

А. В. Пунгин, Л. О. Ларцева, М. В. Кулаков, Е. А. Попова

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ *SPERGULARIA MARINA* (L.) GRISEB.: ПОЛУЧЕНИЕ И ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Поступила в редакцию 18.12.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

doi: 10.5922/gikbfu-2023-1-7

Для цитирования: Пунгин А.В., Ларцева Л.О., Кулаков М.В., Попова Е.А. Каллусные культуры *Spergularia marina* (L.) Griseb.: получение и фитохимический анализ // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2023. №1. С. 89–112. doi: 10.5922/gikbfu-2023-1-7.

В последние десятилетия возрос интерес к растениям-галофитам из-за высокого содержания в них биологически активных веществ, обладающих мощной антиоксидантной, противомикробной, противовоспалительной и противоопухолевой активностью и перспективных для профилактики различных заболеваний. На территории Калининградской области произрастает несколько видов галофитов, среди которых особый интерес представляет редкий вид *Spergularia marina* (L.) Griseb. Биологическая активность и содержание вторичных метаболитов в растениях этого вида изучены недостаточно. Целью настоящего исследования стало получение каллусных культур, изучение содержания некоторых групп фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов. Проведен подбор регуляторов роста и концентраций, индуцирующих образование каллуса. Было подобрано 19 питательных сред для индукции каллусных культур *S. marina*. Проведенный фитохимический анализ показал значительное содержание фенольных соединений и гидроксикоричных кислот, а также высокой уровень антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур. Из 19 каллусных культур перспективными для получения целевых вторичных метаболитов являются культуры, полученные на питательных средах Мурациге – Скуга, содержащие следующие комбинации регуляторов роста: ТДЗ 0,25 мг/л и 2,4-Д 1 мг/л, ТДЗ 0,1 мг/л и 2,4-Д 1,5 мг/л, ТДЗ 0,25 мг/л и ИМК 0,25 мг/л, ТДЗ 0,5 мг/л и ИМК 0,25 мг/л, Кин 0,25 мг/л и 2,4-Д 0,5 мг/л.

Ключевые слова: галофиты, вторичные метаболиты, антиоксидантная активность, каллус

Введение

Известно, что многие из природных биологически активных веществ, используемых в медицине, являются продуктами вторичного метаболизма растений, оказывающих различное благотворное влияние на здоровье [8]. При этом запасы большинства лекарственных растений ограничены, многие из них относятся к редким и исчезающим видам



или становятся таковыми из-за неконтролируемых заготовок сырья [5]. Проблема рационального использования и сохранения редких лекарственных видов растений не может быть удовлетворена только традиционными методами и требует привлечения современных эффективных биотехнологий размножения и выращивания растений [2; 24].

С точки зрения содержания биологически активных веществ и перспектив своего использования в биотехнологии растений растения-экстремофилы остаются малоизученными. Например, галофиты известны своей устойчивостью к суровым условиям окружающей среды, связанной с избытком солей в местах обитания [11]. Считается, что одним из механизмов эволюционной адаптации галофитных растений к высоким уровням засоления является интенсификация биосинтеза вторичных метаболитов, в том числе фенольных соединений [19]. В течение последнего десятилетия растения-галофиты рассматривались как перспективный источник биологически активных веществ. Многие из этих растений обладают благоприятным эффектом благодаря высокому содержанию минеральных веществ, аминокислот, полифенолов, имеющих терапевтические свойства – антиоксидантные, противовоспалительные, противоопухолевые и др. [16].

На побережье Балтийского моря и в лагунах встречается редкий вид-галофит торичник морской (*Spergularia marina* (L.) Griseb.), занесенный в Красную книгу Калининградской области и Балтийского региона [1; 13]. *S. marina* является однолетним травянистым растением семейства Caryophyllaceae, растет в Европе, Северной Африке, Азии, Австралии и Северной Америке [12]. Как облигатный галофит этот вид произрастает на почвах с переменным, но обычно высоким засолением. *S. marina* встречается на морских и внутренних солончаках и может произрастать на обочинах дорог, где почва загрязнена солями, используемыми в качестве противогололедного реагента [26].

Торичник морской применяется в пищевой промышленности в Южной Корее для разработки функциональных продуктов питания и как пищевая добавка – заменитель соли [6; 18]. Известно, что *S. marina* обладает способностью снижать инсулинорезистентность, оказывает антиоксидантное, противовоспалительное, антимикробное и антиадипогенное действие, а также ингибирующее действие на раковые клетки [7; 9; 15; 17; 20; 23]. Исследовано содержание некоторых групп фенольных соединений и биологическая активность экстрактов различных частей *S. marina* при разных уровнях засоления почв в естественных местах обитания [27].

Однако до настоящего времени не разработано биотехнологических протоколов получения и культивирования клеточных культур *Spergularia marina*, перспективных для промышленного получения целевых вторичных метаболитов и разработки фармацевтических препаратов и функциональных продуктов питания, что обуславливает актуальность и перспективность такого исследования. Целью нашей работы стал подбор регуляторов роста для получения каллусных культур редкого вида-галофита *S. marina*, а также фитохимический анализ содержания некоторых групп фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов полученных каллусных культур.



Материалы, методы и этапы исследования

Растительный материал.

Для получения каллусных культур были использованы узловые сегменты асептических растений *S. marina*, введенных в культуру *in vitro* в 2021 г. [3; 4], культивируемых на твердой питательной среде Мурасиге — Скуга (МС) с добавлением 7 г/л агара и 30 г/л сахарозы без регуляторов роста [22]. Работы по получению и культивированию каллусных культур выполнялись в лаборатории микрклонального размножения растений НОЦ «Промышленные биотехнологии» образовательного-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта.

I этап: подбор регуляторов роста для индукции каллуса.

Индукция каллусогенеза проводилась на питательной среде МС с добавлением 7 г/л агара, 30 г/л сахарозы и регуляторов роста [22]. Пять вариантов питательных сред содержали соответствующие ауксины в концентрации 0,25 мг/л, а именно ИУК (β -индолилуксусная кислота), ИМК (индолил-3-масляная кислота), НУК (1-нафтилуксусная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), 4-ХФУК (4-хлорфеноксиуксусная кислота). Остальные 20 вариантов сред содержали комбинацию регуляторов роста — ауксина (в концентрации 0,25 мг/л) и цитокинина (в концентрации 1 мг/л). Среди регуляторов роста цитокининового ряда были использованы БАП (6-бензиламинопурин), Кин (кинетин), ТДЗ (тидиазурон), 2iP (N6-(дельта 2-изопентенил)-аденин).

Узловые экспланты асептических растений *S. marina* помещались в чашку Петри на поверхность питательной среды. На одну чашку Петри помещали 10 эксплантов, а общее количество повторностей для каждого варианта питательной среды для индукции первичного каллуса составляло три чашки Петри. Для индукции каллусов чашки Петри с эксплантами помещали в термостат и инкубировали при 25 °С в условии полной темноты в течение 30 дней (рис. 1).

По истечении указанного времени проводилась визуальная оценка эффективности каллусообразования по разработанным нами критериям: цвет, плотность каллуса (0–3 балла), степень проявления ризогенеза (0–3 балла), степень проявления геммогенеза (0–3 балла), степень образования каллуса (0–5 баллов), частота индукции каллуса (%). Балльная шкала оценки степени таких признаков, как плотность каллуса, степень проявления ризогенеза и геммогенеза, предусматривает градацию выраженности признака: от 0 баллов (отсутствует проявление признака) до 3 баллов (максимальная выраженность признака). Соответствующим образом оценивалась степень образования каллуса: от 0 баллов (образование каллусной ткани отсутствует) до 5 баллов (образовался каллус крайне крупного размера). Частота индукции каллуса рассчитывалась для каждого варианта питательных сред как выраженное в процентах отношение количества эксплантов с образовавшимся каллусом к общему количеству эксплантов.

На основании данных визуальной оценки и с применением кластерного анализа для следующего этапа исследования отбирались варианты питательных сред, содержащих регуляторы роста и их комбинации, на

которых был получен крупный первичный каллус с высокой частотой индукции, имеющий рыхлую структуру с легко отделяющимися друг от друга клетками, без сильного проявления геммо- и ризогенеза.

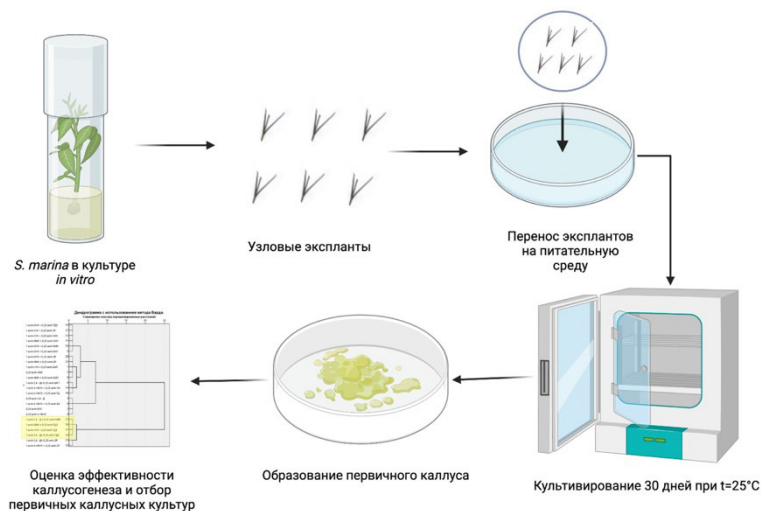


Рис. 1. Дизайн эксперимента по подбору регуляторов роста для индукции каллуса *S. marina*

II этап: подбор концентраций ауксинов и цитокининов для индукции и культивирования каллуса.

Для подбора концентраций ауксинов и цитокининов для индукции и культивирования каллуса использовалась питательная среда МС с добавлением 7 г/л агара и 30 г/л сахарозы [22], в которую вносились комбинации регуляторов роста в заданных концентрациях: 0 мг/л; 0,1 мг/л; 0,25 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л; 2 мг/л. Всего использовалось 36 вариантов питательных сред – в соответствии с числом комбинаций регуляторов роста (табл.).

Подбор концентраций ауксинов и цитокининов для индукции и культивирования каллуса

Ауксин, мг/л	Цитокинин, мг/л					
	0,00	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00
0,00	1	2	3	4	5	6
0,10	7	8	9	10	11	12
0,25	13	14	15	16	17	18
0,50	19	20	21	22	23	24
1,00	25	26	27	28	29	30
2,00	31	32	33	34	35	36

Для получения каллуса на одну чашку Петри помещали 10 узловых эксплантов, полученных из асептических растений *S. marina*. Общее количество повторностей для каждого варианта питательной среды для



индукции первичного каллуса составляло три чашки Петри. Техника культивирования и оценка эффективности каллусообразования были аналогичны использовавшимся на первом этапе исследования.

Оценка прироста сухой и сырой биомассы каллусов.

Полученные первичные каллусы культивировались в течение трех месяцев в тех же условиях и на питательных средах того же состава, что и для индукции данных каллусных культур. Пассирование каллусных культур осуществлялось каждые 30 дней.

Для оценки прироста сухой и сырой биомассы полученных каллусных культур отбирались участки каллусной ткани массой 0,500 г и переносились на свежую питательную среду с соответствующими регуляторами роста. Далее каллус культивировался в термостате при 25 °С в течение 30 дней. По истечении данного времени взвешивали сырую биомассу. После растительный материал сушили в термостате при 60 °С в течение 48 ч, а затем взвешивали сухую биомассу. Высушенный материал для последующего анализа хранили в герметичных пластиковых пробирках в морозилке при -18 °С.

Определение суммарного содержания некоторых групп фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур *S. marina*.

Работы по изучению содержания фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур *S. marina* выполнялись в лаборатории природных антиоксидантов НОЦ «Промышленные биотехнологии» образовательного-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта.

Для получения экстрактов высушенный материал растирали в фарфоровой ступке до гомогенного состояния, после брали навеску 0,250 г, переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл и добавляли 20 мл 70 %-ного раствора этанола. Далее центрифужные пробирки помещали на орбитальный шейкер (Biosan OS-20) и проводили мацерацию при 250 об/мин в течение 24 ч. Далее пробирки центрифугировали (Eppendorf 5810R) при 3900 об/мин в течение 30 мин. Затем супернатант переносили в мерную колбу на 25 мл, после чего объем в мерной колбе доводился до 25 мл 70 %-ным раствором этанола. Полученные экстракты хранились в холодильнике при +4 °С.

Суммарное содержание фенольных соединений, флавоноидов, гидроксикоричных кислот, а также антиоксидантную активность экстрактов определяли спектрофотометрическим методом с помощью микропланшет-ридера (BMG Labtech CLARIOstar). Все реакции проводили в плоскодонном 96-луночном микропланшете.

Суммарное содержание фенольных соединений определяли с использованием реактива Фолина – Чокальтеу [28; 31]. В каждую лунку микропланшета добавляли по 100 мкл реактива Фолина – Чокальтеу и по 20 мкл экстракта или стандарта. Смесь перемешивали на орбитальном шейкере (BioSan MPS-1) и выдерживали 4 мин, а затем добавляли 75 мкл 7,5 %-ного раствора карбоната натрия. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин, затем регистрировали оптическое поглощение при длине волны 765 нм. В качестве стандарта использовали галловую кислоту (ГК). Суммарное содержание



фенольных соединений оценивали по калибровочной кривой и выражали в мг эквивалентов галловой кислоты на грамм сухой массы каллуса (мг-экв. ГК/г сухого веса).

Для определения суммарного содержания флавоноидов был использован метод, основанный на реакции комплексообразования с $AlCl_3$ в присутствии ацетата натрия с некоторыми изменениями [28; 31]. К 50 мкл экстракта или стандарта добавляли 10 мкл 10 %-ного раствора $AlCl_3$, 10 мкл 1М ацетата натрия и 150 мкл 96 %-ного раствора этанола. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре 40 мин. Раствор сравнения готовился для каждого экстракта без добавления 10 %-ного раствора $AlCl_3$. Оптическое поглощение регистрировали при длине волны 415 нм. В качестве калибровочного стандарта использовали рутин. Общее содержание флавоноидов выражали в мг эквивалентов рутина на грамм сухой массы каллуса (мг-экв. рутин/г сухого веса).

94

Суммарное содержание гидроксикоричных кислот определяли с использованием реактива Арно с некоторыми изменениями [32]. К 20 мкл экстракта добавляли 40 мкл 0,5 М HCl, 40 мкл реактива Арно, 40 мкл NaOH и 60 мкл дистиллированной воды. Для каждого экстракта готовился раствор сравнения без добавления реактива Арно. Оптическое поглощение регистрировали при длине волны 525 нм. В качестве стандарта использовали розмариновую кислоту (РК). Суммарное содержание гидроксикоричных кислот выражали в мг эквивалентов розмариновой кислоты на грамм сухой массы каллуса (мг-экв. РК/г сухого веса).

Антиоксидантную активность определяли по способности захватывать радикалы 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) и 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновой кислоты) (ABTS), а также по восстановительной способности при взаимодействии с Fe(III)-2,4,6-трипиридил-s-триазиновым комплексом (FRAP) [10]. Для построения калибровочного графика использовалась аскорбиновая кислота (АК). Антиоксидантную активность выражали в мг эквивалентов аскорбиновой кислоты на грамм сухой массы каллуса (мг-экв. АК/г сухого веса). При определении антиоксидантной активности методом DPPH 20 мкл экстракта смешивали с 300 мкл 0,1 мМ раствора DPPH. В качестве раствора сравнения использовали 300 мкл DPPH и 20 мкл 70 %-ного раствора этанола. Смесь инкубировали 60 минут в темноте при комнатной температуре. Снижение оптического поглощения было зафиксировано при 515 нм. При определении антиоксидантной активности методом ABTS 20 мкл экстракта смешивали с 300 мкл приготовленного раствора катион-радикала ABTS. Полученную смесь инкубировали 15 мин в темноте, оптическое поглощение измеряли при длине волны 734 нм. Для определения восстановительной способности экстрактов использовали реагент FRAP. Для проведения реакции к 20 мкл исследуемого экстракта добавляли по 300 мкл реагента FRAP. Полученную смесь инкубировали 10 мин, затем измеряли оптическое поглощение при длине волны 593 нм.

Статистическая обработка данных.

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с использованием IBM SPSS Statistic версии 23. Обработка результатов осуществлялась посредством применения однофакторного дисперси-

онного анализа (ANOVA) с использованием апостериорных критериев Шеффе или Тьюки при уровне значимости $p \leq 0,05$. Статистические результаты представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Для отбора вариантов питательных сред проводился иерархический кластерный анализ методом Уорда. Для оценки корреляции количественных признаков использовали коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

Подбор регуляторов роста для индукции каллуса.

По результатам первого этапа исследования по подбору регуляторов роста для индукции каллуса *S. marina* было установлено, что на питательных средах МС с добавлением 7 г/л агара и 30 г/л сахарозы, содержащих только ауксины ИУК, ИМК, НУК, 2,4-Д, 4-ХФУК в концентрации 0,25 мг/л, образования каллусов на эксплантах не наблюдалось. На эксплантах, культивируемых на питательных средах, содержащих регуляторы роста ауксинового ряда (ИУК, ИМК, НУК, 2,4-Д, 4-ХФУК) в концентрации 1 мг/л в комбинации с 0,25 мг/л БАП, наблюдался гемморизогенез без пролиферации каллуса (рис. 2).

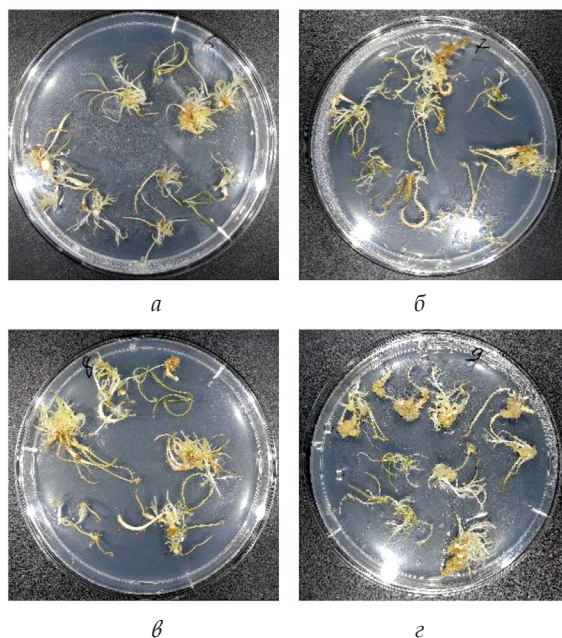


Рис. 2. Внешний вид эксплантов *S. marina*, культивируемых на питательной среде МС с добавлением регуляторов роста: а – 1 мг/л ИУК и 0,25 мг/л БАП; б – 1 мг/л ИМК и 0,25 мг/л БАП; в – 1 мг/л НУК и 0,25 мг/л БАП; г – 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л БАП

На основе данных визуальной оценки эффективности каллусообразования по разработанному критерию был проведен иерархический кластерный анализ с использованием метода Уорда. Иерархический

кластерный анализ выделил два главных кластера, группирующих питательные среды на основе сходства ростовых характеристик первичных каллусных культур (рис. 3).

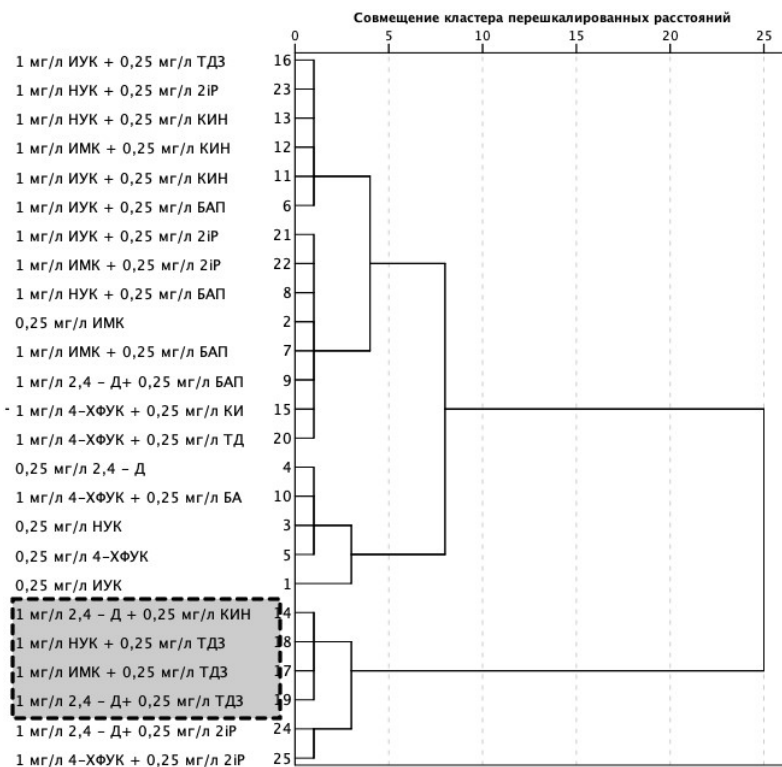


Рис. 3. Дендрограмма кластеризации исследуемых вариантов питательных сред по эффективности образования первичных каллусных культур *S. marina*

В первый кластер были сгруппированы варианты питательных сред, на которых отсутствовал каллус или отмечалась низкая частота индукции каллуса и высокая степень проявления гемо- и ризогенеза (рис. 3). Во второй кластер были сгруппированы 6 вариантов сред с высокой частотой индукции каллуса (90–100%). Однако на питательных средах с комбинациями регуляторов роста 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л 2iP, а также 1 мг/л 4-ХФУК и 0,25 мг/л 2iP на отдельных эксплантах отмечалось образование плотного темно-коричневого каллуса.

Таким образом, были отобраны наиболее эффективные питательные среды, которые индуцируют образование первичного каллуса *S. marina*: 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л Кин; 1 мг/л ИМК и 0,25 мг/л ТДЗ; 1 мг/л НУК и 0,25 мг/л ТДЗ; 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л ТДЗ. Полученный первичный каллус на данных средах имел светло-желтую окраску, был рыхлым по своей структуре, а также отличался высокой частотой индукции без проявления геммо- и ризогенеза (рис. 4).

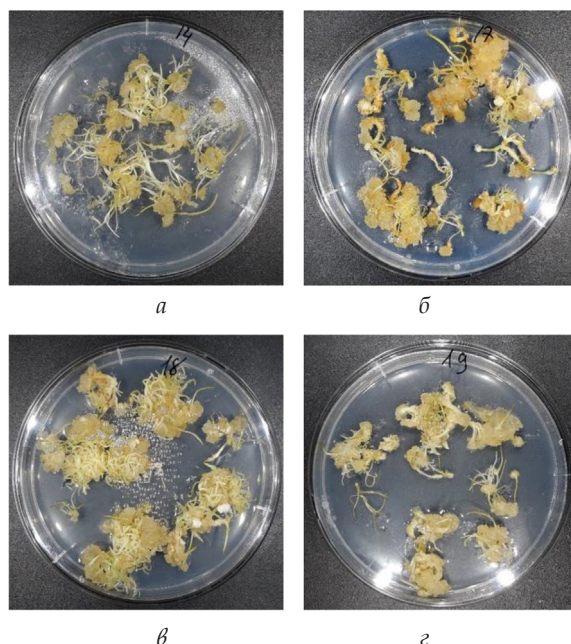


Рис. 4. Внешний вид эксплантов *S. marina* и первичных каллусов, культивируемых на питательной среде МС с добавлением регуляторов роста:

а – 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л Кин; б – 1 мг/л ИМК и 0,25 мг/л ТДЗ;

в – 1 мг/л НУК и 0,25 мг/л ТДЗ; г – 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л ТДЗ

Подбор концентраций ауксинов и цитокининов для индукции и культивирования каллуса.

Для отобранных комбинаций ауксинов и цитокининов на первом этапе исследования был проведен подбор концентраций для индукции и культивирования каллуса *S. marina*. В свою очередь, на втором этапе для каждой комбинации регуляторов роста (2,4-Д и Кин; ИМК и ТДЗ; НУК и ТДЗ; 2,4-Д и ТДЗ) было протестировано 36 вариантов питательных сред МС, в которые вносились комбинации регуляторов роста в заданных концентрациях: 0 мг/л; 0,1 мг/л; 0,25 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л; 2 мг/л.

На всех 36 вариантах питательных сред, содержащих НУК и ТДЗ в тестируемых концентрациях, отмечена высокая частота индукции плотного темно-коричневого каллуса, отличающегося от каллусной культуры, полученной на первом этапе исследования при концентрациях 1 мг/л НУК и 0,25 мг/л ТДЗ. Данный результат, вероятнее всего, можно объяснить тем, что обработка одними и теми же регуляторами роста, применяемая к различным эксплантам одного и того же вида или генотипа, может приводить к различным ответам, что предполагает возможную тканевую специфичность рецепторов или эфффекторов регуляторов роста либо взаимодействие эндогенных фитогормонов в тканях растений и экзогенно поставляемых регуляторов роста в культуре тканей [25]. В связи с этим комбинация регуляторов роста НУК и ТДЗ для индукции и культивирования каллуса была исключена из исследования.

На основе данных визуальной оценки эффективности каллусообразования и по результатам проведенного иерархического кластерного анализа из 36 вариантов питательных сред МС, содержащих регуляторы роста Кин и 2,4-Д, были отобраны наиболее эффективные варианты со следующими концентрациями: 0,1 мг/л Кин и 1 мг/л 2,4-Д; 0,25 мг/л Кин и 0,5 мг/л 2,4-Д; 0,25 мг/л Кин и 1 мг/л 2,4-Д (рис. 5). Полученный первичный каллус имел 100 %-ную частоту индукции, светло-желтую окраску, рыхлую структуру. Отметим, что более высокие концентрации Кин и 2,4-Д негативно влияли на индукцию каллуса, стимулируя геммогенез.

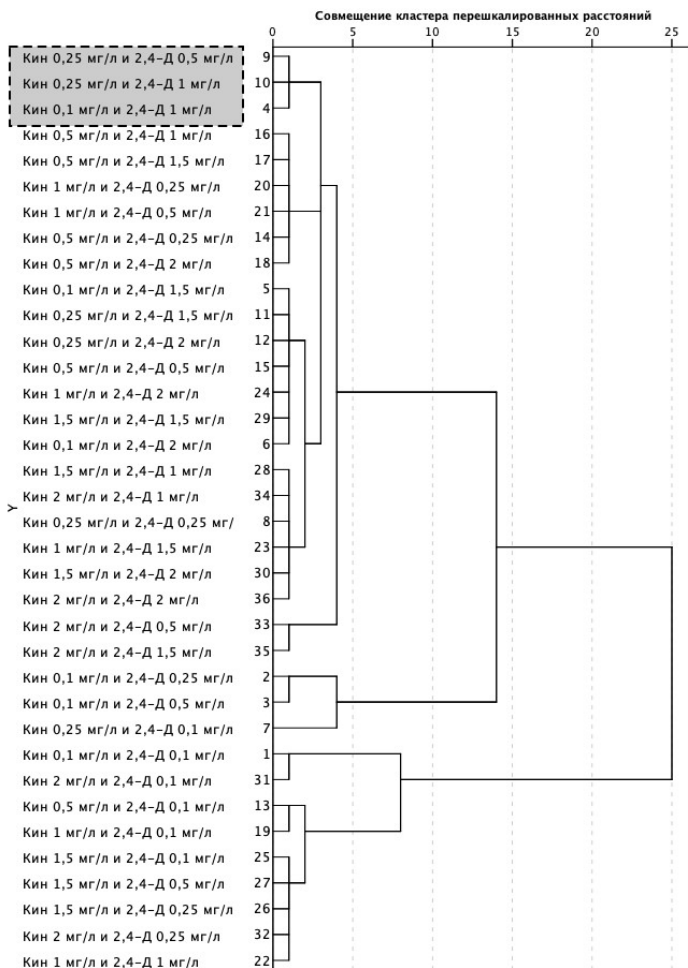


Рис. 5. Дендрограмма кластеризации исследуемых вариантов питательных сред, содержащих различные концентрации регуляторов роста Кин и 2,4-Д, по эффективности образования первичных каллусных культур *S. marina*

По результатам иерархического кластерного анализа из 36 вариантов питательных сред МС, содержащих регуляторы роста ТДЗ и ИМК, были отобраны 11 питательных сред (рис. 6): 0,1 мг/л ТДЗ и



1 мг/л ИМК; 0,1 мг/л ТДЗ и 1,5 мг/л ИМК; 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК; 0,25 мг/л ТДЗ и 0,5 мг/л ИМК; 0,25 мг/л ТДЗ и 1,5 мг/л ИМК; 0,25 мг/л ТДЗ и 2 мг/л ИМК; 0,5 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК; 0,5 мг/л ТДЗ и 0,5 мг/л ИМК; 0,5 мг/л ТДЗ и 1 мг/л ИМК; 0,5 мг/л ТДЗ и 1,5 мг/л ИМК; 0,5 мг/л ТДЗ и 2 мг/л ИМК. На данных вариантах сред первичный каллус характеризовался высокой частотой индукции, светло-желтой окраской и рыхлой структурой, при этом наблюдался незначительный геммогенез без признаков ризогенеза.

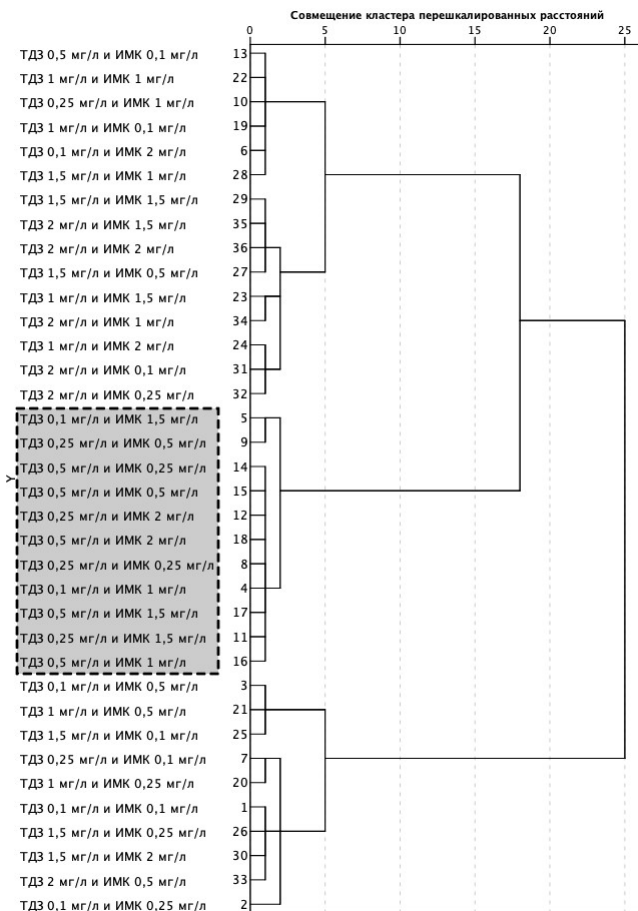


Рис. 6. Дендрограмма кластеризации исследуемых вариантов питательных сред, содержащих различные концентрации регуляторов роста ТДЗ и ИМК, по эффективности образования первичных каллусных культур *S. marina*

По результатам иерархического кластерного анализа из 36 вариантов питательных сред МС, содержащих регуляторы роста ТДЗ и 2,4-Д, были отобраны наиболее эффективные среды со следующими концентрациями: 0,1 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л 2,4-Д; 0,1 мг/л ТДЗ и 1 мг/л 2,4-Д; 0,1 мг/л ТДЗ и 1,5 мг/л 2,4-Д; 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л 2,4-Д; 2 мг/л ТДЗ и 1 мг/л 2,4-Д (рис. 7). Полученный первичный каллус на данных вариантах сред

имел светло-желтую окраску, рыхлую структуру, без признаков ризогенеза, но при этом отмечалось небольшое число эксплантов с признаками геммогенеза.

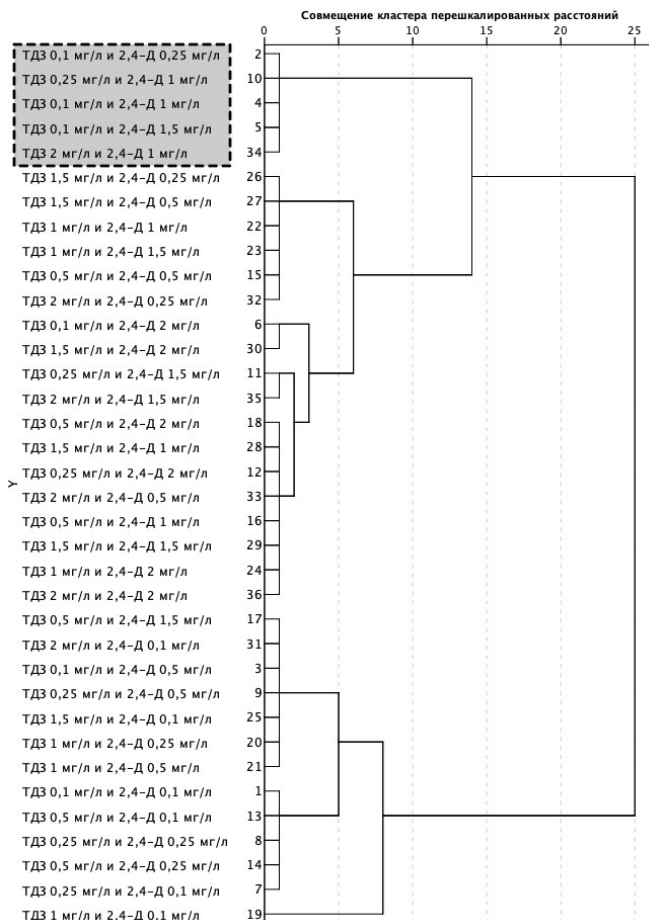


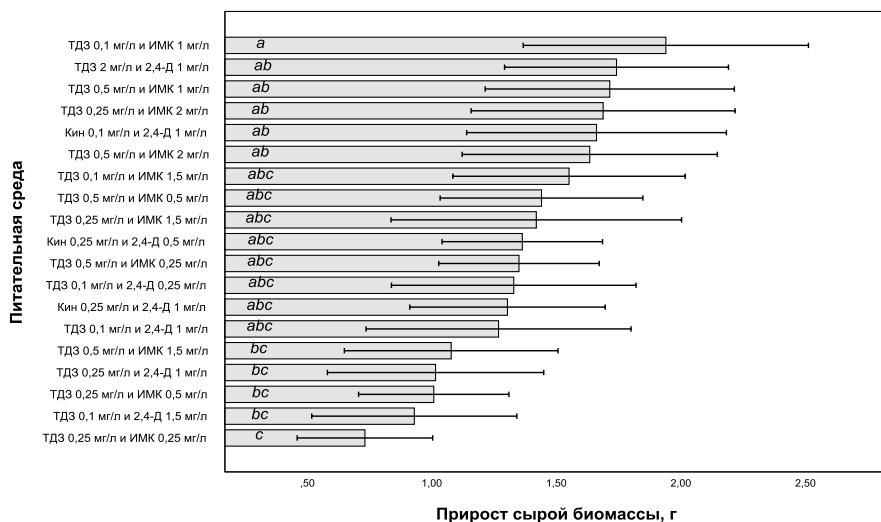
Рис. 7. Дендрограмма кластеризации исследуемых вариантов питательных сред, содержащих различные концентрации регуляторов роста ТДЗ и 2,4-Д, по эффективности образования первичных каллусных культур *S. marina*

Таким образом, в результате второго этапа исследования было отобрано 19 питательных сред, содержащих в качестве регуляторов роста ауксины (2,4-Д и ИМК) и цитокинины (Кин и ТДЗ) в концентрациях, позволяющих индуцировать каллусогенез на эксплантах *S. marina*. Полученные первичные каллусные культуры культивировались на отобранных 19 вариантах питательных сред в течение трех месяцев, после чего была произведена оценка прироста сырой и сухой биомассы каллусов *S. marina*.

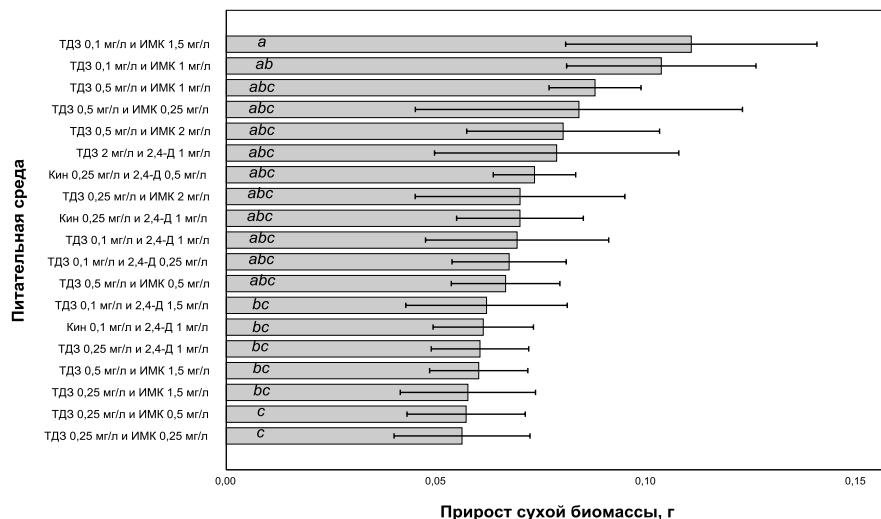
В результате проведенных исследований было установлено наличие значимых различий в приросте сырой (ANOVA, $F = 3,82$; $p \leq 0,001$) и сухой биомассы (ANOVA, $F = 2,91$; $p \leq 0,05$) каллусных культур *S. marina* (рис. 8).



Максимальный прирост сырой биомассы наблюдали на питательной среде МС, содержащей 0,1 мг/л ТДЗ и 1 мг/л ИМК (1,94±0,46 г), а сухой — на питательной среде 0,1 мг/л ТДЗ и 1,5 мг/л ИМК (0,11±0,03 г). Наименьший прирост сырой (0,73±0,22 г) и сухой (0,06±0,02 г) биомассы был на среде с добавлением 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК.



а



б

Рис. 8. Прирост сырой (а) и сухой (б) биомассы каллусных культур *S. marina*.
 Разными буквами обозначены значимо различающиеся данные (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Отобранные каллусные культуры *S. marina* были исследованы на содержание биологически активных веществ фенольной природы, а именно на суммарное содержание фенольных соединений, флавоноидов и гидроксикоричных кислот. Также была исследована антиоксидантная активность экстрактов методами DPPH, ABTS и FRAP.

По результатам проведенного анализа присутствия флавоноидов было обнаружено только в двух каллусных культурах *S. marina*, культивируемых на средах МС с добавлением 0,25 мг/л Кин и 0,5 мг/л 2,4-Д ($0,88 \pm 0,14$ мг-экв. рутина/г сухого веса) и 0,25 мг/л ТДЗ и 2 мг/л ИМК ($0,18 \pm 0,07$ мг-экв. рутина/г сухого веса).

В результате анализа суммарного содержания фенольных соединений исследуемых каллусных культур (рис. 9) было установлено наличие значимых различий (ANOVA, $F = 225,10$; $p \leq 0,001$). Наибольшее суммарное содержание фенольных соединений наблюдалось в каллусных культурах *S. marina*, полученных на средах МС с добавлением 0,25 мг/л ТДЗ и 1 мг/л 2,4-Д ($1,24 \pm 0,04$ мг-экв. ГК/г сухого веса), а также 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК ($1,21 \pm 0,04$ мг-экв. ГК/г сухого веса). Наименьшее содержание фенольных соединений установлено в каллусах, культивируемых на питательной среде с добавлением 0,25 мг/л ТДЗ и 2 мг/л ИМК ($0,46 \pm 0,04$ мг-экв. ГК/г сухого веса).

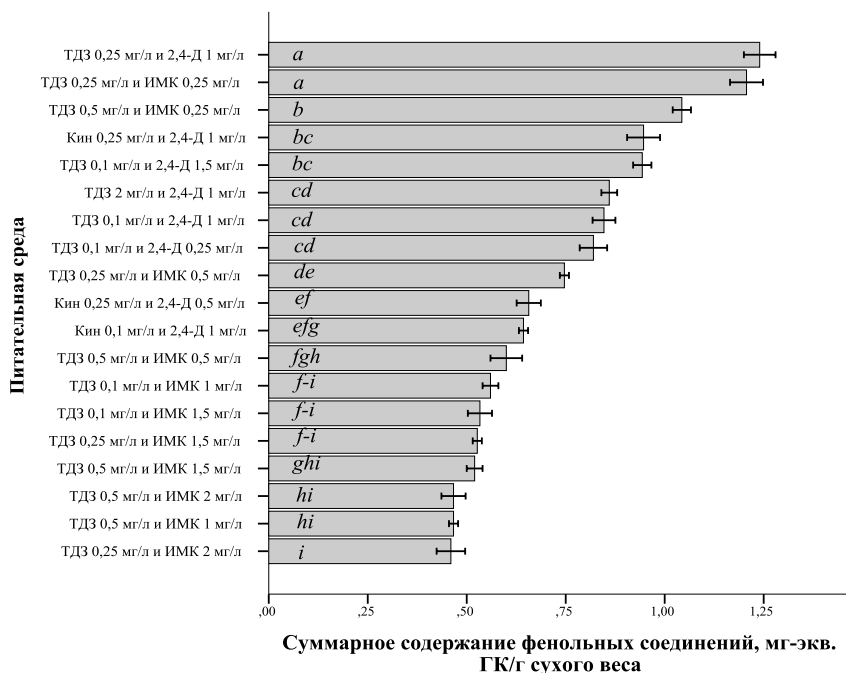


Рис. 9. Суммарное содержание фенольных соединений в каллусных культурах *S. marina*. Разными буквами обозначены значимо различающиеся данные (ANOVA, тест Шеффе, $p \leq 0,05$)



Были выявлены значимые различия (ANOVA, $F=6,52$; $p \leq 0,001$) в суммарном содержании гидроксикоричных кислот в исследуемых образцах каллусных культур (рис. 10). Наибольшее содержание гидроксикоричных кислот наблюдается в каллусных культурах, культивируемых на питательной среде MS с добавлением регуляторов роста 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК ($0,73 \pm 0,16$ мг-экв. РК/г сухого веса), а также 0,25 мг/л ТДЗ и 1 мг/л 2,4-Д ($0,70 \pm 0,02$ мг-экв. РК/г сухого веса). Наименьшее содержание выявлено в каллусах, культивируемых на среде с добавлением 0,5 мг/л ТДЗ и 2 мг/л ИМК ($0,31 \pm 0,03$ мг-экв. РК/г сухого веса).

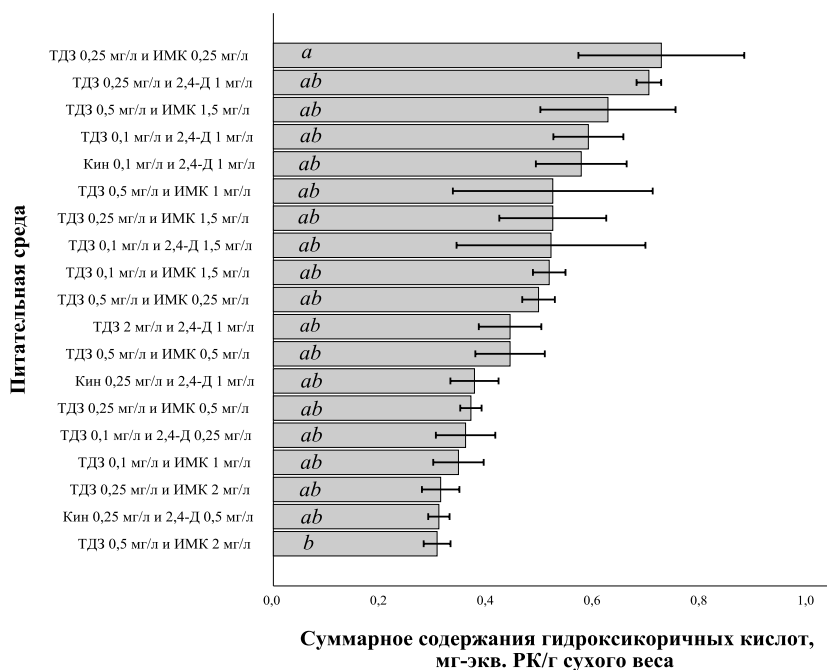


Рис. 10. Суммарное содержание гидроксикоричных кислот в каллусных культурах *S. marina*. Разными буквами обозначены значимо различающиеся данные (ANOVA, тест Шеффе, $p \leq 0,05$)

Антиоксидантную активность экстрактов *S. marina* определяли с использованием трех методов: DPPH, ABTS и FRAP. Согласно анализу DPPH, максимальная антиоксидантная активность экстрактов ($3,56 \pm 0,22$ мг-эвл. АК/г сухого веса) наблюдается в каллусных культурах, полученных на среде MS с комбинациями регуляторов роста 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК (рис. 11).

Также экстракты каллусной культуры на питательной среде MS, дополненной 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК, показали высокую антиоксидантную активность методом FRAP ($4,42 \pm 0,88$ мг-эвл. АК/г сухого образца) (рис. 12).

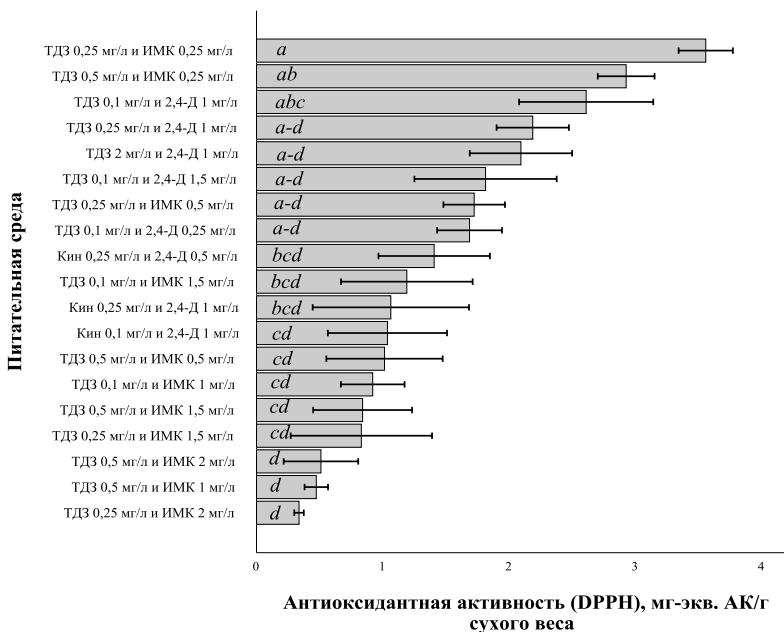


Рис. 11. Антиоксидантная активность (DPPH) экстрактов каллусных культур *S. marina*. Разными буквами обозначены значимо различающиеся данные (ANOVA, тест Шеффе, $p \leq 0,05$)

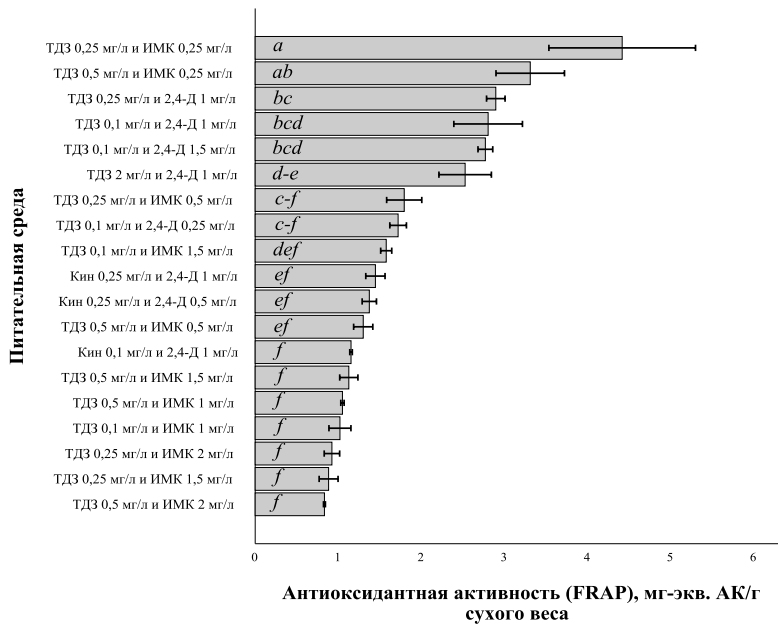


Рис. 12. Антиоксидантная активность (FRAP) экстрактов каллусных культур *S. marina*. Разными буквами обозначены значимо различающиеся данные (ANOVA, тест Шеффе, $p \leq 0,05$)



Согласно анализу с использованием метода ABTS, максимальная антиоксидантная активность наблюдалась в каллусных культурах, полученных на среде MS с регуляторами роста 0,25 мг/л ТДЗ и 1 мг/л 2,4-Д ($7,51 \pm 0,8$ мг-эвл. АК/г сухого веса) (рис. 13).

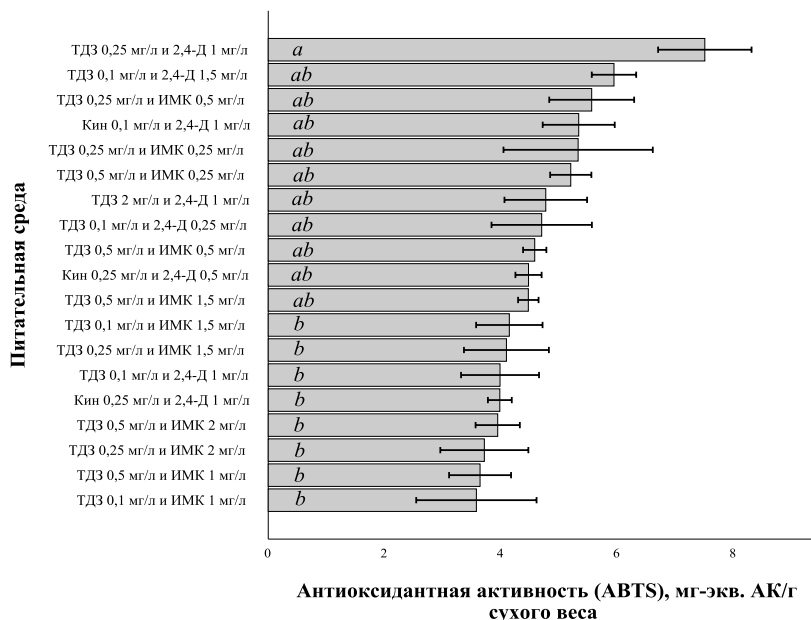


Рис. 13. Антиоксидантная активность (ABTS) экстрактов каллусных культур *S. marina*. Разными буквами обозначены значимо различающиеся данные (ANOVA, тест Шеффе, $p \leq 0,05$)

Проведенный корреляционный анализ показал наличие значимых положительных корреляций ($r > 0,45$; $p \leq 0,05$) между содержанием фенольных соединений, гидроксикоричных кислот и антиоксидантной активностью (DPPH, ABTS и FRAP) исследуемых каллусных культур (рис. 14). Высокая отрицательная корреляционная связь ($r < -0,5$; $p \leq 0,05$) выявлена между приростом сырой биомассы и содержанием фенольных соединений, гидроксикоричных кислот и антиоксидантной активностью экстрактов.

Таким образом, проведенное исследование показало, что высокое содержание биологически активных веществ выявлено в каллусных культурах *S. marina*, культивируемых на среде Мурасиге – Скуга с 7 г/л агара и 30 г/л сахарозы с добавлением следующих концентраций и сочетаний регуляторов роста: ТДЗ 0,25 мг/л и 2,4-Д 1 мг/л; ТДЗ 0,1 мг/л и 2,4-Д 1,5 мг/л; ТДЗ 0,25 мг/л и ИМК 0,25 мг/л; ТДЗ 0,5 мг/л и ИМК 0,25 мг/л; Кин 0,25 мг/л и 2,4-Д 0,5 мг/л.

Как известно, ни одна питательная среда не будет поддерживать рост всех клеток растения и изменения состава питательных сред часто необходимы для развития ответной реакции разных типов роста для одного эксплантата, в том числе и индукции каллуса [25]. В связи

с этим для подбора концентраций ауксинов и цитокининов для индукции и культивирования каллуса *S. marina* нами был проведен факториальный эксперимент. Из полученных результатов видно, что в большинстве случаев каллус пролиферировал при сочетании умеренного количества цитокининов с высоким содержанием ауксинов, что соответствует фитогормональной модели органогенеза Скуга и Миллера [29].

106

	Прирост сухой биомассы	Содержание фенольных соединений	Содержание гидрокси-коричных кислот	DPPH	FRAP	ABTS
Прирост сырой биомассы	0,657**	-0,656**	-0,528*	-0,605**	-0,639**	-0,630**
Прирост сухой биомассы	1	-0,354	-0,319	-0,231	-0,231	-0,487*
Содержание фенольных соединений		1	0,486*	0,860**	0,885**	0,722**
Содержание гидрокси-коричных кислот			1	0,508*	0,578**	0,510*
DPPH				1	0,963**	0,536*
FRAP					1	0,579**

Рис. 14. Матрица корреляций значений коэффициента Пирсона для фенольных соединений, антиоксидантной активности экстрактов и ростовых характеристик каллусных культур *S. marina*

Примечание: ** – корреляция значима на уровне 0,01; * – корреляция значима на уровне 0,05.

Мы осуществили фитохимический анализ содержания некоторых групп фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов полученных каллусных культур. В более раннем исследовании при изучении содержания фенольных соединений в различных частях нативных растений *Spergularia marina* при разных уровнях засоления почв



было показано, что наибольшее суммарное содержание фенольных соединений обнаружено в корнях растений ($5,9 \pm 0,6$ мг-экв. ГК/г сухого веса) [27]. Данное значение практически в 4 раза превосходит содержание в каллусной культуре *S. marina*, культивируемой на питательной среде с добавлением 0,25 мг/л ТДЗ и 1 мг/л 2,4-Д. В свою очередь, максимальное содержание флавоноидов было обнаружено в соцветиях нативного растения ($3,9 \pm 2,1$ мг-экв. рутина/г сухого веса), меньшее содержание флавоноидов выявлено в побегах и корнях растений [27]. Однако в данном исследовании присутствие флавоноидов было обнаружено только в двух каллусных культурах, в концентрациях от 4 до 20 раз меньших по сравнению с нативным растением *S. marina*.

В настоящем исследовании мы показали присутствие гидроксикоричных кислот в полученных каллусных культурах. Максимальное их содержание выявлено в каллусах, культивируемых на питательной среде Мурасиге – Скуга с добавлением регуляторов роста 0,25 мг/л ТДЗ и 0,25 мг/л ИМК ($0,73 \pm 0,16$ мг-экв. ХК/г сухого веса). При изучении нативных растений *S. marina* выявить присутствие гидроксикоричных кислот не удалось из-за низкого содержания – ниже порога чувствительности используемого метода [27]. Однако по результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии было показано, что различные части *S. marina* содержат флавоноиды (катехин, гесперетин, эпикатехин, производное апигенина, производное лютеолина и производное трицина), фенольные кислоты (протокатеховая кислота) и следовые количества производных гидроксикоричной кислоты (хлорогеновой, цикориевой и розмариновой кислот) [27].

В другом фитохимическом исследовании *S. marina* из различных растительных экстрактов было выделено семь соединений: из хлороформного экстракта – β -ситостеролгликозид и трицин, из этилацетатного экстракта – дигидроферуловая кислота, ванилиновая кислота, 4-гидроксибензойная кислота, урацил и 8-оксикуминовая кислота [9]. В исследованиях других авторов было показано, что в семенах, надземных частях и во всем растении *S. marina* содержится относительно большое количество фенолов, флавоноидов, дубильных веществ и сапонинов, содержание которых напрямую связано с антиоксидантной активностью [7; 14; 21]. Мы также установили высокую положительную корреляционную связь содержания фенольных соединений и гидроксикоричных кислот с антиоксидантной активностью экстрактов полученных каллусных культур *S. marina*.

Заключение

В ходе исследований были подобраны регуляторы роста и их концентрации для индукции образования каллуса на экспланты *S. marina*. Подбор проходил в два этапа. На первом этапе осуществлялся подбор регуляторов роста для индукции каллуса, в результате которого были отобраны комбинации регуляторов роста: 2,4-Д и Кин; ИМК и ТДЗ; НУК и ТДЗ; 2,4-Д и ТДЗ. На втором этапе для каждой комбинации регуляторов роста было протестировано 36 вариантов питательных сред,



в которые вносились комбинации регуляторов роста в заданных концентрациях: 0 мг/л; 0,1 мг/л; 0,25 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л; 2 мг/л. Таким образом было отобрано 19 питательных сред, содержащих в качестве регуляторов роста ауксины (2,4-Д и ИМК) и цитокинины (Кин и ТДЗ) в концентрациях, позволяющих индуцировать каллусогенез на эксплантах *S. marina*.

Была дана оценка прироста сырой и сухой биомассы каллусов *S. marina*, проведен фитохимический анализ суммарного содержания фенольных соединений, флавоноидов, гидроксикоричных кислот и оценена антиоксидантная активность экстрактов. Исследование показало наличие прямой связи между содержанием фенольных соединений и гидроксикоричных кислот с антиоксидантной активностью. Установлено, что при увеличении сырой биомассы каллусных культур происходит уменьшение накопления фенольных соединений и гидроксикоричных кислот, также уменьшается антиоксидантная активность экстрактов *S. marina*.

Таким образом, для получения каллусных культур *S. marina* с высоким содержанием биологически активных веществ можно рекомендовать использовать питательную среду Мурасиге – Скуга с 7 г/л агара и 30 г/л сахарозы с добавлением следующих концентраций и сочетаний регуляторов роста: ТДЗ 0,25 мг/л и 2,4-Д 1 мг/л; ТДЗ 0,1 мг/л и 2,4-Д 1,5 мг/л; ТДЗ 0,25 мг/л и ИМК 0,25 мг/л; ТДЗ 0,5 мг/л и ИМК 0,25 мг/л; Кин 0,25 мг/л и 2,4-Д 0,5 мг/л.

Благодарности: исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, грант № 21-74-00035, <https://rscf.ru/project/21-74-00035/>.

Список литературы

1. Губарева И. Ю. Торичник морской // Красная книга Калининградской области / под ред. В. П. Дедкова, Г. В. Гришанова. Калининград, 2010. С. 141.
2. Ивацук О. А., Батлуцкая И., Маслова Е. и др. Подходы к сохранению биоразнообразия редких и находящихся под угрозой исчезновения лекарственных растений на основе микроклонального размножения с оптимизацией параметров методами моделирования нейронных сетей // Научно-исследовательский журнал фармацевтических биологических и химических наук. 2018. Т. 9, №5. С. 2347–2356.
3. Ларцева Л. О., Пунгин А. В. Подбор концентраций и регуляторов роста цитокининового ряда для мультипликации *Spergularia marina* (L.) Griseb. в условиях *in vitro* // ХимБиоSeasons 2022 : сб. тез. докл. Форума молодых исследователей. Кемерово, 2022. С. 27.
4. Ларцева Л. О., Пунгин А. В. Подбор оптимальных питательных сред для роста *Spergularia marina* (L.) Griseb. в условиях *in vitro* // ХимБиоSeasons : сб. тез. докл. Форума молодых исследователей, посвященного 125-летию со дня рождения лауреата Нобелевской премии академика Н. Н. Семенова. Калининград, 2021. С. 55–56.
5. Belokurova V. B. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation // Cytology and genetics. 2010. Vol. 44, №3. P. 174–185.



6. Chang H., Kim M., Kim M. et al. Quality characteristics and antioxidant activities of noodles added with *Spergularia marina* L. Griseb. powder // Journal of the East Asian Society of Dietary Life. 2017. Vol. 27, №1. P. 50–60.

7. Cho J. Y., Kim M. S., Lee Y. G. et al. A phenyl lipid alkaloid and flavone C-diglucosides from *Spergularia marina* // Food science and biotechnology. 2016. Vol. 25, №1. P. 63–69.

8. Cragg G. M., Newman D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2013. Vol. 1830, №6. P. 3670–3695.

9. El-Dien O. G., Shawky E., Aly A. H. et al. Phytochemical and Biological Investigation of *Spergularia marina* (L.) Griseb. growing in Egypt // Natural Product Sciences. 2014. Vol. 20, №3. P. 152–159.

10. Feduraev P., Skrypnik L., Nebreeva S. et al. Variability of phenolic compound accumulation and antioxidant activity in wild plants of some *Rumex* species (Polygonaceae) // Antioxidants. 2022. Vol. 11, №2. P. 311.

11. Flowers T. J., Colmer T. D. Salinity tolerance in halophytes // New Phytologist. 2008. P. 945–963.

12. GBIF. *Spergularia marina* (L.) Griseb. in GBIF Secretariat // GBIF Backbone Taxonomy : Checklist Dataset. Copenhagen, 2021. URL: <https://www.gbif.org/species/3085658> (дата обращения: 15.04.2023).

13. Ingeløeg T., Andersson R., Tjernberg M. (eds.). Red Data Book of the Baltic Region. Part 1 : Lists of Threatened Vascular Plants and Vertebrates. Uppsala ; Riga, 1993. P. 96.

14. Jakimiuk K., Wink M., Tomczyk M. Flavonoids of the Caryophyllaceae // Phytochemistry Reviews. 2022. Vol. 21, №1. P. 179–218.

15. Karadeniz F., Kim J. A., Ahn B. N. et al. Anti-adipogenic and Pro-osteoblastogenic Activities of *Spergularia marina* Extract // Preventive nutrition and food science. 2014. Vol. 19, №3. P. 187–193.

16. Ksouri R., Megdiche W., Falleh H. et al. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes // Comptes Rendus Biologies. 2008. Vol. 331, №11. P. 865–873.

17. Lee J., Kim M., Kim S. et al. Changes in antioxidant and cancer cell growth inhibitory activities of *Spergularia marina* Griseb. extract according to different cooking methods // Korean Journal of Food and Cookery Science. 2017. Vol. 33, №6. P. 673–681.

18. Lee J. J., Jung H. O. Changes in physicochemical properties of *Spergularia marina* Griseb. by blanching // Korean Journal of Food Preservation. 2012. Vol. 19, №6. P. 866–872.

19. Lokhande V. H., Suprasanna P. Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance // Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. N.Y. 2012. P. 29–56.

20. Miri A., Ghalehnoo Z. R., Shaharaki E. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Spergularia marina* (L.) Griseb. extract // Journal of Fundamental and Applied Sciences. 2016. Vol. 8, №2. P. 501–517.

21. Miri A., Shahraki E., Tabrizian K., Oudi S. Anti-nociceptive and antiinflammatory effects of the hydroalcoholic extract of the *Spergularia marina* (L.) Griseb. in male mice // Fen. Bilimleri. Dergisi. (CFD). 2015. Vol. 36, №3. P. 501–517.

22. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // Physiologia plantarum. 1962. Vol. 15, №3. P. 473–497.



23. Park Y. H., Lee J. J., Son H. K. et al. Antiobesity effects of extract from *Spergularia marina* Griseb. in adipocytes and high-fat diet-induced obese rats // *Nutrients*. 2020. Vol. 12, №2. P. 336.
24. Pathak M. R., Abido M. S. The role of biotechnology in the conservation of biodiversity // *Journal of Experimental Biology*. 2014. Vol. 2. P. 352–363.
25. Phillips G. C., Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2019. Vol. 55. P. 242–257.
26. Pliszko A. A new record of *Spergularia marina* (Caryophyllaceae) from southern Poland // *Acta Musei Silesiae, Scientiae Naturales*. 2017. Vol. 66, №1. P. 49–51.
27. Pungin A., Lartseva L., Loskutnikova V. et al. The Content of Certain Groups of Phenolic Compounds and the Biological Activity of Extracts of Various Halophyte Parts of *Spergularia marina* (L.) Griseb. and *Glaux maritima* L. at Different Levels of Soil Salinization // *Plants*. 2022. Vol. 11, №13. S. 1738.
28. Sembiring E. N., Elya B., Sauriasari R. Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb // *Pharmacognosy Journal*. 2018. Vol. 10, №1. P. 123–127.
29. Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro // *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1957. Vol. 11. P. 118–130.
30. Skrypnik L., Feduraev P., Golovin A. et al. Biotechnological Potential of Different Organs of Mistletoe (*Viscum album* L.) collected from Various Host Tree Species in an Urban Area // *Plants*. 2022. Vol. 11, №20. P. 2686.
31. Štefan M. B., Vuković Rodríguez J., Blažeković B. et al. Total hydroxycinnamic acids assay: Prevalidation and application on Lamiaceae species // *Food Analytical Methods*. 2014. Vol. 7. P. 326–336.

Об авторах

Пунгин Артём Викторович — канд. геогр. наук, доц. Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: APungin@kantiana.ru

<https://orcid.org/0000-0001-8374-3907>

Ларцева Лидия Олеговна — студ., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: lida.lartseva@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8727-8771>

Кулаков Максим Владимирович — студ., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: zarich36@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0005-1386-2552>

Попова Елена Александровна — асп., Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: elena_popova97@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7008-3823>



A. V. Pungin, L. O. Larceva
M. V. Kulakov, E. A. Popova

CALLUS CULTURES OF SPERGULARIA MARINA (L.) GRISEB.:
OBTAINING AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received 18 December 2022

Accepted 17 January 2023

doi: 10.5922/gikbfu-2023-1-7

To cite this article: Pungin A. V., Larceva L. O., Kulakov M. V., Popova E. A., 2023, Callus cultures of *Spergularia marina* (L.) Griseb.: obtaining and phytochemical analysis, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №1. P. 89 – 112. doi: 10.5922/gikbfu-2023-1-7.

111

In recent decades, interest in halophyte plants has increased due to their high content of biologically active substances with powerful antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor properties and promising for the prevention of various diseases. Several species of halophytes grow on the territory of the Kaliningrad region, among which the rare species *Spergularia marina* (L.) Griseb. is of particular interest, the biological activity and content of secondary metabolites of which have not been studied sufficiently. The purpose of this study was to obtain callus cultures, to study the content of some groups of phenolic compounds and the antioxidant activity of extracts. The study carried out the selection of growth regulators and concentrations that induce callus formation. 19 nutrient media were selected for the induction of *S. marina* callus cultures. The conducted phytochemical analysis showed a significant content of phenolic compounds and hydroxycinnamic acids, as well as a high level of antioxidant activity of extracts of callus cultures. Out of 19 callus cultures, cultures obtained on Murashige and Skoog nutrient media containing the following combinations of growth regulators are promising for obtaining target secondary metabolites: 0.25 mg/l TDZ and 1 mg/l 2,4-D; 0.1 mg/l TDZ and 1.5 mg/l 2,4-D; 0.25 mg/l TDZ and 0.25 mg/l IBA; 0.5 mg/l TDZ and 0.25 mg/l IBA; 0.25 mg/l KinN and 0.5 mg/l 2,4-D.

Keywords: halophytes, secondary metabolites, antioxidant activity, callus

The authors

Dr Artem V. Pungin, Associate Professor, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

E-mail: APungin@kantiana.ru

<https://orcid.org/0000-0001-8374-3907>

Lidiya O. Larceva, Student, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

E-mail: lida.lartseva@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8727-8771>

Maksim V. Kulakov, Student, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

E-mail: zarich36@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0005-1386-2552>



Elena A. Popova, PhD Student, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.
E-mail: elena_popova97@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7008-3823>