



Дослідження вмісту індольних алкалоїдів у клітинній біомасі культури тканин раувольфії зміїної (*Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz)

О. А. Беда^{1,A,C,D}, І. І. Конвалюк^{2,B,E}, Л. П. Можилевська^{2,A,B,C}, С. С. Лукашов^{2,C,D,E}, В. А. Кунах^{2,A-F}, С. М. Ярмолюк^{2,A-F}

¹Науково-сервісна фірма «Отава», м. Київ, Україна, ²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Серцево-судинні захворювання – одні з найпоширеніших серед хвороб людини. Цим зумовлена актуальність виробництва кардіологічних, зокрема антиаритмічних препаратів природного походження. Раувольфія зміїна (*Rauwolfia serpentina* Benth.) – тропічна чагарникова рослина, накопичує індольні алкалоїди, як-от аймалін і його похідні, що є найефективнішими засобами для лікування шлуночкових аритмій серця з мінімальними побічними діями.

Мета роботи – дослідження якісного та кількісного вмісту індольних алкалоїдів у клітинній біомасі культури тканин *Rauwolfia serpentina*, тривало вирощуваній *in vitro*.

Матеріали та методи. Об'єкт досліджень – клітинна біомаса штаму K-27 *R. serpentina*, який отримали методами тривалої клітинної селекції *in vitro*. Для визначення вмісту алкалоїдів використовували високоефективний рідинний хроматограф із мас-спектрометричною детекцією TSQ Vantage.

Результати. Встановили, що у клітинній біомасі штаму K-27 раувольфії зміїної накопичується 20 індольних алкалоїдів. З-поміж них найбільший уміст аймаліну та його похідних – 0,690 % від сухої маси, дещо нижчий – йохімбіну (0,020 %) та резерпіну (0,009 %).

Висновки. У клітинній біомасі штаму K-27 *R. serpentina* сумарний уміст індольних алкалоїдів вищий порівняно з природною сировиною та стабільний протягом понад 30 років вирощування. Сумарний вміст алкалоїдів у перерахунку на суху біомасу культивованих клітин становив 2,8 %, вміст аймаліну та аймаліноподібних алкалоїдів – 1,6 % від сухої маси, а для природної сировини (корені 5–7-річних рослин), за даними фахової літератури, – 0,8–1,3 %.

Ключові слова: *Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz, культура тканин рослин, індольні алкалоїди, аймалін, резерпін, йохімбін.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2021. Т. 14, № 1(35). С. 73–78

Determination of content of indole alkaloids in cell biomass of *Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz tissue culture

O. A. Bieda, I. I. Konvaliuk, L. P. Mozhylevska, S. S. Lukashov, V. A. Kunakh, S. M. Yarmoluk

Cardiovascular diseases are the most common human diseases, hence, the production of cardiological (in particular, anti-arrhythmic) medications from the natural sources is an ever-actual task. *Rauwolfia serpentina* Benth. is a tropical fruticose plant that is able to produce and concentrate indole alkaloids, especially ajmaline and its derivatives, which are the most effective medications against ventricular arrhythmia with low side effects.

Aim of the study. Determination of the qualitative and quantitative content of indole alkaloids in cell biomass of *Rauwolfia serpentina* tissue culture, obtained by the prolonged *in vitro* growth.

Materials and methods. Object: cell biomass of *Rauwolfia serpentina* tissue culture (K-27 strain), obtained by methods of long-term cell selection *in vitro*. Alkaloids content determination: TSQ Vantage LC-MS (ThermoFischer Scientific).

Results. 20 indole alkaloids are found in cell biomass of *Rauwolfia serpentina* tissue culture (K-27 strain). The highest content is registered for ajmaline and its derivatives (0.690 % mass. for ajmaline). The contents of reserpine and yohimbine were found to be as low as 0.009 % and 0.020 %, respectively.

Conclusions. It is established that the content of indole alkaloids is higher in K-27 strain in comparison to natural plant and is stable over more than 30 years of its growth. Total alkaloids content was found to be 2.8 % of dry cell biomass, and total ajmaline-type alkaloids

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/226810>

UDC 615.322+547.94+581.143.6:582.923.5

DOI: [10.14739/2409-2932.2021.1.226810](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226810)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2021; 14 (1), 73–78

Key words: *Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz, cell culture, tissue culture, indole alkaloids, ajmaline, reserpine, yohimbine.

*E-mail: konvalyuk.i.i@gmail.com

Received: 01.10.2020 // Revised: 29.10.2020 // Accepted: 09.11.2020

content (including ajmaline) was found to be 1.6 % of dry cell biomass. In contrast, the total alkaloid contents in the natural plant material is reported to be in the range of 0.8–1.3 %.

Key words: *Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz, cell culture, tissue culture, indole alkaloids, ajmaline, reserpine, yohimbine.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2021; 14 (1), 73–78

Исследование содержания индольных алкалоидов в клеточной биомассе культуры тканей раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz)

А. А. Беда, И. И. Конвалюк, Л. П. Можилевская, С. С. Лукашов, В. А. Кунах, С. Н. Ярмолук

Сердечно-сосудистые заболевания – одни из самых распространенных среди болезней человека. Это обуславливает актуальность производства кардиологических, в частности антиаритмических препаратов природного происхождения. Раувольфия змеиная (*Rauwolfia serpentina* Benth.) – тропическое кустарниковое растение, которое накапливает индольные алкалоиды, в частности аймалин и его производные, которые являются наиболее эффективными средствами для лечения желудочковых аритмий сердца с минимальными побочными действиями.

Цель работы – исследование качественного и количественного содержания индольных алкалоидов в клеточной биомассе культуры тканей *Rauwolfia serpentina* при длительном выращивании *in vitro*.

Материалы и методы. Объект исследований – клеточная биомасса штамма K-27 *R. serpentina*, полученная методами длительной клеточной селекции *in vitro*. Для определения содержания алкалоидов использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф с масс-спектрометрической детекцией TSQ Vantage.

Результаты. Установлено, что в клеточной биомассе штамма K-27 раувольфии змеиной накапливается 20 индольных алкалоидов. Среди них наибольшее содержание аймалина и его производных – 0,690 % от сухой массы, несколько ниже – йохимбина (0,020 %) и резерпина (0,009 %).

Выводы. В клеточной биомассе штамма K-27 *R. serpentina* суммарное содержание индольных алкалоидов выше по сравнению с естественным сырьем и сохраняется в течение более 30 лет выращивания. Суммарное содержание алкалоидов в пересчете на сухую биомассу культивируемых клеток составляло 2,8 %, содержание аймалина и аймалиноподобных алкалоидов – 1,6 % от сухой массы, а для природного сырья (корни 5–7-летних растений), по данным научной литературы, – 0,8–1,3 %.

Ключевые слова: *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex Kurz, культура тканей растений, индольные алкалоиды, аймалин, резерпин, йохимбин.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. 2021. Т. 14, № 1(35). С. 73–78

Серцево-судинні захворювання – одні з найпоширеніших серед хвороб людини. Цим зумовлена актуальність виробництва кардіологічних, зокрема антиаритмічних препаратів природного походження.

Тропічну рослину раувольфію зміїну (*Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz) протягом століть використовували в аюрведичній медицині під назвою *sarpagandha*, а в 1930–1950-х роках вона почала привертати увагу доказової медицини завдяки відкриттю індольних алкалоїдів аймаліну та резерпіну. Сировина для отримання цих алкалоїдів – корені рослини, в яких накопичується понад 50 різних алкалоїдів, що мають гіпотензивну, антиаритмічну, психотропну дію [1–4]. Найважливіші з них: аймалін, який має антиаритмічний ефект, аймаліцин і резерпін, здатні знижувати тиск крові та мають седативну дію [5,6], йохімбін, що застосовується для посилення потенції та нарощування м'язової маси [7]. Відомо, що індольні алкалоїди раувольфії зміїної також характеризуються антимікробними, протигрибковими, протизапальними, антипроліферативними, антидіуретичними, антихолінергічними й антимутагенними властивостями [8,9].

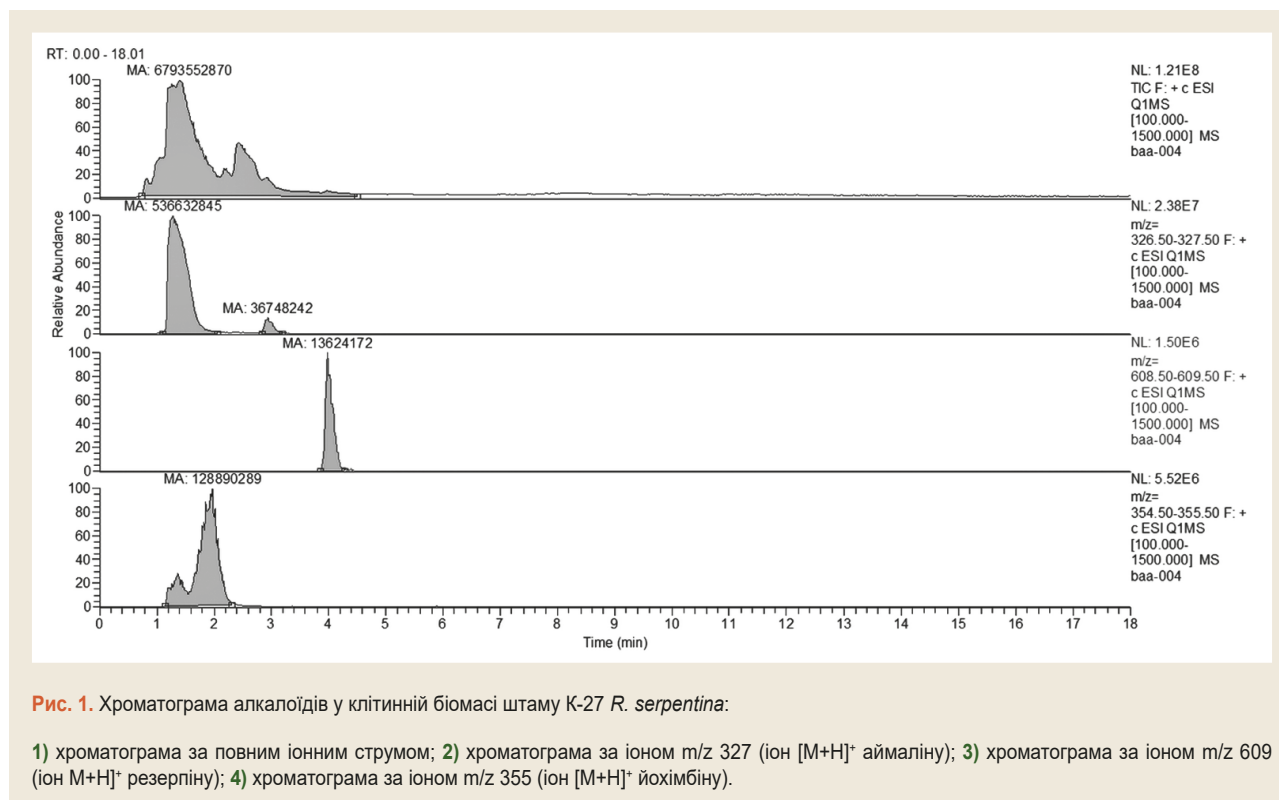
Актуальним є розроблення новітніх технологій отримання дефіцитної екологічно чистої рослинної біомаси, що містить біологічно активні сполуки, оскільки рослина сировина для виробництва лікарських препаратів і біологічно активних добавок рідкісна та дорогавартісна.

Перспективним джерелом біологічно активних сполук може бути культура *in vitro* (культура клітин, тканин, органів) відповідних видів рослин [2,10]. Отримана біомаса в умовах *in vitro* є асептичною, за якістю близькою або навіть кращою за сировину, яку заготовляють у природі [11,12].

В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України у 1990-х роках В. А. Кунах і співавт. розробили альтернативний біотехнологічний метод отримання аймаліну з біомаси культури тканин раувольфії зміїної. Джерело клітинної біомаси – високопродуктивний штам K-27 культури тканин *R. serpentina*, отриманий у 1985–1987 рр. у результаті клітинної селекції у спеціальних умовах на спеціально розроблених живильних середовищах. Штам K-27 *R. serpentina* істотно відрізняється за вмістом алкалоїдів від коренів диких рослин. Упродовж 1990–2000-х років і в лабораторних, і промислових умовах вирощування він накопичував, крім аймаліну та його похідних (0,9–1,4 % у сухій біомасі, що становить 45 % від суми алкалоїдів), воміленін (0,1–0,4 %), резерпін, серпентин, аймаліцин, ресцинамін (не більше ніж 0,05 % кожен) [10,11,13].

Мета роботи

Дослідження якісного та кількісного вмісту індольних алкалоїдів у клітинній біомасі культури тканин *Rauwolfia serpentina*, тривало вирощуваній *in vitro*.



Матеріали і методи дослідження

Матеріал для дослідження – біомаса отриманою у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та культивованого понад 30 років в умовах *in vitro* високопродуктивного штаму K-27 культури тканин раувольфії зміїної [10,11]. Штам вирощували в термостатованих умовах (27–28 °C) у темряві у скляних посудинах об'ємом 250 мл, що містили 50 мл спеціального живильного агаризованого середовища [10]. Клітинну біомасу на 65–70 день росту висушували з використанням інфрачервоної сушильної шафи (виробник ТОВ «Авангард СВМ Сервіс», Україна) протягом доби за температури 55 °C і вологості 56,3 % з продувкою повітря через кожні 15 хвилин протягом 4 хвилин.

Для визначення вмісту алкалоїдів сухий матеріал екстрагували метанолом із розрахунку маса сировини (г): об'єм метанолу (мл) = 1:10 із додаванням 1 краплі водного розчину аміаку на ультразвуковій бані протягом 30 хв чотириразово, об'єднували метанольні екстракти, упарювали у вакуумі та повторно розводили до фіксованого об'єму, який відповідав 1 мл метанолу на 0,1 г вихідної сухої сировини. Препарати клітинної біомаси раувольфії досліджували, використовуючи вискоєфективний рідинний хроматограф із мас-спектрометричною детекцією TSQ Vantage (ThermoFischer Scientific, США). Хроматографування виконали на колонці з фазою C18 і градієнтним елюванням (вода : метанол, сенсibilізатор – аміачно-форміатний буфер 0,05 %).

Стандартні розчини алкалоїдів для калібрування готували з аймаліну (основи), резерпіну (основи) та йохімбіну гідрохлориду шляхом розведення точних наважок у метанолі до концентрацій 0,5–1,0 мг/мл. Хроматограми відбудовували за струмом іонів [M + H]⁺ для кожного алкалоїда та порівнювали площі хроматографічних піків із площами піків стандартів. Для алкалоїдів, відмінних від аймаліну, резерпіну та йохімбіну, оцінювальний уміст розраховували за співвідношенням площ хроматографічних піків цих алкалоїдів до піків стандартів, у припущенні однакової іонізації для структурно подібних алкалоїдів.

Результати

У результаті досліджень методом ВЕРХ встановили, що у клітинній біомасі штаму K-27 раувольфії зміїної, культивованого понад 30 років у стабільних умовах у пересадній культурі *in vitro*, накопичується 20 індольних алкалоїдів (рис. 1). У сумі алкалоїдів більшість становили алкалоїди аймалінової групи: аймалін, ацетилаймалін, ацетилнораймалін, аймаліцин, метилаймалін. Крім того, у клітинній біомасі наявні раукафрицин, рауфлоридин, йохімбін, йохімбінова кислота, ебурнамонін, перакін, грамін, резерпін, алстонін, стріктосидин, таберсонін, ацетилвміленін, ресціннамін, дезепрідин, триптамін.

Вміст алкалоїдів резерпінової групи менший порівняно з аймаліновою, становив майже 6 % від суми алкалоїдів.

Серед індольних алкалоїдів у клітинній біомасі раувольфії встановили найбільший уміст аймаліну та його

Таблиця 1. Кількісний вміст індольних алкалоїдів у клітинній біомасі штаму K-27 *R. serpentina*

Алкалоїд	(m/z)	Вміст алкалоїдів у клітинній біомасі, % від сухої маси
Аймалін та його ізомери	327	0,69
Резерпін та його ізомери	609	0,009
Йохімбін та його ізомери	355	0,020

похідних – 0,69 % від сухої маси, дещо нижчий – йохімбіну (0,020 %) та резерпіну (0,009 %) (табл. 1).

Сума аймаліну та структурно подібних алкалоїдів оціночно становила 1,6 % від сухої маси. Оцінювальне значення суми всіх алкалоїдів раувольфії зміїної – 2,8 %.

Обговорення

За різними даними, сума алкалоїдів у коренях дикорослих рослин раувольфії зміїної становить 0,8–1,3 % від сухої маси [1,8]. Корені містять здебільшого резерпін, ресцинамін, аймалін, аймаліцин, ізоаймалін, раухімбін, ізораухімбін, раувольфінін, серпентин, серпентинін, серпін, йохімбін, тебаїн, папаверин. Відомо, що вміст алкалоїдів залежить від географічного місця зростання рослин і пори року. Наприклад, зібрані у грудні у штаті Ассам (Індія) корені раувольфії зміїної мають найвищий вміст (до 2,5 %) алкалоїдів [14]. Сумарний вміст алкалоїдів клітинної біомаси штаму K-27 *R. serpentina* протягом 30 років культивування постійно становить 2,5–3,0 % [10,11].

Перші спроби отримати культуру тканин раувольфії зміїної зробили ще у 1960-х роках, однак культивовані клітини накопичували низькі кількості алкалоїдів, а вміст аймаліну в сухій біомасі не перевищував 0,1 %, а в коренях інтактною рослини накопичувалося майже 0,3 % аймаліну [15]. Пізніше отримали штаб культури тканин *R. serpentina*, в якому накопичувалося до 1,10 % суми алкалоїдів і до 0,25 % алкалоїдів групи індоліну в перерахунку на суху біомасу [16].

Інші вчені отримали суспензійну культуру цього виду, в якій виявили майже 30 індольних алкалоїдів. Серед них переважав воіленін (0,2 %), який не виявили в дикорослих рослинах [17]. У суспензійній культурі накопичувалося не більше ніж 0,07 % аймаліну [18]. Отримали трансгенну культуру коренів *R. serpentina*, в яких виявили нові алкалоїди, неідентифіковані в дикорослих рослин. Вміст аймаліну в біомасі коренів становив 0,3–0,6 % [19].

Показано, що у трансформованій культурі коренів раувольфії зміїної відносний вміст резерпіну коливався від дуже низького (0,0064 %) до порівняно високого (0,0858 %). Відзначимо, що максимальне значення вмісту резерпіну в культурі у 2–3 рази перевищувало цей показник у коренях рослин раувольфії, вирощених у польових умовах протягом 18–24 місяців [20].

Отже, проаналізований штаб K-27 культури тканин *R. serpentina* є найпродуктивнішим з усіх відомих культур тканин і клітин раувольфії зміїної. Він стабільно, протягом понад 30 років вирощування й у промислових,

і лабораторних умовах накопичує понад 2 % індольних алкалоїдів у сухій біомасі, основна частина з них – аймалін і його похідні.

Висновки

1. Результати дослідження свідчать, що у клітинній біомасі штаму K-27 *R. serpentina* сумарний вміст індольних алкалоїдів протягом майже 30 років його культивування стабільний і є більшим порівняно з природною сировиною – коренями тропічних рослин раувольфії зміїної. Сумарний вміст алкалоїдів у перерахунку на суху біомасу культивованих клітин становив 2,8 %, вміст аймаліну та аймаліноподібних алкалоїдів – 1,6 % від сухої маси, а для природної сировини (корені 5–7-річних рослин) – 0,8–1,3 %.

2. Це дає підстави стверджувати перспективність використання індольних алкалоїдів, що отримані з клітинної біомаси високопродуктивної культури тканин штаму K-27 раувольфії зміїної, для створення нових лікарських засобів і біологічно активних добавок для лікування та профілактики захворювань серцево-судинної системи. Так, клітинна біомаса культури тканин раувольфії зміїної стала основою для розроблення нових дієтичних добавок снодійно-седативної дії «Сонормін» і стимулятора статевої активності чоловіків «Простатонормін» ТМ «Добрадія» (відповідні публікації готуються).

Перспективи подальших досліджень передбачають дослідження вмісту та спектра індольних алкалоїдів, що накопичуються у клітинній біомасі *R. serpentina*, вирощених в різних умовах на різних живильних середовищах. Це дасть змогу розробити біотехнології одержання біомаси з різним вмістом алкалоїдів, що відрізняються за фармакологічною дією.

Фінансування

Робота виконана в рамках НДР «Розробка клітинних технологій виробництва біологічно активних сполук рослинного походження для фармакологічної та харчової промисловості». № держреєстрації 0120U103216; «Розробка засад біотехнологічного виробництва нових гіпотензивних і протиаритмічних алкалоїдів раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth.», № держреєстрації 0120U104577.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflicts of interest.

Відомості про авторів:

Беда О. А., канд. хім. наук, зав. відділу науково-дослідних розробок, наукова установа ТОВ «Науково-сервісна фірма «ОТАВА», м. Київ, Україна.

Конвалюк І. І., канд. біол. наук, науковий співробітник відділу генетики клітинних популяцій, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

Можилевська Л. П., науковий співробітник відділу генетики клітинних популяцій, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

Лукашов С. С., канд. хім. наук, старший науковий співробітник відділу біомедичної хімії, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

Кунах В. А., д-р біол. наук, чл.-кор. НАН України, професор, зав. відділу генетики клітинних популяцій, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.
Ярмолюк С. М., д-р хім. наук, професор, зав. відділу біомедичної хімії, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

Information about authors:

Bieda O. A., PhD, Head of the R&D Department, Scientific service company "OTAVA" LLC, Kyiv, Ukraine.
Konvaliuk I. I., PhD, Researcher of the Department of Cell Population Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv.
Mozhylevska L. P., Researcher of the Department of Cell Population Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv.
Lukashov S. S., PhD, Senior Researcher of the Department of Medicinal Chemistry, Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv.
Kunakh V. A., Dr. hab., Corresponding Member of NASU, Professor, Head of the Department of Cell Population Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv.
Yarmoluk S. M., Dr. hab., Professor, Head of the Department of Medicinal Chemistry, Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv.

Сведения об авторах:

Беда А. А., канд. хім. наук, зав. відділом науково-дослідницьких розробок, НУ ОО «Науко-сервісна фірма «ОТАВА», г. Київ, Україна.
Конвалюк І. І., канд. біол. наук, научний співробітник відділу генетики клітинних популяцій, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, г. Київ.
Можилівська Л. П., научний співробітник відділу генетики клітинних популяцій, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, г. Київ.
Лукашов С. С., канд. хім. наук, старший научний співробітник відділу біомедичної хімії, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, г. Київ.
Кунах В. А., д-р біол. наук, чл.-кор. НАН України, професор, зав. відділом генетики клітинних популяцій, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, г. Київ.
Ярмолюк С. М., д-р хім. наук, професор, зав. відділом біомедичної хімії, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, г. Київ.

Список літератури

- [1] Quantitative determination of reserpine, ajmaline and ajmalicine in *Rauwolfia serpentina* by reversed-phase high-performance liquid chromatography / A. Srivastava, A. K. Tripathi, R. Pandey et al. *Journal of Chromatographic Science*. 2006. Vol. 44, Iss. 9. P. 557-560. <http://doi.org/10.1093/chromsci/44.9.557>
- [2] Poonam Agrawal S., Mishra S. Physiological, biochemical and modern biotechnological approach to improvement of *Rauwolfia serpentina*. *IOSR-Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2013. Vol. 6, Iss. 2. P. 73-78. <https://doi.org/10.9790/3008-0627378>
- [3] Lobay D. *Rauwolfia* in the Treatment of Hypertension. *Integrative Medicine*. 2015. Vol. 14, Iss. 3. P. 40-46.
- [4] Evaluating the therapeutic efficiency and drug targeting ability of alkaloids present in *Rauwolfia serpentina* / M. Singh, R. Kaur, R. Rajput, G. Mathur. *International Journal of Green Pharmacy*. 2017. Vol. 11, Iss. 3. P. 132-142. <http://dx.doi.org/10.22377/ijgp.v11i03.1116>
- [5] *Rauwolfia serpentina* L. Benth. ex Kurz.: phytochemical, pharmacological and therapeutic aspects / R. Kumaria, B. Rath, A. Rani, S. Bhatnagar. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013. Vol. 23, Iss. 2. P. 348-355.
- [6] Shamon S. D., Perez M. I. Blood pressure-lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016. Vol. 21, Iss. 12. CD007655. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD007655.pub3>
- [7] Cimolai N., Cimolai T. Yohimbine use for physical enhancement and its potential toxicity. *Journal of dietary supplements*. 2011. Vol. 8, Iss. 4. P. 346-354. <http://doi.org/10.3109/19390211.2011.615806>

- [8] Genotoxic, mutagenic and recombinogenic effects of rauwolfia alkaloids / G. von Poser, H. H. Andrade, K. V. Da-Silva et al. *Mutation research*. 1990. Vol. 232, Iss. 1. P. 37-43. [http://doi.org/10.1016/0027-5107\(90\)90107-f](http://doi.org/10.1016/0027-5107(90)90107-f)
- [9] Tarkovská D. A Fast and Reliable UHPLC–MS/MS-Based Method for Screening Selected Pharmacologically Significant Natural Plant Indole Alkaloids. *Molecules*. 2020. Vol. 25, Iss. 14. P. 3274. <https://doi.org/10.3390/molecules25143274>
- [10] Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. Монографія. Київ: Логос, 2005. 730 с.
- [11] Kunakh V. A. Twenty five years long stable biosynthesis of ajmaline by related hormone-independent *Rauwolfia serpentina* cell lines. *Euromedica-Hannover-2005 (16-17 Juni) International Congress and Exhibition* : Programm Abstracts Hannover, 2005. P. 22.
- [12] Biotechnological interventions on the genus *Rauwolfia*: recent trends and imminent prospects / E. Mukherjee, S. Gantait, S. Kundu et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 103, Iss. 18. P. 7325-7354. <http://doi.org/10.1007/s00253-019-10035-6>
- [13] Kunakh V. A. Somaclonal Variation in *Rauwolfia* / eds. Y. P. S. Bajaj. *Somaclonal Variation in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 36. Berlin ; Heidelberg: Springer, 1996. P. 315-332. http://doi.org/10.1007/978-3-642-61081-3_22
- [14] Distribution of reserpine in *Rauwolfia* species from India – HPTLC and LC-MS studies / S. Bindu, K. B. Rameshkumar, B. Kumar et al. *Industrial Crops and Products*. 2014. Vol. 62. P. 430-443. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.018>
- [15] Воллосович А. Г., Бутенко Р. Г. Культура ткани раувольфии змеиной как продуцент алкалоидов. *Культура изолированных органов, тканей и клеток растений*. Москва: Наука, 1970. С. 253-257.
- [16] Штаммы культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth и их продуктивность / Н. Е. Воллосович, А. Г. Воллосович, Т. А. Ковалева, Р. Г. Бутенко. *Растительные ресурсы*. 1976. Т. 12, № 4. С. 578-583.
- [17] Stöckigt J., Pfitzner A., Firl J. Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Plant cell reports*. 1981. Vol. 1, Iss. 1. P. 36-39. <https://doi.org/10.1007/BF00267656>
- [18] Yamamoto O., Yamada Y. Production of reserpine, its optimization in cultured *Rauwolfia serpentina* Benth. cells. *Plant cell reports*. 1986. Vol. 5, Iss. 1. P. 50-53. <http://doi.org/10.1007/BF00269717>
- [19] Шелудько Ю. В. Отримання та фітохімічний аналіз трансгенної кореневої культури *Rauwolfia serpentina* як джерела нових індольних алкалоїдів : автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.20 / Інститут клітинної біології і генетичної інженерії. Київ, 2004. 21 с.
- [20] Agrobacterium rhizogenes-mediated transformed roots of *Rauwolfia serpentina* for reserpine biosynthesis / M. K. Goel, S. Goel, S. Banerjee et al. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 2010. Vol. 4. P. 8-14.

References

- [1] Srivastava, A., Tripathi, A. K., Pandey, R., Verma, R. K., Gupta M. M. (2006). Quantitative determination of reserpine, ajmaline and ajmalicine in *Rauwolfia serpentina* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 44(9), 557-560. <http://doi.org/10.1093/chromsci/44.9.557>
- [2] Poonam, Agrawal S., Mishra, S. (2013). Physiological, biochemical and modern biotechnological approach to improvement of *Rauwolfia serpentina*. *IOSR-Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 6(2), 73-78. <https://doi.org/10.9790/3008-0627378>
- [3] Lobay D. (2015). *Rauwolfia* in the Treatment of Hypertension. *Integrative medicine*, 14(3), 40-46.
- [4] Singh, M., Kaur, R., Rajput, R., & Mathur, G. (2017). Evaluating the therapeutic efficiency and drug targeting ability of alkaloids present in *Rauwolfia serpentina*. *International Journal of Green Pharmacy*, 11(3), 132-142. <http://dx.doi.org/10.22377/ijgp.v11i03.1116>
- [5] Kumaria, R., Rath, B., Rani, A., & Bhatnagar, S. (2013). *Rauwolfia serpentina* L. Benth. ex Kurz.: phytochemical, pharmacological and therapeutic aspects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23(2), 348-355.
- [6] Shamon, S. D., & Perez, M. I. (2016). Blood pressure-lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. *The Cochrane database of systematic reviews*, 12(12), CD007655. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007655.pub3>
- [7] Cimolai, N., & Cimolai, T. (2011). Yohimbine use for physical enhancement and its potential toxicity. *Journal of dietary supplements*, 8(4), 346-354. <https://doi.org/10.3109/19390211.2011.615806>

- [8] Von Poser, G., Andrade, H. H., da Silva, K. V., Henriques, A. T., & Henriques, J. A. (1990). Genotoxic, mutagenic and recombinogenic effects of rauwolfia alkaloids. *Mutation research*, 232(1), 37-43. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(90\)90107-f](https://doi.org/10.1016/0027-5107(90)90107-f)
- [9] Tarkowská D. (2020). A Fast and Reliable UHPLC-MS/MS-Based Method for Screening Selected Pharmacologically Significant Natural Plant Indole Alkaloids. *Molecules*, 25(14), 3274. <https://doi.org/10.3390/molecules25143274>
- [10] Kunakh, V. A. (2005). *Biotehnolohiia likarskykh roslyn. Henetychni ta fiziolohichno-biokhimichni osnovy* [Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis]. Kyiv: Logos. [in Ukrainian].
- [11] Kunakh, V. A. (2005). Twenty five years long stable biosynthesis of ajmaline by related hormone-independed *Rauwolfia serpentina* cell lines. *Euromedica-Hannover-2005 (16-17 Juni) International Congress and Exhibition*. Programm Abstracts. Hannover.
- [12] Mukherjee, E., Gantait, S., Kundu, S., Sarkar, S., & Bhattacharyya, S. (2019). Biotechnological interventions on the genus *Rauwolfia*: recent trends and imminent prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(18), 7325-7354. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10035-6>
- [13] Kunakh, V. A. (1996). Somaclonal Variation in *Rauwolfia*. In Y. P. S. Bajaj (eds.). *Somaclonal Variation in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. (Vol. 36, pp. 315-332). Springer. http://doi.org/10.1007/978-3-642-61081-3_22
- [14] Bindu, S., Rameshkumar, K. B., Kumar, B., Singh, A., & Anilkumar, C. (2014). Distribution of reserpine in rauwolfia species from India – HPTLC and LC-MS studies. *Industrial Crops and Products*, 62, 430-436. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.018>
- [15] Vollosovich, A. G., & Butenko, R. G. (1970). Kul'tura tkani rauvol'fii zmeinoy kak produktsent alkaloidov [Tissue culture of *Rauwolfia serpentina* as a alkaloids producer]. In *Culture of isolated organs, tissues and cells of plants*. Moscow: Nauka. [in Russian].
- [16] Vollosovich, N. E., Vollosovich, A. G., Kovaleva, T. A., & Butenko, R. G. (1976). Shtammy kul'tury tkaney *Rauwolfia serpentina* Benth i ikh produktivnost' [Tissue culture strains of *Rauwolfia serpentina* Benth. and their productivity]. *Rastitel'nyye resursy*, 12(4), 578-583. [in Russian].
- [17] Stöckigt, J., Pfitzner, A., & Firl, J. (1981). Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* benth. *Plant cell reports*, 1(1), 36-39. <https://doi.org/10.1007/BF00267656>
- [18] Yamamoto, O., & Yamada, Y. (1986). Production of reserpine and its optimization in cultured *Rauwolfia serpentina* Benth. cells. *Plant cell reports*, 5(1), 50-53. <https://doi.org/10.1007/BF00269717>
- [19] Sheludko, Yu. V. (2004). *Otrymanniia ta fitokhimichniy analiz transhennoi korenevoi kultury Rauwolfia serpentina yak dzherela novykh indolnykh alkaloidiv* [Obtaining and phytochemical analysis of transgenic root culture of *Rauwolfia serpentina* as a source of new indole alkaloids] (Abstract PhD thesis). Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine. [in Ukrainian].
- [20] Goel, M., Goel, S., Banerjee, S., Shanker, K., & Kukreja, A. (2010). *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformed Roots of *Rauwolfia serpentina* for Reserpine Biosynthesis. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 4, 8-14.