

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНИАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ ВО ФЛОРЕ ТУРКМЕНИСТАНА

Т.Ш. Дурдыев¹, преподаватель

Д.Г. Гадамов², док. хим. наук

А. Акмурадов³, канд. биол. наук, докторант

И. Гурбанов¹, канд. хим. наук

¹Государственный медицинский университет Туркменистана им. Мырата Гаррыева

²Международный научно-технологический парк АН Туркменистана

³Инженерно-технологический университет Туркменистана им. Огузхана

^{1,2,3}(Туркменистан, г. Ашхабад)

DOI:10.24412/2500-1000-2026-2-1-22-29

Аннотация. В данной научно-исследовательской работе представлены результаты научных работ по микроклональному размножению в лабораторных условиях расторопши пятнистой, встречающейся во флоре Туркменистана. В ходе исследований расторопша пятнистая выращивалась в лабораторных условиях на слегка модифицированной среде Мурасиге-Скуга. Проведены сравнительные исследования культивируемого растения с формой, произрастающей в естественных условиях.

Ключевые слова: расторопша пятнистая; микроклональное размножение; *in vitro*; силимарин.

Применение фитотерапевтических свойств в медицине. Семена расторопши пятнистой используются в свежемолотом виде, заваренные в виде чая или в виде водно-спиртового экстракта в лечебных целях.

Силимарин включен в фармакопеи многих стран. Средняя суточная норма потребления измельченных семян для взрослых составляет 12-15 г; стандартизированного экстракта семян (силимарин): 200-400 мг в день; жидкого экстракта семян: 4-9 мл в день. Силимарин очень плохо растворяется в воде, поэтому семена расторопши пятнистой не очень эффективны в качестве чая. Приготовленный для питья экстракт семян расторопши пятнистой в форме таблеток или капсул обычно представляет собой стандартизированный экстракт семян, содержащий 70-80% силимарина. Терапевтические и оздоровительные эффекты семян расторопши пятнистой связаны с несколькими молекулярными механизмами. Его основная активность – антиоксидантное и гепатопротекторное действие.

Антиоксидант. Было установлено, что силимарин действует как превосходный антиоксидант, нейтрализуя свободные радикалы и препятствуя перекисному окислению липидов, тем самым защищая клетки от оксидативного стресса. Он усиливает нефермента-

тивные и ферментативные антиоксидантные защитные системы клеток, такие как глутатион, супероксиддисмутаза и каталаза. Благодаря своей способности предотвращать перекисное окисление липидов и восстанавливать уровень глутатиона, он может защищать печень, мозг, сердце и другие жизненно важные органы от оксидативного поражения. Силибинин обладает мембранозащитными свойствами и может защищать компоненты крови от оксидативного поражения.

Гепатопротектор. Использование семян расторопши пятнистой в качестве средства для защиты печени восходит к первому веку. Одним из главных факторов защиты печени является ее антиоксидантная активность.

Антигепатотоксический потенциал. Силимарин защищает клетки печени людей и животных от широкого спектра гепатотоксинов.

Некоторые грибы (например, *Amanita phalloides* – «бледная поганка» и *Amanita virosa*) содержат два токсина: фаллоидин и альфа-аманитин. Они разрушают мембраны клеток печени и подавляют синтез белка в печени, что приводит к серьезному повреждению печени и смерти. Силимарин эффективно предотвращает оба этих эффекта, блокируя места связывания токсина и повышая способ-

ность клеток печени к регенерации. Было установлено, что силимарин может быть эффективным средством от повреждения печени при внутривенном введении в течение 24 часов после употребления ядовитых грибов. В исследовании, проведенном учеными, 60 пациентам с тяжелым отравлением ядовитым грибом *Amanita* внутривенно ввели силибинин в дозе 20 мг/кг, благодаря чему были получены отличные результаты без летальных исходов. Силимарин часто используется в качестве вспомогательной терапии при пищевых отравлениях, вызванных грибами. Силимарин также обеспечивает защиту гепатоцитов новорожденных от повреждения печени, вызванного тетрациклином, d-галактозамином и таллием, а также от воздействия эритромицина эстолата, амитриптилина, нортриптилина и трет-бутилгидропероксида. Он уменьшает повреждение печени, вызванное длительным лечением фенотиразином или бутирофеноном. Силибинин значительно ингибирует повреждение печени, вызванное конканавалином-А. Он обладает гепатопротекторным действием при отравлении фаллоидином, галотаном, тиоацетамидом, ацетаминофеном и тетрахлоридом углерода. Он также защищает печень от ишемического повреждения, перегрузки железом и радиации. Силимарин применяется для лечения ряда заболеваний печени, характеризующихся дегенеративным некрозом и функциональными нарушениями, включая хроническую печеночную недостаточность.

Алкогольный цирроз. Метаболизм этанола приводит к образованию свободных радикалов и оксидативному стрессу в печени. Силимарин успешно противодействует алкогольному циррозу за счет антиоксидантных и гепатопротекторных механизмов и восстанавливает нормальные биохимические показатели печени. Силимарин также облегчает цитоллиз у пациентов с активным циррозом. Однако применение силимарина при декомпенсированном циррозе не рекомендуется.

Гепатит. У пациентов с острым вирусным гепатитом силимарин сокращает продолжительность лечения и демонстрирует улучшение показателей билирубина и ферментов печени. У пациентов, получающих лечение силимарином, биохимические показатели нормализуются в более короткие сроки. При хро-

ническом активном гепатите лечение силимарином улучшает функциональные пробы печени. Гистологическое улучшение наблюдается у пациентов с хроническим гепатитом, получающих лечение силимарином. Силимарин вызывает стабильную ремиссию при алкогольном гепатите и нормализует биохимические показатели печени.

Фиброз печени: Фиброз печени изменяет структуру печени, приводя к печеночной недостаточности и печеночной энцефалопатии. Трансформация звездчатых клеток печени в миофибробласты является одним из основных факторов развития фиброгенеза. Лечение силимарином значительно подавляет этот процесс, что указывает на антифибротический эффект у пациентов с фиброзом печени.

Регенерация печеночной ткани. Силимарин стимулирует регенерацию печеночной ткани за счет увеличения синтеза белка в поврежденной печени. В экспериментах *in vivo* и *in vitro*, проведенных на печени крыс с частичным удалением печени, силибинин значительно увеличивал образование рибосом и синтез ДНК, а также синтез белка. Интересно, что повышение синтеза белка под действием силибинина наблюдалось только в поврежденной печени, а не в здоровой.

Против воспалений. Расторопша пятнистая и её активный экстракт - силимарин, обладают противовоспалительным и противоартритным действием благодаря своим сильным антиоксидантным свойствам, то есть нейтрализации свободных радикалов, вызывающих воспаление. Было установлено, что силимарин более эффективен при недавно развившемся артрите, чем при уже продолжающемся. Силимарин и силибинин подавляют воспалительный процесс, ингибируя миграцию нейтрофилов и клеток Купфера. Они также ингибируют образование воспалительных медиаторов, а именно простагландинов и, в частности, лейкотриенов, ингибируя путь 5-липоксигеназы и высвобождение гистамина из базофилов. Таким образом, семена расторопши пятнистой могут также обладать противоаллергическими и противоастматическими свойствами.

Иммуномодулятор. Иммуномодулирующая активность силимарина у пациентов с заболеваниями печени может также усилить его гепатопротекторный эффект. Силимарин за-

щищает от иммуносупрессии (угнетения иммунитета), вызванной ультрафиолетовым излучением у экспериментальных грызунов. Силибинин ингибирует активацию человеческих Т-лимфоцитов и человеческих полиморфноядерных лейкоцитов. Длительное применение силимарина улучшает иммунитет за счет увеличения количества Т-лимфоцитов и интерлейкинов, а также снижения всех типов иммуноглобулинов.

Липидный контроль печени. Установлено, что силимарин и силибинин снижают синтез и обмен фосфолипидов в печени. Силибинин нейтрализует ингибирование синтеза фосфолипидов под воздействием этанола и снижение включения глицерина в липиды изолированных гепатоцитов. Силимарин значительно ингибирует перекисное окисление липидов в печени и может снижать синтез триглицеридов в печени. Нарушения липидного профиля печени, вызванные длительным воздействием этанола и противотуберкулезных препаратов (Изониазид, Рифампицин), эффективно корректируются силимарином.

Липидный контроль плазмы крови. Введение силимарина пациентам с гиперлипидемией II типа привело к незначительному снижению уровня общего холестерина и липопротеинов высокой плотности в плазме крови. Силимарин снижает уровень холестерина и липопротеинов низкой плотности в плазме гиперлипидемических крыс. Снижение уровня холестерина и фосфолипидов в желчи, вызванное силимарином у крыс и людей, может быть частично обусловлено снижением синтеза холестерина в печени.

Желчегонный эффект. Силимарин активно участвует в энтерогапатической циркуляции, создавая непрерывную циркуляцию между кишечником и печенью. Он предотвращает блокировку выделения желчи, тем самым увеличивая выделение желчи, экскрецию холата и билирубина.

Противовирусный эффект. Хотя силимарин не влияет на репликацию вирусов, он играет благотворную роль при вирусном гепатите, подавляя воспалительные и цитотоксические процессы, вызванные вирусными инфекциями. Силибинин сильно подавляет рост как клеток HepG2, так и Hep3В; при этом клетки Hep3В проявляют более высокую ци-

тотоксичность, что связано с усилением апоптоза.

Противоожелвачный эффект. Силимарин значительно подавляет рост опухолей и вызывает уменьшение размеров существующих опухолей. Считается, что этот эффект связан с его антипролиферативным, проапоптотическим и антиангиогенным действием *in vitro* при опухоли предстательной железы.

Нейропротекция. Силимарин считается полезным для профилактики и лечения нейродегенеративных и нейротоксических процессов благодаря своим антиоксидантным свойствам. Силимарин эффективен в защите дофаминергических нейронов головного мозга от нейротоксичности, вызванной липополисахаридом.

Защита сердечно-сосудистой системы. Применение некоторых химиотерапевтических препаратов, таких как доксорубин, в лечении желвака (опухоли) ограничено наличием кардиотоксических эффектов, обусловленных оксидативным стрессом и усилением апоптоза. Силибинин обладает кардиопротекторными свойствами благодаря своим антиоксидантным и мембранозащитным свойствам.

Другие эффекты: Силимарин помогает поддерживать нормальную функцию почек. Силибинин снижает оксидативное поражение клеток почек в условиях *in vitro*. Как антиоксидант, силимарин может защищать поджелудочную железу от некоторых повреждений. В контролируемых исследованиях пациентов с диабетом, получавших силимарин, потребность пациентов в инсулине для регулирования уровня глюкозы в крови снижалась.

Побочные эффекты. Исследования на людях с использованием семян расторопши пятнистой показали, что нет серьезных оснований для беспокойства по поводу побочных эффектов. Исследования на людях показали, что экстракт семян расторопши пятнистой безопасен и хорошо переносится. Он, в целом, нетоксичен и не вызывает никаких побочных эффектов при применении у взрослых в дозах 200-900 мг в день, разделенных на два или три приема. Более высокие дозы (более 1500 мг в день) могут вызывать незначительные желудочно-кишечные расстройства, такие как легкая диарея, которая может возникнуть из-за повышенной секреции и оттока желчи. Хо-

тя легкие аллергические реакции наблюдались, они были крайне редки.

Химический состав. Силимарин, извлекаемый из расторопши пятнистой, является фитопрепаратом, используемым в традиционной медицине для лечения нарушений в печени, и в настоящее время включен в комплементарную и альтернативную медицину для лечения заболеваний печени. Активный экстракт расторопши пятнистой, известный как силимарин, представляет собой смесь флавонолигнанов, а именно силибина, силидианина и силикристина. Хотя все части растения используются в медицине, семена содержат самую высокую концентрацию силимарина (1,5-3,0%).

Большая часть его гепатопротекторных свойств обусловлена силибином, основным компонентом силимарина (60-70%). Механизм действия силимарина до конца не изучен. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что он действует через множество путей. Силимарин стабилизирует мембранную структуру гепатоцитов, тем самым предотвращая проникновение токсинов в клетку через энтерогепатическую циркуляцию. Он ускоряет регенерацию печени, стимулируя ядерную А-полимеразу и увеличивая синтез рибосомальных белков. Силимарин – один из наиболее успешных примеров развития современной фармацевтики, берущей начало в традиционной медицине. Однако стандартизация различных форм силимарина и определение эффективных доз до сих пор на не достаточном уровне.

Соединения силимаринового комплекса обладают и другими интересными свойствами, такими как противораковые и антихолестериновые свойства. Эти эффекты доказаны при многих заболеваниях различных органов, таких как предстательная железа, легкие, центральная нервная система, почки, поджелудочная железа и защита кожи. Проапоптотическая активность (вызывающая гибель раковых клеток) и антиангиогенная активность (ингибирующая рост кровеносных сосудов, питающих опухоли) силибина в предраковых и канцерогенных клетках являются важными открытиями, приближающими силимарин к применению в лечении рака.

Микроклональное размножение – это метод вегетативного размножения растений *in vitro*, или, другими словами, с использовани-

ем биотехнологических методов *in vitro* для бесполого размножения растений, генетически идентичных исходному растительному экспланту. Для этой цели обычно используются небольшие части растения, содержащие меристемные клетки – экспланты, в результате чего из одного небольшого образца можно получить множество мелких. Микроклональное размножение основано на тотипотентности соматических клеток растений, то есть способности клеток полностью реализовать генетический потенциал целого организма [2; 4].

Несмотря на обилие биологических ресурсов в Туркменистане, чрезмерное антропогенное воздействие, при нерациональном использовании, может привести к сокращению численности природных групп полезных растений или даже к их исчезновению. Поэтому важной задачей является расширение значения метода микроклонального размножения лекарственных растений в нашей стране [1; 3].

Цель работы – разработать метод микроклонального размножения расторопши пятнистой в лабораторных условиях и сравнить её фитохимический состав с видом, произрастающим в природе.

Материалы и методология.

Традиционное выращивание расторопши пятнистой. Размножение семенами. Семенное размножение является наиболее распространенным методом размножения расторопши пятнистой. Однако многие факторы могут препятствовать прорастанию семян расторопши пятнистой, наиболее важными из которых являются твердость семенной оболочки, состояние покоя семян, гормональный баланс внутри семени и незрелый зародыш. Как правило, жизнеспособные эмбрионы прорастают в течение 3-4 дней после частичного удаления древесной семенной оболочки. Для преодоления состояния покоя семян используются различные методы.

Для его нарушения рекомендуются такие методы, как растительные гормоны, серная кислота, метанол, нитрат калия, кипяченая вода и стратификация. В случае расторопши пятнистой рекомендуются серная кислота, холодная стратификация, скарификация и обработка гиббереллиновой или азотной кислотой.

Размножение расторопши пятнистой методом тканевой культуры.

Для микроклонального размножения использовались семена расторопши пятнистой. Была проведена методика получения каллусной культуры из расторопши пятнистой через 28 дней после посева. Из части, ближайшей к центральной жилке свежих молодых побегов, отрезали срезы толщиной 1,5-2 мм и поместили их в пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга, подготовленные для получения каллусной культуры. В течение 24-26 дней отслеживалось образование каллуса на побегах и их способность к морфогенезу.

Очистка поверхности семян и подготовка питательной среды. Описаны различные протоколы поверхностной дезинфекции семян расторопши пятнистой. Например, процедура дезинфекции начинается с пятикратного промывания семян стерильной дистиллированной водой. Затем семена обрабатывают серной кислотой в течение 30 минут, после чего за-

мачивают в 70% спирте в течение 5 минут, а затем в 6% гипохлорите натрия в течение 20 минут при постоянном перемешивании. Наконец, семена промывают пять раз стерильной дистиллированной водой по 5 минут каждый раз.

Другой метод заключается в замачивании семян в 70% этиловом спирте в течение 3 минут, затем в бытовом хлоре (примерно 1,5% активный хлор) в течение 20 минут и, в конце, в трехкратном промывании стерильной дистиллированной водой.

Прорастание семян. На прорастание семян *in vitro* могут влиять несколько факторов, таких как: генотип растения, состав питательной среды, регуляторы роста растений, оболочка семени, предварительная обработка и условия среды выращивания. В результате исследований было установлено, что среда Мурасиге - Скуга (МС) является наиболее подходящей средой для прорастания семян расторопши пятнистой *in vitro*.

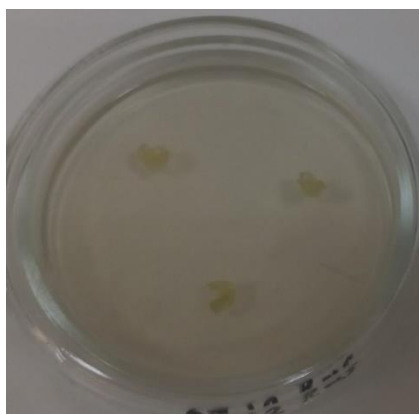
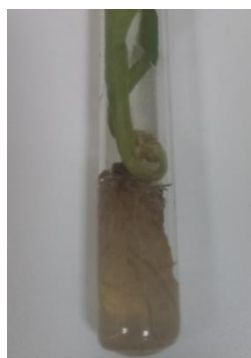


Рис. 1. Семена расторопши пятнистой; семя, высаженное в пробирке, проросток из семян расторопши пятнистой, каллусная ткань, образованная из стебля, и саженец, адаптированный к почве

Исследования расторопши пятнистой, выращенной *in vitro*. Сравнительные исследования листьев и корней расторопши пятнистой, выращенной *in vitro*, проводились с ис-

пользованием ультрафиолетовой спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.



Рис. 2. Листья и корни расторопши пятнистой, выращенной *in vitro*

Ультрафиолетовая спектрофотометрия (UV-Vis). После точного взвешивания листьев и корней расторопши пятнистой на аналитических весах, их готовили в 96%-ном растворе этанола в соотношении массы к объему 1:50 и мацерировали в течение 24 часов. Полученный экстракт фильтровали через фильтр

0,45 мкм, полученный фильтрат анализировали на ультрафиолетовом спектрофотометре (Agilent Cary 60, UV-Vis) в режиме сканирования в диапазоне длин волн 200-800 нм. Анализ проводили путем сравнения со стандартным комплексом силимарина и флаволигнана.

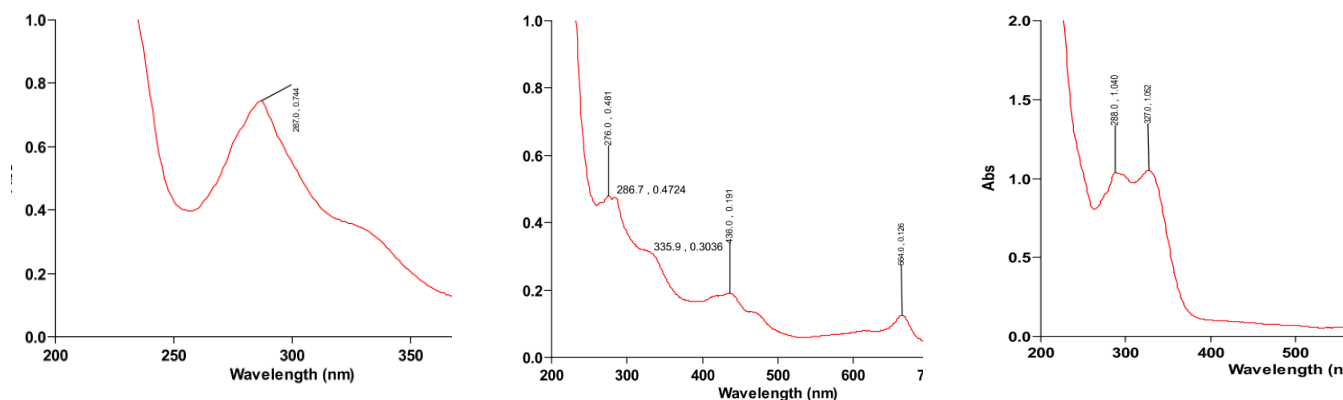


Рис. 3. Слева направо: УФ-спектр стандартного комплекса силимарина и флаволигнана; УФ-спектры листьев и корней выращенной *in vitro* расторопши пятнистой в 96% этаноле

Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Листья и корни расторопши пятнистой, выращенные *in vitro*, были измельчены в фарфоровой емкости, взяли 1,0 г образца и мацерировали в 50 мл этанола в течение 24 часов при комнатной температуре. Раствор фильтровали

через фильтр 0,45 мкм для анализа. Взяли стандартный раствор силимарина, 5,0 мг растворили в 5,0 мл этанола, и приготовили раствор с концентрацией 1 мг/мл (1000 ppm). Для анализа приготовили разбавленный раствор с концентрацией 5 ppm (0,005 мг/мл).

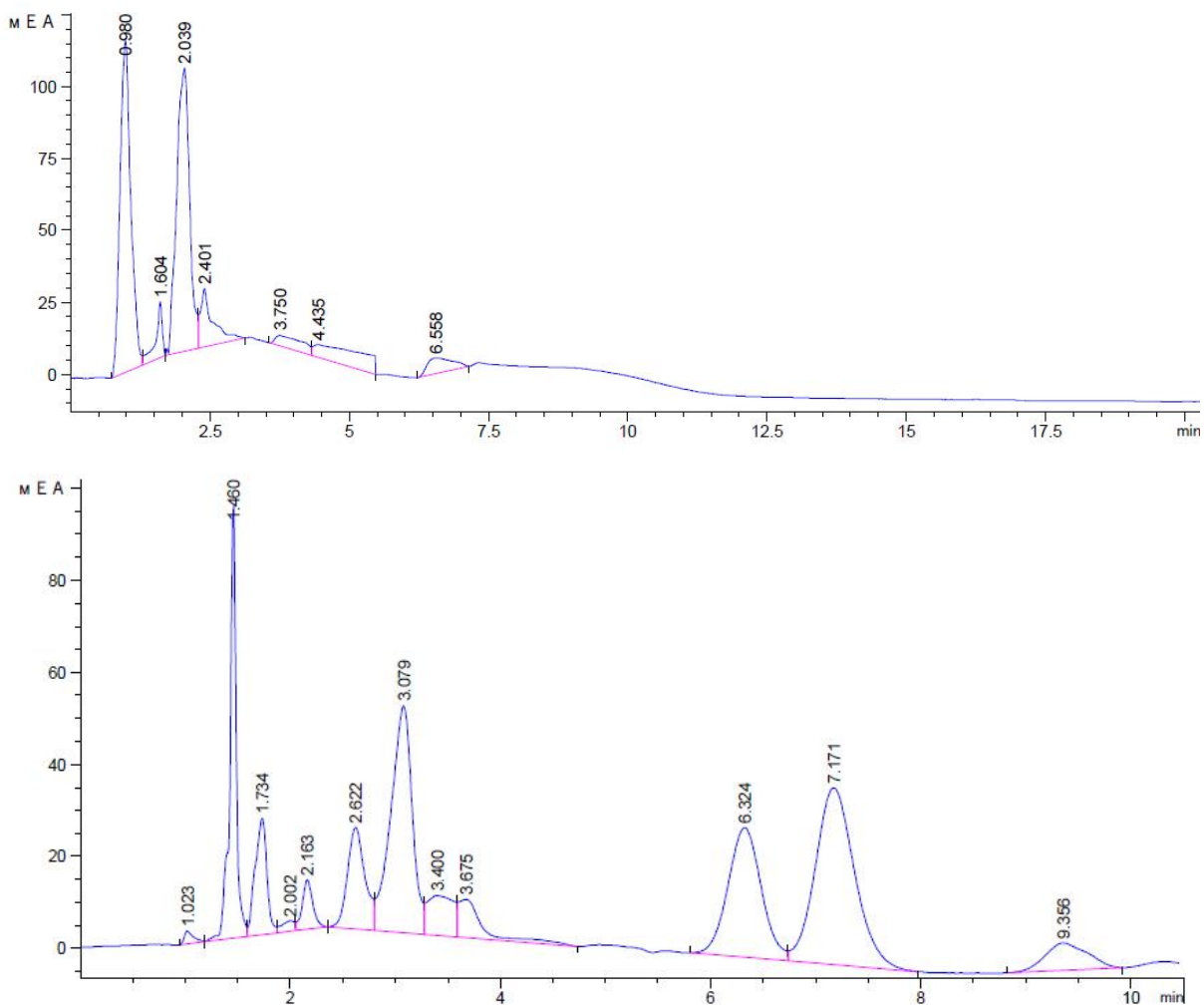


Рис. 4. HPLC-анализ корней и листьев расторопши пятнистой

Анализ 96%-ного этанольного экстракта листьев и корней расторопши пятнистой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) провели на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Agilent 1260 infinity) с диодным детектором (DAD). Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения осуществлены с помощью программного обеспечения Chemstation (Agilent Chemstation for LC 3D).

Для анализа были использованы колонки C18 (Zorbax Eclipse Plus C18 rapid resolution 4,6x100 мм, 3,5 мкм). В качестве мобильной фазы использовали раствор дистиллированной воды и метанола в объемном соотношении 50:50 в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин. Спектры поглощения получали при длинах волн 288 нм и 360 нм, объем вводимого образца составлял 50 μ л. В качестве стандарта использован стандартный образец силимарина.

Результаты. Расторопша пятнистая хорошо проросла *in vitro* на питательной среде Мурасиге-Скука, каллусная ткань сформировалась через 28 дней после посева. Ультрафиолетовое спектрофотометрическое исследование экстракта, приготовленного в соотношении 1:50 в 96%-ном этанольном растворе листьев и корней расторопши пятнистой, выращенной *in vitro*, проводилось в режиме сканирования в диапазоне 200-800 нм в сравнении со стандартом силимарина флаволигнана. Стандарт силимарина показывает максимум поглощения на длине волны 287 нм. В листьях расторопши пятнистой, выращенной *in vitro*, были обнаружены спектры поглощения, равные абсорбции 0,4724 на длине волны 286 нм, а в корнях расторопши пятнистой – 1,040 на длине волны 288 нм.

В результате исследования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в листьях расторопши пятнистой, выращенной

in vitro, появились пики 12 веществ, а в корнях – 7 веществ.

Заключение. В будущем методы микроклонального размножения, вероятно, будут широко использоваться для улучшения и генетической трансформации сельскохозяйственных растений, о чем свидетельствует неуклонный рост числа частных коммерческих компаний за рубежом, использующих методы микроклонального размножения, влияющих на мировую экономику.

Микроклональное размножение является очень ценной технологией для сельского хозяйства, пищевой и фармацевтической промышленности, поскольку многие вторичные метаболиты растений не могут быть синтезированы химическим путем. Поэтому крайне важно совершенствовать исследования в области микроклонального размножения растений в нашей стране.

Библиографический список

1. Бердымухамедов Г. Лекарственные растения Туркменистана. – Ашхабад: Туркменская государственная издательская служба, 2010. – Том I. – С. 89-90.
2. Демидчик В. и др. Микроклональное размножение растений // Наука и инновации. – 2019. – № 6 (196).
3. Никитин В.В., Гельдиханов А.М. Определитель растений Туркменистана. – Л.: Наука, 1988. – 680 с.
4. Annarita Leva et al. Recent advances in plant in vitro culture. Published by InTech, Croatia, 2012. – P. 10-11.

FEATURES OF MICROCLONAL REPRODUCTION OF SILYBUM MARIANUM IN THE FLORA OF TURKMENISTAN

T.Sh. Durdyev¹, Lecturer

D.G. Gadamov², Doctor of Chemical Sciences

A. Akmuradov³, Candidate of Biological Sciences

I. Gubanov¹, Candidate of Chemical Sciences

¹Mirat Gareev State Medical University of Turkmenistan

²International Scientific and Technological Park of the Academy of Sciences of Turkmenistan

³Oguzkhan University of Engineering and Technology of Turkmenistan

^{1,2,3}(Turkmenistan, Ashgabat)

Abstract. This research paper presents the results of scientific studies on the microclonal propagation of the spotted milk thistle, which is found in the flora of Turkmenistan, in laboratory conditions. During the research, the spotted milk thistle was grown in laboratory conditions using a slightly modified Murashige-Skoog medium. Comparative studies were conducted on the cultivated plant and the natural form.

Keywords: spotted milk thistle; microclonal propagation; *in vitro*; silymarin.