

УДК- 57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ И СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР МАЧКА ЖЕЛТОГО КАК ИСТОЧНИКА ГЛАУЦИНА

Р.Г. Тухбатуллина, Л.И. Мотыгуллина

*Институт фармации, Казанский государственный медицинский университет,
Казань, Российская Федерация*

Многолетнее травянистое растение мачок жёлтый (*Glaucium flavum*) является важным источником алкалоида глауцина, который используется в фармацевтике. Однако его распространение ограничивает доступность сырья для производства. Мы предлагаем использовать биотехнологии для создания каллусных и суспензионных культур мачка жёлтого, которые являются источником получения алкалоида глауцина. В настоящее время производится культивирование мачка жёлтого на плантациях в некоторых регионах страны, например, в Крыму. Однако этот метод очень затратный, требует большого количества площадей и применение ручного труда. В работе описаны этапы получения каллусных и суспензионных культур мачка желтого в качестве источника глауцина.

Ключевые слова: мачок желтый, каллусные и суспензионные культуры, технология культивирования *in vitro*, глауцин.

PRODUCTION OF CALLUS AND SUSPENSION CULTURES OF YELLOW HORN POPPY AS A SOURCE OF GLAUCIN

R.G. Tuhbatullina, L.I. Motygullina

*Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University,
Kazan, Russian Federation*

The perennial herbaceous plant yellow horn poppy (*Glaucium flavum*) is an important source of the alkaloid glaucin, which is used in pharmaceuticals. However, its distribution limits the availability of raw materials for production. We propose to use biotechnologies to create callus and suspension cultures of yellow horn poppy, which are the source of the glaucin alkaloid. Currently, the cultivation of yellow horn poppy is carried out on plantations in some regions of the country, for example, in the Crimea. However, this method is very expensive, requires a large amount of space and the use of manual labor. The work describes the stages of obtaining callus and suspension cultures of yellow horn poppy as a source of glaucin.

Keywords: yellow horn poppy, callus and suspension cultures, *in vitro* cultivation technology, glaucin.

Введение. Рынок противокашлевых лекарств постоянно расширяется, но исследования по созданию новых активных компонентов из лекарственных растений никогда не теряют своей актуальности. Одно из таких растений, положительно влияющих на лечение заболеваний дыхательных путей, — это мачок жёлтый (*Glaucium flavum*) [5,6,10]. В надземной части растения присутствуют изохинолиновые алкалоиды (до 3–4%), где преобладает глауцин (примерно 1,8–2,0%) [4,8,9]. Глауцин обладает мощным противокашлевым действием и превосходит по спектру активности кодеин. Однако, у глауцина есть ряд преимуществ перед другими противокашлевыми препаратами, включая кодеин. Глауцин не угнетает дыхательный центр, не влияет на моторику кишечника и не вызывает привыкания.

Помимо противокашлевого действия, глауцин обладает противовоспалительным, анальгетическим, гипотензивным, спазмолитическим и адrenomолитическим эффектами. Он может применяться при различных заболеваниях верхних дыхательных путей, бронхов, лёгких,

плеврите, коклюше, бронхиальной астме, туберкулёзе и раке лёгких. Эти свойства подтверждены экспериментальными и клиническими исследованиями [7].

Препараты из сырья мачка жёлтого не производятся в России, их изготавливают только за границей: «Глаувент», «Бронхоцин», «Бронхолитин» (глауцина гидробромид) из Болгарии, «Глауцина фосфат» из Македонии. Однако эти лекарства созданы на основе глауцина, который получен синтетическим и полусинтетическим путём. Биотехнологический метод получения глауцина из суспензионной культуры имеет следующие преимущества: он требует меньше места для выращивания растений, сокращает затраты на поддержание их роста и ручной труд по уходу за плантациями, а также не зависит от климатических условий. Инновационная технология предполагает превращение каллусных культур в биореакторах в суспензионные культуры мачка жёлтого, которые станут сырьём для производства глауцина. Использование растительных культур и тканей — перспективный подход для получения биологически активных веществ, включая лекарственные препараты. Преимущества биотехнологического производства глауцина включают получение экологически чистого сырья, экономическую эффективность и возможность сохранения разнообразия растительной флоры [1,2,3]. Культура клеток и тканей растений мачка жёлтого *in vitro* представляет собой инновационный метод получения глауцина с помощью биотехнологии, недостаточно описанный в научных публикациях. Основная цель исследования заключалась во введении растения мачка жёлтого в культуру *in vitro* для потенциального использования в качестве источника ценных соединений.

Методика. Для лабораторного эксперимента были использованы семена мачка жёлтого, выращенного в ботаническом саду Казанского государственного медицинского университета, на территории Республики Татарстан. Для работы был отобран эксплант – семя, разработаны среды для проращивания семян, гармонизированные питательные среды для получения каллусной и суспензионной культур, разработан способ стерилизации экспланта.

Обсуждение результатов. Для получения глауцина биотехнологическим способом, мы впервые создали технологию производства каллусной и суспензионной культур мачка жёлтого с содержанием глауцина. Каллусные культуры, используемые в биотехнологии для производства вторичных соединений, должны отличаться быстрым ростом и способностью синтезировать необходимое количество целевого продукта [11].

Для получения каллусной культуры необходимо было выбрать первоначальный эксплант. Ввиду климатических условий, использовать зеленые части растения круглый год не предоставлялось возможным. С учетом этого, были выбраны семена растения *Glaucium flavum*, выращенные на территории ботанического сада Казанского государственного медицинского университета в фазе «конец цветения, начало плодоношения».

Далее семена необходимо было простерилизовать. Для стерилизации экспланта использовался раствор антибактериального мыла в стерильной дистиллированной воде в разных пропорциях (3:30, 4:30, 3:40 и 4:40 мл). В качестве антибактериального мыла применялось мыло «Защитное», рекомендованное для мытья рук и обладающее антибактериальным эффектом. Мыло состоит из воды, лаурилсульфата натрия, хлорида натрия, кокамидопропилбетаина, глицерет-2 кокоата, триклозана, масла чайного дерева, декспантенола, глицерина, динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, лимонной кислоты, метилхлоризотиазолинона, отдушки, гексилкоричного альдегида и красителя «Бриллиантовый синий» (E113, CI42090).

Двадцать семян помещались в химический стакан, заливались водой и добавлялись капли антибактериального мыла в указанных пропорциях. Затем использовались магнитные мешалки для перемешивания в течение 10–15 минут при скорости 300 оборотов в минуту. Соотношение объёма воды и количества капель мыла было определено опытным путём.

На следующем этапе стерильный раствор выливался на металлическое сито и семена трижды промывались стерильной дистиллированной водой. Затем семена снова помещались в стерильный химический стакан, туда добавлялся 30–40 мл стерильной дистиллированной воды, и устанавливались две магнитные мешалки размером 3 × 10. Стакан ставился на магнитную мешалку с частотой вращения 300 оборотов в минуту, и перемешивание продолжалось в течение 5 минут. По истечении этого времени вода сливалась, и семена были готовы для посева на питательную среду [13].

Сначала стерильные семена были помещены на твёрдую питательную среду без гормонов, состоящую из следующих компонентов (мг/л): вода — 1000 мл, агар-агар — 6500. На четвёртый день семена начали трескаться, а на седьмой появились всходы. Зелёные ростки появились на 12–15 день, и их было 80–83 % от общего числа посаженных семян.

Далее полученные проростки продолжали выращивать на следующей питательной среде (мг/л): вода — 1000 мл, NH_4NO_3 — 825, KNO_3 — 950, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 220, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 185, KH_2PO_4 — 85, KI — 0,415, H_3BO_3 — 3,1, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 11,15, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 4,3, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,125, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,0125, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,0125, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 13,9, Na-ЭДТА (трилон Б) — 18,65, мезоинозит — 100, тиамин — 0,5, пиридоксин — 0,5, никотиновая кислота — 0,5, сахараза — 15000, агар — 6500.

Проростки выращивались при температуре 24 ± 1 °C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота). Их выращивание продолжалось до третьего-пятого настоящих листьев в течение трёх недель. Затем из полученных проростков были получены листовые экспланты, которые разрезались на мелкие кусочки и помещались в питательную среду с добавлением альфа-нафтилуксусной кислоты (НУК) и 6-бензиламинопурина (БАП).

На питательной среде с добавлением фитогормонов (НУК — 1 мг/л и БАП — 0,5 мг/л) наблюдалось интенсивное образование каллуса. Формирование каллуса начиналось на 14–18 день после посадки эксплантов (разрезанных растений) и заметно увеличивалось на 27 день.

33 листовых экспланта были размещены на 3 чашках Петри с этой средой. Каллус образовался у 21 экспланта (63,6%). Образованный каллус был разделён на мелкие части и повторно высажен на ту же среду 5 раз. В результате из 21 экспланта было получено 21 каллусов (100%).

В процессе пятинедельного субкультивирования появились новые экземпляры каллуса. Эксперименты показали, что более качественный каллус образовывался при многократном субкультивировании и увеличивал свою массу.

Каллус выращивали в темноте при температуре 24 ± 1 °C и влажности $70 \pm 5\%$ в чашках Петри диаметром 90 мм с циклом субкультивирования 5 недель. Изначально полученный каллус имел плотную оформленную тёмную коричнево-серую окраску. После субкультивирования каллусы приобрели разнообразную окраску и становились рыхлыми [14].

Для получения первичной суспензионной культуры мачка жёлтого, использовали рыхлую каллусную культуру мачка жёлтого и жидкую питательную среду того же состава, на которой была получена каллусная ткань (без добавления агар-агара).

Сравнительный анализ алкалоидного состава каллусной культуры и травы мачка жёлтого проводился методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Сорбфил-ПТСХАФ-А-УФ» совместно с сотрудниками кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета [12]. В качестве системы растворителей использовалась смесь *n*-бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:2. Разделение веществ проводилось с помощью ультрафиолетового света при длинах волн 366 и 254 нм с последующим проявлением реактивом Драгендорфа. Также применялся метод УФ-спектрофотометрии.

Экстракция образцов биомассы и травы мачка жёлтого проводилась 70% этиловым спиртом в соотношении 1:10 на кипящей водяной бане. Стандартными образцами служили изохинолиновые алкалоиды, включая берберин, сангвиритрин и глауцина гидрохлорид, полученный из травы мачка жёлтого с помощью колоночной хроматографии.

Люминесцентный анализ культуры ткани мачка выявил слабое жёлтое и яркое жёлто-зелёное свечение при длинах волн 420 и 360 нм, связанных с присутствием алкалоидов изохинолиновой природы. Этот тип свечения наблюдался на поперечных срезах разных органов мачка жёлтого. В некоторых образцах культуры ткани мачка жёлтого свечение отсутствовало при длинах волн 420 и 360 нм, что указывает на низкое содержание алкалоидов в тканях.

ТСХ-анализ показал наличие изохинолиновых алкалоидов, включая глауцин, в каллусных культурах и траве мачка жёлтого. Результаты исследования водно-спиртовых экстрактов методом ТСХ указывают на возможное присутствие протоалкалоидов, кроме глауцина, в

биомассе мачка жёлтого. Берберин, хелелитрин и сангвинарин не были обнаружены ни в биомассе, ни в траве мачка жёлтого [12].

Заключение. Таким образом нами были выращены объекты растения *Glaucium flavum* in vitro и получены каллусные и суспензионные культуры мачка жёлтого, а также проанализированы образцы полученных культур на предмет нахождения в них алкалоида глауцина.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке НИР Фонда содействия инновациям <https://www.fasie.ru/>

Библиографический список

1. Badea C., Basu SK. Impact of drought on plant proteome and metabolome. In: Proceedings of the UGC State Level Seminar on Emerging Trends in Contemporary Education: Implications for 21st Century; 2010 Apr 9; Howrah, India. p. 104–20.
2. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Plant cell cultures. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* 1968. V. 50. P. 151–158.
3. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients // *Plant Propagation by Tissue Culture*, V. 1. Springer. 2008. P. 65–113.
4. Jimenez V. M. (2001) Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones, *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(2), 196–223.
5. Murashige Y., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.
6. Peled B., Waisel Y., Carmeli S. Alkaloid content in various chemocotypes of *Glaucium flavum* from Israel // *Phytochemistry*. 1988. V. 27 (4). P. 1021–1034.
7. Scholar E. Glaucine // *The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007N3, P.1-4.
8. Yang J. L., B. Zhao, E. S. Seong, M. J. Kim, W. H. Kang et al (2010) Callus induction and high-efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Papaver nudicaule* L. an ornamental medicinal plant, *Plant Biotechnol. Rep.*, 4(4), 261–267.
9. Мотыгуллина, Л. И. *Glaucium flavum* (Papaveraceae) — компонентный состав и биологическая активность (обзор) / Л. И. Мотыгуллина, Р. Г. Тухбатуллина // *Современные проблемы естественных наук и медицины: С568 сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием (Йошкар-Ола, 17–21 мая 2021 г.)* / Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет» ; под редакцией: О. Л. Воскресенской, А. Е. Алябышевой. — ЙошкарОла : Марийский гос. ун-т, 2021. — Вып. 10. – С. 388-395.
10. Рожанец В.В. Мачок желтый (*Glaucium flavum*) // *Наркология*. 2004. №5. С. 69–72.
11. Абделаиз В.М.А., Костюкова Ю.А., Хуснетдинова Л.З. и др. Гистологический анализ каллусной культуры белены египетской (*Huoscymus muticus* L.). *Цитология*. 2019; 61(7): 571–579.
12. Куркин В.А., Куркина А.В., Трифонова П.В., Тухбатуллина Р.Г., Мотыгуллина Л.И. Сравнительное хроматографическое и спектральное исследование алкалоидного состава биомассы культуры ткани и травы мачка жёлтого. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2024;27(3):16–22. <https://doi.org/10.29296/25877313-2024-03-03>
13. Тухбатуллина Р.Г. Мотыгуллина Л.И. Патент на изобретение № 2773121. Способ получения стерильных проростков семян мачка желтого. Оpubл. 30.05.2022.
14. Тухбатуллина Р.Г., Мотыгуллина Л.И. Патент на изобретение № 2792813. Способ получения каллусной культуры мачка жёлтого (*Glaucium flavum* Grantz) в условиях in vitro. Оpubл. 24.03.2023 г.