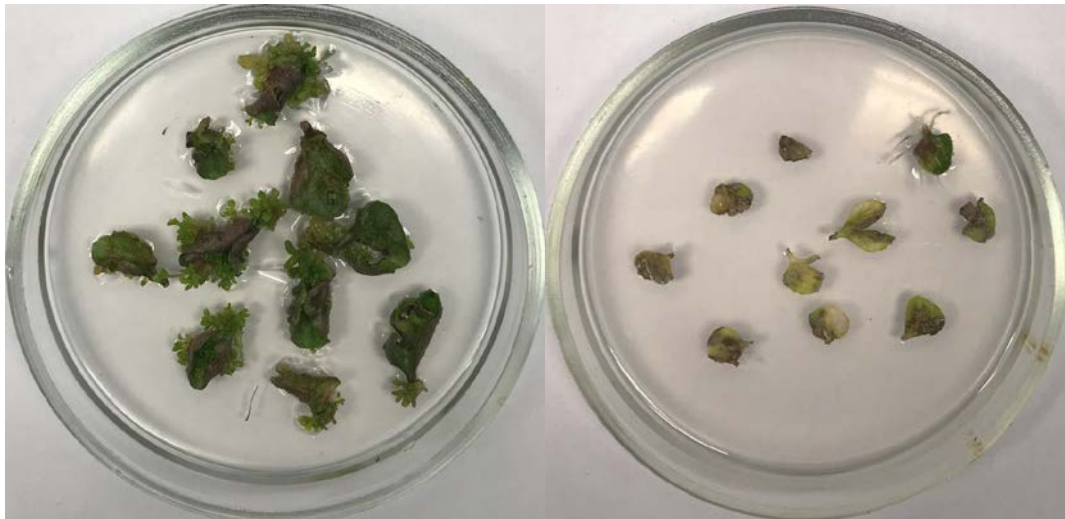


а

б

Рис. 3.11. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 5 (а) та № 6 (б) після 14 діб культивування.

На 21 добу культивування зразок № 5 продемонстрував регенерацію з пагоноутворенням яка була найбільш вираженою серед усіх інших зразків (рис 3.12, а). Були чітко помітні окремі пагони з листками, а також висота окремих пагонів була до 10 мм.



а

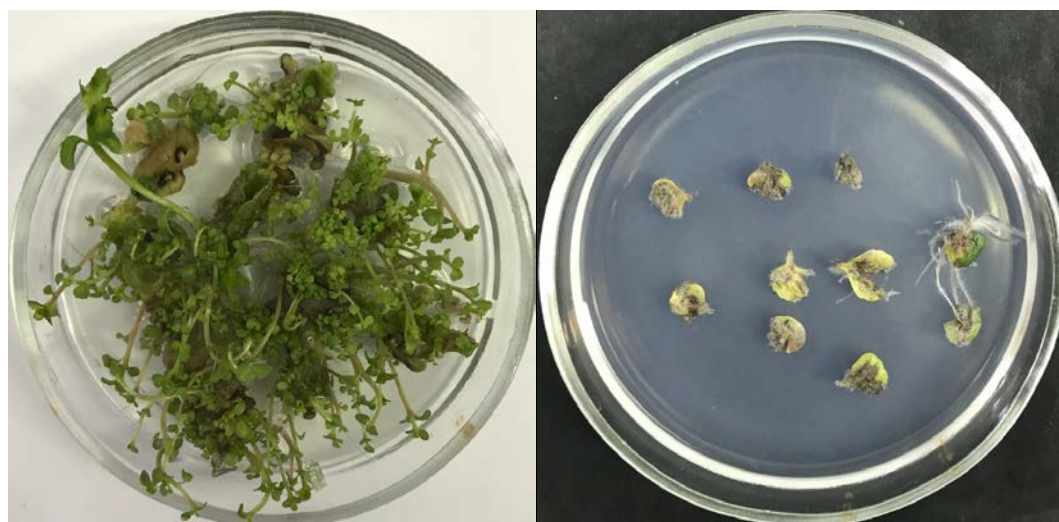
б

Рис. 3.12. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 5 (а) та № 6 (б) після 21 доби культивування.

Листки зразку № 5 залишалися зеленими, хоча до 80 % листків зразку № 6 потемнішали як і в зразку № 4. В свою чергу зразок № 6 мав помітний ризогенез 20 % листкових пластинок, хоча всі експланти цього зразку показали відсутність регенерації (рис. 3.12, б). Утворення калусу не було виявлено в обох зразках.

Через 35 діб культивації зразку № 5 наявна масова регенерація з пагоноутворенням зі 100 % листових пластинок (рис. 3.13, а). Регенерація зразку № 5 є найбільш вираженою серед усіх інших зразків, а висота більшості пагонів досягає 20 мм, а іноді і перевищує. Подекуди спостерігається потемніння надрізів листкових експлантів. Також помітне коренеутворення, хоча воно є менш інтенсивним ніж в зразку № 1.

У зразку № 6 після 35 діб культивації помітне пожовтіння 100 % листкових пластинок, а також потемніння до 70 % листків (рис. 3.13, б). Регенерація та утворення калусу відсутні. На 30 % листкових пластинок помітне незначне коренеутворення, що є менш інтенсивним від зразку № 4.



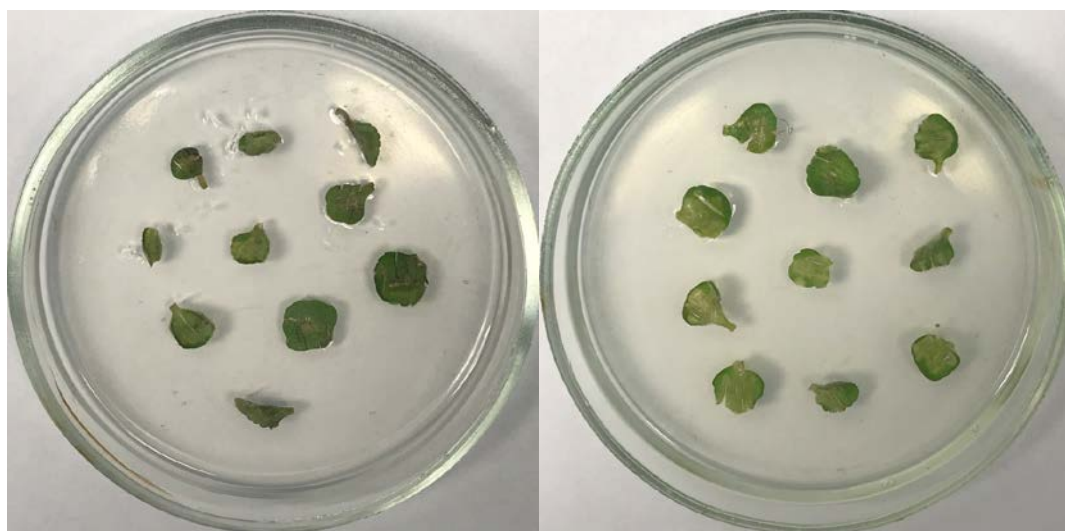
а

б

Рис. 3.13. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 5 (а) та № 6 (б) після 35 діб культивування.

Відібрані листкові експланти були посаджені на поживні середовища MS № 9 та № 10 з наступним вмістом регуляторів росту відповідно: 2,5 мг/л 2.4-Д + 1 мг/л кін та 2,5 мг/л кін + 1 мг/л 2.4-Д.

Вже через 7 діб культивування обидва зразки продемонстрували наявну опушеність листкових пластинок (рис. 3.14). Колір листкових експлантів зразків № 9 та № 10 був зеленим, а місця надрізів не почорніли. Регенерація з пагоноутворенням обох зразків, а також утворення калусу не були помічені.

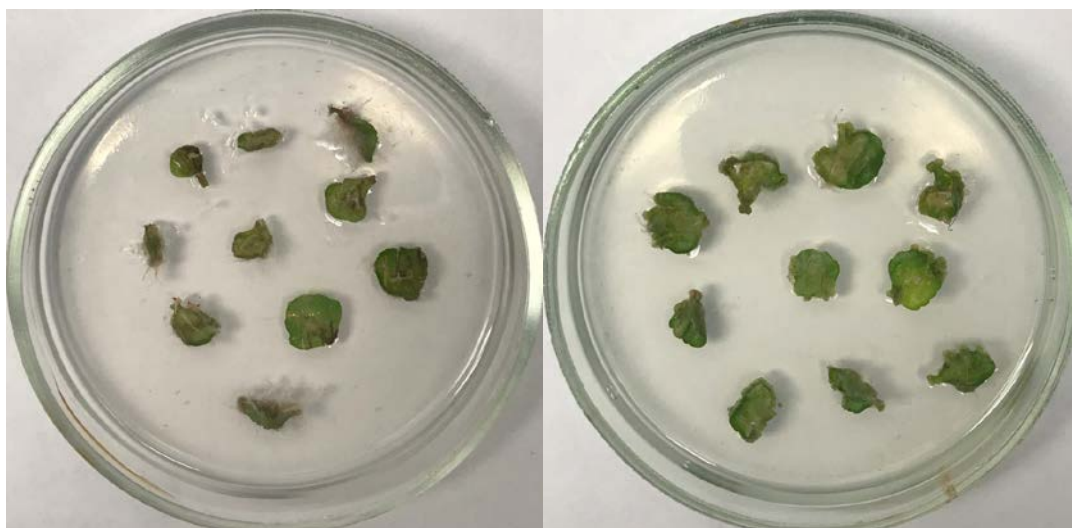


а

б

Рис. 3.14. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 9 (а) та № 10 (б) після 7 днів культивування.

Після 14 днів культивування було наявне інтенсивне коренеутворення зразків № 10 та № 9 (рис. 3.15). Колір листкових пластинок зразку № 10 був більш зеленуватий на противагу кольору листків зразку № 9. Спостерігалось незначне потемніння надрізів 9-го зразку. Регенерація не була помітна в обох зразках, проте було виявлено ініціацію утворення калусу в зразку № 10.

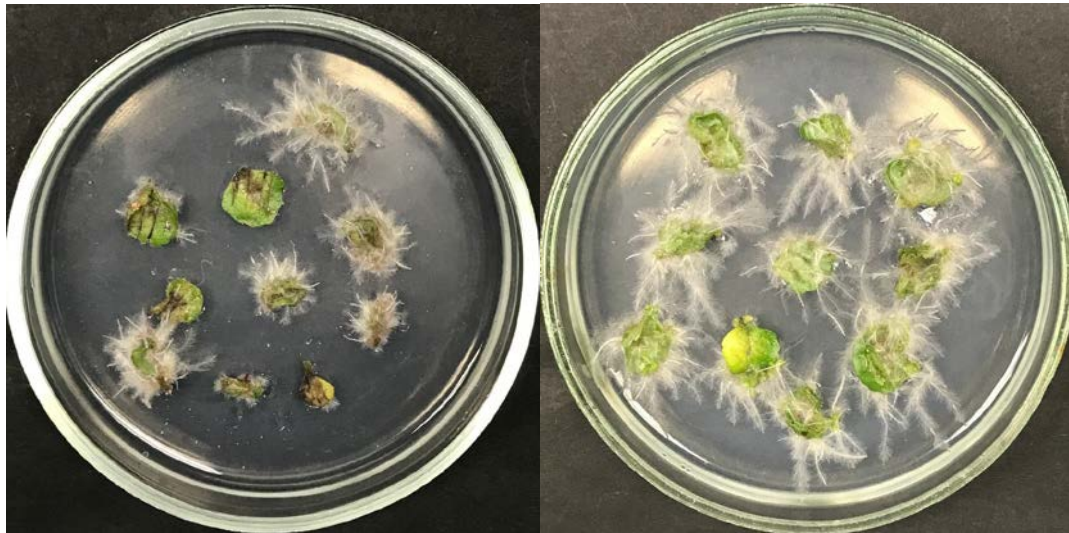


а

б

Рис. 3.15. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 9 (а) та № 10 (б) після 14 днів культивування.

Чітка поява масового ризогенезу з 100 %-ю частотою формування коренів спостерігалася в зразку № 10 через 21 добу культивування (рис. 3.16, б), на відміну від зразку № 9, де був чітко помітний ризогенез з 80 %-ю частотою формування коренів (рис. 3.16, а). Був використаний чорний фон для більш чіткішої візуалізації коренеутворення на отриманих знімках.



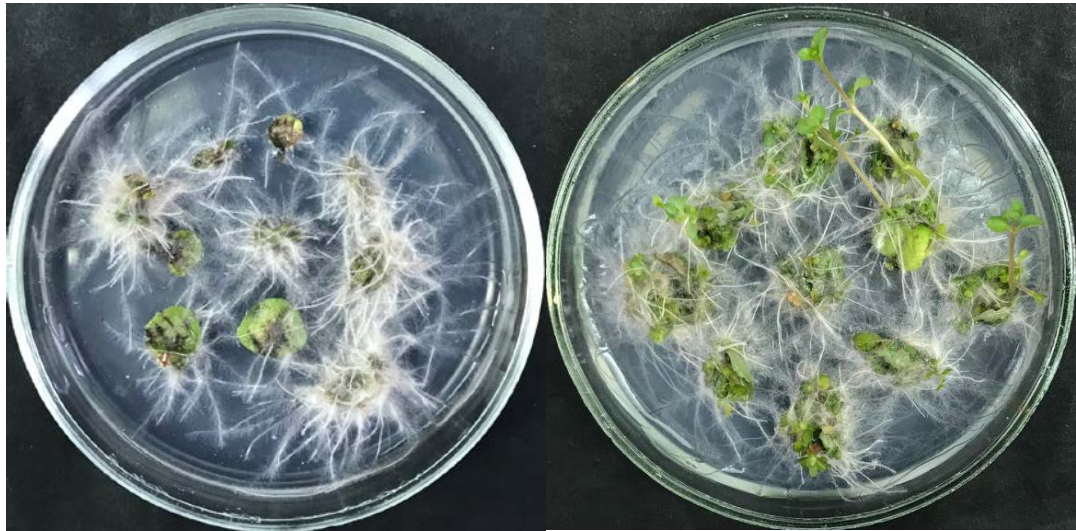
а

б

Рис. 3.16. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 9 (а) та № 10 (б) після 21 доби культивування.

Середовище № 9 після 35 діб культивування продемонстрував потемніння 70 % листкових експлантів (рис. 3.17, а). Також чітко видно потемніння надрізів всіх листкових пластинок зразку. Регенерація з пагоноутворенням не наявна. Спостерігається масовий ризогенез 100 % листків, що є набагато інтенсивнішим ніж в зразку № 10 (рис. 3.17, б).

Листки зразку на середовищі № 10 залишилися зеленого кольору. Потемніння надрізів не наявне. Помітна 100 %-ва регенерація з пагоноутворення усіх листкових експлантів, а також наявні пагони що за висотою перевищують 20 мм. Крім того, помітний масовий ризогенез 100 % листків, який за кількістю новоутворених пагонів перебільшує кількість в середовищі № 9, проте опушеність є значно нижчою.



а

б

Рис. 3.17. Листкові експланти лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 9 (а) та № 10 (б) після 35 діб культивування.

3.2. Визначення оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції коренеутворення зразків № 7, № 8 та № К *Rhodiola rosea* L.

Зразки на середовищах № 7, № 8 та № К (контроль) містили по 6 зрізаних пагонів з листками та бруньками на кожний зразок, які були посаджені на поживне середовище MS і були відібрані для перевірки ризогенезу. До поживних середовищ зразків № 7 та № 8 було додано рівний вміст регуляторів росту, а саме по 0,5 мг/л IAA та ІВА відповідно, а контрольний зразок не мав регуляторів росту взагалі (табл. 2.2).

Для підтвердження, що нічого не відбулося на початку перших годин культивації пагонів з листками та бруньками (0 діб) зразків № 7, № 8, № К, вони були сфотографовані (рис 3.18).

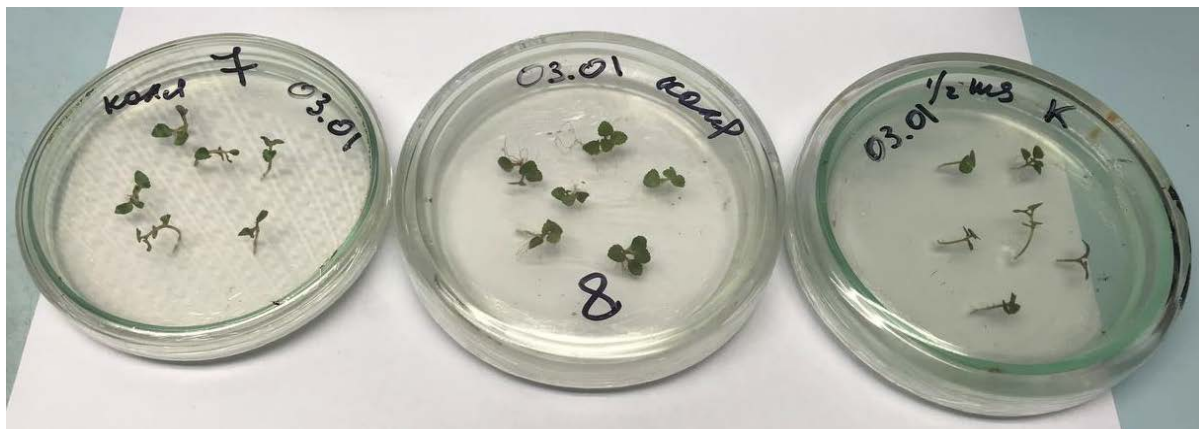


Рис. 3.18. Пагони з листками та бруньками лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 7, № 8 та № К в перші години культивування (0 діб).

Вже через 7 діб після культивування зразків, на пагонах з листками чітко видніється утворення коренів білого кольору з областей розташування бруньок усіх зразків (рис. 3.19).

Чітко помітний ризогенез зразку № 8, який є більш інтенсивним ніж у контрольному зразку та зразку № 7.

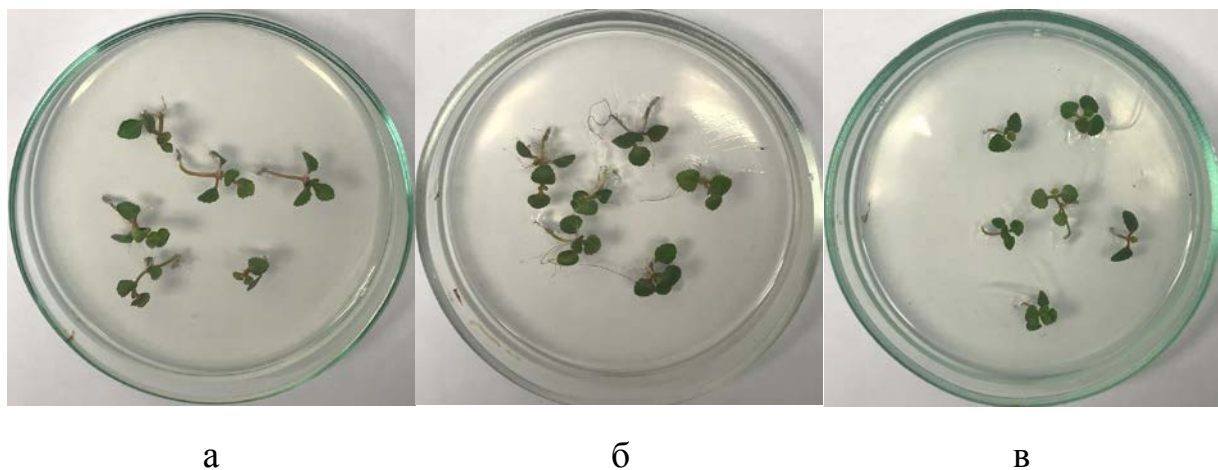


Рис. 3.19. Пагони з листками та бруньками лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 7 (а), № 8 (б) та № К (в) після 7 діб культивування.

Після 14 діб культивування зразок № 8 продемонстрував наявний ризогенез на пагонах з листками та бруньками, який був набагато інтенсивнішим, ніж у зразку № 7 та зразку № К (рис. 3.20). У контрольному

зразку були помітні поодинокі довгі корені, які були довші відносно зразків № 7 та № 8. За інтенсивністю коренеутворення зразку № К значно поступалося зразкам № 7 та № 8.

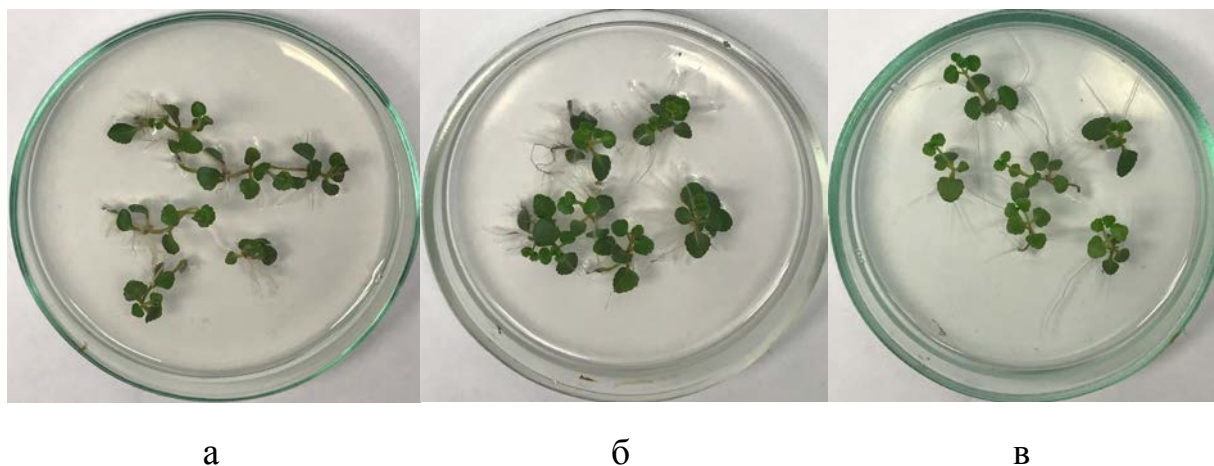


Рис. 3.20. Пагони з листками та бруньками лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 7 (а), № 8 (б) та № К (в) після 14 діб культивування.

Через 21 добу культивування було наявне інтенсивне коренеутворення на пагонах з листками з областей бруньок всіх зразків (рис. 3.21). В зразку № 8 ризогенез був найбільш виражений (рис. 3.21, б), а кількість розвинутих коренів на 1 рослину значно переважала, ніж у зразку № 7 та зразку № К.

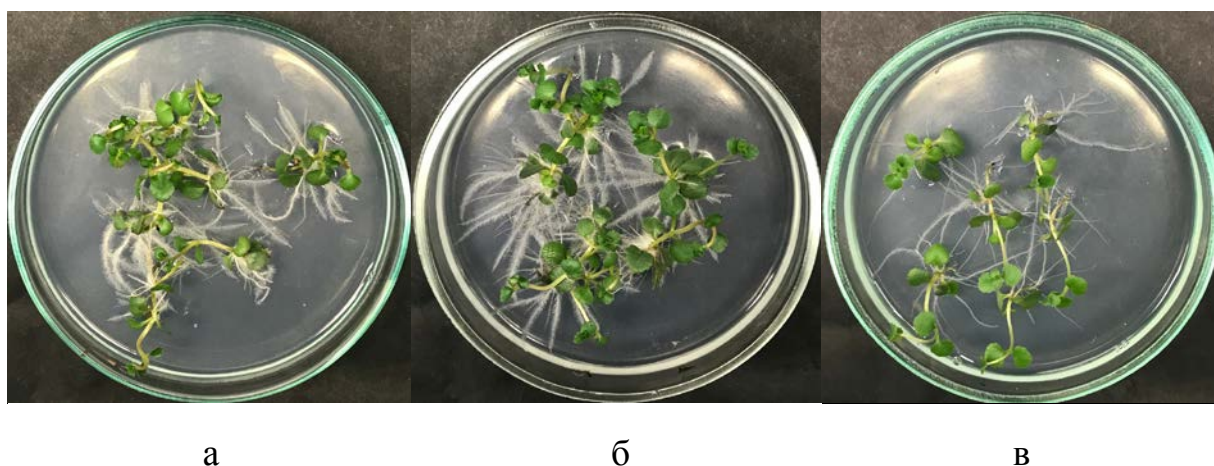


Рис. 3.21. Пагони з листками та бруньками лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 7 (а), № 8 (б) та № К (в) після 21 доби культивування.

У контрольному зразку спостерігалось утворення поодиноких довгих коренів (рис. 3.21, в), хоча за кількістю новоутворених коренів ризогенез значно поступався зразкам № 7 та № 8. На знімках був застосований чорний фон для покращення візуалізації інтенсивного коренеутворення всіх зразків після 21 доби культивування.

Помітний інтенсивний ріст всіх пагонів у висоту більше ніж 40 мм у зразках № 7 (рис. 3.22, а) та № 8 (рис. 3.22, б) після 35 діб культивування. Листки всіх зразків залишилися зеленими.

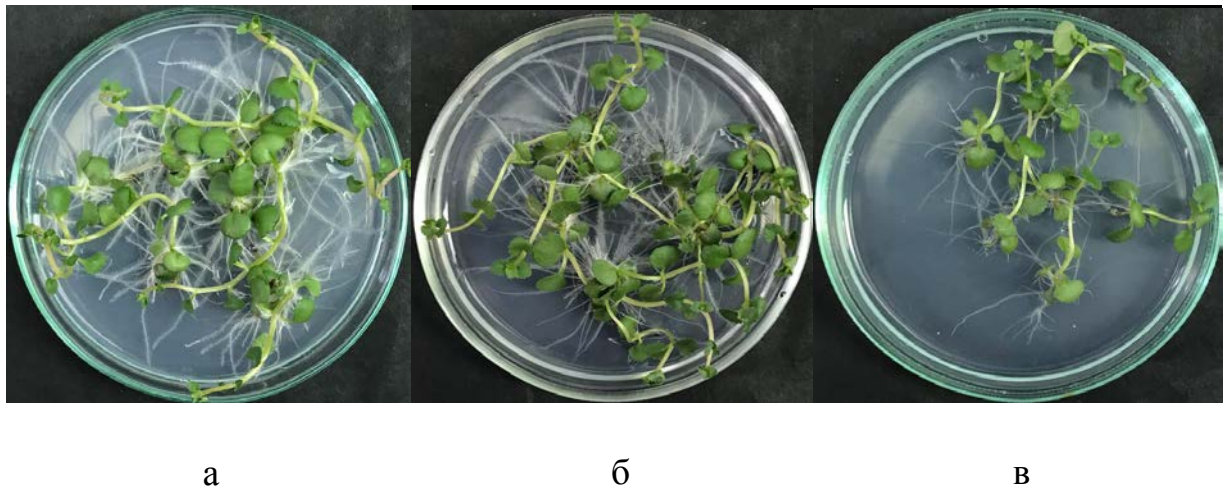


Рис. 3.22. Пагони з листками та бруньками лікарської рослини *R. rosea* середовищ № 7 (а), № 8 (б) та № К (в) після 35 діб культивування.

Наявний масовий 100 %-й ризогенез всіх пагонів зразку № 8, який за кількістю новоутворених коренів переважає кількість контрольного зразку та дорівнює зразку № 7. У зразку № 8 помітне масове коренеутворення 100 % пагонів, яке за інтенсивністю перевищує зразок № К та № 7, хоча за кількістю розвинутих коренів дорівнює зразку № 7. Помітна переважаюча кількість розвинутих листків зразку № 8 на відміну від зразку № 7 та контролю.

У контрольному зразку також спостерігається ріст пагонів у висоту, проте він є менш інтенсивнішим ніж в зразках № 7 та № 8. Щодо кількісного критерію ризогенезу зразку № К, то за кількістю новоутворених коренів

чітко видно, що контрольний зразок значно поступається обом іншим зразкам.

3.3. Дослідження частоти та ефективності регенерації пагонів та коренеутворення зразків лікарської рослини *Rhodiola rosea L.* на середовищах з регуляторами росту

При визначенні частоти та ефективності регенерації пагонів та коренеутворення було відібрано пагони з листками, бруньками та корінцями 5-ти окремих рослин зразків № 7, № 8 та № К (контроль) культивованих на середовищах з регуляторами росту (окрім зразку № К) більше 35 діб.

Пагони та корінці (попередньо очищені від залишків поживного середовища) 5-ти рослин кожного зразку були зважені та оцінені за показниками маси, зазначеними в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Маса коренів та пагонів з середовищ № К, № 7 та № 8 лікарської рослини *Rhodiola rosea L.*

№	Середовище № К (контроль)		№	Середовище № 7 (ІАА)		№	Середовище № 8 (ІВА)	
	Маса коренів, г	Маса пагонів, г		Маса коренів, г	Маса пагонів, г		Маса коренів, г	Маса пагонів, г
1	0.0061	0.1087	6	0.0566	0.1814	11	0.0760	0.3264
2	0.0128	0.1093	7	0.0590	0.2310	12	0.0993	0.2938
3	0.0098	0.0946	8	0.0851	0.2696	13	0.0825	0.3795
4	0.0131	0.1054	9	0.0725	0.3302	14	0.0962	0.2878

5	0.0152	0.1114	10	0.0753	0.3529	15	0.0791	0.2697
Сер. маса	0.0114	0.1058		0.0697	0.2730		0.0866	0.3114

В ході дослідження було визначено середні маси коренів та пагонів зразків, які в подальшому порівнювалися між собою.

На діаграмі (рис. 3.23), що демонструє співвідношення середніх мас коренів зразків № К (контроль), № 7 (ІАА) та № 8 (ІВА) лікарської рослини *R. rosea*, чітко видно різницю між оцінюваними зразками.

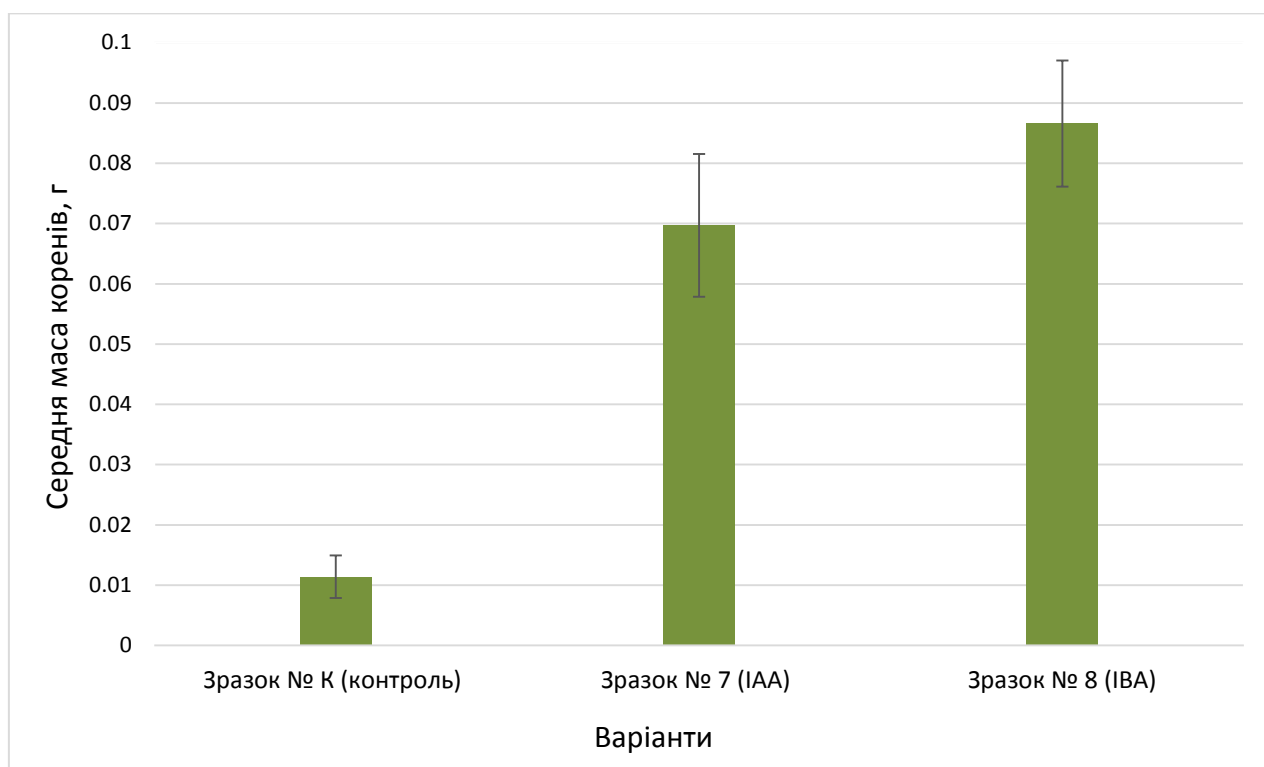


Рис. 3.23. Співвідношення середньої маси коренів між зразками № К (контроль), № 7 (ІАА) та № 8 (ІВА) лікарської рослини *R. rosea*.

Зразок № К, поживне середовище якого було створене без використання регуляторів росту, демонструє найменшу середню масу коренів серед порівнюваних зразків, що вказує на найнижчу частоту та ефективність коренеутворення.

Зразки № 7 та № 8, культивовані на середовищах з використанням регуляторів росту ІАА та ІВА відповідно, мали в рази більшу середню масу коренів в порівнянні з контрольним зразком (рис. 3.23), що свідчить про значно вищу частоту та ефективність ризогенезу. Найбільшу ефективність та частоту коренеутворення виявив зразок № 8.

Також за ідентичною процедурою відбулося порівняння середніх мас пагонів з листками зразків № К (контроль), № 7 (ІАА) та № 8 (ІВА) лікарської рослини *R. rosea* (рис. 3.24).

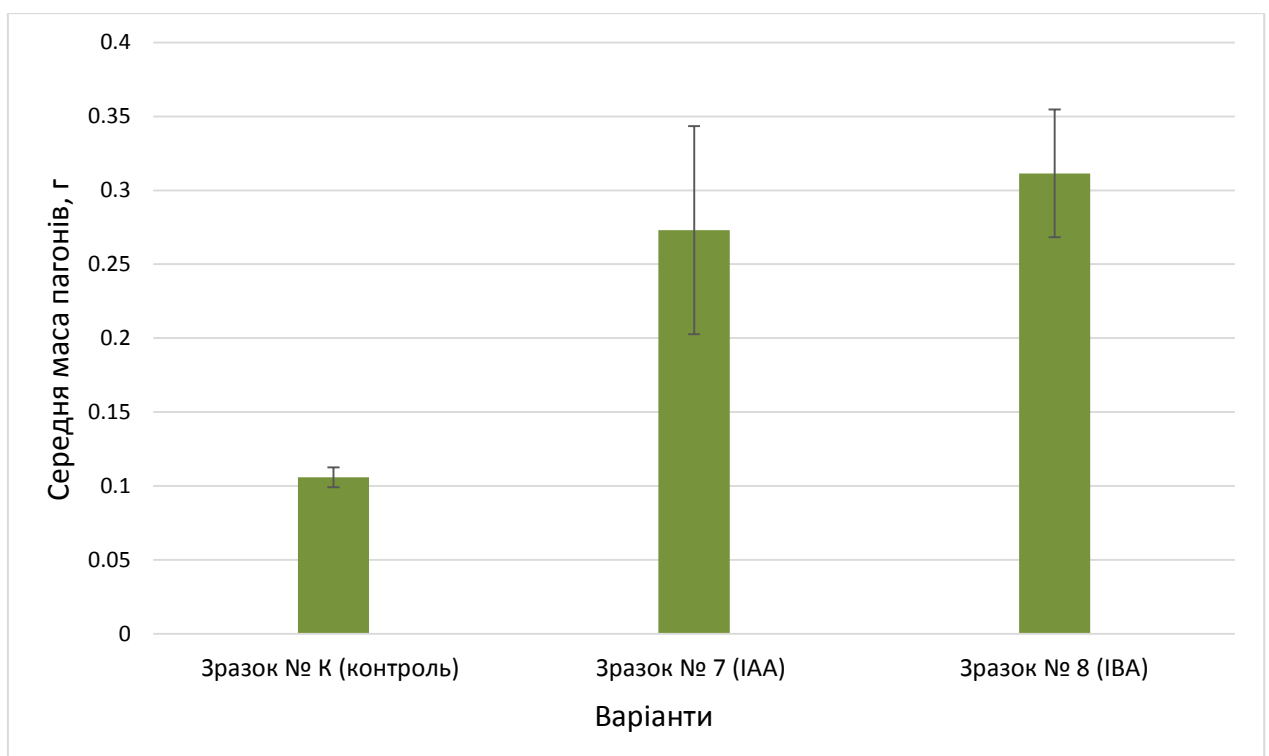


Рис. 3.24. Співвідношення середньої маси пагонів між зразками № К (контроль), № 7 (ІАА) та № 8 (ІВА) лікарської рослини *R. rosea*.

Серед 3-х оцінюваних варіантів добре помітно, що зразок № К, який був культивований на середовищі без регуляторів росту, виявив найменшу ефективність і частоту утворення пагонів, оскільки він демонструє середню масу пагонів, що є найменшою відносно зразків № 7 та № 8.

Зразок № 8, з середовищем на регуляторі росту ІВА, продемонстрував найбільшу ефективність у пагоноутворенні серед усіх інших зразків, тому як

помітно що показник середньої маси пагонів цього зразку є найвищим у співвідношенні щодо інших зразків.

3.4. Визначення вмісту флавоноїдів в розчинах з додаванням екстрактів з пагонів з листками лікарської рослини *Rhodiola rosea* L. зразків № 7, № 8 та № К

Для визначення вмісту флавоноїдів в розчинах з додаванням екстрактів з пагонів з листками лікарської рослини *R. rosea* було зроблено розчини в 5 кюветах для зразків № 7, № 8 та № К (контроль) за $AlCl_3$ методом. Також було відібрано 1 кювету для контрольного зразку, в яку замість екстракту додавали H_2O .

Калібрування проводилось розчином рутину в 5 кюветах, в яких замість розчину екстракту було додано розчин рутину різної концентрації: 0,5 мг/мл; 0,25 мг/мл; 0,125 мг/мл; 0,062 мг/мл та 0,031 мг/мл.

В ході експерименту спостерігалася зміна кольору розчинів на малиновий колір. Після чого було отримано дані про поглинання розчинів за допомогою спектрофлюориметру за довжини хвилі 510 нм.

Далі відбиралися середні значення показників оптичної густини з 5 кювет кожного зразку. З показників оптичної густини були отримані значення вмісту флавоноїдів (міліграм на грам сухої маси) для кожного зразку, які потім порівнювалися між собою за величинами і далі на їх основі була побудована діаграма (рис. 3.25).

Як ми бачимо з діаграми найбільший вміст флавоноїдів спостерігається в зразку № 8 (ІВА), а також у зразку № 7 (ІАА). Це підтверджує що ці зразки є найбільш ефективними для пагоноутворення та мікроклонального розмноження лікарської рослини *R. rosea*, оскільки вони демонструють найбільшу кількість відновлювальних агентів.

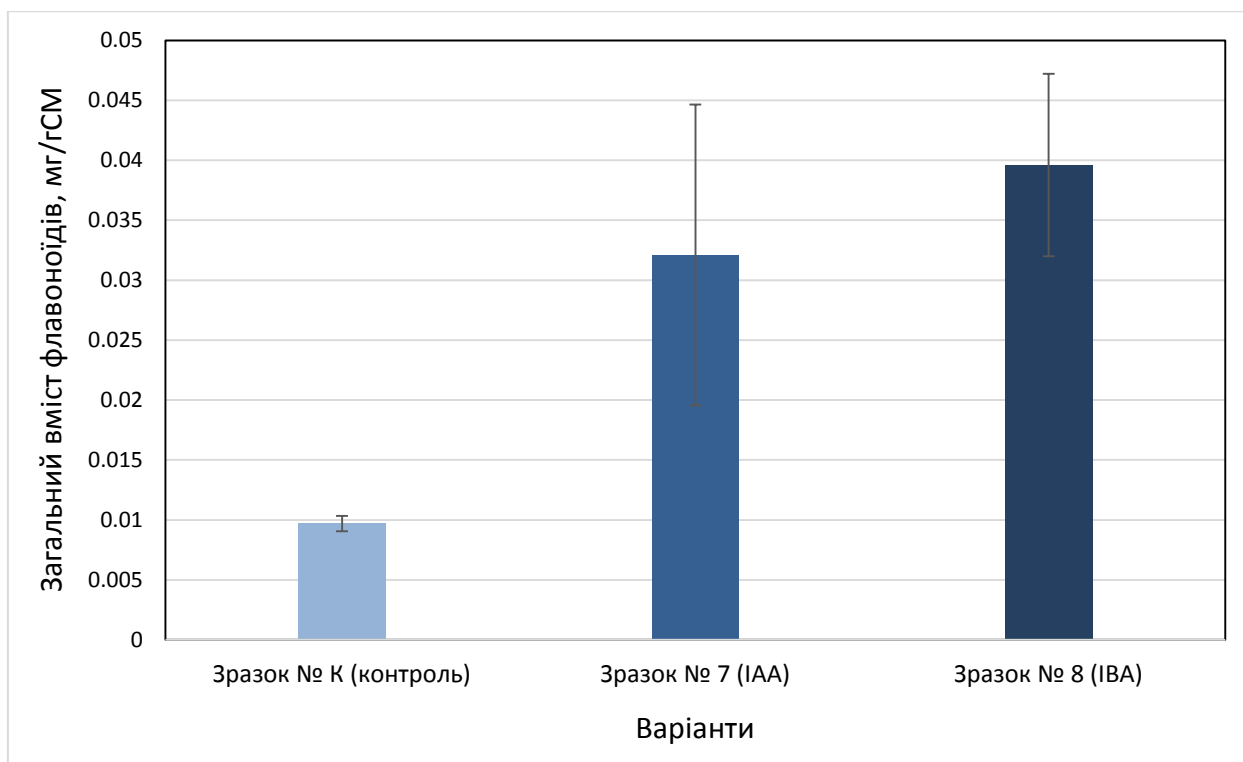


Рис. 3.25. Співвідношення загального вмісту флавоноїдів в розчинах з використанням екстрактів з пагонів з листками зразків № К (контроль), № 7 (IAA) та № 8 (IBA) лікарської рослини *R. rosea*.

Також з діаграми видно, що зразок № К (контроль) має найменший загальний вміст флавоноїдів у розчині з використанням екстрактів з пагонів з листками, що означає найменшу ефективність в макроклональному розмноженні на середовищах без використання регуляторів росту, які є присутніми в поживних середовищах інших порівнюваних зразків.

ВИСНОВКИ

1. Мікроклональне розмноження лікарської рослини *R. rosea* на середовищах з додаванням регуляторів росту за допомогою листкових експлантів та пагонів з листками є можливим практичним методом розмноження та збереження цієї рослини, оскільки результати проведеного дослідження показали регенерацію експлантів з утворенням пагонів і коренів в умовах, які відрізнялися від природних.

2. Швидкість та інтенсивність мікроклонального розмноження експлантів *R. rosea*, що культивувались на середовищах з регуляторами росту, в декілька разів вищі в порівнянні з середовищами без їх додавання. Було встановлено, що ефективність регенерації значно вища у експлантів, які культивувались на поживних середовищах з додаванням ВАР у якості регулятора росту. Підтвердженнями були наведені у роботі порівняльні знімки середовищ та діаграми.

3. Важливим фактором методу мікроклонального розмноження *R. rosea* є підбір необхідної концентрації регуляторів росту в поживних середовищах. Отримані знімки в ході дослідження продемонстрували, що експланти, культивовані на різних середовищах, відрізнялися за інтенсивністю регенерації, хоча мали однаковий тип регулятору росту, проте його різну концентрацію.

4. Значну роль відіграє використання конкретних регуляторів росту, або їх комбінацій, для ініціації процесу пагоноутворення та інших регуляторів росту для розвитку ризогенезу, в залежності від кінцевої мети мікроклонального розмноження *R. rosea*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Khanna K, Mishra KP, Ganju L, Singh SB. // Golden root: A wholesome treat of immunity. // *Biomed Pharmacother.* 2017;87:496–502.
2. Radomska-Leśniewska DM, Skopiński P, Bałan BJ, Białoszewska A, JóŹwiak J, Rokicki D, Skopińska-RóŹewska E, Borecka A, Hevelke A. // Angiomodulatory properties of *Rhodiola spp.* and other natural antioxidants. // *Cent Eur J Immunol.* 2015;40:249–62. doi: 10.5114/ceji.2015.52839.
3. Ishaque S, Shamseer L, Bukutu C, Vohra S. // *Rhodiola rosea* for physical and mental fatigue: a systematic review. // *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:70. doi: 10.1186/1472-6882-12-70.
4. Panossian A, Wikman G, Sarris J. *Rosenroot // (Rhodiola rosea): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy.* // *Phytomedicine.* 2010;17:481–93. doi: 10.1016/j.phymed.2010.
5. Li, Y., Pham, V., Bui, M. et al. // *Rhodiola rosea L.: an Herb with Anti-Stress, Anti-Aging, and Immunostimulating Properties for Cancer Chemoprevention.* // *Curr Pharmacol Rep* 3, 384–395 (2017).
6. Xiuli Lin, Yingying Liu, Lili Ma, Xiaomeng Ma, Zhaoyu Chen, Hao Chen, Lei Si, Xueying Ma, Zhiling Yu, Xiaohong Chen. // *Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by Rhodiola rosea, a natural adaptogen.* // *Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 125, 2020, 109960, ISSN 0753-3322.*
7. Pu WL, Zhang MY, Bai RY, Sun LK, Li WH, Yu YL, Zhang Y, Song L, Wang ZX, Peng YF, Shi H, Zhou K, Li TX. // *Anti-inflammatory effects of Rhodiola rosea L.: A review.* // *Biomed Pharmacother.* 2020 Jan;121:109552. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109552.
8. Qihong Wang, Haixue Kuang, Yang Su, Yanping Sun, Jian Feng, Rui Guo, Kelvin Chan // *Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants.* // *Journal of Ethnopharmacology, Volume 146, Issue 1, 2013, Pages 9-39.*

9. Jing WANG, Rong-Guang JIN, Lu XIAO, Qiu-Juan WANG, Tian-Hua YAN // Anti-asthma effects of synthetic salidroside through regulation of Th1/Th2 balance // Chinese Journal of Natural Medicines, Volume 12, Issue 7, 2014, Pages 500-504.
10. Wang, C., Wang, Q., Lou, Y., Xu, J., Feng, Z., Chen, Y., Zhang, X. // Salidroside attenuates neuroinflammation and improves functional recovery after spinal cord injury through microglia polarization regulation. // Journal of cellular and molecular medicine, (2018), 22(2), 1148-1166.
11. Yang, Da-Wun, et al. // "Anti-inflammatory effect of salidroside on phorbol-12-myristate-13-acetate plus A23187-mediated inflammation in HMC-1 cells." // International Journal of Molecular Medicine, 38.6 (2016): 1864-1870.
12. Zheng, T., Bian, F., Chen, L., Wang, Q., & Jin, S. // Beneficial effects of *Rhodiola* and salidroside in diabetes: potential role of AMP-activated protein kinase. // Molecular Diagnosis & Therapy, (2019), 23(4), 489-498.
13. Donath, Marc Y. Multiple benefits of targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2016, 59.4: 679-682.
14. Zhou, T., Zheng, J., Zhou, Y., Li, S., Gan, R. Y., Li, H. B., & Gan, R. Y. // Chemical components and bioactivities of *Rhodiola rosea*. // Int J Trad Nat Med, 2015, 5, 23-51.
15. Cai, Z., Li, W., Wang, H., Yan, W., Zhou, Y., Wang, G, Wang, F. // Antitumor effects of a purified polysaccharide from *Rhodiola rosea* and its action mechanism. // Carbohydrate polymers, 2012, 90(1), 296-300.
16. Zhao, G., Shi, A., Fan, Z., & Du, Y. // Salidroside inhibits the growth of human breast cancer in vitro and in vivo. // Oncology Reports, 2016, 33(5), 2553-2560.
17. Rivier C., Rivest S. // Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. // Biol. Reprod. 1991;45:523-532.
18. Rooney K.L., Domar A.D. // The relationship between stress and infertility. // Dialogues Clin. Neurosci. 2018;20:41-47.

19. Brown R., Gerbarg P., Ramazanov Z. // *Rhodiola rosea*: A Phytomedicinal overview. // *HerbalGram*. 2002;5:40–52.
20. Amsterdam J.D., Panossian A.G. // *Rhodiola rosea* L. as a putative botanical antidepressant. // *Phytomedicine*. 2016;23:770–783.
21. Gerasimova H.D. // Effect of *Rhodiola rosea* extract on ovarian functional activity // *Proceedings of the Scientific Conference on Endocrinology and Gynecology*. 1970; pp. 46–48.
22. Linh PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS. // Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. // *Arch Pharm Res*. 2000;23:349–52.
23. Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, et al. // Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. // *Am J Epidemiol*, 2002, 156: 445-453.
24. Pakaski M, Kasa P. // Role of acetylcholinesterase inhibitors in the metabolism of amyloid precursor protein. // *Curr Drug Targets CNS Neurol*. 2003, Disord, 2: 163-171.
25. Zhang J, Zhen YF, Pu-Bu-Ci-Ren, Song LG, Kong WN, Shao TM. // Salidroside attenuates beta amyloid-induced cognitive deficits via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in rat hippocampus. // *Behav Brain Res*, 2013, 244: 70-81.
26. Zhang S, Jiang S, Deng N, Zheng B, Li T, Liu RH. // Phytochemical Profiles, Antioxidant Activity and Antiproliferative Mechanism of *Rhodiola rosea* L. Phenolic Extract. // *Nutrients*. 2022 Aug 31;14(17):3602.
27. Yousef GG, Grace MH, Cheng DM, Raskin I, Lila MA. // Comparative phytochemical characterization of three *Rhodiola* species. // *Phytochemistry*. 2006;67:2380–91.
28. Ali Z, Fronczek FR, Khan IA. // Phenylalkanooids and monoterpene analogues from the roots of *Rhodiola rosea*. // *Planta Med*. 2008;74:178–81.

29. Grech-Baran M, Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A. // Biotechnological approaches to enhance salidroside, rosin and its derivatives production in selected *Rhodiola* spp. in vitro cultures. // *Phytochem Rev.* 2015;14:657–674.
30. Perfumi M, Mattioli L. // Adaptogenic and central nervous system effects of single doses of 3% rosavin and 1% salidroside *Rhodiola rosea* L. in mice. // *Phytother Res.* 2007;21:37–43.
31. Kelly GS. // *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. // *Altern Med.* 2001;6:293–302.
32. Verpeut JL, Walters AL, Bello NT. // *Citrus aurantium* and *Rhodiola rosea* in combination reduce visceral white adipose tissue and increase hypothalamic norepinephrine in rat model of diet-induced obesity. // *Nutr Res.* 2013;33:503–12.
33. Hernández-Santana A, Pérez-López V, Zubeldia JM, Jiménez-del-Río M. A // *Rhodiola rosea* root extract protects skeletal muscle cells against chemically induced oxidative stress by modulating heat shock protein 70 (HSP70) expression. // *Phytother Res.* 2014;28:623–8.
34. Panossian A, Hambardzumyan M, Hovhanissyan A, Wikman G. // The adaptogens *rhodiola* and *schizandra* modify the response to immobilization stress in rabbits by suppressing the increase of phosphorylated stress-activated protein kinase, nitric oxide and cortisol. // *Drug Target Insights.* 2007;2:39–54.
35. Lee WJ, Chung HH, Cheng YZ, Lin HJ, Cheng JT. // *Rhodiola*-water extract induces β -endorphin secretion to lower blood pressure in spontaneously hypertensive rats. // *Phytother Res.* 2013;27:1543–7. doi: 10.1002/ptr.4900.
36. Xu J, Li Y. // Effects of salidroside on exhaustive exercise induced oxidative stress in rats. // *Mol Medicine Rep.* 2012;6:1195–8.
37. Jafari M, Felgner JS, Bussel II, Hutchili T, Khodayari B, Rose MR, Vince-Cruz C, Mueller LD. // *Rhodiola*: a promising anti-aging Chinese herb. // *Rejuvenation Res.* 2007;10:587–602.

38. Bayliak MM, Lushchak VI. // The golden root, *Rhodiola rosea*, prolongs lifespan but decreases oxidative stress resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Phytomedicine*. 2011;18:1262–8.
39. Chen C, Song J, Chen M, Li Z, Tong X, Hu H, Xiang Z, Lu C, Dai F. // *Rhodiola rosea* extends lifespan and improves stress tolerance in silkworm, *Bombyx mori*. // *Biogerontology*. 2016;17:373–81.
40. Bayliak MM, Burdyliuk NI, Izers'ka LI, Lushchak VI. // Concentration-Dependent Effects of *Rhodiola Rosea* on Long-Term Survival and Stress Resistance of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: The Involvement of YAP 1 and MSN2/4 Regulatory Proteins. // *Dose Response*. 2013;12:93–109.
41. Mao GX, Deng HB, Yuan LG, Li DD, Li YY, Wang Z. // Protective role of salidroside against aging in a mouse model induced by D-galactose. // *Biomed Environ Sci*. 2010;23:161–6.
42. Mishra KP, Padwad YS, Jain M, Karan D, Ganju L, Sawhney RC. // Aqueous extract of *Rhodiola imbricata* rhizome stimulates proinflammatory mediators via phosphorylated I κ B and transcription factor nuclear factor- κ B.// *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2006;28:201–12.
43. Bawa AS, Khanum F. // Anti-inflammatory activity of *Rhodiola rosea*—a second-generation adaptogen. // *Phytother Res*. 2009;23:1099–102.
44. Abidov M, Grachev S, Seifulla RD, Ziegenfuss TN. // Extract of *Rhodiola rosea* radix reduces the level of C-reactive protein and creatinine kinase in the blood. // *Bull Exp Biol Med*. 2004;138:63–4.
45. Salikhova RA, Aleksandrova IV, Mazurik VK, Mikhaïlov VF, Ushenkova LN, Poroshenko GG. // Effect of *Rhodiola rosea* on the yield of mutation alterations and DNA repair in bone marrow cells. // *Patol Fiziol Eksp Ter*. 1997;4:22–4.
46. Li X, Erden O, Li L, Ye Q, Wilson A, Du W. // Binding to WGR domain by salidroside activates PARP1 and protects hematopoietic stem cells from oxidative stress. // *Antioxid Redox Signal*. 2014;20:1853–65.

47. Tasheva K, Kosturkova G. // The role of biotechnology for conservation and biologically active substances production of *Rhodiola rosea*: endangered medicinal species. // *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:274942.
48. Kaftanat VN, Bodrug MV, Floryia VN. // Enhanced multiplication of *Rhodiola rosea* in Moldova. // In: *Proceedings of the 2nd National Conference on Medicinal Botany*; 1988; Kiev, Ukraine. p. 64.
49. Furmanowa, M., Oledzka, H., Michalska, M., Sokolnicka, I., Radomska, D. // *Rhodiola rosea* L. (Roseroot): In Vitro Regeneration and the Biological Activity of Roots. // *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (1995), vol 33.
50. Kirichenko EB, Rudenko SS, Baglaj BM, Masikevich UG. // Leaf culture from invitro propagated *Rhodiola rosea*. // *Bulletin GBS, RAN*. 1994;169:50–54.
51. Hai-jun L, Bin G, Qiong Y, Yu-jun L, Chun-Zhao L. // Tissue culture of four *Rhodiola* species. // *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2006:207–210.
52. Bazuk OF, Baraneckii GG, Fedyaj LV. // Micropropagation of rose root. // In: *Proceedings of the Conference of Investigations of Ontogenesis Natural and Cultural Flora in Botanical Garden Eurasia*; 1994; Kiev, Ukraine. pp. 6–8.
53. Yin WB, Li W, Du GS, Huang QN. // Studies on tissue culture of Tibetan *Rhodiola rosea*. // *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2004;24:1506–1510.
54. Debnath SC. // Zeatin and TDZ-induced shoot proliferation and use of bioreactor in clonal propagation of medicinal herb, roseroot (*Rhodiola rosea* L) // *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2009;18(2):245–248.
55. Gogu G, Hârțan M, Nicuță D, Maftai D. // Preliminary data regarding *Rhodiola rosea* L. in vitro. // In: *Proceedings of the Scientific Papers of the 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*; September 2008; Brno, Czech Republic. pp. 1–6.
56. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. // Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. // *Biotechnology Advances*. 2002;20(2):101–153.

57. Nurazah Z, Radzali M, Syahida A, Maziah M. // Effects of plant growth regulators on callus induction from *Cananga odorata* flower petal explant. // *African Journal of Biotechnology*. 2009;8(12):2740–2743.
58. Ishmuratova MM. // Effect of *Rhodiola rosea* plant extracts on the in vitro development of *Rhodiola rosea* L. and *Rhodiola iremelica* Boriss Explants. // *Biotekhnologiya*. 2002;6:52–56.
59. Bozhilova M, Evstatieva L, Tasheva K. // Salidroside content in in vitro propagated *Rhodiola rosea* L. // In: *Proceedings of the 5th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*; 2008; Brno, Czech republic.
60. Ross SM. // *Rhodiola rosea* (SHR-5), Part I: a proprietary root extract of *Rhodiola rosea* is found to be effective in the treatment of stress-related fatigue. // *Holist Nurs Pract*. 2014;28:149–54.
61. Ross SM. // *Rhodiola rosea* (SHR-5), Part 2: A standardized extract of *Rhodiola rosea* is shown to be effective in the treatment of mild to moderate depression. // *Holist Nurs Pract*. 2014;28:217–21.
62. Darbinyan V, Kteyan A, Panossian A, Gabrielian E, Wikman G, Wagner H. // *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue--a double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty. // *Phytomedicine*. 2000;365–71.
63. Spasov AA, Wikman GK, Mandrikov VB, Mironova IA, Neumoin VV. // A double-blind, placebo-controlled pilot study of the stimulating and adaptogenic effect of *Rhodiola rosea* SHR-5 extract on the fatigue of students caused by stress during an examination period with a repeated low-dose regimen. // *Phytomedicine*. 2000;7:85–9.
64. Krasik, E.D., Petrova, K.P., Rogulina, G.A. // About the adaptogenic and stimulating effect of *Rhodiola rosea* extract. // In: *Avrutskiy, G.Y. (Ed.), Proceedings of All-Union and 5th Sverdlovsk Area Conference of*

- Neurobiologists, Psychiatrists and Neurosurgeons—26–29 May 1970. Sverdlovsk Press, pp. 215–217.
65. Darbinyan, V., Aslanyan, G., Gabrielyan, E., Malmström, C., & Panossian, A. // Clinical trial of *Rhodiola rosea* L. extract SHR-5 in the treatment of mild to moderate depression. // *Nordic Journal of Psychiatry*, 2007. 61(5), 343–348.
66. Yu L, Qin Y, Wang Q, et al. // The efficacy and safety of Chinese herbal medicine, *Rhodiola* formulation in treating ischemic heart disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. // *Complement Ther Med*. 2014;22(4):814-825.
67. Edwards D, Heufelder A, Zimmermann A. // Therapeutic effects and safety of *Rhodiola rosea* Extract WS 1375 in subjects with life-stress symptoms—results of an open-label study. // *Phytother Res*. 2012;26(8):1220-1225.
68. Zhu Y, Zhu J, Ma X, Wan X, Zhang T. // Evaluation for developmental toxicity of rhodioside injection in rats. // *Chin J New Drugs*. 2009;18(21):2068-2071.
69. Zhu J, Wan X, Zhu Y, Ma X, Zheng Y, Zhang T. // Evaluation of salidroside in vitro and in vivo genotoxicity. // *Drug Chem Toxicol*. 2010;33(2):220-226.
70. Cropley M, Banks AP, Boyle J. // The Effects of *Rhodiola rosea* L. Extract on Anxiety, Stress, Cognition and Other Mood Symptoms. // *Phytother Res*. 2015 Dec;29(12):1934-9.
71. Udintsev SN, Shakhov VP. // Decrease in the growth rate of Ehrlich's tumor and Pliss' lymphosarcoma with partial hepatectomy. // *Vopr Onkol*. 1989;35:1072–5.
72. Udintsev SN, Schakhov VP. // Decrease of cyclophosphamide haematotoxicity by *Rhodiola rosea* root extract in mice with Ehrlich and Lewis transplantable tumors. // *Eur J Cancer*. 1991;27:1182.
73. Liu Z, Li X, Simoneau AR, Jafari M, Zi X. // *Rhodiola rosea* extracts and salidroside decrease the growth of bladder cancer cell lines via inhibition of the mTOR pathway and induction of autophagy. // *Mol Carcinog*. 2012;51:257–67.
74. Zhao G, Shi A, Fan Z, Du Y. // Salidroside inhibits the growth of human breast cancer in vitro and in vivo. // *Oncol Rep*. 2015;33:2553–60.

75. Wang J, Li JZ, Lu AX, Zhang KF, Li BJ. // Anti-cancer effect of salidroside on A549 lung cancer cells through inhibition of oxidative stress and phospho-p38 expression. // *Oncol Lett.* 2014;7:1159–1164.
76. Sun C, Wang Z, Zheng Q, Zhang H. // Salidroside inhibits migration and invasion of human fibrosarcoma HT1080 cells. // *Phytomedicine.* 2012;19:355–63.
77. Hu X, Lin S, Yu D, Qiu S, Zhang X, Mei R. // A preliminary study: the anti-proliferation effect of salidroside on different human cancer cell lines. // *Cell Biol Toxicol.* 2010;26:499–507.