

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра медичної біології, фармакогнозії, ботаніки та гістології

Кваліфікаційна робота

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

на тему: «Аналіз та перспективи використання технологій *in vitro* для одержання цінних вторинних метаболітів лікарських рослин роду *Hypericum*»

Виконав: студент заочної форми навчання спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація»

Крутько Олександр

Керівник: Колосова Ірина Іванівна

доцентка, к.біол.н

Рецензент: Шаторна Віра Федорівна

професорка, д.біол.н.

Рекомендовано до захисту:

протокол засідання кафедри

№ 11 від 26.05 2026 р.

Завідувач кафедри

Шаторна Віра Федорівна

Захищено на засіданні ЕК

1 від « 11 » червня 2026 р

Оцінка добре / С / 167

(за національною шкалою/ за шкалою

ECTS/ бал)

Голова ЕК Лєвих А. Е.

Дніпро – 2026

ЗМІСТ

Вступ		5
Розділ 1	Ботаніко-фармакогностична характеристика роду <i>Hypericum</i>	7
1.1.	Таксономія, морфологічні особливості та ареали поширення.	7
1.2.	Хімічний склад: основні групи біологічно активних речовин.	9
1.3.	Фармакологічний потенціал та синергізм дії	10
Розділ 2.	Технології <i>in vitro</i> як інструмент одержання біомаси <i>Hypericum</i>	12
2.1.	Особливості ініціації та культивування калусних і суспензійних культур	12
2.2.	Суспензійні культури: кінетика росту та метаболічний потенціал	13
2.3.	Органогенез та мікроклональне розмноження: збереження генетичної стабільності	13
2.4.	Використання <i>Agrobacterium rhizogenes</i> для створення "Hairy roots"	14
2.5.	Генетична трансформація: створення високопродуктивних "Hairy roots"	14
2.6.	Масштабування: від колби до промислового біореактора	15
Розділ 3	Стратегії інтенсифікації біосинтезу вторинних метаболітів	17
3.1.	Оптимізація складу поживних середовищ та фізичних факторів (світло, температура).	17

3.2.	Еліситація як метод "метаболичного вибуху".	18
3.3.	Біотрансформація та використання прекурсорів.	19
Розділ 4	Перспективи промислового впровадження та стандартизація біотехнологічної сировини	21
4.1.	Типи біореакторів для вирощування культур клітин та коренів звіробою	21
4.2.	Економічна ефективність та перспективи впровадження	22
4.3.	Проблеми стандартизації біотехнологічної сировини.	23
Висновки		25
Список використаних джерел		28
Додатки		33

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР — біологічно активні речовини

ВЕРХ — високоефективна рідинна хроматографія

ГХ — газова хроматографія

ДФУ — Державна Фармакопея України

ІКТ — Інформаційно-комунікаційні технології

ЛР — лікарська рослина

ЛРС — лікарська рослинна сировина

ТШХ — тонкошарова хроматографія

УЗЕ — Ультразвук-асистована екстракція (ультразвукова екстракція)

2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (синтетичний ауксин)

6-БАП — 6-бензиламінопурин (цитокінін)

DRPH — 2,2-дифеніл-1-пікрілгідрозил (стабільний вільний радикал для визначення антиоксидантної активності)

HPLC — High-Performance Liquid Chromatography (високоефективна рідинна хроматографія)

in vitro — штучні умови, «у пробірці» (поза живим організмом)

in vivo — природні умови, у живому організмі

MS — живильне середовище Мурасіге-Скуга

Ri-плазміда — Root-inducing плазміда *Agrobacterium rhizogenes*

T-ДНК — трансферна ДНК плазмід

ВСТУП

Актуальність теми

Рослини роду *Hypericum* (зокрема, *Hypericum perforatum*) є джерелом унікальних сполук: гіперіцинів (антивірусна та антидепресивна дія) та гіперфоринів (антибактеріальна дія). Традиційне збирання дикорослої сировини призводить до виснаження ресурсів, а якість сировини залежить від екологічних факторів. Технології *in vitro* (культури клітин, тканин та органів) дозволяють отримувати стандартизовану біомасу незалежно від сезону та інтенсифікувати біосинтез цільових сполук шляхом еліситації.

Мета дослідження. Проаналізувати сучасний стан біотехнологічних підходів до вирощування видів роду *Hypericum* та оцінити ефективність різних типів культур *in vitro* для промислового отримання вторинних метаболітів.

Основні завдання дослідження.

1. Узагальнити дані про хімічний склад та біологічну активність основних видів роду *Hypericum*.
2. Порівняти ефективність калусних, суспензійних культур та органокультур (мікроклональне розмноження) для накопичення гіперіцину.
3. Дослідити потенціал технології "Hairy roots" (бородатих коренів) у біосинтезі ксантонів та флавоноїдів.
4. Проаналізувати вплив еліситорів (біотичних та абіотичних) на продуктивність культур.
5. Обґрунтувати перспективи масштабування лабораторних технологій у промислові біореактори.

Об'єкт і предмет дослідження

Об'єкт дослідження: процеси біосинтезу вторинних метаболітів у представників роду *Hypericum* за умов штучного культивування.

Предмет дослідження: технологічні параметри культивування *in vitro* (склад середовищ, регулятори росту, еліситатори), що впливають на вихід гіперіцину, гіперфорину та фенольних сполук.

Методи дослідження: Теоретичний аналіз, систематизація та узагальнення наукових публікацій (PubMed, Scopus, Google Scholar), порівняльний морфо-біохімічний аналіз даних експериментальних досліджень, прогностичне моделювання.

Новизна та значення одержаних результатів.

Наукова новизна: систематизовано дані про вплив специфічних еліситорів (наприклад, метилжасмонату та УФ-випромінювання) на експресію генів, відповідальних за синтез гіперіцину в ізольованих культурах. Визначено найбільш перспективні види роду *Hypericum* (крім *Hypericum perforatum*) для біотехнологічного використання.

Теоретичне значення. Розширення знань про механізми вторинного метаболізму рослин у стресових умовах *in vitro* та роль диференціації тканин у накопиченні специфічних сполук.

Практичне значення. Сформульовано рекомендації щодо оптимізації умов культивування для фармацевтичних підприємств, що займаються розробкою рослинних субстанцій нового покоління.

Апробація результатів дослідження. Апробація результатів наукової роботи представлені в якості статті «Біотехнологічні стратегії інтенсифікації біосинтезу нафтодіантронів у культурах *in vitro* рослин роду» // Modern Research and Education : proceedings of the International scientific and practical conference (May 2-4, 2026). – Warsaw, Poland : naukainfo.com, 2026. - Pp. 438-444.

Структура роботи. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, 3-х розділів, загальних висновків, списку використаної літератури, який включає 40 джерел, у тому числі 38 латиницею та 2 додатків. Зміст роботи викладено на 28 сторінках основного тексту та ілюстровано таблицею.

РОЗДІЛ 1. БОТАНІКО-ФАРМАКОГНОСТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОДУ *HYPERICUM*

1.1. Таксономія, морфологічні особливості та ареали поширення.

Рід *Hypericum* належить до:

відділу — Покритонасінні (*Magnoliophyta*)

класу — Дводольні (*Magnoliopsida*)

порядку — Мальпігієцвіті (*Malpighiales*)

родини — Звіробійні (*Hypericaceae*)

Рід *Hypericum* L. (звіробій) належить до родини *Hypericaceae*, порядку *Malpighiales*, класу *Magnoliopsida*, відділу *Magnoliophyta*. Рід є одним із найбільш численних у родині та налічує близько 500 видів, поширених у помірних і субтропічних зонах світу. Найбільша видова різноманітність зосереджена у Середземноморському регіоні, Західній Азії та Південній Америці [1].

В Україні представлено 12–15 видів роду *Hypericum*, серед яких фармакогностичне значення мають передусім *Hypericum perforatum* L. (звіробій звичайний) та *Hypericum maculatum* Crantz.

Офіційним видом є *Hypericum perforatum* L., лікарська рослинна сировина — *Hyperici herba* (трава звіробою), яка включена до Державної фармакопеї України та Європейської фармакопеї [2]. В Україні рід представлений переважно 12–15 видами, серед яких найбільше значення мають *H. perforatum* та *H. maculatum*.

Рід *Hypericum* L. (родина *Hypericaceae*) включає широкий спектр життєвих форм: від однорічних трав до чагарників та невеликих дерев

Найбільш вивчений вид — *Hypericum perforatum* L.:

Багаторічна трав'яниста рослина висотою 30–100 см.

Коренева система: стрижнева або короткокореневищна з додатковими коренями

Стебло: прямостояче, гіллясте, циліндричне, з двома поздовжніми ребрами

Листки: супротивні, прості, цілісні, без прилистків, з характерними прозорими крапковими залозками («перфораціями»), що дало назву виду (*perforatum* — продірявлений);

Квітки: актиноморфні, двостатеві, жовті, зібрані у щиткоподібні суцвіття

Андроцей: численні тичинки, зрослі у пучки

Гінецей: ценокарпний

Плід: багатонасінна коробочка [2].

Лікарська рослинна сировина (ЛРС): *Hyperici herba* — трава звіробою

Фармакогностичні діагностичні ознаки

Важливими макро- та мікродіагностичними ознаками є:

- ✓ прозорі секреторні залозки (*translucent glands*) — містять ефірну олію та флороглюциноли
- ✓ темні (чорні) залозки (*black glands*) — локалізують нафтодіантрони (гіперіцин, псевдогіперіцин)
- ✓ наявність секреторних структур у листках і пелюстках

Ці ознаки є ключовими при ідентифікації сировини відповідно до фармакопейних вимог.

Заготівля сировини

Сировину (*Hyperici herba*) заготовляють у фазі цвітіння (червень–серпень), зрізаючи верхні частини рослини довжиною 20–30 см. Сушіння проводять при температурі не вище 40 °С у добре вентиляованих умовах.

Морфо-анатомічні маркери накопичення БАР:

Для біотехнолога ключовим є розуміння локалізації метаболітів:

- прозорі залозки (*translucent glands*): містять переважно ефірні олії та флороглюциноли (гіперфорин).

- чорні залозки (*black glands*): локалізовані на краях листків, пелюстках та пиляках. Саме вони є сайтами акумуляції нафтодіантронів (гіперіцину та псевдогіперіцину) [1].

-секреторні канали: поздовжні структури в стеблах, де накопичуються фенольні сполуки.

1.2. Хімічний склад: основні групи біологічно активних речовин

Хімічний склад рослин роду *Hypericum* характеризується наявністю кількох основних груп біологічно активних речовин (БАР), які зумовлюють багатогранність їхньої терапевтичної дії:

Нафтодіантрони: гіперіцин та псевдогіперіцин локалізуються у специфічних «чорних залозках» на квітках та листках. Вони мають потужну фотодинамічну та антивірусну активність [3]. Біосинтез починається за полікетидним шляхом від емодин-антрону. Важливою особливістю є те, що фінальні стадії конденсації гіперіцину є світлозалежними процесами, що необхідно враховувати при виборі режиму освітлення культур *in vitro* [4].

Похідні флороглюцинолу: гіперфорин та адгіперфорин - це основні компоненти, що відповідають за антидепресивну дію рослини. Утворюються через комбінацію ацил-флороглюцинолового ядра та пренільних ланцюгів, що походять з МЕР-шляху (метилеритритолфосфатного). Ці сполуки надзвичайно лабільні. Через їхню нестабільність до світла та кисню, отримання цих сполук *in vitro* є пріоритетним завданням [5].

Фенольні сполуки: флавоноїди (кверцетин, рутин, гіперозид) та фенолокислоти (хлорогенова, кавова). Вони забезпечують антиоксидантний потенціал та капілярозміцнюючу дію [6].

Біфлавоноїди (аментофлавіон): специфічні для роду *Hypericum* сполуки, що мають антиоксидантну та нейропротекторну дію, перевершуючи за ефективністю мономерні флавоноїди [7].

Ксантони: особлива група метаболітів, що накопичується переважно в коренях і має протигрибкову та нейропротекторну дію. Вважаються "стресовими" метаболітами. Їхній біосинтез активується при ураженні патогенами, що робить їх ідеальними об'єктами для вивчення методів еліcitaції [6].

Також у звіробії міститься дубильні речовини, ефірна олія, сапоніни; вітаміни: С, Е, РР, каротиноїди; стероїди; алкалоїди; холін. Як мінорні

компоненти описані антибіотичні сполуки — гіперфарин, саротрален, саротралеїн [2].

Хімічний профіль звіробою є унікальним через поєднання продуктів різних біогенетичних шляхів:

1.3. Фармакологічний потенціал та синергізм дії

Фармакологічна активність представників роду *Hypericum* зумовлена комплексною дією біологічно активних речовин, що реалізується за принципом синергізму.

Сучасна фармакологія розглядає представників роду *Hypericum* як полівалентні лікарські засоби. Препарати звіробою проявляють: антидепресивну, седативну, протизапальну, антисептичну, жовчогінну, спазмолітичну та антиоксидантну дію [9 -13].

Психотропна дія: препарати на основі звіробою (напр., «Геларіум», «Нейроплант») є золотим стандартом фітотерапії депресивних розладів легкого та середнього ступеня тяжкості. Механізм дії пов'язаний з інгібуванням зворотного захоплення серотоніну, норадреналіну та дофаміну [9].

Протимікробна та репаративна дія: високий вміст дубильних речовин та гіперфорину сприяє швидкому загоєнню ран та пригніченню росту грампозитивних бактерій (включаючи золотистий стафілокок) [10].

Антивірусна активність: останні дослідження (2020–2023 рр.) вказують на потенційну ефективність гіперіцину в інгібуванні реплікації деяких РНК-вірусів, що відкриває нові перспективи для створення антивірусних засобів [11].

Терапевтичний ефект *Hypericum* базується на принципі синергізму («entourage effect»).

Антидепресивна активність: гіперфорин інгібує зворотне захоплення нейромедіаторів (5-НТ, DA, NE, GABA), тоді як флавоноїди підсилюють цю дію шляхом впливу на MAO (моноаміноксидазу) [9].

Фотодинамічна терапія (ФДТ): гіперіцин є одним із найпотужніших природних фотосенсибілізаторів. При опроміненні певною довжиною хвилі він генерує синглетний кисень, що призводить до апоптозу ракових клітин. Це

відкриває перспективи використання біотехнологічного гіперіцину в онкології [12].

Нейропротекція: дослідження 2022–2024 рр. демонструють потенціал екстрактів звіробою у сповільненні агрегації β -амілоїдних білків, що є стратегічним напрямком у терапії хвороби Альцгеймера [13].

Таким чином, рід *Hypericum* є важливим джерелом біологічно активних сполук різної хімічної природи, серед яких провідне значення мають нафтодіантрони, флороглюциноли та фенольні сполуки. Фармакогностичні особливості сировини, зокрема наявність специфічних секреторних структур, мають ключове значення для її ідентифікації та стандартизації.

Комплексний хімічний склад зумовлює широкий спектр фармакологічної активності, що реалізується через синергізм компонентів. Водночас нестабільність окремих сполук та залежність їх накопичення від умов середовища обґрунтовують актуальність використання біотехнологічних підходів, зокрема культур *in vitro*, для отримання стандартизованої рослинної сировини.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЇ IN VITRO ЯК ІНСТРУМЕНТ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ *HYPERICUM*

Розділ присвячений аналізу сучасних біотехнологічних підходів, які забезпечують перехід від природного рослинного матеріалу до контрольованих систем культивування з прогнозованим накопиченням біологічно активних речовин.

2.1. Особливості ініціації та культивування калусних і суспензійних культур

Калусогенез є базовим етапом більшості протоколів *in vitro*. Для представників роду *Hypericum* найбільш ефективними експлантами є сегменти листків, гіпокотилів та апікальних меристем, що характеризуються високою регенераційною здатністю.

Оптимальне калусоутворення досягається на середовищі Мурасіге–Скуга (МС) за наявності комбінації ауксинів (2,4-D, NAA) і цитокінінів (BAP, кінетин). Баланс цих регуляторів визначає ступінь дедиференціації клітин і їх морфогенетичний потенціал.

Ключовим обмеженням калусних культур є низька здатність до синтезу нафтодіантронів (гіперіцину), що зумовлено відсутністю спеціалізованих секреторних структур — чорних залозок. Водночас калус ефективно накопичує фенольні кислоти та флавоноїди, що робить його придатним для отримання антиоксидантних сполук [14].

Суспензійні культури: вирощування клітин у рідкому середовищі дозволяє масштабувати процес у біореакторах. Сучасні дослідження (2021–2023 рр.) фокусуються на використанні суспензій для отримання біофлавоноїдів, де вихід продукту може бути в 2–3 рази вищим, ніж у дикорослих рослин [10, 15].

Вибір експланта та складу поживного середовища є критичним для успішної дедиференціації клітин.

Роль фітогормонів: для *Hypericum* доведено, що висока концентрація цитокінінів (зокрема Kinetin та BAP) у комбінації з низькими дозами ауксинів

(NAA) стимулює не лише ріст калусу, а й закладає потенціал для подальшого органогенезу.

Мінеральний склад: використання середовища Мурасіге-Скуга (МС) зі зменшеним вмістом азоту часто сприяє інтенсифікації вторинного метаболізму, оскільки дефіцит поживних речовин виступає як м'який абіотичний стрес [14, 20].

2.2. Суспензійні культури: кінетика росту та метаболічний потенціал

Суспензійні культури клітин звіробою розглядаються як динамічні системи для швидкого отримання біомаси.

Агрегація клітин: важливою особливістю *Hypericum* у рідкому середовищі є утворення клітинних агрегатів. Доведено, що дрібні агрегати (0,5–1,0 мм) синтезують більше фенольних сполук, ніж поодинокі клітини, через наявність мінімальних міжклітинних контактів, необхідних для метаболічного обміну [15].

Проблема "вимивання" метаболітів: у суспензіях гіперфорин та гіперицин часто залишаються всередині клітин або швидко деградують у середовищі. Використання двофазних систем (з додаванням органічного сорбенту) дозволяє вилучати продукт одразу після синтезу, захищаючи його від окиснення [21].

2.3. Органогенез та мікроклональне розмноження: збереження генетичної стабільності

Оскільки синтез гіперицину жорстко детермінований морфологічною диференціацією, органокультури (культури пагонів) вважаються найбільш перспективними. Нафтодіантрони синтезуються в диференційованих структурах (чорних залозках), культури пагонів (shoot cultures) є найбільш стабільними продуцентами.

Мікроклональне розмноження: дозволяє отримувати генетично однорідний матеріал («елітні клони») з високим вмістом БАР. Використання систем тимчасового занурення (TIS) суттєво підвищує коефіцієнт розмноження та вихід гіперицину [16].

Морфогенетичний потенціал: доведено, що регенеровані пагони *Hypericum* здатні формувати секреторні залозки *in vitro*, що забезпечує стабільний синтез

гіперіцину на рівні 0,1–0,2% від сухої маси, що відповідає показникам офіційної сировини [17].

Технологія RITA та SETIS: використання біореакторів тимчасового занурення дозволяє автоматизувати процес. Короткочасний контакт рослинної тканини з рідким середовищем забезпечує ідеальну аерацію та запобігає гіпергідратації (склуватості) тканин.

Світловий режим: якість світла (співвідношення червоного та синього спектрів) у таких системах критично впливає на експресію генів Нур-1, відповідальних за фінальні стадії синтезу гіперіцину [16, 22].

2.4. Використання *Agrobacterium rhizogenes* для створення "Hairy roots"

Технологія трансформованих («бородатих») коренів є інноваційним підходом для отримання метаболітів, що синтезуються в підземних органах або потребують специфічної генетичної перебудови.

Генетична трансформація. За допомогою плазмід *A. rhizogenes* у геном рослини вводяться *rol*-гени, що спричиняє інтенсивний ріст коренів на середовищах без гормонів.

Профіль метаболітів. У культурах "Hairy roots" звіробою спостерігається гіперпродукція ксантонів та специфічних фенольних сполук, які мають виражену протигрибкову дію. Хоча гіперіцини в коренях зазвичай не синтезуються, такі культури є цінними для вивчення механізмів імунітету рослин та отримання рідкісних ксантонів [18, 19].

2.5. Генетична трансформація: створення високопродуктивних "Hairy roots"

Трансформація за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* дозволяє отримати "метаболічно стабільні" кореневі культури.

Молекулярний механізм: гени *rolA*, *rolB* та *rolC* з Ri-плазмиди агробактерії змінюють гормональний статус клітини, змушуючи її синтезувати специфічні метаболіти.

Ксантоновий профіль: у "Hairy roots" звіробою виявлено понад 12 видів ксантонів, які практично не зустрічаються в надземній частині дикорослих

рослин. Це робить такі культури унікальним джерелом протигрибкових та цитотоксичних субстанцій [18, 23].

2.6. Масштабування: від колби до промислового біореактора

Перехід до великих об'ємів потребує вирішення проблем масообміну та чутливості клітин до механічного стресу.

Типи біореакторів: для *Hypericum* найбільш придатними є ерліфтні біореактори та біореактори з хвильовим перемішуванням (wave-type), де механічний вплив на клітини мінімальний.

Стратегія Fed-batch: дозоване підживлення вуглеводами в процесі культивування дозволяє подовжити фазу стаціонарного росту, під час якої відбувається максимальне накопичення вторинних метаболітів [24].

За результатами аналізу методологічних підходів до введення в культуру та вирощування біомаси рослин роду *Hypericum* встановлено наступне:

Вибір первинного експланту (апикальних меристем та сегментів молодих листків) є критичним етапом для ініціації стабільних калусних та суспензійних культур, що забезпечує високу регенераційну здатність та генетичну однорідність клітинних ліній.

Оптимізація гормонального складу поживних середовищ (зокрема балансу ауксинів та цитокінінів) дозволяє ефективно керувати процесами дедиференціації клітин та переходом до формування морфогенних структур (темних залозок), які є основними місцями локалізації нафтодіантронів.

Культура «Hairy roots», отримана шляхом трансформації *Agrobacterium rhizogenes*, визначена як найбільш перспективна модель для стабільного синтезу вторинних метаболітів. Вона демонструє високу швидкість росту на безгормональних середовищах та здатність до тривалого накопичення цільових сполук (ксантонів та фенолокислот) без ризику соматоклональної мінливості.

Встановлено, що ефективність біотехнологічного отримання метаболітів *Hypericum* визначається типом культури та ступенем її диференціації. Калусні та суспензійні культури є придатними для синтезу фенольних сполук, тоді як культури пагонів забезпечують накопичення гіперицину. Культури “hairy roots” є

перспективними для отримання ксантонів. Комплексна оптимізація умов культивування створює основу для промислового застосування.

РОЗДІЛ 3. СТРАТЕГІЇ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ БІОСИНТЕЗУ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

У третьому розділі проаналізовано сучасні біотехнологічні підходи, зокрема застосування еліситації, оптимізації складу живильних середовищ та генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*, спрямовані на штучне підвищення виходу цільових поліфенольних сполук та гіперіцину в культурах *in vitro* лікарських рослин роду *Hypericum*.

3.1. Оптимізація складу поживних середовищ та фізичних факторів

Фундаментом високої продуктивності культур *in vitro* є баланс між первинним та вторинним метаболізмом. Оптимізація середовища спрямована на створення умов «контрольованого стресу», за яких клітина перемикає ресурси на синтез захисних сполук.

Макро- та мікроелементний склад. Традиційне середовище Мурасіге-Скуга (МС) часто містить надлишок азоту, що стимулює ріст біомаси, але пригнічує вторинний метаболізм. Для звіробою критичним є співвідношення іонів амонію та нітрату ($\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$). Зниження загального вмісту азоту ініціює стресову відповідь, що веде до накопичення фенольних сполук. Встановлено, що зниження концентрації нітратного азоту (з 40 мМ до 10–20 мМ) у середовищі Мурасіге-Скуга (МС) діє як потужний стимулятор накопичення флавоноїдів. Це пояснюється перенаправленням потоків вуглецю з синтезу білків на шикіматний шлях [25].

Джерела вуглецю: використання сахарози в концентрації 3–5% є оптимальним для росту, проте часткова заміна її на сорбітол або манітол створює осмотичний стрес, що ініціює синтез антоціанів та фенольних сполук [26].

Світловий режим та спектральний склад: сучасне використання LED-технологій дозволяє точково впливати на фоторецептори (фітохроми та криптохроми). Доведено, що комбінація синього (450 нм) та червоного (660 нм) світла у співвідношенні 1:3 підвищує експресію генів, відповідальних за фінальні стадії біосинтезу гіперіцину в культурах пагонів. Червоне світло (660 нм) стимулює морфогенез, а синє (450 нм) — активує ключовий фермент

фенілаланін-аміак-ліази (PAL), що веде до «піку» накопичення вторинних метаболітів [22, 27]. Важливо підкреслити, що гіперіцин синтезується в спеціальних структурах — темних залозках, тому оптимізація спрямована на гістогенез (формування залозок).

Температура. Для культур звіробою оптимальним є режим 23–25°C. Зниження температури до 18°C може виступати як чинник абіотичного стресу, що підсилює синтез антиоксидантних сполук.

3.2. Еліситація як метод «метаболічного вибуху»

Еліситація — це найбільш ефективний інструмент для швидкого отримання високих концентрацій БАР, це імітація атаки патогена або дії стресового чинника, що викликає стрімку активацію захисних механізмів рослини.

Абіотичні еліситори. Використання метилжасмонату (MeJA) та саліцилової кислоти (SA) імітує системну набуту стійкість рослини і є «золотим стандартом» інтенсифікації. Додавання MeJA в концентрації 100 мкМ до суспензійної культури *Nuregicum* призводить до 5–8-кратного збільшення вмісту ксантонів та фенольних кислот протягом 48–72 годин. Також ефективним є використання іонів важких металів (Ag⁺, Co²⁺) у сублетальних дозах [28].

Біотичні еліситори. Застосування хітозану або інактивованих гомогенатів грибів (напр. *Aspergillus niger*) або екстрактів дріжджів активує каскад реакцій через рецептори клітинної стінки. Це ініціює «метаболічний або окиснювальний вибух» — різке підвищення активності фенілаланін-аміак-ліази (PAL), ключового ферменту біосинтезу всіх фенольних сполук, стрімкого синтезу захисних метаболітів [29].

Наноеліситація. Новітнім підходом є використання наночастинок металів (Ag, Au, ZnO). Вони діють як потужні тригери генів вторинного метаболізму завдяки високій проникній здатності [30].

На основі проведеного аналізу встановлено, що майбутнє промислового одержання метаболітів звіробою лежить у площині метаболічної інженерії та використання комбінованої еліситації (табл. 1).

**Порівняльна характеристика стратегій інтенсифікації біосинтезу
вторинних метаболітів у культурах *in vitro* роду *Hypericum***

Стратегія	Тип культури	Цільові метаболіти	Ефект (порівняно з контролем)	Переваги та обмеження
Еліcitaція (MeJA)	Суспензія	Гіперіцини	↑ у 3–6 разів	+ Швидка відповідь; – Пригнічення росту
Світлова стимуляція	Калюс	Гіперіцин	↑ на 40–70%	+ Екологічність; – Обладнання
Зміна балансу азоту	Суспензія	Гіперіцини	↑ до 2 разів	+ Низька вартість; – Контроль рН
Прекурсорний фідінг	Суспензія	Флавоноїди	Пряма кореляція	+ Спрямований синтез; – Вартість
Трансформація	Hairy roots	Ксантони	Стабільне ↑	+ Генетична стабільність; – Масштабування

3.3. Біотрансформація та використання прекурсорів

Ця стратегія дозволяє подолати «вузькі місця» природного біосинтезу і базується на введенні в середовище проміжних продуктів біосинтезу, які клітина може перетворити на цільову речовину, минаючи енерговитратні початкові стадії.

Введення прекурсорів. Пряме введення в середовище L-фенілаланіну (прекурсора фенілпропаноїдного шляху) або хінної кислоти дозволяє рослині синтезувати фенолкарбонові кислоти та флавоноїди з меншими енерговитратами. У випадку нафтодіантронів перспективним є використання емодину та емодин-антрону, що дозволяє обійти обмеження швидкості природного синтезу [31].

Біотрансформація. Клітини звіробою мають унікальну ферментативну систему (глікозилтрансферази, гідролази), здатну трансформувати екзогенні

субстрати. Це дозволяє отримувати рідкісні похідні БАР, які важко синтезувати хімічним шляхом. Наприклад, трансформація екзогенних фенолів у відповідні глікозиди значно підвищує їхню розчинність та стабільність у водних розчинах, що є критичним для фармацевтичної розробки [32]. Біотрансформація використовується не тільки для збільшення кількості, а й для отримання нових сполук, яких немає в дикорослій рослині [32].

Аналіз стратегій інтенсифікації вторинного метаболізму рослин роду *Hypericum* дозволяє дійти таких висновків:

Керування фізико-хімічними чинниками (зокрема зниження концентрації азоту в середовищі МС та застосування вузькоспектрального LED-опромінення) є базовим інструментом для перемикання клітинного метаболізу з ростових процесів на біосинтез фенольних сполук.

Метод еліcitaції визначено як найбільш ефективний підхід для ініціації «метаболічного вибуху». Застосування сигнальних молекул (метилжасмонату, саліцилової кислоти) та наночастинок металів дозволяє багаторазово підвищити вихід цільових нафтодіантронів (гіперіцину) за рахунок імітації системного стресу та активації генів захисного метаболізму.

Використання прекурсорів та біотрансформація є перспективними методами подолання обмежень природних біосинтетичних шляхів. Введення екзогенних субстратів дозволяє не лише збільшити кількісний вміст БАР, а й отримувати модифіковані форми вторинних метаболітів із покращеними фармакокінетичними властивостями.

Таким чином, комбіноване застосування зазначених стратегій є необхідною умовою для забезпечення рентабельності та високої продуктивності біотехнологічного одержання цінних метаболітів звіробою в умовах промислового культивування.

РОЗДІЛ 4. ПЕРСПЕКТИВИ ПРОМИСЛОВОГО ВПРОВАДЖЕННЯ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ СИРОВИНИ

У четвертому розділі обґрунтовано технологічні схеми масштабування біопроектів у біореакторах та визначено критерії стандартизації отриманої *in vitro* біомаси рослин роду *Hypericum* відповідно до вимог Державної Фармакопеї України для її подальшого використання у промисловому виробництві фітопрепаратів.

4.1. Типи біореакторів для вирощування культур клітин та коренів звіробою
Масштабування лабораторних протоколів до рівня промислового виробництва потребує вибору систем, що забезпечують стабільність параметрів культивування.

Перехід від лабораторних колб до промислових об'ємів потребує вибору оптимальної конструкції біореактора, що мінімізує механічний стрес для рослинних клітин.

Системи з м'яким перемішуванням (Air-lift та Барботажні реактори): для суспензійних культур *Hypericum* критичним є рівень механічного зсуву (shear stress). Оскільки клітини звіробою схильні до утворення агрегатів, ерліфтні системи є кращими за класичні ферментери з лопатями, бо вони забезпечують аерацію без руйнування клітинних стінок. Біореактори з перемішуванням (Stirred-tank): традиційні системи, які забезпечують високий масообмін кисню. Проте для суспензій *Hypericum* вони мають обмежене застосування через високу чутливість клітин до механічного зсуву (shear stress).

Ерліфтні та барботажні біореактори: вважаються оптимальними для рослинних клітин. Перемішування здійснюється потоком повітря, що забезпечує м'яку аерацію. Це критично для збереження цілісності клітинних агрегатів, у яких відбувається синтез гіперіцину [33].

Хвильові біореактори (Wave-mixed): найбільш актуальна технологія для виробництва субстанцій для нутрицевтиків. Використовують одноразові пластикові контейнери, що коливаються, що забезпечує ідеальну стерильність та низький рівень стресу. Це мінімізує ризики контамінації та скорочує час

підготовки до нового циклу ферментації. Дослідження 2024 року підтверджують ефективність таких систем для масштабування культур пагонів звіробою [24, 34].

Для вирощування трансформованих коренів використовують біореактори з нерухомим шаром (packed-bed) або туманні біореактори (mist bioreactors), де коріння зрошується поживним розчином, що забезпечує максимальний доступ кисню [35]. Для культур «Hairy roots» звіробою найефективнішими є системи, де коріння знаходиться у повітряному середовищі та періодично зрошується поживним «туманом». Це вирішує проблему обмеженого доступу кисню, що часто виникає при повному зануренні коріння у рідке середовище [35].

4.2. Економічна ефективність та перспективи впровадження

Впровадження технологій *in vitro* у фармацевтичний сектор України має чіткі економічні переваги. Промислове вирощування біомаси *in vitro* стає рентабельним лише за умови високого виходу цільових БАР та стабільності процесу.

Біотехнологічне виробництво дозволяє отримувати сировину 365 днів на рік, що виключає ризики неврожаю та дефіциту на ринку. На відміну від плантаційного вирощування, де вміст гіперіцину коливається залежно від погоди, біотехнологічний метод гарантує стабільний вихід діючих речовин (наприклад, не менше 0,5% суми нафтодіантронів у сухому залишку). Біотехнологічна сировина позбавлена пестицидів, гербіцидів та важких металів, що дозволяє позиціонувати кінцевий нутрицевтик як продукт преміум-класу для екологічно свідомих споживачів.

Завдяки методам еліситації (див. розділ 3), вміст гіперіцину в біотехнологічній сировині може бути в 5–10 разів вищим, ніж у дикорослих рослинах, що суттєво знижує витрати на подальшу екстракцію та очищення [36].

Впровадження вертикального фермерства та нутрицевтики дозволяє створювати локальні фармацевтичні потужності, що працюють за стандартами GMP, забезпечуючи нутрицевтичну галузь екологічно чистою сировиною без пестицидів та важких металів. Можливість розміщення виробничих ліній

безпосередньо поруч із фасувальними цехами скорочує логістичні витрати та ризику псування сировини під час зберігання [37].

4.3. Проблеми стандартизації біотехнологічної сировини

Стандартизація сировини, отриманої *in vitro*, стикається з низкою регуляторних викликів, які наразі активно обговорюються у фармацевтичній спільноті. Основні проблеми:

Це найбільш дискусійне питання, яке потребує методологічного вирішення:

1. Генетична стабільність. Тривале культивування може призводити до соматональної мінливості, що впливає на продуктивність. Необхідний регулярний контроль із використанням молекулярних маркерів (ISSR, RAPD) [38].

2. Варіабельність хімічного складу. Біомаса *in vitro* може відрізнитися від природної за співвідношенням компонентів, особливо мінорних сполук [39].

3. Відсутність фармакопейних стандартів. Сучасні фармакопеї орієнтовані на морфологічно ідентифіковану сировину, тоді як біотехнологічна продукція є аморфною [40].

4. Обмеження традиційних методів ідентифікації. Макро- і мікроскопічні ознаки не застосовні, що потребує переходу до хімічних і молекулярних методів.

Впровадження Fingerprint-аналізу: для підтвердження автентичності біомаси необхідно використовувати метод ВЕРХ-профілювання (chromatographic fingerprinting), що дозволяє порівняти склад вторинних метаболітів біомаси *in vitro* з еталонним зразком дикорослої рослини.

Контроль соматональної мінливості: необхідно впроваджувати регламент регулярної перевірки стабільності лінії за допомогою молекулярних маркерів (наприклад, ISSR або RAPD-аналіз), щоб гарантувати, що через 10 циклів ферментації клітини не втратять здатність синтезувати гіперіцин.

Перспективні підходи стандартизації:

✓ ВЕРХ-профілювання (chromatographic fingerprinting) — для підтвердження автентичності та відтворюваності складу;

- ✓ LC-MS аналіз — для ідентифікації маркерних сполук;
- ✓ генетичний контроль культур;
- ✓ розробка тимчасових фармакопейних статей для біотехнологічної сировини [38- 40].

У результаті аналізу технологічних та регуляторних аспектів промислового впровадження методів *in vitro* встановлено:

Оптимальним інженерним рішенням для масштабування біомаси *Hypericum* є використання хвильових та ерліфтних біореакторів, а для культур «Hairy roots» — систем із розпиленням поживного середовища (mist bioreactors), що мінімізує механічне пошкодження клітин та забезпечує ефективний газообмін.

Економічна доцільність біотехнологічного виробництва базується на отриманні екологічно чистої сировини з прогнозованим вмістом цільових метаболітів (гіперіцину, гіперфорину), що відповідає концепції "Clean-label" та стандартам належної виробничої практики (GMP).

Ключовим викликом стандартизації визначено відсутність специфічних фармакопейних статей на аморфну біотехнологічну масу. Обґрунтовано необхідність впровадження методів ВЕРХ-профілювання (fingerprinting) та молекулярно-генетичного контролю для підтвердження автентичності та стабільності продукції.

Встановлено, що ефективне промислове впровадження біотехнологічних систем для *Hypericum* можливе за умови правильного вибору типу біореактора та стандартизації процесу. Найбільш перспективними є ерліфтні та хвильові системи, а також туманні біореактори для культур коренів. Основними бар'єрами залишаються питання стандартизації та нормативного регулювання, вирішення яких потребує впровадження сучасних аналітичних і молекулярних методів.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та розв'язання актуальної науково-практичної задачі щодо обґрунтування використання біотехнологічних методів *in vitro* для стабільного отримання біологічно активних речовин (БАР) рослин роду *Hypericum*. За результатами дослідження зроблено такі висновки:

1. Проведено аналіз роду *Hypericum* як цінного джерела нафтодіантронів (гіперіцину), флороглюцинолів (гіперфорину) та фенольних сполук. Встановлено, що традиційне збирання дикорослої сировини не може забезпечити зростаючі потреби фармацевтичної та нутрицевтичної галузей у стандартизованій, екологічно чистій сировині, що зумовлює необхідність впровадження технологій *in vitro*.

2. Обґрунтовано вибір біотехнологічних моделей. Обґрунтовано вибір оптимальних біотехнологічних моделей. Показано, що:

- калусні та суспензійні культури ефективні для синтезу фенольних сполук;
- культури пагонів — для накопичення гіперіцину;
- «hairy roots» — для продукції ксантонів

3. Визначено стратегії інтенсифікації біосинтезу. Найбільш ефективним методом підвищення виходу вторинних метаболітів є еліситація (використання метилжасмонату та саліцилової кислоти), яка в поєднанні з оптимізацією світлового режиму (LED-спектри) дозволяє досягти ефекту «метаболічного вибуху» — багаторазового збільшення концентрації цільових БАР протягом 48–72 годин.

4. Проаналізовано інженерно-технологічні аспекти. Встановлено, що для промислового масштабування культур звіробою пріоритетним є використання хвильових та ерліфтних біореакторів, які мінімізують механічний стрес для клітин, забезпечуючи при цьому необхідний рівень аерації та масообміну.

5. Окреслено перспективи стандартизації. Доведено, що біотехнологічна сировина потребує розробки нових специфікацій якості, орієнтованих на ВЕРХ-профілювання ключових метаболітів та контроль мінерального складу, що

дозволить інтегрувати її у сучасне виробництво нутрицевтиків за стандартами GMP.

ABSTRACT

Title: Analysis and Prospects of Using in vitro Technologies for Obtaining Valuable Secondary Metabolites of Medicinal Plants of the Genus *Hypericum*. **Object of study:** Biotechnological processes of cultivation of isolated cells, tissues, and organs of plants belonging to the genus *Hypericum* L. **Subject of study:** Methods for intensifying the synthesis of biologically active substances (hypericin, hyperforin, flavonoids) under in vitro conditions. **Aim of the work:** To summarize current scientific data on the use of plant biotechnology methods for obtaining secondary metabolites of *Hypericum* species and to identify the most promising approaches for industrial phytopharmaceutical production. **Key Results:** The work provides a detailed analysis of the chemical composition and pharmacological value of the *Hypericum* genus, particularly *H. perforatum*. The advantages of using in vitro systems (callus cultures, suspension cultures, and hairy roots) compared to traditional harvesting of wild plant materials are reviewed. Special attention is paid to the methods of regulating secondary metabolite biosynthesis: the use of elicitors (biotic and abiotic), optimization of nutrient media composition, the influence of phytohormones, and lighting conditions. It was determined that the most stable and high yields of hypericin are achieved during the cultivation of differentiated structures (shoots and adventitious roots). Prospects for scaling up processes in bioreactors for the needs of the pharmaceutical industry are outlined. **Scientific Novelty:** Data on the influence of various elicitation strategies on the metabolic profile of *Hypericum* cultures have been systematized, and the efficiency of genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* for obtaining stable producer lines has been substantiated. **Practical Significance:** The findings can be used to develop regulations for the industrial production of medicinal components, which will reduce dependence on natural resources and ensure high raw material quality regardless of the season.

Keywords: *Hypericum*, St. John's wort, in vitro, secondary metabolites, hypericin, elicitation, suspension culture, medicinal plant biotechnology.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tocci N., Pramsöhler M., Conterno L., Weil T. *Hypericum hircinum* L.: Botany, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Properties. *Plants*. 2025. Vol. 14, № 9. 1451. <https://doi.org/10.3390/plants14091451>
2. Фармацевтична енциклопедія / голова ред. ради В. П. Черних. 3-тє вид., переробл. і доповн. Київ: Моріон, 2016. 1632 с.
3. Семенко В., Поспєлов С. В. *Hypericum perforatum* L. в культурі: від агроєкологічних умов до фітофармакологічного профілю. *Український журнал природничих наук*. 2024. № 7. С. 159–167.
4. Jendželovská Z., Jendželovský R., Kuchárová B., Fedoročko P. Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. 560. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00560>
5. Sytar O. et al. Anthocyanins and naphthodianthrones in *Hypericum* species: biosynthesis and regulation. *Plant Cell Reports*. 2021. Vol. 40, № 7. P. 1125–1143. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02700-1>
6. Tusevski O. et al. Phenolic Compounds Composition of *Hypericum perforatum* L. Wild-Growing Plants from the Republic of Macedonia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2019. Vol. 84, № 1. P. 67–75.
7. Remali J., Sahidin I., Aizat W. Xanthone Biosynthetic Pathway in Plants: A Review. *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. 809497. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.809497>
8. He X., Yang F., Huang X. Proceedings of Chemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics and Synthesis of Biflavonoids. *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 19. 6088. <https://doi.org/10.3390/molecules26196088>
9. Ng Q. X., Venkatanarayanan N., Ho C. Y. Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*. 2017. Vol. 210. P. 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.12.048>
10. Sathishkumar R. et al. Biotechnological production of secondary metabolites in *Hypericum* species: current status and future prospects. *Molecular*

Biology Reports. 2023. Vol. 50, № 4. P. 3655–3670. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08284-y>

11. Adeosun W. B., Loots D. T. Medicinal Plants against Viral Infections: A Review of Metabolomics Evidence. *Viruses*. 2024. Vol. 16, № 2. 218. <https://doi.org/10.3390/v16020218>

12. Czarnecka-Czapczyńska M. et al. Hypericin Photodynamic Therapy Induces Cytotoxicity in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal of Clinical Medicine*. 2025. Vol. 14, № 21. 7514. <https://doi.org/10.3390/jcm14217514>

13. Cao Z. et al. Hypericum perforatum extract attenuates behavioral and neurochemical abnormalities in Alzheimer's disease rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017. Vol. 91. P. 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.022>

14. Tusevski O. et al. Phenolic Compounds Composition of Hypericum perforatum L. Wild-Growing Plants. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2019. Vol. 84. P. 67–75.

15. Shasmita et al. Recent advances in tissue culture and secondary metabolite production in Hypericum perforatum L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2023. Vol. 154. P. 231–245. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02525-3>

16. Kwiecień I. et al. Different Types of Hypericum perforatum cvs. In Vitro Cultures: A Rich Source of Bioactive Metabolites. *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 5. 2376. <https://doi.org/10.3390/molecules28052376>

17. Motallebi-Azar A. In vitro shoot regeneration and hypericin production in four Hypericum perforatum L. genotypes. *Industrial Crops and Products*. 2018. Vol. 187. 115450.

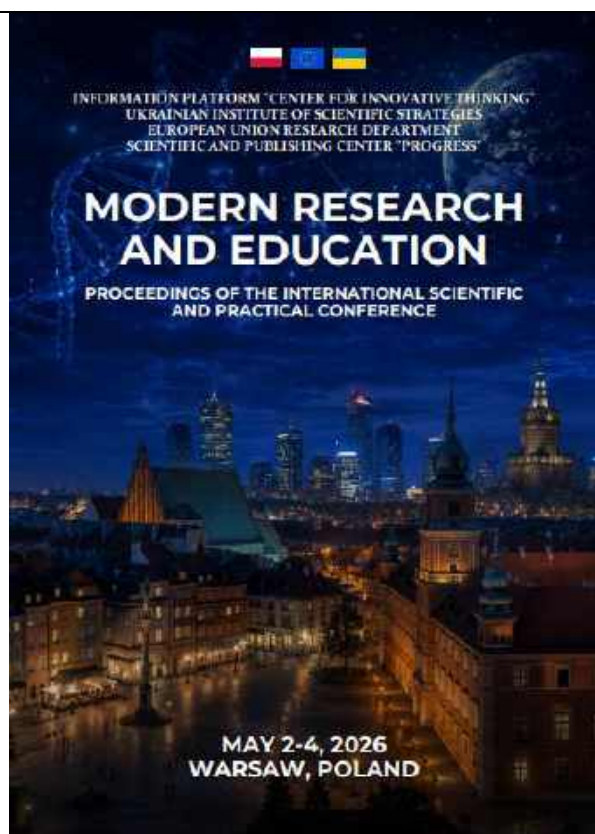
18. Montazeri M. et al. Hairy Root Cultures of Hypericum perforatum L.; A Promising Method for High Scale Production. *Journal of Medicinal Plants*. 2018. Vol. 3. P. 55–67.

19. Hou W., Shakya P., Franklin G. A Perspective on Hypericum perforatum Genetic Transformation. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. 879. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00879>

20. Amini M. et al. Effect of mineral nutrients on the growth and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2021. Vol. 40. P. 1145–1159. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10173-1>
21. Biswas D. et al. Hairy root culture: a potent method for improved secondary metabolite production. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14. 1197555. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1197555>
22. Fan C., Manivannan A., Wei H. Light Quality-Mediated Influence of Morphogenesis in Micropropagated Horticultural Crops. *BioMed Research International*. 2022. 4615079. <https://doi.org/10.1155/2022/4615079>
23. Tusevski O. et al. Xanthone production in *Hypericum perforatum* hairy root cultures transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012. Vol. 165. P. 120–135.
24. Verdú-Navarro F. et al. The advent of plant cells in bioreactors. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14. 1310405. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1310405>
25. Surmuş Asan H. Modulation of Bioactive Phenolic Compounds by Cytokinins in *Hypericum amblysepalum* Shoot Cultures. *Plants*. 2026. Vol. 15, № 7. 1017. <https://doi.org/10.3390/plants15071017>
26. Kwiecień I., Nicosia N., Ekiert H. Cultivation of *Hypericum perforatum* and Biotechnological Approaches for Improvement of Quality. Springer Nature. 2021. P. 145–168. https://doi.org/10.1007/978-3-030-74779-4_8
27. Soufi H. R. et al. Manipulation of light spectrum is an effective tool to regulate biochemical traits and gene expression. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13. 8600. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35326-x>
28. Jeyasri R. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2023. Vol. 153, № 3. P. 447–458. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8>
29. Tahseen S. et al. Comparative elicitation efficiency of chitosan and yeast extract for enhanced production of celastrol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2025. Vol. 163. 10.1007/s11240-025-03268-z

30. Golkar P., Vázquez-Núñez E., Peralta-Videa J. R. Nano-Elicitation Approaches for Boosting Secondary Metabolites in Medicinal Plant Cell Cultures. *Plants*. 2026. Vol. 15, № 1. 46. <https://doi.org/10.3390/plants15010046>
31. Tusevski O. et al. Production of Phenylpropanoids and Antioxidant Status of *Hypericum perforatum* L. Transgenic Shoots. *Molecules*. 2023. Vol. 28. 0987.
32. Liu C. et al. Reprogramming Hairy Root Cultures: A Synthetic Biology Framework for Precision Metabolite Biosynthesis. *Plants*. 2025. Vol. 14, № 13. 1928. <https://doi.org/10.3390/plants14131928>
33. Miserez A., Yu J., Mohammadi P. Protein-Based Biological Materials: Molecular Design and Artificial Production. *Chemical Reviews*. 2023. Vol. 123, № 5. P. 2049–2111. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00621>
34. Cambaz E., Çördük N. Micropropagation and Acclimatization of *Hypericum aucheri*. *Horticulturae*. 2025. Vol. 11. 1069. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11091069>
35. Bagal D. et al. Metabolic engineering in hairy roots: An outlook on production of plant secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2023. Vol. 201. 107847. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107847>
36. Danova K. et al. Evolutionary Aspects of Hypericin Productivity and Endogenous Phytohormone Pools. *Plants*. 2022. Vol. 11, № 20. 2753. <https://doi.org/10.3390/plants11202753>
37. Montagu M. V. The future of plant biotechnology in a globalized and environmentally endangered world. *Genetics and Molecular Biology*. 2020. Vol. 43, № 1. e20190040. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0040>
38. Morshedloo M. R. et al. Genetic relationships of Iranian *Hypericum perforatum* L. wild populations as evaluated by ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*. 2015. Vol. 301. P. 657–665. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1103-z>
39. Kilibarda S. et al. Phytochemical Profile and Biological Activities of Rtanj's *Hypericum perforatum* Infusion Tea. *Plants*. 2025. Vol. 14, № 9. 1377. <https://doi.org/10.3390/plants14091377>

40. European Pharmacopoeia. General chapter on herbal drugs and herbal drug preparations obtained by biotechnology (Draft for discussion). Strasbourg: Council of Europe, 2024.



UDC 001.3-048.35:09(06)

Proceedings of the International scientific and practical conference "Modern Research and Education" (May 2-4, 2026) / Publisher website: www.naukainfo.com. – Warsaw, Poland, 2026. - 523 p.

ISBN 978-617-8680-64-0

<https://doi.org/10.64828/conf-119-2026>

The recommended citation for this publication is:

Shevchenko T. G. Research into the specifics of the development of performing arts in Ukraine under martial law // Modern Research and Education : proceedings of the International scientific and practical conference (May 2-4, 2026). – Warsaw, Poland : naukainfo.com, 2026. – Pp. 15-21. – URL: <https://naukainfo.com/conference?id=119>

Editor
Soloviov O. V.

*M.Sc.Ed., M.P.A., Hon. PhD, Academic Advisor,
Head of the European Union Research Department,
Ukrainian Institute of Scientific Strategies*

The collection of scientific articles is a scientific and practical publication that includes research papers by students, postgraduate students, Candidates and Doctors of Sciences, researchers, and practitioners of Ukraine, Europe, neighboring countries, and beyond. The articles reflect studies of processes and changes in the structure of modern science. This collection is intended for students, postgraduate and doctoral candidates, educators, researchers, practitioners, and all those interested in current trends in the development of modern science.

E-mail: journal@naukainfo.com

Publisher website: <https://www.naukainfo.com>

© Publisher website: naukainfo.com, 2026

© Ukrainian Institute of Scientific Strategies (UISS), 2026

© All authors, 2026

PHARMACY AND PHARMACOTHERAPY

УДК 615.322:581.19:612.392

Колісова Ірина Іванівна
к.б.н., доцентка

Крутько Олександр Васильович
студент

Дніпровський державний медичний університет
м. Дніпро, Україна

БИОТЕХНОЛОГІЧНІ СТРАТЕГІЇ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ БІОСИНТЕЗУ НАФТОДІАНТРОНІВ У КУЛЬТУРАХ IN VITRO РОСЛИН РОДУ

Анотація. У статті проведено теоретичний аналіз сучасних біотехнологічних підходів до отримання вторинних метаболітів рослин роду *Hupericum*. Розглянуто переваги технологій in vitro над традиційним рослинництвом у контексті стабільності хімічного профілю та екологічної чистоти сировини. Особливу увагу приділено методам інтенсифікації біосинтезу нафтодіантронів та флавоноїдів за допомогою елітації, світлової стимуляції та генетичної трансформації. Обґрунтовано перспективність концепції «клітинної фабрики» для промислового виробництва лікарських засобів.

Ключові слова: *hupericum*, in vitro, вторинні метаболіти, глікринин, елітація, біотехнологія, клітинна фабрика.

Сучасна фармацевтична галузь демонструє стійку тенденцію до зростання попиту на фітопрепарати та nutraceutics, виготовлені на основі стандартизованої рослинної сировини. Представники роду *Hupericum* (Звіробій) посідають чільне місце в номенклатурі лікарських рослин завдяки унікальному комплексу біологічно активних речовин (БАР). Пріоритетне значення мають нафтодіантрони (гіперіцин та псевдогіперіцин), що виявляють антидепресивну, антивірусну та фотодинамічну активність, а також флороглюцозини (гіперфорин) та специфічні біфлавоноїди (рутин, кверцетрин) [1, с. 1451].

Традиційне отримання сировини шляхом збору дикорослих популяцій або плантаційного вирощування стикається з низкою критичних обмежень. По-перше, вміст вторинних метаболітів у рослинах роду *Hupericum* характеризується значною варіабельністю, зумовленою сезонними факторами, кліматичними умовами та станом ґрунту [2, с. 159]. По-друге, антропогенне навантаження призводить до накопичення в дикорослій сировині важких металів та залишків пестицидів, що суперечить вимогам концепції "Clean-label" та стандартам належної виробничої практики (GMP) [3, с. 71].

Біотехнології in vitro пропонують ефективну альтернативу традиційному рослинництву. Створення керованих біосистем — калосних, суспензійних культур та генетично трансформованих коренів («Haigu roots») — дозволяє мінімізувати вплив зовнішнього середовища та отримувати біомасу з прогнозованим хімічним профілем. Ключовою перевагою клітинних технологій є можливість застосування методів інтенсифікації біосинтезу, таких як елітація та спектральне маніпулювання світлом, що дозволяє значно підвищити біосинтетичний потенціал інтактних рослин. [3, с. 3658].

Метою даного дослідження було проведення комплексного аналізу та оцінка перспектив впровадження технологій in vitro для стабільного одержання цільових метаболітів роду *Hupericum*, а також наукове обґрунтування стратегій масштабування цих процесів у промислових умовах.

Методологічну базу дослідження склав систематичний аналіз наукової літератури за період 2015–2026 рр., представленої у наукометричних базах Scopus, Web of Science, PubMed та Google Scholar. Пошук здійснювався за ключовими дескрипторами: "Hypericum in vitro", "elicitation strategies", "bioreactor scaling", "secondary metabolites optimization". Було проаналізовано понад 100 джерел, з яких відібрано найбільш релевантні праці, що висвітлюють кореляцію між умовами культивування та виходом цільових метаболітів.

На основі проведеного аналізу встановлено, що майбутнє промислового одержання метаболітів з виробом лежить у площині метаболічної інженерії та використання комбінованої елітації (табл. 1). Перспективним напрямком є інтеграція методів "Зеленої хімії" (Green Chemistry) у процеси екстракції біомаси безпосередньо в біореакторах (in situ extraction), що дозволить значно знизити собівартість кінцевого продукту» [5, с. 2049].

Таблиця 1

Порівняльна характеристика стратегій інтенсифікації біосинтезу вторинних метаболітів у культурах in vitro роду Hypericum

Стратегія	Тип культури	Цільові метаболіти	Ефект (порівняно з контролем)	Переваги та обмеження
Елітація (MeIA)	Суспензія	Гіперіцини	↑ у 3–6 разів	+ Швидка відповідь; - Пригнічення росту
Світлова стимуляція	Калос	Гіперіцини	↑ на 40–70%	+ Екологічність; - Обмеження
Зміна балансу азоту	Суспензія	Гіперіцини	↑ до 2 разів	+ Низька вартість; - Контроль pH
Прекурсорний фідінг	Суспензія	Флавоноїди	Пряма кореляція	+ Спрямований синтез; - Вартість
Трансформація	Hairy roots	Ксантони	Стабільне ↑	+ Генетична стабільність; - Масштабування

Концепція «клітинної фабрики» передбачає перехід до керованого біосинтезу, де клітина розглядається як програмований біореактор.

Інтегрований підхід, що поєднує генетично стабільні лінії із періодичною елітацією, є найбільш перспективним. Теоретично доведено, що біотехнологічне отримання гіперіцину стає рентабельним лише за умови використання стратегій інтенсифікації, які підвищують вихід продукту мінімум у 4 рази від базового рівня [6, с. 1928].

Концептуальна схема функціонування «клітинної фабрики» для роду Hypericum (звіробій) базується на інтегрованому підході відбору високоефективних ліній клітин до отримання цільових сполук, таких як гіперіцини, псевдогіперіцини та гіперфорини [7, с. 20190040].

Ось основні етапи цієї схеми:

1. Ініціація та селекція біомаси

Вихідний експлант: використання фрагментів листків, стебел або насіння для введення в культуру in vitro.

Отримання калусної культури: дедиференціація клітин на живильних середовищах (наприклад, Мурасіге-Скута) з додаванням фітогормонів (ауксинів та цитокинінів).

Суспензійна культура: перенесення калусу в рідке середовище для швидкої проліферації клітин у біореакторах.

2. Оптимізація біосинтезу (Елітація)

Оскільки вторинні метаболіти — це захисна реакція рослини, для їх накопичення використовують «стресові» чинники:

Абіотичні елісатори: солі важких металів, УФ-випромінювання, зміна осмотичного тиску.

Біотичні елісатори: хітозан, витяжки з грибів-патогенів, жасмонова чи саліцилова кислоти.

Попередники (прекурсори): додавання амінокислот (наприклад, фенілаланіну), що входять у ланцюг синтезу фенольних сполук.

3. Культивування в біореакторах

Використання біореакторів різних типів (змурети, з внутрішнім ліфтом або хвилевої).

Дифузійні системи: Використання органічних розчинників для вивільнення продуктів з клітин без їх знищення, що дозволяє фабриці працювати безперервно.

4. Виділення та очистка (Downstream Processing)

Сепарація біомаси від середовища.

Екстракція та хроматографічне очищення цільових метаболітів [8, с. 1377].

Проведений теоретичний аналіз сучасних біотехнологічних підходів до культивування рослин роду *Hypericum* дозволяє зробити наступні висновки:

1. Незважаючи на традиційні методи отримання сировини з виробом не забезпечують необхідної стабільності вмісту вторинних метаболітів через вплив кліматичних факторів та екологічне навантаження. Технології in vitro є єдиною ефективною альтернативою для одержання стандартизованої, екологічно чистої біомаси із прогнозованим хімічним профілем [3, с. 165].

2. Аналіз різних типів культур продемонстрував, що суспензійні клітинні лінії та генетично трансформовані корені («Hairy roots») мають найвищий технологічний потенціал для промислового масштабування. Суспензійні культури забезпечують швидку проліферацію біомаси, тоді як культури «Hairy roots» гарантує генетичну стабільність та високий вихід ксантонів [9, с. 235].

3. Науково обґрунтовано, що інтеграція стратегій інтенсифікації, зокрема елітації імплакементом та маніпулювання спектрами складом світла, дозволяє підвищити вміст цільових флавоноїдів (гіперіцину) у 3–6 разів порівняно з природною сировиною. Це робить біотехнологічне виробництво економічно рентабельним [10, с. 46].

4. Визначено, що концепція «клітинної фабрики», яка базується на інтеграції автоматизованих систем біореакторів та методів метаболічної інженерії, є міграторним шляхом розвитку сучасної фітофармації. Впровадження таких систем дозволить створити замкнений цикл виробництва

високотехнологічних субстанцій на основі виробом, незалежний від природних ресурсів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Tucci N., Fransohler M., Contreras L., Weil T. *Hypericum hircicum* L.: Botany, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Properties. *Plants*. 2025. Vol. 14, № 9. 1451. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants14091451>
2. Семченко В., Попова С. В. *Hypericum perforatum* L. в культурі: від агрологічних умов до фітофармакологічного профілю. *Український журнал природничих наук*. 2024. № 7. С. 159–167.
3. Turovski O. et al. Phenolic Compounds Composition of *Hypericum perforatum* L. Wild-Growing Plants. *Agricultural Composites Scientifcus*. 2019. Vol. 84. P. 67–75.
4. Sathishkumar R. et al. Biotechnological production of secondary metabolites in *Hypericum* species: current status and future prospects. *Molecular Biology Reports*. 2023. Vol. 50, № 4. P. 3655–3670. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08284-y>
5. Miserez A., Yu J., Mohammadi P. Protein-Based Biological Materials: Molecular Design and Artificial Production. *Chemical Reviews*. 2023. Vol. 123, № 5. P. 2049–2111. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chenrev.2c06621>
6. Liu C. et al. Reprogramming Hairy Root Cultures: A Synthetic Biology Framework for Precise Metabolic Biosynthesis. *Plants*. 2025. Vol. 14, № 13. 1928. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants14131928>
7. Montagu M. V. The future of plant biotechnology in a globalized and environmentally endangered world. *Genetics and Molecular Biology*. 2020. Vol. 43, № 1. e20190040. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0040>
8. Kilibarda S. et al. Phytochemical Profile and Biological Activities of *Rhamnus Hypericum perforatum* Infusion Tea. *Plants*. 2025. Vol. 14, № 9. 1377. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants14091377>

9. Shasmita et al. Recent advances in tissue culture and secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2023. Vol. 154. P. 231–245. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02525-3>
10. Golkar P., Vázquez-Núñez E., Peralta-Videa J. R. Nano-Elicitation Approaches for Boosting Secondary Metabolites in Medicinal Plant Cell Cultures. *Plants*. 2026. Vol. 15, № 1. 46. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants15010046>

