

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БОГДАНОВИЧ ТАЇСА АНДРІЇВНА

УДК 604.6:577.13:615.322:615.076.8

ДИСЕРТАЦІЯ


РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СПОЛУК З
ПРОТИЗАПАЛЬНИМИ ТА АНТИОКСИДАНТНИМИ
ВЛАСТИВОСТЯМИ З «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ
ARTEMISIA TILESII LEDEB.

Спеціальність 091 «Біологія»

Галузь знань 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

 Т. А. Богданович

Науковий керівник: Матвеева Надія Анатоліївна, доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Богданович Т.А. Розробка біотехнології отримання сполук з протизапальними та антиоксидантними властивостями з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (09 Біологія). – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2024.

Дисертаційна робота присвячена створенню «бородатих» коренів з високим вмістом флавоноїдів, антиоксидантною, відновною та протизапальною активністю; стимулюванню синтезу поліфенольних сполук та отриманню сухих екстрактів з коренів полину, які мають перелічені вище біологічні активності.

Починаючи з 1980-х років значного розвитку набув напрямок генетичної інженерії рослин з використанням *Agrobacterium (Rhizobium) rhizogenes* для створення рослинних зразків, які є продуцентами біологічно активних сполук. Було встановлено, що шляхом генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* можна отримати культури коренів (так званих «бородатих» коренів), які можуть рости необмежений час на поживних середовищах без додавання регуляторів росту та синтезувати біоактивні сполуки, зокрема флавоноїди, у кількості, що значно перевищує таку у вихідних рослинах. Саме тому зусилля дослідників були спрямовані на розроблення методології генетичної трансформації та отримання «бородатих» коренів лікарських рослин різних видів.

Рослини полину також належать до лікарських і відомі синтезом таких сполук як артемізінін, полісахариди, терпени, флавоноїди (кверцетин, лютеолін та ін.). Разом з тим, досі мало вивченим є вид *Artemisia tilesii* Ledeb. Ці рослини мають обмежений ареал, пристосовані до екстремальних умов існування і можуть бути джерелом біологічно активних сполук. Саме тому, робота була спрямована на отримання флавоноїдовмісних екстрактів з протизапальними та антиоксидантними властивостями з попередньо отриманих автором

«бородатих» коренів полину Тілесіуса. Такі екстракти можуть бути використані для створення нових ліків з антиоксидантними та протизапальними властивостями.

Метою роботи було створення «бородатих» коренів *A. tilesii* та отримання з них сполук з протизапальними та антиоксидантними властивостями. Для досягнення поставленої мети було окреслено та вирішено наступні завдання:

- 1) здійснити генетичну трансформацію полину Тілесіуса диким агропіновим штамом *Agrobacterium rhizogenes* A4;
- 2) провести скринінг «бородатих» коренів за допомогою біохімічних методів;
- 3) проаналізувати зв'язок активності генів *rolB*, *rolC*, *CHS* (халконсинтази) та *PAL* (фенілаланін-амоній-ліази) з швидкістю росту різних ліній «бородатих» коренів та накопиченням ними флавоноїдів;
- 4) визначити вплив умов культивування на ріст «бородатих» коренів, синтез флавоноїдів та антоксидантну активність;
- 5) оптимізувати спосіб отримання екстрактів з протизапальними та антиоксидантними властивостями.

У роботі використано такі методи досліджень: біотехнологічні (*Agrobacterium rhizogenes*–опосередкована генетична трансформація), біохімічні, молекулярно-генетичні, методи статистичного аналізу даних.

Шляхом генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* A4 було отримано 15 нових ліній, з яких для подальших досліджень відібрано п'ять. Ще п'ять ліній, отриманих у ході трансформації з використанням *A. rhizogenes* з гетерологічними генами інтерферону- $\alpha 2b$ людини *ifn- $\alpha 2b$* та селективним геном неоміцинофосфотрансферази *nptII*, відібрали з колекції лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Усі десять ліній «бородатих» коренів мали специфічні ознаки – здатність рости на середовищі без регуляторів росту та негативний геотропізм. Морфологія коренів різних ліній, їх забарвлення, структура та швидкість росту

значно варіювали. Вміст флавоноїдів, антиоксидантна та відновлювальна активності, вміст пероксиду водню, активності супероксиддисмутази та каталази у коренях різних ліній «бородатих» коренів також були різними, відрізняючись і від цих параметрів у контрольних нетрансформованих коренях. Значна варіативність у досліджуваних показниках у різних лініях, вірогідно, зумовлена недетермінованістю місця вбудовування перенесених генів у геном рослини. Слід зазначити, що не було виявлено значних відмінностей у діапазоні значень показників систем антиоксидантного захисту у коренях двох груп – трансформованих диким штамом *A. rhizogenes* і тих, що мали плазмід з гетерологічними генами *ifn-α2b* та *nptII*. Очевидно, ці гени не впливають на біосинтез поліфенольних сполук.

Проведений комплексний аналіз встановив, що в усіх зразках антиоксидантна та відновлювальна активності, а також активність супероксиддисмутази були вищими, ніж у екстрактах контрольних коренів, а вміст флавоноїдів був вищим або порівняним з таким у контролі. Також було показано наявність кореляції між вмістом флавоноїдів, антиоксидантною та відновлювальною активностями, що свідчить про потенційну можливість використання цих екстрактів для розробки нових лікарських засобів.

Також було виявлено кореляцію активності *rolB* та *rolC* генів та швидкості росту «бородатих» коренів: в усіх лініях більший приріст маси спостерігався у зразках з більшою активністю *rolB* та *rolC*. Активність гена халконсинтази (*CHS*) не корелювала з вмістом флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів. Разом з тим, рівень активності фенілаланін-амоній-ліази (*PAL*) обернено співвідносився з вмістом флавоноїдів в усіх дослідних лініях: чим вищим був вміст, тим меншою була активність *PAL*. Відносна активність як *PAL*, так і *CHS* була найвищою саме у контрольних коренях. Такий результат може свідчити про наявність оберненого інгібування цих двох генів продуктами біосинтезу, в якому вони задіяні, через високий вміст флавоноїдів у трансформованих коренях. Встановлено також, що значимих відмінностей у

відносних активностях генів *rolB*, *rolC*, *PAL* та *CHS* між двома групами ліній «бородатих» коренів не відзначалося.

За допомогою ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія) аналізу екстрактів шести ліній «бородатих» коренів та контрольних коренів *A. tilesii* було ідентифіковано такі фенольні кислоти: 4-гідроксифенілоцтова, хлорогенова, кавова, сирінгова, бензойна, р-кумарова, транс-ферулова, синапова, транс-корична, хінна. Було встановлено, що деякі сполуки, наприклад, хінна та 4-гідроксифенілоцтова кислоти були присутні лише у контролі і відсутні в усіх лініях «бородатих» коренів. Разом з тим, транс-корична кислота синтезувалася в усіх лініях «бородатих» коренів і була відсутня у контролі. Таким чином, після трансформації дійсно можна отримати значно більше біоактивних сполук, зокрема поліфенолів, а також можна отримати корені, які синтезують невластиві контрольним кореням сполуки.

Дослідження протизапальної активності проводили з використанням етанольного екстракту «бородатих» коренів за його здатністю до інгібування ферменту 15-ліпоксигенази. Показано, що додавання екстракту збільшило константу Міхаеліса та практично не змінило максимальну швидкість ферментативної реакції, що повністю відповідає моделі конкурентного інгібування. Чим вищою була концентрація екстракту (від 25 до 100 мкМ РЕ (рутинового еквіваленту)), тим більшою була протизапальна активність. Таким чином, виявлено дозозалежність протизапальної активності екстрактів.

Дослідження протівірусної активності проводили з використанням екстрактів «бородатих» коренів, штаму вірусу грипу A/FM/1/47 H1N1 та чутливої до цього вірусу лінії клітин нирки собаки Madin-Darby (інфекційний титр $10.0 \lg ID_{50}$ (half maximal infectious dose)). Після 3 діб культивування з екстрактом з більшим вмістом флавоноїдів інфекційний титр становив від 0 (повне інгібування) до $5 \lg ID_{50}$ (великі розведення екстракту). Таким чином, цим дослідженням було доведено інгібуючу дію екстракту на вірус грипу A/FM/1/47 H1N1, що може бути зумовлено особливостями біоактивності флавоноїдів, які входили до цього екстракту. Ці сполуки є потужними

антиоксидантами, які можуть нейтралізувати активні форми кисню в клітинах та служити противірусними агентами.

Також було показано, що екстракти «бородатих» коренів здатні відновлювати Ag^+ до Ag^0 , у результаті чого утворювались наночастки срібла. За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії та спектрофотометрії у діапазоні УФ та видимого світла було охарактеризовано наночастки, отримані в результаті такого «зеленого» синтезу з використанням етанольних екстрактів з «бородатих» коренів. Встановлено наявність кореляції вмісту флавоноїдів у екстракті з висотою піку поглинання при спектрофотометрії на довжині хвилі 440 нм: чим вищим був вміст, тим вищим був пік абсорбції.

Проаналізовано вплив фенілаланіну у різних концентраціях та освітлення (окремо та в комбінації) на ріст «бородатих» коренів та біосинтез флавоноїдів. Додавання фенілаланіну у високій концентрації (1 мМ) пригнічувало ріст усіх зразків. Дві лінії коренів відрізнялися за чутливістю до фенілаланіну у менших концентраціях (50 та 100 мкМ). Вміст флавоноїдів у всіх зразках обох ліній був вищим при вирощуванні з освітленням (до 3.14 раза), незалежно від концентрації фенілаланіну. Антиоксидантна активність також була вищою у коренях, вирощених при освітленні, причому значення EC_{50} (half maximal effective concentration) корелювали з вмістом флавоноїдів.

Додавання метилжасмонату у різних концентраціях (10, 50 та 100 мкМ) призвело до різкого збільшення вмісту флавоноїдів та антиоксидантної активності екстрактів «бородатих» коренів. Таким чином, метилжасмонат може бути використаний як еліситор для стимулювання синтезу флавоноїдів у «бородатих» коренях полину. Лінії «бородатих» коренів відрізнялися за чутливістю до цієї сполуки. Було визначено, що для швидкого отримання біомаси «бородатих» коренів з високим вмістом метилжасмонату доцільним є короткочасне культивування (від 4 до 7 діб) з цим еліситором. Також було показано, що «бородаті» корені різних ліній мали відмінності у динаміці накопичення флавоноїдів після еліситації. Таке явище може бути зумовлено

відмінностями у місці вбудовування перенесених генів у досліджуваних ліній полину та їх чутливості до еліситора.

Оптимізовано спосіб отримання сухого флавоноїдовмісного екстракту з лінії «бородатих» коренів полину, яка була чутлива до метилжасмонату та мала швидкий ріст на рідкому середовищі. 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 було отримано 270 мг сухого екстракту (СЕ). Вміст флавоноїдів в отриманому сухому екстракті становив 95.53 мг РЕ / г СЕ, тобто 9.56% сухої маси СЕ. Таким чином, з 100 г коренів, що вирости, можна отримати 4 г сухого екстракту з загальним вмістом флавоноїдів 382.12 мг РЕ. Було проведено перевірку фіто-токсичності цього екстракту, який додавали до живильного середовища, на якому вирощували рослини ряски *Lemna minor* L. Виявлено відсутність токсичності екстракту; крім того, екстракт стимулював ріст рослин ряски. Таким чином, пропонується спосіб підвищення вмісту флавоноїдів у «бородатих» коренях полину Тілесіуса та отримання флавоноїдвмісного екстракту може бути використаний для розроблення технології отримання цінних біоактивних сполук. Результати дослідження отриманого комплексу свідчать про відсутність токсичності флавоноїдвмісної композиції.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в наступному:

1) уперше проведено комплексний аналіз отриманих ліній «бородатих» коренів *A. tilesii*, зокрема визначено відмінності у вмісті флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активностей, вмісті пероксиду водню, активностей супероксиддисмутази та каталази, а також проведено порівняння особливостей ліній, отриманих з використанням дикого штаму *A. rhizogenes* та тих, що мають гетерологічні гени *ifn-α2b* та *nptII*;

2) уперше методом ВЕРХ порівняно вміст фенольних кислот зразків «бородатих» коренів полину Тілесіуса;

3) уперше доведено пряму кореляцію активності *rolB* та *rolC* генів зі швидкістю росту «бородатих» коренів *A. tilesii* та обернену кореляцію активності *PAL* з вмістом флавоноїдів;

4) уперше визначено вплив фенілаланіну, освітлення та метилжасмонату на ріст культур «бородатих» коренів *A. tilesii*, синтез флавоноїдів та антиоксидантну активність;

5) уперше показано наявність противірусної та протизапальної активностей у екстрактах «бородатих» коренів *A. tilesii*;

6) уперше оптимізовано спосіб отримання флавоноїдовмісних екстрактів з «бородатих» коренів полину з використанням двоетапного культивування та еліситації метилжасмонатом.

Практичне значення отриманих результатів:

1) отримані лінії «бородатих» коренів, які проявили антиоксидантну, відновлювальну, противірусну та протизапальну активності, можуть бути джерелом цінних біологічно активних сполук;

2) сухий екстракт, отриманий з таких коренів, може використовуватись як основа для виробництва препаратів з рослинної сировини;

3) оптимізований спосіб отримання біоактивного флавоноїдовмісного комплексу дозволяє ефективно використовувати корені та масштабувати процес за допомогою культивування коренів на безгормональному рідкому середовищі в біореакторах.

Результати теоретичних та практичних досліджень можуть представляти інтерес для фармацевтичної та медичної галузей, а також для біотехнологів та представників промисловості, які зацікавлені у інтенсифікації виробництва сполук з цілим спектром біологічних активностей.

Ключові слова: *Artemisia tilesii*, *Agrobacterium (Rhizobium) rhizogenes*, *rol* гени, «бородаті» корені, флавоноїди, вторинний метаболізм, антиоксидантна активність, протизапальна активність, відновлювальна активність, противірусна активність, наночастки, метилжасмонат, еліситори, біоактивний екстракт.

SUMMARY

Bohdanovych T.A. Development of biotechnology for obtaining compounds with anti-inflammatory and antioxidant properties from the hairy roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis to fulfill requirements for Doctor of Philosophy degree in the specialty 091 Biology (09 Biology). – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to the initiation of hairy roots with a high content of flavonoids, antioxidant, reducing and anti-inflammatory activity; stimulating the synthesis of polyphenolic compounds and obtaining of dry extracts from wormwood roots, which have the biological activities listed above.

Since the 1980s, the direction of genetic engineering of plants using *Agrobacterium (Rhizobium) rhizogenes* to create plant samples that are producers of biologically active compounds has gained significant development. It has been established that via genetic transformation using *A. rhizogenes* it is possible to obtain root cultures (so-called hairy roots) that can grow indefinitely on nutrient media without the addition of growth regulators and synthesize bioactive compounds, in particular flavonoids, in quantities far exceeding such in parent plants. That is why the researchers' efforts were directed to the development of genetic transformation methodology and obtaining hairy roots of medicinal plants of various species.

Wormwood plants also belong to medicinal plants and are known for the synthesis of such compounds as artemisinin, polysaccharides, terpenes, flavonoids (quercetin, luteolin, etc.). At the same time, the species *Artemisia tilesii* Ledeb. is still poorly studied. These plants have a limited growth area, are adapted to extreme conditions of existence and can be a source of biologically active compounds. That is why, the work was aimed at obtaining flavonoid-containing extracts with anti-inflammatory and antioxidant properties from the hairy roots of Tilesius' wormwood, previously received by the author. Such extracts can be used to create new drugs with antioxidant and anti-inflammatory properties.

The aim of the work was to create hairy roots of *A. tilesii* and obtain compounds with anti-inflammatory and antioxidant properties from their extracts. To achieve the set goal, the following tasks were outlined and solved:

- 1) carry out genetic transformation of Tilesius' wormwood with a wild agropine strain of *Agrobacterium rhizogenes* A4;
- 2) screen hairy roots using biochemical methods;
- 3) analyze the relationship between the activity of the *rolB*, *rolC*, *CHS* (chalcone synthase) and *PAL* (phenylalanine-ammonia-lyase) genes with the growth rate of different lines of hairy roots and their accumulation of flavonoids;
- 4) determine the influence of cultivation conditions on the growth of hairy roots, synthesis of flavonoids and antioxidant activity;
- 5) to optimize the method of obtaining extracts with anti-inflammatory and antioxidant properties.

The following research methods were used in the work: biotechnological (*Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation), biochemical, molecular genetic, statistical data analysis methods.

By genetic transformation using *A. rhizogenes* A4, 15 new lines were initiated, of which five were selected for further research. Another five lines obtained during transformation using *A. rhizogenes* with heterologous genes of human interferon- $\alpha 2b$ *ifn- $\alpha 2b$* and selective gene of neomycin phosphotransferase *nptII* were selected from the collection of the Laboratory of Adaptive Biotechnology of the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine. All ten lines of hairy roots had specific characteristics – the ability to grow on medium without growth regulators and negative geotropism. The morphology of the roots of different lines, their color, structure and growth rate varied significantly. The content of flavonoids, antioxidant activity and reducing power, hydrogen peroxide content, superoxide dismutase and catalase activities in the roots of different lines of hairy roots also varied, differing from these parameters of the control untransformed roots. Significant variability in the studied indicators in different lines is probably due to the non-determinism of the incorporation site of transferred genes into the plant

genome. It should be noted that no significant differences were found in the range of values of indicators of antioxidant defense systems in the roots of two groups – transformed with the wild strain of *A. rhizogenes* and those that had plasmids with heterologous *ifn- α 2b* and *nptII* genes. Apparently, these genes do not affect the biosynthesis of polyphenolic compounds.

The comprehensive analysis found that in all samples the antioxidant activity and reducing power, as well as the superoxide dismutase activity, were higher than in the control root extracts, and the flavonoid content was higher or comparable to that in the control. Correlation between flavonoid content, antioxidant and regenerating activities was also shown, indicating the potential use of these extracts for the development of new drugs.

A correlation between the activity of the *rolB* and *rolC* genes and the growth rate of hairy roots was also revealed: in all lines, greater weight gain was observed in samples with higher *rolB* and *rolC* activity. Chalcone synthase (*CHS*) gene activity was not correlated with flavonoid content in hairy root samples. However, the level of phenylalanine-ammonia-lyase activity was inversely correlated with the content of flavonoids in all experimental lines: the higher the content, the lower the *PAL* activity. The relative activity of both *PAL* and *CHS* was highest precisely in the control roots. Such a result may indicate the presence of inverse inhibition of these two genes by the products of biosynthesis in which they are involved, due to the high content of flavonoids in the transformed roots. It was also established that there were no significant differences in the relative activities of the *rolB*, *rolC*, *PAL* and *CHS* genes between the two groups of hairy root lines.

Using HPLC (high-performance liquid chromatography) analysis of the extracts of six lines of hairy roots and control roots of *A. tilesii*, the following phenolic acids were identified: 4-hydroxyphenylacetic, chlorogenic, caffeic, syringic, benzoic, p-coumaric, trans-ferulic, sinapic, trans-cinnamic, quinic. It was found that some compounds, for example, quinic and 4-hydroxyphenylacetic acid, were present only in the control and absent in all hairy root lines. However, trans-cinnamic acid was synthesized in all lines of hairy roots and was absent in the control. Thus, after

transformation, it is indeed possible to obtain significantly more bioactive compounds, in particular polyphenols, and it is also possible to obtain roots that synthesize compounds that are not characteristic for the control roots.

The study of anti-inflammatory activity was carried out using the ethanol extract of hairy roots according to its ability to inhibit the enzyme 15-lipoxygenase. It was shown that the addition of the extract increased the Michaelis constant and practically did not change the maximum rate of the enzymatic reaction, which fully corresponds to the model of competitive inhibition. The higher was the concentration of the extract (from 25 to 100 μM RE (rutin equivalent)), the greater was the anti-inflammatory activity. Thus, the dose dependence of the anti-inflammatory activity of the extracts was revealed.

Studies of antiviral activity were carried out using extracts of hairy roots, influenza virus strain A/FM/1/47 H1N1 and Madin-Darby dog kidney cell line sensitive to this virus (infectious titer 10.0 lg ID₅₀ (half maximal infectious dose)). After 3 days of co-cultivation with the extract with a higher content of flavonoids, the infectious titer ranged from 0 (complete inhibition) to 5 lgID₅₀ (high dilutions of the extract). Thus, this study proved the inhibitory effect of the extract on the A/FM/1/47 H1N1 influenza virus, which may be due to the specifics of the bioactivity of flavonoids included in this extract. These compounds are powerful antioxidants that can neutralize reactive oxygen species in cells and serve as antiviral agents.

It was also shown that extracts of hairy roots are capable of reducing Ag⁺ to Ag⁰, resulting in the formation of silver nanoparticles. Using the method of transmission electron microscopy and spectrophotometry in the UV and visible light ranges, nanoparticles obtained as a result of such a «green» synthesis using ethanol extracts from hairy roots were characterized. A correlation was established between the content of flavonoids in the extract and the height of the absorption peak in spectrophotometry at a wavelength of 440 nm: the higher was the content, the higher was the absorption peak.

The effect of phenylalanine in different concentrations and lighting (individually and in combination) on the growth of hairy roots and the biosynthesis of

flavonoids was analyzed. Addition of phenylalanine in high concentration (1 mM) inhibited the growth of all samples. The two root lines differed in their sensitivity to phenylalanine at lower concentrations (50 and 100 μ M). The content of flavonoids in all samples of both lines was higher while growing with lighting (up to 3.14 times), regardless of the concentration of phenylalanine. Antioxidant activity was also higher in roots grown with lighting, with EC₅₀ (half maximal effective concentration) values correlating with flavonoid content.

The addition of methyl jasmonate at different concentrations (10, 50, and 100 μ M) led to a sharp increase in the content of flavonoids and antioxidant activity of hairy root extracts. Thus, methyl jasmonate can be used as an elicitor to stimulate the synthesis of flavonoids in the hairy roots of wormwood. Lines of hairy roots differed in their sensitivity to this compound. It was determined that short-term cultivation (from 4 to 7 days) with this elicitor is appropriate for the rapid production of hairy root biomass with a high content of methyl jasmonate. It was also shown that hairy roots of different lines had dissimilarities in the dynamics of flavonoid accumulation after elicitation. Such a phenomenon may be caused by differences in the place of transferred genes insertion in the investigated lines of wormwood.

The method of obtaining a dry flavonoid-containing extract from a line of hairy roots of wormwood, which was sensitive to methyl jasmonate and had rapid growth on a liquid medium, was optimized. It was established that the content of dry matter in 1 g of roots obtained after such cultivation was 0.15 g or 14.8%. 270 mg of dry extract (DE) was obtained from 1 g of lyophilized roots. The content of flavonoids in the obtained dry extract was 95.53 mg RE / g DE, i.e. 9.56% of the dry weight of DE. Thus, 4 g of dry extract with a total flavonoid content of 382.12 mg RE can be obtained from 100 g of grown roots. The phytotoxicity of this extract, which was added to the nutrient medium on which *Lemna minor* L. duckweed plants were grown, was tested. The absence of toxicity of the extract was found; in addition, the extract stimulated the growth of duckweed plants. Thus, the proposed method of increasing the content of flavonoids in the hairy roots of the Tilesius' wormwood and obtaining a flavonoid-containing extract can be used to develop a technology for

obtaining valuable bioactive compounds. The results of the study of the obtained complex indicate the absence of toxicity of the flavonoid-containing composition.

The scientific novelty of the obtained results is as follows:

1) for the first time, a comprehensive analysis of the obtained lines of *A. tilesii* hairy roots was carried out, in particular, differences in the content of flavonoids, antioxidant activity and reducing power, hydrogen peroxide content, superoxide dismutase and catalase activities were determined, and a comparison of the features of the lines initiated using the wild *A. rhizogenes* strain and those with heterologous *ifn- α 2b* and *nptII* genes was carried out;

2) for the first time, the content of phenolic acids in samples of the hairy roots of the Tilesius' wormwood was compared using the HPLC method;

3) for the first time, a direct correlation of the activity of the *rolB* and *rolC* genes with the growth rate of the hairy roots of *A. tilesii* and an inverse correlation of the activity of *PAL* with the content of flavonoids was proved;

4) the influence of phenylalanine, light and methyl jasmonate on the growth of *A. tilesii* hairy root cultures, flavonoid synthesis and antioxidant activity was determined for the first time;

5) the presence of antiviral and anti-inflammatory activities in extracts of the hairy roots of *A. tilesii* was shown for the first time;

6) for the first time, the method of obtaining flavonoid-containing extracts from hairy wormwood roots using two-stage cultivation and elicitation with methyl jasmonate was optimized.

Practical significance of the obtained results:

1) the obtained lines of hairy roots, which showed antioxidant, reducing, antiviral and anti-inflammatory activity, can be a source of valuable biologically active compounds;

2) the dry extract obtained from such roots can be used as a basis for the production of bio-safe preparations from plant raw materials;

3) the optimized method of obtaining a bioactive flavonoid-containing complex allows the effective use of roots and the scaling of the process by cultivating roots on a hormone-free liquid medium in bioreactors.

The results of theoretical and practical research may be of interest to the pharmaceutical and medical industries, as well as to biotechnologists and industry representatives who are interested in intensifying the production of compounds with a wide range of biological activities.

Keywords: *Artemisia tilesii*, *Agrobacterium (Rhizobium) rhizogenes*, *rol* genes, hairy roots, flavonoids, secondary metabolism, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, reducing power, antiviral activity, nanoparticles, methyl jasmonate, elicitors, bioactive extract.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України:

1. **Bohdanovych, T.,** Morgun, B., Lakhneko, O., *Shakhovsky, A., & Matvieieva, N.* (2022). Peculiarities of the growth of *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” roots with different foreign genes. *Biotechnologia Acta*, 15(3), 13–22. <https://doi.org/10.15407/biotech15.03.013> (Категорія Б) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, брала участь у проведенні частини експериментальних досліджень, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
2. **Bohdanovych, T., & Matvieieva, N.** (2022). Optical characteristics of silver nanoparticles obtained using *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” root extracts with high flavonoid content. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, 6(3-4), 169–177. <https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.3-4.271259> (Категорія А, Q3, Scopus) (<https://www.scopus.com/sourceid/21101111532>) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
3. **Богданович, Т.А., & Матвєєва, Н.А.** (2023). Отримання біобезпечного флавоноїдовмісного екстракту з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *Фізіологія рослин і генетика*, 55(4), 344–354. <https://doi.org/10.15407/frg2023.04.344> (Категорія Б) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
4. **Bohdanovych, T., & Matvieieva, N.** (2023). Effect of phenylalanine and light on the growth of hairy roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Biotechnologia Acta*, 16(5), 61–

69. <https://doi.org/10.15407/biotech16.05.061> (**Категорія Б**) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

Статті в зарубіжних періодичних наукових виданнях:

5. **Bohdanovych, T.**, Shakhovsky, A., Duplij, V., Ratushnyak, Y., Kuchuk, M., Poyedinok, N., & Matvieieva, N. (2021). Effects of Genetic Transformation on the Antioxidant Activity of “Hairy” Roots of *Althaea officinalis* L., *Artemisia vulgaris* L., and *Artemisia tilesii* Ledeb. *Cytology and genetics* (USA, Allerton Press Inc., Springer), 55(6), 531–539. <https://doi.org/10.3103/S0095452721060037> (**Категорія А, Q3, Scopus** (SCImago Journal Rank)) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила аналіз отриманих даних)

6. Matvieieva, N., Shakhovsky, A., Tashyreva, H., Ratushnyak, Y., Duplij, V., **Bohdanovych, T.**, & Kuchuk, M. (2022). Study of superoxide dismutase activity in long-term cultivated *Artemisia* and *Althaea* “hairy” roots. *Current Microbiology* (USA, Springer New York), 79(1), 14. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02709-0> (**Q3, WoS, Scopus**) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, оптимізувала проведення частини експериментів)

Глава монографії:

7. Matvieieva, N., & **Bohdanovych, T.** (2022). Native to Ukraine Plants with Anti-Inflammatory, Antioxidant and Antiviral Activities (Eds. R.K. Behl, Pravin K Sharma, Rajesh K. Arya and Ravindra N. Chibbar), *Plants for Immunity* (pp. 97 – 122). India: Agro bios Research publishers. ISBN 10: 9394380019 / ISBN 13: 9789394380011 (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні відповідного розділу монографії)

Монографія:

8. Matvieieva, N., **Bohdanovych, T.** & Duplij, V. (2023). *Bacteria – Plant Interaction: Transgenic Roots for Human Health* (1st ed.). Ed. Jan Brindza. Slovak University of Agriculture in Nitra. 156 p. ISBN 978-80-552-2640-8. <https://doi.org/10.15414/2023.9788055226408> (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні монографії)

Тези наукових доповідей:

9. **Bohdanovych, T.**, Matvieieva, N. (Eds.). (2020). Production of flavonoids with antioxidant properties by biotechnological “hairy” root culture of *Artemisia tilesii* wormwood. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції*. Харків. 26 листопада 2020. – С.9. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
10. **Bohdanovych, T.**, Matvieieva, N. (Eds.). (2021). Effect of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation on the antioxidant status of *Tilesius*’ wormwood “hairy” roots. *Biology, Biotechnology, Biomedicine: Materials of Young Scientists International Conference 3-5 July 2021*. Odesa: Odesa I.I. Mechnikov National University. – P. 11–15. ISBN 978-617-689-376-9 (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
11. **Богданович, Т.А.**, Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2022). Вплив фенілаланіну на ріст та антиоксидантну активність культури «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* за різних режимів освітлення. *«Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»: Матеріали II Міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.* (20 травня 2022 р., м. Харків). – Х. : НФаУ, 2022. – С. 65. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

12. **Bohdanovych, T.,** Starosyla, D., Rybalko, S., Kobylinska, N., Matvieieva, N. (Eds.). (2022). “Hairy” roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. as a promising candidate for anti-influenza treatment. All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with International Participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against russian invaders: conference proceedings, June 15-17, 2022. Kyiv, Ukraine. – P. 109. (Здобувачка здійснила аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
13. **Богданович, Т.А.,** Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2022). Дослідження впливу фенілаланіну на ріст «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*. «Біотехнологія XXI століття»: Матеріали XVI Всеукраїнської Науково-Практичної конференції. (3 червня 2022 р., м. Київ.) – Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського, 2022. – С. 17. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
14. **Bohdanovych, T.,** Matvieieva, N. (Eds.). (2022). Determination of the possibility of using phenylalanine to intensify the biosynthesis of flavonoids in wormwood “hairy” roots. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції* (м. Харків, 13 жовтня 2022 р.). Х.: Вид-во НФаУ, 2022. – С. 16. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
15. **Богданович, Т.А.,** Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Використання метилжасмонату як еліситора для підвищення синтезу вторинних метаболітів у «бородатих» коренях полину. «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»: Матеріали III Міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. (24 березня 2023 р., м. Харків). – Х. : НФаУ, 2023. – С. 113–114. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

16. **Богданович, Т.А.,** Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Розробка способу отримання сухого екстракту з високим вмістом флавоноїдів з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (м. Харків, 14 квітня 2023 р.). – Х. : НФаУ, 2023. – С. 73. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
17. **Богданович, Т.А.,** Дуплій, В.П., Шаховський, А.М., Ратушняк, Я.І., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Культура «бородатих» коренів рослин полину як екологічний та продуктивний спосіб отримання біологічно активних сполук. Міжнародна наукова конференція *Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування*: матеріали Міжнар. наук. конф. (27-28 квітня 2023 р., м. Харків) / Держ. біотехнол. ун-т. – Х., 2023. – С. 95–97. (Здобувачка виконала частину експериментів, здійснила аналіз отриманих даних)
18. Skorokhod, I., **Bohdanovych, T.,** Matvieieva, N. (Eds.). (2023). Phenolcarboxylic acids in *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” roots. *Modern achievements of pharmaceutical technology: Collection of X International Scientific-Practical Conference, dedicated to the 60th anniversary of the birth of Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor Gladukh Ievgenii Volodymyrovych, Kharkiv, May 10-11, 2023.* – Kharkiv : NUPh, 2023. – P. 248. (Здобувачка здійснила аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
19. **Богданович, Т.А.,** Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Оцінка біобезпечності флавоноїдвмісної композиції на основі екстракту «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *«Біотехнологія XXI століття»*: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції, 19 травня 2023. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023. – С. 75–76. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

20. **Bohdanovych, T.**, Matvieieva, N. (Eds.). (2023). Effect of genetic transformation as a stress factor on reducing activity of wormwood “hairy” roots. *Plant Stress and Adaptation: Abstracts of the Second International Scientific Conference, dedicated to the 125th anniversary of the birth of Prof. F.P. Matskov* (Kharkiv, 7-8 June 2023). – P. 24. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
21. **Bohdanovych, T.**, Klymchuk, D., Matvieieva, N. (Eds.). (2023). Characteristics of nanoparticles obtained via “green” synthesis using *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” root extracts. X International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (16-19 August, Bukovel). – Kyiv: LLC APF POLYGRAPH SERVICE, 2023. – P. 331. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	25
ВСТУП.....	27
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	35
1.1. Характеристика рослин <i>Artemisia tilesii</i> – продуцента біологічно активних речовин.....	35
1.2. Отримання «бородатих» коренів з використанням <i>Agrobacterium rhizogenes</i> – опосередкованої трансформації.....	41
1.2.1. Особливості бактерій <i>Agrobacterium rhizogenes</i> та можливість їх використання для генетичної трансформації.....	41
1.2.2. Особливості «бородатих» коренів та дії <i>rol</i> -генів.....	44
1.2.3. Вплив <i>A. rhizogenes</i> – опосередкованої трансформації на синтез вторинних метаболітів.....	49
1.3. Оптимізація живильного середовища та застосування еліситорів для активізації синтезу цінних біологічно активних сполук у «бородатих» коренях.....	53
1.4. Висновки до розділу 1.....	59
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	61
2.1. Рослинний матеріал.....	61
2.2. Генетична трансформація з використанням <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	61
2.3. Субкультивування «бородатих» коренів.....	62
2.4. Виділення загальної ДНК та молекулярно-біологічний аналіз (ПЛР та ПЛР у реальному часі).....	62
2.5. Визначення швидкості росту «бородатих» коренів.....	64
2.6. Дослідження «бородатих» коренів методом світлової мікроскопії	65
2.7. Визначення вмісту біоактивних сполук у «бородатих» коренях полину та біологічної активності екстрактів.....	65

2.7.1. Вміст флавоноїдів.....	65
2.7.2. Антиоксидантна та відновлювальна активність.....	66
2.7.3. Вміст пероксиду водню.....	67
2.7.4. Активність каталази та супероксиддисмутази.....	67
2.7.5. Протизапальна активність.....	69
2.7.6. Противірусна активність.....	70
2.8. Отримання наночасток срібла та їх аналіз.....	71
2.9. Хроматографічні дослідження.....	72
2.10. Визначення впливу складу живильного середовища на ріст «бородатих коренів» та накопичення флавоноїдів.....	73
2.10.1. Дослідження впливу фенілаланіну на ріст «бородатих» коренів полину Тілесіуса за двох режимів освітлення.....	73
2.10.2. Ріст коренів на середовищі з метилжасмонатом.....	73
2.11. Отримання флавоноїдовмісного комплексу сполук на основі екстракту «бородатих» коренів.....	74
2.12. Визначення біобезпечності отриманого флавоноїдовмісного комплексу сполук	74
2.13. Статистична обробка результатів досліджень.....	75
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	76
3.1. Бородаті корені <i>Artemisia tilesii</i> : отримання, культивування та накопичення біологічно активних сполук.....	76
3.1.1. Отримання культури «бородатих» коренів та їх ПЛР аналіз.....	76
3.1.2. Особливості росту «бородатих» коренів різних ліній.....	77
3.1.3. Вплив генетичної трансформації на синтез біоактивних сполук..	80
3.1.4. Активність <i>rol</i> , <i>PAL</i> та <i>CHS</i> генів та ріст «бородатих» коренів і синтез флавоноїдів.....	87
3.1.5. Хроматографічні дослідження.....	91
3.1.6. Визначення біологічної активності екстрактів з «бородатих» коренів.....	94

	24
3.1.6.1. Протизапальна активність.....	94
3.1.6.2. Протівірусна активність.....	97
3.1.6.3. Відновлювальна активність.....	100
3.1.7. Висновки до підрозділу 3.1.....	110
3.2. Вплив умов культивування на ріст «бородатих» коренів.....	112
3.2.1. Вплив фенілаланіну та освітлення на ріст «бородатих» коренів та синтез флавоноїдів.....	112
3.2.2. Вплив метилжасмонату на ріст «бородатих» коренів та синтез флавоноїдів.....	120
3.2.3. Висновки до підрозділу 3.2.....	128
3.3. Отримання флавоноїдвмісного комплексу сполук та його перевірка на біобезпечність.....	129
3.3.1. Отримання сухого екстракту з «бородатих» коренів.....	129
3.3.2. Перевірка отриманого екстракту «бородатих» коренів на біобезпечність.....	132
3.3.3. Висновки до підрозділу 3.3.....	135
ВИСНОВКИ.....	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	139
ДОДАТКИ.....	189

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

15-LOX – 15-ліпоксигеназа

AgNPs, НЧ – наночастки срібла

BSA – альбумін бичачої сироватки

CaMV – вірус мозаїки цвітної капусти

CHS – ген халконсинтази

dNTPs – дезоксирибонуклеозидтрифосфати

DE – dry extract

DEPC – діетилпірокарбонат

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EC₅₀ – half maximal effective concentration, напівмаксимальна ефективна концентрація

EDTA, ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

GAE – gallic acid equivalent, в еквіваленті галлової кислоти

HPLC – (high-performance liquid chromatography) – ВЕРХ – Високоефективна рідинна хроматографія

ID₅₀ – half maximal infectious dose, напівмаксимальна інфекційна доза

inf-α2b – ген інтерферону α2b людини

LB середовище – поживне середовище для мікрорганізмів (Lysogeny broth)

MeJ – метилжасмонат

NAD, НАД – Нікотинамідаденіндинуклеотид

nptII – ген неоміцинофосфотрансферази II *E. coli*

OD – оптична густина (optical density)

ORF – (open reading frame) відкрита рамка зчитування

PAL – ген фенілаланін-амоній-ліази

PHE – фенілаланін

QE – quercetin equivalent, в кверцетиновому еквіваленті

RE – rutin equivalent

Ri-плазмiда – плазмiда, яка iндукує утворення «бородатих» коренiв (root-inducing)

rol гени – гени, що мiстяться у Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* («rooting locus» чи «root loci»)

Ti-плазмiда – плазмiда, яка iндукує утворення «галiв» (tumor-inducing)

vir гени – гени вiрулентностi

АОА – антиоксидантна активнiсть

АФК, ROS – активнi форми кисню

ВА – вiдновна активнiсть

ВМ – волога маса

ДМСО – диметилсульфоксид

ДФПГ – 2,2-дифенiл-1-пiкрилгiдразил

КАТ, САТ – каталаза

МС – живильне середовище Мурасiге-Скуга

ПЛР – полiмеразна ланцюгова реакцiя

пн – пар нуклеотидiв

РЕ – рутиновий еквiвалент

СЕ – сухий екстракт

СМ – суха маса

СОД, SOD – супероксид-дисмутаза

Т-ДНК – транспортна ДНК

ТЕМ – трансмiсiйна електронна мiкроскопiя

ЦТАБ – цетилтриметиламонiю бромiд

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Починаючи з 1980-х років значного розвитку набув напрямок генетичної інженерії рослин з використанням *Agrobacterium (Rhizobium) rhizogenes* для створення рослинних зразків, які є продуцентами біологічно активних сполук. Було встановлено, що при генетичній трансформації з використанням *A. rhizogenes* можна отримати культури коренів (так званих «бородатих» коренів), які можуть рости необмежений час на середовищах без додавання регуляторів росту та синтезувати біоактивні сполуки, зокрема флавоноїди, у кількості, що значно перевищує таку у вихідних рослинах, що зумовлено перенесенням в геном рослини генів *A. rhizogenes* (Malarz, Yudina & Stojakowska, 2023; Kowalczyk et al., 2023; Malarz, Michalska, Yudina & Stojakowska, 2022; Piatczak, Dfbska, Kontek, Olas & Wysokinskai, 2016; El-Esawi et al., 2017; Gai et al., 2015; Zafari, Sharifi & Chashmi, 2018; Tavassoli & Safipour, 2018). Ця трансформація впливає на метаболізм рослин, а поява нових специфічних ознак дозволяє вирощувати отримані корені у великих промислових масштабах, використовуючи біореактори (Srivastava & Srivastava, 2007). Саме тому зусилля дослідників були спрямовані на розроблення методології генетичної трансформації та отримання «бородатих» коренів лікарських рослин різних видів.

Рослини полину належать до лікарських і здавна використовуються в народній та класичній медицині завдяки властивостям біологічно активних сполук, які входять до складу цих рослин: артемізінін, флавоноїди (кверцетин, лютеолін та ін.), кумарини, сесквітерпени, таніни, глікозиди, аскорбінова кислота, інулін, полісахариди, каротин, дубильні речовини, ефірні олії (Trendafilova, Moujir, Sousa & Seca, 2020; Malik et al., 2019; Zubair, Shameem & Seyed, 2020; Janackovic et al., 2019). Різноманіття та синтез, а отже і терапевтичну дію цих сполук можна підвищити, використовуючи такий метод генетичної трансформації рослин, як створення «бородатих» коренів.

Разом з тим, досі мало вивченим є вид *Artemisia tilesii* Ledeb. Полин Тілесіуса давно використовується у медицині народів Аляски в лікувальних цілях, але культури «бородатих» коренів рослин цього виду є маловивченими, адже ця рослина зустрічається лише на півночі Канади, Японії, Сибіру, а також на Алясці. Ці рослини пристосовані до екстремальних умов існування і можуть бути джерелом біологічно активних компонентів, зокрема, поліфенольних сполук. Поліфеноли, до яких відносяться і флавоноїди, є біологічно активними речовинами з відновною, антиоксидантною, протизапальною, антиатеросклеротичною, противірусною та цитостатичною активностями (Ullah et al., 2020; Xu et al., 2017). Антиоксидантні властивості рослин – дуже актуальна тема для фармацевтичної біотехнології, адже оксидативний стрес є однією з причин виникнення нейродегенеративних та серцевосудинних хвороб (Korovesis, Rubio-Tomás & Tavernarakis, 2023; Kumar, Bishayee, Park, Lee & Kim, 2023; Kasote, Katyare, Hegde & Bae, 2015). Слід зазначити, що доповнення екзогенними антиоксидантами або посилення ендогенних антиоксидантних захисних сил організму є перспективним методом протидії небажаним ефектам окисного стресу (Meulmeester et al., 2022; Vona, Pallotta, Cappelletti, Severi & Matarrese, 2021; Kasote, Hegde & Katyare, 2013). Саме тому робота була спрямована на отримання флавоноїдовмісних екстрактів з протизапальними та антиоксидантними властивостями з культур «бородатих» коренів полину Тілесіуса. Такі екстракти можуть бути використані як основа для створення нових ліків з цілим спектром біологічних активностей.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дослідження за темою дисертаційної роботи виконувались в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН згідно з бюджетними темами II-1-23 «Синтез рекомбінантних фармацевтичних білків та підвищення вмісту біологічно активних природних сполук в рослинах. Розділ 1» (реєстраційний номер: 0123U101081), II-3-20 «Індуковані зміни спектра біологічно активних сполук та накопичення білків генноінженерного походження в рослинах» (реєстраційний номер: 0122U001510) та III-1-20

«Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах» (реєстраційний номер: 0120U100849).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було створення «бородатих» коренів *A. tilesii* та отримання з них сполук з протизапальними та антиоксидантними властивостями. Для досягнення поставленої мети було окреслено та вирішено наступні завдання:

- 1) здійснити генетичну трансформацію полину Тілесіуса диким агропіновим штамом *Agrobacterium rhizogenes* A4;
- 2) провести скринінг «бородатих» коренів за допомогою біохімічних методів;
- 3) проаналізувати зв'язок активності генів *rolB*, *rolC*, *CHS* (халконсинтази) та *PAL* (фенілаланін-амоній-ліази) з швидкістю росту різних ліній «бородатих» коренів та накопиченням ними флавоноїдів;
- 4) визначити вплив умов культивування на ріст «бородатих» коренів, синтез флавоноїдів та антоксидантну активність;
- 5) оптимізувати спосіб отримання екстрактів з протизапальними та антиоксидантними властивостями.

Об'єкт дослідження – процес створення «бородатих» коренів та активізація синтезу вторинних метаболітів лікарських рослин з використанням біотехнологічних методів.

Предмет дослідження – оптимізація способу підвищення біологічної активності «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* та отримання екстракту з високим вмістом флавоноїдів, антиоксидантною, відновною, протівірусною та протизапальною активністю з отриманих коренів.

Методи дослідження: біотехнологічні (*Agrobacterium rhizogenes* – опосередкована генетична трансформація), фізіологічні та біохімічні, молекулярно-генетичні, методи статистичного аналізу даних.

Наукова новизна одержаних результатів зумовлена сукупністю поставлених завдань. У межах проведеного дослідження було отримано результати, які мають наукову новизну та виносяться на захист, а саме:

1) уперше проведено комплексний аналіз отриманих «бородатих» коренів *A. tilesii*, зокрема визначено відмінності у вмісті флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активностей, вмісті пероксиду водню, активностей супероксиддисмутази та каталази, а також проведено порівняння особливостей ліній, отриманих з використанням дикого штаму *A. rhizogenes* та тих, що мають гетерологічні гени *ifn-α2b* та *nptII*;

2) уперше методом ВЕРХ порівняно вміст фенольних кислот зразків «бородатих» коренів полину Тілесіуса;

3) уперше доведено пряму кореляцію активності *rolB* та *rolC* генів зі швидкістю росту «бородатих» коренів *A. tilesii* та обернену кореляцію активності *PAL* з вмістом флавоноїдів;

4) уперше визначено вплив фенілаланіну, освітлення та метилжасмонату на ріст культур «бородатих» коренів *A. tilesii*, синтез флавоноїдів та антиоксидантну активність;

5) уперше показано наявність протівірусної та протизапальної активностей у екстрактах «бородатих» коренів *A. tilesii*;

6) уперше оптимізовано спосіб отримання флавоноїдовмісних екстрактів з «бородатих» коренів полину з використанням двоетапного культивування та еліcitaції метилжасмонатом.

Практичне значення одержаних результатів:

1) отримані лінії «бородатих» коренів, які проявили антиоксидантну, відновлювальну, протівірусну та протизапальну активності, можуть бути джерелом цінних біологічно активних сполук;

2) сухий екстракт, отриманий з таких коренів може використовуватись як основа для виробництва препаратів з рослинної сировини;

3) оптимізований спосіб отримання біоактивного флавоноїдовмісного комплексу дозволяє ефективно використовувати корені та масштабувати процес за допомогою культивування коренів на безгормональному рідкому середовищі в біореакторах.

Результати теоретичних та практичних досліджень можуть представляти інтерес для фармацевтичної та медичної галузей, а також для біотехнологів та представників промисловості, які зацікавлені у інтенсифікації виробництва сполук з цілим спектром біологічних активностей.

Біоетична експертиза. Дисертантка не порушила жодних рекомендацій «Заяви про позицію МСОП (Міжнародного союзу охорони природи) щодо досліджень видів, які знаходяться під загрозою зникнення» («IUCN Position Statement on Research Involving Species at Risk of Extinction») та працювала в рамках українського законодавства. Дисертантка не імпортувала рослин з жодної країни і працювала виключно із зразками колекції рослин *in vitro* Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (<http://germplasm.icbge.org.ua/en/>), яка існує в Інституті понад 20 років. Рослини *Artemisia tilesii* з цієї колекції *in vitro* були використані як вихідний матеріал для проведених досліджень.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота містить результати, отримані власноруч здобувачкою. Проблематика роботи, мета і завдання досліджень сформульовані автором разом з науковим керівником д.б.н. Матвєєвою Надією Анатоліївною. Особистий внесок здобувачки в роботу полягав у підборі та аналізі наукової літератури, плануванні експериментальних досліджень, відборі матеріалу, проведенні генетичної трансформації диким штамом *Agrobacterium rhizogenes* A4, виділенні ДНК та проведенні ПЛР-аналізів, проведенні біохімічних досліджень (вміст флавоноїдів, антиоксидантна та відновна активності, вміст пероксиду водню, активності каталази та супероксиддисмутази), підготуванні матеріалу для хроматографічних та інших досліджень, отриманні наночасток та їх аналізі, дослідженні впливу умов культивування та еліситації, отриманні флавоноїдовмісного комплексу сполук та його перевірці на фіто-токсичність, статистичній обробці одержаних результатів, їх описі, аналізі та формулюванні висновків. Внесок інших авторів у роботи (Богданович, Дуплій, Шаховський, Ратушняк, Матвєєва, 2023; Богданович, Матвєєва, 2022а; Богданович,

Матвєєва, 2022b; Богданович, Матвєєва, 2023a; Богданович, Матвєєва, 2023b; Богданович, Матвєєва, 2023c; Богданович, Матвєєва, 2023d; Bohdanovych & Matvieieva, 2020; Bohdanovych & Matvieieva, 2021; Bohdanovych et al., 2021; Bohdanovych & Matvieieva, 2022a; Bohdanovych & Matvieieva, 2022b; Bohdanovych & Matvieieva, 2023a; Bohdanovych & Matvieieva, 2023b) полягав у сприянні і допомозі під час проведення експериментальних досліджень, обговоренні отриманих даних, написанні та редагуванні проекту рукописів публікацій. Внесок Ірини Олександрівни Скороход (к.б.н., ІМВ НАНУ) (Skorokhod, Bohdanovych & Matvieieva, 2023) полягав у практичній допомозі у проведенні хроматографічного (ВЕРХ) аналізу екстрактів «бородатих» коренів *A. tilesii*. Внесок співробітників Центру колективного користування електронними мікроскопами НАН України (Bohdanovych, Klymchuk & Matvieieva, 2023) полягав у практичній допомозі при роботі з електронним мікроскопом для аналізу наночасток срібла (трансмісійна електронна мікроскопія), отриманих дисертанткою з екстрактів «бородатих» коренів *A. tilesii*. Внесок співробітників ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» (Bohdanovych, Starosyla, Rybalko, Kobylinska & Matvieieva, 2022) полягав у проведенні дослідження противірусної активності екстрактів «бородатих» коренів *A. tilesii*, отриманих дисертанткою. Внесок Ольги Романівни Лахнеко (Ph.D., ІКБГІ НАНУ) (Bohdanovych, Morgun, Lakhneko, Shakhovsky & Matvieieva, 2022) полягав у допомозі у проведенні аналізу активності генів (ПЛР у реальному часі). Внесок Михайла Юрійовича Журби (к.б.н., НБС ім. М.М.Гришка НАНУ) полягав у проведенні світлової мікроскопії зразків «бородатих» коренів *A. tilesii*. Внесок співробітників Кафедри промислової фармації КНУТД полягав у практичній допомозі при визначенні протизапальної активності екстрактів «бородатих» коренів *A. tilesii*.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дисертаційної роботи були оприлюднені та обговорені на наукових семінарах Відділу генетичної інженерії, на засіданнях Вченої ради Інституту клітинної

біології та генетичної інженерії НАН України, а також представлені на міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференціях: V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 26 листопада 2020); Young Scientists International Conference «Biology, Biotechnology, Biomedicine» (Odesa, 3-5 July 2021); II Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 20 травня 2022); All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with International Participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against russian invaders (Kyiv, 15-17 June 2022); XVI Всеукраїнська Науково-Практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 3 червня 2022); II Міжнародна науково-практична конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (Харків, 13 жовтня 2022); III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 24 березня 2023); V Міжнародної Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (Харків, 14 квітня 2023); Міжнародна наукова конференція «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (Харків, 27-28 квітня 2023); X International Scientific-Practical Conference, dedicated to the 60th anniversary of the birth of Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor Gladukh Ievgenii Volodymyrovych «Modern achievements of pharmaceutical technology» (Kharkiv, 10-11 May 2023); XVII Всеукраїнська Науково-Практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 19 травня 2023); II International Scientific Conference, dedicated to the 125th anniversary of the birth of Prof. F.P. Matskov «Plant Stress and Adaptation» (Kharkiv, 7-8 June 2023); X International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (Bukovel, 16-19 August 2023).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову працю, з

них 6 наукових статей, у тому числі 4 – у фахових наукових виданнях України та 2 – опубліковані у зарубіжних наукових періодичних виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази WoS та/або Scopus, глава монографії та монографія, опубліковані закордоном, та 13 тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з переліку умовних позначень, анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел, додатків. Основна частина роботи викладена на 114 сторінках друкованого тексту, проілюстрована 2 таблицями та 31 рисунками. Список використаних джерел складається з 351 найменування, з яких 342 – латиницею. Загальний обсяг рукопису становить 200 сторінок.

Подяка. За допомогу під час проведення молекулярно-біологічних досліджень для дисертації автор висловлює щире подяку Шаховському Анатолію Михайловичу, співробітнику Відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ. За допомогу під час проведення обробки деяких статистичних даних автор висловлює щире подяку Дуплію Володимирі Павловичу, співробітнику Відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика рослин *Artemisia tilesii* Ledeb. – продуцента біологічно активних речовин

Рід *Artemisia* L. – один з найбільших родів родини *Asteraceae* Bercht. & J. Presl., в якому налічують від 200 до 500 видів. Поширені вони головним чином в північній півкулі – помірній зоні Європи, Азії, Північної Америки та Північної Африки. На території України знайдено 30 видів роду *Artemisia*, серед яких найбільш поширеними є *A. vulgaris* (чорнобиль, нехворощ, нехвороща), *A. annua* (полин однорічний), *A. absinthium* (білий полин, віниччя), *A. austriaca* (полинець), *A. dracunculus* (естрагон, тархун), *A. hololeuca* (полин білоповстий), *A. nutans* (полин пониклий), *A. pontica* (полин причорноморський, понтичний), *A. salsoloides* (полин кураєвий, солянковидний), *A. santonicum* (полин солонцевий), *A. scoparia* (полин мітлистий), *A. taurica* (полин кримський).

Рослини роду *Artemisia* багаті на ефірні олії, що містять терпени та їх похідні (евкаліптол/цинеол, борнеол, α -пінен, α -туйон, туянон, гермакрен Д, каріофіллен, лімонен, камфен), терпеноїди (камфора), терпінени та їх похідні (терпінен-4-ол, γ -терпінен) та поліароматичні вуглеводні (аценафтен) (Alamgir, 2018; Rolnik & Olas, 2021; Septembre-Malaterre et al., 2020; Kshirsagar & Rao, 2021; Trendafilova, Moujir, Sousa & Seca, 2020; Ekiert, Klimek-Szczykutowicz, Rzepiela, Klin & Szopa, 2022; Sharifi-Rad et al., 2022; Ivanov et al., 2021; Kamarya, Lijie & Jinyao, 2022). Поширеними є й інші біологічно активні речовини у складі полину, зокрема фенольні кислоти (кавова, хлорогенова, ізохлорогенова, протокатехінова, розмаринова, артемізінова, ванілінова, сиригнінова, кумарова, галова), флавоноїди (кверцетин, рутин, катехін, нарцизин, лютеолін, кемферол, генкванін, астрагалін, евпатілін, вульгарин, опігенін) та їх глікозиди, фенілпропаноїди (скополетин), сесквітерпенові лактони (артемізинін,

артеаннуїн), фітостерини (β -ситостерол), а також моно- (галактоза, арабіноза, фруктоза) та полісахариди (інулін, поліфруктани). Біологічні активності цих сполук є різноманітними, у тому числі протималярійна, антиоксидантна, протимікробна, протигрибкова, протиракова, знеболювальна, протизапальна, противиразкова, заживлююча, противірусна, відхаркувальна, антидіабетична, гепатопротекторна, протиепілептична, протизастудна, протипаразитична, протисвербіжна, сечогінна, нейропротекторна, антигіпертензивна (Tiwari et al., 2023; Sohail et al., 2023; Shinyuy et al., 2023; Mazumder, Biswas, Raja & Fukase, 2020; Joshi et al., 2020; Siddiqui et al., 2020; Moacă et al., 2019; Feng, Cao, Qiu & Zhang, 2020; Mirbehbahani, Hejazi, Najmoddin & Asefnejad, 2020; Martini et al., 2020; Lianza et al., 2020; Abiri et al., 2021; Alamgir, 2018; Rolnik & Olas, 2021; Septembre-Malaterre et al., 2020; Kshirsagar & Rao, 2021; Kamarya, Lijie & Jinyao, 2022; Ekiert, Klimek-Szczykutowicz, Rzepiela, Klin & Szopa, 2022; Sharifi-Rad et al., 2022; Ivanov et al., 2021). Такий набір біоактивностей пояснює використання різних видів полину у традиційній медицині різних народів для лікування запалення, кашлю, застуди, малярії, лихоманки, грипу, астми та діабету; для загоєння ран, полегшення свербіжів та лікування укусів павуків; як сечогінний, противиразковий, жовчогінний та гепатопротекторний засіб (лікування гепатиту та жовтяниці); для вигнання паразитів; при порушеннях менструального циклу; при хронічній втомі та больових синдромах (Boudreau, Richard, Harvey & Stephens, 2022; Dogra, Singh, Koul & Yadav, 2023; Ekiert, Klimek-Szczykutowicz, Rzepiela, Klin & Szopa, 2022; Ekiert et al., 2021; Ekiert et al., 2020; Native American Ethnobotany Database, 2022; Alaska ethnobotany, 2023; Suh Nchang et al., 2023; Septembre-Malaterre et al., 2020; Feng, Cao, Qiu & Zhang, 2020; Ivanov et al., 2021). Для вищезазначених цілей найчастіше використовують *A. annua* (Shinyuy et al., 2023) та *A. absinthium* (Sohail et al., 2023). Полини, поширені як сировина для медичного застосування у Південній Африці – *A. afra* (Suh Nchang et al., 2023), у Північній та Південній Америці – *A. dracunculus* (Ekiert et al., 2021). *A. nilagirica* (Albaqami et al., 2022), *A. herba-alba* (Mohamed et al., 2023), *A. scoparia* (Boudreau, Richard, Harvey & Stephens, 2022),

A. vestita (Dogra, Singh, Koul & Yadav, 2023) та *A. argui* (Wang et al., 2023b) є іншими видами полину, які відомі своїм використанням у медицині.

Проводиться багато досліджень рослин полину як лікарської сировини по всьому світу. Нині вже є певні надбання, які обґрунтовують роль відповідних хімічних сполук полину у його біоактивності. Наприклад, показано наступні взаємозв'язки (Sharifi-Rad et al., 2022):

- поліфенольні сполуки полину, такі як флавоноїди, мають антиоксидантну активність, підвищують активність супероксид-дисмутази (СОД, SOD) та інших ферментативних антиоксидантних систем, вміст неферментативних антиоксидантів (наприклад, глутатіон), що впливає на перокисне окислення ліпідів і протікання оксидативного стресу у рослинах;
- флавоноїди та терпени полину мають протизапальну активність, зменшують вміст брадікініну, гістаміну, простагландину E2, ядерного фактору каппа В (NF-κB), фактору некрозу пухлин α (TNF-α), а також знижують активність таких ферментів, як індукцибельна синтаза оксиду азоту (iNOS) і циклооксигеназа-2 (COX-2), послаблюючи таким чином запальні реакції, знижуючи ендогенний пірогенез та прояв аутоімунних захворювань;
- сесквітерпеновий лактон полину артемізинін має протималярійний ефект, що проявляється у токсичній дії проти одноклітинного паразита *Plasmodium falciparum*. За дослідження цього ефекту артемізиніну, отриманого з *A. annua*, було вручено Нобелівську премію китайській науковиці Tu Youyou у 2015 році;
- флавони еупатілін (eupatilin) та жацеосідин (jaceosidin) полину мають протидіабетичний ефект, підвищуючи активність активованої аденозинмонофосфатом протеїнкінази (AMPK), збільшуючи вміст транспортеру глюкози типу VI (GLUT4) та знижуючи рівень глікованого гемоглобіну;
- терпеноїди полину мають нейропротекторну дію, підвищують активність ацетилхолінестерази (AChE) та моноамін оксидази (MAO), а також

зменшують вміст активних форм кисню (АФК, ROS) та знижують активність протеїнкінази С (PKC) і Jun N-термінальної кінази (JNK);

- поліфенольні сполуки мають гепатопротекторну дію, знижуючи вміст АФК та зменшуючи активність аспартат амінотрансферази (AST) та аланінтрансамінази (ALT);
- також поліфенольні сполуки мають протипухлинну дію, підвищуючи активність мітоген-активованої позаклітинної сигнал-регульованої кінази/позаклітинної сигнал-регульованої протеїнкінази (MEK/ERK) та каспаз, і збільшуючи рівень апоптозу ракових клітин.

Як компоненти рослинного походження з лікувальними властивостями нині застосовують артемізинін та його похідну артесунат, а також ефірні олії різних видів полину. В Україні також використовують траву полину гіркого (*A. absinthii* herba). Застосовують і траву полину звичайного, яка входить до збору мікстури Здренко у суміші з чебрецем для лікування алкоголізму (Лікарські рослини, 1992).

Етанольні, метанольні, водні екстракти полину та його ефірні олії використовують у косметичних засобах. Наприклад, *A. annua* використовують у засобі «Artemisia creme», Kingnature; *A. dracunculus* – у «Age-Rebel Moisturiser», ESPA; *A. vulgaris* – у «Mugwort Anti Acne Serum», Humphrey; *A. absinthium* – у «Restorative Clay», Bioelements; *A. abrotanum* – у «Sensitive care conditioner», Dr. Hauschka (Ekiert, Klimek-Szczykutowicz, Rzepiela, Klin & Szopa, 2022).

Artemisia tilesii (полин Тілесіуса, алеутський полин, Tilesius' wormwood, Aleutian mugwort, stinkweed) є багаторічною травою з глибоко розділеним ворсистим листям. У дикій природі (Alaska ethnobotany, 2023; Wright, 2008; Saarela et al., 2020) пагін рослини сягає 80 см, а листки – від 2 до 6 см у довжину, зубчасті та розділені. Морфологія листя та суцвіть алеутського полину має багато варіацій (Temperate Plants Database, 2023) (Рис. 1.1). Рослина здатна рости на різних типах ґрунтів і краще зростає при інтенсивному освітленні. *A. tilesii* невибаглива до умов навколишнього середовища і здатна рости на сухих піщаних ґрунтах, пошкоджених екологічними та техногенними

катастрофами територіях та у альпійській тундрі. Вона має високу толерантність як до кислотних, так і до основних ґрунтів, і може рости на шахтах, де відбувається видобуток токсичних речовин. Ці її властивості використовують на Алясці, де вивели сорт «Caiggluk», який вирощують для контролю ерозії (Wright, 2008).



Рисунок 1.1. Верхівка стебла *Artemisia tilesii* з нерозкритими суцвіттями (А) (Хомер, Аляска, США) (Alaska ethnobotany, 2023) та з суцвіттями, що відцвіли (Б) (Номе, півострів Сьюард, Аляска, США) (Tsuyuzaki Shiro, 2023)

A. tilesii зустрічається по всій Алясці, а також в Японії, Сибіру, Канаді і на півночі США (Royal Botanic Gardens, 2023). Ця рослина здавна використовується корінним населенням Америки для лікування різних хвороб серцево-судинної системи, для загоєння ран та попередження інфекційних хвороб (Native American Ethnobotany Database, 2022). Використовували цю рослину різними способами (Amidon et al., 2014.; Russel, 2017): зовнішньо, щоб зменшити біль при артриті або зменшити набряк, зупинити кровотечу та вилікувати шкірні хвороби; внутрішньо при болях у шлунку, як проносний засіб або засіб від гельмінтів (Schofield, 1989). Також листя жували для полегшення кашлю (Moerman, 2009). Інші джерела згадують про використання

полину Тілесіуса при больових відчуттях під час вагітності (Viereck, 1987). Його болезаспокійливі властивості пояснюються кодеїноподібною речовиною, яка міститься в рослині (Bown, 2001). До того ж, відомо про застосування цього виду полину у кухні народів Східної Азії (Trendafilova, Moujir, Sousa & Saca, 2020), а також як засіб для усунення запахів (Moerman, 2009) та як репелент від комарів (Kari, 1995).

Ця рослина має багато гомотипових (*Artemisia vulgaris* f. *tilesii* (Ledeb.) Kjellm. in Norra Ishav. Algfl. 2: 29 (1833), *Artemisia vulgaris* subsp. *tilesii* (Ledeb.) H.M.Hall & Clem. in Phylogen. Meth.: 72 (1923)) та гетеротипових синонімів (*Artemisia hookeriana* Besser in Tent. Arbot.: 39 (1832), *Artemisia nipponica* (Nakai) Pamp. in Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., 36: 462 (1930), *Artemisia elatior* Rydb. in Mem. New York Bot. Gard. 1: 430 (1900) та ін.) (Royal Botanic Gardens, 2023). Біологічна класифікація цього полину представлена у табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Біологічна класифікація полину Тілесіуса

Домен:	Еукаріоти (<i>Eukaryota</i>)
Царство:	<u>Зелені рослини</u> (<i>Viridiplantae</i>)
Відділ:	<u>Вищі рослини</u> (<i>Streptophyta</i>)
Клас:	Дводольні (<i>Eudicotidae</i>)
Порядок:	<u>Айстроцвіті</u> (<i>Asterales</i>)
Родина:	<u>Айстрові</u> (<i>Asteraceae</i>)
Рід:	Полин (<i>Artemisia</i>) <u>L.</u>
Вид:	<i>Artemisia tilesii</i> Ledeb.

Таким чином, застосування полину Тілесіуса у медицині різних народів північної півкулі, його витривалість та спектр біоактивностей свідчать на користь важливості подальшого дослідження цього виду та можливості отримання з нього комплексу цінних сполук.

1.2. Отримання «бородатих» коренів з використанням *Agrobacterium rhizogenes* – опосередкованої трансформації

1.2.1. Особливості бактерій *Agrobacterium rhizogenes* та можливість їх використання для генетичної трансформації

Трансформація рослин стала можливою завдяки розробленню методу з використання ґрунтових бактерій роду *Agrobacterium*, здатних переносити свою Т-ДНК у геном рослини. Це найстаріший і найпоширеніший метод трансформації рослин, який залишився майже незмінним з 1970-х років, оскільки його технологія дуже проста і легка у відтворенні.

Уперше нарости на кореневій шийці різних фруктових дерев вчені помітили в кінці 19 століття. У 1892 році для опису цих пухлиноподібних наростів було обрано назву «кореневі гали». Ервін Сміт був першим ученим, який припустив, що бактерії можуть бути причиною цих пухлинних утворень. Надалі збудника цієї хвороби ідентифікували як *Phytomonas tumefaciens* і пізніше перейменували на *Agrobacterium tumefaciens*.

Паралельно вивчали ще одну хворобу рослин – хворобу «бородатих» коренів (Srivastava & Srivastava, 2007). Її назва вперше була введена в літературу Steward, Hall & Rolfs (1900). Пізніше Riker, Banfield, Wright, Keitt & Sagen (1930) описали і назвали її збудника – мікроорганізм *Phytomonas rhizogenes*, який пізніше був перейменований на *Agrobacterium rhizogenes*.

Першим великим внеском на шляху до визначення принципу «індукції пухлини» («tumor-inducing principle») була робота лабораторії Шелл і ван Монтегю (Schell/van Montagu) початку 1970-х років. Вони ідентифікували велику плазмиду, яку можна знайти лише в штамх *A. tumefaciens*, що індукують онкогенну пухлину. Вчені перенесли плазмиду в неонкогенний штам *Agrobacterium* і продемонстрували, що цей штам отримав здатність індукувати пухлини. Вони назвали цю плазмиду Tumor-inducing (Ti)-plasmid. У 1980 році Шелл і ван Монтегю дійшли висновку, що в геном рослини переноситься лише

ділянка Ti-плазмідної ДНК. Ця область отримала назву Т-ДНК (транспортна ДНК).

Також вивчали *A. rhizogenes*. Здатність цих бактерій індукувати «бородаті» корені була доведена багатьма дослідниками. Перша трансформація вищих рослин (*Nicotiana tabacum*) з використанням *A. rhizogenes* була зроблена Аккерманом у 1973 році (Ackermann, 1977).

Відтоді обидва види *Agrobacterium* використовують для генетичної трансформації рослин і називаються «природними генними інженерами» через їх здатність вбудовувати Т-ДНК Ti- (індукує пухлину) або Ri- (індукує корені) плазмиди в геном рослини. Отримані «кореневі гали» та «бородаті» корені є утвореннями з характерним зовнішнім виглядом і здатністю виробляти опіни (їх синтез кодується генами, що входять до Т-ДНК) – похідні амінокислот. Ці сполуки (октопін, нопалін, кукумопін, маннопін, агропін та ін.) є поживним джерелом вуглецю та азоту для агробактерій і не утилізуються рослинами (Zárate, 2010; Trovato, Mattioli & Costantino, 2018). Тому в природі ці бактерії є фітопатогенами. Набір опінів є унікальним для кожного штаму і для кожного типу Ri-плазмиди.

Agrobacterium rhizogenes (Riker et al. 1930) Conn 1942 належить до класу Alphaproteobacteria родини Rhizobiaceae. Його однотипним синонімом (база даних NCBI, 2023) є *Rhizobium rhizogenes* (Riker, Banfield, Wright, Keitt & Sagen, 1930; Young, Kuykendall, Martinez-Romero, Kerr & Sawada, 2001). Статус *A. rhizogenes* як автентичного виду роду *Rhizobium* підтверджується аналізом даних і порівняльним аналізом послідовності 16S рРНК (Garrity, 2005).

Спектр хазяїв *A. rhizogenes* дуже широкий: Bradbury (1986) перерахував понад 50 видів рослин, також уражених ризогенними штамми. Пізніше Porter (1991) повідомив, що більше 450 видів багатьох різних родів і родин чутливі до цього патогена. Раніше, De Cleene & De Ley (1981) повідомили про 37 видів рослин, що належать до 30 родів у 15 сімействах дводольних рослин, які були чутливими до *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації. Однак вчені також досліджували 250 однодольних видів, і жоден з них не був сприйнятливий до

хвороби, за винятком деяких представників Liliales і Arales. Дійсно, однодольні види рідко трансформуються за допомогою *A. rhizogenes* через ряд обмежень (НАО et al., 2021): однодольні виробляють менше сигнальних фенолів; їхні клітини схильні до лігніфікації, несприятливої диференціації та селективної відповіді на інфікування *A. rhizogenes*. Нині у більшості випадків для успішної трансформації та ініціації «бородатих» коренів у однодольних і голонасінних необхідне додавання ацетосирингону або використання живильного шару (культури-«няньки») (Syklowiska & Sygitowicz, 2019).

Недавніми прикладами використання *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації для отримання культур «бородатих» коренів різних видів є трансформація *Ocimum basilicum* з використанням штамів *A. rhizogenes* ATCC 13333, ATCC 15834, A4, R1000, R1200 та R1601 (Sathasivam et al., 2022), трансформація *Agastache rugosa* з використанням штаму R1000 (Yeo et al., 2023), трансформація *Tetragastria hemsleyanum* з використанням штамів C58C1, Ar Qual та Ar Qual+ pCAMBIA 1381Z (Wang et al., 2023a).

Розмір Ri-плазмід (pRi) *A. rhizogenes* становить приблизно 200000 пн (Kang et al., 2020). У них є ділянка (область) Т-ДНК транспортної ДНК (transferred DNA), яка переноситься в рослинні клітини при активації генів вірулентності (*vir*) з тієї ж плазміди. Гени *vir* активуються фенольними сполуками (такими як ацетосирингон і попередники лігніну) пошкодженої рослинної тканини. Гени хромосомної вірулентності (*chv*) також важливі для патогенності. Найбільш значущими генами *vir* є *virD1* і *virD2*, які кодують білки, що прикріплюються до ДНК і розрізають її біля бордерних повторюваних послідовностей Т-ДНК, які складаються з ≈ 25 пн (Georgiev, Agostini, Ludwig-Müller & Xu, 2012). Інші гени *vir*, такі як *virE1* і *virE2*, також важливі, оскільки білки, трансльовані з цих генів, захищають Т-ланцюги від розщеплення нуклеазами та полегшують їх інтеграцію в хромосому рослини. Деякі штами *A. rhizogenes* не мають цих генів, але ефективно переносять Т-ланцюги завдяки гену pRi *GALLS*, який кодує білок із сигналом ядерної локалізації та геліказною активністю. Передача Т-ДНК починається від правого

бордера і продовжується до лівого. TL-ДНК і TR-ДНК зазвичай незалежно переносяться і стабільно інтегруються в геном рослини-господаря. Однак лише TL-ДНК важлива і достатня для індукції «бородатих» коренів.

Ділянка Т-ДНК містить гени для синтезу фітогормонів, які індуюють поділ клітин у рослинах. Т-ДНК зазвичай містить набір *rol* («rooting locus» чи «root loci») генів (*rolA*, *rolB*, *rolC* і *rolD*), які стимулюють утворення додаткових коренів і впливають на вторинний метаболізм. Т-ДНК Ri-плазмід випадковим чином інтегрується в геном рослини та експресується як мРНК (Gutierrez-Valdes et al., 2020). Повні послідовності геному різних штамів *A. rhizogenes* вже доступні в літературі (Нооукаас & Нооукаас, 2021).

1.2.2. Особливості «бородатих» коренів та дії *rol*-генів

Т-ДНК Ri-плазмиди *A. rhizogenes* A4 містить дві ділянки: TL-ДНК і TR-ДНК. Перша має чотири гени *rol* – A, B, C і D, які можуть покращувати сприйнятливість рослинних клітин до ауксинів і цитокінінів і відповідають за формування цих коренів (Alcalde et al., 2022; Cho et al., 2022; Mauro, Costantino & Bettini, 2017; Bulgakov, Vereshchagina, Bulgakov, Veremeichik & Shkryl, 2018). TR-ДНК містить гени, пов'язані з біосинтезом ауксину, відомі як *aux1* і *aux2*. Обидві області можуть бути перенесені в ядерний геном інфікованих рослинних клітин незалежно (Nemoto et al., 2009).

Гени і ORF Т-ДНК можна розділити на 3 групи: ті, що кодують синтез опінів; ті, що кодують синтез гормонів; пласт-гени (plast genes). Останні можуть змінювати розвиток рослин різними способами. Назва «пласт» походить від функції «пластичності розвитку» цих генів.

Спочатку *rol* гени були визначені на основі здатності Т-ДНК мутантів *A. rhizogenes* A4 індукувати «бородаті» корені на листі *Kalanchoe daigremontiana* (White, Taylor, Huffman, Gordon & Nester, 1985). Дослідження показало, що *rolB* відіграє ключову роль у феномені «бородатих» коренів, оскільки мутація *rolB* спричинила відсутність їх росту. Мутація *rolC* показала, що цей ген не є

необхідним для індукції коренів на листках *K. daigremontiana*, але за його відсутності ріст коренів сповільнювався. Було також показано, що комбінації *rolABC* достатньо для індукції типового фенотипу «бородатого» кореня. Крім того, *A4-rolB* сам по собі індукує ріст коріння (хоча вони відрізняються від коренів *rolABC*), так само як і *A4-rolC* (тільки під промотором 35S). Однак слід мати на увазі, що характеристики отриманих «бородатих» коренів суттєво залежать від виду трансформованої рослини, штаму агробактерій (Sathasivam et al., 2022) та умов культивування.

Ген *rolA* (*orf10*) кодує невеликий білок, який, як припускають, бере участь у метаболізмі гіберелінів та інших класів гормонів, адже експресія білка *rolA* може спричинити карликовість у деяких рослин (Dehio, Grossmann, K., Schell, J., & Schmülling, 1993; Pistelli, Giovannini, Ruffoni, Bertoli & Pistelli, 2010; Ozyigit, Dogan & Artam Tarhan, 2013). Також повідомлялося, що ген *rolA* відповідає за зміни метаболізму поліамінів (Martin-Tanguy et al., 1996).

Функція гена *rolB* (*orf11*) – механізм «аварійного» коренеутворення рослин. Крім того, він впливає на метаболізм ауксину та сприйняття ауксину (Ottens, 2018). Таким чином, він відіграє важливу роль на ранніх стадіях індукції «бородатих» коренів (Dilshad et al., 2021). Адвентивні корені, індуковані геном *rolB*, мають високу галузистість та швидкий ріст, а також дуже часто негативний геотропізм. Ці явища вказують на те, що білок, який кодується геном *rolB*, має вирішальний вплив на формування «бородатих» коренів. Таким чином, з'ясування функції білка, що кодується геном *rolB*, необхідне для розуміння утворення коренів у рослин (Pistelli, Giovannini, Ruffoni, Bertoli & Pistelli, 2010). Різниця у швидкості росту між лініями «бородатих» коренів часто пов'язана з різницею в рівні експресії гена *rolB* (Tanaka et al., 2001). Ген *rolB* також вважається геном, який найбільше з усіх *rol* генів впливає на вторинний метаболізм рослин і активує захисні реакції рослин (Bulgakov et al., 2002; Kiselev et al., 2007; Pistelli, Giovannini, Ruffoni, Bertoli & Pistelli, 2010; Dilshad et al., 2021). Його експресія підвищує стійкість до біотичних і абіотичних стресів (Veremeichik, Shkryl, Bulgakov, Avramenko & Zhuravlev, 2012; Bulgakov, Shkryl, Veremeichik, Gorpenchenko &

Vereshchagina, 2013) і підвищує резистентність до грибів (Arshad, Haq, Waheed, Mysore & Mirza, 2014). Крім того, показано, що ген *rolB* бере участь у шляхах сайленсингу РНК через надмірну експресію мікроРНК (Bulgakov, Veremeichik & Shkryl, 2015). Нарешті, ген *rolB* бере участь у активації факторів транскрипції більшості спеціалізованих метаболітів у «бородатих» коренях і експресії білків шаперонного типу (Bulgakov, Vereshchagina, Bulgakov, Veremeichik & Shkryl, 2018). Також вважається, що *orf13* діє синергетично з *rolB*, і білок, який кодується *orf13*, може мати ауксиноподібну активність, необхідну для індукції «бородатих» коренів (Hansen et al., 1993; Aoki and Syono, 1999).

Ген *rolC* (*orf12*) вважається найбільш консервативним з усіх *rol* генів і має певний вплив на формування «бородатих» коренів (Makhzoum, Sharma, Bernards & Trémouillaux-Guiller, 2013). Рослини, отримані в ході трансформації з використанням штамів бактерій, що мають тільки ген *rolC*, мали схожі фенотипи (Smith, John & Gardner, 2006). Наявність цього гена впливала на розмір і будову рослин, включаючи зменшення висоти, довжини міжвузлів, плодючості, апікального домінування та збільшення кількості квіток. Іншими морфологічними ефектами є зміни розміру, кольору та форми листя (Pistelli, Giovannini, Ruffoni, Bertoli & Pistelli, 2010). Різні ступені карликовості через ефект *rolC* спостерігалися серед незалежних трансформантів, що несуть ту саму конструкцію гена *rolC*. Ці відмінності залежать від кількох факторів, таких як місце інтеграції, кількість копій, мутація, соматональна варіація та зміни рівня експресії (Kiyokawa, Kikuchi, Kamada & Harada, 1996; Giovannini, Pecchioni, Rabaglio & Allavena, 1997; Pistelli, Giovannini, Ruffoni, Bertoli & Pistelli, 2010). Вплив гена *rolC* на морфологію рослин може бути наслідком активності цитокінін-бета-глюкозидази, яка підвищує рівень цитокініну (Estruch, Schell & Spena, 1991). Було продемонстровано, що *rolC* також має незначну стимулюючу дію на вторинний метаболізм, впливаючи на рівні тропанових, піридинових та індольних алкалоїдів, гінзенозидів і антрахінонових фітоалексинів, отриманих із шикімату, без зміни загальних шляхів захисту рослин (Bulgakov et al., 2003; Palazon et al., 2003; Cardillo, Giulietti, Palazón & Bonfill, 2013; Hashemi and Naghavi, 2016). Ген *rolC* індукується сахарозою (Nilsson, Moritz,

Sundberg, Sandberg & Olsson, 1996), і він може протидіяти певним некротичним ефектам, спричиненим дуже високим рівнем експресії гена *rolB* (Röder, Schmülling & Gatz, 1994). Тим не менш, механізм цієї антагоністичної активності залишається нез'ясованим. Це може бути пов'язано з можливою функцією *rolB* у збільшенні або зниженні передачі сигналів активних форм кисню (ROS), тоді як *rolC* діє як супресор ROS (Paolis et al., 2019).

Вважається, що *rolD* (*orf15*) стимулює репродуктивний фазовий перехід у рослин, посилення цвітіння (через зміни концентрації рослинних гормонів), незначною мірою стимулює ріст коренів і впливає на захисну відповідь на дію патогенів (Mauro et al., 1996). Дослідженнями встановлено, що *rolD* кодує орнітинциклодеаміназу, здатну каталізувати NAD^+ -залежне перетворення орнітину на пролін, викликаючи прискорення та стимуляцію цвітіння як у рослин *in vitro*, так і *in vivo* (Pistelli, Giovannini, Ruffoni, Bertoli & Pistelli, 2010). Таким чином, роль *rolD* у формуванні «бородатих» коренів є несуттєвою, але він може впливати на розвиток рослини через свою метаболічну активність (Trovato, Mattioli & Costantino, 2018). Цей ген приблизно на 55% ідентичний із сусіднім геном *orf16* (Hooykaas & Hooykaas, 2021).

Значна кількість досліджень експресії генів *rol* і *aux* у культурах «бородатих» коренів були зосереджені на демонстрації їх впливу на вторинний метаболізм і морфологію трансформованих коренів і регенерованих рослин. Останнім часом вчені (Alcalde et al., 2022) звернули увагу на зв'язок між експресією цих генів і гормональним профілем, який є визначальним фактором у розвитку коренів і їх морфології, використовуючи моделі машинного навчання. Вони досліджували 10 ліній «бородатих» коренів *Centella asiatica*, які мали помітні відмінності у галуженні, швидкості росту та накопиченні біомаси. Було підтверджено відому інформацію щодо позитивної кореляції між генами *rol* і *aux1* та вмістом вторинних метаболітів, галуженням коренів і швидкістю приросту біомаси. Також було проведено кластерний аналіз гормонів на основі впливу експресії генів. Встановлено, що на вміст абсцизової кислоти (ABA) у досліджених культурах найбільше впливала експресія гена *rolB*, менший вплив

мали гени *rolA* та *rolC*; активність гена *aux1* та, меншим чином, гена *rolA*, вплинула на біосинтез ізопентеніладенозину (IPA); ген *rolC* найбільше впливав на вміст 2-ізопентеніладеніну (2iP); активність *rolA* і *rolC* корелювала з вмістом індол-3-оцтової кислоти (IAA); на синтез гіберелінів (GA4) незначно впливала активність генів *rolA* та *aux1*; синтез саліцилової кислоти (SA) змінювався за зміни експресії *rolB*; експресія гена *rolD* не сильно впливала на синтез рослинних гормонів. Таким чином, дійсно є певна кореляція між експресією *rol* генів та балансом фітогормонів у культурах «бородатих» коренів, що може впливати на їх характерну морфологію та значне накопичення ними вторинних метаболітів.

Крім вивчення генів Т-ДНК Ri-плазмід, які функціонують як індуктори «бородатих» коренів, також приділялась увага дослідженням морфологічних відмінностей цих трансформованих коренів від коренів дикого типу на мікроскопічному рівні. Дані з різних статей (Lincoln et al., 2002; Ho-Plágaro, Huertas, Tamayo-Navarrete, Ocampo & García-Garrido, 2018; Daspute et al., 2019; Jian et al., 2009; Ishida, Yoshida, Ito, Namba & Shirasu, 2011; Marsh et al., 2014; Plasencia et al., 2016) свідчать на користь здатності «бородатих» коренів зберігати структуру і морфологію коренів дикого типу того ж виду. Такі результати мають важливе значення, оскільки вони показують, що «бородаті» корені можна використовувати як модельну систему для вивчення функції генів, що відіграють роль у розвитку кореневих структур у природі.

Прикладом використання культур «бородатих» коренів як модельної системи є робота Plasencia et al. (2016). Вчені використовували культури «бородатих» коренів *Eucalyptus grandis* для швидкого *in vivo* аналізу трансгенів. Вони показали, що ці корені можуть бути використані як модель для функціональної характеристики генів, дослідження субклітинної локалізації білків, просторової та часової закономірностей експресії генів і регуляції ендегенних генів. Щоб оцінити, чи можна використовувати трансгенні «бородаті» корені як систему для дослідження функції генів, залучених до формування вторинної клітинної стінки ксилеми, вчені порівняли радіальний візерунок і анатомію ксилеми «бородатих» коренів та коренів дикого типу.

Спостереження з використанням світлової мікроскопії та ультрафіолетового світла показали, що як первинна, так і вторинна ксилема трансформованих коренів розвиваються подібно до нетрансформованих. Таким чином, перенесені *rol* гени не впливали на морфологічну структуру коренів.

1.2.3. Вплив *A. rhizogenes* – опосередкованої трансформації на синтез вторинних метаболітів

При *A. rhizogenes*–опосередкованій трансформації лінії-суперпродуценти можливо отримувати зі використання диких штамів агробактерій. Це пов'язано з роллю *rol* генів у активації вторинного метаболізму трансформованих коренів. Наявність Ri-плазмід у диких штамів *A. rhizogenes* (наприклад A4, ATCC 15834, AR15834, LBA9402, KCTC 2703, A13) дозволяє використовувати їх для генетичної трансформації рослин. Таким чином, можна отримати лінії «бородатих» коренів з різними якісним та кількісним вмістом метаболітів, наприклад фенольних сполук, і навіть такі корені, що синтезують сполуки, які не були виявлені в контрольних рослинах. Це, вірогідно, відбувається через недетермінованість місця вбудовування бактеріальних генів у геном рослин і, відповідно, різний ефект цих перенесених генів на функціонування власних генів рослин. Приклади успішної *A. rhizogenes*–опосередкованої трансформації, в результаті якої дослідники отримали лінії «бородатих» коренів та визначали різні параметри антиоксидантної системи, наведено у таблиці Додатку Б.

Окрім нативних плазмід, для *A. rhizogenes*–опосередкованої трансформації використовують і інші типи векторів: бінарні, супербінарні та тернальні (Gallego, 2023). Такі вектори потрібні для переносу гетерологічних генів.

Бінарні вектори включають дві плазмід/вектори: Ri-плазмиду або «роззброєну» Ti-плазмиду, яку зазвичай називають Т-бінарним вектором, і допоміжну плазмиду, яку іноді називають допоміжною *vir* плазмидою. Т-бінарний вектор включає Т-ДНК і векторний каркас. Т-ДНК має ліву та праву бордерні

послідовності (зазвичай походять від октопінових або нопалінових плазмід). Крім того, він може містити репортерні гени (β -glucuronidase *GUS*, luciferase *LUC*, green fluorescent protein *GFP*), селективні гени (кодують стійкість до антибіотиків або гербіцидів), а також гени інтересу з відповідними промоторами та термінаторами. Допоміжна плазміда несе *vir* ділянку та початок реплікації для агробактерій. Іноді допоміжними плазмідами можуть слугувати «роззброєні» Ті-плазміди без будь-якої вбудованої Т-ДНК.

Бінарні вектори можна «перетворити» в супербінарні з додаванням додаткових *vir* генів до Т-бінарного вектора. Ця область називається *S vir* і використовується для більшої вірулентності бінарних векторів. Така техніка може бути корисною для трансформування однодольних рослин і рослин, які важко трансформувати (recalcitrant plants).

Тернальні (потрійні) вектори були представлені в 2018 році Anand et al. Ідея їх створення полягає у використанні третьої плазміди, яка називається додатковою плазмідною або додатковою *vir* плазмідною, яка несе додатковий кластер гена вірулентності. Ця плазміда має структуру, подібну до хелперної плазміди. Таку векторну систему найчастіше використовують для стійких до трансформації рослин.

Використовуючи такі вектори з додатковими генами, можливо збільшити вміст вторинних метаболітів у «бородатих» коренях, і таким чином підвищити цінність отриманих ліній. Існує декілька інженерних стратегій, спрямованих на активізацію синтезу вторинних метаболітів та антиоксидантів, а також їх синтез *de novo*. Усі вони спрямовані на модифікацію метаболізму рослин і включають такі методи (Zhu et al., 2013):

- 1) надлишкова експресія ферменту, який обмежує швидкість однієї з реакцій біохімічного шляху, і таким чином пом'якшення метаболічної перешкоди (metabolic «bottleneck»);

- 2) надмірна експресія кількох ферментів для забезпечення підвищеного біосинтезу метаболітів по усьому біохімічному шляху;

- 3) експресія регуляторних білків для координованої індукції всього біохімічного шляху без введення гетерологічних ферментів;
- 4) придушення конкурентного шляху або точки розгалуження для забезпечення потоку біосинтезу у потрібному напрямку;
- 5) створення/збільшення метаболічного «стоку» (metabolic «sink»), що зменшує зворотне інгібування та дозволяє бажаному продукту стабільно накопичуватися.

Найчастіше використовуються перші дві стратегії, для чого переносять різноманітні структурні гени з інших рослин для створення рекомбінантного біосинтетичного шляху. Нижче представлені деякі приклади успішної метаболічної інженерії в культурах «бородатих» коренів.

Park et al. (2021a) показали, що фактор транскрипції кукурудзи Lc (ZmLc) і фактор транскрипції арабідопсису PAP1 (AtPAP1) можуть активізувати синтез флавоноїдів байкаліну, байкалеїну та вогоніну в культурах «бородатих» коренів *Scutellaria baicalensis*. Механізм активізації полягає в комплексній регуляції генів шляху біосинтезу флавоноїдів (*SbPAL1*, *SbC4H*, *Sb4CL* і *UBGAT* за допомогою ZmLc і *SbPAL1*, *SbPAL2*, *SbPAL3*, *SbC4H*, *Sb4CL*, *SbCHI* і *UBGAT* за допомогою AtPAP1). Загальний вміст флавоноїдів збільшився на 322% при використанні ZmLc і на 532% при використанні AtPAP1.

Park et al. (2012a) змогли збільшити синтез рутину у *Fagopyrum esculentum* шляхом надекспресії флавонол-специфічного фактора транскрипції AtMYB12 у «бородатих» коренях. Це призвело до посилення експресії генів біосинтезу флавоноїдів (фенілаланін-амоній-ліаза, циннамат-4-гідроксилаза, 4-кумарат: КоА-ліаза, халкон-синтаза, халкон-ізомераза, флавоон-3-гідроксилаза, флавоноід-3'-гідроксилаза та флавонол-синтаза) і накопичення рутина до 0.9 мг / г сухої маси.

Chen et al. (1999) перенесли ген фарнезилдифосфатсинтази у «бородаті» корені *Artemisia annua*, що призвело до збільшення вмісту артемізиніну у 3-4 рази порівняно з контрольними «бородатими» коренями. Інше дослідження, зосереджене на посиленні синтезу артемізиніну, було виконано Shi et al. (2017). Вони повідомили про одночасну надекспресію чотирьох перенесених генів

біосинтетичного шляху артемізиніну у «бородатих» коренях: *ADS*, *CYP71AV1*, *CPR* і *ALDH1*. Вміст артемізиніну підвищився у 3.4 рази порівняно з контролем.

Крім того, використовуючи культури «бородатих» коренів, можливо не тільки синтезувати рослинні вторинні метаболіти, а і рекомбінантні білки. Це зручно і тому, що ці культури здатні до позаклітинної секреції експресованих білків (також відомої як ризосекреція) (Gaume, Komarnytsky, Borisjuk & Raskin, 2003; Aragão, Alvarez, Caiafa & Santos, 2023) і до продукування комплексних сполук у великих масштабах (можливість цілорічної культивування у біореакторах в контрольованих умовах) (Srivastava and Srivastava, 2012). Наприклад, мишачі моноклональні антитіла з «бородатих» коренів тютюну були вперше отримані в 1997 році (Wongsamuth & Doran). Згодом були отримані інші рекомбінантні білки: зелений флуоресцентний білок (GFP) (Medina-Bolívar & Cramer, 2004), ацетилхолінестераза людини (Woods, Geyer & Mor, 2008), мишачий інтерлейкін (Liu et al., 2009), підсолоджувач тауматин (Pham, Schäfer & Wink, 2012), людський інтерферон- $\alpha 2b$ (Luchakivskaia, Olevinskaya, Kishchenko, Spivak & Kuchuk, 2012), людський EPO (rhEPO) (Gurusamy, Schäfer, Ramamoorthy & Wink, 2017), альфа-L-ідуронідаза (Cardon et al., 2019) та інші. Таким чином можливо отримувати численні гетерологічні білки, включаючи антигени, антитіла, ферменти та імуномодулятори.

Вирощування «бородатих» коренів у біореакторах має ряд переваг:

- можливість збереження природних популяцій рослин;
- уникнення негативного впливу погодних умов на ріст рослин;
- сталий вміст біоактивних сполук;
- отримання гарантовано чистого рослинного матеріалу (без забруднення пестицидами, гербіцидами тощо) завдяки вирощуванню на живильному середовищі стандартизованого складу;
- звільнення додаткових площ для вирощування сільськогосподарських культур;
- підвищення концентрації синтезованих рослинами біоактивних речовин за рахунок використання ліній-надпродуцентів.

Основними умовами, необхідними для росту коренів у біореакторі, є живильне середовище відповідного складу і кисень (аерація завдяки перемішуванню або барботуванню повітря). Живильне середовище може перебувати в біореакторі постійно, заповнюючи частину його об'єму, або подаватись через спеціальні насадки у вигляді туману, що дозволяє кореням контактувати з киснем повітря.

Для культивування в біореакторах використовували «бородаті» корені рослин різних видів: *Arachis hypogaea* культивували для отримання поліфенолів-стілбеноїдів транс-ресвератролу, транс-арахідину-1 та транс-арахідину-3 (Eungsuwan et al., 2021), *Centaurium maritimum* культивували для отримання секоїридоїдних глікозидів (Mišić et al., 2013), *Salvia sclarea* культивували для отримання дитерпеноїдів (Kuźma, Bruchajzer Wysokińska, 2009), *Hyoscyamus niger* – для отримання саліцилової кислоти (Kareem et al., 2019).

Отже, використання *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації та отримання «бородатих» коренів може бути корисним завдяки можливості отримання цінних біологічно активних сполук, підвищенню вмісту вторинних метаболітів, цілорічного культивування їх продуцентів та вирощуванню у спеціальних біореакторах.

1.3. Оптимізація живильного середовища та застосування еліситорів для активізації синтезу цінних біологічно активних сполук у «бородатих» коренях

Трансформація з використанням *A. rhizogenes* може використовуватись для активізації вторинного метаболізму цінних сполук завдяки дії *rol* генів. Також можливо ще більше стимулювати синтез потрібних метаболітів, використовуючи метаболомну інженерію та перенесення гетерологічних генів, що було розглянуто вище. Разом з тим, існують «простіші» варіанти – оптимізація складу живильного середовища та застосування еліситорів.

Живильні середовища є джерелом усіх необхідних речовин для росту і розвитку рослинних культур. Використання стандартних середовищ забезпечує легку відтворюваність експериментів і можливість порівняти результати з роботами інших дослідників. Середовище Мурасіге-Скуга (Murashige & Scoog, MS) (1962) є найбільш часто використовуваним стандартним живильним середовищем для культивування «бородатих» коренів та рослин *in vitro*. Для цієї мети також використовують середовище Шенка і Гільдебрандта (Schenk & Hildebrandt, SH) (1972) і Гамборга (Gamborg, B5) (1968).

Будь-яке живильне середовище для культур рослин *in vitro* повинно мати наступні компоненти: макрокомпоненти (N, S, P, Ca, K); мікрокомпоненти (Mn, Cu, B, Cl, Co, Mo, Zn, I); вітаміни; джерело Fe; джерело вуглецю. Важливий не тільки вміст поживних речовин у середовищі, але й його pH, оскільки рослини ростуть лише в певному діапазоні кислотності (від 5.5 до 5.9 для більшості видів). Також іноді додають змінні компоненти: амінокислоти, регулятори росту та еліситори. Регулятори росту вводять не тільки для підтримки деяких культур *in vitro*, але й для отримання калюсних культур (і суспензійних культур з них), регенерації рослин, ризогенезу або формування множинних пагонів. Таким чином, змінюючи склад живильного середовища, можна отримувати нові культури *in vitro* з уже існуючих, а також досліджувати тотипотентність окремих видів рослин або підбирати й оптимізувати середовища для їх мікроклонального розмноження.

Оптимізуючи склад живильного середовища, можливо збільшити синтез поліфенольних сполук. Наприклад, Shinde et al. (Shinde, Malpathak & Fulzele, 2010) досліджували вплив компонентів середовища на синтез фітоестрогенних ізофлавононів дайдзеїну та геністеїну у «бородатих» коренях *Psoralea corylifolia*. Встановлено, що додавання в середовище NH_4^+ та NO_3^- у співвідношенні 2:1 підвищує приріст біомаси та продуктивність культур. Підвищення рівня сахарози призвело до вищого виходу дайдзеїну. Разом з тим, зниження вмісту сахарози сприяло виробленню геністеїну. Найвищі рівні дайдзеїну (2.06% сухої

маси) і геністеїну (0.37% сухої маси) були отримані в присутності низьких концентрацій PO_4^{3-} .

Kim et al. (2012) оптимізували живильне середовище для найкращого росту та виробництва флавонів у «бородатих» коренях *Scutellaria baicalensis*. Найбільший приріст маси коренів був при культивуванні на середовищі SH (0.32 г / 30 мл). Найбільший вміст флавонів байкаліну, байкалеїну та вогоніну було виявлено у коренях, вирощених на середовищі B5 з половинним вмістом макросолей. Обробка ауксином (1 мг / л індолицтової або індолмасляної кислоти) не вплинула на швидкість росту «бородатих» коренів, проте продукування флавонів було збільшено. Park et al. (2016) визначали вплив різних вуглеводів на накопичення флавоноїдів у «бородатих» коренях того ж виду. Сім джерел вуглеводів (сахароза, фруктоза, глюкоза, галактоза, сорбіт, маніт і мальтоза) у концентрації 100 мМ використовували для додавання до рідкого середовища B5 з половинним вмістом макросолей. Виявлено, що на синтез основних флавонів впливали сахароза, галактоза та фруктоза. Встановлено, що різні вуглеводи стимулювали вироблення різних флавоноїдів. Сахароза була оптимальним джерелом вуглецю для активізації синтезу байкалеїну, фруктоза викликала найбільше накопичення байкаліну, а галактоза була оптимальним джерелом вуглецю для накопичення вогоніну.

Ріст і синтез вторинних метаболітів (ВМ) часто є антагоністичними через конкуренцію за ті самі попередники. Іноді для підвищення вмісту цільових сполук необхідно змінити параметри культивування. Для цього широко використовуються біосинтетичні прекурсори та еліситори, а також розділення росту та синтезу ВМ у часі (двофазне культивування).

Вторинні метаболіти беруть участь у захисті рослин і комунікації з навколишнім середовищем. Крім того, вони пов'язані з кольором, смаком і запахом рослин. Вони також беруть участь у реакції рослин на стрес, як біотичний (патогени рослин), так і абіотичний (температура, посуха, солоність і ультрафіолетове світло). Стикаючись із такими стресовими факторами, рослини можуть змінювати свої морфологічні характеристики (кількість листя або гілок,

площу листя, висоту та об'єм коренів) разом із метаболізмом (Jan, Asaf, Numan, Lubna & Kim, 2021). Рослини мають широкий набір захисних механізмів, які дозволяють їм справлятися зі стресовими умовами на метаболічному рівні та активізують накопичення ВМ під час стресу. Сигнали загрози розпізнаються рецепторами рослин, що забезпечує захисну реакцію, однією з яких є накопичення вторинних метаболітів.

Фактори транскрипції відіграють важливу роль у контролі захисту рослин, виявляючи сигнали стресу та спрямовуючи експресію захисних генів. Подібним чином, виживання, довговічність і продуктивність рослини залежать від посиленого синтезу вторинних метаболітів, що відомо як еліситація. Різні біотичні та абіотичні еліситори використовуються для стимулювання синтезу ВМ у рослинах, щоб захистити їх від стресових подразників.

Еліситори – це сполуки, які навіть у дуже малих концентраціях сприяють посиленню вторинного метаболізму для захисту клітини та всієї рослини від різних факторів. Залежно від походження еліситори можна класифікувати на біотичні і абіотичні. Біотичні еліситори бувають екзогенні та ендогенні. Екзогенні еліситори походять від патогенів (це ферменти, лізати, полісахариди), а ендогенні виробляються рослинами вже після дії патогенів (це полісахариди, протеїни та низкомолекулярні сполуки рослин). Абіотичні еліситори поділяють на фізичні (наприклад, ультрафіолетове світло), хімічні (неорганічні сполуки, наприклад нітропрурид натрію або оксид міді) і гормональні (наприклад, жасмонати та саліцилова кислота). Іноді до третьої групи еліситорів відносять наночастинки (наноеліситори). Еліситорами, що часто використовуються, є ацетилсаліцилова кислота, хітозан, коронатин (токсин бактерій), жасмонова кислота, метилжасмонат, пектин, саліцилова кислота та дріжджовий екстракт. Їх додають як окремо, так і в складі комплексу.

Нижче наведені деякі приклади використання абіотичних та біотичних еліситорів. Zhang et al. (2018) досліджували різні типи світлової хвилі як можливий фізичний еліситор (дальнє червоне, біле, синє та червоне світло) для

посилення накопичення артемізиніну в *Artemisia annua*. Результати показали, що червоне та синє світло може посилити вироблення артемізиніну шляхом індукції експресії генів, які беруть участь у біосинтезі артемізиніну (*ADS* та *CYP71AV1*).

Jiao et al. (2018) аналізували ультрафіолетове випромінювання як фізичний еліситор для посилення виробництва флавоноїдів у «бородатих» коренях *Isatis tinctoria*. Максимальне накопичення флавоноїдів у «бородатих» коренях, оброблених дозою УФ-В опромінення 108 кДж / м², збільшилося в 16.51 разів порівняно з контролем. Антиоксидантна активність також була підвищена. Більше того, експресія гена халконсинтази була значно підвищена (до 405.84 разів), що може свідчити про роль цього гена в накопиченні флавоноїдів.

Tashackori et al. (2016) визначали дію екстракту міцелію *Piriformospora indica* як біотичного еліситора для «бородатих» коренів *Linum album*. Цей екстракт збільшував накопичення фенольних кислот навіть після 12-годинної обробки, а лігнанів – після 24-годинної обробки. Вміст флавонолів збільшився після 48-годинної обробки, а вміст фенолів і флавоноїдів значно підвищився після 72-годинної обробки (до 422.69 мкг / г СМ (сухої маси) фенолів і 15.41 мкг / г СМ флавоноїдів). Активність фенілаланін-амоній-ліази зростала і досягала максимуму через 24 години після еліситації. Інше дослідження цих авторів (Tashackori et al., 2021) показало, що ферментована клітинна стінка *P. indica* прискорює метаболізм і антиоксидантну активність *Linum album*. Активність SOD (супероксиддисмутази) і GPX (глутатіонпероксидази) значно підвищилася. Експресія кількох генів (*PAL*, *CCR*, *CAD* і *PLR*) також була посилена.

Jiao et al. (2017) вивчали дію іммобілізованих грибів *Aspergillus niger* у системі спільного культивування з «бородатими» коренями *Astragalus membranaceus*. Посилене продукування калікозину (730.88 ± 63.72 мкг / г СМ, у 7.72 рази вище, ніж у необробленому контролі) та формонетину ($1119.42 \pm$

95.85 мкг / г СМ, у 18.78 разу вище, ніж у необробленому контролі) було досягнуто через 54 години кокультивування.

Demirci, Çelikkol Akçay & Göktürk Baydar (2020) досліджували вплив 24-епібрасиноліду та L-фенілаланіну на ріст коренів, загальну кількість фенолів і флавоноїдів та накопичення похідних кавової кислоти у «бородатих» коренях *Echinacea purpurea*. Обробка 24-епібрасинолідом у кількості 0.5 мг / л протягом 50 днів призвела до найбільшого приросту маси коренів та індексу росту, тоді як L-фенілаланін не мав істотного впливу на приріст маси коренів. Крім того, було виявлено, що 24-епібрасинолід у концентрації 1.0 мг / л є оптимальним для найбільшого накопичення фенольних сполук та флавоноїдів, цихоринової кислоти, кафтарової кислоти, ехінакозиду та *p*-кумарової кислоти.

Krzemińska et al. (2022) визначали ефект додавання чотирьох еліситорів (екстракт дріжджів, метилжасмонат, транс-анетол і хлорид кадмію) на «бородатих» коренях *Salvia bulleyana*. Виявлено, що метилжасмонат є найефективнішим еліситором. Накопичення фенольних сполук збільшилося приблизно на 100% (до 124.4 мкг / г СМ) після 72 годин еліситації. Було виявлено також високу антиоксидантну активність при тестуванні з використанням DPPH, ABTS і супероксид-аніон-радикалу.

Gharari, Bagheri, Danafar & Sharafi (2020) вивчали вплив метилжасмонату, метил-*b*-циклодекстрину та хітозану (окремо та в комбінації) на «бородаті» корені *Scutellaria bornmuelleri*. Накопичення хризину, вогоніну та байкалеїну збільшувалось у 9.15...13.25 разів після додавання метилжасмонату в поєднанні з хітозаном. Крім того, така комбінація посилила експресію двох генів, залучених у шлях біосинтезу флавоноїдів, *FNSII-2* і *MYB7*.

Chung, Rekha, Rajakumar & Thiruvengadam (2018) аналізували вплив біологічно синтезованих наночастинок срібла на вміст глюкозинолатів і фенольних сполук у «бородатих» коренях *Brassica rapa*. Дослідження показало значне збільшення вмісту глюкозинолатів (глюкоалізін, глюкобрассиканалін, синігрін, прогоїтрин, глюконалін, 4-метоксиглюкобрасицин, 4-гідроксиглюкобрасицин, глюкобрасицин, неоглюкобрасицин і

глюконастуртії) і фенольних сполук (флавоноли, гідроксибензойна та гідроксициннамова кислоти) в «бородатих» коренях. Крім того, авторами встановлено значне підвищення біологічної активності (антиоксидантної, протимікробної та протипухлинної).

Nourozi, Hosseini, Maleki & Abdollahi Mandoulakani (2019) показали, що еліситація культур «бородатих» коренів *Dracosephalum kotschyi* наночастинками заліза збільшує приріст біомаси. Крім того, ферментативна антиоксидантна активність та вміст розмаринової кислоти збільшилися (1194 мкг / г ВМ) після 24 годин впливу 75 мг / л наночастинок заліза. Вміст ксантомікролу, цирсимаритину та ізокемфериду збільшувався відповідно в 11.87, 3.85 та 2.27 разів.

Усі згадані вище дослідження показують важливість оптимізації складу живильного середовища та умов культивування, використання відповідних еліситорів для збільшення вмісту цільових сполук у «бородатих» коренях. Крім того, використання деяких еліситорів може сприяти індукції синтезу невласивих для материнських рослин сполук. Таким чином, «бородаті» корені можуть бути унікальним і універсальним біопродуцентом цінних біологічно активних сполук.

1.4. Висновки до розділу 1

У *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації кожне вбудовування Т-ДНК у рослинну клітину є незалежною трансформаційною подією. Таким чином, використовуючи цей метод генної інженерії, можна швидко отримати спектр нових ліній-трансформантів з покращеними або новими характеристиками, відмінними від контрольних рослин. Крім того, для культури «бородатих» коренів є характерним швидке збільшення біомаси, ріст на безгормональних середовищах і змінений вторинний метаболізм завдяки перенесеним *rol* генам. Вплив на процес біосинтезу цільових метаболітів завдяки додаванню еліситорів або перенесенню гетерологічних генів дозволяє

стимулювати ріст коренів та збільшувати вміст у них цінних сполук. «Бородаті» корені можна цілорічно культивувати у біореакторах задля отримання комплексу вторинних метаболітів. Таке виробництво дозволяє не тільки отримати цінні метаболіти зі спектром біологічних активностей, а й зберегти посівні площі сільськогосподарських угідь.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

Матеріалом для дослідження слугували рослини *Artemisia tilesii* Ledeb. та десять ліній «бородатих» коренів *A. tilesii* з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Рослини вирощували *in vitro* у термостатованому приміщенні при + 25°C та освітленням 16 годин на добу на агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС, Duchefa Biochemie) зі зменшеною удвічі концентрацією компонентів ($\frac{1}{2}$ МС) та сахарозою (20 г / л), субкультивування здійснювали раз на 4 тижні.

П'ять ліній «бородатих» коренів було отримано нами шляхом трансформації з використанням дикого штаму *A. rhizogenes* A4 (див. п. 2.2), п'ять інших отримані раніше (Матвєєва, 2015) з використанням *A. rhizogenes*, що мали вектор pCB124 з геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини *ifn- $\alpha 2b$* та селективним геном неоміцинофосфотрансферази II *nptII*.

Контрольні рослини та десять ліній «бородатих» коренів зображені у Додатку В.

2.2. Генетична трансформація з використанням *Agrobacterium rhizogenes*

«Бородаті» корені отримували шляхом кокультивування експлантів (листіків) полину Тілесіуса з суспензією *Agrobacterium rhizogenes*. Використовували дикий агропіновий штам *A. rhizogenes* A4.

Для трансформації готували добову культуру агробактерій: їх вирощували на рідкому середовищі LB без антибіотиків у термостаті при температурі +28°C протягом 24 годин. У якості експлантів слугували листки *A.*

tilesii, які попередньо надрізали стерильним скапелем і переносили у суспензію агробактерій. Через годину кокультивування експланти переносили на агаризоване середовище $\frac{1}{2}$ МС без додавання антибіотиків. Половину експлантів перенесли на середовище $\frac{1}{2}$ МС з цефотаксимом (600 мг / л) через одну добу, інші – через дві доби.

Після індукції «бородатих» коренів з експлантів корені відділяли та переносили на агаризоване середовище $\frac{1}{2}$ МС з цефотаксимом (600 мг / л). Експланти субкультивували на середовищі з антибіотиком до повної елімінації агробактерій.

Отримані лінії (незалежні трансформаційні події) аналізували методом ПЛР для підтвердження відсутності генів *vir* та присутності *rol* генів.

2.3. Субкультивування «бородатих» коренів

Отримані лінії «бородатих» коренів субкультивували раз на 3-4 тижні і вирощували у термостатованому приміщенні при +25°C та освітленням 16 годин на добу на агаризованому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з вмістом сахарози 20 г / л.

2.4. Виділення загальної ДНК та молекулярно-біологічний аналіз (ПЛР та ПЛР у реальному часі)

Виділення загальної ДНК. Загальну рослинну ДНК для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виділяли відповідно до протоколу (Aboul-Maaty & Oraby, 2019), застосовуючи ЦТАБ метод.

ПЛР аналіз. Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буферу з сульфатом амонію (Fermentas), 0.2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0.5 од. Taq-полімерази (Fermentas), 2.0 мМ хлориду магнію, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші

дорівнював 20 мкл. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі в Tris–боратній буферній системі. Негативним контролем була ДНК з нетрансформованих рослин, позитивним контролем – ДНК відповідного плазмідного вектору. Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Умови ампліфікації: первинна денатурація – 94°C, 3 хв., 30 циклів (94°C, 30 сек – 56/60/65°C (у залежності від аналізованих генів), 30 сек – 72°C, 30 сек), полімеризація – 72°C, 3 хв. Продукти реакції розділяли у 1.5% агарозному гелі у Tris–боратній буферній системі. O`GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder #1163 було використано як маркер розмірів ампліфікованих фрагментів. Праймери, використанні для підтвердження відсутності генів *VirD* та наявності генів *rolB*, *rolC*, *ifn-α2b* та *nptII*: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3' та 5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3' (*rolB*, 780 п.н., 56°), 5'-CTCACTCCAGCATGGAGCCA-3' та 5'-ATTGTGTGGTGCCGCAAGCTA-3' (*rolB*, 592 п.н., 56°), 5'-TGGAGGATGTGACAAGCAGC-3' та 5'-ATGCCTCACCAACTCACCAGG-3' (*rolC*, 473 п.н., 56°), 5'-ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA-3' та 5'-GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA-3' (*VirD*, 432 п.н., 60°).

ПЛР аналіз у реальному часі. Загальну РНК виділяли із зразків «бородатих» коренів (~200 мг) і контрольних культур *A. tilesii* відповідно до високоефективного методу на основі фенолу, описаного в роботі (Box, Coustham, Dean & Mylne, 2011). Обробку ДНКазою кожного зразка РНК проводили в 20 мкл реакційної суміші, що містила 3 мкг загальної РНК, 2 одиниці ДНКазі I без РНКазі (Thermo Fisher Scientific), 20 одиниць інгібітора РНКазі RiboLock™ (Thermo Fisher Scientific), 1× реакційний буфер (Thermo Fisher Scientific), доведений до кінцевого об'єму водою Milli-Q, обробленою DEPC. Реакцію проводили при 37 °C протягом 30 хвилин за допомогою системи ПЛР у реальному часі Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) і зупиняли додаванням 2 мкл 25 мМ EDTA з подальшою інкубацією при 65°C протягом 10 хв. Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили в

реакційній суміші, що містила 10 мкл зразка РНК, обробленого ДНКазою, 40 ОД Maxima зворотньої транскриптази (Thermo Fisher Scientific), 20 ОД інгібітора РНКаз РiboLock™ (Thermo Fisher Scientific), 5 мкМ оліго(dT)₁₈ праймера (Metabion, Німеччина), 1 мкМ dNTP (Thermo Fisher Scientific), 1× реакційний буфер (Thermo Fisher Scientific), доведений до кінцевого об'єму 20 мкл водою Milli-Q, обробленою DEPC. Реакцію проводили при 55°C протягом 30 хвилин у термоциклері та зупиняли інкубацією при 85°C протягом 5 хвилин.

Аналіз експресії генів проводили в 20 мкл суміші qPCR з використанням HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (без ROX; Solis BioDyne, Естонія) згідно з протоколом виробника. Реакційна суміш містила ген-специфічні прямий і зворотний праймери (0.5 мМ кожен) і 2 мкл вищевказаної RT суміші. Набори праймерів, які використовувались для ампліфікації генів: 5'-ATCAGCAATACCAGGGAACATAGT-3' та 5'-AGGTGCCCTGAGGTCTTGTTC-3' (*β-actin*, EU531837), 5'-AGGCTAACAGAGGAGGGTA-3' та 5'-CCAATTTACCGGCTTTCT-3' (chalcone synthase, *CHS*, GQ468548), 5'-ACACTCGGTAGCTATTGCTGCAA-3' та 5'-CCATGGCGATTTCTGCACCT-3' (phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*, JF806362), 5'-CTCACTCCAGCATGGAGCCA-3' та 5'-ATTGTGTGGTGCCGCAAGCTA-3' (*rolB*, (Matvieieva et al., 2020)), 5'-TGGAGGATGTGACAAGCAGC-3' та 5'-ATGCCTCACCAACTCACCAGG-3' (*rolC*, (Matvieieva et al., 2020)). Для отримання середніх рівнів експресії генів і внутрішніх стандартів було проведено три реакції ампліфікації на зразок. Рівні відносної експресії досліджуваних генів були розраховані відповідно до рівняння Пфаффа (Pfaffl, 2001).

2.5. Визначення швидкості росту «бородатих» коренів

Для визначення швидкості росту «бородатих» коренів, у чашку Петрі з живильним середовищем ½ МС з концентрацією сахарози 20 г / л переносили по п'ять експлантів (точок росту) довжиною 1 см. Корені попередньо зважували на

електронних вагах Sartorius моделі L 310 зі стандартним відхиленням ± 0.01 г. Через чотири тижні збирали біомасу коренів, промивали від агару дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу та знову зважували. Швидкість росту виражали як приріст маси за чотири тижні в грамах на точку росту. Експеримент проводили у трьох повторностях.

2.6. Дослідження «бородатих» коренів методом світлової мікроскопії

Зображення «бородатих» коренів було отримано за допомогою стереомікроскопу ZEISS SteREO Discovery.V20 (MicroImaging GmbH 37081 Göttingen, Німеччина) та цифрових камер Fuji FinePix S 7000 та Panasonic DMC FZ50. Зображення оброблені за допомогою AxioVision 4.8.2.

2.7. Визначення вмісту біоактивних сполук у «бородатих» коренях полину та біологічної активності екстрактів

2.7.1. Вміст флавоноїдів

Визначення вмісту флавоноїдів проводили за методикою (Pekal & Pyrzynska, 2014). Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу, зважували по 0.3 г і гомогенізували у 3 мл 70% етанолу. Гомогенат центрифугували в мікроцентрифугі «EppendorfCentrifuge 5415 C» при 15 000 g протягом 10 хв. Реакційна суміш містила 0.25 мл супернатанту, 1 мл бідистильованої води, 0.075 мл 5% розчину NaNO_2 . Після витримання протягом 5 хв додавали 0.075 мл 10% розчину AlCl_3 . Через 5 хвилин додавали 0.5 мл 1M NaOH та 0.6 мл бідистильованої води. Абсорбцію визначали при $\lambda = 510$ нм на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Розрахунок загального вмісту флавоноїдів проводили в рутиновому еквіваленті за наступною формулою та перераховували на грам вологої маси (ВМ):

$$C = C_1 \cdot V / m, \quad (1)$$

де C – концентрація флавоноїдів у 1.0 г вологої маси рослинного матеріалу, мг РЕ / г ВМ; C_1 – концентрація флавоноїдів у спиртових екстрактах за калібрувальним графіком, мг / мл; V – об'єм спирту, що використовувався для приготування екстракту (3 мл); m – маса рослинного матеріалу, що використовувався для досліджень (0.3 г).

2.7.2. Антиоксидантна та відновлювальна активність

Антиоксидантну активність етанольних екстрактів «бородатих» коренів досліджували за допомогою DPPH-тесту за методикою, описаною у роботі (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995). Оптичну густину розчинів вимірювали при довжині хвилі $\lambda=515$ нм на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Відсоток інгібування розраховували за наступною формулою:

$$\% inhibition = (OD_1 - OD_2) / OD_1 \cdot 100, \quad (2)$$

де OD_1 – оптична густина контрольної проби, од; OD_2 – оптична густина реакційної суміші після проведення реакції з DPPH, од.

Ефективна концентрація (EC_{50}) була розрахована як волога маса коренів (ВМ), необхідна для відновлення 50 % DPPH у реакції з радикалом.

Визначення здатності екстрактів коренів до відновлювання визначали за методикою, що базується на відновленні Fe^{3+} до Fe^{2+} (Zhao et al., 2008) з модифікаціями (Matvieieva et al., 2020). Реакційна суміш містила: 0.312 мл 0.2 М фосфатного буфера (рН 6.6); 0.312 мл 1% гексаціаноферату(III) калію та спиртовий екстракт коренів, концентрацію якого послідовно зменшували. Кювети інкубували на водяній бані при 50 °C протягом 30 хв. Після цього до реакційної суміші додавали 0.312 мл 10% трихлороцтової кислоти, 1.25 мл води бідистильованої та 0.25 мл 0,1% хлориду заліза(III). Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі $\lambda=700$ нм на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Відновлювальну активність характеризували за параметром

ефективної концентрації ($EC_{0.5}$), що відповідає масі коренів (мг ВМ), необхідної для отримання $OD = 0.5$.

2.7.3. Вміст пероксиду водню

Вмісту пероксиду водню визначали за методикою (Kumar, Bishayee, Park, Lee & Kim, 2023) спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували по 0.25 г. Після цього зразок розтирали у фарфоровій ступці у 2.5 мл 0.1% трихлороцтової кислоти. Гомогенат переносили в пробірки Eppendorf об'ємом 2 мл і центрифугували при 12000g в мікроцентрифузі EppendorfCentrifuge 5415 С протягом 10 хв при кімнатній температурі. До 2 мл отриманого супернатанту додавали 0.25 мл 1 М буфера гідрофосфату калію (pH 7.0) та 0.5 мл 1 М йодиду калію. Після перемішування на вортексі проводили вимірювання оптичної густини суміші за $\lambda = 390$ нм у кварцевій кюветі 10×10 мм.

Калібрувальний графік будували за приготуванним розчином H_2O_2 : 57 мкл 30% H_2O_2 додавали до 100 мл дистильованої води. Отриманий розчин розводили деіонізованою водою у 10 разів для отримання концентрацій H_2O_2 0.559 ... 5.586 μM / мл. Розрахунок проводили за наступною формулою та виражали у μM H_2O_2 на грам вологої маси (ВМ):

$$C = C_I \cdot V / m, \quad (3)$$

де C – вміст пероксиду водню у 1.0 г вологої маси рослинного матеріалу, мкМ / г ВМ; C_I – вміст пероксиду водню за калібрувальним графіком, μM / мл; V – об'єм реакційної суміші (2.5 мл); m – маса наважки коренів (0.25 г).

2.7.4. Активність каталази та супероксиддисмутази

Активність каталази визначали за модифікованою методикою (Aebi, 1984) спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Для

приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу. 0.5 г коренів гомогенізували з 5 мл 0.1 М фосфатного буферу. Гомогенат переносили в пробірки Eppendorf об'ємом 2 мл і центрифугували 20 хв в мікроцентрифузі EppendorfCentrifuge 5415 С при 15000 g. Супернатант переносили у чисті пробірки, поміщені у льодяну баню для запобігання втрати активності ферменту. В кювету об'ємом 3 мл наливали 2.8 мл реакційного середовища (30 мкл 33 % пероксиду водню, 50 мл 0.1 М фосфатного буферу, рН 7.0) та 0.2 мл супернатанта. Суміш струшували та вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при $\lambda = 240$ нм. Вимір повторювали через 1 хвилину. В контрольну пробу замість супернатанта у реакційне середовище додавали 0.2 мл буфера. Для підрахунку активності каталази використовували наступну формулу:

$$AK = \Delta OD \cdot V_c / (0.036 \cdot C_6 \cdot V_v), \quad (4)$$

де AK – активність каталази, мкМ H_2O_2 / мг білка · хв; V_c – об'єм реакційного середовища (2.8 мл); $0.036 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – коефіцієнт екстинкції H_2O_2 ; C_6 – вміст білка в пробі, мг; V_v – об'єм екстракту (0.2 мл). Вміст розчиненого білка в супернатанті визначали за методом Бредфорда (Bradford, 1976).

Активність супероксиддисмутази визначали відповідно до (Beyer & Fridovich, 1987). Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу. 0.1 г коренів гомогенізували у 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (рН 8.0). Отриманий гомогенат центрифугували 15 хв в мікроцентрифузі Eppendorf Centrifuge 5415 С при 13000 g. Супернатант переносили у чисті пробірки, поміщені у льодяну баню для запобігання втрати активності ферменту. Реакційна суміш містила 40 мкл супернатанта; 2160 мкл буфера 50 мМ Tris-HCl; 520 мкл 65 мМ метіоніну; 188 мкл 630 мкМ нітросинього тетразолію; 50 мкл 1 мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, три – опромінювали протягом 5 хв при 26 °С люмінісцентною лампою білого світла. Абсорбцію визначали при $\lambda = 550$ нм. Нульова проба містила усі

перелічені компоненти за винятком рослинного екстракту. Розрахунок проводили за формулою в од. акт. / мг білка (за Бредфордом):

$$\text{СОД (од. акт. / мкг білка)} = ((OD_1/OD_2 - 1) \cdot V_e) / (C_6 \cdot V_e), \quad (5)$$

де OD_1 – оптична густина нульової проби; OD_2 – оптична густина експериментальної проби; V_e – об’єм реакційного середовища (3 мл); C_6 – вміст білка в пробі, мг; V_e – об’єм екстракту, мл (0.04 мл).

2.7.5. Протизапальна активність

Для підготовки зразка використовували спиртові екстракти (70% етанол) сухих коренів. Екстракцію проводили на ротаційному шейкері Gio Gyrotory (New Brunswick Scientific, США) при 120 об / хв і 28 °С протягом 36 годин. Після центрифугування (Eppendorf Centrifuge 5415 C, 10000 × g протягом 10 хв) супернатант збирали та висушували на роторному випарювачі. Потім екстракт розчиняли в ДМСО (диметилсульфоксид) до кінцевої концентрації 100 мкМ в рутинному еквіваленті (РЕ). Дослідження протизапальної активності проводили на базі Кафедри промислової фармації Київського національного університету технологій та дизайну. Кінетику інгібування 15-LOX визначали за допомогою УФ спектрофотометра SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина) при 235 нм. Розчин екстракту фільтрували через шприцевий дисковий фільтр з діаметром пор 0.45 мкм. Дослідження проводилося з використанням соєвої ліпоксигенази типу I-B (15-LOX) як ферменту та лінолевої кислоти як субстрату. У тест-кювету додавали суміш загальним об’ємом 2500 мкл, що складається з фосфатного буфера (pH = 7.6), 2.5 мМ лінолевої кислоти та досліджуваного розчину в концентраціях 25, 50 і 100 мкМ. Реакцію ініціювали додаванням розчину 15-LOX з концентрацією 0.65 мг / мл. Суміш інкубували при 25 °С протягом 1.5 хвилин. Як розчин порівняння використовували фосфатний буфер (pH = 7.6). Проводили сім серій вимірювань при різних концентраціях субстрату в інкубаційній суміші (10-100 мкМ) для кожної з чотирьох концентрацій екстракту (0, 25, 50, 100 мкМ в рутинному еквіваленті).

Кожне вимірювання повторювали тричі. Обробка експериментальних даних включала розрахунок усталених швидкостей та кінетичних параметрів інгібування та проводилася за стандартними методиками.

2.7.6. Протівірусна активність

«Бородаті» корені *A. tilesii* культивували в умовах *in vitro* з використанням середовища $\frac{1}{2}$ MS з 20 г / л сахарози протягом 6 тижнів. Коріння ліофілізували та подрібнювали, потім екстрагували 70 % етанолом на ротаційному шейкері протягом 36 годин. В якості екстракту №1 використовували відфільтрований розчин із концентрацією флавоноїдів 0.23 мг РЕ / мл. Для приготування екстракту № 2 екстракт № 1 сушили за допомогою роторного випарювача (AES 2010) і розчиняли в ДМСО до концентрації флавоноїдів 3.22 мг РЕ / мл. Вміст флавоноїдів досліджували за стандартною методикою з AlCl_3 . Дослідження біоактивності проводили на базі ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» з використанням екстракту «бородатих» коренів, штаму вірусу грипу A/FM/1/47 H1N1 (інфекційний титр $10.0 \lg \text{ID}_{50}$ (half maximal infectious dose)) та чутливої до цього вірусу лінії клітин нирки собаки Madin-Darby (MDCK).

Для визначення антивірусної активності екстрактів в умовах *in vitro* використовували добову перещеплювану культуру клітин MDCK із суцільним моношаром. Клітини тричі промивали розчином трипсину в поживному середовищі по 50 мкл на лунку, потім середовище росту видаляли і до клітин додавали досліджувані екстракти в різних концентраціях і вносили вірус грипу. Культури інкубували в термостаті з подачею CO_2 протягом 3 діб, щодня контролюючи виникнення цитопатичної дії за допомогою мікроскопу. Після цього культуральну рідину збирали і в ній визначали інфекційний титр вірусу грипу титруванням в культурі клітин методом кінцевих розведень по ЦПД (цитопатогенна дії).

Для визначення цитотоксичної концентрації екстрактів (CC_{50}) використовували клітини СНЕВ (культура клітин нирки ембріона свині). У дослідах застосовували не менше десяти рядів лунок в плашки з культурами клітин для кожного розведення екстрактів в живильному середовищі. Плашки з культурою клітин інкубували при $+ 37^{\circ}\text{C}$ з подачею 5% CO_2 протягом 5 днів. Щодня здійснювали перегляд досліджуваних і контрольних зразків з метою виявлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД) в клітинах. Ступінь ЦПД визначали по зміні морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відторгнення від поверхні лунок дегенеративно змінених клітин). За CC_{50} приймали його найбільшу концентрацію, яка не викликала дегенерацію клітин. За МПК (максимальна переносима концентрація) препарату приймали його найбільшу кількість, яка не викликала дегенерацію клітин.

Ефективну концентрацію (EC_{50}) визначали як мінімальну концентрацію екстракту, яка гальмує розвиток віруспецифічної ЦПД на 50%. Для визначення EC_{50} тест-вірус вносили в культуру клітин та інкубували протягом 60 хв при 37°C . Після адсорбції вірусу на клітинах залишки його видаляли, клітини відмивали живильним середовищем, після чого в підтримувальне середовище вносили екстракти у різних концентраціях. Відсутність ЦПД у досліді (в оброблених культурах), при наявності його в контролі, а також зниження інфекційного титру в оброблених культурах, при наявності його в контрольних та різниця інфекційних титрів в досліді у порівнянні з контролем вірусу грипу дозволяли виявити EC_{50} препарату.

Індекс селективності (IS) препаратів визначали шляхом встановлення співвідношення МПК до мінімально активної концентрації (CC_{50} / EC_{50}).

2.8. Отримання наночасток срібла та їх аналіз

Наночастки срібла (AgNPs) були отримані з використанням етанольних екстрактів (70% етанол) «бородатих» коренів стандартним методом з AgNO_3 . Для цього, 0.3 мл екстрактів і 3 мл 1 мМ AgNO_3 ретельно змішували. Далі всі

розчини інкубували одну годину на водяній бані при $+80^{\circ}\text{C}$ для відновлення Ag^+ до Ag^0 . Оптичну густину зразків (колоїдних розчинів AgNPs) вимірювали автоматично в діапазоні довжин хвиль 300 – 600 нм (спектрофлуориметр Флюорат-02-Панорама) відразу після інкубації на водяній бані, потім через п'ять і дев'ять днів для спостереження динаміки зміни спектрів. Спектри зразків в УФ-видимому діапазоні були отримані за допомогою програмного забезпечення PanoramaPro.

Розмір і морфологію AgNPs досліджували на базі Центру колективного користування електронними мікроскопами НАН України за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ 1230 JEOL, Токіо, Японія) з прискорювальною напругою 80 кВ. Розміри AgNPs були виміряні за допомогою програмного забезпечення ImageJ і представлені як умовні діаметри.

2.9. Хроматографічні дослідження

Висушені зразки рослинної сировини (корені контрольних рослин та «бородаті» корені) подрібнювали у фарфоровій ступці. Відбирали 0.5 г кожного зразка, поміщали в круглодонні колби та двічі екстрагували метанолом (25 мл / зразок для однієї екстракції) при температурі 67.4°C протягом двох годин за допомогою зворотного холодильника. Об'єднані екстракти (50 мл) фільтрували через паперовий фільтр (Whatman® qualitative filter paper, Grade 1, SigmaAldrich) і концентрували до сухого залишку при температурі 40°C на роторному вакуум-випарнику IP-1M2 (ПО «ХІМЛАБОРПРИБОР»). Сухі залишки повторно розчиняли в 3 мл метанолу. Отримані екстракти фільтрували через одноразові мембранні фільтри з PTFE (політетрафторетиленового полімеру) з порами 0.22 мкм.

Рідинну хроматографію фенольних кислот (вільна фаза) проводили на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. Як рухомих фаз використовували метанол (А) і 0.1% розчин мурашиної кислоти у воді (Б).

Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (25%): Б (75%); 25 хв – А (75%): Б (25%); 27 хв – А (100%); 35 хв – А (100%). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4.6 мм × 150 мм, 3.5 мкм, Agilent Technologies, США), швидкість потоку колонки – 0.5 мл / хв, температура термостата – 30 °С, об'єм введення – 4 мкл. Детектування проводили за допомогою діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 250 і 275 нм і записом спектрів поглинання в діапазоні 210 – 700 нм. Ідентифікацію та кількісний аналіз проводили з використанням стандартів (Sigma) фенольних кислот (4-гідроксифенілоцтової, хлорогенової, кавової, сирінгової, р-кумарової, транс-ферулової, синапової, транс-коричної, хінної). Значення виражали як мкг / г СМ коренів.

2.10. Визначення впливу складу живильного середовища на ріст «бородатих» коренів та накопичення флавоноїдів

2.10.1. Дослідження впливу фенілаланіну на ріст «бородатих» коренів полину Тілесіуса за двох режимів освітлення

«Бородаті» корені вирощували на агаризованому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з додаванням 0.05, 0.1 та 1 мМ фенілаланіну при +24°C за наявності освітлення (3000 лк, 16 год / добу) та у темряві. Приріст маси, вміст флавоноїдів та АОА визначали за методиками, описаними у п.п. 2.7.1, 2.7.2, через 4 тижні культивування.

2.10.2. Ріст коренів на середовищі з метилжасмонатом

Метилжасмонат (MeJ) додавали до 18-денних культур, вирощених у рідкому середовищі Мурасіге-Скуга зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей та сахарозою (20 г / л). Концентрації MeJ становили 10, 50 і 100 мкМ. Після додавання в середовище MeJ «бородаті» корені вирощували ще два тижні при

постійному перемішуванні середовища. Вміст флавоноїдів та АОА вимірювали у етанольних (70%) екстрактах коренів за методиками, описаними у п.п. 2.7.1, 2.7.2, через 2, 4, 7 та 11 діб для визначення динаміки біосинтезу.

2.11. Отримання флавоноїдовмісного комплексу сполук на основі екстракту «бородатих» коренів

«Бородаті» корені полину вирощували 18 діб на рідкому середовищі МС зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей та 20 г / л сахарози, додавали метилжасмонат у концентрації 100 мкМ у якості еліситора і культивували ще 7 діб. Біомасу збирали та ліофілізували, подрібнювали та додавали 70% етанол у співвідношенні 1:100 (суха маса коренів, г / об'єм етанолу, мл). Екстракт фільтрували та випарювали на роторному випарювачі.

2.12. Визначення біобезпечності отриманого флавоноїдовмісного комплексу сполук

Перевіряли на біобезпечність попередньо отриману флавоноїдовмісну композицію, що була приготована з сухого етанольного екстракту ліофілізованих «бородатих» коренів полину Тілесіуса. Культура ряски малої була взята з *in vitro* колекції рослин лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Сухий етанольний екстракт «бородатих» коренів *A. tilesii* розчиняли у 70% етанолі (50 мг в 1 мл). Відбирали по 20 листеців ряски у кожну чашку Петрі (контроль та повторності з препаратом); додавали по 20 мл рідкого середовища Мурасіге-Скуга з половинним вмістом макросолей та сахарозою у концентрації 30 г / л; у контрольну чашку додавали 100 мкл 70% етанолу, а у інші чашки – по 100 мкл приготованого етанольного розчину препарату; культивали 3 тижні при температурі +24°C та освітленні 16 год. Через 3 тижні культивування було

проведено оцінку біобезпечності шляхом визначення кількості листеців ряски та приросту їх маси.

2.13. Статистична обробка результатів досліджень

Усі аналізи проводились у трьох повторностях. Результати обраховані у Microsoft Excel та представлені як середнє значення \pm довірчий інтервал (з урахуванням коефіцієнту Стюдента). Відносна похибка відповідає умові $P < 0.05$. Статистичний аналіз проводили з використанням t-тесту Стюдента та методу Тьюкі (R, версія 4.0.4).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Бородаті корені *Artemisia tilesii*: отримання, культивування та накопичення біологічно активних сполук

3.1.1. Отримання культури «бородатих» коренів та їх ПЛР аналіз

«Бородаті» корені *Artemisia tilesii* були отримані шляхом трансформації з використанням дикого агропінового штаму *Agrobacterium rhizogenes* A4. Використовували культивовані рослини *in vitro* з колекції лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (Matvieieva, Bohdanovych & Duplij, 2023; Богданович, Дуплій, Шаховський, Ратушняк, Матвєєва, 2023). Ініціація бородатих коренів показана на Рисунку 3.1. Перші корені з'явилися на 10-й день після кокультивування експлантів із суспензією *A. rhizogenes*. Частота трансформації становила 70%, ефективність трансформації – 3 (на одному експланті ініціювалося у середньому три корені). Було отримано 15 ліній, з яких для подальших досліджень відібрано п'ять.



Рисунок 3.1. Вихідні контрольні рослини *Artemisia tilesii* (А) та ініціація (Б) та ріст «бородатих» коренів (В)

ПЛР-аналіз (Рис. 3.2) отриманих ліній «бородатих» коренів, проведений з використанням праймерів, специфічних до генів *rolB* і *rolC* (592 і 473 п.н. відповідно), підтвердив наявність цих генів і, таким чином, трансгенну природу всіх досліджених ліній коренів, отриманих після спільного культивування експлантів (листіків) з *A. rhizogenes*. ПЛР-аналіз ДНК «бородатих» коренів з праймерами, специфічними до гена *virD*, показав відсутність цих генів в усіх досліджуваних лініях.

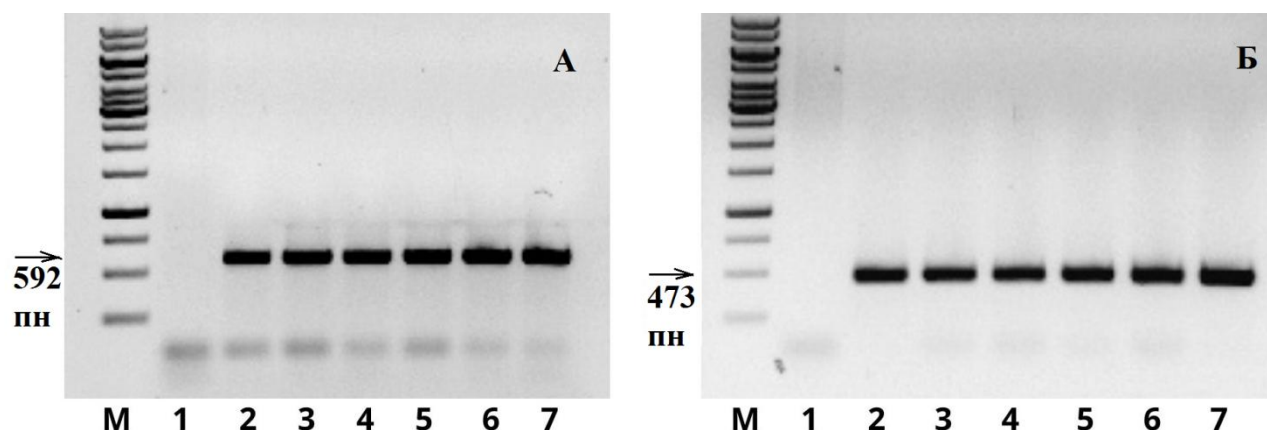


Рисунок 3.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* з праймерами, специфічними до генів *rolB* (А) та *rolC* (Б) (М – O'Gene-Ruler 1 kb Plus DNA Ladder #1163, 1 – ДНК коренів нетрансформованих рослин, 2 – ДНК *A. rhizogenes*, 3-7 – ДНК «бородатих» коренів різних ліній)

3.1.2. Особливості росту «бородатих» коренів різних ліній

Для роботи було обрано п'ять ліній, отримання яких описано вище (підрозділ 3.1.1), та п'ять ліній, отриманих раніше шляхом трансформації з використанням *A. rhizogenes* з гетерологічними генами інтерферону- $\alpha 2b$ людини *ifn- $\alpha 2b$* та селективним геном неоміцинфосфотрансферази *nptII* (останні – з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України). Такий вибір був зумовлений можливістю порівняти особливості «бородатих» коренів, які мають тільки перенесені гени *A. rhizogenes*, з тими, що додатково

мають гетерологічні гени *ifn- α 2b* та *nptII*. Саме ці 10 ліній були обрані тому, що вони мали відмінності за досліджуваними параметрами (швидкість росту, особливості біоактивності). Усі десять ліній «бородатих» коренів мали специфічні ознаки – здатність рости на середовищі без регуляторів росту та негативний геотропізм. Однак, морфологія коренів різних ліній значно різнилася (Додаток В). Товщина коренів, ступінь їх галуження та забарвлення варіювали у різних лініях. Корені деяких ліній були білі, а інші мали зеленувате забарвлення. Поява забарвлення може свідчити про наявність можливої здатності до фотосинтезу у деяких лініях «бородатих» коренів.

Спостерігалися відмінності і в довжині та кількості кореневих волосків коренів різних ліній (Рис. 3.3). Оскільки кореневі волоски важливі для живлення рослин (поглинання поживних речовин), можна припустити, що рослини з більш розвиненими кореневими волосками можуть отримувати більше живлення, таким чином маючи фізіологічну перевагу.

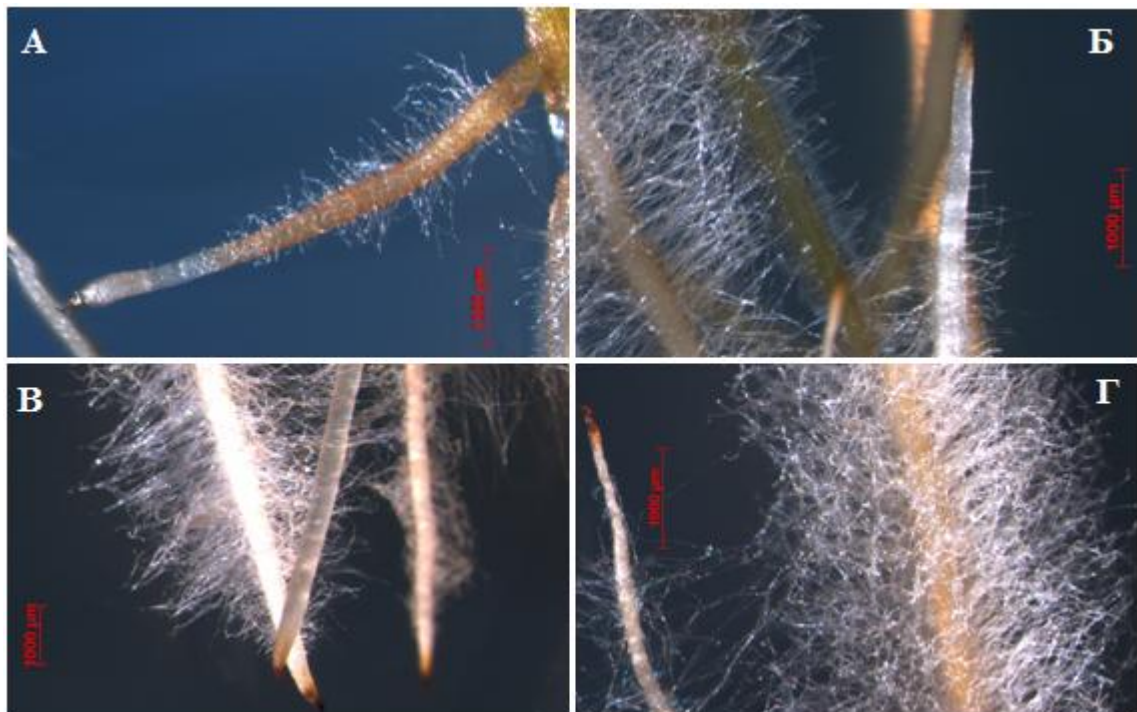


Рисунок 3.3. Відмінності у морфології «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: лінії №2 (А), №4 (Б), №10 (В) та №16 (Г). Довжина риски масштабу 1000 мкм

Окрім морфологічних ознак, корені різних ліній відрізнялися і за швидкістю росту (Рис. 3.4). Встановлено, що приріст маси коренів різних ліній значно варіював (Рис. 3.5): найбільш швидкорослою були лінії №№ 10 та 15 (приріст маси становив 2.31 ± 0.22 та 2.75 ± 0.15 г, відповідно), лініями з найповільнішим ростом були №№ 1, 12 та 18 (0.97 ± 0.08 , 0.36 ± 0.09 г та 0.64 ± 0.08 г відповідно), усі інші лінії мали середню швидкість росту (1.51 ± 0.19 ... 1.94 ± 0.15 г). Слід відзначити, що спостерігалась варіабельність за швидкістю росту як у коренів, отриманих з використанням дикого штаму *A. rhizogenes* (Рис. 3.5, лінії 10, 12, 15, 16, 18), так і у коренів, що додатково мали гетерологічні гени (Рис. 3.5, лінії 1-5). Таким чином, вірогідно, наявність генів *ifn-α2b* та *nptII* не приводила до додаткової варіабельності швидкості росту, а наявні відмінності, очевидно, були передусім зумовлені перенесеними генами *A. rhizogenes*, які мали як корені, отримані трансформацією диким штамом, так і корені, для отримання яких використовували бактерії з додатковою плазмідною.

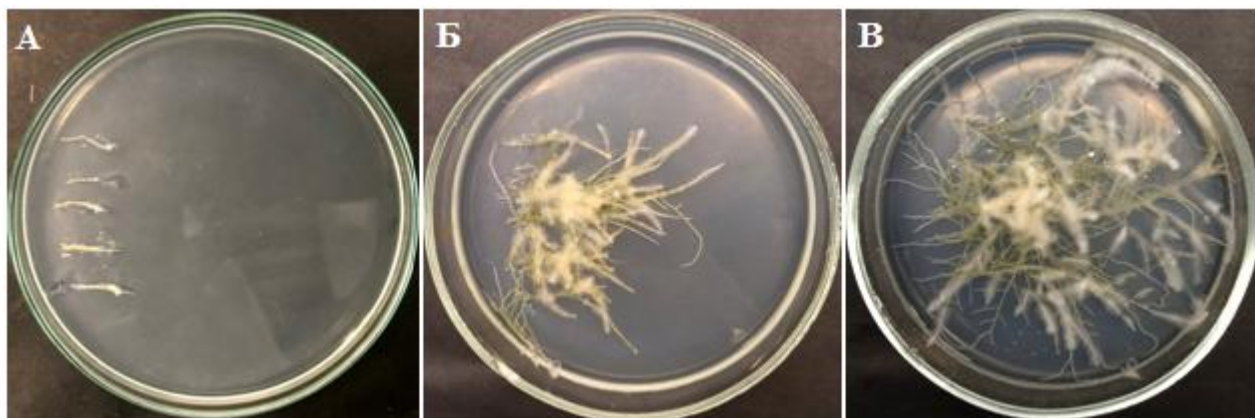


Рисунок 3.4. Відмінності у швидкості росту між різними лініями «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: початок експерименту (А); лінія №4 після 4 тижнів культивування на агаризованому середовищі $\frac{1}{2}$ МС (Б); лінія №16 після 4 тижнів культивування на агаризованому середовищі $\frac{1}{2}$ МС (В)

Таким чином, морфологічні відмінності коренів різних ліній та їх особливості у порівнянні з контрольними нетрансформованими коренями свідчать про вплив перенесених у ході трансформації агробактеріальних *rol*

генів. Різниця у швидкості росту та фенотипові відмінності можуть бути пов'язані з рівнем експресії гена *rolB* у кожної окремої лінії (Dilshad et al., 2021; Tanaka et al., 2001). Ці гени впливають на утворення «бородатих» коренів, морфогенез рослин-регенерантів, морфологію їх листків і квіток (Otten, 2018; Kodah, Müller & Lütken, 2016; Arshad, Haq, Waheed, Mysore & Mirza, 2014; Altamura, 2004).

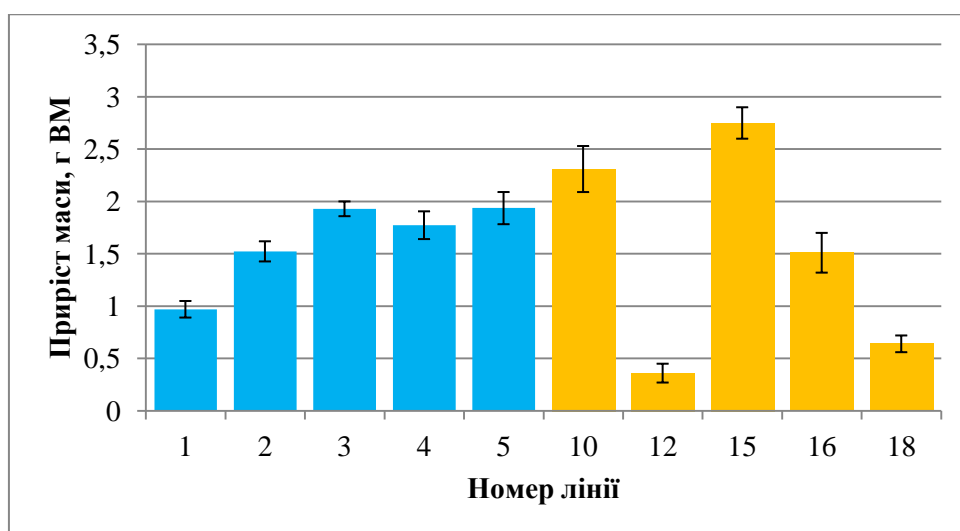


Рисунок 3.5. Приріст маси «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: 1-5 – лінії, отримані в результаті трансформації *A. rhizogenes*, які мали плазмиду з гетерологічним геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини, та 10-18 – лінії, отримані в результаті трансформації диким агропіновим штамом *A. rhizogenes* A4

3.1.3. Вплив генетичної трансформації на синтез біоактивних сполук

Дія різних стресових факторів на рослини може викликати відповідь рослинного організму, яка часто пов'язана зі змінами активності системи антиоксидантного захисту. Тому ми вважали доцільним визначити особливості впливу генетичної трансформації як можливого стресового фактору (сама трансформація та вбудовування чужорідних генів в геном рослин) на активність неферментативних (вміст флавоноїдів, антиоксидантна та відновлювальна активності) та ферментативних (активності каталази та

супероксиддисмутази) складових системи захисту рослин від оксидативного стресу (Bohdanovych et al., 2021; Bohdanovych & Matvieieva, 2020; Bohdanovych & Matvieieva, 2021).

Це пов'язано передусім з тим, що здатність мінімізувати негативний вплив АФК (активних форм кисню) є важливим показником пристосування рослин до негативної дії різних стресових умов (Ahmad, Jaleel, Salem, Nabi & Sharma, 2010; Scandalios, 2005; Hasanuzzaman et al., 2021; Medrano-Macías et al., 2022). АФК можуть взаємодіяти з білками, ліпідами та нуклеїновими кислотами, викликаючи пошкодження молекул та структур (перекисне окислення ліпідів, лізис мембран, амінокислотні модифікації, фрагментація пептидного ланцюга, підвищена схильність до протеолізу, делеції та транслокації хромосом, ДНК-мутації, деградація основ) (Scandalios, 2005; Hasanuzzaman et al., 2021; Szechyńska-Hebda, Ghalami, Kamran, Van Breusegem & Karpiński, 2022). Визначення можливості збільшення вмісту антиоксидантів завдяки трансформації з використанням *A. rhizogenes* становить не тільки теоретичний, але й практичний інтерес, оскільки отримані «бородаті» коренів з підвищеним рівнем антиоксидантної активності можуть бути джерелом біоактивних сполук.

Аналіз виявив достовірні відмінності як у вмісті флавоноїдів у коренях різних ліній, так і відмінності між трансгенними та контрольними коренями. Вміст флавоноїдів в усіх лініях «бородатих» коренів був вищим або співставним з таким у контролі. Зокрема, вміст коливався від 2.57 ± 0.16 мг РЕ / г ВМ (лінія № 4) до 9.47 ± 1.10 мг РЕ / г ВМ (лінія № 2), в той час як у контролі значення становило 2.31 ± 0.24 мг РЕ / г ВМ. (Рис. 3.6, А). Таке збільшення вмісту флавоноїдів у екстрактах з «бородатих» коренів у порівнянні з нетрансформованими рослинами може бути пояснено збільшенням рівня синтезу вторинних метаболітів після перенесення *rol* генів, адже вони є активаторами вторинного метаболізму у рослин (El-Esawi et al., 2017; Dilshad et al., 2016a; Dilshad et al., 2016b). Значна варіативність у показниках між окремими лініями, вірогідно, зумовлена недетермінованістю вбудовування перенесених генів у геном

рослини. Слід зазначити, що не було виявлено значних відмінностей у діапазоні значень вмісту флавоноїдів у коренях, отриманих в результаті трансформації бактеріями, що мали плазмиду з гетерологічними генами інтерферону- $\alpha 2b$ людини та *nptII* (лінії №№ 1-5) та тих, що отримані після трансформації бактеріями дикого штаму (лінії №№ 10-18). Отже, у даному випадку ці гени не впливали на біосинтез флавоноїдів.

Було визначено антиоксидантну (АОА, DPPH-тест) та відновну (ВА) активності тих самих етанольних екстрактів, а також кореляцію цих значень з вмістом флавоноїдів. АОА (виражена як EC_{50}) екстрактів коливалася від 1.76 ± 0.56 мг ВМ (лінія № 1) до 6.01 ± 0.52 мг ВМ (лінія № 16), а в контролі становила 8.99 ± 0.97 мг ВМ (Рис. 3.6, Б). Така низька антиоксидантна активність екстрактів з коренів контрольних рослин (чим вищим є показник EC_{50} , тим меншою є антиоксидантна активність) відповідає низькому вмісту флавоноїдів у його екстракті. Таким чином, в усіх досліджуваних лініях АОА була вищою, ніж у контрольних зразках. Так само як і при проведенні аналізів з визначення вмісту флавоноїдів, не було знайдено значних відмінностей між двома групами ліній за рівнем антиоксидантної активності. Разом з тим, була виявлена певна кореляція між вмістом флавоноїдів та АОА (Рис. 3.6, В). Відносно невисоке значення R^2 кореляції можна пояснити тим, що різні флавоноїди мають різні рівні біологічної активності, як антиоксидантної та відновної, так і протівірусної та протизапальної (Sadik, Sies & Schewe, 2003; Shamsudin et al., 2022; Grijalva-Guiza, Jiménez-Garduño & Hernández, 2021; Badshah et al., 2021). Тому певний комплекс флавоноїдів у екстракті, а саме його якісний та кількісний склад може значно впливати на варіації у біоактивностях екстрактів та кореляції цих біоактивностей.

У екстрактах з «бородатих» коренів виявлено високу відновну активність (виражену як $EC_{0.5}$), яка варіювала від 1.37 ± 0.13 мг ВМ (лінія № 2) до 3.58 ± 0.4 мг ВМ (лінія № 4). У той же час показник $EC_{0.5}$ у контрольних зразках становив 4.70 ± 0.27 мг ВМ (Рис. 3.7, А), тобто екстракти усіх ліній «бородатих» коренів

мали вищу відновну активність, ніж екстракти з контрольних коренів. Значних відмінностей між двома групами коренів не було виявлено.

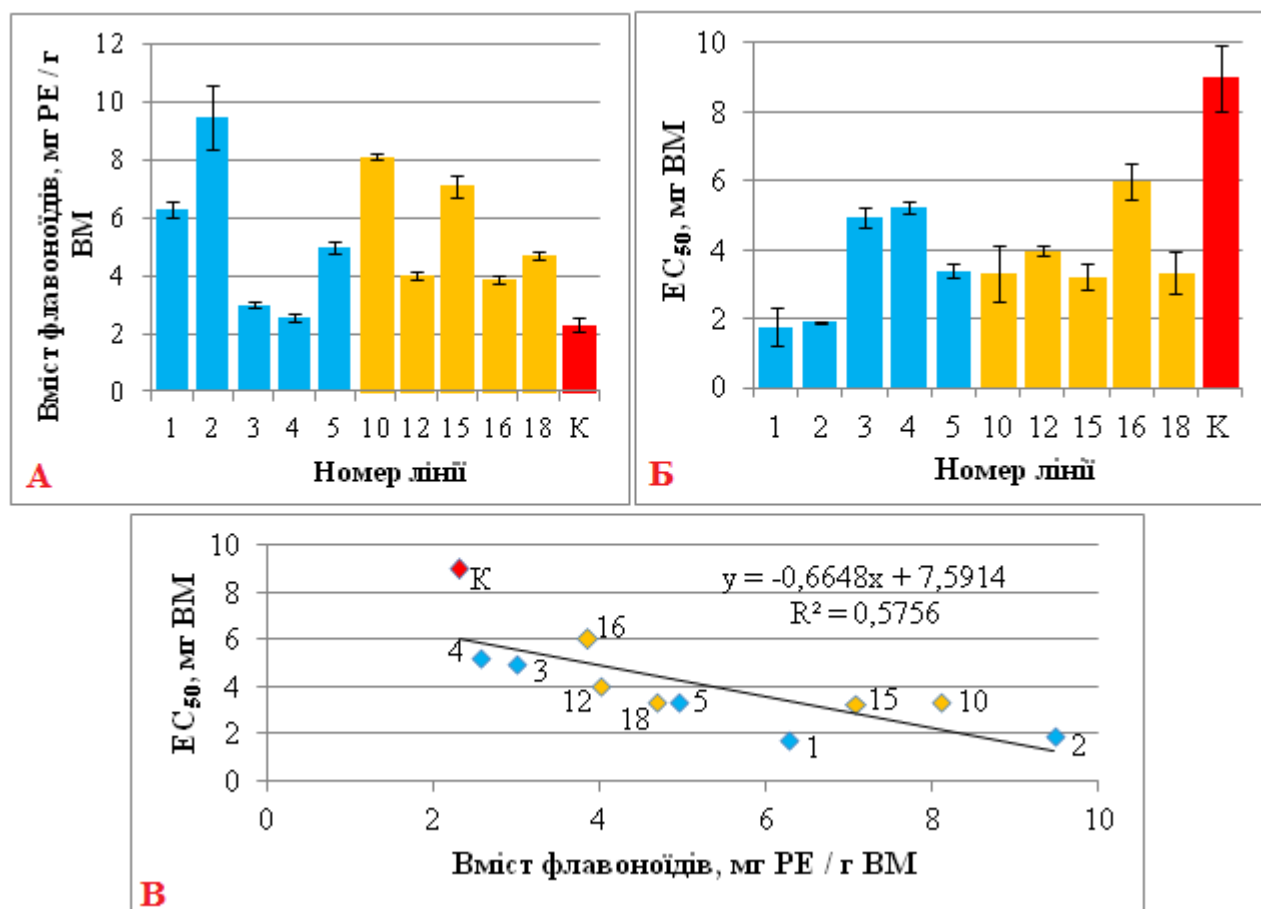


Рисунок 3.6. Вміст флавоноїдів (А), антиоксидантна активність (Б) та їх кореляція (В) у етанольних екстрактах «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: 1-5 – лінії, отримані в результаті трансформації *A. rhizogenes*, які мали плазмідну з гетерологічним геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини, та 10-18 – лінії, отримані в результаті трансформації диким агропіновим штамом *A. rhizogenes* A4, К – контрольні нетрансформовані корені

Кореляція між ВА та вмістом флавоноїдів (Рис. 3.7, Б) була кращою ($R^2 = 0.761$), ніж між АОА та вмістом флавоноїдів. Відновна та антиоксидантна активності добре корелювали між собою ($R^2 = 0.913$, Рис. 3.7, В). Таким чином, у контрольних зразках був найменший вміст флавоноїдів та найнижчі АОА та ВА, а у більшості зразків «бородатих» коренів чим більшим був вміст флавоноїдів, тим вищими була відновна та антиоксидантна активності. Така

кореляція узгоджується з даними, наявними у наукових публікаціях стосовно біологічної активності флавоноїдів та їх потенційної можливості використання для розробки нових препаратів, зокрема, з антиоксидантними властивостями (Khan et al., 2021; González, Casado & Lanas, 2021; Ferraz et al., 2020; Sun & Shahrajabian, 2023; Golonko, Olichwier, Swislocka, Szczerbinski & Lewandowski, 2022; Li, Sun, Cui & Li, 2022). Антиоксидантні властивості поліфенолів пов'язані з їх високою реакційною здатністю як донорів водню або електронів. Вважають, що поліфеноли мають ідеальну хімічну структуру для активізації вилучення вільних радикалів, і вони ефективніші антиоксиданти, ніж токофероли та аскорбати (Ahmad, Jaleel, Salem, Nabi & Sharma, 2010; He et al., 2017).

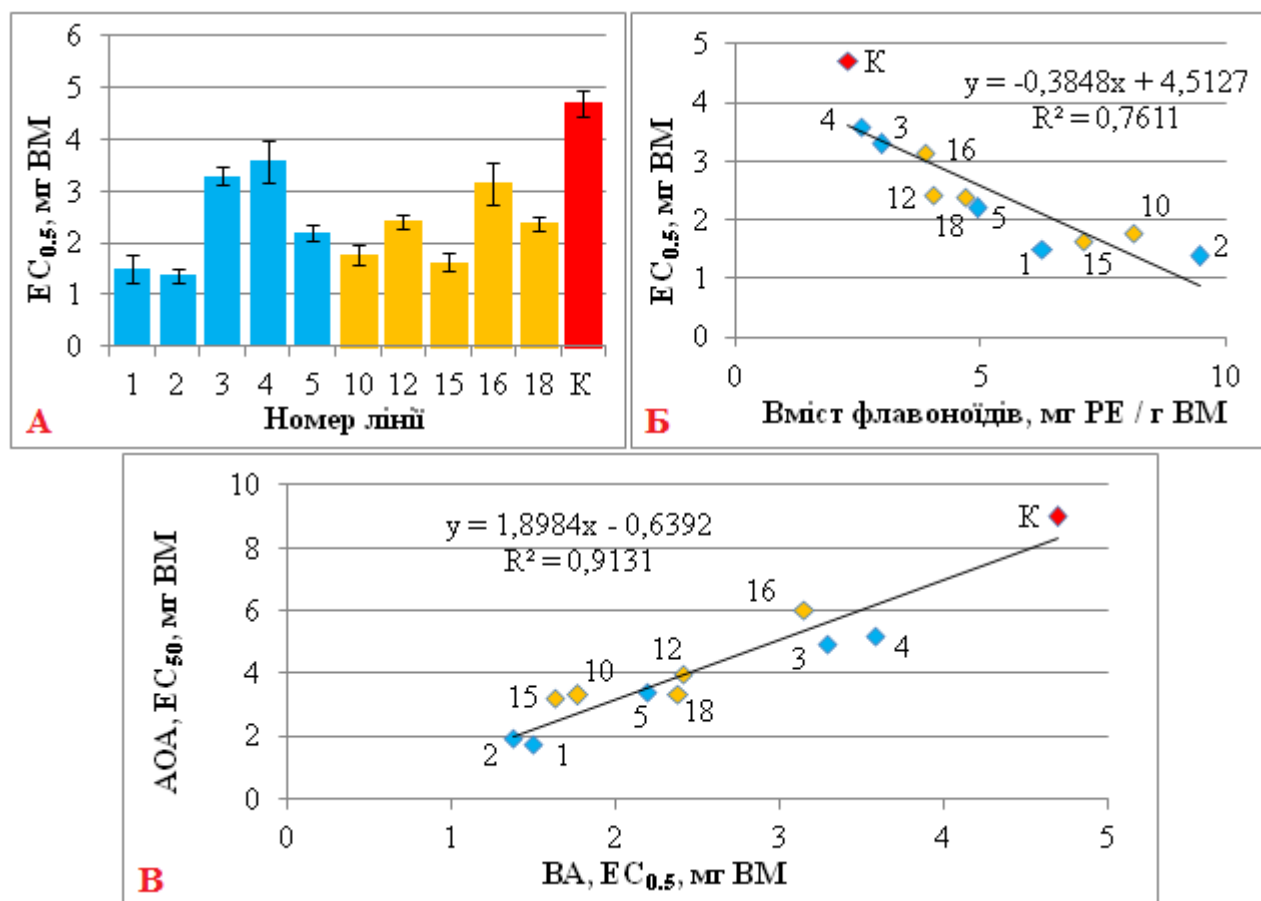


Рисунок 3.7. Відновна активність (А) та її кореляція з вмістом флавоноїдів (Б) і з антиоксидантною активністю (В) у етанольних екстрактах «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: 1-5 – лінії, отримані в результаті трансформації *A. rhizogenes*, які мали плазмиду з гетерологічним геном

інтерферону- $\alpha 2b$ людини, та 10-18 – лінії, отримані в результаті трансформації диким агропіновим штамом *A. rhizogenes* A4, К – контрольні не трансформовані корені

Активність каталази та супероксиддисмутази (Matvieieva et al., 2022) порівнювали в лініях «бородатих» коренів і контрольних коренях (Рис. 3.8, А, Б і Г). Були виявлені значні відмінності в активності цих ферментів в екстрактах зразків.

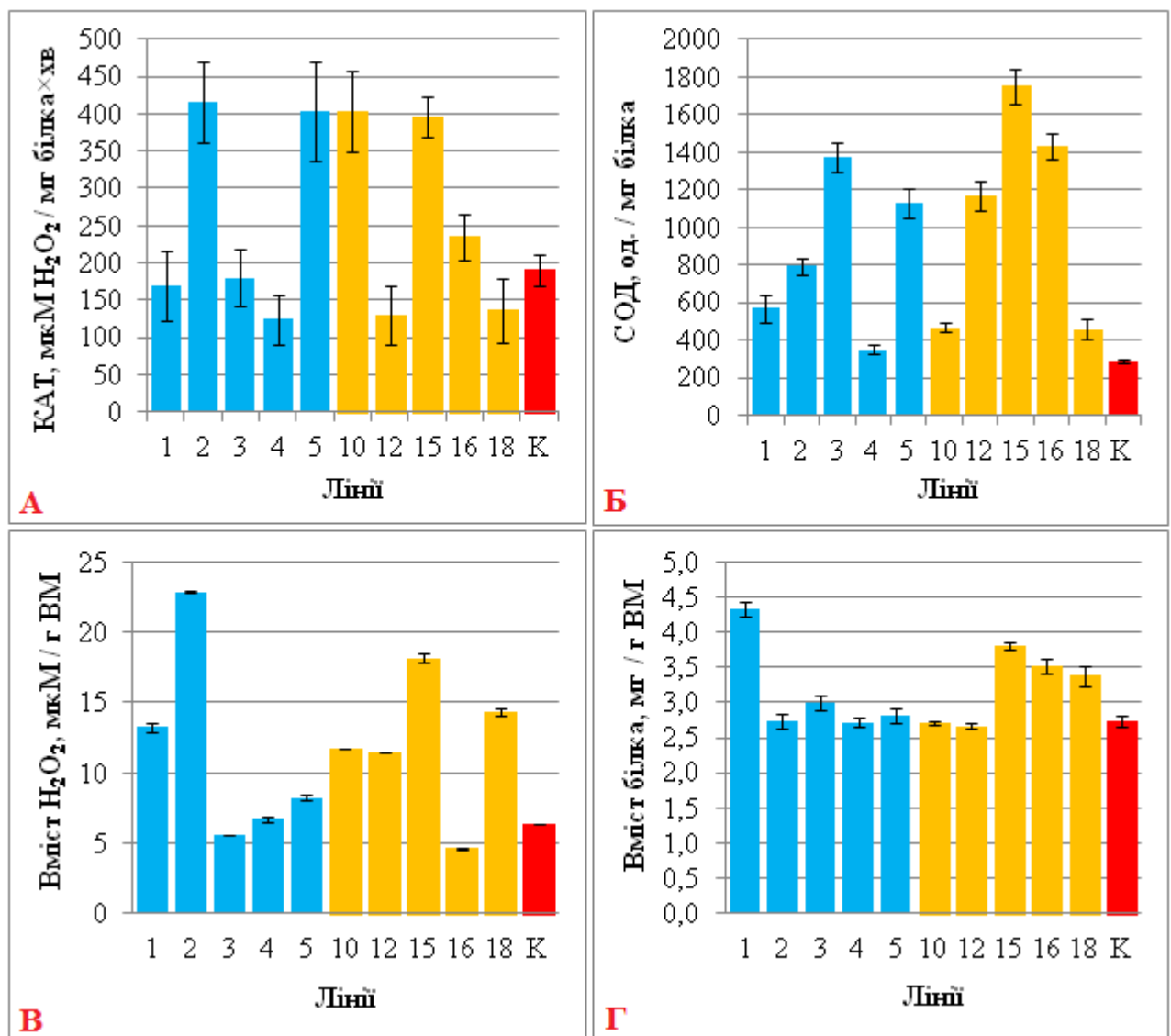


Рисунок 3.8. Активність каталази (А) та супероксиддисмутази (Б), вміст пероксиду водню (В) та білка (Г) у етанольних екстрактах «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: 1-5 – лінії, отримані в результаті трансформації *A. rhizogenes*, які мали плазмиду з гетерологічним геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини, та 10-18 –

лінії, отримані в результаті трансформації диким агропіновим штамом *A. rhizogenes* A4, К – контрольні не трансформовані корені

Активність каталази коливалася від 124.05 ± 34.09 мкмоль H_2O_2 / мг білка·хв (лінія № 4) до 415.78 ± 53.28 мкмоль H_2O_2 / мг білка × хв (лінія № 2), а в контрольній пробі – 190.62 ± 20.92 мкмоль H_2O_2 / мг білка × хв. Активність супероксиддисмутази в усіх лініях «бородатих» коренів була достовірно вищою, ніж у контролі (288.17 ± 10.66 Од. / мг білка) і коливалася від 347.96 ± 25.27 Од. / мг білка (лінія № 4) до 1751.85 ± 89.94 Од. / мг білка (лінія № 15). Вміст пероксиду водню в екстрактах варіював від 4.62 ± 0.05 мкмоль / г ВМ (лінія № 16) до 22.87 ± 0.04 мкмоль / г ВМ (лінія № 2), а в контрольному зразку – 22.87 ± 0.04 мкмоль / г ВМ (Рис. 3.8, В). Кореляції між активністю каталази та супероксиддисмутази, а також вмістом пероксиду водню в екстрактах коренів не було виявлено.

Таким чином, у всіх лініях активність СОД була вищою, ніж у контрольних коренях, однак активність САТ та вміст пероксиду водню були як вищими, так і нижчими, ніж у контролі. Як і у попередніх аналізах, відмінностей між двома групами ліній не було виявлено. Значення значно варіювали незалежно від наявності гетерологічних генів (*ifn-α2b* та *nptII*) у досліджуваних лініях.

Отже, аналіз ферментативних та неферментативних систем антиоксидатного захисту показав значне варіювання усіх досліджуваних параметрів серед ліній «бородатих» коренів незалежно від наявності гетерологічних генів. Також було показано, що в усіх зразках антиоксидантна та відновлювальна активності, а також активність супероксиддисмутази були вищими, ніж у екстрактах контрольних коренів, а вміст флавоноїдів був вищим або порівняним з таким у контролі.

Для подальших досліджень було обрано по дві лінії, отриманих в результаті трансформації диким штамом (лінії №№ 10 та 16) та з

гетерологічним геном інферферону- $\alpha 2b$ людини (лінії №№ 2 та 4), у яких були значні відмінності по усім досліджуваним параметрам.

3.1.4. Активність *rol*, *PAL* та *CHS* генів та ріст «бородатих» коренів і синтез флавоноїдів

Раніше було проведено аналіз стосовно накопичення флавоноїдів та рівня антиоксидантної активності (Matvieieva et al., 2020). Було встановлено значні коливання цих параметрів у різних лініях, що, вірогідно, зумовлено недетермінованим вбудовування перенесених генів у геном рослин. Разом з тим, становить значний інтерес з'ясування особливостей кореляції активності перенесених *rol* генів *A. rhizogenes* та синтезу флавоноїдів у лініях, які трансформовані диким штамом *A. rhizogenes* A4 та штамом, що містив додатково плазмиду з генами *nptII* та *ifn- $\alpha 2b$* .

Дане завдання було спрямовано на порівняння таких ліній «бородатих» коренів стосовно наявності кореляції загального вмісту флавоноїдів, рівня антиоксидантної та відновлювальної активності, а також активності власних генів рослин – фенілаланін-амоній-ліази (*PAL*) та халконсинтази (*CHS*), та генів *rolB* і *rolC* *A. rhizogenes*.

Результати ПЛР у реальному часі показали, що активність перенесених генів *rolB* (Рис. 3.9, А) та *rolC* (Рис. 3.9, Б) була різною у досліджених лініях, незалежно від того, яким штамом *A. rhizogenes* їх трансформували. Слід відзначити, що активність обох генів у лінії №10 була вищою, ніж в інших трьох лініях: відносна активність *rolB* була вищою у 3.05 – 9.34 рази, а *rolC* у 2.46 – 5.38 рази. Встановлено залежність між активністю генів *rol* та приростом маси «бородатих» коренів *A. tilesii*. Дійсно, лінія 10 мала найшвидший темп росту на противагу лініям 2 та 16 (Рис. 3.5). Такий же результат отримано при аналізі відносної активності генів *rolB* та *rolC*. Це можна пояснити механізмами дії *rol* генів при їх перенесенні у геном рослин. Головна функція гена *rolB*

полягає у специфічному коренеутворенні у рослин і має вирішальний вплив на формування як бічних, так і придаткових коренів. Ген *rolC* також має певний вплив на формування «бородатих» коренів (Makhzoum, Sharma, Bernards & Trémouillaux-Guiller, 2013). Таким чином, різниця у швидкості росту ліній «бородатих» коренів може бути обумовлена різницею у рівні експресії генів *rolB* та *rolC* (Pistelli, Giovannini, Ruffoni, Bertoli & Pistelli, 2010).

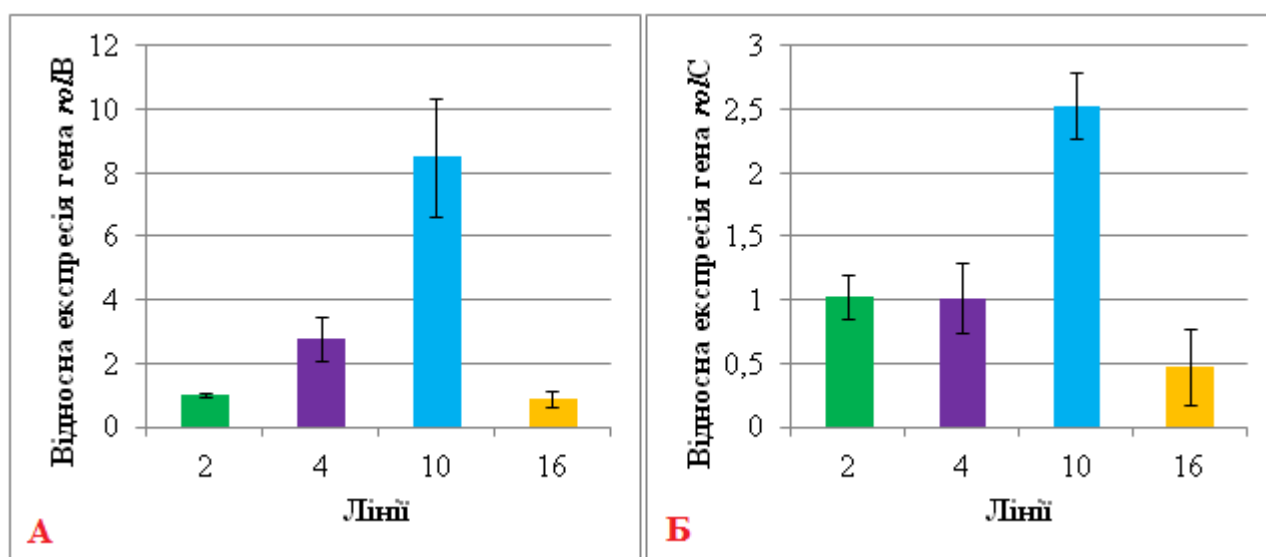


Рисунок 3.9. Відносна активність генів *rolB* (А) та *rolC* (Б) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii* після 2 тижнів культивування

У літературі відомою є кореляція активності гена *rolB* з активністю власних генів рослин та вмістом вторинних метаболітів. Наприклад, збільшена експресія цього гена позитивно корелювала зі збільшенням активності гена ізохромсинтази та синтезом антрахінону (Shkryl et al., 2007). У цьому дослідженні ефект *rolB* гена перевищував аналогічну дію інших генів *A. rhizogenes*, а саме *rolA* та *rolC*, у 5.36 та 3.45 рази відповідно. Таким чином, дослідниками було показано, що вплив гена *rolC* проявлявся у меншій мірі, ніж вплив гена *rolB*, але також був статистично достовірним і, можливо, мав місце синергійний ефект. Крім того, перенесення *rolB* та *rolC* генів до рослин *A. annua* призвело до збільшення вмісту артемізиніну, артесунату та дигідроартемізиніну у трансгенних рослинах (Dilshad et al., 2015). У цих

рослинах спостерігалось підвищення активності генів, задіяних у біосинтезі артемізиніну. Тому у нашій роботі було проаналізовано зв'язок активності *rol* генів (Рис. 3.9) та вмісту флавоноїдів у тих самих лініях (Рис. 3.6, А). Хоча результати цього дослідження підтвердили вплив відносної активності перенесених *rol* генів на швидкість росту утворених «бородатих» коренів *A. tilesii*, кореляції з синтезом флавоноїдів не спостерігалось. Це може бути зумовлено тим, що функція *rol* генів як активаторів вторинного метаболізму у рослин може бути зумовлена не тільки активністю цих перенесених генів, але й їх наявністю та місцем вбудовування у рослинний геном. Крім того, можливим є «відтермінований» синтез флавоноїдів у зразках коренів, які швидше ростуть, що спричинено особливостями метаболізму клітин, які швидко діляться. Отже, процес накопичення біомаси та синтезу флавоноїдів може бути розділеним у часі через обмежені ресурси клітин та/або компонентів середовища.

Дослідження відносної активності генів фенілаланін-амоній-ліази (*PAL*) та халконсинтази (*CHS*) показало (Bohdanovych, Morgun, Lakhneko, Shakhovsky & Matvieieva, 2022), що рівень активності цих генів в лініях був різним, але меншим, ніж в контролі (Рис. 3.10). Оскільки ці гени залучені у біосинтез поліфенольних сполук, зокрема флавоноїдів, фенілпропаноїдів та лігніну у рослин, їх активність може впливати на вміст флавоноїдів (Lam et al., 2022; Hu et al., 2023; Wang et al., 2018; Yang et al., 2019). Як виявилось, у всіх дослідних зразках більшому вмісту флавоноїдів відповідала менша активність *PAL*. Наприклад, вміст флавоноїдів у лінії №2 був найбільшим серед усіх зразків і у 4.10 разів більшим, ніж у коренях контрольних нетрансформованих рослин (Рис. 3.6, А). Аналогічно активність *PAL* у лінії №2 була нижчою за контроль у 8.62 рази (Рис. 3.10, А). Така обернена кореляція спостерігалась в усіх дослідних лініях. Це можна пояснити оберненим інгібуванням гена *PAL* високим вмістом продукту біосинтезу. Рівень активності гена *CHS* у контрольних рослин був вищим у 4.01 – 16.72 рази, ніж у «бородатих» коренях *A. tilesii* (Рис. 3.10, Б). Це також може бути результатом зворотного інгібування гена халконсинтази, задіяного у синтезі поліфенолів. Залежності активності

генів фенілаланін-амоній-ліази та халконсинтази від наявності тільки *rol* генів або додатково ще *ifn-α2b* та *nptII* генів серед двох груп «бородатих» коренів не було виявлено.

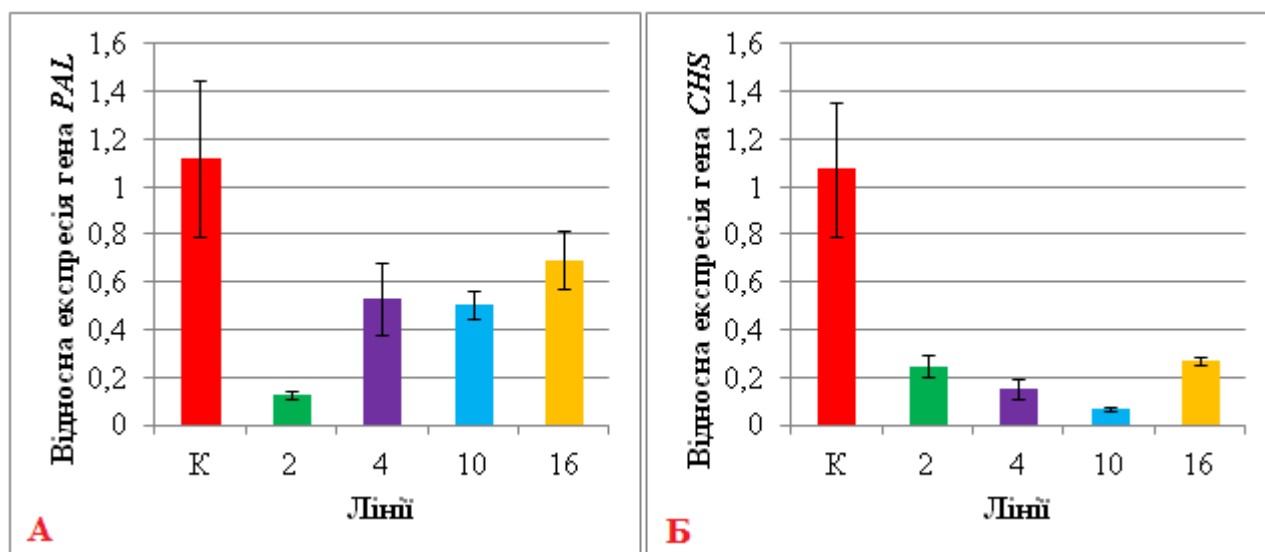


Рисунок 3.10. Відносна активність генів фенілаланін-амоній-ліази (*PAL*) (А) та халконсинтази (*CHS*) (Б) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii* після 2 тижнів культивування

Отже, представлене дослідження підтвердило вплив генів *rolB* та *rolC* на швидкість росту «бородатих» коренів: в усіх лініях більший приріст маси спостерігався у зразках з більшою активністю *rolB*. Разом з тим, рівень активності гена фенілаланін-амоній-ліази обернено співвідносився з вмістом флавоноїдів в усіх дослідних лініях: чим вищим був вміст, тим меншою була активність *PAL*. Відносна активність як *PAL*, так і *CHS* була найвищою саме у контрольних коренях. Такий результат може свідчити про наявність оберненого інгібування цих двох генів продуктами біосинтезу, в якому вони задіяні, через високий вміст флавоноїдів у трансформованих рослинах. Окремий інтерес становило підтвердження чи спростування того, чи впливає наявність гетерологічних генів *nptII* та *ifn-α2b* у «бородатих» коренях на усі вищевказані показники. У результаті дослідження з'ясовано, що принципових відмінностей у відносних активностях генів *rolB*, *rolC*, *PAL* та *CHS* між двома групами ліній «бородатих» коренів не відзначалося.

3.1.5. Хроматографічні дослідження

За допомогою ВЕРХ аналізу (Рис. 3.11) екстрактів з п'яти ліній «бородатих» коренів та контрольних коренів *A. tilesii* було ідентифіковано такі феноксикислоти: 4-гідроксифенілоцтова, хлорогенова, кавова, сирінгова, бензойна, р-кумарова, транс-ферулова, синапова, транс-корична, хінна (Skorokhod, Bohdanovych & Matvieieva, 2023).

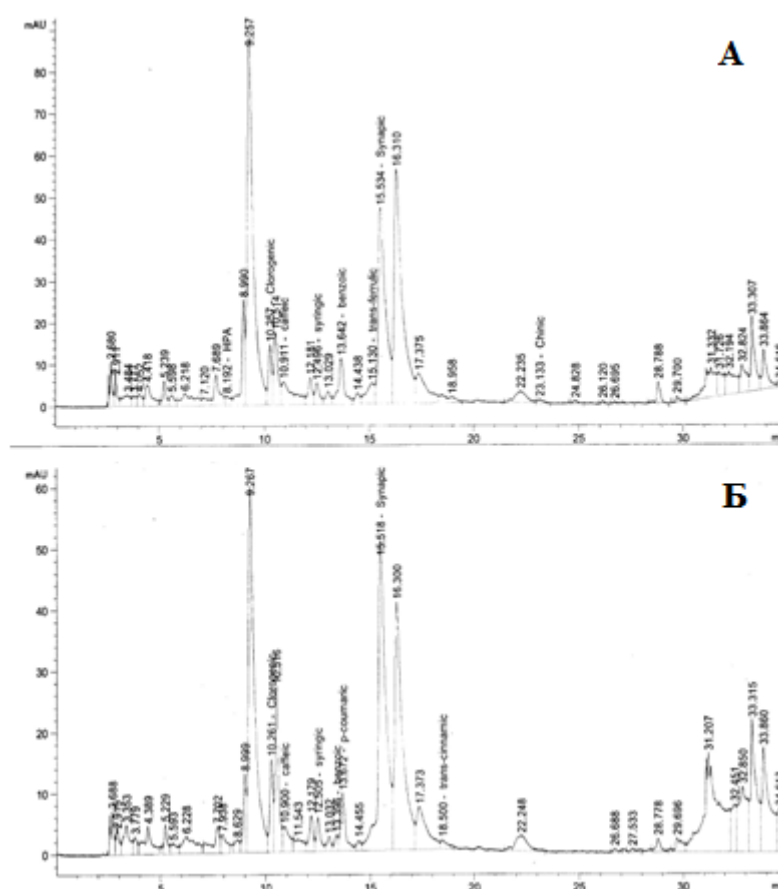


Рисунок 3.11. Приклади хроматограм фенольних кислот в метанольних екстрактах контрольних коренів *Artemisia tilesii* (А) та однієї з ліній «бородатих» коренів (Б)

Було встановлено, що деякі сполуки, наприклад, хінна та 4-гідроксифенілоцтова кислоти були присутні лише у контролі і відсутні в усіх лініях «бородатих» коренів (Табл. 3.1). Разом з тим, транс-корична кислота синтезувалася в усіх лініях «бородатих» коренів і була відсутня у контролі, а р-

кумарова кислота була ідентифікована тільки в одній лінії «бородатих» коренів. Транс-ферулова кислота синтезувалася тільки в контрольних коренях та одній лінії «бородатих» коренів, і була відсутня в усіх інших лініях. Такі результати свідчать про те, що завдяки трансформації з використанням *A. rhizogenes* можна отримати лінії з набором вторинних метаболітів, які будуть відмінними від контрольних коренів. До того ж, можна отримати корені, які синтезують невластиві контрольним кореням сполуки, зокрема поліфеноли.

Таблиця 3.1

Вміст феноксикислот в зразках ліній «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* (№№ 10 – 18) та коренів контрольних рослин (К)

Rt	Сполука	Вміст фенольних кислот (мкг / г СМ) в зразках					
		К	10	12	15	16	18
8.33	4-гідрокси-фенілоцтова	21.10	-	-	-	-	-
10.241	хлорогенова	392.22	663.90	533.52	592.41	394.84	615.43
10.874	кавова	147.13	132.43	149.35	174.60	63.44	125.41
12.487	сирінгова	29.76	56.09	36.26	40.46	28.32	43.12
13.657	бензойна	93.27	188.03	104.69	117.52	12.30	109.69
13.901	p-кумарова	-	-	-	-	65.42	-
14.874	транс-ферулова	54.52	-	49.15	-	-	-
15.493	синапова	364.72	499.58	328.07	403.46	414.15	427.10
18.496	транс-корична	-	21.44	8.39	10.77	5.15	7.35
23.011	хінна	183.55	-	-	-	-	-
	Всього	1286.27	1561.46	1209.43	1339.23	983.62	1328.10

Було також встановлено, що отримані після трансформації лінії мають не тільки відмінний якісний, а і кількісний склад фенольних кислот. Вміст хлорогенової кислоти був співставним з таким у контрольних коренях (392.22 мкг / г СМ) лише в однієї лінії (№ 16) «бородатих» коренів (394.84 мкг / г СМ), а в усіх інших лініях цей вміст був на 36.01 ... 69.27 % більшим. Вміст сирінгової кислоти був так само співставним з таким у контролі тільки в однієї лінії (№ 16), а в усіх інших лініях був у 1.22 ... 1.88 більшим, ніж у контролі. Разом з тим, вміст кавової кислоти був лише в однієї лінії (№ 15) на 18.67 % більшим, ніж контролі, а в інших ліній був співставним або меншим, ніж у контролі у 1.11 ... 2.32 раза. Транс-корична кислота була ідентифікована в усіх лініях «бородатих» коренів і була відсутня у контролі; її вміст варіював від 5.15 до 21.44 мкг / г СМ, тобто у 4.16 раза.

Загальний вміст ідентифікованих фенольних кислот у лініях «бородатих» коренів значно варіював від 983.62 до 1561.46 мкг / г СМ, у той же час у контролі становив 1286.27 мкг / г СМ.

Таким чином, загальний вміст ідентифікованих фенольних кислот у зразках «бородатих» коренях варіював та може бути як вищим (корені №10), так і нижчим (корені №16) за контроль. Не було знайдено лінії «бородатих» коренів, яка б мала усі ідентифіковані фенольні кислоти у більшій кількості, ніж контрольні корені. Тільки одна лінія (№ 15) мала більший вміст одразу шести фенольних кислот у порівнянні з контрольним зразком. Отже, в результаті трансформації не вдалося отримати лінію з усіма найвищими досліджуваними показниками, але було показано, що можливо отримати зразки зі значно більшою кількістю окремих фенольних кислот та їх значною варіабельністю.

У літературі досить давно досліджують вплив *rol* генів на синтез фенольних кислот. Наприклад, Dilshad et al. (2016b) виявили триразове збільшення вмісту кавової кислоти в «бордатих» коренях *Artemisia annua*. «Бородаті» корені *Brassica rapa*, які мали перенесені *rol* гени, продукували р-гідроксибензойну, протокатехову та сирінгову кислоти в кількості, значно вищій, ніж у контролі (Chung, Rekha, Rajakumar & Thiruvengadam, 2016). Разом

з тим, концентрація ентизинової, р-кумарової, m-кумарової та t-коричної кислот була вищою в контрольних коренях. «Бородаті» корені *Fagopyrum tataricum* синтезували фенольні сполуки та їх вміст був у декілька разів вищим, ніж у контрольних коренях (Kim et al., 2009). Такі зміни в синтезі біоактивних сполук і відповідної активності можуть бути використані для відбору зразків (ліній) – продуцентів цінних сполук. Ці речовини можливо використовувати не тільки у фармакологічній промисловості як антиоксидантні, протизапальні, цитостатичні сполуки (Mishra, Pandey & Manvati, 2020; Enogieru, Haylett, Hiss, Bardien & Ekpo, 2018; Al-Dhabi, Arasu, Park & Park, 2015; Rashmi & Negi, 2020; Malik et al., 2019). Вони також є важливими компонентами системи адаптації рослин до несприятливих факторів середовища (Baskar, Venkatesh & Ramalingam, 2018; Mathesius, 2018; Hasanuzzaman et al., 2020; Sahu et al., 2022). Кількісний та якісний склад фенольних сполук можуть впливати на пристосованість рослин до біотичних та абіотичних стресових чинників середовища та на виживання в несприятливих умовах (Sharma, Jha, Dubey & Pessarakli, 2012; Das & Roychoudhury, 2014). Така позитивна роль поліфенолів пов'язана з їх участю у регулюванні діяльності різних ферментів, клітинних циклів, збереженості цілісності ДНК і білків, а також в перекисному окисленні ліпідів (Shomali et al., 2022). Також важливим є той факт, що біологічні активності кожної окремо взятої фенольної кислоти є відмінними, а тому для можливих препаратів краще отримати комплекс цих сполук, які матимуть синергійний ефект, а не одну сполуку у великій кількості.

3.1.6. Визначення біологічної активності екстрактів з «бородатих» коренів

3.1.6.1. Протизапальна активність

Наявність протизапальної активності визначали за інгібуванням ферменту соєвої 15-ліпоксигенази (15-LOX). Ліпоксигенази – це ферменти, присутні в

клітинах як рослин, так і тварин. Вони каталізують окислення поліненасичених жирних кислот, які входять до складу ліпідів і ліпопротеїнів. Ліпоксигенази відіграють важливу роль у біосинтезі медіаторів захворювань людини, таких як запалення різного генезу, астма, алергія, артрит, псоріаз. 15-Ліпоксигенази беруть участь у патогенезі запалення, атеросклерозу, раку, гломерулонефриту, остеопорозу тощо (Leuti, Fava & Maccarrone, 2023; Mohamed & Sullivan, 2023; Kianfar et al., 2023; Mashima & Okuyama, 2015; Wisastra & Dekker, 2014). Тому інгібітори 15-LOX можуть бути використані як компоненти препаратів для лікування комплексних захворювань, що супроводжуються запаленням (Rao et al., 2023; Lavrentaki et al., 2023; Noti, Pontiki & Hadjipavlou-Litina, 2023; AlFadly et al., 2019).

Дослідження протизапальної активності екстракту (від 25 до 100 мкМ РЕ) полину Тілесіуса показало, що екстракт мав таку активність, адже екстракт в усіх використаних концентраціях інгібував 15-ліпоксигеназу, і ця реакція була дозозалежною (Рис. 3.12). Дійсно, етанольний екстракт із вмістом флавоноїдів у 100 мкМ РЕ активніше інгібував стаціонарну швидкість реакції для кожної концентрації субстрату, ніж екстракт з вмістом флавоноїдів 25 мкМ РЕ. Було досліджено також кінетику реакції. Для цього було побудовано графік Лайнвівера-Берка в обернених координатах, адже він дозволяє знайти максимальну швидкість реакції та константу Міхаеліса використовуючи наступну формулу:

$$1/V_{st} = K_m/V_{max} \cdot 1/(S) + 1/V_{max} \quad (3.1)$$

Було визначено, що максимальна швидкість реакції у контролі становила $0.31 \text{ мкМ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$, а у екстрактах від 0.27 до $0.31 \text{ мкМ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$, тобто практично не змінилася. У той же час значення константи Міхаеліса значно збільшилось: у контролю цей показник становив 98.64 , а у екстрактах від 452.2 до 1020 . Модель конкурентного інгібування повністю задовольняє такі результати, адже за такої моделі максимальна швидкість реакції після додавання інгібітора майже не змінюється, а значення константи Міхаеліса зростає.

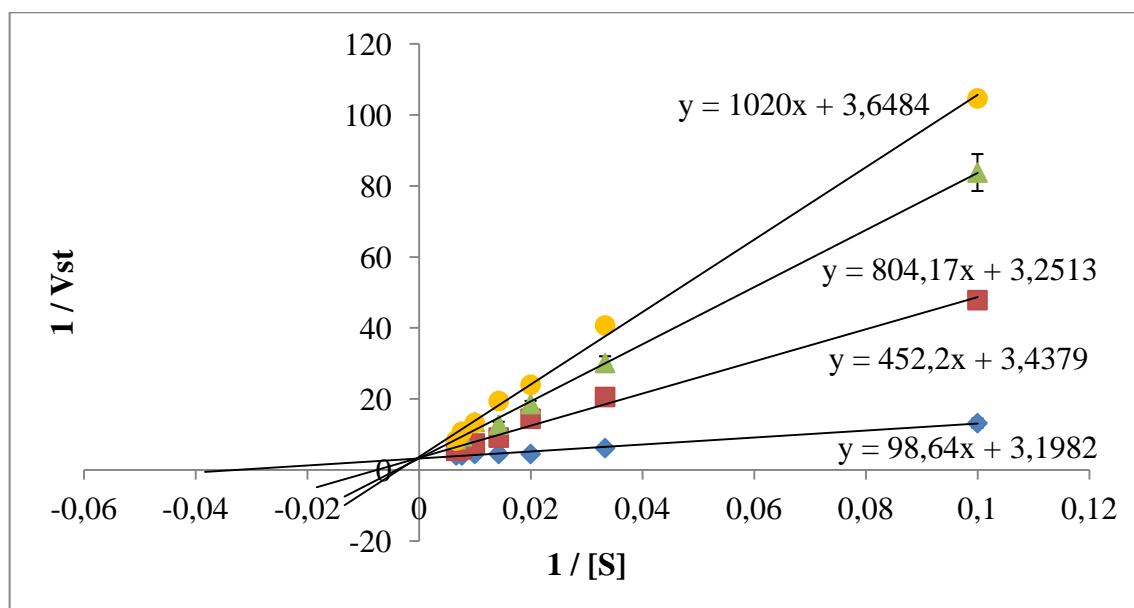


Рисунок 3.12. Кінетика дозозалежного інгібування активності соєвої 15-ліпоксигенази екстрактом «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* в обернених координатах рівняння Лайнвівера-Берка: сині маркери – контроль, червоні – з додаванням 25 мкМ РЕ екстракту, зелені – 50 мкМ РЕ екстракту, жовті – 100 мкМ РЕ екстракту

Раніше було встановлено, що різні класи сполук, які синтезуються рослинами, зокрема поліфеноли, мають здатність пригнічувати активність ліпоксигенази (Yahfoufi, Alsadi, Jambi & Matar, 2018; Saleem et al., 2023; Mukhopadhyay, Shukla, Makhal & Kaki, 2023; Sharif et al., 2023; Rafey et al., 2022). Тому пошук нових інгібіторів 15-LOX рослинного походження представляє великий практичний інтерес. У цьому напрямку проводяться дослідження щодо можливості використання флавоноїдів, які можуть бути перспективними для розробки нових препаратів для лікування запальних процесів (Ortega, Parmar, Golczak & Jastrzebska, 2021; Sychrová, Škovranová, Čulenová & Bittner Fialová, 2022; Pei, Zou, Zhou & Wang, 2023). Наприклад, фенольні та фенолокислотні фракції екстракту *Lithraea caustica* показали інгібуючу дію проти 15-LOX (Muñoz-Ramírez, Mascayano-Collado, Barriga, Echeverría & Urzúa, 2020). Такий же ефект мали і флавоноїди, виділені з листя та плодів банану загостреного (Oresanya et al., 2020). Було виявлено, що деякі

рослини роду *Artemisia* синтезують сполуки з протизапальною дією. Наприклад, була вивчена така активність етанольного екстракту листя *A. montana*. Автори (Jeong, Kim & Min, 2018) досліджували значне зниження експресії індукцибельної синтази оксиду азоту та циклооксигенази-2 та зниження NO та простагландину E2, пригнічення продукції фактора некрозу пухлини- α та інтерлейкіну-6. Також було показано, що флавоноїди *A. asiatica* виявляють значну протизапальну, протипухлинну та антимікробну дію (Ahuja, Yi, Kim & Cho, 2018; Park et al., 2008). Іншими полинами, у яких виявлено протизапальну активність, є *A. mongolica* (Wang, Liu, Zhu, Aisa & Xin, 2024), *A. argyi*, *A. princeps* та *A. montana* (Zhang et al., 2023; Yu, Huang & Du, 2023). Результати наших досліджень свідчать про наявність протизапальної активності у екстрактів з «бородатих» коренів полину, причому така активність виявилась дозозалежною. Ці результати можуть бути використані у подальшому для розроблення нових засобів рослинного походження для лікування запальних процесів (Богданович, Матвєєва, 2023d).

3.1.6.2. Протівірусна активність

Для аналізу протівірусної активності досліджували вплив екстрактів «бородатих» коренів *A. tilesii* на репродукцію вірусу грипу H1N1. Визначали цитотоксичну концентрацію екстракту (CC₅₀), ефективну концентрацію (EC₅₀), їх співвідношення (індекс селективності, IS) та інгібування інфекційного титру (Bohdanovych, Starosyla, Rybalko, Kobylinska & Matvieieva, 2022). Визначення протівірусної активності екстрактів «бородатих» коренів є доцільним та актуальним, адже рослинні екстракти відомі як джерела сполук, в тому числі поліфенолів, з протівірусною дією (Matvieieva & Bohdanovych, 2022; Wang et al., 2023c; Pennisi et al., 2023; Kaul et al., 2021; Hamdani, Bouchentouf & Allali, 2023; El-Nashar, Eldahshan, Fattah, Loutfy & Abdel-Salam, 2023).

Аналіз представлених результатів досліджень стосовно цитотоксичної дії досліджуваних екстрактів (Рис. 3.13, А) показав, що зразки були малотоксичні для

культур клітин СНЕВ (культура клітин нирки ембріона свині). Цитотоксична концентрація екстракту (CC_{50}) № 1 становила 1:30 (клітини виживали за такої концентрації), екстракту № 2 – 1:5 (найменш токсичний), а контролю – 1:2560 (найбільш токсичний, навіть при великому розведенні). На таку різницю між екстрактом № 1 та № 2 можуть впливати два параметри: розчинник та вміст флавоноїдів, адже ці два параметри відрізнялись у екстрактах. Екстракт № 1 – це свіжоприготований етанольний (70%) екстракт «бородатих» коренів полину, а екстракт № 2 – перерозчинений у ДМСО ліофілізований сухий осад екстракту № 1, і вміст флавоноїдів у другому екстракті був у 14 разів вищим, ніж у першому екстракті. Тобто, екстракт № 1 містив етанол і мав меншу кількість флавоноїдів, а екстракт № 2 містив ДМСО і мав більшу кількість флавоноїдів. Оскільки CC_{50} була значно меншою у екстракта №2, це означає, що екстракт №2 був менш токсичним з двох. Таким чином, вірогідно, що високий вміст флавоноїдів не викликає токсичного ефекту на культури клітин.

Згідно результатів, наведених на Рис. 3.13, Б, обидва екстракти ефективно інгібували репродукцію вірусу грипу. Разом з тим, ефективність екстракту № 2 була значно вищою. Початкова концентрація вірусу (до додавання екстрактів) становила 10 $lgID_{50}$. Через 3 доби кокультивування моношару клітин нирки собаки Madin-Darby (MDCK), вірусу та екстрактів різного розведення, інфекційний титр в усіх лунках з екстрактом №2 був меншим: від 0 (повне інгібування) до 5 $lgID_{50}$ (при великих розведеннях екстракту). У лунках з екстрактом №1 не було досягнуто повного інгібування при жодній концентрації екстракту, а мінімальне значення інфекційного титру становило 3 $lgID_{50}$. EC_{50} екстракту №1 становила 1:400, а екстракту №2 – 1:600.

Індекс селективності екстракту №1 становив 13.33, а екстракту №2 – 120. Таким чином, для подальшого вивчення та можливого впровадження в якості складових препаратів для лікування більш ефективним для вірусу грипу був екстракт 2, що характеризувався значно більшим вмістом флавоноїдів. Ці поліфеноли є потужними антиоксидантами, які можуть нейтралізувати активні форми кисню в клітинах і є противірусними агентами.

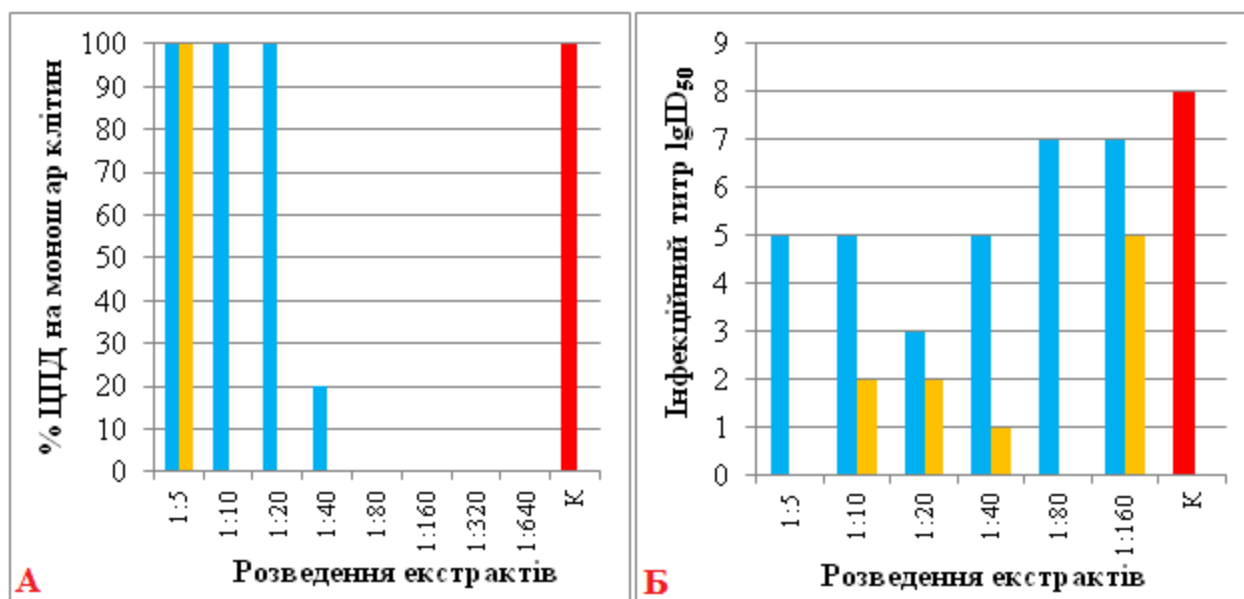


Рисунок 3.13. А – Цитотоксична дія різних розведень екстрактів «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* на клітини СНЕВ (культура клітин нирки ембріона свині); Б – вплив екстрактів на репродукцію вірусу грипу; сині стовпчики – первинний екстракт (супернатант), жовті – перерозчинений ліофілізований екстракт з більшим вмістом флавоноїдів, червоні – контроль (фосфатний буфер ph 7.5 + PMSF сахароза + SDS)

Роль флавоноїдів як сполук з активністю проти вірусу грипу відома в літературі (Tang et al., 2024; Morimoto & Isegawa, 2023; Kanazawa, Morimoto, Horio, Sumitani & Isegawa, 2022; Chen et al., 2020). Більше того, можливо порівняти результати проведеної роботи (а саме індекси селективності екстрактів) з роботами інших дослідників. Наприклад, Stannard, Koszalka, Deshpande, Desjardins & Baz (2023) досліджували поліфеноли зеленого чаю як можливі противірусні агенти. В результаті було встановлено, що індекси селективності епігалокатехін-3-галлату, виділеного з цієї рослини, становили 77 та 96 проти вірусів A/California/07/2009 та A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09 вірусу грипу, відповідно. Інші дослідники (Li et al., 2019) проводили експерименти з поліфенол-пентациклічними тритерпеновими кон'югатами та вірусами грипу. У результаті проведеної роботи було встановлено, що ці

кон'югати мали селективний індекс більше 17.2 і міцно зв'язувалися з гемаглютиніном вірусної оболонки, таким чином блокуючи інвазію вірусів грипу в клітини господаря.

Таким чином, результати дослідження вказують на перспективність використання отриманих нами екстрактів «бородатих» коренів та флавоноїдовмісних комплексів, отриманих з їх екстрактів, як основи для можливих протівірусних препаратів.

3.1.6.3. Відновлювальна активність

Як зазначалося вище, «бородаті» корені можуть бути цінними не тільки через високі антиоксидантну та протизапальну активності, а й завдяки відновлювальній здатності. Більшість методів оцінки цього параметра засновані на здатності рослинних екстрактів відновлювати радикали і метали (Sharma & Vig, 2013; Wong et al., 2014; Mbida et al., 2022; Kebert et al., 2022; Mandal, Sarkar & Chakraborty, 2022). Аналізи з використанням DPPH (ДФПГ, 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил), ABTS (АБТС, 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота)) та NO (монооксидазоту) є найбільш поширеними серед першої групи, а FRAP (ferric reducing antioxidant power), FTC (ferric thiocyanate, тіоціанат заліза) та CUPRAC (cupric ions reducing assay) – серед другої. Водночас такі реакції з металами, пов'язані з відновною активністю рослинних екстрактів, можна використовувати і для так званого «зеленого» синтезу наночасток. Наприклад, можна ініціювати утворення наночасток срібла (AgNPs, НЧ) шляхом відновлення Ag^+ до Ag^0 за допомогою екстрактів «бородатих» коренів завдяки наявності флавоноїдів, які характеризуються високою відновною активністю.

Отримання AgNPs представляє інтерес не тільки як метод і оцінка рівня відновної здатності, а й як самостійний біотехнологічний процес створення продукту (наночасток), який може знайти широке практичне застосування завдяки протипухлинній, антибактеріальній, антиоксидантній, протизапальній та антигіперглікемічній активності (Abdelhameed et al., 2022; Wei, Xu, Jia &

Zhang, 2022; Yousaf et al., 2022; Mostafa Abdalhamed et al., 2022; Fierascu et al., 2022; Alsareii et al., 2022; Ahmed et al., 2022). Використання та переваги таких «зелених» наночасток срібла, цинку, золота, платини, нікелю, алюмінію та заліза широко досліджуються (Naiel, Fawzy, Halmy & Mahmoud, 2022; Dehghani, Mosleh-Shirazi, Shafiee, Kasaei & Amani, 2022; Sharma et al., 2022; Mikhailova, 2022; Tymoszuk et al., 2022; Sampath et al., 2022).

Представляє як фундаментальний, так і практичний інтерес визначення зв'язку між вмістом флавоноїдів, відомих як хімічних речовин з відновною активністю, та характеристиками наночастинок срібла, зокрема, за динамікою змін ультрафіолетового/видимого спектра (UV/Vis) та їх морфологічної характеристики. Наночастки срібла мають специфічні оптичні властивості, які залежать від розміру, форми, концентрації та стану агломерації. Використання цих спектрів можливе, оскільки наночастки срібла характеризуються наявністю специфічного піку в діапазоні приблизно 420 ... 440 нм. Це робить спектроскопію UV/Vis інструментом для вивчення різних колоїдних розчинів AgNPs (Alim-Al-Razy, Asik Bayazid, Rahman, Bosu & Shamma, 2020).

Метою нашої роботи було вивчення морфології та характеристик AgNPs, отриманих із використанням екстрактів «бородатих» коренів *A. tilesii*, які суттєво відрізняються за вмістом флавоноїдів. Завдяки відновній активності флавоноїдів таке порівняння дає можливість відносно оцінити відновну здатність екстрактів без проведення специфічних реакцій з одночасним утворенням наночасток срібла.

Концентрація флавоноїдів в екстрактах, отриманих з використанням різних ліній «бородатих» коренів, варіювала від 4.01 ± 0.39 до 15.37 ± 1.08 мг РЕ / г ВМ (Рис. 3.14). Отже, чотири лінії коренів суттєво відрізнялися за загальним вмістом флавоноїдів. Такі відмінності корелювали з візуальними результатами утворення AgNPs у зразках. Процес утворення наночасток зазвичай характеризується зміною кольору розчину – від прозорого і безбарвного до жовто-коричневого, причому ступінь інтенсивності забарвлення відповідає кількості утворених наночасток (Kobylynska et al., 2020). Як виявилось, більший вміст флавоноїдів у зразку був пов'язаний з більш глибоким забарвленням колоїдних

розчинів від світло- до темно-коричневого (Рис. 3.15) (Bohdanovych & Matvieieva, 2022; Bohdanovych & Matvieieva, 2023a). Крім того, поява забарвлення відбувалася дуже швидко, відразу після додавання екстрактів «бородатих» коренів до розчину AgNO_3 (Рис. 3.15, Б), ще до обробки зразків у гарячій водяній бані. Після нагрівання сумішей спостерігали значне збільшення інтенсивності забарвлення усіх зразків (Рис. 3.15, В), тому для аналізу UV/Vis спектрів необхідно було вдаватися до розведення отриманих розчинів НЧ. Зразки №№ 2 і 4 розводили у співвідношенні 1:4, а зразок № 10 – 1:2 деіонізованою водою.

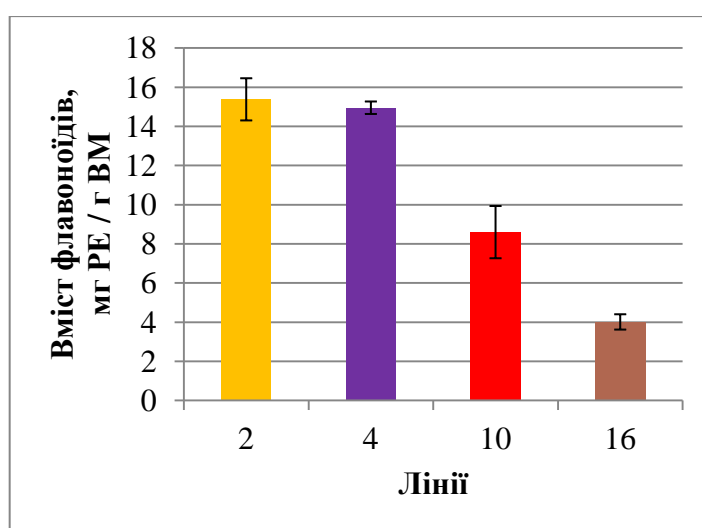


Рисунок 3.14. Вміст флавоноїдів в екстрактах «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: 2, 4, 10, 16 – лінії «бородатих» коренів



Рисунок 3.15. Формування наночасток срібла: зразки до додання екстрактів «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* до розчину AgNO_3 (А), одразу після додавання екстрактів (Б), та після витримування розчинів протягом 1 години при 80°C (В). Зліва направо: розчин порівняння (AgNO_3), зразки з екстрактом ліній №№ 2, 4, 10, 16

UV/vis спектри цих зразків були записані відразу після ініціації НЧ, через п'ять і дев'ять діб (Рис. 3.16). Як видно з рисунків, криві поглинання різко зростали з плином часу, переважно з 0 до 5 доби. У цей період значення абсорбції при $\lambda = 370 \dots 500$ нм зросло майже вдвічі. Пік поглинання всіх зразків залишався на $\lambda \approx 440$ нм. Наявність такого піку є доказом того, що AgNPs були присутні в аналізованих розчинах.

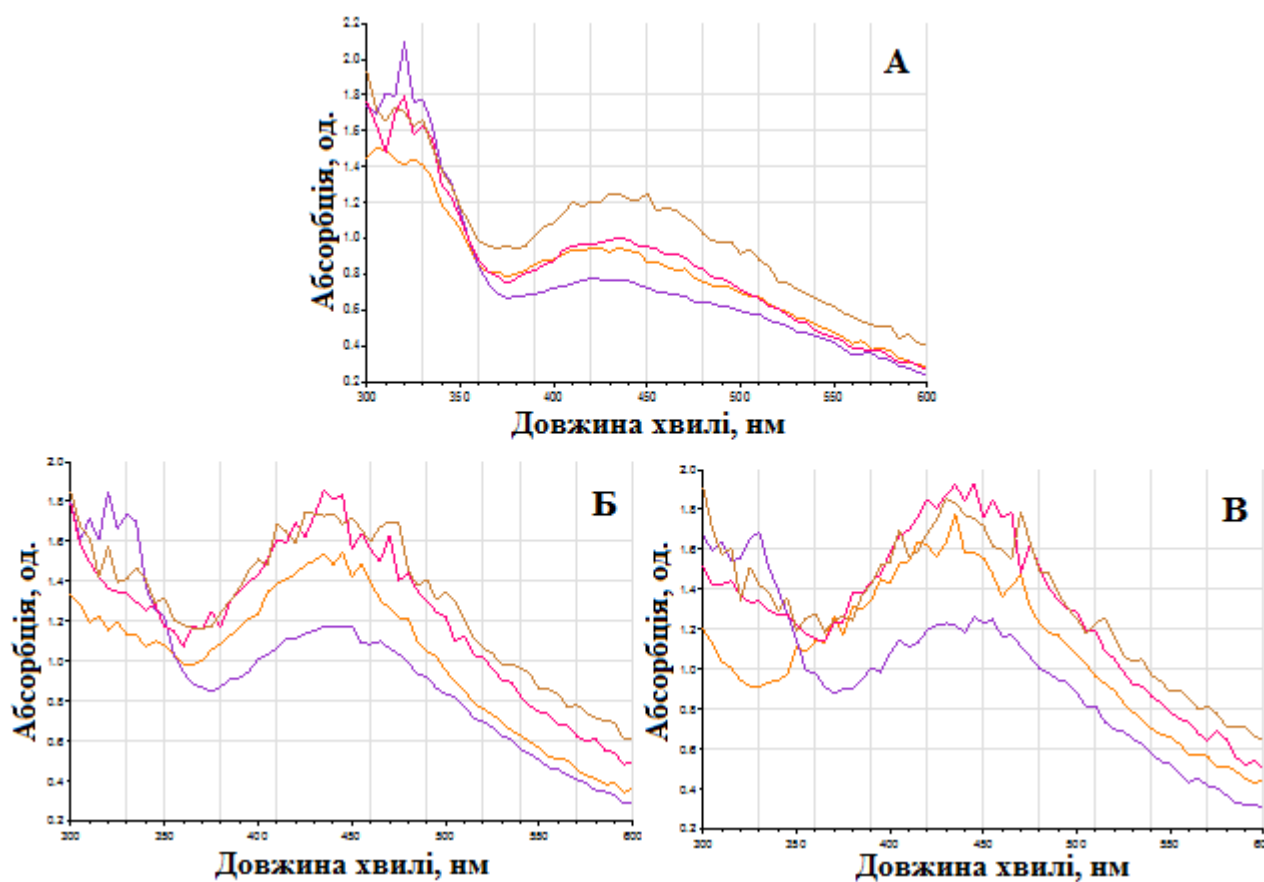


Рисунок 3.16. UV/vis спектри колоїдних розчинів наночастинок срібла, отриманих «зеленим» синтезом з використанням екстрактів «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* одразу після формування наночастинок срібла (А), через 5 діб (Б), та через 9 діб (В): жовті спектри – лінія № 2 (розведення колоїдного розчину 1:4); фіолетові – лінія № 4 (1:4); червоні – лінія № 10 (1:2); коричневі – лінія № 16 (без розведення)

Додатково досліджували кореляцію цих піків поглинання з вмістом флавоноїдів, щоб краще проаналізувати динаміку змін, які відбуваються під час

короткочасного зберігання розчинів. Піки поглинання в кожній часовій точці проведення спектроскопічного аналізу повністю корелювали з вмістом флавоноїдів в екстрактах (Рис. 3. 17). Кореляція дещо змінювалася з часом, а коефіцієнт детермінації залишався в достовірному діапазоні ($R^2 = 0.9223 \dots 0.8815$). Крім того, як видно зі спектрів, більший приріст поглинання спостерігався з 0 доби до 5 доби (до 81%) і майже не змінювався з 5 доби до 9 доби. Такі особливості свідчать про те, що процес утворення AgNPs не відбувався миттєво, а тривав переважно протягом п'яти днів.

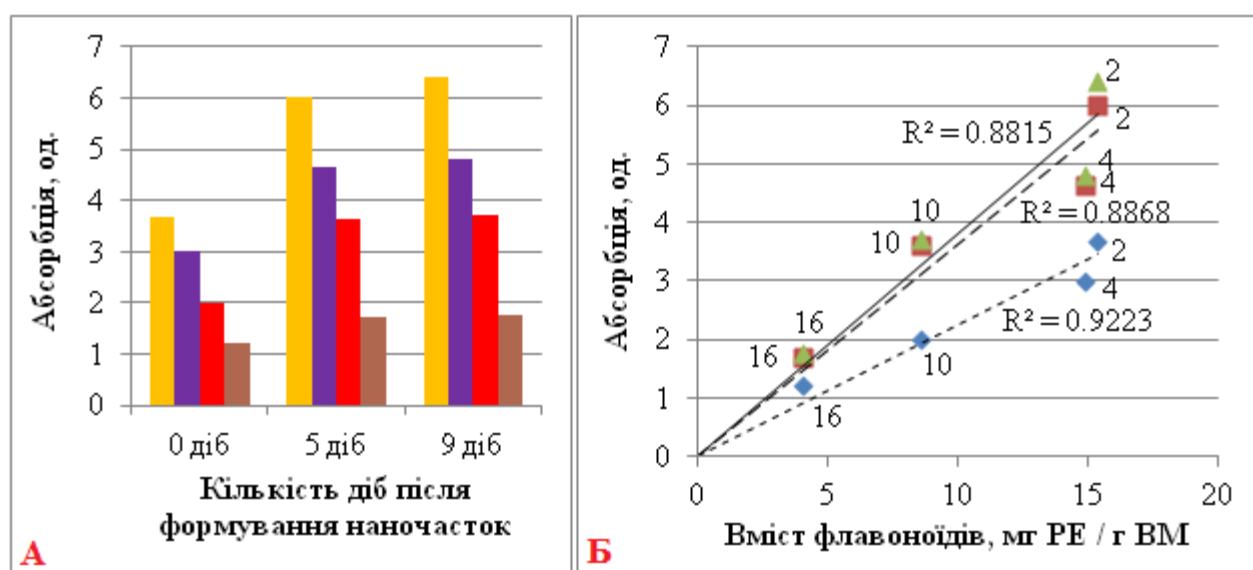


Рисунок 3.17. А – Зміни у абсорбції (при довжині хвилі 440 нм) колоїдних розчинів наночастинок срібла без розведення: жовті стовпчики – екстракт лінії № 2 «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*; фіолетові – лінія № 4; червоні – лінія № 10; коричневі – лінія № 16; Б – Кореляція між вмістом флавоноїдів та піком абсорбції (при довжині хвилі 440 нм) у колоїдних розчинах наночастинок срібла без розведення: 2, 4, 10, 16 – лінії «бородатих» коренів; сині маркери – одразу після формування наночастинок срібла, червоні – через 5 діб, зелені – через 9 діб

Величина приросту поглинання повністю корелювала також із вмістом флавоноїдів: значне збільшення відповідало високому вмісту флавоноїдів в

екстрактах. При цьому, чим вищим був вміст флавоноїдів, тим більше зростало поглинання з 0 до 5 дня та з 5 до 9 дня. Наприклад, найвищий вміст флавоноїдів був у лінії № 2 (15.37 ± 1.08 мг РЕ / г ВМ). Пікове поглинання колоїдного розчину ($\lambda = 440$ нм) на нульовий день (одразу після формування НЧ) становило 3.68 од., за п'ять днів воно зросло на 2.32 од., а за дев'ять днів – на 0.4 од. Водночас найменший вміст флавоноїдів був у лінії № 16 (4.01 ± 0.39 мг РЕ / г ВМ). Пікове поглинання колоїдного розчину в 0 добу становило 1.21 од., за п'ять і дев'ять днів воно зросло лише на 0.51 і 0.07 од. відповідно.

Окрім проведення аналізу UV/Vis спектрів, також проводили аналіз наночасток за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) (Рис. 3.18). Проведений ТЕМ-аналіз підтвердив наявність наночасток срібла і деякі відмінності в їх розмірах (Bohdanovych, Klymchuk & Matvieieva, 2023). Наночастки всіх зразків мали досить неоднорідну еліпсоїдну або бочкоподібну форму. Тому були виміряні площі перерізів, розраховані умовні діаметри та представлені на гістограмах розподілу.

Діаметри AgNPs різних зразків були між 2.86...45.42 нм, а діапазон розподілу значень у всіх чотирьох зразків був майже однаковим (Рис. 3.19). Проте зразки відрізнялися кількісним розподілом наночасток за їх розмірами (діаметрами). Зокрема, у зразку № 2 найбільша кількість наночасток мала розмір 5 ... 10 нм, хоча в цілому розмір більшості наночасток коливався від 2.8 до 30 нм. Більшість наночасток із зразка № 4 мали розміри від 5 до 20 нм, при цьому значного домінування наночастинок певного розміру не спостерігалось. Зразок № 16 відрізнявся від інших тим, що 61.4% усіх наночасток мали розмір 5 ... 10 нм. Водночас цей зразок був отриманий з використанням екстракту лінії № 16, який мав найменший вміст флавоноїдів. Тому, можливо, розкид значень пов'язаний з відновною активністю екстрактів та вмістом у них поліфенольних сполук. Дійсно, у зразках, отриманих з використанням екстрактів ліній №№ 2, 4 та 10 була значно більша кількість наночасток великого розміру, що було помітно на ТЕМ-фотографіях. Такий результат можна пояснити тим, що, можливо, в зразках, де екстракти мали більший вміст сполук з відновною

активністю, утворилась велика кількість наночастинок малого розміру, однак відбувався процес агрегації. Такі великі відмінності серед зразків можуть представляти інтерес для вивчення не тільки різноманіття хімічних складів різних екстрактів, а і дослідження хімічного складу поверхневого (стабілізуючого) шару наночастинок різних зразків. Таке дослідження було б цікавим для пояснення ефекту наявності або відсутності агрегації частинок та кореляції цього процесу і вмісту поліфенолів у зразках, що є важливим для практичного використання наночастинок, отриманих з різних ліній «бородатих» коренів.

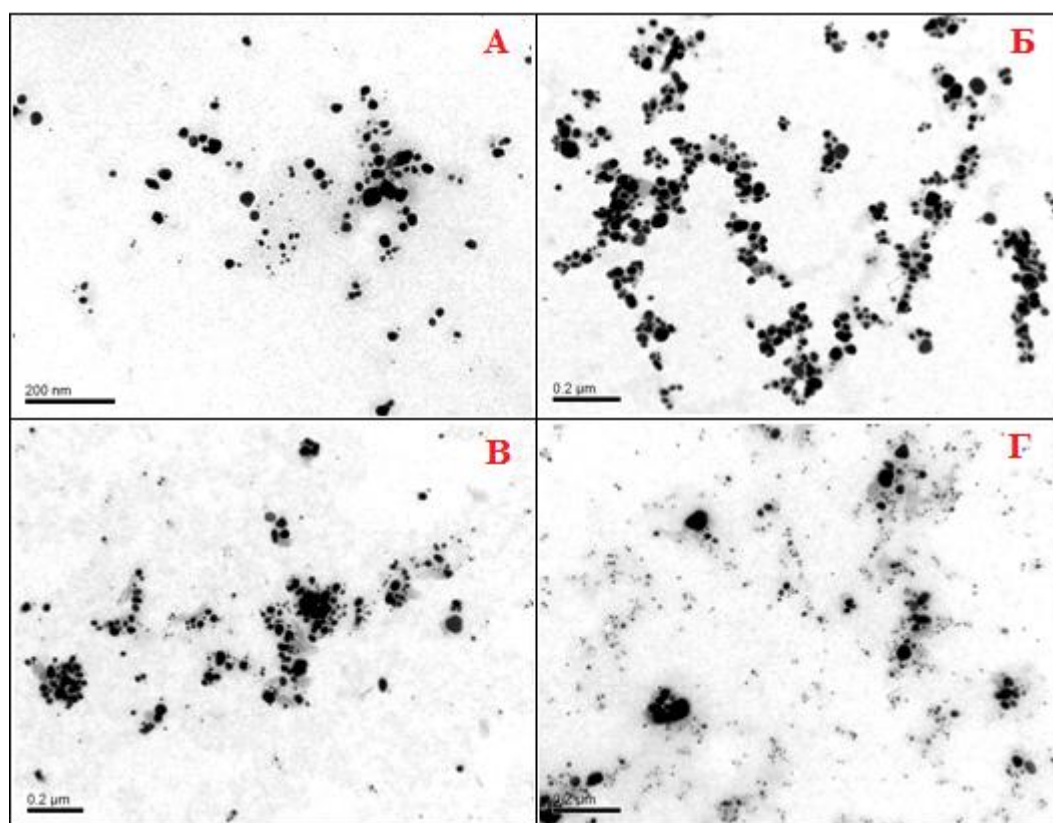


Рисунок 3.18. Мікрофотографії TEM візуалізації наночастинок срібла, отриманих з використанням «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: лінії №№ 2 (А), 4 (Б), 10 (В) та 16 (Г)

Значну варіативність у вмісті флавоноїдів та відновлювальній активності екстрактів можна пояснити активацією вторинного метаболізму перенесеними *rol* генами та їх невизначеним місцем інкорпорації в геном рослини (Zhu et al.,

2013; Ono & Tian, 2011). Аналіз компонентів екстрактів полину Тілесіуса (Kobylińska et al., 2020) виявив значну концентрацію поліфенольних сполук, зокрема, флавоноїдів. Зокрема, було виявлено такі сполуки як апігенін, кверцетин, кемпферол, лутеолін і рутин. Більш високий вміст таких флавоноїдів у рослинних клітинах корисний для рослини, оскільки поліфенольні сполуки мають відновні властивості, таким чином допомагаючи протистояти окислювальному стресу (He, He, Farrar, Ji, Liu & Ma, 2017). Водночас, як показали наші дослідження, етанольні екстракти коренів цих рослин можуть бути ефективно використані для отримання наночасток срібла, ймовірно, завдяки високому вмісту флавоноїдів з відновною активністю.

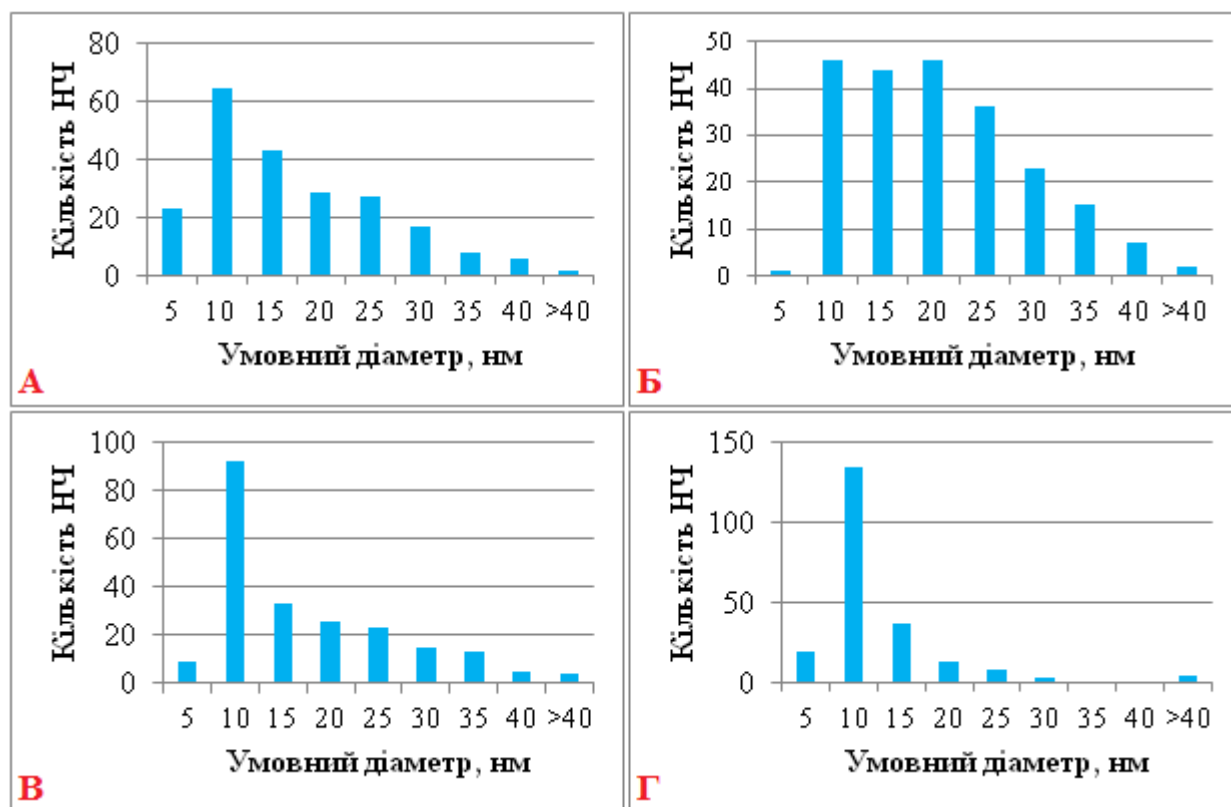


Рисунок 3.19. Розподіл значень умовного діаметру наночасток срібла, отриманих з використанням «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*: лінії №№ 2 (А), 4 (Б), 10 (В) та 16 (Г)

Раніше відомі роботи з утворення наночастинок срібла в таких рослинах роду *Artemisia*, як *A. absinthium* (Viršilė et al., 2022), *A. arborescens* (Bordoni et al.,

2021), *A. vulgaris* (Rasheed, Bilal, Iqbal & Li, 2017), *A. turcomanica* (Mousavi, Tafvizi & Zaker Bostanabad, 2018), *A. sieberi* (Ali & Abdallah, 2021), *A. afra* (Elemike, Onwudiwe, Ekennia & Jordaan, 2018), *A. capillaris* (Park et al., 2012b), *A. scoporia* (Moulavi et al., 2019), *A. marschalliana* (Salehi et al., 2016), *A. haussknechtii* (Alavi & Karimi, 2018), *A. annua* (Aghajanyan, Gabrielyan, Schubert & Trchounian, 2020), та *A. tilesii* (Kobylińska et al., 2020). Однак ці дослідження були зосереджені на характеристиці наночастинок, а саме на їх концентрації та розподілі за розміром, а також на антиоксидантному та відновлювальному потенціалі отриманих наночастинок для майбутнього біомедичного застосування. Метою нашого дослідження було не тільки вивчити характеристики НЧ та UV/vis спектри колоїдних розчинів, отриманих з використанням різних екстрактів «бородатих» коренів полину, але й порівняти ці спектри з вмістом флавоноїдів у цих екстрактах як сполук із відновною активністю. Ймовірно, таке порівняння дозволяє провести порівняльну оцінку відновної здатності екстрактів без проведення специфічних реакцій. Результати дослідження свідчать про те, що зміну кольору реакційної суміші можна виявити практично після ініціації окисно-відновної реакції при додаванні етанольного екстракту «бородатих» коренів до розчину нітрату срібла. Ці зміни, а також дані спектрального аналізу можуть бути використані як індикатор відновної активності через їх кореляцію із загальним вмістом флавоноїдів. Слід зазначити, що раніше (Bohdanovych et al., 2021) було виявлено сильну кореляцію між вмістом флавоноїдів і відновною здатністю екстрактів з «бородатих» коренів рослин різних видів. Зокрема, як показали наші дослідження, при відновленні Ag^+ до Ag^0 видно, що реакція протікає швидше і колоїдний розчин стає темнішим у зразках із вищим вмістом флавоноїдів (лінії №№ 2 і 4). Такий результат відповідає антиоксидантній та відновній природі флавоноїдів та інших поліфенольних сполук, екстрагованих етанолом. Дійсно, було оцінено та підтверджено відновну здатність флаванолів, флаванолів, флавонолів і флавонолів (Dutta, Mahapatra, Ghosh & Basu, 2022; Wu et al., 2022; Zheng, Chen, Deng & Guo, 2018). Отримані нами UV/vis спектри (Рис. 3.16) досліджуваних зразків підтвердили таку кореляцію. Більш високе

поглинання в діапазоні 370 ... 500 нм пов'язане з вмістом флавоноїдів. Це співвідношення залишалося незмінним навіть після збільшення поглинання через п'ять і дев'ять днів після утворення наночасток. Збільшення поглинання з часом свідчить про збільшення вмісту AgNPs у розчині та може бути наслідком подальшого протікання окисно-відновної реакції. Цей ефект може означати пролонговану дію відновлювальної активності екстрактів «бородатих» коренів і призвести до подальшої стабілізації колоїдного розчину. Збільшення поглинання було пропорційним вмісту флавоноїдів. Це свідчить про те, що процес отримання розчину колоїдного срібла фактично може бути використаний як порівняльна оцінка відновної здатності екстрактів, доданих до розчину AgNO_3 . Крім того, аналіз можливо проводити відразу після ініціації AgNPs або після деякого зберігання, адже кореляція піку поглинання з вмістом відновлювальних сполук практично не змінилася з часом. Той факт, що пік поглинання всіх зразків залишався на рівні близько 440 нм, дозволяє визначити результат реакції, виконуючи лише одне спектрофотометричне вимірювання, коли не є можливим отримання повних UV/vis спектрів. Таке можливе застосування базується на раніше встановленому діапазоні піку поглинання колоїдного розчину наночасток срібла (410 ... 460 нм) (Wei, Xu, Jia & Zhang, 2022; Fierascu et al., 2022; Alsareii et al., 2022), та підтверджену у дослідженнях наночасток срібла, синтезованих з використанням екстрактів полину (Kobylynska et al., 2020; Ali & Abdallah, 2021; Elemike, Onwudiwe, Ekennia & Jordaan, 2018; Salehi et al., 2016).

Отже, характеристики (UV/vis спектри) наночасток срібла, отримані з використанням екстрактів «бородатих» коренів *A. tilesii*, корелювали із загальним вмістом флавоноїдів у зразках. Встановлено залежність інтенсивності поглинання в області 440 нм від вмісту флавоноїдів у екстрактах, використаних для отримання наночасток. Оскільки флавоноїди мають відновну активність, для оцінки відмінності у відновній здатності рослинних екстрактів можна використовувати спектрофотометричний аналіз розчину наночасток срібла при 410 ... 460 нм, отриманих після додавання досліджуваних екстрактів до розчину нітрату срібла. Такий спосіб виявляється досить простим і зручним.

3.1.7. Висновки до підрозділу 3.1

Результати проведення скринінгу двох груп «бородатих» коренів (отриманих шляхом генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* дикого штаму A4 та ліній з гетерологічними генами *ifn-α2b* та *nptII*) показали наявність відмінностей фізіологічних, біохімічних, морфологічних характеристик коренів різних ліній, однак відсутність специфічних рис, притаманних кореням тільки однієї групи.

Генетична трансформація привела до появи варіабельності вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності, вмісту пероксиду водню, активності супероксиддисмутази та каталази. Така варіабельність виявлена як у зразках коренів, трансформованих диким штамом, та і у зразках коренів, які мали гетерологічні гени *ifn-α2b* та *nptII*. Таким чином, відмінності (збільшення або зменшення параметрів) зумовлено, вірогідно, перенесенням до геному рослин саме *rol* генів *A. rhizogenes*.

Генетична трансформація спричинила підвищення вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності, а також активності супероксиддисмутази у всіх зразках «бородатих» коренів порівняно з цими показниками у коренях контрольних рослин, причому було показано наявність кореляції між вмістом флавоноїдів, антиоксидантною та відновлювальною активностями.

Трансформація впливала на ряд морфологічних та фізіологічних параметрів: забарвлення, структура та швидкість росту коренів різних ліній значно відрізнялись, причому специфічні ознаки – здатність рости на середовищі без регуляторів росту та негативний геотропізм – зберігались в усіх досліджуваних лініях.

У «бородатих» коренях активність *rolB* та *rolC* генів корелювала зі швидкістю росту: в усіх лініях більший приріст маси спостерігався у зразках з більшою активністю *rolB* та *rolC*. Разом з тим, рівень активності фенілаланін-амоній-ліази обернено співвідносився з вмістом флавоноїдів в усіх дослідних

лініях: чим вищим був вміст, тим меншою була активність *PAL*. Значимих відмінностей у відносних активностях генів *rolB*, *rolC*, *PAL* та *CHS* між двома групами ліній «бородатих» коренів не відзначалося.

Генетична трансформація привела до ряду змін вторинного метаболізму, зокрема вмісту фенольних кислот у порівнянні з контрольними коренями. Хінна та 4-гідроксифенілоцтова кислоти були ідентифіковані лише у контролі і відсутні в усіх лініях «бородатих» коренів. Разом з тим, транс-корична кислота синтезувалася в усіх лініях «бородатих» коренів і була відсутня у контролі. Отримані після трансформації лінії мали не тільки відмінний якісний, а і кількісний склад фенольних кислот. Одна лінія (№ 15) мала більший вміст одразу шести фенольних кислот у порівнянні з контрольним зразком. Таким чином, було отримано зразки зі значно більшою кількістю окремих фенольних кислот, їх значною варіабельністю та наявністю сполук, відсутніх у контролі.

Екстракти «бородатих» коренів проявляли дозозалежну протизапальну активність, а також активність проти вірусу грипу H1N1 (інгібуюча дія екстракту на проліферацію вірусу). Завдяки наявності відновної активності, екстракти «бородатих» коренів можуть бути використані для отримання наночасток срібла, причому вміст флавоноїдів у екстрактах корелював з висотою піку поглинання при спектрофотометрії на довжині хвилі 440 нм: чим вищим був вміст, тим вищим був пік абсорбції.

Результати даного розділу висвітлені у статтях в зарубіжних періодичних наукових виданнях (Bohdanovych et al., 2021; Matvieieva et al., 2022), статтях у фахових виданнях України (Bohdanovych, Morgun, Lakhneko, Shakhovsky & Matvieieva, 2022; Bohdanovych & Matvieieva, 2022), главі монографії (Matvieieva, & Bohdanovych, 2022), монографії (Matvieieva, Bohdanovych, & Duplij, 2023) та інших наукових працях (Bohdanovych & Matvieieva, 2020; Bohdanovych & Matvieieva, 2021; Bohdanovych, Starosyla, Rybalko, Kobylinska & Matvieieva, 2022; Богданович, Дуплій, Шаховський, Ратушняк, Матвєєва, 2023; Skorokhod, Bohdanovych & Matvieieva, 2023; Bohdanovych & Matvieieva, 2023a; Bohdanovych, Klymchuk & Matvieieva, 2023).

3.2. Вплив умов культивування на ріст «бородатих» коренів

3.2.1. Вплив фенілаланіну та освітлення на ріст «бородатих» коренів та синтез флавоноїдів

Усі поліфенольні сполуки вважаються метаболітами шикіматного шляху. Цей біосинтетичний шлях перетворює прості цукри з гліколізу та пентозофосфатного шляху у ароматичні амінокислоти – фенілаланін та тирозин. Далі з них синтезуються фенілпропаноїди, які є прекурсорами таких важливих вторинних метаболітів (ВМ), як флавоноїди, кумарини, таніни та лігніни. Також шикіматний шлях забезпечує синтез азотовмісних ВМ, таких як алкалоїди та глюкозинолати, і деяких фітогормонів, наприклад, β -індолилцукрової кислоти (гетероауксину) (Borrelli & Trono, 2016; Mohaddab et al., 2022). Тому концентрація фенілаланіну може впливати на біосинтез флавоноїдів. Наші дослідження були спрямовані на визначення впливу фенілаланіну на синтез флавоноїдів у «бородатих» коренях *A. tilesii*. Таке дослідження проводили з коренями, які вирощували у темряві та при освітленні, використовуючи освітлення як додатковий фактор, що може впливати на синтез флавоноїдів, оскільки зміна умов культивування може призвести до змін біосинтезу вторинних метаболітів, а при вирощуванні коренів важливим є визначення параметрів, необхідних для найкращого співвідношення накопичення біомаси та біосинтезу.

У коренях обох ліній (№№ 10 та 16), культивованих без фенілаланіну, приріст біомаси був більше під час росту у темряві. Такі корені були білими, подовженими і менш розгалуженими (Bohdanovych & Matvieieva, 2023b; Богданович, Матвєєва, 2022а; Богданович, Матвєєва, 2022b; Bohdanovych & Matvieieva, 2022b). Приріст маси коренів цих ліній, вирощених у темряві, у 2.33 і 3.94 раза (відповідно №№ 10 та 16) був більшим, ніж при освітленні (Рис. 3.20, А). При цьому вміст флавоноїдів був вищим у коренях, вирощених на світлі. Такі корені були зеленуватого кольору і сильно розгалужені. Вміст флавоноїдів

у етанольних екстрактах, отриманих із коренів ліній №№ 10 та 16, вирощених на світлі (Рис. 3.20, Б), становив 2.53 ± 0.28 та 5.45 ± 0.37 мг РЕ / г ВМ відповідно. У зразків, вирощених у темряві, значення були меншими: 2.3 та 4.74 мг РЕ / г ВМ відповідно. Таким чином, високий приріст біомаси корелює з низьким біосинтезом флавоноїдів і навпаки. Цей результат можна пояснити тим, що рослинні клітини мають обмежену кількість усіх необхідних попередників та енергії як для росту кореня, так і для накопичення вторинних метаболітів. Отже, оскільки біомаса коренів була вищою в темряві, швидкість їх росту була більшою, а активність біосинтезу флавоноїдів була нижчою. Відповідно, корені, вирощені на світлі, мали вищу біосинтетичну активність і накопичення флавоноїдів, однак швидкість їхнього росту була повільнішою.

Спостерігали різке пригнічення росту усіх зразків, вирощених на середовищі з додаванням 1 мМ фенілаланіну (PHE). Лінія № 10 краще переносила додавання PHE, і приріст маси становив 0.022 ± 0.014 і 0.008 ± 0.003 г на одну точку росту при вирощуванні на світлі та в темряві відповідно. Вміст флавоноїдів в спиртових екстрактах цих зразків був порівняним із вмістом у контрольному зразку (з освітленням, без фенілаланіну): 2.36 ± 0.17 (вирощені на світлі) та 1.84 ± 0.06 (вирощені в темряві) мг РЕ / г ВМ. Загальний вміст флавоноїдів у загальній масі зразків «бородатих» коренів був таким: 0.10 мг РЕ (0 мМ PHE на світлі) > 0.09 мг РЕ (0 мМ PHE у темряві) > 0.05 мг РЕ (1 мМ PHE на світлі) > 0.01 мг РЕ (1 мМ PHE у темряві). Такий результат ще раз підтвердив інгібуючу дію фенілаланіну у досить високій концентрації на ріст «бородатих» коренів *A. tilesii* та їх біосинтетичну активність. Крім того, було показано, що краще вирощувати «бородаті» корені полину саме з освітленням.

Лінія № 16 була більш чутливою до додавання PHE, ніж лінія № 10 (Рис. 3.20, А). Інгібування було настільки великим, що не вдалося отримати достатньо рослинного матеріалу для приготування екстрактів для дослідження накопичення флавоноїдів та антиоксидантної активності.

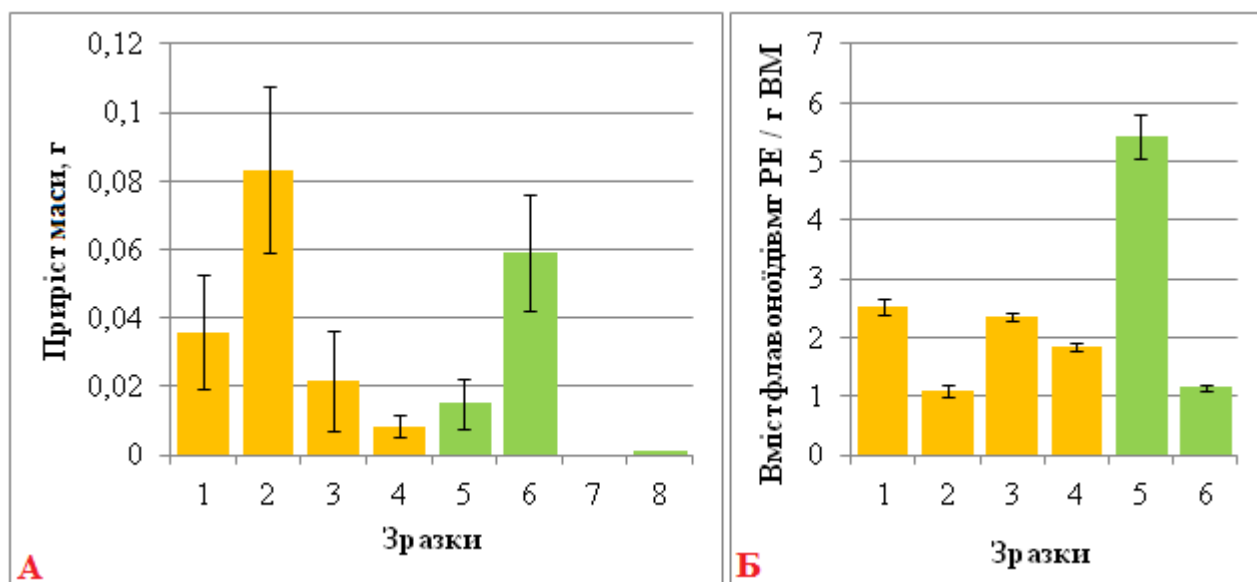


Рисунок 3.20. Приріст маси (А) та вміст флавоноїдів (Б) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii*, вирощених на двох режимах освітлення без і з додаванням високої концентрації фенілаланіну: жовті стовпчики – лінія № 10, зелені – лінія № 16. Умови вирощування: стовпчики 1 та 5 – з освітленням, без фенілаланіну (контроль); 2 та 6 – у темряві, без фенілаланіну; 3 та 7 – з освітленням, 1 мМ фенілаланіну; 4 та 8 – у темряві, 1 мМ фенілаланіну

Оскільки було показано, що фенілаланін у концентрації 1 мМ інгібує «бородаті» корені *A. tilesii*, для наступної частини дослідження були обрані значно нижчі концентрації, а саме 0.05 і 0.1 мМ.

Морфологія та характеристики росту «бородатих» коренів залежали від наявності освітлення (Рис. 3.21) так само, як і у попередньому експерименті. Освітлення впливало на колір «бородатих» коренів, їх розгалуженість і товщину. Усі зразки «бородатих» коренів були злегка зеленуватими при вирощуванні на світлі та білими без освітлення.

Встановлено, що у обох ліній при використанні фенілаланіну (усі концентрації) приріст маси «бородатих» коренів був вищим у зразках, вирощених при освітленні (Рис. 3.22, А), що суперечить даним попереднього дослідження. Тому різницю у впливі освітлення на приріст маси можна пояснити відмінностями у товщині коренів: усі зразки коренів, вирощені на світлі, цього

разу були значно товщі (до 1.5 мм), ніж корені, вирощені в темряві. Саме тому спостерігали і відмінності у загальній вазі коренів. Приріст маси коренів ліній №№ 10 та 16, вирощених на світлі, був у 1.16...2.91 і 1.26...1.59 раза відповідно вищим за такий же показник коренів, культивованих у темряві.

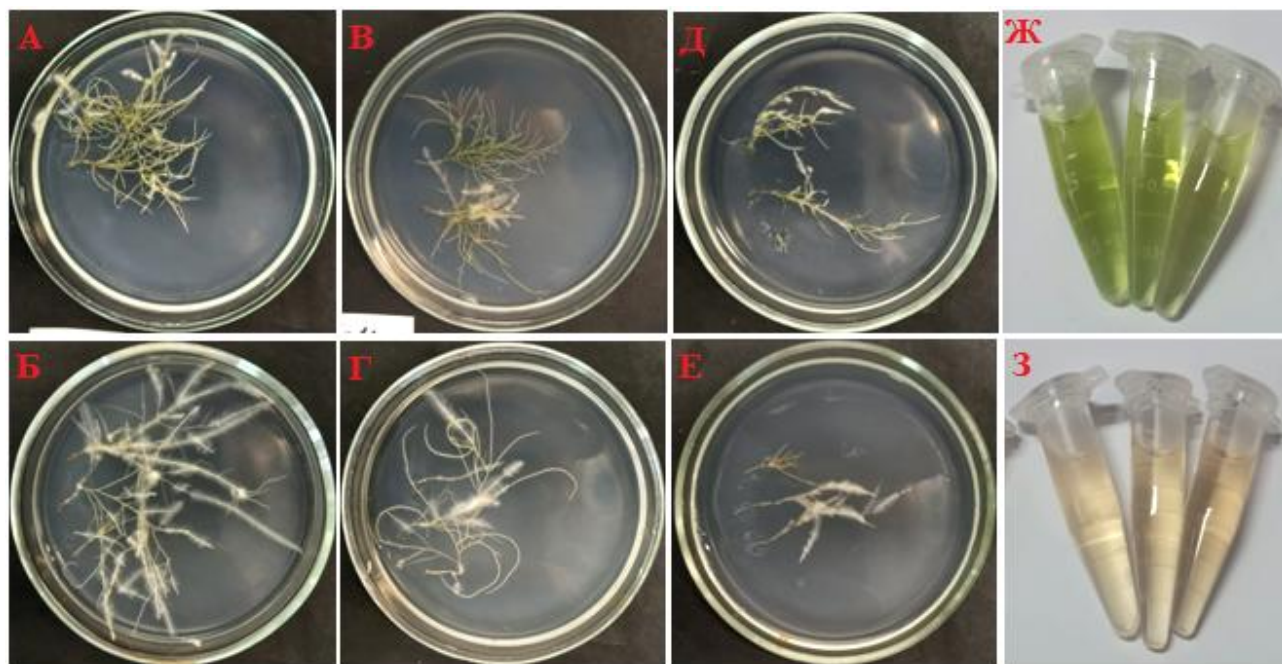


Рисунок 3.21. Відмінності у морфології лінії № 16 «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*, вирощених на двох режимах освітлення без і з додаванням фенілаланіну: **А** – з освітленням, без фенілаланіну (контроль); **Б** – у темряві, без фенілаланіну; **В** – з освітленням, 0.05 мМ фенілаланіну; **Г** – у темряві, 0.05 мМ фенілаланіну; **Д** – з освітленням, 0.1 мМ фенілаланіну; **Е** – у темряві, 0.1 мМ фенілаланіну; **Ж** – етанольні екстракти, приготовані із зразка, вирощеного на світлі; **З** – етанольні екстракти, приготовані із зразка, вирощеного у темряві.

Додавання фенілаланіну в будь-яких концентраціях (0.05 або 0.1 мМ) приводило до пригнічення росту коренів. Спостерігали особливості інгібування росту коренів різних ліній, як і у попередньому експерименті: лінія № 10 переносила додавання фенілаланіну у низьких концентраціях краще, ніж лінія № 16. Приріст маси коренів лінії № 10, вирощених за однакових умов освітлення, не відрізнявся у варіантах експерименту з додаванням до

середовища РНЕ у різних концентраціях. Водночас підвищення концентрації РНЕ призводило до пригнічення росту коренів лінії № 16.

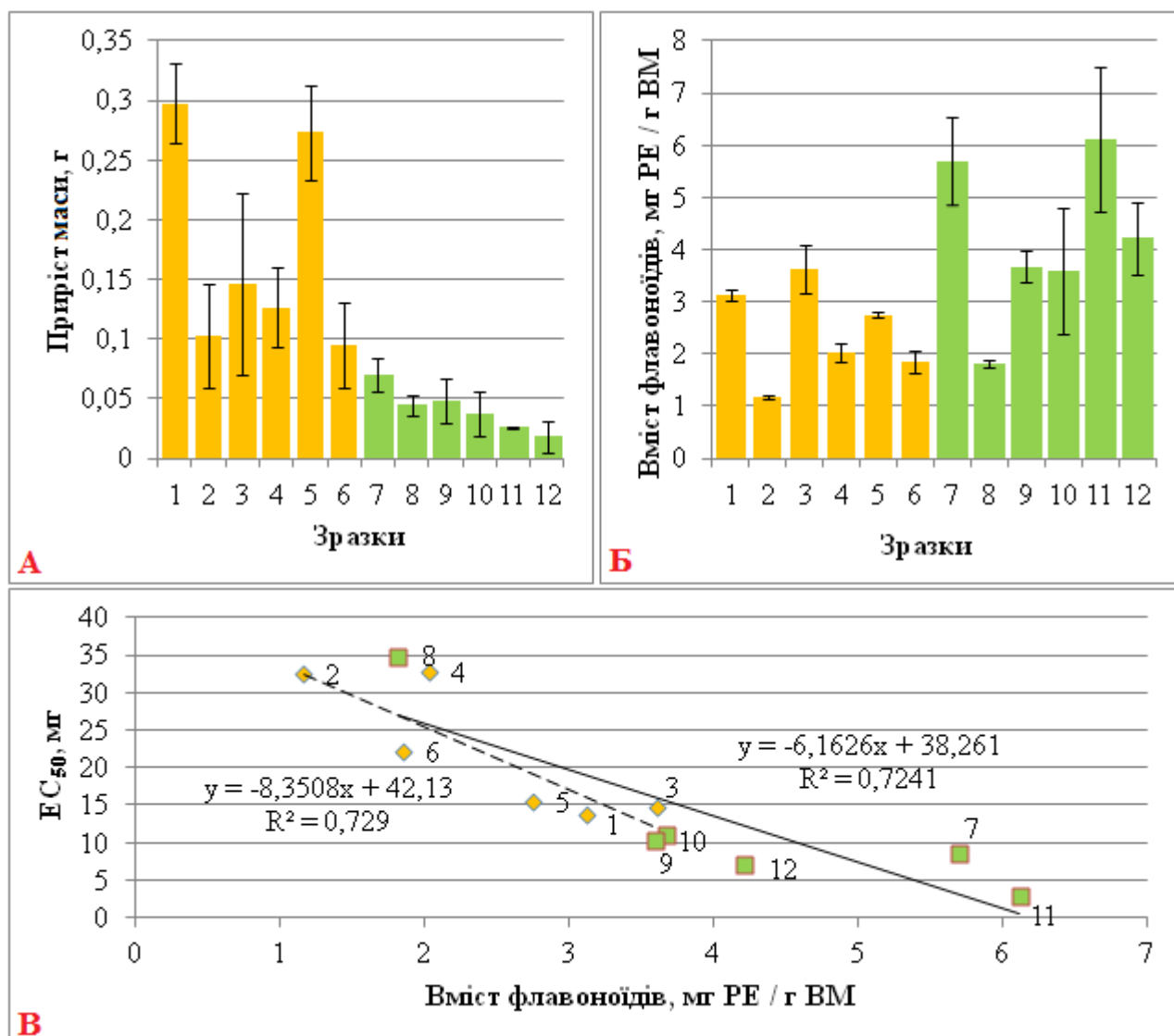


Рисунок. 3.22. Приріст маси (А), вміст флавоноїдів (Б) та кореляція антиоксидантної активності і вмісту флавоноїдів (В) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii*, вирощених на двох режимах освітлення без і з додаванням низьких концентрацій фенілаланіну: жовті стовпчики – лінія № 10, зелені – лінія № 16. Умови вирощування: стовпчики 1 та 7 – з освітленням, без фенілаланіну (контроль); 2 та 8 – у темряві, без фенілаланіну; 3 та 9 – з освітленням, 0.05 мМ фенілаланіну; 4 та 10 – у темряві, 0.05 мМ фенілаланіну; 5 та 11 – з освітленням, 0.1 мМ фенілаланіну; 6 та 12 – у темряві, 0.1 мМ фенілаланіну

Вміст флавоноїдів (Рис. 3.22, Б) у всіх зразках обох ліній був вищим при вирощуванні на світлі, що може свідчити про можливу дію освітлення як активатора біосинтезу флавоноїдів у «бородатих» коренях полину, що було також припущено на підставі результатів попереднього дослідження. Дійсно, незалежно від наявності та концентрації фенілаланіну у живильному середовищі вміст флавоноїдів був вищим у коренях лінії № 10 у 1.48...2.69 рази, а у коренях лінії № 16, вирощених на світлі, – у 1.02...3.14 рази. Як і у експерименті з високою концентрацією РНЕ, незважаючи на те, що накопичення біомаси коренів лінії № 16 було значно нижчим, ніж у лінії № 10, вміст флавоноїдів був вищим у всіх зразках при порівнянні варіантів, вирощених в однакових умовах. Це є підтвердженням можливого пояснення, запропонованого за результатами першого експерименту з РНЕ: накопичення біомаси та накопичення вторинних метаболітів можуть не відбуватися одночасно і можуть значно варіювати у «бородатих» коренях різних ліній.

Встановлено також, що антиоксидантна активність у всіх зразках була вищою в коренях, вирощених в умовах освітлення. Значення EC_{50} (Рис. 3.22, В) корелювали з вмістом флавоноїдів у зразках. Нижчі числові значення показника EC_{50} і, отже, більш висока антиоксидантна активність були пов'язані, вірогідно, з більш високим рівнем накопичення флавоноїдів.

Як видно з графіка (Рис. 3.22, Б), додавання РНЕ у менших концентраціях (0.05 мМ та 0.1 мМ) не пригнічувало біосинтез флавоноїдів, хоча при додаванні РНЕ у вищій концентрації (1 мМ, Рис. 3.20) спостерігалось інгібування. Тим не менш, таке значення, як загальний вміст флавоноїдів, розраховане на загальний приріст біомаси, показало, що пригнічення росту, яке виникло після додавання фенілаланіну, було більш помітним, ніж збільшення концентрації флавоноїдів в екстрактах. У жодному із зразків значення загального вмісту флавоноїдів на всю біомасу не було вищим, ніж у контрольних зразках коренів (корені, вирощені на світлі без додавання фенілаланіну). Цей результат показує, що для обох ліній «бородатих» коренів *A. tilesii* фенілаланін не є придатним еліситором, незалежно від вибраної концентрації, хоча раніше вивчалася

можливість стимулювання біосинтезу метаболітів у рослин за допомогою фенілаланіну (Demirci, Çelikkol Akçay & Göktürk Baydar, 2020; Sykłowska-Baranek et al., 2012). Зокрема, Peng, Wang, Wang, Wang & Bian (2023) показали сприятливий вплив комбінації мікрохвильового випромінювання та L-фенілаланіну на специфічну активність фенілаланін-амоній-ліази, халкон-ізомерази та флавонол-синтази у паростках татарської гречки. Demirci, Çelikkol & Göktürk (2020) досліджували вплив 24-епібрасинолідів та L-фенілаланіну на ріст коренів, вміст фенолів та флавоноїдів і накопичення похідних кавової кислоти у «бородатих» коренях *Echinacea purpurea*. Обробка 24-епібрасинолідом (0.5 мг / л) протягом 50 днів призвела до найбільшого приросту маси коренів та індексу росту, тоді як L-фенілаланін не мав істотного впливу на ріст коренів. Cao, Vu, Hoang, Bui & Quach (2020) показали перевагу використання комбінації 10 мМ фенілаланіну та 50 мМ хітозану для збільшення сухої маси, вмісту флавоноїдів і фенолів у «бородатих» коренів *Urena lobata*. Arya & Patni (2013) повідомили про значну активізацію синтезу кверцетину в клітинах калюсу *Pluchea lanceolata* шляхом додавання коричної кислоти та L-фенілаланіну. Sykłowska-Baranek et al. (2012) визначили вплив L-фенілаланіну на активність *PAL* та продукцію нафтохінонів в суспензійних культурах *Arnebia euchroma*. Andi, Gholami, Ford & Maskani (2018) визначили стимулюючу дію L-фенілаланіну на синтез стильбенів і флавоноїдів у суспензійних культурах *Vitis vinifera*. Усі ці дослідження свідчать про те, що додавання прекурсорів може по-різному впливати на ріст рослинних культур *in vitro* та активність їх біосинтезу. Таким чином, очевидно, що вплив фенілаланіну як стимулятора синтезу вторинних метаболітів може бути видоспецифічним.

Світло відоме як важливий фактор, що впливає на рослини, включаючи їх ріст і метаболізм рослинних клітин. Воно може стимулювати вторинний метаболізм, але такий ефект може бути видоспецифічним і варіювати при дослідженні різних метаболітів. У літературі було досліджено позеленіння коренів *Solanum khasianum* та стимуляцію біосинтезу під впливом світлового опромінення (Jacob & Malpathak, 2004). Освітлення також збільшило концентрацію поліфенолів

у *Echinacea purpurea* (Abbasi, Tian, Murch, Saxena & Liu, 2007), *Fagopyrum tataricum* (Park, Park, Yeo, Park & Park, 2021), *Scutellaria lateriflora* (Marsh et al., 2014) та *Fagopyrum tataricum* (Thwe et al., 2014). Tusevski, Petreska Stanoeva, Stefova, & Simic (2013) показали, що рослини *Hypericum perforatum*, які росли в темряві або за освітлення, відрізнялися накопиченням фенольних кислот, флавонолів, флаван-3-олів та ксантонів. Світло слугувало стимулятором синтезу хінної кислоти, кемпферолу та семи ідентифікованих ксантонів. З іншого боку, культури, які росли в темряві, мали більший вміст флаван-3-олів (димери катехіну, епікатехіну та проантоціанідину). Сприятливий вплив світла на накопичення ціанідин 3-О-рутинозиду також спостерігали в «бородатих» коренях гречки татарської (Thwe et al., 2014). Marsh et al. показали, що «бородаті» корені *Scutellaria lateriflora*, культивовані при безперервному освітленні в комбінації з β -циклодекстрином, накопичували більше флавонових глікозидів, тоді як культури, які росли в темряві з такою ж обробкою, мали максимальний вміст байкалейну та вогоніну (5.4 та 0.71 мг / г ВМ, відповідно) (Marsh et al., 2014). Wongshaya et al. показали кращу реакцію на еліситацію «бородатих» коренів *Arachis hypogaea*, які зберігалися в темряві, ніж вирощені на світлі (Wongshaya et al., 2020). Інші дослідники (Zhang et al., 2018; Jiao et al., 2018; Kumar, Arya, Mahadevappa & Giridhar, 2020; de Castro et al., 2019) встановили позитивний вплив світлових хвиль різної довжини, оптимізації фотоперіоду та ультрафіолетового випромінювання на збільшення рівня накопичення флавоноїдів. Результати нашого дослідження продемонстрували позитивний вплив освітлення на ріст «бородатих» коренів *A. tilesii* та накопичення флавоноїдів. Подібний стимулюючий ефект було встановлено раніше і в дослідях з іншими рослинами роду *Artemisia* – «бородатими» коренями *A. annua* (Liu, Guo, Wang & Ouyang, 2002). У цьому експерименті швидкість росту та накопичення артемізиніну збільшувалися у разі культивування «бородатих» коренів при 3000 лк світлового опромінення протягом 16 годин.

Отже, в нашому дослідженні показано, що наявність освітлення впливає на морфологію «бородатих» коренів *A. tilesii*, їх колір, галуження, накопичення

біомаси та біосинтез флавоноїдів. У обох досліджуваних ліній коренів виявилось, що наявність освітлення є більш доцільною, ніж постійне вирощування в темряві, оскільки світло активізує синтез флавоноїдів і підвищує антиоксидантну активність.

Додавання фенілаланіну у жодній з тестованих концентрацій (0.05, 0.1 та 1 мМ) до живильного середовища не впливало позитивно для загальний вміст флавоноїдів у всій біомасі «бородатих» коренів *A. tilesii*. Додавання PHE в концентрації 1 мМ пригнічувало як ріст коренів, так і синтез флавоноїдів. Такий ефект спостерігався при культивуванні з освітленням і без нього. Ступінь інгібування росту коренів різних ліній дещо відрізнявся. Зокрема, одна з ліній виявилася більш толерантною до PHE у будь-яких концентраціях, ніж інша. Крім того, лінія, яка характеризувалася меншим приростом біомаси, водночас мала більший вміст флавоноїдів при культивуванні на середовищі з додаванням низьких концентрацій фенілаланіну. Це може бути результатом залежності співвідношення швидкості росту та біосинтезу вторинних метаболітів, обмежених наявними ресурсами рослинних клітин.

Таким чином, додавання фенілаланіну в різних концентраціях до живильного середовища під час культивування може по-різному впливати на лінії «бородатих» коренів *A. tilesii*. Це може бути зумовлено не лише параметрами культивування (різні режими освітлення), а й відмінностями в генотипах отриманих ліній одного виду.

3.2.2. Вплив метилжасмонату на ріст «бородатих» коренів та синтез флавоноїдів

У роботі визначали вплив метилжасмонату як можливого еліситора для стимулювання синтезу флавоноїдів «бородатих» коренів полину, оскільки такий ефект сполуки виявлено у багатьох дослідженнях. Зокрема, Ghimire, Thiruvengadam & Chung (2019) показали, що більше підвищення загального вмісту фенолів і флавоноїдів було досягнуто після додавання метилжасмонату у

культури «бородатих» коренів *Aster scaber*, ніж після додавання дріжджового екстракту. Krzemińska et al. (2022) встановили, що метилжасмонат був найбільш ефективним еліситором для збільшення вмісту фенолів та антиоксидантної активності у «бородатих» коренях *Salvia bulleyana* у порівнянні з дріжджовим екстрактом, транс-анетолом та хлоридом кадмію. Pilaisangsree et al. (2018) визначили, що ко-еліситація «бородатих» коренів арахісу метилжасмонатом та циклодекстрином ефективніше збільшувала вміст фенолів, ніж еліситація цими сполуками окремо. Horbowicz et al. (2021) показали, що оприскування метилжасмонатом листя *Ginkgo biloba* привело до збільшення вмісту терпенових трилактонів. Дослідження інших науковців (Vergara-Martínez et al., 2021; Kim et al., 2020; Tavakoli, Tavakoli & Moradi, 2019; Perreca et al., 2022; Wang et al., 2022; Bernard et al., 2020) також засвідчило позитивну дію метилжасмонату на синтез поліфенольних сполук. Саме тому і було обрано метилжасмонат як можливий еліситор для збільшення вмісту флавоноїдів у коренях полину.

В ході перших експериментів (дані не опубліковані і не вказані в цій роботі) було показано інгібуючу дію метилжасмонату на ріст «бородатих» коренів за умови додавання цієї сполуки на початковому етапі вирощування коренів. Корені практично переставали рости, тому накопичити біомасу для приготування екстрактів було неможливо. Разом з тим, виявили доцільним проведення двоетапного культивування на рідкому середовищі: спочатку корені вирощували 18 діб на середовищі ½ МС з вмістом сахарози 20 г / л, а вже потім додавали метилжасмонат (MeJ) у різних концентраціях (10, 50 і 100 мкМ) (Богданович, Матвєєва, 2023). Після додавання в середовище MeJ «бородаті» корені вирощували ще два тижні при постійному перемішуванні середовища. Таким чином, процеси накопичення біомаси та еліситацію задля підвищення вмісту вторинних метаболітів було розділено у часі (Рис. 3.23). Такий підхід до еліситації описано, наприклад, у роботі Gajurel, Nopo-Olazabal, Hendrix & Medina-Bolivar, 2022.

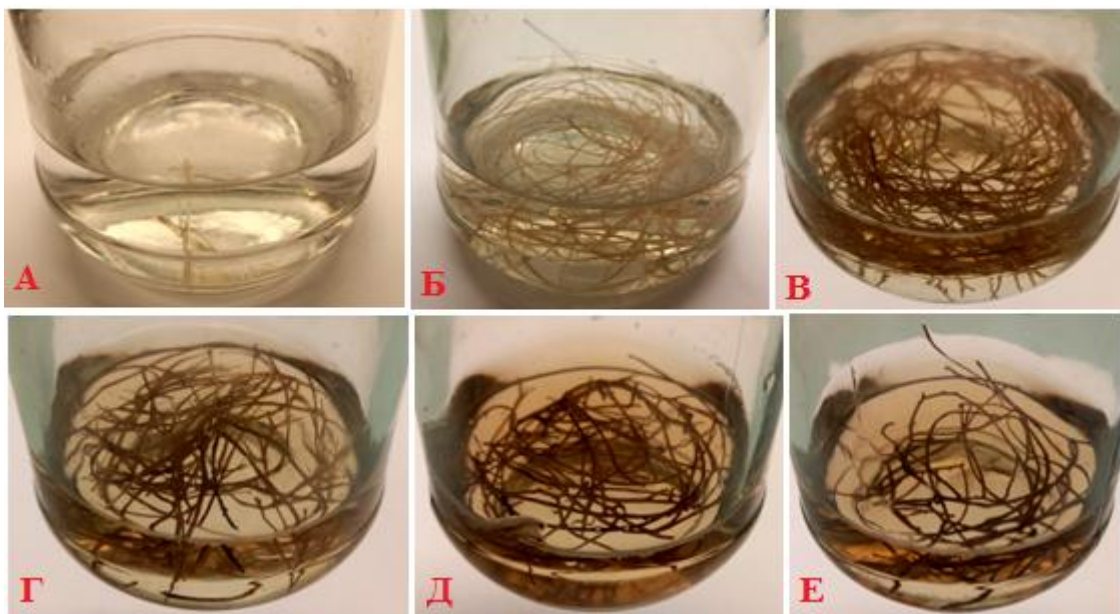


Рисунок 3.23. Культивування «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* (лінія №2) з метилжасмонатом різних концентрацій: початок експерименту (А); через 18 діб культивування на середовищі $\frac{1}{2}$ МС (Б); через два тижні культивування без метилжасмонату (контроль, В), з 10 мкМ метилжасмонату (Г), 50 мкМ (Д) та 100 мкМ (Е)

Вміст флавоноїдів вимірювали у етанольних (70%) екстрактах коренів за стандартною методикою з AlCl_3 через 2, 4, 7 та 11 діб для визначення динаміки біосинтезу. Двоетапне культивування на рідкому середовищі виявилось доцільним, адже відбулося значне збільшення вмісту флавоноїдів в усіх досліджуваних лініях (Рис. 3.24 – 3.27, А). Вміст флавоноїдів до додавання метилжасмонату («нульовий» день) у трьох ліній «бородатих» коренів (№№ 4, 10 та 16) був приблизно однаковий: від 4.37 ± 0.43 до 6.38 ± 2.05 мг РЕ / г ВМ. У лінії №2 початковий вміст флавоноїдів становив 15.08 ± 1.45 мг РЕ / г ВМ. Уже через 2 дні після додавання метилжасмонату у будь-яких концентраціях в усіх лініях вміст флавоноїдів значно збільшився у порівнянні з контрольними зразками (варіант без додавання метилжасмонату) – у 1.47 ... 3.49 раза і сягнув 40.31 ± 3.45 мг РЕ / г ВМ для лінії №2.

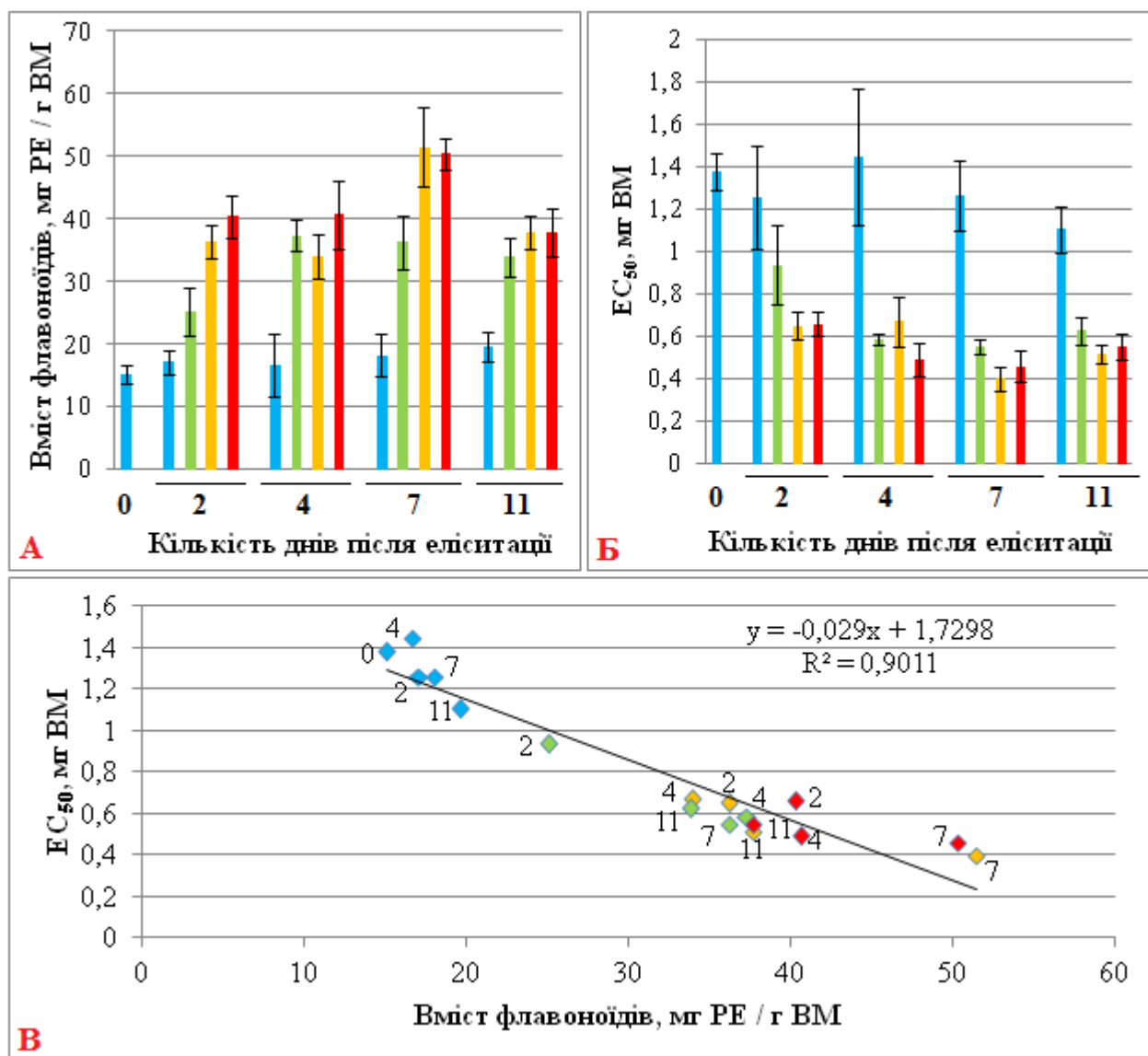


Рисунок 3.24. Вміст флавоноїдів (А), антиоксидантна активність (Б) та їх кореляція (В) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii* після культивування з метилжасмонатом (лінія 1-2): блакитні стовпчики та маркери – контроль (0 мкМ MeJ), зелені – 10 мкМ MeJ, жовті – 50 мкМ MeJ, червоні – 100 мкМ MeJ

Крім того, було виявлено вплив додавання метилжасмонату на морфологію «бородатих» коренів: корені швидше коричневіли, ставали значно товщі, крихкіші, тобто відбувалося їх «старіння». Такий ефект метилжасмонату на структуру коренів є цікавим і описаний в літературі (Rogowska, Stpıcıńska, Rączkowski & Szakiel, 2022). Цими дослідниками було проведено не тільки опис морфології коренів після культивування з метилжасмонатом, а і досліджено їх

структуру на мікроскопічному рівні. Було показано, що у коренях, вирощених на середовищах з метилжасмонатом, клітинні стінки ендодермісу були лігніфіковані, чого не було у контрольних зразках.

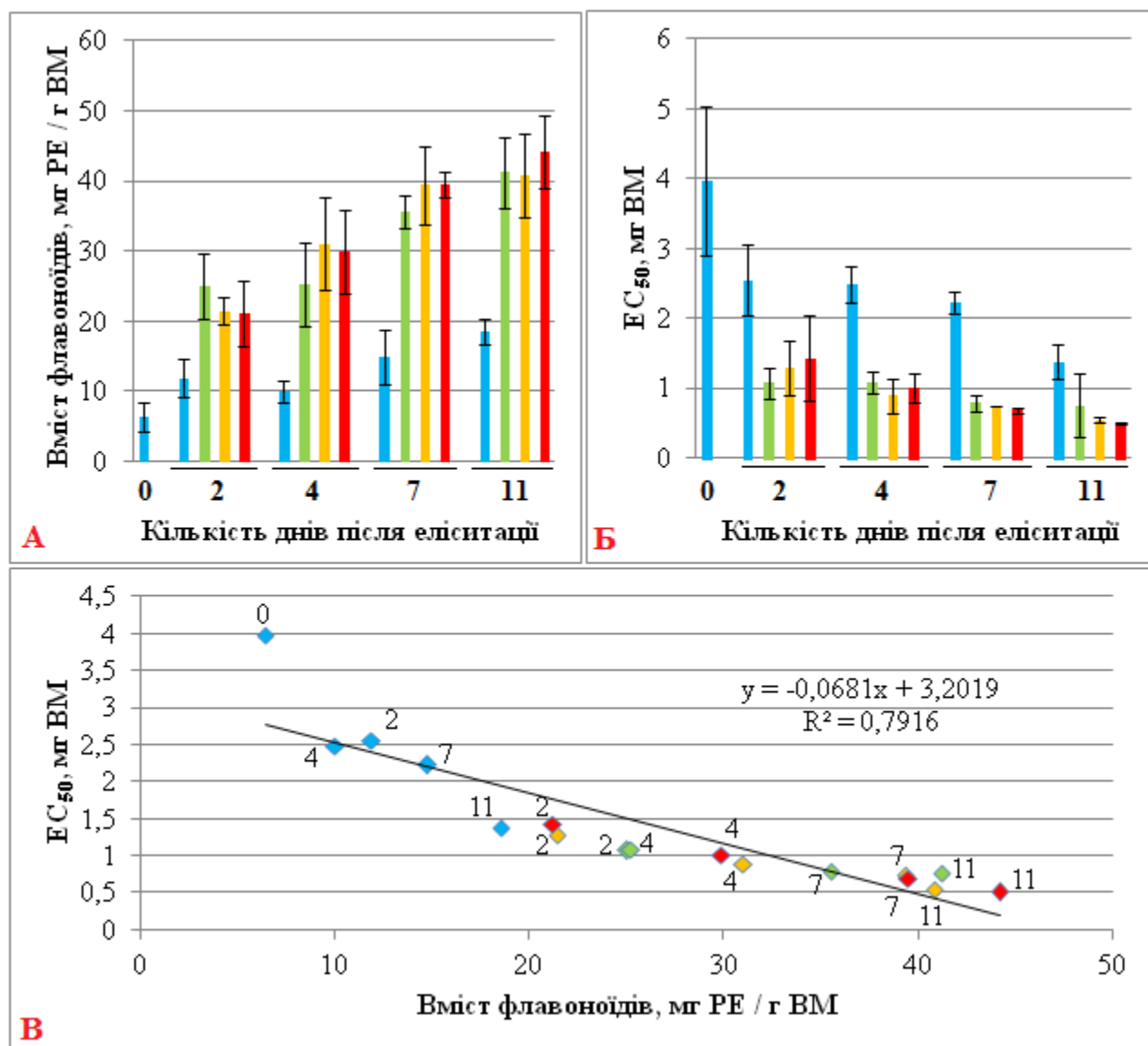


Рисунок 3.25. Вміст флавоноїдів (А), антиоксидантна активність (Б) та їх кореляція (В) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii* після культивування з метилжасмонатом (лінія 1-4): блакитні стовпчики та маркери – контроль (0 мкМ MeJ), зелені – 10 мкМ MeJ, жовті – 50 мкМ MeJ, червоні – 100 мкМ MeJ

Динаміка синтезу флавоноїдів у різних ліній відрізнялась. Зокрема, у лінії №2 (Рис. 3.24, А) вміст флавоноїдів поступово збільшувався до 7 дня

культивування з MeJ у будь-яких концентраціях у порівнянні з контрольними зразками: при додаванні 10 мкМ – у 2.00 рази, 50 мкМ – у 2.85 рази, 100 мкМ – у 2.79 рази, сягнувши 51.49 ± 6.45 мг РЕ / г ВМ. Разом з тим, при подальшому культивуванні вміст флавоноїдів в усіх зразках, культивованих з MeJ, зменшувався, що можна пояснити вичерпуванням наявних ресурсів клітин та/або компонентів середовища для синтезу вторинних метаболітів.

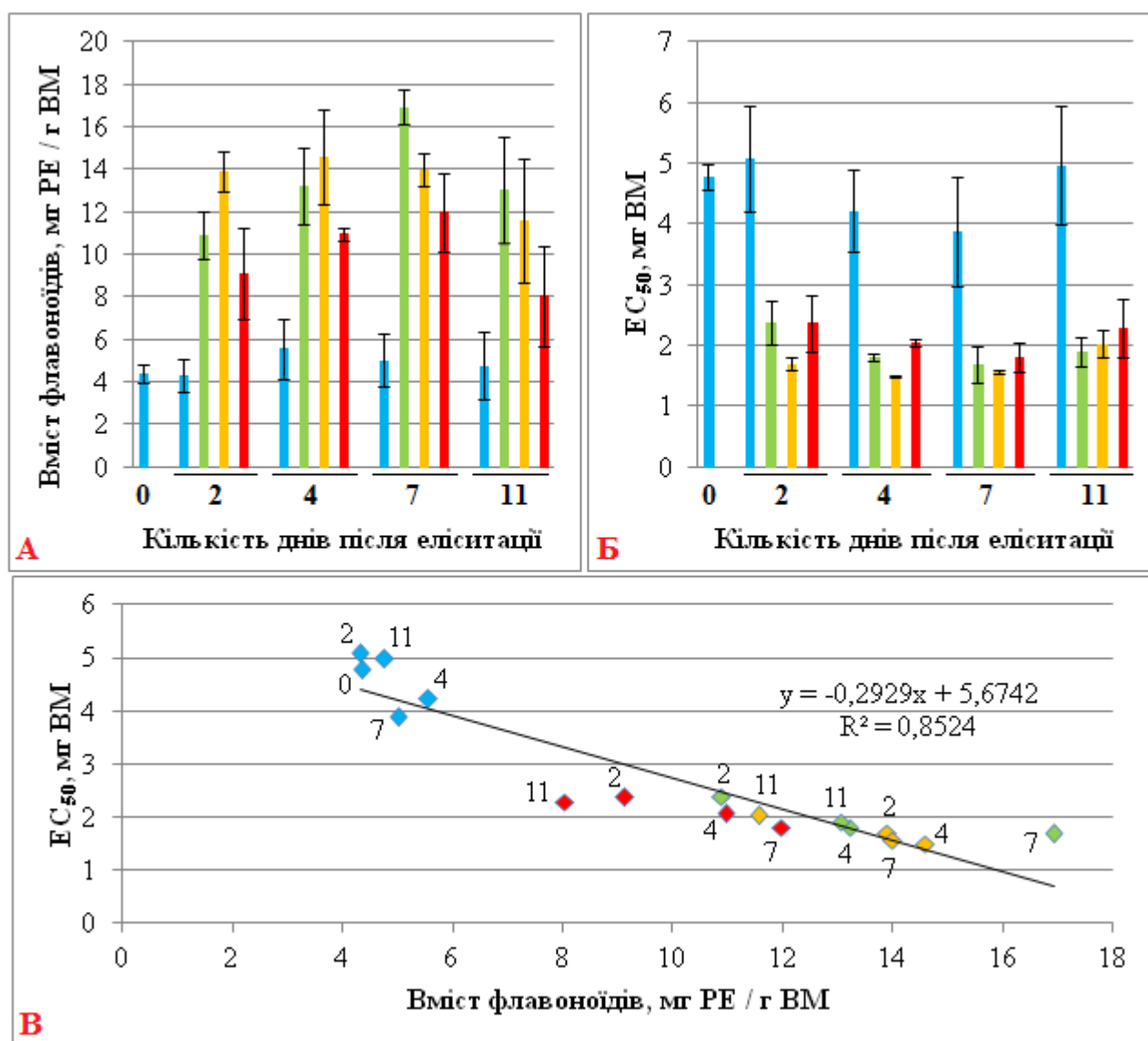


Рисунок 3.26. Вміст флавоноїдів (А), антиоксидантна активність (Б) та їх кореляція (В) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii* після культивування з метилжасмонатом (лінія 1-10): блакитні стовпчики та маркери – контроль (0 мкМ MeJ), зелені – 10 мкМ MeJ, жовті – 50 мкМ MeJ, червоні – 100 мкМ MeJ

У лінії №4 (Рис. 3.25, А) вміст флавоноїдів поступово збільшувався і після двох тижнів культивування з MeJ в усіх зразках незалежно від концентрації доданого метилжасмонату. Цікавим є те, що у зразках цієї лінії приблизно однаковий вміст флавоноїдів спостерігався після додавання MeJ будь-яких концентрацій. На останній день культивування значення сягнули $40.89 \pm 5.97 \dots 44.21 \pm 5.16$ мг РЕ / г ВМ у порівнянні з контрольними зразками без MeJ (18.54 ± 1.80 мг РЕ / г ВМ).

У коренях лінії №10 (Рис. 3.26, А) після додавання 10 мкМ MeJ концентрація флавоноїдів з часом поступово збільшилась на 21% і досягла 16.94 ± 0.82 мг РЕ / г ВМ, що перевищило контроль (без MeJ) у 3.37 раза. У зразках, культивованих з MeJ у більших концентраціях, збільшення вмісту флавоноїдів з часом майже не відбулося. Більше того, на 11 день культивування вміст зменшився, аналогічно до динаміки у лінії №2, що можна пояснити вичерпуванням прекурсорів для синтезу флавоноїдів у клітині або іншими причинами. Проте у лінії №16 (Рис. 3.27, А) вміст флавоноїдів на 4 день культивування з MeJ збільшувався і надалі в усіх зразках: при додаванні 10 мкМ – на 18.44%, 50 мкМ – на 28.26%, 100 мкМ – на 46.71%, сягнувши 27.23 ± 3.46 мг РЕ / г ВМ, що перевищувало показники контролю у 5.21 раза. Після цього вміст флавоноїдів у зразках з вищими концентраціями MeJ не збільшувався, але і не зменшувався, на противагу лінії №10.

Антиоксидантна активність екстрактів з коренів корелювала з вмістом флавоноїдів ($R^2 = 0.79 \dots 0.90$). Крім того, і динаміка зміни антиоксидантної активності корелювала з динамікою накопичення флавоноїдів в усіх лініях (Рис. 3.24 – 3.27, Б та В). У лінії №2 EC_{50} у контролі з часом майже не змінювався, початкове значення було 1.37 ± 0.09 мг ВМ, а з часом значення варіювали від 1.10 ± 0.11 до 1.44 ± 0.42 мг ВМ. В той же час після додавання метилжасмонату показник EC_{50} значно зменшувався, досягнувши мінімального значення (0.40 ± 0.06 мг ВМ) на 7 добу культивування, що свідчить про збільшення активності. Таким чином, антиоксидантна активність зразків цієї лінії після додавання MeJ була найвищою серед усіх досліджуваних ліній, що

відповідало найбільшому вмісту флавоноїдів. Показники EC_{50} у інших ліній після додавання MeJ так само значно зменшувались у порівнянні з контролем. У лінії №4 найменші значення EC_{50} були досягнуті після 11 днів культивування зі 100 мкМ MeJ (0.50 ± 0.01 мг ВМ), у лінії №10 – через 4 дні культивування з 50 мкМ MeJ (1.49 ± 0.01 мг ВМ), у лінії №16 – через 11 днів культивування з 100 мкМ MeJ (0.92 ± 0.006 мг ВМ).

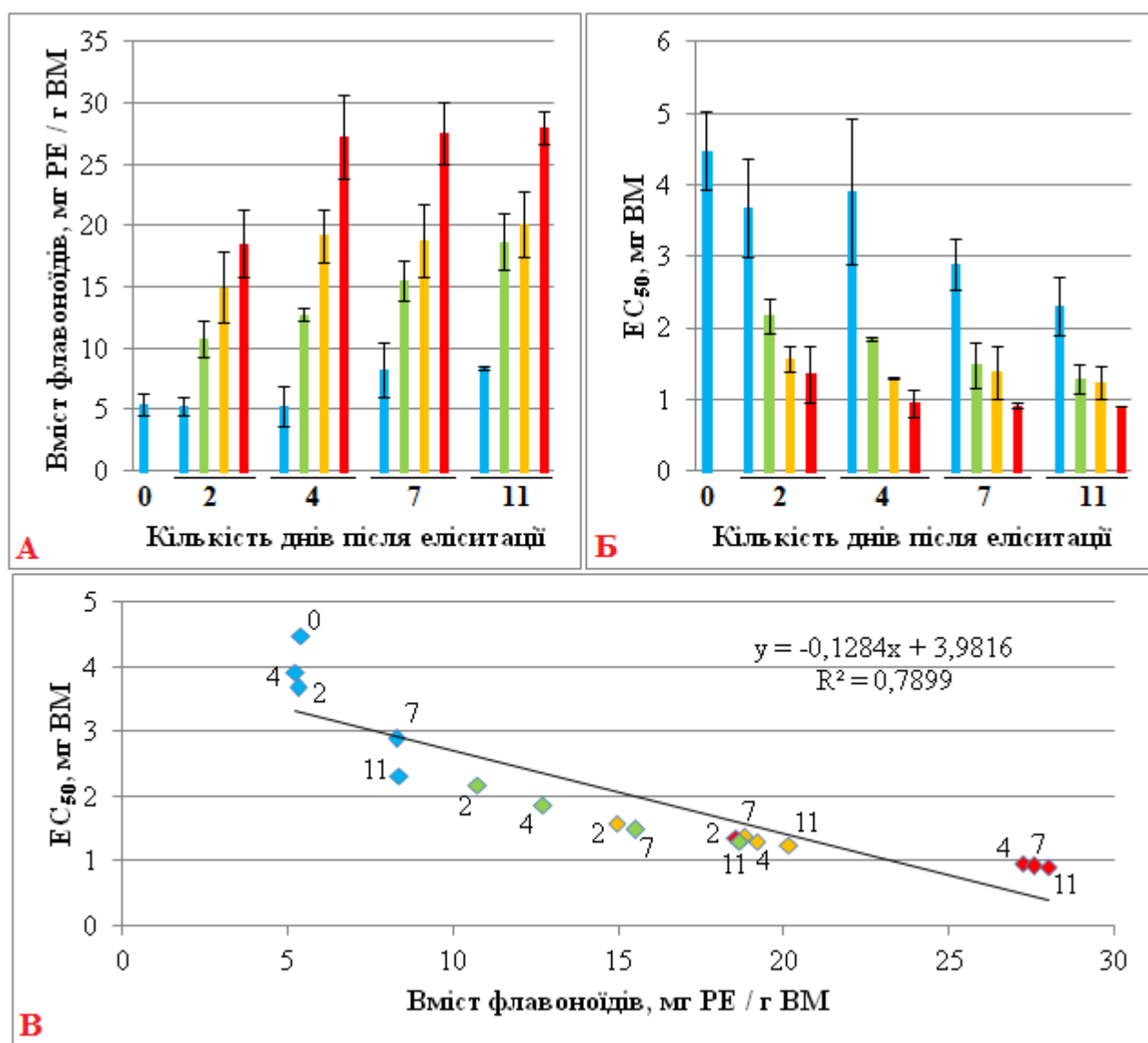


Рисунок 3.27. Вміст флавоноїдів (А), антиоксидантна активність (Б) та їх кореляція (В) у «бородатих» коренях *Artemisia tilesii* після культивування з метилжасмонатом (лінія 1-16): блакитні стовпчики та маркери – контроль (0 мкМ MeJ), зелені – 10 мкМ MeJ, жовті – 50 мкМ MeJ, червоні – 100 мкМ MeJ

Важливо зазначити, що метилжасмонат проявив інгібуючу дію на ріст «бородатих» коренів незалежно від його концентрації. Такий результат відомий в літературі. Вченими (Han et al., 2023) нещодавно було проведено огляд масиву наукової літератури і визначено, що жасмонати негативно впливають на ріст коренів. Зважаючи на це, для більшості ліній, доцільним є додавання 100 мкМ MeJ для швидкого збільшення виходу флавоноїдів з наступним короткочасним культивуванням (від 4 до 7 діб).

Отже, додавання метилжасмонату привело до швидкого і значного збільшення вмісту флавоноїдів у «бородатих» коренях *A. tilesii*. Таким чином, метилжасмонат може бути використаний як еліситор для стимулювання синтезу флавоноїдів у «бородатих» коренях полину. Разом з тим, треба брати до уваги особливості росту коренів різних ліній та їх чутливість до метилжасмонату.

3.2.3. Висновки до підрозділу 3.2

Зміна умов культивування має вплив на морфологію «бородатих» коренів полину Тілесіуса, швидкість росту та біосинтез вторинних метаболітів.

Наявність освітлення приводить до формування коренів зеленуватого кольору з більшим галуженням та товщиною. Освітлення також стимулює ріст коренів та вторинний метаболізм, приводячи до збільшення приросту маси, вмісту флавоноїдів та антиоксидантної активності, причому така тенденція зберігалась і при додаванні 0.05 та 0.1 мМ фенілаланіну. Корені, вирощені на світлі, після додавання цієї сполуки росли краще на світлі та синтезували більше флавоноїдів. Таким чином, наявність освітлення є важливим фактором для підвищення біосинтетичного потенціалу коренів.

Додавання фенілаланіну до живильного середовища при культивуванні «бородатих» коренів полину не приводило до збільшення загального вмісту флавоноїдів у всій біомасі коренів, оскільки такі умови вирощування приводили до пригнічення росту. Слід зазначити, що ступінь інгібування

залежав від лінії: одна з ліній виявилася більш толерантною до РНЕ у будь-яких концентраціях, ніж інша. Це може бути пов'язано з особливостями генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes* та недетермінованістю місця вбудовування перенесених до геному рослин *rol* генів.

Метилжасмонат у концентраціях 10, 50 та 100 мкМ, незважаючи на деяку інгібуючу дію на ріст «бородатих» коренів *A. tilesii*, значно стимулював синтез флавоноїдів та підвищував антиоксидантну активність в усіх лініях вже після двох діб культивування на живильному середовищі із цією сполукою (у 2.21 ... 5.21 раза). Корені різних ліній відрізнялись за чутливістю до метилжасмонату та способом реагування на його наявність у живильному середовищі. Можливі такі особливості реакції коренів на наявність метилжасмонату у середовищі: поступове збільшення вмісту флавоноїдів та антиоксидантної активності до сьомої доби після додавання еліситуру з наступним їх зменшенням; продовження накопичення навіть після одинадцяти діб культивування на середовищі з метилжасмонатом; максимальне накопичення флавоноїдів у перші чотири доби культивування зі збереженням такої концентрації при продовженні вирощування коренів протягом наступних семи діб.

Результати даного розділу висвітлені у статті у фаховому виданні України (Bohdanovych & Matvieieva, 2023b) та інших наукових працях (Богданович, Матвєєва, 2022a; Богданович, Матвєєва, 2022b; Bohdanovych & Matvieieva, 2022b; Богданович, Матвєєва, 2023).

3.3. Отримання флавоноїдвмісного комплексу сполук та його перевірка на біобезпечність

3.3.1. Отримання сухого екстракту з «бородатих» коренів

Розробка препаратів на основі флавоноїдів є актуальним завданням, адже доведена можливість застосування цих біологічно активних сполук для лікування та профілактики багатьох захворювань. Відомо, що ці поліфенольні

сполуки здатні підвищувати активність ферментативних антиоксидантних систем та вміст антиоксидантів, послаблювати запальні реакції, знижувати рівень глікованого гемоглобіну та збільшувати рівень апоптозу ракових клітин (Khan et al., 2021; Sharifi-Rad et al., 2022). Саме тому одним із завдань роботи було отримання сухого екстракту на основі «бородатих» коренів полину, що мав би високий вміст біофлавоноїдів та проявляв антиоксидантну (п. 2.7.2), протівірусну (п. 2.7.6), протизапальну (п. 2.7.5) та відновну (п. 2.7.2 та 2.8) дію.

Створення нових ліків на основі такого екстракту є актуальним завдяки можливості розв'язання одразу декількох проблем, які ставляться перед біотехнологами: (1) пошук природних продуцентів біологічно активних сполук; (2) пошук нових продуцентів; (3) можливість інтенсифікації виробництва. Дійсно, по-перше, більшість наявних у продажу препаратів отримують хімічним або напівхімічним синтезом, і такі препарати мають низку побічних ефектів. По-друге, *A. tilesii* є маловивченою рослиною з вузьким природним ареалом та може розглядатися як новий продуцент біоактивних сполук. Ці рослини багаті на поліфенольні сполуки, що було встановлено при виконанні дисертаційної роботи. По-третє, стимулювання синтезу та збільшення різноманіття біоактивних сполук в цій рослині можливе завдяки створенню ліній-надпродуцентів на основі культур «бородатих» коренів і додатковій активізації синтезу вторинних метаболітів, використовуючи еліситори, зокрема метилжасмонат.

Для роботи було обрано лінію «бородатих» коренів *A. tilesii* № 16 через її швидкий ріст на рідкому середовищі та чутливість до метилжасмонату, що було визначено раніше (Богданович, Матвєєва, 2023). Двоетапне культивування з метилжасмонатом (Рис. 3.28, А – В) виявило можливість у 3.3 рази (до 27.56 ± 2.52 мг РЕ / г ВМ у порівнянні з контролем без жасмонату) збільшити вміст флавоноїдів вже на 4 добу культивування, що є важливим для інтенсифікації процесу. Такий результат підтверджує вплив жасмонату як еліситору, що було показано дослідниками раніше (Hassini et al., 2019; Sohn et al., 2022).

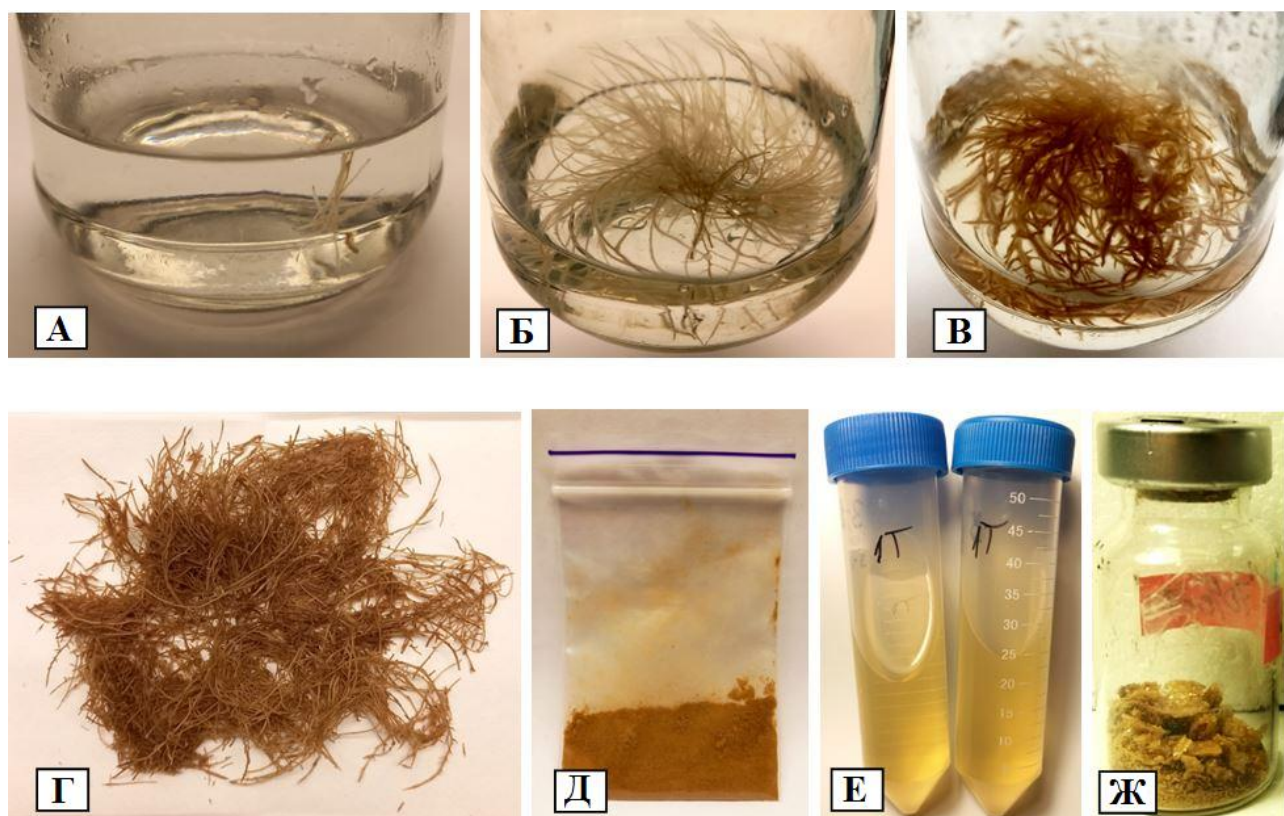


Рисунок 3.28. Етапи отримання комплексу біофлавоноїдів з «бородатих» коренів полину *Artemisia tilesii* Ledeb.: початок культивування «бородатих» коренів на рідкому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з 20 г / л сахарози (А); «бородаті» корені після 18 діб культивування при постійному перемішуванні на шейкері (Б); «бородаті» корені після 7 діб культивування з додаванням 100 мкМ жасмонату при постійному перемішуванні на шейкері (В); нативні та подрібнені корені (Г, Д); супернатант, отриманий після 2-добової етанольної екстракції подрібнених ліофілізованих коренів (Е); сухий флавоноїдвмісний екстракт після висушування на роторному випарювачі (Ж)

Для отримання сухого флавоноїдвмісного екстракту використовували методику, описану у підрозділі 2.11. Початкова маса коренів становила 0.01 ± 0.001 г ВМ, і з цієї маси було отримано 1.093 ± 0.36 г ВМ коренів у середньому на зразок. Встановлено, що вміст сухої речовини у 1 г коренів, отриманих після такого вирощування, становив 0.15 г або 14.8% (Богданович, Матвєєва, 2023b; Богданович, Матвєєва, 2023d). З 1 г ліофілізованих коренів було отримано 270 мг сухого екстракту (СЕ). Вміст флавоноїдів в отриманому сухому екстракті (Рис.

3.28, Г – Ж) становив 95.53 мг РЕ / г СЕ, тобто 9.56% сухої маси СЕ. Таким чином, оптимізований спосіб отримання сухого флавоноїдовмісного екстракту з лінії-суперпродуцента дозволяє отримати за чотири тижні вирощування з 1 кг висаджених коренів 109.3 кг загальної вологої маси коренів, або 16.2 кг сухої маси коренів, з яких можна екстрагувати 4.4 кг сухого екстракту, в якому є 0.42 кг біоактивного комплексу флавоноїдів.

3.3.2. Перевірка отриманого екстракту «бородатих» коренів на біобезпечність

Після отримання флавоноїдвмісної композиції було проведено оцінку її біобезпечності шляхом тестування на культивованих *in vitro* рослинах *Lemna minor* L. (за кількістю листеців ряски та приросту їх маси). Таке визначення нетоксичності отриманого комплексу сполук є доцільним, адже різні види ряски здавна використовуються як біоіндикатори для вивчення токсичності препаратів та інших сполук (Park et al., 2021b; Rozman & Kalčíková, 2022; Huang, Kong, Chen & An, 2022) та як модельні організми для дослідження фіторе mediaції (Ziegler, Appenroth & Sree, 2023; Sikorski, Beś & Warmiński, 2023; Zhou, Stepanenko, Kishchenko, Xu & Borisjuk, 2023; Acosta et al., 2021).

Перед початком культивування ряски з додаванням розчинника (контроль), розчину сухого екстракту та стандартів флавоноїдів (Рис. 3.29, А) у кожній чашці було по 20 шт. листеців загальною масою 0.018 ± 0.001 г. Через 3 тижні культивування (Рис. 3. 29, А) у контрольних чашках (Рис. 3. 29, Б) кількість листеців становила 195.5 ± 2.94 шт., а у чашках з екстрактом (Рис. 3., В) 246.33 ± 26.16 шт., що на 26% більше (Рис. 3.30, А) (Богданович, Матвєєва, 2023с). Маса листеців (Рис. 3.30, Б) також збільшилась у порівнянні з контролем: 0.064 ± 0.003 г у контролі та 0.088 ± 0.012 г у чашках з сухим екстрактом, що на 35.50% більше. Такі результати свідчать про нетоксичність та біобезпечність препарату для рослин, адже кількість листеців та їх маса не стали з часом меншими, ніж у контрольному зразку. Більше того, ріст ряски малої був активнішим у чашках з

доданим екстрактом. Таким чином, окрім нетоксичності, виявлено рістстимулюючу дію отриманого комплексу сполук на основі сухого етанольного екстракту «бородатих» коренів полину на ріст та накопичення біомаси ряски.

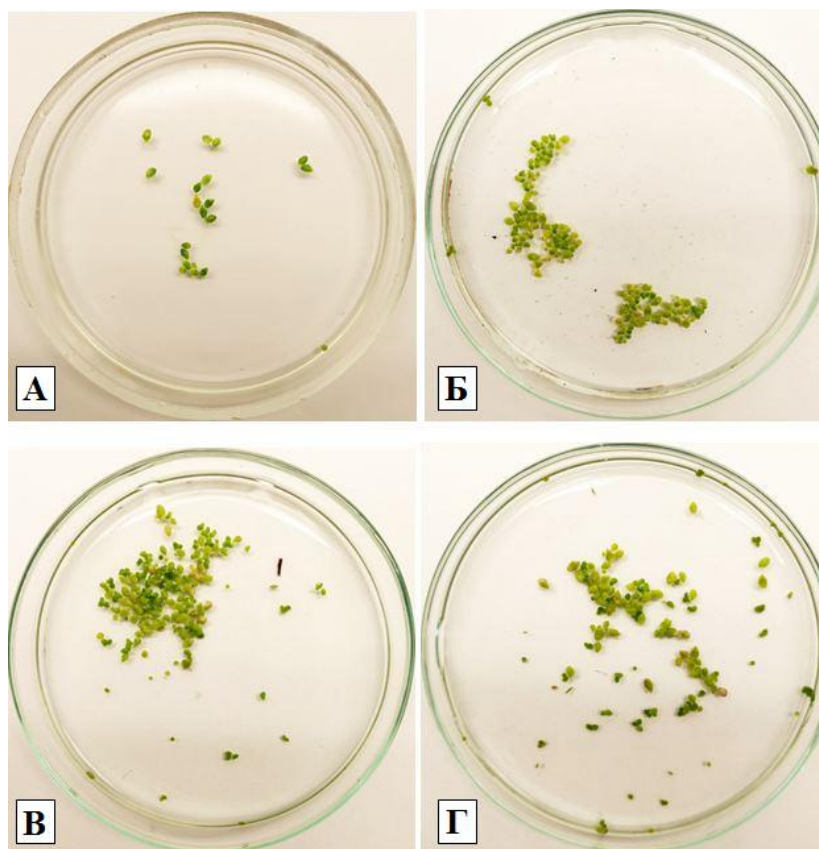


Рисунок 3.29. Ріст ряски *Lemna minor* L. до (А) та після 3 тижнів культивування на рідкому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з додаванням етанолу 70% (Б), етанольного розчину отриманого сухого екстракту (В) та кемпферолу (Г)

Оскільки отриманий екстракт мав високий вміст флавоноїдів, було проведено порівняння впливу різних флавоноїдів (стандарти) на ріст ряски (Рис. 3.30) за таких самих умов. Для дослідження обрали 4 сполуки: фісетин, кемпферол, кверцетин (відносяться до класу флавонолів) та епікатехін (клас флаванолів). Через 3 тижні культивування (Рис. 3.29, Г) кількість листеців була від 195.5 ± 30.38 шт. (при культивуванні з епікатехіном) до 219 ± 15.68 шт. (при культивуванні з кемпферолом). Тобто, в усіх дослідних зразках їх кількість була порівняною або трохи більшою, ніж в контролі, але на 11 ... 21% меншою,

ніж в зразках після культивування з екстрактом. Приріст маси листеців ряски після культивування становив від 0.063 ± 0.003 г (при культивуванні з епікатехіном) до 0.075 ± 0.007 г (при культивуванні з кверцетином). Таким чином, приріст маси листеців ряски після культивування з розчинами стандартів флавоноїдів був також порівняним або трохи вищим, ніж в контролі, але на 15.02 ... 27.85% меншим, ніж у варіанті експерименту з використанням екстракту з «бородатих» коренів. Такий результат може свідчити про рістстимулюючу дію флавоноїдів у їх сукупності, в якій вони є в комплексі, отриманому з «бородатих» коренів. Вірогідно, має місце синергійний ефект дії різних флавоноїдів – компонентів екстракту, а також можлива наявність у тестованому екстракті інших біоактивних сполук.

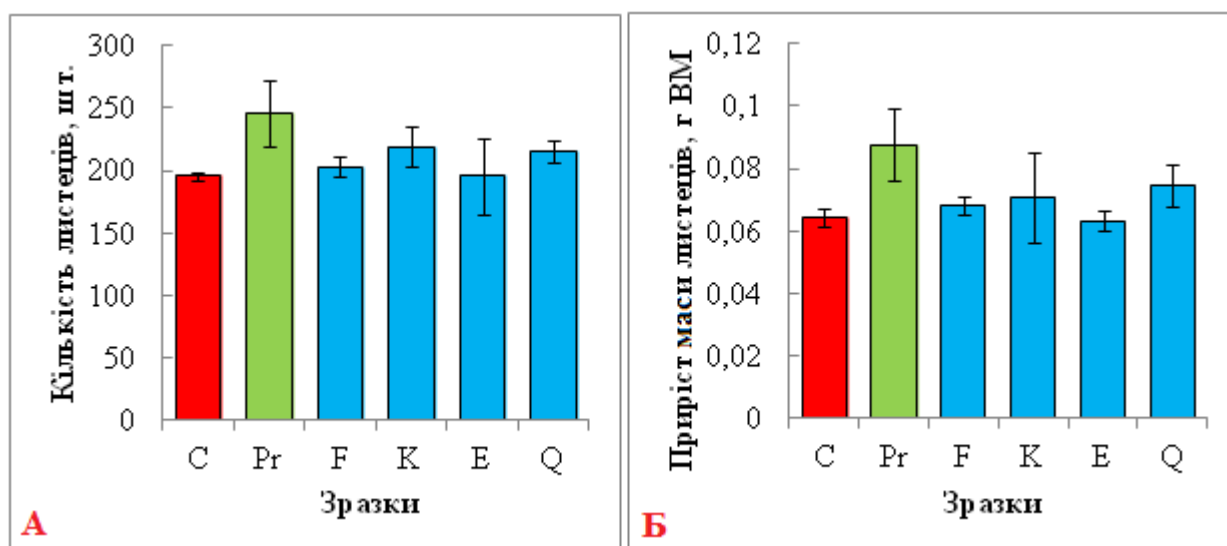


Рисунок 3.30. Кількість листеців ряски *Lemna minor* L. (А) та приріст їх маси (Б) після 3 тижнів культивування на рідкому середовищі $\frac{1}{2}$ МС з додаванням етанолу 70% (контроль, С), етанольного розчину отриманого сухого екстракту (Pr), фісетину (F), кемпферолу (К), епікатехіну (Е), кверцетину (Q)

Насьогодні є декілька препаратів на основі флавоноїдів, які використовуються у світовій практиці. Прикладами можуть слугувати препарати Accuvit® (Ache), Soyfit® (Janssen Cilag) та Ginkgo® (Herbarium).

Перший має у складі біофлавоноїди цитрусових, другий – ізофлавоноїди сухого екстракту *Glycine max* (L.) Merr., а третій – стандартизований екстракт *Ginkgo biloba* L. Перший та другий препарати зарекомендували себе як ліки з високою біоактивністю проти малярійного плазмодію *Plasmodium falciparum* (Penna-Coutinho, Aguiar & Krettli, 2018), в той час як стандарти флавоноїдів гесперидин та геністеїн були неактивними проти цього патогену. Лише кверцетин мав таку активність. Такі результати підтверджують можливість того, 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 флавоноїдвмісної композиції. Цей екстракт є біобезпечним та може бути використаний як основа для розроблення лікарських засобів, що містять біофлавоноїди.

3.3.3. Висновки до підрозділу 3.3

Оптимізований спосіб отримання сухих флавоноїдовмісних екстрактів «бородатих» коренів полину Тілесіуса, який полягає у двоетапному культивуванні коренів з метилжасмонатом, та наступною ліофілізацією і екстрагуванням дозволив отримати комплекс сполук з вмістом флавоноїдів 95.53 мг РЕ / г сухого екстракту (СЕ), тобто 9.56% сухої маси СЕ. Оскільки вміст сухої речовини у коренях становив 14.8%, з яких було отримано 270 мг сухого екстракту, таким способом можна отримати 382.12 мг флавоноїдів зі 100 г свіжих коренів.

Отриманий сухий екстракт не тільки не проявляв токсичної дії при його тестуванні на рослинах ряски *in vitro*, але й мав рістстимулюючу активність. Таким чином, даний сухий комплекс сполук, отриманий з «бородатих» коренів оптимізованим способом, може слугувати основою для виробництва біобезпечних

препаратів з рослинної сировини з антиоксидантною, протівірусною, протизапальною та відновною дією. Цей спосіб отримання біоактивного екстракту у подальшому може бути ефективно використаний при масштабуванні процесу вирощування коренів на безгормональному рідкому середовищі в біореакторах.

Результати даного розділу висвітлені у статті у фаховому виданні України (Богданович, Матвєєва, 2023d) та інших наукових працях (Богданович, Матвєєва, 2023b; Богданович, Матвєєва, 2023c).

ВИСНОВКИ

Шляхом генетичної трансформації диким штамом *Agrobacterium rhizogenes* A4 створено лінії «бородатих» коренів полину Тілесіуса та виявлено у них високий вміст флавоноїдів, антиоксидантну, відновну, протівірусну та протизапальну активність. Вперше за допомогою біотехнологічних методів доведено можливість підвищення біологічної активності у «бородатих» коренях полину Тілесіуса з використанням двоетапного культивування з метилжасмонатом при освітленні і оптимізовано спосіб отримання з цих коренів сухих екстрактів з високим вмістом флавоноїдів.

1. Дикий агропіновий штам *A. rhizogenes* A4 може бути високоефективно використаний для генетичної трансформації полину Тілесіуса (частота трансформації – 70%). Підтвердженням цього є отримання 15 нових ліній «бородатих» коренів, які мали гени *rolB* та *rolC* (і не мали генів *virD*) і характеризувалися негативним геотропізмом та здатністю рости на безгормональному середовищі.

2. Отримані лінії «бородатих» коренів відрізнялися за фізіологічними, біохімічними та морфологічними характеристиками, причому такі особливості були властиві як кореням, що мають додатково лише перенесені гени *A. rhizogenes* (зокрема, *rol*), так і тим, які мали також гетерологічні гени (*ifn-α2b* та *nptII*). Такі відмінності стосувались забарвлення, структури, швидкості росту коренів різних ліній, підвищення вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності, активності супероксиддисмутази, відмінності якісного та кількісного складу фенольних кислот у всіх зразках «бородатих» коренів порівняно з цими показниками у коренях контрольних рослин. Екстракти «бородатих» коренів проявляли також дозозалежну протизапальну активність та активність проти вірусу грипу H1N1.

3. У «бородатих» коренях *A. tilesii* *rolB* та *rolC* гени беруть участь у регуляції фізіологічних функцій: активність *rolB* та *rolC* генів корелювала з швидкістю росту; у всіх лініях більший приріст маси спостерігався у зразках з

більшою активністю *rolB* та *rolC*. Активність гена халконсинтази (*CHS*) не корелювала з вмістом флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів. Разом з тим, рівень активності фенілаланін-амоній-ліази (*PAL*) обернено співвідносився з вмістом флавоноїдів в усіх дослідних лініях: чим вищим був вміст, тим меншою була активність *PAL*. Активність гена *CHS*, так само як і активність гена *PAL*, була найвищою саме у контрольних зразках. Значимих відмінностей у відносних активностях генів *rolB*, *rolC*, *PAL* та *CHS* між двома групами ліній «бородатих» коренів не відзначалося.

4. Зміна умов культивування (умови освітлення, наявність еліситора або попередника синтезу флавоноїдів) значним чином впливає на морфологію «бородатих» коренів полину Тілесіуса, швидкість росту та біосинтез вторинних метаболітів. Освітлення стимулювало ріст коренів та вторинний метаболізм, приводячи до збільшення приросту маси, вмісту флавоноїдів та антиоксидантної активності, причому така тенденція зберігалась і при додаванні 0.05 та 0.1 мМ фенілаланіну. Додавання фенілаланіну до поживного середовища не приводило до збільшення загального вмісту флавоноїдів у всій біомасі «бородатих» коренів, оскільки такі умови вирощування приводили до пригнічення росту. Метилжасмонат у концентраціях 10, 50 та 100 мкМ значно стимулював синтез флавоноїдів та підвищував антиоксидантну активність в усіх лініях вже після двох діб культивування на середовищі із цією сполукою. Корені різних ліній відрізнялись за чутливістю до метилжасмонату та фенілаланіну за способом реагування на їх наявність у живильному середовищі.

5. Двоетапне культивування коренів *A. tilesii* з метилжасмонатом при освітленні дає можливість значно збільшити вміст флавоноїдів і таким чином оптимізувати спосіб культивування та отримання сухого флавоноїдовмісного екстракту, дозволяючи отримати комплекс сполук з вмістом флавоноїдів 95.53 мг РЕ / г сухого екстракту (СЕ), тобто 9.56% сухої маси СЕ. Оскільки вміст сухої речовини у коренях становив 14.8%, з яких було отримано 270 мг сухого екстракту, таким способом можна отримати 382.12 мг флавоноїдів зі 100 г свіжих коренів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Богданович, Т.А., Дуплій, В.П., Шаховський, А.М., Ратушняк, Я.І., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Культура «бородатих» коренів рослин полину як екологічний та продуктивний спосіб отримання біологічно активних сполук. Міжнародна наукова конференція *Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування*: матеріали Міжнар. наук. конф. (27-28 квітня 2023 р., м. Харків) / Держ. біотехнол. ун-т. – Х., 2023. – С. 95–97.
2. Богданович, Т.А., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2022а). Вплив фенілаланіну на ріст та антиоксидантну активність культури «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* за різних режимів освітлення. *«Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»: Матеріали II Міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.* (20 травня 2022 р., м. Харків). – Х. : НФаУ, 2022. – С. 65.
3. Богданович, Т.А., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2022b). Дослідження впливу фенілаланіну на ріст «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*. *«Біотехнологія XXI століття»: Матеріали XVI Всеукраїнської Науково-Практичної конференції.* (3 червня 2022 р., м. Київ.) – Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського, 2022. – С. 17.
4. Богданович, Т.А., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023а). Використання метилжасмонату як еліситора для підвищення синтезу вторинних метаболітів у «бородатих» коренях полину. *«Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»: Матеріали III Міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.* (24 березня 2023 р., м. Харків). –Х. : НФаУ, 2023. – С. 113–114.
5. Богданович, Т.А., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023b). Розробка способу отримання сухого екстракту з високим вмістом флавоноїдів з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (м. Харків, 14 квітня 2023 р.). – Х. : НФаУ, 2023. – С. 73.

6. Богданович, Т.А., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023с). Оцінка біобезпечності флавоноїдвмісної композиції на основі екстракту «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції, 19 травня 2023. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023. – С. 75–76.
7. Богданович, Т.А., & Матвєєва, Н.А. (2023d). Отримання біобезпечного флавоноїдовмісного екстракту з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *Фізіологія рослин і генетика*, 55(4), 344–354. <https://doi.org/10.15407/frg2023.04.344>
8. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А. М. Гродзінський. – К.: Українська Енциклопедія ім. М. Бажана, 1992. – 544 с.
9. Матвєєва Н. А. Створення рослин-продуцентів біологічно активних сполук шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації: дис. докт. біол. наук: 03.00.20 / Матвєєва Надія Анатоліївна; НАН України. – Київ, 2015. – 361 с.
10. Abbasi, B. H., Tian, C. L., Murch, S. J., Saxena, P. K., & Liu, C. Z. (2007). Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Plant cell reports*, 26(8), 1367–1372. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0344-5>
11. Abdelhameed, R. F. A., Nafie, M. S., Hal, D. M., Nasr, A. M., Swidan, S. A., Abdel-Kader, M. S., Ibrahim, A. K., Ahmed, S. A., Badr, J. M., & Eltamany, E. E. (2022). Comparative Cytotoxic Evaluation of *Zygophyllum album* Root and Aerial Parts of Different Extracts and Their Biosynthesized Silver Nanoparticles on Lung A549 and Prostate PC-3 Cancer Cell Lines. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(11), 1334. <https://doi.org/10.3390/ph15111334>
12. Abiri, R., Abdul-Hamid, H., Sytar, O., Abiri, R., Bezerra de Almeida, E., Jr, Sharma, S. K., Bulgakov, V. P., Arroo, R., & Malik, S. (2021). A Brief Overview of Potential Treatments for Viral Diseases Using Natural Plant Compounds: The Case of SARS-Cov. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 3868. <https://doi.org/10.3390/molecules26133868>

13. Aboul-Maaty, N. A. F., & Oraby, H. A. S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(25). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
14. Ackermann, C.E. (1977). Pflanzen aus Agrobacterium rhizogenes-Tumoren an Nicotiana tabacum. *Plant Science Letters*, 8, 23–30. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(77\)90167-5](https://doi.org/10.1016/0304-4211(77)90167-5)
15. 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. *The Plant cell*, 33(10), 3207–3234. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab189>
16. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121–6. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
17. Aghajanyan, A., Gabrielyan, L., Schubert, R., & Trchounian, A. (2020). Silver ion bioreduction in nanoparticles using Artemisia annua L. extract: characterization and application as antibacterial agents. *AMB Express*, 10(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01002-w>
18. Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 161–175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
19. Ahmed, S. S., Alqahtani, A. M., Alqahtani, T., Alamri, A. H., Menaa, F., Mani, R. K., D R, B., & Kavitha, K. (2022). Green Synthesis, Characterizations of Zinc Oxide Nanoparticles from Aqueous Leaf Extract of *Tridax procumbens* Linn. and Assessment of their Anti-Hyperglycemic Activity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(22), 8202. <https://doi.org/10.3390/ma15228202>
20. Ahuja, A., Yi, Y. S., Kim, M. Y., & Cho, J. Y. (2018). Ethnopharmacological properties of Artemisia asiatica: A comprehensive review. *Journal of ethnopharmacology*, 220, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.032>

21. 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: Volume 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds*, 74, 585–664. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_7
22. Alaska ethnobotany (Електронний ресурс). – 2023. – Режим доступу: <https://alaskaethnobotany.community.uaaf.edu/artemisia-moon-plants-for-women/> (дата звернення: 29.06.23). – Назва з екрана.
23. Alavi, M., & Karimi, N. (2018). Characterization, antibacterial, total antioxidant, scavenging, reducing power and ion chelating activities of green synthesized silver, copper and titanium dioxide nanoparticles using *Artemisia haussknechtii* leaf extract. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(8), 2066–2081. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1408121>
24. Albaqami, J. J., Benny, T. P., Hamdi, H., Altemimi, A. B., Kuttithodi, A. M., Job, J. T., Sasidharan, A., & Narayanankutty, A. (2022). Phytochemical Composition and In Vitro Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, and Enzyme-Inhibitory Activities of *Artemisia nilagirica* (C.B. Clarke) Pamp. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(20), 7119. <https://doi.org/10.3390/molecules27207119>
25. Alcalde, M. A., Müller, M., Munné-Bosch, S., Landín, M., Gallego, P. P., Bonfill, M., Palazon, J., & Hidalgo-Martinez, D. (2022). Using machine learning to link the influence of transferred *Agrobacterium rhizogenes* genes to the hormone profile and morphological traits in *Centella asiatica* hairy roots. *Frontiers in plant science*, 13, 1001023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1001023>
26. Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Park, C. H., & Park, S. U. (2015). An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI journal*, 14, 59–63. <https://doi.org/10.17179/excli2014-663>
27. AlFadly, E. D., Elzahhar, P. A., Tramarin, A., Elkazaz, S., Shaltout, H., Abu-Serie, M. M., Janockova, J., Soukup, O., Ghareeb, D. A., El-Yazbi, A. F., Rafeh, R. W., Bakkar, N. Z., Kobeissy, F., Iriepa, I., Moraleda, I., Saudi, M. N. S., Bartolini, M., & Belal, A. S. F. (2019). Tackling neuroinflammation and cholinergic deficit in

Alzheimer's disease: Multi-target inhibitors of cholinesterases, cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase. *European journal of medicinal chemistry*, 167, 161–186. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.012>

28. Ali, E. M., & Abdallah, B. M. (2021). Effective Inhibition of Invasive Pulmonary Aspergillosis by Silver Nanoparticles Biosynthesized with *Artemisia sieberi* Leaf Extract. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 12(1), 51. <https://doi.org/10.3390/nano12010051>
29. Alim-Al-Razy, M., Asik Bayazid, G.M., Rahman, R., Bosu, R., & Shamma, S.S. (2020). Silver nanoparticle synthesis, UV-Vis spectroscopy to find particle size and measure resistance of colloidal solution. *Journal of Physics: Conference Series*, 1706(1), 012020. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1706/1/012020>
30. Alsareii, S. A., Manaa Alamri, A., AlAsmari, M. Y., Bawahab, M. A., Mahnashi, M. H., Shaikh, I. A., Shettar, A. K., Hoskeri, J. H., & Kumbar, V. (2022). Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from *Rhizophora apiculata* and Studies on Their Wound Healing, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(19), 6306. <https://doi.org/10.3390/molecules27196306>
31. Altamura, M.M. (2004). Agrobacterium rhizogenes rolB and rolD genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 77, 89–101, <https://doi.org/10.1023/B:TICU.00000016609.22655.33>.
32. Amidon, C., Barnett, R., Cathers, J., Chambers, B., Hamilton, L., Kellett, A., Kennel, E., Montowski, J., Thomas, M.A., & Watson, B. (2014). *Artemisia: An Essential Guide*. The Herb Society of America. Kirtland, OH, USA.
33. Anand, A., Bass, S. H., Wu, E., Wang, N., McBride, K. E., Annaluru, N., Miller, M., Hua, M., & Jones, T. J. (2018). An improved ternary vector system for Agrobacterium-mediated rapid maize transformation. *Plant molecular biology*, 97(1-2), 187–200. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0732-y>
34. Andi, S. A., Gholami, M., Ford, C. M., & Maskani, F. (2019). The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and secondary metabolism in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Journal of*

- photochemistry and photobiology. B, Biology*, 199, 111625.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111625>
35. Aoki, S., & Syōno, K. (1999). Synergistic function of rolB, rolC, ORF13, and ORF14 of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in hairy root induction in *Nicotiana tabacum*. *Plant and Cell Physiology*, 40, 252-256.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029535>
36. Aragão, M. M., Alvarez, M. A., Caiafa, L., & Santos, M. O. (2023). *Nicotiana* hairy roots for recombinant protein expression, where to start? A systematic review. *Molecular biology reports*, 50(5), 4587–4604. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08360-1>
37. Arshad, W., Haq, I. U., Waheed, M. T., Mysore, K. S., & Mirza, B. (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with rolB gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens. *PloS one*, 9(5), e96979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096979>
38. Arya, D., & Patni, V. (2013). Pharmacognostic Profile and Phytochemical Investigation of *Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern. In vivo and In vitro. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22, 157–61.
39. Badshah, S. L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2021). Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 140, 111596. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111596>
40. Baskar, V., Venkatesh, R., & Ramalingam, S. (2018). Flavonoids (antioxidant systems) in higher plants and their response to stresses. *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Springer; Cham, Switzerland: 253–268, https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_12 (2018)
41. Bergier, K., Kuźniak, E., & Skłodowska, M. (2012). Antioxidant potential of *Agrobacterium*-transformed and non-transformed *Physalis ixocarpa* plants grown in vitro and ex vitro. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 66, 976–982. <https://doi.org/10.5604/17322693.1023086>

42. Bernard, G., Alves Dos Santos, H., Etienne, A., Samaillie, J., Neut, C., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Gagneul, D., Jullian, N., Tahrioui, A., Chevalier, S., Rivière, C., & Rambaud, C. (2020). MeJA Elicitation of Chicory Hairy Roots Promotes Efficient Increase of 3,5-diCQA Accumulation, a Potent Antioxidant and Antibacterial Molecule. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(10), 659. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100659>
43. Beyer, W. F., Jr, & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), 559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
44. Bohdanovych, T., Matvieieva, N. (Eds.). (2020). Production of flavonoids with antioxidant properties by biotechnological “hairy” root culture of *Artemisia tilesii* wormwood. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції*. Харків. 26 листопада 2020. – С.9.
45. Bohdanovych, T., Matvieieva, N. (Eds.). (2021). Effect of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation on the antioxidant status of *Tilesius*’ wormwood “hairy” roots. *Biology, Biotechnology, Biomedicine: Materials of Young Scientists International Conference 3-5 July 2021*. Odesa: Odesa I.I. Mechnikov National University. – P. 11–15.
46. Bohdanovych, T., Shakhovsky, A., Duplij, V., Ratushnyak, Y., Kuchuk, M., Poyedinok, N., & Matvieieva, N. (2021). Effects of Genetic Transformation on the Antioxidant Activity of “Hairy” Roots of *Althaea officinalis* L., *Artemisia vulgaris* L., and *Artemisia tilesii* Ledeb. *Cytology and genetics* (USA, Allerton Press Inc., Springer), 55(6), 531–539. <https://doi.org/10.3103/S0095452721060037>
47. Bohdanovych, T., Morgun, B., Lakhneko, O., Shakhovsky, A., & Matvieieva, N. (2022). Peculiarities of the growth of *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” roots with different foreign genes. *Biotechnologia Acta*, 15(3), 13–22. <https://doi.org/10.15407/biotech15.03.013>
48. Bohdanovych T., Starosyla D., Rybalko S., Kobylinska N., Matvieieva N. (Eds.). (2022). “Hairy” roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. as a promising candidate for anti-

- influenza treatment. All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with International Participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against russian invaders: conference proceedings, June 15-17, 2022. Kyiv, Ukraine. – P. 109.
49. Bohdanovych, T., & Matvieieva, N. (2022a). Optical characteristics of silver nanoparticles obtained using *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” root extracts with high flavonoid content. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, 6(3-4), 169–177. <https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.3-4.271259>
50. Bohdanovych, T., Matvieieva, N. (Eds.). (2022b). Determination of the possibility of using phenylalanine to intensify the biosynthesis of flavonoids in wormwood “hairy” roots. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції* (м. Харків, 13 жовтня 2022 р.). Х.: Вид-во НФаУ, 2022. – С. 16.
51. Bohdanovych T., Klymchuk D., Matvieieva N. (Eds.). (2023). Characteristics of nanoparticles obtained via “green” synthesis using *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” root extracts. X International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (16-19 August, Bukovel). – Kyiv: LLC APF POLYGRAPH SERVICE, 2023. – P. 331.
52. Bohdanovych, T., Matvieieva, N. (Eds.). (2023a). Effect of genetic transformation as a stress factor on reducing activity of wormwood “hairy” roots. *Plant Stress and Adaptation: Abstracts of the Second International Scientific Conference, dedicated to the 125th anniversary of the birth of Prof. F.P. Matskov* (Kharkiv, 7-8 June 2023). – P. 24.
53. Bohdanovych, T., & Matvieieva, N. (2023b). Effect of phenylalanine and light on the growth of hairy roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Biotechnologia Acta*, 16(5), 61–69. <https://doi.org/10.15407/biotech16.05.061>
54. Bordoni, V., Sanna, L., Lyu, W., Avitabile, E., Zoroddu, S., Medici, S., Kelvin, D. J., & Bagella, L. (2021). Silver Nanoparticles Derived by *Artemisia arborescens* Reveal Anticancer and Apoptosis-Inducing Effects. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8621. <https://doi.org/10.3390/ijms22168621>

55. Borrelli, G. M., & Trono, D. (2016). Molecular Approaches to Genetically Improve the Accumulation of Health-Promoting Secondary Metabolites in Staple Crops – A Case Study: The Lipoxygenase-B1 Genes and Regulation of the Carotenoid Content in Pasta Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1177. <https://doi.org/10.3390/ijms17071177>
56. 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. *Frontiers in endocrinology*, 12, 727061. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.727061>
57. Bown, D. 2001. The Herb Society of America new encyclopedia of herbs and their uses. New York: Dorling Kindersley. P. 131.
58. Box, M. S., Coustham, V., Dean, C., & Mylne, J. S. (2011). Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis. *Plant methods*, 7, 7. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-7>
59. Bradbury, J.F. (1986). *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew.
60. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
61. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lwt - Food Science and Technology*, 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
62. Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., Zvereva, E. V., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *Journal of biotechnology*, 97(3), 213–221. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00067-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00067-6)
63. Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Shkryl, Y. N., Glazunov, V. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2003). Effects of Ca(2+) channel blockers

- and protein kinase/phosphatase inhibitors on growth and anthraquinone production in *Rubia cordifolia* callus cultures transformed by the rolB and rolC genes. *Planta*, 217(3), 349–355. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-0996-5>
64. Bulgakov, V. P., Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Gorpenchenko, T. Y., & Vereshchagina, Y. V. (2013). Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 134, 1–22. https://doi.org/10.1007/10_2013_179
65. Bulgakov, V. P., Veremeichik, G. N., & Shkryl, Y. N. (2015). The rolB gene activates the expression of genes encoding microRNA processing machinery. *Biotechnology letters*, 37(4), 921–925. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1743-7>
66. Bulgakov, V. P., Vereshchagina, Y. V., Bulgakov, D. V., Veremeichik, G. N., & Shkryl, Y. N. (2018). The rolB plant oncogene affects multiple signaling protein modules related to hormone signaling and plant defense. *Scientific reports*, 8(1), 2285. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20694-6>
67. Cao, D. M., Vu, P. T. B., Hoang, M. T. T., Bui, A. L., & Quach, P. N. D. (2020). Developing a Sufficient Protocol for the Enhancement of α -Glucosidase Inhibitory Activity by *Urena lobata* L. Aeroponic Hairy Roots Using Exogenous Factors, a Precursor, and an Elicitor. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(4), 548. <https://doi.org/10.3390/plants9040548>
68. Cardillo, A. B., Giulietti, A. M., Palazón, J., and Bonfill, M. (2013). Influence of hairy root ecotypes on production of tropane alkaloids in *Brugmansia candida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114, 305–312. doi: <https://doi.org/10.1007/S11240-013-0326-Y/FIGURES/5>
69. Cardon, F., Pallisse, R., Bardor, M., Caron, A., Vanier, J., Ele Ekouna, J. P., Lerouge, P., Boitel-Conti, M., & Guillet, M. (2019). Brassica rapa hairy root based expression system leads to the production of highly homogenous and reproducible profiles of recombinant human α -L-iduronidase. *Plant Biotechnology Journal*, 17(2), 505–516. <https://doi.org/10.1111/pbi.12994>

- 70.Chen, D. H., Liu, C. J., Ye, H. C., Li, G. F., Liu, B. Y., Meng, Y. L., & Chen, X. Y. (1999). Ri-mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57(3), 157–162. <https://doi.org/10.1023/A:1006326818509>
- 71.Chen, F., Yang, L., Huang, Y., Chen, Y., Sang, H., Duan, W., & Yang, J. (2020). Isocorilagin, isolated from *Canarium album* (Lour.) Raeusch, as a potent neuraminidase inhibitor against influenza A virus. *Biochemical and biophysical research communications*, 523(1), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.043>
- 72.Cho, H. J., Moy, Y., Rudnick, N. A., Klein, T. M., Yin, J., Bolar, J., Hendrick, C., Beatty, M., Castañeda, L., Kinney, A. J., Jones, T. J., & Chilcoat, N. D. (2022). Development of an efficient marker-free soybean transformation method using the novel bacterium *Ochrobactrum haywardense* H1. *Plant biotechnology journal*, 20(5), 977–990. <https://doi.org/10.1111/pbi.13777>
- 73.Chung, I. M., Rekha, K., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2016). Production of glucosinolates, phenolic compounds and associated gene expression profiles of hairy root cultures in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *3 Biotech*, 6(2), 175. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0492-9>
- 74.Chung, I.-M., Rekha, K., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2018). Influence of silver nanoparticles on the enhancement and transcriptional changes of glucosinolates and phenolic compounds in genetically transformed root cultures of *Brassica rapa* ssp. *rapa*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(11), 1665–1677. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1991-3>
- 75.Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2(53). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- 76.Daspute, A. A., Yunxuan, X., Gu, M., Kobayashi, Y., Wagh, S., Panche, A., & Koyama, H. (2019). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy roots transformation as a tool for exploring aluminum-responsive genes function. *Future science OA*, 5(3), FSO364. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0065>

- 77.de Castro, K.M., Batista, D.S., Fortini, E.A., Silva, T.D., Felipe, S.H., Fernandes, A.M., de Jesus Sousa, R.M., de Queiroz Nascimento, L.S., Campos, V.R., Grazul, R.M., Viccini, L.F., & Otoni, W.C. (2019). Photoperiod modulates growth, morphoanatomy, and linalool content in *Lippia alba* L. (Verbenaceae) cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139, 139 - 153. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01672-w>
- 78.De Cleene, M. & J. De Ley. (1981). The host range of infectious hairyroot. *The Botanical Review*, 47: 147–194. <https://doi.org/10.1007/BF02868853>
- 79.Deighani, F., Mosleh-Shirazi, S., Shafiee, M., Kasaei, S. R., & Amani, A. M. (2023). Antiviral and antioxidant properties of green synthesized gold nanoparticles using *Glaucium flavum* leaf extract. *Applied nanoscience*, 13(6), 4395–4405. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02705-1>
- 80.Dehio, C., Grossmann, K., Schell, J., & Schmülling, T. (1993). Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the rolA gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant molecular biology*, 23(6), 1199–1210. <https://doi.org/10.1007/BF00042353>
- 81.Demirci, T., Çelikkol Akçay, U., & Göktürk Baydar, N. (2020). Effects of 24-epibrassinolide and l-phenylalanine on growth and caffeic acid derivative production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* L. Moench. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(4), 66. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03055-7>
- 82.Dilshad, E., Cusido, R. M., Palazon, J., Estrada, K. R., Bonfill, M., & Mirza, B. (2015). Enhanced artemisinin yield by expression of rol genes in *Artemisia annua*. *Malaria journal*, 14, 424. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0951-5>
- 83.Dilshad, E., Ismail, H., Haq, I. U., Cusido, R. M., Palazon, J., Ramirez-Estrada, K., & Mirza, B. (2016a). Rol genes enhance the biosynthesis of antioxidants in *Artemisia carvifolia* Buch. *BMC plant biology*, 16(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0811-7>
- 84.Dilshad, E., Zafar, S., Ismail, H., Waheed, M. T., Cusido, R. M., Palazon, J., & Mirza, B. (2016b). Effect of Rol Genes on Polyphenols Biosynthesis in *Artemisia annua* and Their Effect on Antioxidant and Cytotoxic Potential of the Plant. *Applied*

biochemistry and biotechnology, 179(8), 1456–1468. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2077-9>

85. Dilshad, E., Noor, H., Nosheen, N., Gilani, S. R., Ali, U., and Khan, M. A. (2021). Influence of rol Genes for Enhanced Biosynthesis of Potent Natural Products. In *Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds*. (USA: John Wiley & Sons, Ltd), 379–404.
86. Dogra, S., Singh, J., Koul, B., & Yadav, D. (2023). *Artemisia vestita*: A Folk Medicine with Hidden Herbal Fortune. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(6), 2788. <https://doi.org/10.3390/molecules28062788>
87. Dutta, M. S., Mahapatra, P., Ghosh, A., & Basu, S. (2022). Estimation of the reducing power and electrochemical behavior of few flavonoids and polyhydroxybenzophenones substantiated by bond dissociation energy: a comparative analysis. *Molecular diversity*, 26(2), 1101–1113. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10232-4>
88. 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(19), 4415. <https://doi.org/10.3390/molecules25194415>
89. Ekiert, H., Świątkowska, J., Knut, E., Klin, P., Rzepiela, A., Tomczyk, M., & Szopa, A. (2021). *Artemisia dracunculus* (Tarragon): A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in pharmacology*, 12, 653993. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.653993>
90. 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(19), 6427. <https://doi.org/10.3390/molecules27196427>
91. Elemike, E. E., Onwudiwe, D. C., Ekennia, A. C., & Jordaan, A. (2018). Synthesis and characterisation of silver nanoparticles using leaf extract of *Artemisia afra* and

- their in vitro antimicrobial and antioxidant activities. *IET nanobiotechnology*, 12(6), 722–726. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0297>
- 92.El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J., & Ahmad, M. (2017). Genetic Transformation and Hairy Root Induction Enhance the Antioxidant Potential of *Lactuca serriola* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/5604746>
- 93.El-Nashar, H. A. S., Eldahshan, O. A., Fattah, N. F. A., Loutfy, S. A., & Abdel-Salam, I. M. (2023). HPLC-ESI/MS-MS characterization of compounds in *Dolomiaea costus* extract and evaluation of cytotoxic and antiviral properties: molecular mechanisms underlying apoptosis-inducing effect on breast cancer. *BMC complementary medicine and therapies*, 23(1), 354. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04164-9>
- 94.Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., & Ekpo, O. E. (2018). Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 6241017. <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
- 95.Estruch, J. J., Schell, J., & Spena, A. (1991). The protein encoded by the rolB plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *The EMBO journal*, 10(11), 3125–3128. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04873.x>
- 96.Eungsuwan, N., Chayjarung, P., Pankam, J., Pilaisangsuree, V., Wongshaya, P., Kongbangkerd, A., Sriphannam, C., & Limmongkon, A. (2021). Production and antimicrobial activity of trans-resveratrol, trans-arachidin-1 and trans-arachidin-3 from elicited peanut hairy root cultures in shake flasks compared with bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 326, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.006>
- 97.Feng, X., Cao, S., Qiu, F., & Zhang, B. (2020). Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacology & therapeutics*, 216, 107650. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107650>
- 98.Ferraz, C. R., Carvalho, T. T., Manchope, M. F., Artero, N. A., Rasquel-Oliveira, F. S., Fattori, V., Casagrande, R., & Verri, W. A., Jr (2020). Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and

- Clinical Data, and Pharmaceutical Development. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(3), 762. <https://doi.org/10.3390/molecules25030762>
99. Fierascu, I. C., Fierascu, I., Baroi, A. M., Ungureanu, C., Ortan, A., Avramescu, S. M., Somoghi, R., Fierascu, R. C., & Dinu-Parvu, C. E. (2022). Phytosynthesis of Biological Active Silver Nanoparticles Using *Echinacea purpurea* L. Extracts. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(20), 7327. <https://doi.org/10.3390/ma15207327>
 100. Gai, Q.-Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z.-F., Zu, Y.-G., Ma, W., & Fu, Y.-J. (2015). Establishment of Hairy Root Cultures by *Agrobacterium Rhizogenes* Mediated Transformation of *Isatis Tinctoria* L. for the Efficient Production of Flavonoids and Evaluation of Antioxidant Activities. *PLOS ONE*, 10(3), e0119022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119022>
 101. Gajurel, G., Nopo-Olazabal, L., Hendrix, E., & Medina-Bolivar, F. (2022). Production and Secretion of Isowighteone in Hairy Root Cultures of Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) Co-Treated with Multiple Elicitors. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(6), 834. <https://doi.org/10.3390/plants11060834>
 102. Gallego, A. How to choose the right *Agrobacterium* vector for plant transformation. 2023. (Electronic resource) <https://goldbio.com/articles/article/How-to-choose-the-right-Agrobacterium-vector>
 103. Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
 104. Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T. (2005). Class I. Alphaproteobacteria *class. nov.* In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, Boston, MA. P.325-344. https://doi.org/10.1007/978-0-387-29298-4_1
 105. Gaume, A., Komarnytsky, S., Borisjuk, N., & Raskin, I. (2003). Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant cell reports*, 21(12), 1188–1193. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0660-3>

106. Georgiev, M. I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., & Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in biotechnology*, 30(10), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.001>
107. 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 Physiology and Biochemistry*, 148, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.002>
108. Ghimire, B. K., Thiruvengadam, M., & Chung, I.-M. (2019). Identification of elicitors enhances the polyphenolic compounds and pharmacological potential in hairy root cultures of *Aster scaber*. *South African Journal of Botany*, 125, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.006>
109. Giovannini, A., Pecchioni, N., Rabaglio, M., & Allavena, A. (1997). Characterization of ornamental *Datura* plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 33, 101-106. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0004-z>
110. Golonko, A., Olichwier, A. J., Swislocka, R., Szczerbinski, L., & Lewandowski, W. (2022). Why Do Dietary Flavonoids Have a Promising Effect as Enhancers of Anthracyclines? Hydroxyl Substituents, Bioavailability and Biological Activity. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 391. <https://doi.org/10.3390/ijms24010391>
111. González, A., Casado, J., & Lanas, Á. (2021). Fighting the Antibiotic Crisis: Flavonoids as Promising Antibacterial Drugs Against *Helicobacter pylori* Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 709749. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.709749>
112. Grijalva-Guiza, R. E., Jiménez-Garduño, A. M., & Hernández, L. R. (2021). Potential Benefits of Flavonoids on the Progression of Atherosclerosis by Their Effect on Vascular Smooth Muscle Excitability. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(12), 3557. <https://doi.org/10.3390/molecules26123557>
113. Gurusamy, P. D., Schäfer, H., Ramamoorthy, S., & Wink, M. (2017). Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root

- cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. *PLOS ONE*, 12(8), e0182367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182367>
114. Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy Root Cultures-A Versatile Tool With Multiple Applications. *Frontiers in plant science*, 11, 33. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>
 115. Hamdani, S., Bouchentouf, S., & Allali, H. (2023). Modeling the Antiviral Activity of Ginkgo Biloba Polyphenols Against Variola: In Silico Exploration of Inhibitory Candidates for Vartmpk and Hsstmprk Enzymes. *Current drug discovery technologies*, 10.2174/0115701638261541230922095853. Advance online publication. <https://doi.org/10.2174/0115701638261541230922095853>
 116. Han, X., Kui, M., He, K., Yang, M., Du, J., Jiang, Y., & Hu, Y. (2023). Jasmonate-regulated root growth inhibition and root hair elongation. *Journal of experimental botany*, 74(4), 1176–1185. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac441>
 117. Hansen, G., Vaubert, D., Héron, J.N., Clérot, D., Tempé, J., & Brevet, J. (1993). Phenotypic effects of overexpression of *Agrobacterium rhizogenes* T- DNA ORF13 in transgenic tobacco plants are mediated by diffusible factor(s). *Plant Journal*, 4, 581-585. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04030581.x>
 118. Hao, C., Wang, S., Wang, Y.H., Hou, X., Jiang, Y., Jiang, B., Zhang, X., Hua, X., & Xue, Z. (2021). Technology and Application of Hairy Root Culture in Monocotyledons. *Current Biochemical Engineering*, 7(1), 2021, 31-37. <https://doi.org/10.2174/2212711907666210525115018>
 119. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., Hossen, M. S., Zulfiqar, F., Alam, M. M., & Fujita, M. (2020). Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8695. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>
 120. Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2021). Regulation of Reactive Oxygen

Species and Antioxidant Defense in Plants under Salinity. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9326. <https://doi.org/10.3390/ijms22179326>

121. Hashemi, S. M., & Naghavi, M. R. (2016). Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125, 31–41. <https://doi.org/10.1007/S11240-015-0927-8/FIGURES/8>
122. 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. *Journal of plant physiology*, 239, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.05.008>
123. He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
124. Hooykaas, M., & Hooykaas, P. (2021). The genome sequence of hairy root *Rhizobium rhizogenes* strain LBA9402: Bioinformatics analysis suggests the presence of a new opine system in the agropine Ri plasmid. *MicrobiologyOpen*, 10(2), e1180. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1180>
125. Ho-Plágaro, T., Huertas, R., Tamayo-Navarrete, M. I., Ocampo, J. A., & García-Garrido, J. M. (2018). An improved method for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of tomato suitable for the study of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant methods*, 14, 34. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0304-9>
126. 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(15), 4682. <https://doi.org/10.3390/molecules26154682>
127. Hu, X., Zhu, T., Min, X., He, J., Hou, C., & Liu, X. (2023). Integrated Metabolomic and Transcriptomic Analysis of Puerarin Biosynthesis in *Pueraria*

- montana* var. *thomsonii* at Different Growth Stages. *Genes*, 14(12), 2230.
<https://doi.org/10.3390/genes14122230>
128. Huang, W., Kong, R., Chen, L., & An, Y. (2022). Physiological responses and antibiotic-degradation capacity of duckweed (*Lemna aequinoctialis*) exposed to streptomycin. *Frontiers in plant science*, 13, 1065199.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1065199>
 129. Ishida, J. K., Yoshida, S., Ito, M., Namba, S., & Shirasu, K. (2011). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *PloS one*, 6(10), e25802.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025802>
 130. 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, 9961089. <https://doi.org/10.1155/2021/9961089>
 131. Jacob, A.I., & Malpathak, N.P. (2004). Green hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke - a new route to in vitro solasodine production. *Current Science*, 87, 1442-1447. <https://www.jstor.org/stable/24109486>
 132. Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, & Kim, K.-M. (2021). Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 11(5), 968.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>
 133. Janačković, P., Rajčević, N., Gavrilović, M., Novaković, J., Giweli, A.A., Stešević, D., & Marin, P.D. (2019). Essential oil composition of five *Artemisia* (Compositae) species in regards to chemophenetics. *Biochemical Systematics and Ecology*, 87, 103960. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.103960>.
 134. Jeong, S., Kim, J., & Min, H. (2018). In vitro anti-inflammatory activity of the *Artemisia montana* leaf ethanol extract in macrophage RAW 264.7 cells. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 688-698.
<https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1439454>

135. Jian, B., Hou, W., Wu, C., Liu, B., Liu, W., Song, S., Bi, Y., & Han, T. (2009). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Superroot-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC plant biology*, 9, 78. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-78>
136. Jiao, J., Gai, Q.-Y., Fu, Y.-J., Ma, W., Peng, X., Tan, S.-N., & Efferth, T. (2014). Efficient Production of Isoflavonoids by *Astragalus membranaceus* Hairy Root Cultures and Evaluation of Antioxidant Activities of Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(52), 12649–12658. <https://doi.org/10.1021/jf503839m>
137. Jiao, J., Gai, Q.-Y., Niu, L.-L., Wang, X.-Q., Guo, N., Zang, Y.-P., & Fu, Y.-J. (2017). Enhanced Production of Two Bioactive Isoflavone Aglycones in *Astragalus membranaceus* Hairy Root Cultures by Combining Deglycosylation and Elicitation of Immobilized Edible *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(41), 9078–9086. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03148>
138. Jiao, J., Gai, Q.-Y., Yao, L.-P., Niu, L.-L., Zang, Y.-P., & Fu, Y.-J. (2018). Ultraviolet radiation for flavonoid augmentation in *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures mediated by oxidative stress and biosynthetic gene expression. *Industrial Crops and Products*, 118, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.046>
139. Joshi, T., Joshi, T., Sharma, P., Mathpal, S., Pundir, H., Bhatt, V., & Chandra, S. (2020). In silico screening of natural compounds against COVID-19 by targeting Mpro and ACE2 using molecular docking. *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(8), 4529–4536. https://doi.org/10.26355/eurev_202004_21036
140. Kamarya, Y., Lijie, X., & Jinyao, L. (2022). Chemical Constituents and Antitumor Mechanisms of *Artemisia*. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 22(10), 1838–1844. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210708125230>
141. Kanazawa, R., Morimoto, R., Horio, Y., Sumitani, H., & Isegawa, Y. (2022). Inhibition of influenza virus replication by Apiaceae plants, with special reference to *Peucedanum japonicum* (Sacna) constituents. *Journal of ethnopharmacology*, 292, 115243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115243>

142. Kang, B., Maeshige, T., Okamoto, A., Kataoka, Y., Yamamoto, S., Rikiishi, K., Tani, A., Sawada, H., & Suzuki, K. (2020). The Presence of the Hairy-Root-Disease-Inducing (Ri) Plasmid in Wheat Endophytic Rhizobia Explains a Pathogen Reservoir Function of Healthy Resistant Plants. *Applied and environmental microbiology*, 86(17), e00671-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00671-20>
143. Kareem, Z. J., Su, L., Rathgeb, A., Sirrenberg, A., Hadacek, F., Rashid, A. H. A. H., & Karlovsky, P. (2019). Small-Scale Bioreactor for Sterile Hydroponics and Hairy Roots: Metabolic Diversity and Salicylic Acid Exudation by Hairy Roots of *Hyoscyamus niger*. *Applied Sciences*, 9(15), 3044. <https://doi.org/10.3390/app9153044>
144. Kasote, D. M., Hegde, M. V., & Katyare, S. S. (2013). Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy. *BioFactors (Oxford, England)*, 39(4), 392–406. <https://doi.org/10.1002/biof.1093>
145. Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, 11(8), 982–991. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12096>
146. Kari, P.R. (1995). *TANAINA PLANTLORE: Dena'ina k'et'una*. Adult Literacy Laboratory, University of Alaska, Anchorage. p.139
147. Kaul, R., Paul, P., Kumar, S., Büsselberg, D., Dwivedi, V. D., & Chaari, A. (2021). Promising Antiviral Activities of Natural Flavonoids against SARS-CoV-2 Targets: Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11069. <https://doi.org/10.3390/ijms222011069>
148. Kebert, M., Kostić, S., Vuksanović, V., Gavranović Markić, A., Kiproviski, B., Zorić, M., & Orlović, S. (2022). Metal- and Organ-Specific Response to Heavy Metal-Induced Stress Mediated by Antioxidant Enzymes' Activities, Polyamines, and Plant Hormones Levels in *Populus deltoides*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(23), 3246. <https://doi.org/10.3390/plants11233246>

149. Khan, J., Deb, P. K., Priya, S., Medina, K. D., Devi, R., Walode, S. G., & Rudrapal, M. (2021). Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 4021. <https://doi.org/10.3390/molecules26134021>
150. Kianfar, S., Salimi, V., Jahangirifard, A., Mirtajani, S. B., Vaezi, M. A., Yavarian, J., Mokhtari-Azad, T., & Tavakoli-Yaraki, M. (2023). 15-lipoxygenase and cyclooxygenase expression profile and their related modulators in COVID-19 infection. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 197, 102587. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2023.102587>
151. Kim, S., Jeong, Y. J., Park, S. H., Park, S. C., Lee, S. B., Lee, J., Kim, S. W., Ha, B. K., Kim, H. S., Kim, H., Ryu, Y. B., Jeong, J. C., & Kim, C. Y. (2020). The Synergistic Effect of Co-Treatment of Methyl Jasmonate and Cyclodextrins on Pterocarpin Production in *Sophora flavescens* Cell Cultures. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3944. <https://doi.org/10.3390/ijms21113944>
152. Kim, Y.K., Li, X., Xu, H., Park, N.I., Uddin, M.R., Pyon, J.Y., & Park, S.U. (2009). Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12(1), 53-57. <https://doi.org/10.1007/s12892-009-0075-y>
153. Kim, Y. S., Li, X., Park, W. T., Uddin, R., Park, N. Il, Kim, Y. B., Lee, M. Y., & Park, S. U. (2012). Influence of media and auxins on growth and flavone production in hairy root cultures of baikal skullcap, *Scutellaria baicalensis*. *Plant Omics Journal*, 4(1), 24–27.
154. Kiselev, K. V., Dubrovina, A. S., Veselova, M. V., Bulgakov, V. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2007). The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of biotechnology*, 128(3), 681–692. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.008>
155. Kiyokawa, S., Kikuchi, Y., Kamada, H., & Harada, H. (1996). Genetic transformation of *Begonia tuberhybrida* by Ri rol genes. *Plant cell reports*, 15(8), 606–609. <https://doi.org/10.1007/BF00232462>

156. Kobylinska, N., Shakhovsky, A., Khainakova, O., Klymchuk, D., Avdeeva, L., Ratushnyak, Y., Duplij, V., & Matvieieva, N. (2020). 'Hairy' root extracts as source for 'green' synthesis of silver nanoparticles and medical applications. *RSC advances*, 10(65), 39434–39446. <https://doi.org/10.1039/d0ra07784d>
157. Kodah, N., Müller, R., & Lütken, H. (2016). The *Agrobacterium rhizogenes* oncogenes *rolB* and *ORF13* increase formation of generative shoots and induce dwarfism in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Science*, 252, 22–29, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.020>.
158. Korovesis, D., Rubio-Tomás, T., & Tavernarakis, N. (2023). Oxidative Stress in Age-Related Neurodegenerative Diseases: An Overview of Recent Tools and Findings. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(1), 131. <https://doi.org/10.3390/antiox12010131>
159. Kowalczyk, T., Merecz-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(5), 1242. <https://doi.org/10.3390/cells10051242>
160. Kowalczyk, T., Sitarek, P., Śliwiński, T., Hatziantoniou, S., Soulintzi, N., Pawliczak, R., & Wieczfinska, J. (2023). New Data on Anti-Inflammatory and Wound Healing Potential of Transgenic *Senna obtusifolia* Hairy Roots: In Vitro Studies. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5906. <https://doi.org/10.3390/ijms24065906>
161. 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(3), 992. <https://doi.org/10.3390/molecules27030992>
162. Kshirsagar, S. G., & Rao, R. V. (2021). Antiviral and Immunomodulation Effects of Artemisia. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(3), 217. <https://doi.org/10.3390/medicina57030217>

163. Kumar, D., Yusuf, M. A., Singh, P., Sardar, M., & Sarin, N. B. (2013). Modulation of antioxidant machinery in α -tocopherol-enriched transgenic *Brassica juncea* plants tolerant to abiotic stress conditions. *Protoplasma*, 250(5), 1079–1089.
164. Kumar, S. S., Arya, M., Mahadevappa, P., & Giridhar, P. (2020). Influence of photoperiod on growth, bioactive compounds and antioxidant activity in callus cultures of *Basella rubra* L. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 209, 111937. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111937>
165. Kumar, V., Bishayee, K., Park, S., Lee, U., & Kim, J. (2023). Oxidative stress in cerebrovascular disease and associated diseases. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1124419. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1124419>
166. Kuźma, Ł., Bruchajzer, E., & Wysokińska, H. (2009). Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6–7), 406–410. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.01.005>
167. Lam, P. Y., Wang, L., Lui, A. C. W., Liu, H., Takeda-Kimura, Y., Chen, M. X., Zhu, F. Y., Zhang, J., Umezawa, T., Tobimatsu, Y., & Lo, C. (2022). Deficiency in flavonoid biosynthesis genes CHS, CHI, and CHIL alters rice flavonoid and lignin profiles. *Plant physiology*, 188(4), 1993–2011. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab606>
168. Lavrentaki, V., Kousaxidis, A., Theodosis-Nobelos, P., Papagiouvannis, G., Koutsopoulos, K., & Nicolaou, I. (2023). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of indazole carboxamides of N-substituted pyrrole derivatives as soybean lipoxygenase inhibitors. *Molecular diversity*, 10.1007/s11030-023-10775-8. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s11030-023-10775-8>
169. Leuti, A., Fava, M., & Maccarrone, M. (2023). A game of networks: Do different lipids interact to orchestrate inflammatory homeostasis?. *Cell chemical biology*, 30(12), 1499–1501. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.11.001>
170. Li, H., Li, M., Xu, R., Wang, S., Zhang, Y., Zhang, L., Zhou, D., & Xiao, S. (2019). Synthesis, structure activity relationship and in vitro anti-influenza virus

- activity of novel polyphenol-pentacyclic triterpene conjugates. *European journal of medicinal chemistry*, 163, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.006>
171. Li, J., Sun, M., Cui, X., & Li, C. (2022). Protective Effects of Flavonoids against Alzheimer's Disease: Pathological Hypothesis, Potential Targets, and Structure-Activity Relationship. *International journal of molecular sciences*, 23(17), 10020. <https://doi.org/10.3390/ijms231710020>
 172. Lianza, M., Mandrone, M., Chiocchio, I., Tomasi, P., Marincich, L., & Poli, F. (2020). Screening of ninety herbal products of commercial interest as potential ingredients for phytocosmetics. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 35(1), 1287–1291. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1774571>
 173. Lincoln, J. E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., & Gilchrist, D. G. (2002). Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 15217–15221. <https://doi.org/10.1073/pnas.232579799>
 174. Liu, C., Guo, C., Wang, Y., & Fan, O. (2002). Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*, 38(4), 581–585. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00165-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00165-6)
 175. Liu, C., Towler, M. J., Medrano, G., Cramer, C. L., & Weathers, P. J. (2009). Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1074–1086. <https://doi.org/10.1002/bit.22154>
 176. Luchakivskaya, Y. S., Olevinskaya, Z. M., Kishchenko, E. M., Spivak, N. Y., & Kuchuk, N. V. (2012). Obtaining of hairy-root, callus and suspension cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b. *Cytology and Genetics*, 46(1), 15–20. <https://doi.org/10.3103/S0095452712010057>
 177. Makhzoum, A. B., Sharma, P., Bernards, M. A., & Trémouillaux-Guiller, J. (2013). Hairy roots: An ideal platform for transgenic plant production and other promising applications. *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment*, 42, 95–142. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4066-6_6/COVER

178. Malarz, J., Michalska, K., Yudina, Y. V., & Stojakowska, A. (2022). Hairy Root Cultures as a Source of Polyphenolic Antioxidants: Flavonoids, Stilbenoids and Hydrolyzable Tannins. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(15), 1950. <https://doi.org/10.3390/plants11151950>
179. Malarz, J., Yudina, Y. V., & Stojakowska, A. (2023). Hairy Root Cultures as a Source of Phenolic Antioxidants: Simple Phenolics, Phenolic Acids, Phenylethanoids, and Hydroxycinnamates. *International journal of molecular sciences*, 24(8), 6920. <https://doi.org/10.3390/ijms24086920>
180. Malik, S., de Mesquita, L. S. S., Silva, C. R., de Mesquita, J. W. C., de Sá Rocha, E., Bose, J., Abiri, R., de Maria Silva Figueiredo, P., & Costa-Júnior, L. M. (2019). Chemical Profile and Biological Activities of Essential Oil from *Artemisia vulgaris* L. Cultivated in Brazil. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 12(2), 49. <https://doi.org/10.3390/ph12020049>
181. Mandal, D., Sarkar, T., & Chakraborty, R. (2023). Critical Review on Nutritional, Bioactive, and Medicinal Potential of Spices and Herbs and Their Application in Food Fortification and Nanotechnology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 195(2), 1319–1513. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04132-y>
182. Martini, M. C., Zhang, T., Williams, J. T., Abramovitch, R. B., Weathers, P. J., & Shell, S. S. (2020). *Artemisia annua* and *Artemisia afra* extracts exhibit strong bactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of ethnopharmacology*, 262, 113191. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113191>
183. Marsh, Z., Yang, T., Nopo-Olazabal, L., Wu, S., Ingle, T., Joshee, N., & Medina-Bolivar, F. (2014). Effect of light, methyl jasmonate and cyclodextrin on production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora*. *Phytochemistry*, 107, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.020>
184. Martin-Tanguy, J., Sun, L. Y., Burtin, D., Vernoy, R., Rossin, N., & Tepfer, D. (1996). Attenuation of the Phenotype Caused by the Root-Inducing, Left-Hand, Transferred DNA and Its *rolA* Gene (Correlations with Changes in Polyamine Metabolism and DNA Methylation). *Plant physiology*, 111(1), 259–267. <https://doi.org/10.1104/pp.111.1.259>

185. Mashima, R., & Okuyama, T. (2015). The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox biology*, 6, 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.006>
186. Mathesius U. (2018). Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants (Basel, Switzerland)*, 7(2), 30. <https://doi.org/10.3390/plants7020030>
187. Matvieieva, N., Drobot, K., Duplij, V., Ratushniak, Y., Shakhovsky, A., Kyrpa-Nesmiian, T., Mickevičius, S., & Brindza, J. (2019). Flavonoid content and antioxidant activity of *Artemisia vulgaris* L. “hairy” roots. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(1), 82–87. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536994>
188. Matvieieva, N. A., Morgun, B. V., Lakhneko, O. R., Duplij, V. P., Shakhovsky, A. M., Ratushnyak, Y. I., Sidorenko, M., Mickevicius, S., & Yevtushenko, D. P. (2020). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 152, 177–183. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.020>
189. Matvieieva, N., & Bohdanovych, T. (2022). Native to Ukraine Plants with Anti-Inflammatory, Antioxidant and Antiviral Activities (Eds. R.K. Behl, Pravin K Sharma, Rajesh K. Arya and Ravindra N. Chibbar), *Plants for Immunity* (pp. 97 – 122). India: Agro bios Research publishers. ISBN 10: 9394380019 / ISBN 13: 9789394380011
190. Matvieieva, N., Shakhovsky, A., Tashyreva, H., Ratushnyak, Y., Duplij, V., Bohdanovych, T., & Kuchuk, M. (2022). Study of superoxide dismutase activity in long-term cultivated *Artemisia* and *Althaea* “hairy” roots. *Current Microbiology* (USA, Springer New York), 79(1), 14. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02709-0>
191. Matvieieva, N., Bohdanovych, T. & Duplij, V. (2023). *Bacteria – Plant Interaction: Transgenic Roots for Human Health* (1st ed.). Ed. Jan Brindza. Slovak University of Agriculture in Nitra. 156 p. ISBN 978-80-552-2640-8. <https://doi.org/10.15414/2023.9788055226408>
192. Mauro, M. L., Trovato, M., Paolis, A. D., Gallelli, A., Costantino, P., & Altamura, M. M. (1996). The plant oncogene rolD stimulates flowering in transgenic

tobacco plants. *Developmental biology*, 180(2), 693–700.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0338>

193. Mauro, M. L., Costantino, P., & Bettini, P. P. (2017). The never ending story of rol genes: a century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131, 201–212. <https://doi.org/10.1007/S11240-017-1277-5>
194. Mazumder, K., Biswas, B., Raja, I. M., & Fukase, K. (2020). A Review of Cytotoxic Plants of the Indian Subcontinent and a Broad-Spectrum Analysis of Their Bioactive Compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(8), 1904. <https://doi.org/10.3390/molecules25081904>
195. Mbida, H., Tsala, D. E., Aboubakar, S., Habtemariam, S., Edmond, J. J., Bakwo, E. F., & Minkande, J. Z. (2022). Antioxidant Activity of Aqueous Extract of Leaves and Seeds of *Datura metel* (Solanaceae) in Frog's Heart Failure Model. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2022, 5318117. <https://doi.org/10.1155/2022/5318117>
196. Medina-Bolívar, F., & Cramer, C. (2004). Production of Recombinant Proteins by Hairy Roots Cultured in Plastic Sleeve Bioreactors. In *Recombinant Gene Expression* (Vol. 267, pp. 351–364). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:351>
197. Medrano-Macías, J., Flores-Gallegos, A. C., Nava-Reyna, E., Morales, I., Tortella, G., Solís-Gaona, S., & Benavides-Mendoza, A. (2022). Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species (RONSS) as a Metabolic Cluster for Signaling and Biostimulation of Plants: An Overview. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(23), 3203. <https://doi.org/10.3390/plants11233203>
198. Meulmeester, F. L., Luo, J., Martens, L. G., Mills, K., van Heemst, D., & Noordam, R. (2022). Antioxidant Supplementation in Oxidative Stress-Related Diseases: What Have We Learned from Studies on Alpha-Tocopherol?. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(12), 2322. <https://doi.org/10.3390/antiox11122322>
199. Mikhailova E. O. (2022). Green Synthesis of Platinum Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of functional biomaterials*, 13(4), 260. <https://doi.org/10.3390/jfb13040260>

200. Mirbehbahani, F. S., Hejazi, F., Najmoddin, N., & Asefnejad, A. (2020). *Artemisia annua* L. as a promising medicinal plant for powerful wound healing applications. *Progress in biomaterials*, 9(3), 139–151. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00138-z>
201. Mishra, S., Pandey, A., & Manvati, S. (2020). Coumarin: An emerging antiviral agent. *Heliyon*, 6(1), e03217. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03217>
202. Mišić, D., Šiler, B., Skorić, M., Djurickovic, M. S., Nestorović Živković, J., Jovanović, V., & Giba, Z. (2013). Secoiridoid glycosides production by *Centaureum maritimum* (L.) Fritch hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. *Process Biochemistry*, 48(10), 1587–1591. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.015>
203. Moacă, E. A., Pavel, I. Z., Danciu, C., Crăiniceanu, Z., Minda, D., Ardelean, F., Antal, D. S., Ghiulai, R., Cioca, A., Derban, M., Simu, S., Chioibaş, R., Szuhaneck, C., & Dehelean, C. A. (2019). Romanian Wormwood (*Artemisia absinthium* L.): Physicochemical and Nutraceutical Screening. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(17), 3087. <https://doi.org/10.3390/molecules24173087>
204. Moerman, D.E. 2009. *Native American medicinal plants: An Ethnobotanical Dictionary*. Portland, OR: Timber Press, p. 91
205. Mohaddab, M., El Goumi, Y., Gallo, M., Montesano, D., Zengin, G., Bouyahya, A., & Fakiri, M. (2022). Biotechnology and In Vitro Culture as an Alternative System for Secondary Metabolite Production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(22), 8093. <https://doi.org/10.3390/molecules27228093>
206. Mohamed, R., & Sullivan, J. C. (2023). Sustained activation of 12/15 lipoxygenase (12/15 LOX) contributes to impaired renal recovery post ischemic injury in male SHR compared to females. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 29(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00762-y>
207. 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(28), 19530–19539. <https://doi.org/10.1039/d3ra02690f>

208. Morimoto, R., & Isegawa, Y. (2023). Anti-Influenza Virus Activity of *Citrullus lanatus* var. *citroides* as a Functional Food: A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(20), 3866. <https://doi.org/10.3390/foods12203866>
209. Mostafa Abdalhamed, A., Zeedan, G. S. G., Ahmed Arafa, A., Shafeek Ibrahim, E., Sedky, D., & Abdel Nabey Hafez, A. (2022). Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical and Subclinical Mastitis in Ruminants and Studying the Effect of Novel Green Synthetized Nanoparticles as One of the Alternative Treatments. *Veterinary medicine international*, 2022, 6309984. <https://doi.org/10.1155/2022/6309984>
210. Moulavi, P., Noorbazargan, H., Dolatabadi, A., Foroohimanjili, F., Tavakoli, Z., Mirzazadeh, S., Hashemi, M., & Ashrafi, F. (2019). Antibiofilm effect of green engineered silver nanoparticles fabricated from *Artemisia scoporia* extract on the expression of *icaA* and *icaR* genes against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of basic microbiology*, 59(7), 701–712. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900096>
211. Mousavi, B., Tafvizi, F., & Zaker Bostanabad, S. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), 499–510. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1430697>
212. Mukhopadhyay, N., Shukla, A., Makhal, P. N., & Kaki, V. R. (2023). Natural product-driven dual COX-LOX inhibitors: Overview of recent studies on the development of novel anti-inflammatory agents. *Heliyon*, 9(3), e14569. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14569>
213. Muñoz-Ramírez, A., Mascayano-Collado, C., Barriga, A., Echeverría, J., & Urzúa, A. (2020). Inhibition of Soybean 15-Lipoxygenase and Human 5-Lipoxygenase by Extracts of Leaves, Stem Bark, Phenols and Catechols Isolated From *Lithraea caustica* (Anacardiaceae). *Frontiers in pharmacology*, 11, 594257. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.594257>

214. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
215. Naiel, B., Fawzy, M., Halmy, M. W. A., & Mahmoud, A. E. D. (2022). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Sea Lavender (*Limonium pruinatum* L. Chaz.) extract: characterization, evaluation of anti-skin cancer, antimicrobial and antioxidant potentials. *Scientific reports*, 12(1), 20370. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24805-2>
216. Native American Ethnobotany Database (Електронний ресурс). – 2022. – Режим доступу: <http://naeb.brit.org/uses/search/?string=artemisia+tillesii/> (дата звернення: 1.12.22). – Назва з екрана.
217. NCBI database, *Agrobacterium rhizogenes*, Taxonomy ID: 359. Database (Електронний ресурс). – 2023. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=359> (дата звернення: 1.06.23). – Назва з екрана.
218. Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Oka, A., Muranaka, T., & Mano, Y. (2009). Function of the aux and rol genes of the Ri plasmid in plant cell division in vitro. *Plant signaling & behavior*, 4(12), 1145–1147. <https://doi.org/10.4161/psb.4.12.9904>
219. Nilsson, O., Moritz, T., Sundberg, B., Sandberg, G., & Olsson, O. (1996). Expression of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC Gene in a Deciduous Forest Tree Alters Growth and Development and Leads to Stem Fasciation. *Plant physiology*, 112(2), 493–502. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.493>
220. Noti, V., Pontiki, E., & Hadjipavlou-Litina, D. (2023). Development of Novel Pyrrole Derivatives and Their Cinnamic Hybrids as Dual COX-2/LOX Inhibitors. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(24), 7958. <https://doi.org/10.3390/molecules28247958>
221. Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R., & Abdollahi Mandoulakani, B. (2019). Iron oxide nanoparticles: a novel elicitor to enhance anticancer flavonoid production and gene expression in *Dracocephalum kotschyi* hairy-root cultures. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, 99(14), 6418–6430.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9921>

222. Ono, N. N., & Tian, L. (2011). The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 180(3), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.012>
223. Oresanya, I. O., Sonibare, M. A., Gueye, B., Balogun, F. O., Adebayo, S., Ashafa, A. O. T., & Morlock, G. (2020). Isolation of flavonoids from *Musa acuminata* Colla (Simili radjah, ABB) and the in vitro inhibitory effects of its leaf and fruit fractions on free radicals, acetylcholinesterase, 15-lipoxygenase, and carbohydrate hydrolyzing enzymes. *Journal of food biochemistry*, 44(3), e13137. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13137>
224. Ortega, J. T., Parmar, T., Golczak, M., & Jastrzebska, B. (2021). Protective Effects of Flavonoids in Acute Models of Light-Induced Retinal Degeneration. *Molecular pharmacology*, 99(1), 60–77. <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000072>
225. Otten L. (2018). The Agrobacterium Phenotypic Plasticity (Plast) Genes. *Current topics in microbiology and immunology*, 418, 375–419. https://doi.org/10.1007/82_2018_93
226. Ozyigit, I. I., Dogan, I., & Tarhan, E. A. (2013). Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation and Its Biotechnological Applications in Crops. In *Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques*. eds. H. K. Rehman, A. Parvaiz, & O. Munir (Boston, MA: Springer US), 1–48.
227. Palazón, J., Cusido, R.M., Bonfill, M., Mallol, A., Moyano, E., Morales, C., & Piñol, M.T. (2003). Elicitation of different Panax ginseng transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 1019-1025. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.09.002>
228. Paolis, A., Frugis, G., Giannino, D., Iannelli, M. A., Mele, G., Rugini, E., Silvestri, C., Sparvoli, F., Testone, G., Mauro, M. L., Nicolodi, C., & Caretto, S. (2019). Plant Cellular and Molecular Biotechnology: Following Mariotti's Steps. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(1), 18. <https://doi.org/10.3390/plants8010018>

229. Park, C. H., Kim, Y. S., Li, X., Kim, H. H., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Lee, S. Y., & Park, S. U. (2016). Influence of Different Carbohydrates on Flavonoid Accumulation in Hairy Root Cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Natural Product Communications*, 11(6), 1934578X1601100. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100625>
230. Park, C. H., Xu, H., Yeo, H. J., Park, Y. E., Hwang, G. S., Park, N. I., & Park, S. U. (2021a). Enhancement of the flavone contents of *Scutellaria baicalensis* hairy roots via metabolic engineering using maize Lc and *Arabidopsis* PAP1 transcription factors. *Metabolic engineering*, 64, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.01.003>
231. Park, C. H., Park, Y. E., Yeo, H. J., Park, N. I., & Park, S. U. (2021). Effect of Light and Dark on the Phenolic Compound Accumulation in Tartary Buckwheat Hairy Roots Overexpressing *ZmLC*. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4702. <https://doi.org/10.3390/ijms22094702>
232. 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. (2021b). Interlaboratory Validation of Toxicity Testing Using the Duckweed *Lemna minor* Root-Regrowth Test. *Biology*, 11(1), 37. <https://doi.org/10.3390/biology11010037>
233. Park, N. I., Li, X., Thwe, A. A., Lee, S. Y., Kim, S. G., Wu, Q., & Park, S. U. (2012a). Enhancement of rutin in *Fagopyrum esculentum* hairy root cultures by the *Arabidopsis* transcription factor AtMYB12. *Biotechnology letters*, 34(3), 577–583. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0807-1>
234. Park, S. W., Oh, T. Y., Kim, Y. S., Sim, H., Park, S. J., Jang, E. J., Park, J. S., Baik, H. W., & Hahm, K. B. (2008). *Artemisia asiatica* extracts protect against ethanol-induced injury in gastric mucosa of rats. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(6), 976–984. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05333.x>
235. Park, Y., Noh, H. J., Han, L., Kim, H. S., Kim, Y. J., Choi, J. S., Kim, C. K., Kim, Y. S., & Cho, S. (2012b). *Artemisia capillaris* extracts as a green factory for the

- synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activities. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 12(9), 7087–7095. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6575>
236. Pei, J., Zou, Y., Zhou, W., & Wang, Y. (2023). Baicalein, a component of banxia xiexin decoction, alleviates CPT-11-induced gastrointestinal dysfunction by inhibiting ALOX15-mediated ferroptosis. *Chemical biology & drug design*, 102(6), 1568–1577. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14349>
237. Pękal, A., & Pyrzyńska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7, 1776-1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
238. Peng, W., Wang, N., Wang, S., Wang, J., & Bian, Z. (2023). Effect of co-treatment of microwave and exogenous l-phenylalanine on the enrichment of flavonoids in Tartary buckwheat sprouts. *Journal of the science of food and agriculture*, 103(4), 2014–2022. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12263>
239. 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(12), e180279. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180279>
240. Pennisi, R., Trischitta, P., Tamburello, M. P., Barreca, D., Mandalari, G., & Sciortino, M. T. (2023). Mechanistic Understanding of the Antiviral Properties of Pistachios and Zeaxanthin against HSV-1. *Viruses*, 15(8), 1651. <https://doi.org/10.3390/v15081651>
241. Perreca, E., Eberl, F., Santoro, M. V., Wright, L. P., Schmidt, A., & Gershenzon, J. (2022). Effect of Drought and Methyl Jasmonate Treatment on Primary and Secondary Isoprenoid Metabolites Derived from the MEP Pathway in the White Spruce *Picea glauca*. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3838. <https://doi.org/10.3390/ijms23073838>
242. Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

243. Pham, N. B., Schäfer, H., & Wink, M. (2012). Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. *Biotechnology Journal*, 7(4), 537–545. <https://doi.org/10.1002/biot.201100430>
244. Piątczak, E., Dębska, M., Kontek, B., Olas, B., & Wysokińska, H. (2016). Antioxidant properties of methanolic extracts from the shoots and roots of pRi-transformed plants of *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 73(2), 433–438. <https://publicum-test.umed.lodz.pl/info/article/AMLe03a5680f4e246ab89ca3ff739e14e77/>
245. Pilaisangsree, V., Somboon, T., Tonglairoum, P., Keawracha, P., Wongs, T., Kongbangkerd, A., & Limmongkon, A. (2018). Enhancement of stilbene compounds and anti-inflammatory activity of methyl jasmonate and cyclodextrin elicited peanut hairy root culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(1), 165–179. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1321-5>
246. Pistelli, L., Giovannini, A., Ruffoni, B., Bertoli, A., & Pistelli, L. (2010). Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production. *Bio-Farms for Nutraceuticals*, 167–184. *Advances in experimental medicine and biology*, 698, 167–184. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_13
247. Plasencia, A., Soler, M., Dupas, A., Ladouce, N., Silva-Martins, G., Martinez, Y., Lapierre, C., Franche, C., Truchet, I., & Grima-Pettenati, J. (2016). Eucalyptus hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant biotechnology journal*, 14(6), 1381–1393. <https://doi.org/10.1111/pbi.12502>
248. Porter, J.R. (1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10, 387–421.
249. Rafey, A., Amin, A., Kamran, M., Aziz, M. I., Athar, V., Niaz, S. I., & Pieters, L. (2022). Evaluation of Major Constituents of Medicinally Important Plants for Anti-Inflammatory, Antidiabetic and AGEs Inhibiting Properties: In Vitro and Simulatory Evidence. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(19), 6715. <https://doi.org/10.3390/molecules27196715>

250. Rao, Z., Brunner, E., Giszas, B., Iyer-Bierhoff, A., Gerstmeier, J., Börner, F., Jordan, P. M., Pace, S., Meyer, K. P. L., Hofstetter, R. K., Merk, D., Paulenz, C., Heinzl, T., Grunert, P. C., Stallmach, A., Serhan, C. N., Werner, M., & Werz, O. (2023). Glucocorticoids regulate lipid mediator networks by reciprocal modulation of 15-lipoxygenase isoforms affecting inflammation resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(35), e2302070120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2302070120>
251. Rasheed, T., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Li, C. (2017). Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 158, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.020>
252. Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 136, 109298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>
253. Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W., & Sagen, H. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery Apple trees. *Journal of Agricultural Research*, 41, 507-540.
254. Röder, F. T., Schmülling, T., & Gatz, C. (1994). Efficiency of the tetracycline-dependent gene expression system: complete suppression and efficient induction of the rolB phenotype in transgenic plants. *Molecular & general genetics : MGG*, 243(1), 32–38. <https://doi.org/10.1007/BF00283873>
255. Rogowska, A., Stpiczyńska, M., Pączkowski, C., & Szakiel, A. (2022). The Influence of Exogenous Jasmonic Acid on the Biosynthesis of Steroids and Triterpenoids in *Calendula officinalis* Plants and Hairy Root Culture. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12173. <https://doi.org/10.3390/ijms232012173>
256. Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The Plants of the *Asteraceae* Family as Agents in the Protection of Human Health. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3009. <https://doi.org/10.3390/ijms22063009>
257. Royal Botanic Gardens, Plants of the world online. (Электронный ресурс). – 2023. — Режим доступа:

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:20769-2> (дата звернення: 29.06.23). – Назва з екрана.

258. 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(21), 2953. <https://doi.org/10.3390/plants11212953>
259. Russel, P. (2017). *Naut'staarpet – Our plants: A Kodiak Alutiiq plantlore*. Alutiiq Museum & Archaeological Repository. p.131-132
260. 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, 1–330. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.141.48810>
261. Sadik, C. D., Sies, H., & Schewe, T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical pharmacology*, 65(5), 773–781. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01621-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01621-0)
262. Sahu, P. K., Jayalakshmi, K., Tilgam, J., Gupta, A., Nagaraju, Y., Kumar, A., Hamid, S., Singh, H. V., Minkina, T., Rajput, V. D., & Rajawat, M. V. S. (2022). ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in plant science*, 13, 1042936. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1042936>
263. Saleem, H., Yaqub, A., Rafique, R., Ali Chohan, T., Malik, D. E., Tousif, M. I., Khurshid, U., Ahemad, N., Ramasubburayan, R., & Rengasamy, K. R. (2023). Nutritional and medicinal plants as potential sources of enzyme inhibitors toward the bioactive functional foods: an updated review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1–24. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2217264>
264. Salehi, S., Shandiz, S. A., Ghanbar, F., Darvish, M. R., Ardestani, M. S., Mirzaie, A., & Jafari, M. (2016). Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their

- antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *International journal of nanomedicine*, 11, 1835–1846. <https://doi.org/10.2147/IJN.S99882>
265. Sampath, G., Chen, Y. Y., Rameshkumar, N., Krishnan, M., Nagarajan, K., & Shyu, D. J. H. (2022). Biologically Synthesized Silver Nanoparticles and Their Diverse Applications. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(18), 3126. <https://doi.org/10.3390/nano12183126>
 266. 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*. *Frontiers in plant science*, 13, 983776. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.983776>
 267. Scandalios J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 38(7), 995–1014. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700003>
 268. Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199–204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
 269. Schofield, J. (1989). *Discovering wild plants*. Alaska Northwest Books. p. 245.
 270. 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. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 4986. <https://doi.org/10.3390/ijms21144986>
 271. Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Shah, S. A. A., Sarian, M. N., Khattak, M. M. A. K., Khatib, A., Sabere, A. S. M., Yusoff, Y. M., & Latip, J. (2022). Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents: A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12605. <https://doi.org/10.3390/ijms232012605>

272. Sharif, M. A., Khan, A. M., Salekeen, R., Rahman, M. H., Mahmud, S., Bibi, S., Biswas, P., Nazmul Hasan, M., Islam, K. M. D., Rahman, S. M. M., Islam, M. E., Alshammari, A., Alharbi, M., & Hayee, A. (2023). *Phyllanthus emblica* (Amla) methanolic extract regulates multiple checkpoints in 15-lipoxygenase mediated inflammopathies: Computational simulation and *in vitro* evidence. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 31(8), 101681. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.06.014>
273. 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, 5628601. <https://doi.org/10.1155/2022/5628601>
274. Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
275. Sharma, S., & Vig, A. P. (2013). Evaluation of in vitro antioxidant properties of methanol and aqueous extracts of *Parkinsonia aculeata* L. leaves. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 604865. <https://doi.org/10.1155/2013/604865>
276. Sharma, S., Kumari, P., Thakur, P., Brar, G. S., Bouqellah, N. A., & Hesham, A. E. (2022). Synthesis and characterization of $\text{Ni}_{0.5}\text{Al}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanoparticles for potent antifungal activity against dry rot of ginger (*Fusarium oxysporum*). *Scientific reports*, 12(1), 20092. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22620-3>
277. Shi, P., Fu, X., Liu, M., Shen, Q., Jiang, W., Li, L., Sun, X., & Tang, K. (2017). Promotion of artemisinin content in *Artemisia annua* by overexpression of multiple artemisinin biosynthetic pathway genes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(2), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1173-z>
278. Shinde, A. N., Malpathak, N., & Fulzele, D. P. (2009). Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. Using

- elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(3), 288–294. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0238-6>
279. 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 Metabolites Isolated from *Artemisia afra* and *Artemisia annua* and Their Anti-Malarial, Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties-Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: A Review. *Metabolites*, 13(5), 613. <https://doi.org/10.3390/metabo13050613>
280. Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2008). Individual and combined effects of the rolA, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), 118–125. <https://doi.org/10.1002/bit.21727>
281. Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D. K., & Hasanuzzaman, M. (2022). Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(22), 3158. <https://doi.org/10.3390/plants11223158>
282. Siddiqui, A. J., Danciu, C., Ashraf, S. A., Moin, A., Singh, R., Alreshidi, M., Patel, M., Jahan, S., Kumar, S., Alkhinjar, M., Badraoui, R., Snoussi, M., & Adnan, M. (2020). Plants-Derived Biomolecules as Potent Antiviral Phytomedicines: New Insights on Ethnobotanical Evidences against Coronaviruses. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(9), 1244. <https://doi.org/10.3390/plants9091244>
283. Sikorski, Ł., Beś, A., & Warmiński, K. (2023). The Effect of Quinolones on Common Duckweed *Lemna minor* L., a Hydrophyte Bioindicator of Environmental Pollution. *International journal of environmental research and public health*, 20(6), 5089. <https://doi.org/10.3390/ijerph20065089>
284. Skorokhod I., Bohdanovych T., Matvieieva N. (Eds.). (2023). Phenolcarboxylic acids in *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” roots. *Modern achievements of pharmaceutical technology: Collection of X International Scientific-Practical Conference, dedicated to the 60th anniversary of the birth of Doctor of*

Pharmaceutical Sciences, Professor Gladukh Ievgenii Volodymyrovych, Kharkiv, May 10-11, 2023. – Kharkiv : NUPh, 2023. – P. 248.

285. Smith, A.G., John, K.E., & Gardner, N. (2006). *Dwarfing ornamental crops with the rolC gene*. In: Texeira da Silva JA, ed. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology (2nd ed.), 54-59.
286. 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 TGF β 1 and MYC genes. *PloS one*, 18(4), e0284244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284244>
287. 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. *Frontiers in plant science*, 13, 942789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.942789>
288. Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1), 29–43. <https://doi.org/10.1080/07388550601173918>
289. Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2012). Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(9), 1549–1553. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0745-x>
290. Stannard, H., Koszalka, P., Deshpande, N., Desjardins, Y., & Baz, M. (2023). Pre-Clinical Evaluation of the Antiviral Activity of Epigallocatechin-3-Gallate, a Component of Green Tea, against Influenza A(H1N1)pdm Viruses. *Viruses*, 15(12), 2447. <https://doi.org/10.3390/v15122447>
291. Stewart, F.C., Hall, F.H., & Rolfs, F.M. (1900). A fruit-disease survey of western New York in 1900. Bulletin/New York Agricultural Experiment Station no 191. New York Agricultural Experiment Station, Geneva, 293–331.

292. 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. *International journal of environmental research and public health*, 20(13), 6309. <https://doi.org/10.3390/ijerph20136309>
293. Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants-Natural Health Products for Human Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(4), 1845. <https://doi.org/10.3390/molecules28041845>
294. Sychrová, A., Škovranová, G., Čulenová, M., & Bittner Fialová, S. (2022). Prenylated Flavonoids in Topical Infections and Wound Healing. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(14), 4491. <https://doi.org/10.3390/molecules27144491>
295. Sykłowska-Baranek, K., Sygitowicz, G., Maciejak-Jastrzębska, A., Pietrosiuk, A., & Szakiel, A. (2022). Application of Priming Strategy for Enhanced Paclitaxel Biosynthesis in *Taxus × Media* Hairy Root Cultures. *Cells*, 11(13), 2062. <https://doi.org/10.3390/cells11132062>
296. Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M. R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., Lojkowska, E., & Chinou, I. (2012). Effect of 1-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In vitro cellular & developmental biology. Plant : journal of the Tissue Culture Association*, 48(5), 555–564. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9443-2>
297. Szechyńska-Hebda, M., Ghalami, R. Z., Kamran, M., Van Breusegem, F., & Karpiński, S. (2022). To Be or Not to Be? Are Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and Stress Signalling Universal Determinants of Life or Death?. *Cells*, 11(24), 4105. <https://doi.org/10.3390/cells11244105>
298. Tanaka, N., Fujikawa, Y., Aly, M.A., Saneoka, H., Fujita, K., & Yamashita, I. (2001). Proliferation and rol gene expression in hairy root lines of Egyptian clover.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66, 175-182.
<https://doi.org/10.1023/A:1010648124872>

299. Tang, C., Carrera Montoya, J., Fritzlar, S., Flavel, M., Londrigan, S. L., & Mackenzie, J. M. (2024). Polyphenol rich sugarcane extract (PRSE) has potential antiviral activity against influenza A virus in vitro. *Virology*, 590, 109969. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109969>
300. Tashackori, H., Sharifi, M., Ahmadian Chashmi, N., Safaie, N., & Behmanesh, M. (2016). Induced-differential changes on lignan and phenolic acid compounds in *Linum album* hairy roots by fungal extract of *Piriformospora indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(1), 187–194. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1041-2>
301. Tashackori, H., Sharifi, M., Ahmadian Chashmi, N., Behmanesh, M., Safaie, N., & Sagharyan, M. (2021). Physiological, biochemical, and molecular responses of *Linum album* to digested cell wall of *Piriformospora indica*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(12), 2695–2708. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01106-y>
302. Tavakoli, H., Tavakoli, N., & Moradi, F. (2019). The effect of the elicitors on the steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana*. *Functional plant biology : FPB*, 46(9), 787–795. <https://doi.org/10.1071/FP19014>
303. Tavassoli, P., & Safipour Afshar, A. (2018). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *3 Biotech*, 8(8), 351. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1375-z>
304. Temperate Plants Database, Ken Fern (Електронний ресурс). – 2023. – Режим доступу: <https://temperate.theferns.info/plant/Artemisia+tilesii> (дата звернення: 29.06.23). – Назва з екрана.
305. Thiruvengadam, M., Rekha, K., & Chung, I. M. (2016). Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and

- biological activities. *Scientia Horticulturae*, 198, 132–141.
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2015.11.035>
306. Thwe, A. A., Kim, Y., Li, X., Kim, Y. B., Park, N. I., Kim, H. H., Kim, S. J., & Park, S. U. (2014). Accumulation of phenylpropanoids and correlated gene expression in hairy roots of tartary buckwheat under light and dark conditions. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(7), 2537–2547.
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1203-9>
307. Tiwari, R. K., Ahmad, A., Khan, A. F., Al-Keridis, L. A., Saeed, M., Alshammari, N., Alabdallah, N. M., Ansari, I. A., & Mujeeb, F. (2023). Ethanolic Extract of *Artemisia vulgaris* Leaf Promotes Apoptotic Cell Death in Non-Small-Cell Lung Carcinoma A549 Cells through Inhibition of the Wnt Signaling Pathway. *Metabolites*, 13(4), 480. <https://doi.org/10.3390/metabo13040480>
308. 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(1), 65.
<https://doi.org/10.3390/foods10010065>
309. Trovato, M., Mattioli, R., & Costantino, P. (2018). From *A. rhizogenes* RolD to Plant P5CS: Exploiting Proline to Control Plant Development. *Plants (Basel, Switzerland)*, 7(4), 108. <https://doi.org/10.3390/plants7040108>
310. Tsuyuzaki Shiro, Plant ecology and Environmental Conservation, Hokkaido University. (Електронний ресурс). – 2023. – Режим доступу: <https://hosho.ees.hokudai.ac.jp/tsuyu/top/plt/aster/artemisia/til.html> (дата звернення: 29.06.23). – Назва з екрана.
311. Tusevski, O., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M., & Simic, S. G. (2013). Phenolic profile of dark-grown and photoperiod-exposed *Hypericum perforatum* L. Hairy root cultures. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 602752.
<https://doi.org/10.1155/2013/602752>
312. Tymoszuk, A., Sławkowska, N., Szałaj, U., Kulus, D., Antkowiak, M., & Wojnarowicz, J. (2022). Synthesis, Characteristics, and Effect of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles on the In Vitro Regeneration and Biochemical Profile of

- Chrysanthemum Adventitious Shoots. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(22), 8192.
<https://doi.org/10.3390/ma15228192>
313. Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 5243.
<https://doi.org/10.3390/molecules25225243>
314. Veremeichik, G. N., Shkryl, Y. N., Bulgakov, V. P., Avramenko, T. V., & Zhuravlev, Y. N. (2012). Molecular cloning and characterization of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial rolB gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures. *Plant cell reports*, 31(6), 1009–1019.
<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1219-3>
315. Vergara-Martínez, V. M., Estrada-Soto, S. E., Valencia-Díaz, S., Garcia-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, e11279. <https://doi.org/10.7717/peerj.11279>
316. Viereck, E.G. (1987). *Alaska's wilderness medicines: Healthful plants of the far north*. Alaska Northwest Books. p.78
317. Viršilė, A., Samuolienė, G., Laužikė, K., Šipailaitė, E., Balion, Z., & Jekabsone, A. (2022). Species-Specific Plant-Derived Nanoparticle Characteristics. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(22), 3139. <https://doi.org/10.3390/plants11223139>
318. Vona, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C., & Matarrese, P. (2021). The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(2), 201.
<https://doi.org/10.3390/antiox10020201>
319. 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. *Frontiers in nutrition*, 9, 859035.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.859035>

320. Wang, F., Liu, L., Zhu, Z., Aisa, H. A., & Xin, X. (2024). Anti-inflammatory effect and mechanism of active parts of *Artemisia mongolica* in LPS-induced Raw264.7 cells based on network pharmacology analysis. *Journal of ethnopharmacology*, 321, 117509. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117509>
321. Wang, H., Wang, A., Pu, H., Yang, Y., Ling, Z., Xu, H., Xu, J., Yu, H., & Wu, X. (2023a). Induction, Flavonoids Contents, and Bioactivities Analysis of Hairy Roots and True Roots of *Tetragastria hemsleyanum* Diels et Gilg. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(6), 2686. <https://doi.org/10.3390/molecules28062686>
322. Wang, Y. F., Zheng, Y., Feng, Y., Chen, H., Dai, S. X., Wang, Y., & Xu, M. (2023b). Comparative Analysis of Active Ingredients and Potential Bioactivities of Essential Oils from *Artemisia argyi* and *A. verlotorum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(9), 3927. <https://doi.org/10.3390/molecules28093927>
323. Wang, Z., Song, X. Q., Xu, W., Lei, S., Zhang, H., & Yang, L. (2023c). Stand Up to Stand Out: Natural Dietary Polyphenols Curcumin, Resveratrol, and Gossypol as Potential Therapeutic Candidates against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *Nutrients*, 15(18), 3885. <https://doi.org/10.3390/nu15183885>
324. Wang, Z., Yu, Q., Shen, W., El Mohtar, C. A., Zhao, X., & Gmitter, F. G., Jr (2018). Functional study of CHS gene family members in citrus revealed a novel CHS gene affecting the production of flavonoids. *BMC plant biology*, 18(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1418-y>
325. Wei, Z., Xu, S., Jia, H., & Zhang, H. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles from *Mahonia fortunei* extracts and characterization of its inhibitory effect on Chinese cabbage soft rot pathogen. *Frontiers in microbiology*, 13, 1030261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1030261>
326. White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of bacteriology*, 164(1), 33–44. <https://doi.org/10.1128/jb.164.1.33-44.1985>

327. Wisastra, R., & Dekker, F. J. (2014). Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoygenase Activity are Intimately Linked. *Cancers*, 6(3), 1500–1521. <https://doi.org/10.3390/cancers6031500>
328. 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. *Journal of biotechnology*, 318, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.002>
329. Wong, F. C., Yong, A. L., Ting, E. P., Khoo, S. C., Ong, H. C., & Chai, T. T. (2014). Antioxidant, Metal Chelating, Anti-glucosidase Activities and Phytochemical Analysis of Selected Tropical Medicinal Plants. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 13(4), 1409–1415.
330. Wongsamuth, R., & Doran, P. M. (1997). Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(5), 401–415. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290)
331. Wongshaya, P., Chayjarung, P., Tothong, C., Pilaisangsuee, V., Somboon, T., Kongbangkerd, A., & Limmongkon, A. (2020). Effect of light and mechanical stress in combination with chemical elicitors on the production of stilbene compounds and defensive responses in peanut hairy root culture. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 157, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.015>
332. Woods, R. R., Geyer, B. C., & Mor, T. S. (2008). Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase. *BMC Biotechnology*, 8(1), 95. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-95>
333. Wright, S.J. (2008). *A Revegetation Manual for Alaska*. Ed. Hunt P. State of Alaska, Department of Natural Resources, Division of Agriculture, Alaska Plant Materials Center.
334. Wu, H., Wang, Y., Huang, J., Li, Y., Lin, Z., & Zhang, B. (2023). Rutin ameliorates gout via reducing XOD activity, inhibiting ROS production and NLRP3 inflammasome activation in quail. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 158, 114175. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114175>

335. Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., & Li, H. B. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
336. Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>
337. Yang, L., Zhang, J. C., Qu, J. T., He, G., Yu, H. Q., Li, W. C., & Fu, F. L. (2019). Expression response of chalcone synthase gene to inducing conditions and its effect on flavonoids accumulation in two medicinal species of *Anoectochilus*. *Scientific reports*, 9(1), 20171. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56821-0>
338. 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(4), 797. <https://doi.org/10.3390/plants12040797>
339. Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 1), 89–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>
340. Yousaf, A., Waseem, M., Javed, A., Baig, S., Ismail, B., Baig, A., Shahzadi, I., Nawazish, S., & Zaman, I. (2022). Augmented anticancer effect and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by using *Taxus wallichiana* leaf extract. *PeerJ*, 10, e14391. <https://doi.org/10.7717/peerj.14391>
341. Yu, D., Huang, N. N., & Du, X. W. (2023). Review of the Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from *Artemisia Argyi*, *Artemisia Princeps*, and *Artemisia Montana*. *Current topics in medicinal chemistry*, 23(16), 1522–1541. <https://doi.org/10.2174/1568026623666230330152345>

342. Zafari, S., Sharifi, M., & Chashmi, N. A. (2018). A comparative study of biotechnological approaches for producing valuable flavonoids in *Prosopis farcta*. *Cytotechnology*, 70(2), 603–614. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0143-y>
343. Zárte, R. (2010). *Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods, Strategies, Advances, and Omics*. Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. 3. 629-668. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00068-X>.
344. Zhang, D., Sun, W., Shi, Y., Wu, L., Zhang, T., & Xiang, L. (2018). Red and Blue Light Promote the Accumulation of Artemisinin in *Artemisia Annua* L. *Molecules*, 23(6), 1329. <https://doi.org/10.3390/molecules23061329>
345. Zhang, L., Yang, Z., Li, X., Hua, Y., Fan, G., & He, F. (2023). Anti-atherosclerotic effects of naringenin and quercetin from *Folium Artemisiae argyi* by attenuating Interleukin-1 beta (IL-1 β)/ matrix metalloproteinase 9 (MMP9): network pharmacology-based analysis and validation. *BMC complementary medicine and therapies*, 23(1), 378. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04223-1>
346. Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., & Kong, W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*, 107, 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.018>.
347. Zheng, Y. Z., Chen, D. F., Deng, G., & Guo, R. (2018). The Substituent Effect on the Radical Scavenging Activity of Apigenin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(8), 1989. <https://doi.org/10.3390/molecules23081989>
348. Zhou, Y., Stepanenko, A., Kishchenko, O., Xu, J., & Borisjuk, N. (2023). Duckweeds for Phytoremediation of Polluted Water. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(3), 589. <https://doi.org/10.3390/plants12030589>
349. Zhu, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Arjó, G., Berman, J., Zorrilla-López, U., Banakar, R., Bai, C., Pérez-Massot, E., Bassie, L., Capell, T., & Christou, P. (2013). Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: genetic engineering strategies. *Plant biotechnology journal*, 11(2), 129–141. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00740.x>

350. Ziegler, P., Appenroth, K. J., & Sree, K. S. (2023). Survival Strategies of Duckweeds, the World's Smallest Angiosperms. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(11), 2215. <https://doi.org/10.3390/plants12112215>
351. Zubair, Z., Shameem, I., Seyed, M. (2020). A Comprehensive Review with Pharmacological Potential of «Mother of Herbs» *Artemisia vulgaris* Linn. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(8), 240–251. <https://doi.org/10.20959/wjpps20208-16844>.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України:

1. **Bohdanovych, T.,** Morgun, B., Lakhneko, O., *Shakhovsky, A., & Matvieieva, N.* (2022). Peculiarities of the growth of *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” roots with different foreign genes. *Biotechnologia Acta*, 15(3), 13–22. <https://doi.org/10.15407/biotech15.03.013> (Категорія Б) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, брала участь у проведенні частини експериментальних досліджень, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
2. **Bohdanovych, T., & Matvieieva, N.** (2022). Optical characteristics of silver nanoparticles obtained using *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” root extracts with high flavonoid content. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, 6(3-4), 169–177. <https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.3-4.271259> (Категорія А, Q3, Scopus) (<https://www.scopus.com/sourceid/21101111532>) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
3. **Bohdanovych, T., & Matvieieva, N.** (2023). Preparation of a biosafe flavonoid-rich extract from the “hairy” roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Plant physiology and genetics*, 55(4), 344–354. <https://doi.org/10.15407/frg2023.04.344> (Категорія Б) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
4. **Bohdanovych, T., & Matvieieva, N.** (2023). Effect of phenylalanine and light on the growth of hairy roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Biotechnologia Acta*, 16(5), 61–

69. <https://doi.org/10.15407/biotech16.05.061> (**Категорія Б**) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

Статті в зарубіжних періодичних наукових виданнях:

5. **Bohdanovych, T.**, Shakhovsky, A., Duplij, V., Ratushnyak, Y., Kuchuk, M., Poyedinok, N., & Matvieieva, N. (2021). Effects of Genetic Transformation on the Antioxidant Activity of “Hairy” Roots of *Althaea officinalis* L., *Artemisia vulgaris* L., and *Artemisia tilesii* Ledeb. *Cytology and genetics* (USA, Allerton Press Inc., Springer), 55(6), 531–539. <https://doi.org/10.3103/S0095452721060037> (**Категорія А, Q3, WoS** (SCImago Journal Rank)) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, проаналізувала первинний матеріал, спланувала та провела експериментальну частину, здійснила аналіз отриманих даних)

6. Matvieieva, N., Shakhovsky, A., Tashyreva, H., Ratushnyak, Y., Duplij, V., **Bohdanovych, T.**, & Kuchuk, M. (2022). Study of superoxide dismutase activity in long-term cultivated *Artemisia* and *Althaea* “hairy” roots. *Current Microbiology* (USA, Springer New York), 79(1), 14. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02709-0> (**Q3, WoS, Scopus**) (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні статті, оптимізувала проведення частини експериментів)

Глава монографії:

7. Matvieieva, N., & **Bohdanovych, T.** (2022). Native to Ukraine Plants with Anti-Inflammatory, Antioxidant and Antiviral Activities (Eds. R.K. Behl, Pravin K Sharma, Rajesh K. Arya and Ravindra N. Chibbar), *Plants for Immunity* (pp. 97 – 122). India: Agro bios Research publishers. ISBN 10: 9394380019 / ISBN 13: 9789394380011 (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні відповідного розділу монографії)

Монографія:

8. Matvieieva, N., **Bohdanovych, T.** & Duplij, V. (2023). *Bacteria – Plant Interaction: Transgenic Roots for Human Health* (1st ed.). Ed. Jan Brindza. Slovak University of Agriculture in Nitra. 156 p. ISBN 978-80-552-2640-8. <https://doi.org/10.15414/2023.9788055226408> (Здобувачка опрацьовувала літературні джерела, брала участь у написанні монографії)

Тези наукових доповідей:

9. **Bohdanovych, T.**, Matvieieva, N. (Eds.). (2020). Production of flavonoids with antioxidant properties by biotechnological “hairy” root culture of *Artemisia tilesii* wormwood. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії: матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції*. Харків. 26 листопада 2020. – С.9. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

10. **Bohdanovych, T.**, Matvieieva, N. (Eds.). (2021). Effect of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation on the antioxidant status of *Tilesius*’ wormwood “hairy” roots. *Biology, Biotechnology, Biomedicine: Materials of Young Scientists International Conference 3-5 July 2021*. Odesa: Odesa I.I. Mechnikov National University. – P. 11–15. ISBN 978-617-689-376-9 (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

11. **Богданович, Т.А.**, Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2022). Вплив фенілаланіну на ріст та антиоксидантну активність культури «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* за різних режимів освітлення. *«Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»: Матеріали II Міжнародної наук.-практ. інтернет-конф.* (20 травня 2022 р., м. Харків). – Х. : НФаУ, 2022. – С. 65. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

12. **Bohdanovych T.**, Starosyla D., Rybalko S., Kobylinska N., Matvieieva N. (Eds.). (2022). "Hairy" roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. as a promising candidate for anti-influenza treatment. All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with International Participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against russian invaders: conference proceedings, June 15-17, 2022. Kyiv, Ukraine. – P. 109. (Здобувачка здійснила аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
13. **Богданович, Т.А.**, Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2022). Дослідження впливу фенілаланіну на ріст «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*. «Біотехнологія XXI століття»: Матеріали XVI Всеукраїнської Науково-Практичної конференції. (3 червня 2022 р., м. Київ.) – Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського, 2022. – С. 17. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
14. **Bohdanovych, T.**, Matvieieva, N. (Eds.). (2022). Determination of the possibility of using phenylalanine to intensify the biosynthesis of flavonoids in wormwood "hairy" roots. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції* (м. Харків, 13 жовтня 2022 р.). Х.: Вид-во НФаУ, 2022. – С. 16. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
15. **Богданович, Т.А.**, Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Використання метилжасмонату як еліситора для підвищення синтезу вторинних метаболітів у «бородатих» коренях полину. «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»: Матеріали III Міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. (24 березня 2023 р., м. Харків). –Х. : НФаУ, 2023. – С. 113–114. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

16. **Богданович, Т.А.,** Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Розробка способу отримання сухого екстракту з високим вмістом флавоноїдів з «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (м. Харків, 14 квітня 2023 р.). – Х. : НФаУ, 2023. – С. 73. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
17. **Богданович, Т.А.,** Дуплій, В.П., Шаховський, А.М., Ратушняк, Я.І., Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Культура «бородатих» коренів рослин полину як екологічний та продуктивний спосіб отримання біологічно активних сполук. Міжнародна наукова конференція *Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування*: матеріали Міжнар. наук. конф. (27-28 квітня 2023 р., м. Харків) / Держ. біотехнол. ун-т. – Х., 2023. – С. 95–97. (Здобувачка виконала частину експериментів, здійснила аналіз отриманих даних)
18. Skorokhod I., **Bohdanovych T.,** Matvieieva N. (Eds.). (2023). Phenolcarboxylic acids in *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” roots. *Modern achievements of pharmaceutical technology*: Collection of X International Scientific-Practical Conference, dedicated to the 60th anniversary of the birth of Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor Gladukh Ievgenii Volodymyrovych, Kharkiv, May 10-11, 2023. – Kharkiv : NUPh, 2023. – P. 248. (Здобувачка здійснила аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
19. **Богданович, Т.А.,** Матвєєва, Н.А. (Ред.). (2023). Оцінка біобезпечності флавоноїдвмісної композиції на основі екстракту «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. *«Біотехнологія XXI століття»*: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції, 19 травня 2023. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023. – С. 75–76. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

20. **Bohdanovych, T.**, Matvieieva, N. (Eds.). (2023). Effect of genetic transformation as a stress factor on reducing activity of wormwood “hairy” roots. *Plant Stress and Adaptation: Abstracts of the Second International Scientific Conference, dedicated to the 125th anniversary of the birth of Prof. F.P. Matskov* (Kharkiv, 7-8 June 2023). – P. 24. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)
21. **Bohdanovych T.**, Klymchuk D., Matvieieva N. (Eds.). (2023). Characteristics of nanoparticles obtained via “green” synthesis using *Artemisia tilesii* Ledeb. “hairy” root extracts. X International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (16-19 August, Bukovel). – Kyiv: LLC APF POLYGRAPH SERVICE, 2023. – P. 331. (Здобувачка виконала експериментальну частину, здійснила статистичну обробку результатів та аналіз отриманих даних, підготувала матеріал до друку)

ДОДАТОК Б

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ЩОДО ВПЛИВУ ТРАНСФОРМАЦІЇ З
ВИКОРИСТАННЯМ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* БЕЗ
ЧУЖЕРІДНИХ ГЕНІВ НА СИНТЕЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК
ТА АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ**

Вид рослини	штам <i>A. rhizogenes</i>	Результати	Джерела
<i>Ocimum basilicum</i> L.	R1601	Ідентифіковано 55 метаболітів, з них найбільше – розмаринова кислота (62.05 ± 4.94 мкг / г СМ (сухої маси)), при загальному вмісту фенолів 62.3 ± 4.95 мкг / г СМ	Sathasivam et al., 2022
<i>Agastache rugosa</i> (FISCH. & C.A.MEY.) KUNTZE	R1000	Синтез розмаринової кислоти (до 7.656 ± 0.407 мкг / г СМ), загальний вміст фенолів (12.714 ± 0.202 мкг / г GAE (еквівалент галової кислоти))	Yeo et al., 2023
<i>Tetrastigma hemsleyanum</i> Diels et Gilg	C58C1	Загальний вміст флавоноїдів зменшився у порівнянні з контролем, проте вміст деяких флавоноїдів (катехін, епікатехін, неохлорогенова кислота, лютеолін-6-С-глюкозид, орієнтин) значно збільшився і сягнув 692.63 ± 127.24 , 163.34 ± 31.86 , 45.95 ± 3.46 , 209.68 ± 6.03 , та 56.82 ± 4.75 мкг / г СМ відповідно; також зросла антиоксидантна активність (IC_{50} зменшилась з контрольної позначки 2.34 ± 0.15 до 1.64 ± 0.16 мкг / мл)	Wang et al., 2023

<i>Leonotis nepetifolia</i> (L.) R. Br.	A4	Збільшення загального вмісту фенольних сполук з 15913.84 мкг / г СМ (контроль) до 21,838.95 мкг / г СМ; збільшився вміст катехіну, хлорогенової, р-, о- та m-кумаринової, синапінової, еллагової та розмаринової кислот, кумарину, рутину, гесперидину; збільшилась антиоксидантна активність	Kowalczyk et al., 2021
<i>Salvia bulleyana</i> Diels	A4	Збільшення загального вмісту поліфенольних сполук (до 48.9 мкг / г СМ порівняно з контролем 22 мкг / г СМ), з яких найбільше – розмаринова кислота (39.6 мкг / г СМ порівняно з контролем 7.6 мкг / г СМ)	Wojciechowska et al., 2020
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Steud.	A4	Зменшення рівня TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) на 50% (екстракт пагонів) та 30% (екстракт коренів)	Piątczak et al., 2016
<i>Physalis ixocarpa</i> Lam.	ATCC 15834	Збільшення ТАС (total antioxidant capacity) на 39% (екстракт коренів) та 64% (екстракт листя), збільшення загального вмісту фенолів, збільшення вмісту аскорбату у листі	Bergier et al., 2012
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	A4	Збільшення загального вмісту флавоноїдів (13.3 ± 1.0 до 73.1 ± 10.6 мг РЕ / г СМ) та активності проти DPPH радикалу (від 0.23 до 0.36 мг СМ трансформованих рослин порівняно з 1.09 ± 0.05 мг СМ)	Matvieieva et al., 2019

		контролю), зменшення активності СОД	
<i>Lactuca serriola</i> L.	AR15834	Збільшення загального вмісту фенолів (на 54.8 ... 96.7%), загального вмісту флавоноїдів (на 38.1...76.2%), загальної відновлювальної (на 56.7...96.7%) та антиоксидантної активностей (на 31.6...50%)	El-Esawi et al., 2017
<i>Isatis tinctoria</i> L.	LBA9402	Збільшення загального вмісту флавоноїдів (438.10 мкг / г СМ порівняно з контролем 341.73 мкг / г СМ) та антиоксидантної активності ($EC_{50} = 0.39...0.41$ мг СМ порівняно з контролем 0.48...0.56 мг СМ)	Gai et al., 2015
<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	LBA9402	Збільшення загального вмісту флавоноїдів (234.77 мкг / г СМ порівняно з контролем 187.38 мкг / г СМ та антиоксидантної активності ($EC_{50} = 1.40...1.73$ мг / мл порівняно з контролем 1.96...2.17 мг / мл)	Jiao et al., 2014
<i>Prosopis farcta</i> (Banks & Sol.) J.F. Macbr.	LBA9404, AR15834 and A4	Збільшення загального вмісту флавоноїдів у 1.54 та 2. разів в порівнянні з контролем (нетрансформованими коренями) на калусом, відповідно	Zafari et al., 2018
<i>Althea officinalis</i> L.	A4, A13, ATCC15834	Збільшення загального вмісту фенолів (до 1.57 ± 0.1 мг / г) та флавоноїдів (до 3.47 ± 0.3 мг / г)	Tavassoli et al., 2018

<p><i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.</p>	<p>КСТС 2703</p>	<p>Збільшення загального вмісту антрахінонів (емодин 211.32 мг / г СМ та парієтин 353.23 мг / г СМ, що у 3.7 та 3.5 разів більше, ніж у контролі), флавонолів (804.0 мг / г СМ порівняно з 549.5 мг / г СМ у контролі), гідроксицинаматів (833.5 мг / г СМ порівняно з 599.5 мг / г СМ), збільшення загального вмісту фенолів (8175.30 мг / г GAE порівняно з 5633.07 мг / г GAE), загального вмісту флавоноїдів (76.15 мг / г QE (кверцетиновий еквівалент) порівняно з 43.03 мг / г QE), антиоксидантної активності</p>	<p>Thiruvengadam et al., 2013</p>
--	------------------	---	-----------------------------------

ДОДАТОК В

ЛІНІЇ «БОРОДАТИХ» (№№1 – 5, 10, 12, 15, 16, 18) ТА КОНТРОЛЬНИХ (К)
КОРЕНІВ *ARTEMISIA TILESII* LEDEB.

