

УДК 581.1

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ КАЛЛУСОВ И НАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ СОЛОДКИ

© 2024 г. А. А. Ермошин^{a,*}, И. С. Киселёва^a, Б. А. Галишев^a, М. В. Улитко^a^aУральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

*e-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023 г.

После доработки 21.12.2023 г.

Принята к публикации 22.01.2024 г.

Корень солодки традиционно используется в медицине благодаря содержанию в нем сапонинов и флавоноидов. Листья солодки в качестве фармакопейного сырья не используются, хотя в последнее время ведется изучение их химического состава и биологической активности, что позволяет оценить возможности использования этого сырья как лекарственного. Активный сбор солодки может поставить под угрозу ее естественные популяции, поэтому актуальной задачей является культивирование клеток этого растения в системах *in vitro* и изучение состава метаболитов культур клеток. В нашем исследовании материалом для получения каллусной культуры листьев солодки были растения из коллекции Ботанического сада Уральского Отделения РАН. Для подбора оптимальных условий выращивания каллусов проведено сравнение 9 комбинаций фитогормонов. Лучший рост каллусов был обнаружен на среде Мурасиге-Скуга с сочетанием фитогормонов 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК. В этих условиях флавоноиды накапливались в каллусе в количестве, сопоставимом с их содержанием в интактных листьях и корнях. Содержание фенольных соединений было сравнимо с их количеством в корнях. Этанольные экстракты, полученные из каллусной культуры, обладали выраженной антиоксидантной активностью, сравнимой с экстрактами из интактного растения и стандартами рутина, галловой и аскорбиновой кислотами. При оценке влияния экстрактов на культуры животных клеток в МТТ-тесте показано, что все полученные экстракты повышали метаболическую активность как нормальных клеток человека, так и линии HeLa. При этом экстракт, полученный из листьев, проявлял максимальный эффект, а из каллуса — минимальный и незначительно отличался от экстракта корня. Таким образом, каллусы из листовых эксплантов могут рассматриваться как новое сырье для получения БАД с антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: *Glycyrrhiza glabra*, антиоксиданты, каллусная культура, фенольные соединения, ABTS-тест, МТТ-тест, NO

DOI: 10.31857/S0015330324010167, **EDN:** NUXORS

ВВЕДЕНИЕ

Солодка (*Glycyrrhiza glabra* L.) — многолетнее растение из семейства бобовых. Корни солодки с древнейших времен используются в официальной и народной медицине многих стран. Их экстракты применяют, главным образом, как отхаркивающее средство, а также для коррекции вкуса галеновых препаратов и как вспомогательное средство, облегчающее проникновение других активных веществ в ткани человека при приеме лекарственных препаратов. Кроме того, из солодки получены препараты, показавшие противовоспалительную (глицерритиновая кислота) и антибактериальную (глицерритиновая кислота и флавоноиды) активность, а также противоопухолевую и ряд других биологических активностей [1]. Важными биологически активными веществами корня солодки, обуславливающими

эту активность, являются сапонины [1], флавоноиды и полисахариды [2].

Несмотря на длительное применение солодки в медицине, изучение ее химического состава и биологической активности продолжается в настоящее время. Показано, что корень содержит от 22 до 44% экстрактивных веществ [3]. Основными действующими веществами корня и корневищ солодки являются производные тритерпенов (7.3–23.6%), в том числе стероидов (1.5–2%). Сопутствующие вещества — углеводы (18–34%), липиды (0.2–4.7%), смолы (1.7–4.1%), белки (6.2–10.1%) [4]. Кроме того, показана высокая биологическая активность экстрактов солодки и специфичность состава фенольных соединений, в частности флавоноидов, содержание которых составляет 3–4% от сухой массы [4, 5].

К сапонидам солодки относят 18- β -глицеретиновую кислоту и ее тритерпеновый гликозид — глицерризовую кислоту. Для этих соединений была показана гепатопротекторная функция, позитивное действие на ткани головного мозга при ишемии, противовоспалительный эффект при вирусных и бактериальных инвазиях, ингибирование репликации вирусов, в частности ВИЧ-1, Эпштейн-Барра, гепатита В [6] и COVID-19 [7].

Среди флавоноидов солодки обнаружены кверцетин, изофлавоон глабридин, халконы изоликвиригенин и ликуразид, ряд других соединений [5, 8]. Эти вещества подавляют образование активных форм кислорода (АФК), прерывают цепь свободнорадикальных реакций, снижают ответ макрофагов при воспалительных процессах [8].

Помимо прочего, для водных и спиртовых экстрактов солодки показаны положительные эффекты при бронхиальной астме, онкологических заболеваниях, а также иммуномодулирующее и противодиабетическое действие [9, 10].

Активный сбор солодки для нужд медицины и пищевой промышленности привел к истощению ее природных запасов и уменьшению генетического разнообразия в популяциях этого вида растений. В ряде регионов РФ и стран ближнего зарубежья солодка голая находится на грани истребления и занесена в региональные Красные книги (Курганской, Калужской, Самарской, Саратовской областей, республики Крым, Болгарии, Украины) (https://ozonit.ru/krasnaya_kniga/krasnaya_kniga_lekarstvennih_rastenii.php). Это определяет важность введения этого вида в культуру клеток и тканей и биотехнологического воспроизводства сырья с целью сохранения природных популяций.

Следует отметить, что надземная часть растения солодки изучена в меньшей степени, чем корни и корневища, и в официальной медицине не используются. Тем не менее, листья солодки характеризуются разнообразием флавоноидов. В экспериментах *in vitro* показана противораковая и противовирусная активность этих соединений [11]. Флавоноиды и фенольные соединения известны как антиоксиданты, которые участвуют в гашении АФК и NO-радикалов. Это определяет возможность их использования для создания новых БАД и функциональных продуктов.

В обзоре Аммосова и др. [5] проведено подробное сравнение состава различных групп фенольных соединений в корнях, надземной массе и каллусных культурах солодки. Показано, что кроме общих для корней и надземной биомассы фенольных соединений, у солодки имеются специфичные для разных органов вещества. В целом, сведений по составу фенольных сое-

динений в каллусной культуре крайне мало, что определило наш интерес к этому вопросу.

Считается, что для индукции каллусогенеза важен эпигенетический профиль исходного экспланта. Так, для синтеза сапонинов в культуре солодки рекомендуется в качестве первичного экспланта использовать фрагменты корня [12], хотя глицерризин потенциально может синтезироваться также в культуре клеток, индуцируемой из листовых эксплантов [12]. Однако авторы отмечали эту способность только у части полученных ими каллусов, а также указывали на низкий уровень синтеза сапонинов, состав фенольных соединений не был изучен.

В нашем исследовании в качестве исходного материала для получения каллусных культур были выбраны листья солодки. Такой выбор обусловлен тем, что химический состав и биологическая активность экстрактов каллусов, полученных из листьев, изучены в меньшей степени, чем биологически активные соединения корней и полученных из них экстрактов. Кроме того, листья являются более удобным объектом для введения в культуру клеток, так как они более доступны для исследований (не требуется извлекать растение из почвы), и в листьях обычно внутренняя инфекция меньше, чем в подземных органах.

В связи с вышесказанным целью нашей работы было получение каллусной культуры листьев солодки голой, характеристика спектра фенольных соединений в полученных из нее экстрактах, определение их антиоксидантной активности *in vitro*, а также изучение влияния экстрактов из каллуса и интактных растений на культуры нормальных и раковых клеток человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Введение растительного материала в культуру

Каллусную культуру получали из эксплантов листьев солодки *Glycyrrhiza glabra* L., культивируемой в Ботаническом саду УрО РАН (Екатеринбург). Материал был предоставлен А.Ю. Беляевым, лаборатория молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН. Исходные растения солодки были интродуцированы из природных популяций Южного Урала.

Растительный материал стерилизовали по стандартной методике: 70% этанолом (1 мин) и гипохлоритом натрия (0.2% активного хлора, 15 мин), после чего 4 раза отмывали стерильной дистиллированной водой. Каллусы индуцировали в темноте на МС-среде с 3% сахарозой (pH 5.8 перед автоклавированием и внесением фитогормонов) с добавлением 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 10 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Показано, что такое сочетание фитогор-

монов эффективно для каллусогенеза корневых эксплантов солодки [13]. Для подбора комбинации фитогормонов, обеспечивающей наиболее интенсивный рост и высокую выживаемость каллусов, первичные каллусы пассировали на 9 вариантах сред, содержащих БАП в концентрации: 0.2, 1.0, 5 мг/л и НУК в концентрации – 2, 10, 20 мг/л. Эксперимент закладывали трижды по две чашки Петри на каждый вариант опыта, 20–30 каллусов на чашку. Через 4 недели проводили описание каллусной культуры, визуально оценивали цвет, прирост сырой биомассы культуры определяли гравиметрически. Подсчитывали число растущих и погибших (потемневших и остановившихся в росте) каллусов. Результат выражали в процентах (%) выживших от общего числа каллусов.

Получение экстрактов

Для получения экстрактов использовали корни солодки, выращенной в Ботаническом саду (материал собран в июне со здоровых вегетирующих растений, не вступивших в фазу цветения). Клоны растений, взятых для сбора корней, выращивали в почве, отобранной в ботаническом саду УрО РАН, в лабораторных условиях в сосудах объемом 0.5 л. У этих растений для анализа химического состава и для получения эксплантов отбирали листья среднего яруса, как наиболее функционально активные. Это позволило круглогодично получать материал для анализа и индукции листовых эксплантов.

Для экстракции фенольных соединений из каллусной культуры, нативных листьев и корней солодки применяли 95% этанол. Для получения экстрактов использовали 0.2 г сухой биомассы биологического материала, представляющего усредненную пробу листьев или корней трех растений и 20 каллусов. Соотношение биомассы и растворителя 1 : 10 (масса : объем). Экстракцию проводили трехкратно. Каждый раунд экстракции имел продолжительность 40 мин при температуре 50°C, периодическом помешивании и постоянной обработке ультразвуком. Экстракты объединяли, доводили до определенного объема, что соответствовало 20 мг сухого вещества на 1 мл готового экстракта.

*Биохимические исследования и *in vitro* антиоксидантная активность*

В экстрактах спектрофотометрически определяли содержание суммы фенольных соединений (с 0.1 М реактивом Фолина-Чикольтеу и 7.5% карбонатом натрия, при длине волны 760 нм) и флавоноидов (с 2% спиртовым раствором хлорида алюминия, при длине волны 420 нм) [14]. Методика была модифицирована для полумикроанализа – объем реагентов и

пробы был уменьшен пропорционально, что бы общий объем реакционной смеси составлял 0.2 мл для проведения анализа в 96-луночных планшетах. Калибровочные кривые готовили, соответственно, по галловой кислоте и рутину. Содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов выражали в мг/г сухой биомассы, в пересчете на галловую кислоту и рутин соответственно.

Антиоксидантную и антирадикальную активность экстрактов *in vitro* определяли по ингибированию образования окрашенного АБТС-радикала [14], подавлению образования оксида азота (высокоактивного свободного радикала) в реакции с нитропруссидом натрия и реактивом Грисса, а также по общему восстановительному потенциалу – образованию молибденовой сини [15]. В качестве образцов сравнения использовали рутин, галловую и аскорбиновую кислоту в концентрации 0.5 мг/мл. Все использованные в работе реактивы квалификации чда или хч. Стандарты для калибровочных графиков и образцы сравнения производства Merk (Германия). Измерение проводили на микропланшетном спектрофотометре Infinite M200 Pro (“Tecan”, Австрия). При определении антиоксидантной активности все расчеты проводили относительно отрицательного контроля – реакционной смеси, в которую был добавлен этанол (экстрагент) в том же объеме, что и экстракт в опытных пробах, таким образом, во всех методах антиоксидантная активность контрольного образца равнялась 0%, а опытные образцы и растворы стандартов (положительный контроль) сравнивались с ним.

*Тестирование биологической активности на культуре клеток человека *in vitro**

Метаболическую активность культуры дермальных фибробластов человека, выделенных в Институте медицинских клеточных технологий (Екатеринбург) и карциномы шейки матки человека линии HeLa, полученной из коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук определяли по стандартной методике по образованию формаза в МТТ-тесте после 48 ч инкубирования культуры совместно с экстрактами (5% от объема среды культивирования) [16]. Все операции, связанные с инкубированием клеток проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе БАВ-нп-01-“Ламинар-С”-1,2 LORICA (“Ламинар Системс”, Россия). Клетки культивировали до образования монослоя в CO₂ инкубаторе Sanyo (“Panasonic”, Япония) MCO-18AC при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂, 95% влажности с использованием питательной среды Игла DMEM (“Биолот”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Биолот”,

Россия) и пенициллин-стрептомицина (“Биолот”, Россия).

Оптическую плотность раствора формазана измеряли на микропланшетном спектрофотометре Infinite M200 Pro (“Tecan”, Австрия) при длине волны 570 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Перед хроматографическим разделением 1 мл этанольного экстракта, полученного как описано ранее, пропускали через предколону с модифицированным C-18 сорбентом для удаления прочно связывающихся с ним веществ. Первые 0.8 мл экстракта отбрасывали, оставшиеся 0.2 мл пропускали через микрофильтр с размером пор 0.22 мкм, для удаления микрочастиц. Полученный образец использовали для ВЭЖХ.

Анализ проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (“Waters”, США), с гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (“Waters”, США). Пробу в объеме 3 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) (“Waters”, США). Температура колонки – 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. Подвижная фаза – 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0–23 мин – 5→60%, 23–23.5 мин – 60→95%, 23.5–25.0 мин – 95%, 25.0–25.5 мин – 95→5%, 25.5–27.0 мин – 5%. Анализ осуществляли в режиме отрицательной ионизации. Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120°C, температура десольвации – 350°C, напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота 750 л/час. Индивидуальные фенольные соединения и флавоноиды определяли, сопоставляя время удержания и молекулярную массу характеристического иона со стандартами.

Статистическая оценка результатов

Определение содержания фенольных соединений, антиоксидантной и метаболической активности экстрактов проводили в 4–5 повторностях. Достоверность различий определяли по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни с использованием программных пакетов Statistica 10 и MS Excel 2010. На рисунках и в таблицах представлены средние значения измеряемых параметров и ошибка среднего. Разными буквами обозначены различающиеся варианты ($P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбор оптимального сочетания фитогормонов для роста каллусов

Все варианты сред, содержащих БАП в концентрации 5 мг/л не зависимо от концентрации НУК в среде, вызывали гибель каллусов (табл. 1). На средах с 0.2 мг/л БАП выживаемость каллусов варьировала от 16 до 100% в зависимости от содержания НУК, а на средах с 1 мг/л БАП – от 87 до 100% при разных концентрациях НУК. При этом при добавлении в среду 2 мг/л НУК каллусы при всех использованных концентрациях БАП росли медленнее, быстрее старели, что выражалось в их потемнении. С ростом количества НУК каллусы становились более светлыми. При внесении 10 мг/л НУК в среду каллусы были окрашены в светло-коричневый цвет, тогда как при 20 мг/л – в желтый (рис. 1).

Лучший рост каллусов наблюдали в вариантах 1 мг/л БАП и 10 или 20 мг/л НУК. При таком соотношении фитогормонов в среде прирост каллусов на третью неделю пассирования сохранялся на том же уровне. Индекс роста каллусов для этих сочетаний фитогормонов существенно не отличался и составлял от 3.5 до 4.5. Это больше, чем, например, в варианте с той же концентрацией БАП (1 мг/л), но меньшей концентрацией НУК (2 мг/л), где индекс роста каллусов составлял около 2.7.

Содержание фенольных соединений

В экстрактах, полученных из каллусов, выращенных на средах с двумя выбранными комбинациями фитогормонов, определяли суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов. Полученные результаты пересчитывали на единицу сухой массы материала. Поскольку корни традиционно применяются в медицине, их рассматривали как образец сравнения.

Таблица 1. Выживаемость каллусов (%) на средах с различной комбинацией фитогормонов

		Нафтилуксусная кислота, мг/л		
		2	10	20
Бензиламинопури- н, мг/л	0.2	16	73	100
	1	87	87	100
	5	0	0	0

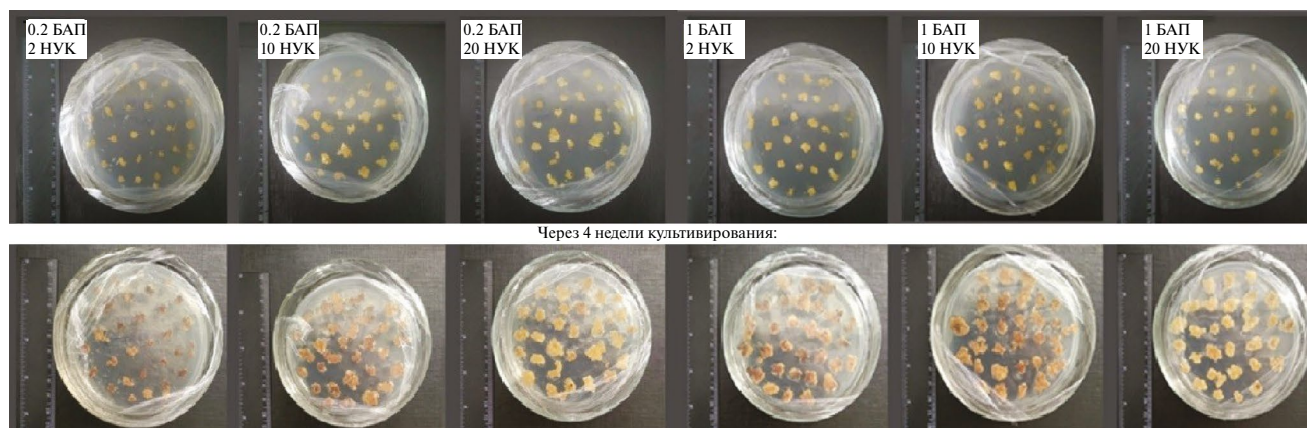


Рис. 1. Рост каллусов через месяц культивирования. БАП — бензиламинопурин (мг/л); НУК — нафтилуксусная кислота (мг/л).

Показано, что экстракты из нативных листьев солодки наиболее богаты фенольными соединениями (29.7 мг/г) в сравнении с каллусами из листовых эксплантов (1.9–4.5 мг/г) и корнями (3.6 мг/г) (рис. 2а). Однако по общему содержанию фенольных веществ каллусные культуры были сопоставимы с экстрактами из корней, которые являются сырьем для получения лекарственных препаратов. В то же время, с увеличением концентрации ауксинов в среде культивирования содержание фенольных соединений заметно снижалось (в 2.5 раза).

Суммарное содержание флавоноидов различалось в трех типах экстрактов. В корнях оно было выше (14.5 мг/г), чем в надземных органах

(10.0 мг/г), а в каллусах меньше, чем в корнях и листьях (3.4–7.1 мг/г) (рис. 2б).

Известно, что фенольные соединения и флавоноиды являются мощными антиоксидантами, поэтому было важно сравнить антиоксидантную активность экстрактов.

Флавоноиды относятся к фенольным соединениям, однако в ряде случаев их содержание в образце превышало суммарное количество фенольных соединений. Это можно объяснить тем, что суммарную концентрацию фенольных соединений и флавоноидов определяли в расчете на разные соединения (галловую кислоту или рутин соответственно), что было указано в методах.

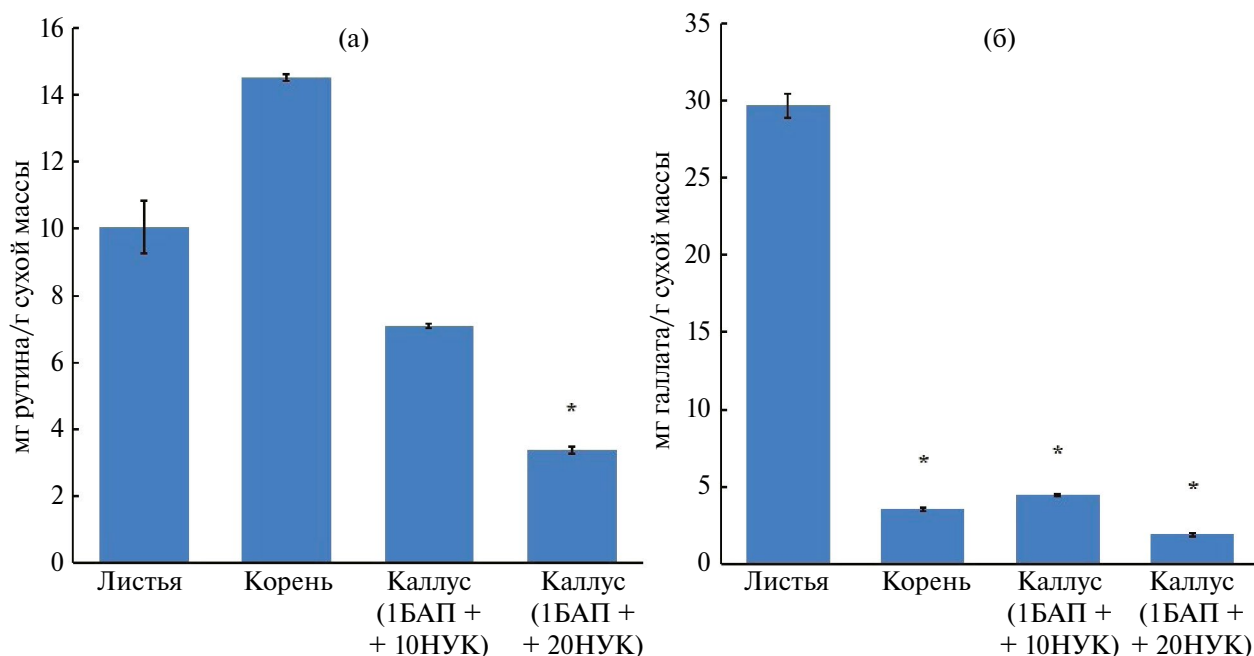


Рис. 2. (а) — Содержание суммы фенольных соединений (в пересчете на галловую кислоту) и (б) — флавоноидов (в пересчете на рутин) в интактных растениях и каллусных культурах. * — отличия от листа при $P < 0.05$. Достоверных отличий между другими вариантами не выявлено.

In vitro показатели антиоксидантной активности экстрактов

Антиоксидантная активность, выраженная как общая восстановительная способность, в 2–3 раза была выше в листьях, чем в корнях и каллусах (табл. 2). По этому показателю экстракты каллуса были сходны с экстрактами корней, но не листьев. В экстрактах каллуса, выращенного с добавлением 1 мг/г БАП и 10 мг/г НУК, эта активность была выше, чем в случае с 1 мг/г БАП и 20 мг/г НУК. Однако восстановительная активность соединений не всегда коррелирует с их способностью ингибировать образование радикалов. Экстракты каллусов, полученные при разных концентрациях НУК, не отличались от экстракта корней и несколько превосходили экстракт листьев по способности ингибировать образование АБТС-радикала. При этом каллусные культуры уступали как листьям, так и корням по способности ингибировать образование оксида азота.

Состав индивидуальных фенольных соединений

Каллусную культуру, растущую на среде с 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК, показавшую лучший рост и синтез фенольных соединений, использовали для ВЭЖХ-МС анализа. В качестве образца сравнения использовали экстракт корня. Анализ показал, что галловая, салициловая, сиреневая, ванилиновая кислоты, ресвератрол, катехин, кверцетин и флороглюцин отсутствовали как в каллусной культуре, так и в корне. В корне был обнаружен рутин, но он не был найден в каллусной культуре. В обоих исследованных образцах присутствовала *p*-кумаровая кислота, тогда как феруловая кислота — только в каллусе (рис. 3).

Влияние экстрактов на метаболическую активность культивируемых клеток

Для изучения биологической активности экстрактов солодки использовали только экстракты каллусной культуры, полученной на среде с 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК. Для тестов использовали культуру фибробластов и клеток HeLa.

Метаболическую активность культивируемых клеток человека выявляли в МТТ-тесте, отражающем активность дыхательных ферментов [16]. Показано, что добавление экстрактов существенно повышает метаболическую активность как нормальных, так и патологических клеток. При этом стимулирование активности было выше в культуре фибробластов, чем в линии опухолевых клеток. Наибольший стимулирующий эффект оказывали экстракты, полученные из листа, а наименьший — экстракты каллусов. В данном тесте эффект, оказываемый экстрактами каллуса, был схож с эффектом экстракта корня, но не листа (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения каллусов из листьев солодки было испытано действие разных сочетаний фитогормонов. Наибольшая доля выживших каллусов обнаружена при добавлении в среду 10 и 20 мг/л НУК (табл. 1) при содержании в среде 1 или 0.2 мг/л БАП. При этом снижение концентрации БАП с 1 до 0.2 мг/л существенно не влияло на выживаемость культуры, однако ускоряло ее старение и вызывало потемнение каллусов. Полученный результат согласуется с известным эффектом замедления старения органов и тканей растений цитокининами [17]. Это также может быть связано с уменьшением синтеза фенольных соединений, которые при окисле-

Таблица 2. Показатели *in vitro* антиоксидантной активности

Образец	Восстановительный потенциал, %	Ингибирование АБТС-радикала, %	Подавление продукции NO, %
Листья	1160 ± 91*	84.5 ± 10	38 ± 3
Корень	550 ± 30 ^x	92.8 ± 0.1	37 ± 3
Каллус (БАП 1 мг/л + НУК 10 мг/л)	585 ± 31 ^x	91.9 ± 0.1	17 ± 2 ^{x*}
Каллус (БАП 1 мг/л + НУК 20 мг/л)	340 ± 20 ^{x*}	92.7 ± 0.2	22 ± 2 ^{x*}
Аскорбиновая кислота, 0.5 мг/мл	255 ± 12 ^{x*}	0.0 ± 0.0 ^{x*}	24 ± 1 ^{x*}
Галловая кислота, 0.5 мг/мл	359 ± 10 ^{x*}	93.4 ± 0.1	36 ± 10
Рутин, 0.5 мг/мл	113 ± 9 ^{x*}	71.2 ± 2.3*	0 ± 0 ^{x*}

Примечание: ^x — отличия от листа достоверны при $P < 0.05$; * — отличия от корня достоверны при $P < 0.05$.

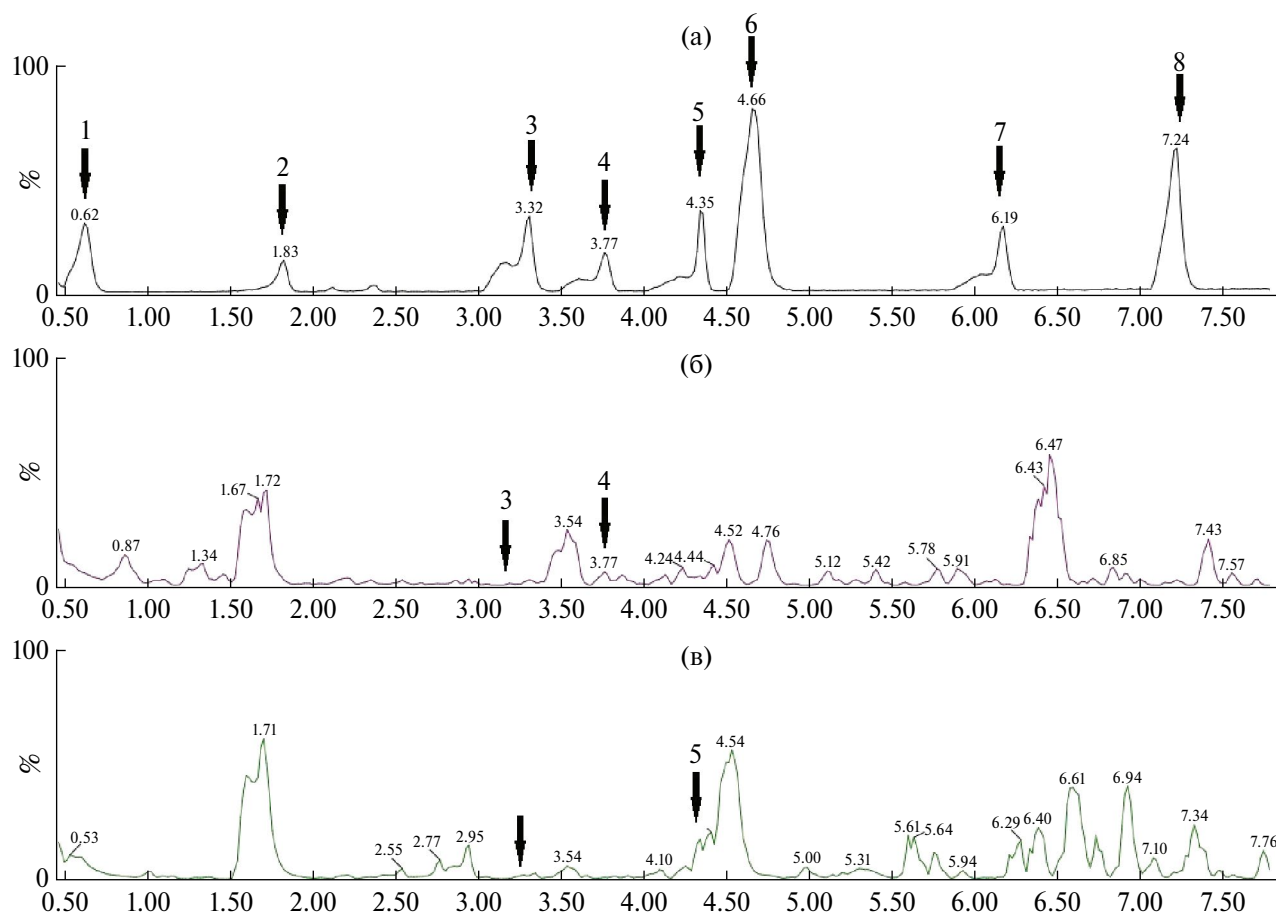


Рис. 3. Хроматограмма смеси стандартов (а), экстракта, полученного из каллуса (б) и из корня (в) солодки. 1 – галловая кислота; 2 – катехин; 3 – *p*-кумаровая кислота; 4 – феруловая кислота; 5 – рутин; 6 – салициловая кислота; 7 – ресвератрол; 8 – кверцетин.

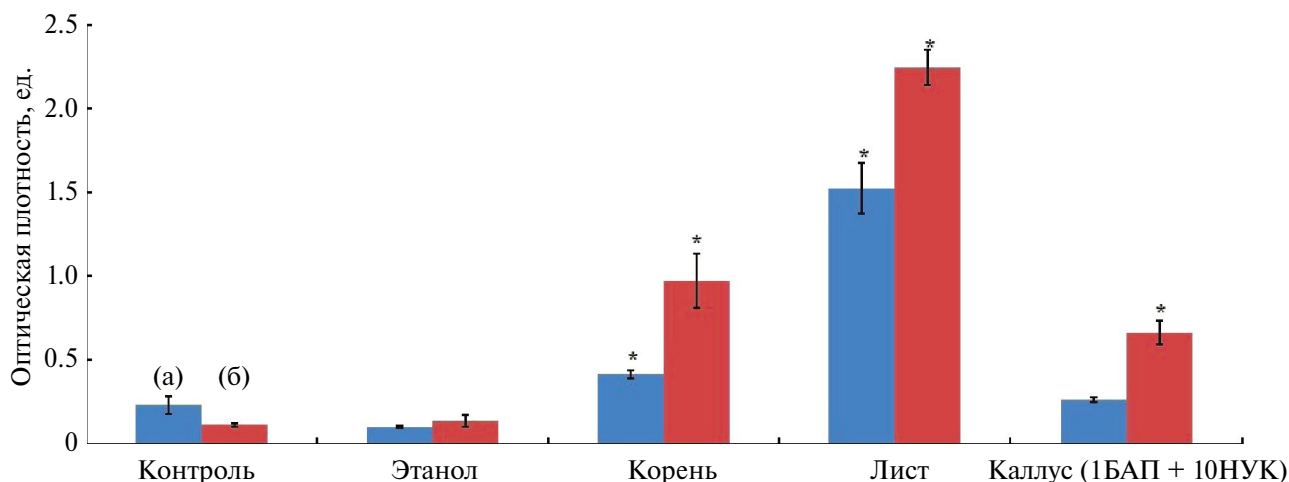


Рис. 4. Метаболическая активность клеточной линии HeLa (а) и культивируемых фибробластов человека (б). * – от отличия от контроля и от этанола достоверны при $P < 0.05$. Варианты “контроль” и “этанол” между собой достоверно не различаются.

нии превращаются в хиноны или с увеличением оводненности каллуса при росте концентрации ауксинов. По нашим данным увеличение концентрации НУК в среде культивирования приводило к заметному снижению содержания фенольных соединений.

Сравнение полученных данных с результатами других исследователей [12] показало, что более низкие концентрации НУК при таких же действующих концентрациях БАП вызывают образование каллуса с такой же частотой. При этом в каллусах наблюдали обра-

зование побегов с частотой от 15 до 50%, что мы считаем нежелательным явлением при получении каллусных культур, являющихся продуцентами БАВ.

Использование более сложных сочетаний фитогормонов (кинетин или БАП, НУК, ИУК (индолилуксусная кислота) или 2,4-Д) [18] при индуцировании каллуса из корней солодки показало, что при одновременном внесении БАП и ИУК каллус не образовывался, а при 0.5 мг/л НУК, 0.5 мг/л ИУК и 1 мг/мл кинетина частота каллусогенеза была ниже, чем в подобранных нами сочетаниях фитогормонов.

Было показано [12], что в каллусах листовых и стеблевых эксплантов солодки синтезировался глицерризин. В полученных нами каллусах не было определено содержание тритерпеновых сапонинов, но на основе литературных данных [12], можно предположить, что они также способны синтезировать глицерризин. Накопление сапонинов [18] было также обнаружено при старении каллусов, при этом изменение содержания суммы фенольных соединений и флавоноидов с увеличением возраста культуры происходило нелинейно и не столь драматично как глицерризиновой кислоты [18].

Сопоставление содержания фенольных соединений в каллусах, полученных нами из листовых эксплантов с каллусами из корней [18] показало, что этих соединений в них было примерно в 1.5 раза меньше, а флавоноидов столько же. При этом соотношение суммы фенольных соединений к сумме флавоноидов в каллусах из листовых эксплантов было значительно меньше, чем в культуре, полученной из корней на среде с несколькими видами ауксинов.

По содержанию фенольных соединений и соотношению суммы фенольных веществ и флавоноидов экстракты каллусов из листьев солодки имели больше сходства с экстрактами нативных корней и корневищ. В сравнении с нативными листьями содержание суммы фенольных соединений в полученных нами каллусах было меньше, а флавоноидов такое же. С увеличением концентрации НУК в среде культивирования каллусов содержание этих метаболитов снижалось (рис. 2).

С накоплением фенольных соединений и флавоноидов связывают биологическую активность экстрактов корней и листьев солодки. Так, Vlasisavljević с соавт. и Frattaruolo с соавт. [19, 20] показали антиоксидантную активность этих экстрактов. Такие же свойства показали экстракты каллусов, полученные нами из листовых эксплантов. Их антиоксидантная активность в тестах *in vitro* была сопоставима с антиоксидантной активностью экстракта из интактных корней. Увеличение концентрации НУК в среде культивирования каллусов не оказывало суще-

ственного влияния на антиоксидантную активность экстрактов, полученных из них, хотя негативно сказывалось на содержании фенольных метаболитов (табл. 2).

Показано, что флавоноиды солодки способны проявлять противовоспалительную [20] и противораковую активность *in vitro*, например, подавлять рост клеточной линии аденокарциномы и рака яичника [19]. Авторы указанного исследования обнаружили в экстракте корней солодки такие флавоноиды как апигенин, нарингинин, кемпферол, эпикатехин, катехин, рутин, кверцетин и другие. Были также найдены изофлавоноиды, лигнаны, кумарины, а также протокатеховая, *p*-кумаровая, *o*-кумаровая, ванилиновая, феруловая, хлорогеновая, кофейная, коричная, галловая кислоты. Однако в сумме содержание всех этих соединений составляло меньше половины от суммарного содержания фенольных соединений, определенных спектрофотометрическим методом в листьях солодки.

В нашем исследовании биологическая активность экстрактов солодки была проверена на культуре фибробластов человека и опухолевой клеточной линии HeLa (рис. 3). Для тестирования использовали экстракт корневища, листьев и каллуса, полученного на МС-среде с добавлением 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК. Было показано, что экстракт интактного листа вызывает наибольшее повышение метаболической активности нормальных и патологических клеток в МТТ-тесте. Важно, что экстракты корневища и листа стимулировали рост как нормальных, так и патологических клеток, тогда как экстракт, полученный из каллусной культуры — стимулировал метаболическую активность только нормальных клеток, тогда как в опухолевых клетках этот показатель не отличался от контрольного варианта. Клеточные культуры HeLa — один из самых распространенных, но далеко не единственный тестовый объект для изучения противораковой активности биологически активных соединений природного и синтетического происхождения. В работе [19] противоопухолевая активность экстрактов солодки также была обнаружена.

Таким образом, дальнейшее изучение биологической активности экстрактов каллуса солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.) из разных эксплантов может вызывать интерес в связи с возможностью получения перспективного сырья для получения антиоксидантных и противораковых препаратов.

ВЫВОДЫ

Подобраны оптимальные условия культивирования каллусов солодки, индуцированных из листовых эксплантов: МС-среда с 3% сахарозой и комбинацией фитогормонов — БАП

(1 мг/л) и НУК (10 мг/л). Увеличение концентрации БАП в среде вызывало снижение жизнеспособности каллусов, а повышение уровня НУК уменьшало содержание вторичных метаболитов и антиоксидантные свойства экстрактов из каллусов.

Каллусные культуры значительно уступали интактным листьям по сумме фенольных соединений, а содержание флавоноидов практически не различалось. По содержанию фенольных веществ и соотношению количества фенольных соединений к флавоноидам, каллусы, полученные из листовых эксплантов, сравнимы с нативными корнями. Экстракты из каллусов листьев солодки демонстрировали такие же антиоксидантные свойства, что и экстракты корней и типичных антиоксидантов – аскорбиновой и галловой кислот и рутина.

Экстракты корней солодки, ее листьев и каллусов, полученных на их основе, стимулировали метаболическую активность нормальных (фибробласты) и опухолевых (HeLa) линий клеток человека, причем экстракт каллуса в меньшей степени стимулировал раковые клетки, чем нормальные.

Таким образом, каллусная культура солодки, полученная из листьев, может стать новым перспективным сырьем для синтеза вторичных метаболитов, в частности флавоноидов, обладающих высоким антиоксидантным потенциалом. Культивирование каллусов солодки *in vitro* позволит сократить сбор растений в природе и восстановить естественную численность популяции этого вида.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ding Y., Brand E., Wang W., Zhao Z. Licorice: Resources, applications in ancient and modern times // J. Ethnopharmac. 2022. V. 15. P. 298:115594. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115594>
2. Pastorino G., Cornara L. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review // Phytother Res. 2018. V. 2. P. 2323. <http://doi.org/10.1002/ptr.6178>
3. Рыбальченко А.С., Голицын В.П., Комарова Л.Ф. Исследование экстракции солодкового корня // Химия растительного сырья. 2002. Т. 4. С. 55.
4. Hosseinzadeh H., Nassiri-Asl M. Pharmacological effects of *Glycyrrhiza* spp. and its bioactive constituents: update and review // Phytother Res. 2015. V. 12. P. 1868.
5. Ammosov A., Litvinenko V. Phenolic compounds of the general *Glycyrrhiza* L. and *Meristotropis* Fisch.

- et Mey. (review) // Pharmaceutical Chem. J. 2007. V. 41. P. 372. <http://doi.org/10.1007/s11094-007-0084-4>
6. Kao T.C., Wu C.H., Yen G.C. Bioactivity and potential health benefits of licorice // J. Agricult. Food Chem. 2014. V. 62. P. 542. <http://doi.org/10.1021/jf404939f>
7. Zhang Q., Huang H., Qiu M., Wu Z., Xin Z., Cai X., Shang Q., Lin J., Zhang D., Han L. Traditional uses, pharmacological effects, and molecular mechanisms of licorice in potential therapy of COVID19 // Front. Pharmacol. 2021. V. 12. P. 719758. <http://doi.org/10.3389/fphar.2021.719758>
8. Wahab S., Annadurai S., Abullais S., Das G., Ahmad W., Ahmad M., Kandasamy G., Vasudevan R., Ali M., Amir M. *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): A comprehensive review on its phytochemistry, biological activities, clinical evidence and toxicology // Plants. 2021. V. 10. P. 2751. <https://doi.org/10.3390/plants10122751>
9. Mamedov N., Egamberdieva D. Phytochemical constituents and pharmacological effects of licorice: A review // Plant Human Health. 2019. V. 3. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04408-4_1
10. Deeksha S., Priyanka N., Priti S. Phytochemistry and pharmacological studies of *glycyrrhiza glabra*: A medicinal plant review // Inter. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res. 2021. V. 67. P. 187. <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v67i01.030>
11. Yang R., Wang L.Q., Yuan B.C., Liu Y. The pharmacological activities of licorice // Planta Medica. 2015. V. 81. P. 1654. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557893>
12. Wongwicha W., Tanaka H., Shoyama Y., Tuvshintogtokh I., Putalun W. Production of glycyrrhizin in callus cultures of licorice // Zeitschrift fur Naturforschung C. 2008. V. 63. P. 413. <https://doi.org/10.1515/znc-2008-5-617>
13. Юшков Е.В., Мусеева Т.В., Величко Н.А., Пенях С.М. РФ Патент 2123255, 1998.
14. Larayetan R., Ololadem Z., Ogunmola O., Ladokun A. Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxicity, antimicrobial, antitrypanosomal, and antimalarial potentials of the crude extracts of *Callusesstemon citrinus* // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2019. 5410923. <https://doi.org/10.1155/2019/5410923>
15. Umamaheswari M., Chatterjee T.K. In vitro antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract // Afr. J. Tradit. Compliment Med. 2008. V. 5. P. 61.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunolog. Meth. 1986. V. 65. P. 55.
17. Romanov G. How do cytokinins affect the cell? // Russ. J. Plant Physiol. 2009. V. 56. P. 268. <https://doi.org/10.1134/S1021443709020174>
18. Акулов А.Н., Костюкова Ю.А. Условия культивирования, гистологический и биохимический

- анализ каллусной культуры солодки *Glycyrrhiza glabra* L. // Цитология. 2021. Т. 63. С. 590.
<https://doi.org/10.31857/S004137712106002X>
19. Vlaisavljević S., Šibul F., Izabella S., Zupko I., Ocsovszki I., Jovanovic-Santa S. Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. // Industrial Crops and Products. 2018. V. 112. P. 217.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.050>
20. Frattaruolo L., Carullo G., Brindisi M., Mazzotta S., Bellissimo L., Rago V., Curcio R., Dolce V., Aiello F., Cappello A. Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) leaf phytocomplexes: identification of licoflavanone as a modulator of NF-κB/MAPK pathway // Antioxidants. 2019. V. 8. P. 186.
<https://doi.org/10.3390/antiox8060186>