

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет

имени К. И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела имени К.Турысова

Кафедра химической и биохимической Инженерии

Кенжалиева Ризана Курмангазыевна

Совершенствование методов культивирования *in vitro* лекарственного растения

*Catharanthus roseus L.*

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

Специальности 5В070100— «Биотехнология»

Алматы 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет

имени К. И. Сатпаева

Институт Геологии и нефтегазового дела имени К.Турысова

Кафедра Химической и Биохимической Инженерии

**ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ**

Заведующий кафедрой Химической и  
Биохимической Инженерии

Доктор PhD

Амитова А.А

“02” июнь 2022 г.



**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

«Совершенствование методов культивирования *in vitro* лекарственного  
растения *Catharanthus roseus L.*»

Специальности 5В070100— «Биотехнология»

Выполнила

Кенжалиева Р.К.

Рецензент

Научный руководитель

Кандидат химических наук

д.б.н., профессор

Рахметуллаева Р.К.

“07” июнь 2022 г

Анапияев Б.Б

“07” июнь 2022 г

Алматы 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет

имени К. И. Сатпаева

Институт Геологии и нефтегазового дела имени К.Турысова

Кафедра Химической и Биохимической Инженерии

5B070100 – «Биотехнология»

**УТВЕРЖДАЮ**

Заведующий кафедрой Химической и  
Биохимической Инженерии

Доктор PhD

Амитова А.А

“02” июнь 2022 г.



**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение дипломной работы**

Обучающемуся: Кенжалиева Ризана Курмангазыевна

Тема «Совершенствование методов культивирования *in vitro* лекарственного растения *Catharanthus roseus L.*»

Утверждена приказом Ректора Университета № 489-П/Ө от “ 24 ” декабря 2021 г

Срок сдачи законченной работы “ 02 ” июня 2022 года

Исходные данные к дипломной работе

Краткое содержание дипломной работы:

- 1) Культивирование соматических клеток лекарственного растения *Catharanthus roseus L.* в условиях *in vitro*;
- 2) Получение каллусных клеток *Catharanthus roseus L.* в условиях культивирования *in vitro*;
- 3) Изучение влияния состава питательных сред на интенсивность процессов каллусогенеза лекарственного растения *Catharanthus roseus L.* в условиях *in vitro*;

Рекомендуемая основная литература: из 27 наименований


## График

подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Литературный обзор по теме дипломной работы	Январь	Выполнено
Освоение методов культивирования соматических клеток лекарственного растения <i>Catarantus roseus</i> L. в условиях in vitro;	Февраль	Выполнено
Анализ полученных результатов и оформление дипломной работы	Апрель-Май	Выполнено

## Подписи

Консультантов и нормоконтролера на законченную дипломную работу с указанием относящихся к ним разделов диссертации

Наименования разделов	Консультанты И.О.Ф (уч.степень,звание)	Дата подписи	Подпись
Норма контролер	Анапияев Б.Б. профессор	07.06.2022	

Научный руководитель \_\_\_\_\_  Анапияев Б.Б.

Задание принял к исполнению обучающийся \_\_\_\_\_  Кенжалиева Р.К.

Дата \_\_\_\_\_ « 7 » июня 2022 г

## АННОТАЦИЯ

Данная работа посвящена разработке методов культивирования соматических клеток лекарственного растения *Catarantus roseus* L. в условиях *in vitro*; В работе приведено описание данного растения и места его произрастания. Особенность *Catharanthus roseus* L. заключается в том, что в его составе находится около 70 идиольных алкалоидов. К ним относятся такие вещества как винкрестин (VCR), винбластин (VBL) и винорелбин (VRL). В работе приведены структуры алкалоидов содержащихся в лекарственном растении *Catarantus roseus* L. и описаны их свойства. В работе приведены результаты по оптимизации условий культивирования соматических клеток *Catharanthus roseus* L. в условиях *in vitro* в модифицированных нами питательных средах Мурасиге-Скуга и Гамборга В5 с 2,4-Д и БАП. Был проведен химический анализ исходного донорного лекарственного растения *Catharanthus roseus* L. на общее содержание алкалоидов и содержание сложных эфиров с использованием ГХ-МС. Общее содержание алкалоидов составил 5,5 % тогда как у стандартных лекарственных растений содержание алкалоидов не превышает 1 %.

## АННОТАЦИЯ

Бұл жұмыс *in vitro* жағдайында *Catharanthus roseus* L. дәрілік өсімдігінің соматикалық жасушаларын өсіру әдістерін жасауға арналады; Жұмыста осы өсімдіктің сипаттамасы және оның өсу орны көрсетілген. *Catharanthus roseus* L. ерекшелігі, оның құрамында шамамен 70 индолды алкалоидтар бар. Оларға винкрестин (VCR), винбластин (VBL) және винорелбин (VRL) тәріздес заттар жатады. Жұмыста *Catharanthus roseus* L. дәрілік өсімдіктеріндегі алкалоидтардың құрылымдары келтірілген және олардың қасиеттері сипатталған. Жұмыста *in vitro* жағдайында біз өзгерткен 2,4-Д және БАП-мен Мурасиге-Скуга және Гамборг В5 қоректік орталарында *Catharanthus roseus* L. соматикалық жасушаларды өсіру жағдайларын оңтайландыру бойынша нәтижелер келтірілген. *Catharanthus roseus* L. бастапқы донорлық дәрілік өсімдікке ГХ-МС пайдалана отырып, алкалоидтардың жалпы құрамына және күрделі эфирлердің құрамына химиялық талдау жүргізілді. Алкалоидтардың жалпы мөлшері 5,5% құрады, ал стандартты дәрілік өсімдіктерде алкалоидтардың мөлшері 1%-дан аспайды.

## ANNOTATION

This work is devoted to the development methods for cultivating somatic cells of medical plant *Catharanthus roseus* L. under in vitro conditions; The paper provides a description of the plant and its habitat. The distinctive feature of *Catharanthus roseus* L. is that it contains 70 idol alkaloids. These include substances such as vincristine (VCR), vinblastine (VBL) and vinorelbine (VRL). The paper introduces the structure of alkaloids contained in the medicinal plant *Catharanthus roseus* L. and describe their properties. The paper presents the results of optimizing the conditions for cultivating *Catharanthus roseus* L. somatic cells under in vitro conditions in our modified Murashige-Skoog and Gamborg B5 culture media with 2,4-D and BAP. In order to get information on the sum of alkaloids and esters it was decided to conduct chemical analyses using GC-MS and original donor medicinal plant *Catharanthus roseus*.L. The total content of alkaloids was 5.5%, while in standard medicinal plants the content of alkaloids does not exceed 1%.

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	9
1 Основная часть .....	10
1.1 Происхождение <i>Catharanthus roseus</i> .....	10
1.1.1 Подробное описание .....	10
1.1.2 Применение.....	11
1.2 Алкалоиды <i>Catharanthus roseus</i> .L.....	12
1.3 Механизм действия в клетке .....	13
1.4 Результаты культивирования других исследователей.....	15
1.4.1 Клинические исследования .....	15
1.4.2 Результаты культивирования других ученых.....	16
1.5. Биотехнологические методы культивирования изолированных соматических клеток <i>Catharanthus roseus</i> L. ....	16
2 Экспериментальная часть .....	18
2.1 Общая характеристика каллусных клеток .....	18
2.2 Аппараты.....	18
2.3 Стерилизация.....	20
2.3.1 Заражение.....	20
2.3.2 Обеззараживания при асептических работах .....	21
2.3.3 Стерилизация экспланта .....	21
2.4 Питательная среда.....	22
3 Результаты исследований и их обсуждение .....	23
3.1 Анализы.....	30
3.1.1 ГХ-МС .....	30
3.1.2 Количественное определение алкалоидов в растении <i>Catharanthus roseus</i> .L. ....	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	33
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	34



## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одной из главных проблем современности является большая смертность людей от такой болезни онкологические заболевания. Рак – собирательный термин, охватывающий широкую группу заболеваний, которые могут поражать любые органы и системы организма человека. Для обозначения этой категории заболеваний используются также термины «злокачественные опухоли» и «новообразования». Одной из характерных особенностей рака является быстрое размножение аномальных клеток, разрастающихся за пределы своих обычных границ и способных проникать в окружающие ткани, а также мигрировать в другие органы, то есть метастазировать. Распространенные метастазы – основная причина смерти от рака. Согласно Всемирной Организации Здравоохранения в 2020 году данное заболевание унесло жизни 10 млн человек. Культивирование лекарственного растения *Catharanthus roseus* L. в условиях *in vitro* позволяет увеличить эффективность роста и количество ростков за короткий промежуток времени. Культивирование данного растения актуально тем что в нем содержится приблизительно от 50 до 70 индольных алкалоидов включая такие вещества как винкристин (VCR), винбластин (VBL) и винорелбин (VRL). Именно эти вещества обладают свойствами апоптоза раковых клеток.

Цель исследования:

Изучение факторов влияющих на процессы каллусогенеза в культуре соматических клеток катарантуса розового и белого лекарственного растения *Catharanthus roseus* L

Задачи исследования:

- Введение в культуру *in vitro* соматических клеток лекарственного растения *Catharanthus roseus* L.
- Изучение влияния генотипа *Catharanthus roseus* L. на частоту процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток *Catharanthus roseus* L.
- Изучение влияния состава питательных сред на частоту процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток *Catharanthus roseus* L. ;

## 1 Основная часть

### 1.1 Происхождение *Catharanthus roseus*

В 1759 году Линней описал род *Vinca* и выделил 4 вида, среди которых *Vinca rosea*. За неимением описания его род неправомерно опубликован. Тем временем, т. е. между 1835 г. и 10 апреля 1838 г., Г. Дон поместил барвинок розовый в свой новый род *Catharanthus*, дав ему четкое описание. Род *Catharanthus* включает 8 видов. *Catharanthus roseus* относится к семейству *Аросупасеае* и является чрезвычайно важным лекарственным растением. Растение широко распространено и натурализовано в Африке, Америке, Азии, Австралии, Южной Европе и некоторых частях островов Тихого океана [1].

Лекарственное растение семейства *Аросупасеае*, производит большое количество фитосоединений, таких как терпеноидные индольные алкалоиды, фенолы, антоцианы, жирные кислоты, стероиды, белки, ферменты и т. д., Их используют для лечения: диабета, артериального давления, астмы, запора и рака. Существует около двух распространенных сортов *C. roseus*, названных в честь их цвета цветка: «Розеа» с розовыми цветками и «Альба» с белыми цветками (Рисунок 1). Синонимы названия растения включают *Vinca rosea*, *Ammocallis rosea* и *Lochnera rosea*, другие английские названия, иногда используемые для растения, включают Cape Periwinkle, Rose Periwinkle, Rosy Periwinkle и «Old Maid» [2-4].



Рисунок 1- *Catharanthus roseus* L.

В дикой природе это растение находится под угрозой исчезновения, и основной причиной их сокращения является разрушение среды обитания подсечно-огневым сельским хозяйством. Обильное естественное свечение во многих регионах, особенно в засушливых прибрежных районах. Культивируется как декоративное растение почти во всех тропических и субтропических регионах мира. Однако климатические условия и свойства почвы в некоторых европейских странах неблагоприятны для выращивания *Catharanthus roseus* [3].

#### 1.1.1 Подробное описание

Кустарник высотой 30-100 см, прямостоячий или лежащий, обычно с белым латексом; корни до 70 см длиной. Стебли примерно круглые, зеленые или желтовато-зеленые, иногда от

слабого до сильного красного или пурпурного цвета, слабо опушенные или голые. Листья крестообразные, черешковые; черешок 0,3—1 см длиной, рыхлоопушенный или голый, с бахромой в пазухе сосочков, наружные из которых длиннее внутренних и с несколькими полосатыми волосками; пластинка довольно изменчивая по форме, эллиптическая, обратнойцевидная или узкояйцевидная, в 1,9-3 раза длиннее ширины, в 4-9 раз больше ширины. Соцветие: прицветники отсутствуют. цветоножка зеленая, 0,1-0,2 мм длиной, слабоопушенная до голой. Цветки 4-5 см длиной. Чашелистики зеленые, у основания слегка сросшиеся, иногда слегка неравные, в 2,7 раза длиннее ширины, 3-5 x 1-1,5 мм, снаружи слабоопушенные или голые, внутри голые, иногда к вершине с несколькими мелкими белыми волосками, цельнокрайние. Часто слегка зеленоватые, с длинным узкоцилиндрическим основанием и короткой широкой верхней частью, в 5—8 раз длиннее чашечки, 2—3 см длиной, в узкой части 0,1—0,2 см шириной, до 0,3 в расширенной части. Наружная часть слабоопушенная или голая, внутри в зеве на уровне пыльников с полосатым кольцом. В расширенной части бархатисто-пушистая на протяжении 1 мм на жилках от основания нитей и ниже находится его серозное кольцо шириной 1,5-2 мм, расположенное чуть ниже уровня ключицы. Узкая базальная часть голая, зев 1,5-2 мм в диаметре лопасти обычно снаружи светлее. Почти округлые, голые, раскидистые, плоские до волнистых, цельнокрайние, иногда реснитчатые. Длина вершины составляет 1 мм. Тычинки вставлены на 0,4—0,6 см ниже устья венчика. Нить белая, очень коротка. Пыльники почти на верхушке острые, у основания сердцевидные. Пестик 17-26 мм длиной; плодолистики 1,5—2 x 0,8—1 x 0,5—1 мм, в основании сросшиеся, на вершине закругленные, на вершине опушенные, к основанию голые. Диск состоит из двух желез размером 2—2,8 x 1—2 мм, которые часто длиннее яичника [5].

### 1.1.2 Применение

Пекольт в 1910 году описал использование *Catharanthus roseus* L. в Бразилии настоем листьев для остановки кровотечения и цинги, в качестве жидкости для полоскания рта при зубной боли, а также для заживления и очистки хронических ран [2].

В Индии сок листьев данного растения используется в качестве аппликации при укусах пчел и ос. Экстракт цветка использовался для промывания глаз младенцев на Кубе и Ямике. Настоем листьев лечат меноррагию и ревматизм. На Филиппинах листья использовали для лечения диабета, желудочных спазмов, а корни — при кишечных паразитах. Неочищенный экстракт листьев и корней использовали для лечения рака. На Мадагаскаре вяжущие и горькие листья использовали для предотвращения рвоты, корни использовали как слабительное, а также использовали как средство от зубной боли. Сок листьев применяют на Маврикии при диспепсии и расстройстве желудка. Растение применяли при туберкулезе, астме и метеоризме на Багамах. Жители Вест-Индии и Нигерии использовали это растение для лечения диабета. Растение использовали в Малайзии при гипертонии, диабете, бессоннице и раке. Кровотечение предотвращали прикладыванием кипяченого настоя растения. В Африке листьями растения лечат ревматизм и меноррагию. В Британской Вест-Индии растение используется для лечения диабетической язвы, а на Филиппинах - как гипогликемическое средство. В Индии листья растения традиционно использовались для лечения диабета, рака, меноррагии и болезни Ходжкина. На Тайване всего экстракт растения использовался перорально для лечения диабета. Экстракт листьев курили как эйфоризант в США [6].

## 1.2 Алкалоиды *Catharanthus roseus*.L

Катарантус розовый (*Vinca rosea*) известен как превосходный источник основных классов монотерпеноидных индольных алкалоидов [7].

Алкалоиды барвинка представляют собой встречающиеся в природе или полусинтетические азотистые основания [8].

Это растение синтезирует около 90 различных алкалоидов, в том числе фармацевтически важные соединения с цитотоксическими и гипотензивное действие. Самое раннее химическое исследование растения было проведено М. Грешоффом, который указал на наличие алкалоидных компонентов, но не смог получить однородных кристаллических соединений. Прогресс в фитохимии этого растения был сделан Коули и Беннеттом в 1928 г., когда им удалось получить два кристаллических сульфата и тартрат из общей алкалоидной фракции; однако никакие химические или физические свойства этих солей не описаны. В 1953 г. R. Paris и Moyses Migmon сообщили о неидентифицированном кристаллическом алкалоиде этого растения [9].

Алкалоиды барвинка имеют димерную химическую структуру, состоящую из двух основных многокольцевых единиц индольного ядра (катарантин) и дигидроиндольного ядра (виндолин), соединенных вместе с другими сложными системами [10].

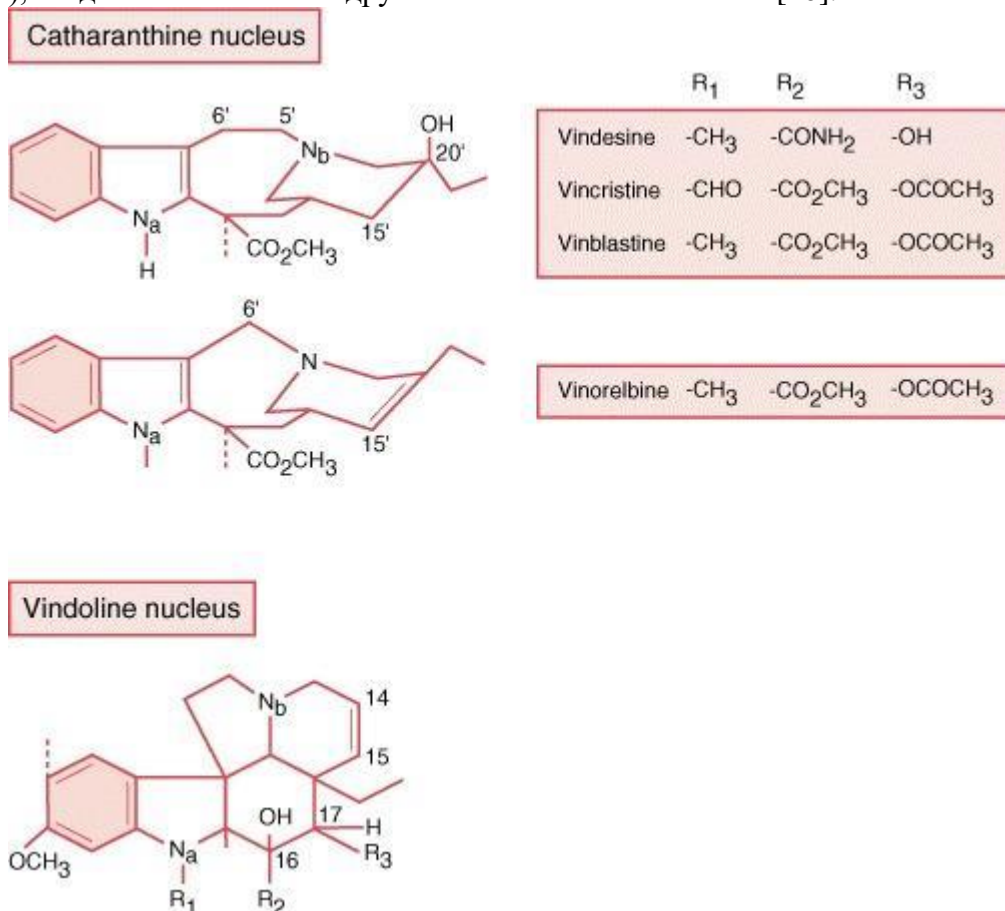


Рисунок 2-Химическая структура алкалоидов барвинка

Винкрестин и винбластин представляют собой алкалоиды барвинка, выделенные из листьев мадагаскарского барвинка *Catharanthus roseus*, ранее известного как барвинок розовый. Винкрестин и винбластин структурно сходны, за исключением того, что первый содержит метильную группу, тогда как винкрестин содержит альдегидную группу, присоединенную к атому азота центральной индольной части (Рисунок 2). Это структурное

различие приводит к значительным различиям как в противоопухолевой активности, так и в токсичности этих агентов [11].

К полусинтетическим алкалоидам относятся виндезин, винорелбин и винфлунин, которые получают химическими модификациями винкрестина и винбластина, причем два последних экстрагируются из *Catharanthus roseus*. Исходные соединения, винбластин и винкрестин, оба состояли из катарантинового фрагмента, связанного с виндолиновым кольцом. Последующее синтетически модифицированное соединение, виндезин, было получено путем изменения виндолиновой группы. В середине 1970-х новый синтетический подход позволил изменить катарантиновую группу, и, как следствие, была получена новая серия соединений, одним из которых являлся винорелбин. Производство одного килограмма винбластина стоит 1 млн долларов, тогда как для производства такого же количества винкрестина необходимо 3,5 миллиона. Эти вещества находятся в очень низких концентрациях в надземной части растения (около 0,0005% ФС), поэтому для получения 1 г винбластина требуется полтонны сухих листьев *C. roseus*, в то время как для производства 1 кг винкрестина требуется 530 кг. Кроме того, его экстракция очень сложна, так как осуществляется в присутствии 200 других соединений со сходными физико-химическими свойствами [12-13].

### 1.3 Механизм действия в клетке

Среди димерных индольных алкалоидов выделим представителей со значительной противоопухолевой активностью винбластин и винкрестин являются типичными соединениями, которые широко используются для клинического лечения рака человека, такого как карцинома яичка, острый лейкоз, рабдомиосаркома и рак молочной железы. Винбластин индуцирует апоптоз в клетках меланомы посредством митохондриальных и немитохондриальных путей, опосредованных белком Rho A. Апоптоз — строго регулируемый процесс запрограммированной гибели клеток, который может запускаться как внешними, так и внутренними путями. Внешний путь (рецептор смерти) начинается со стимуляции рецепторов смерти на клеточной мембране. Внутренний (митохондриальный) путь инициируется дисфункцией митохондрий, что приводит к высвобождению сигнальных факторов, таких как цитохром c (cyto c), в цитозоль. Пермеабиллизация митохондриальной мембраны зависит от семейства белков В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), где проапоптотические Bcl-2-ассоциированные белки X (Bax) или гомологичные Bcl-2 белки-киллеры (Bak) олигомеризуются с образованием пор на наружная митохондриальная мембрана. Эти два пути осуществляются в основном каспазами (семейство цистеиновых протеаз), причем каспазы-8 и -9 участвуют во внешнем и внутреннем пути соответственно. Кроме того, активные формы кислорода (АФК), ряд побочных продуктов метаболизма кислорода, тесно связаны с апоптозом раковых клеток, вызванным природными алкалоидами [14].

Резистентность к винкрестину возникает из-за усиленной экспрессии Р-гликопротеина, который способствует выходу алкалоидов барвинка из клетки. Множественной лекарственной резистентности (МЛУ) является основной причиной неудачи в химиотерапии рака. Многие раковые клетки приобретают устойчивость к широкому спектру структурно и механистически различных противоопухолевых препаратов в результате явления, называемого множественной лекарственной резистентностью (МЛУ). Развитие МЛУ создает серьезные проблемы для химиотерапии рака, особенно при лечении пациентов с метастатическим раком, устойчивыми к традиционной терапии МЛУ происходит по своей природе при некоторых видах рака из-за генетических и эпигенетических изменений, которые влияют на чувствительность к лекарствам без предварительного воздействия химиотерапевтических агентов. МЛУ также

может быть приобретен в ходе химиотерапевтического лечения рака, который изначально был чувствительным к лекарствам, но позже повторялся в лекарственно-устойчивой форме. Также признается, что рак обычно состоит из гетерогенной популяции чувствительных к лекарствам и лекарственно-устойчивых клеток. В ходе лечения чувствительные к лекарствам клетки избирательно удаляются, а резистентные клетки доминируют в популяции раковых клеток. Огромное влияние химиотерапевтической лекарственной устойчивости привело к обширным исследованиям механистических аспектов и стратегий понимания, модуляции или уклонения от МЛУ [15].

Микротрубочки (МТ) являются компонентами цитоскелета и играют очень важную роль во многих клеточных процессах. Они участвуют в разделении хромосом во время митоза и мейоза и являются основными составляющими митотических веретен, кроме того, они участвуют в поддержании клеточной структуры, транспорте и многих других функциях клетки. МТ синтезируются из гетеродимеров  $\alpha, \beta$ -тубулина, которые полимеризуются «конец в конец» в линейные протофиламенты. Эти структуры при динамической полимеризации и деполимеризации находятся на своих концах (Рисунок 3). Сборка и разборка полимеров МТ регулируется связыванием тубулина и гуанозин-5-трифосфата. Любое вмешательство в эту динамику МТ может спровоцировать остановку клеточного цикла и привести к запрограммированной гибели клеток или апоптозу. Динамика МТ и, следовательно, клеточное деление также могут нарушаться небольшими молекулами, которые обычно делят на две группы: (i) МТ-стабилизирующие агенты, препятствующие последующей деполимеризации; и (ii) МТ-деполимеризующие агенты, ингибирующие их образование. Алкалоиды барвинка попадают во вторую группу, поскольку они останавливают опухолевые клетки во время митоза, связываясь на поверхности между двумя гетеродимерами тубулина рядом с заменяемым сайтом связывания гуанозин-5-трифосфата и деполимеризуя МТ. Это приводит к остановке клеточного цикла в митозе. В высоких концентрациях алкалоиды барвинка приводят к образованию крупных полимеров тубулина, в результате чего опухолевые клетки останавливаются в митозе и немедленно погибают. Однако, когда уровни алкалоидов барвинка низкие, клетки останавливаются в митозе и клетки погибают после длительного времени инкубации. Поскольку связывание природных алкалоидов барвинка, винбластин и винкристин, а также их полусинтетических аналогов, винорелбин и винфлунин связаны с самоассоциацией тубулина, их сродство может быть определено, и их связывание управляется энтропией, так что общее сродство уменьшается в следующем порядке: винкристин > винбластин > винорелбин > винфлунин [16].

Винфлунин — первый фторированный ингибитор микротрубочек, синтезированный из винорелбина. Винфлунин отличается от других алкалоидов барвинка тем, что это соединение слабо связывается с тубулином. Описаны три возможных эффекта винфлунина: его действие на тубулин и микротрубочки, его способность разрушать новообразованные кровеносные сосуды и его способность уменьшать метастатический процесс. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что винфлунин может оказывать не только опухолево-цитостатическое действие, но и специфическое антиангиогенное действие. Клинически винфлунин рассматривается в связи с его потенциальной ролью в лечении карциномы молочной железы и немелкоклеточного рака легкого, среди прочих.

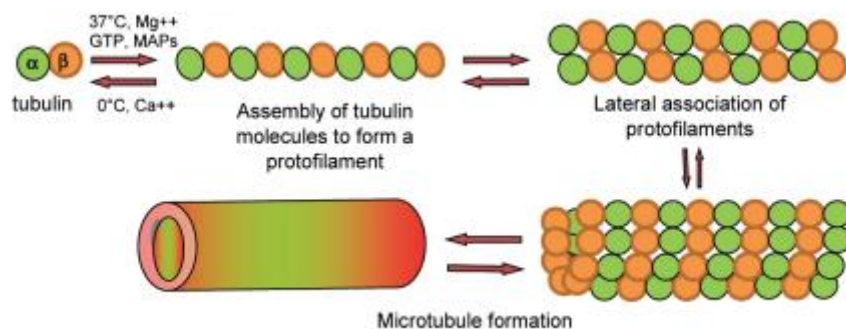


Рисунок 3- Сборка и разборка полимеров МТ

Метаболизм лекарств или ксенобиотиков представляет собой ферментативный процесс, посредством которого липофильные химические соединения превращаются в гидрофильные побочные продукты, так что они легко выводятся из организма. Скорость метаболизма определяет продолжительность и интенсивность фармакологического действия препаратов. Эти реакции также необходимы для детоксикации ядовитых соединений [17].

Винкристин быстро распределяется по всему организму и связывается с белками плазмы после внутривенного введения. административная. Его модель выведения является трехфазной, с периодом полувыведения 5 минут, 2,3 часа и 85 часов. Винкристин метаболизируется главным образом в печени с участием цитохрома СYP450-3A, при этом 50% введенной дозы выводится с желчью в виде метаболитов. Приблизительно 80% введенной дозы выводится с калом, а остальная часть выводится с мочой. До 33% введенной дозы выводится с калом в течение 24 часов и 67% в течение 72 часов. Дозу следует уменьшить на 50% у пациентов с нарушением функции печени (концентрация билирубина выше 3 мг/дл) [11].

## 1.4 Результаты культивирования других исследователей

### 1.4.1 Клинические исследования

1. Подходящими пациентами были пациенты в возрасте < 21 года, которые получали винкристин в рамках стандартной химиотерапии для ряда типов рака. Для участия в исследовании пациенты должны были иметь центральный венозный катетер для облегчения сбора последовательных образцов крови для фармакокинетического анализа и скорость клубочковой фильтрации >60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Были зарегистрированы характеристики пациентов, включая возраст, пол, массу тела и площадь поверхности тела. Базовые данные о токсичности собирали до и после введения винкрестина. Винкристин вводили в виде короткой болюсной инфузии в дозах 0,02–0,05 мг/кг или 0,75–1,5 мг/м<sup>2</sup> у новорожденных и детей в возрасте до 1 года или 12 кг и в дозах 1,5 мг/м<sup>2</sup> (с дозой укупорка в дозе 2 мг) у детей старшего возраста или в рамках их стандартной схемы лечения [18].

2. В 2017 году начали использовать пероральную метрономную форму с винорелбином в дозе 40 мг три раза в неделю (понедельник, среда, пятница) непрерывно. Не было зарегистрировано каких-либо побочных эффектов 3 или 4 степени у 10 из 10 пациентов [19]. Генетика может играть важную роль в исходе, поскольку сообщалось о больших межрасовых различиях в реакции. Фактически, в клинических испытаниях была отмечена более высокая выживаемость у представителей европеоидной расы по сравнению с афроамериканцами.

## 1.4.2 Результаты культивирования других ученых

1. Поверхность листьев стерилизовали в 20% отбеливателе Слогх (30 мин) и трижды промывали в стерильной очищенной воде. Затем листья надрезали на их абаксиальных сторонах стерильным лезвием скальпеля и разрезали на кусочки по 1 см. Эксплантаты культивировали на аликвотах по 25 мл среды для регенерации MS с добавлением 1,5 мг/л ВАР, 1,5 мг/л 2,4D, 30 г/л сахарозы и полуотвержденного 0,8% (масса/объем) агара, рН 5,6. Наилучшая биомасса была получена из комбинаций 2,4D/NAA (11 г), IAA/NAA (9,5 г), ВАР/24D (6,8 г) и 2,4D/IAA (6,8 г). Эти результаты свидетельствуют о том, что добавление в среду ауксинов с более высоким содержанием, чем кинетин, увеличивает биомассу. Однако увеличение биомассы приводило к снижению биосинтеза Vb, а увеличение Vc [20].

2. Семена катарантуса были поверхностно стерилизованы 70% этиловым спиртом в течение 1 мин, затем 1% раствором гипохлорита натрия в течение 15 мин, ополаскивали 5–10 раз стерилизованной дистиллированной водой, после чего семена высушивали на воздухе на чистой фильтровальной бумаге. Семена культивировали на среде Мурасиге-Скуга (МС) с 0,65% агар-агара; рН доводили до 5,8 перед автоклавированием. После инокуляции культуры семян выдерживали в темноте в течение 3–5 дней для индукции прорастания. После прорастания семян культуры содержали при 16-часовом световом периоде и температуре 25°C. Выделенные ткани переносили на дифференциальную индукционную среду, содержащую соли и витамины Гамборга В5 (Duchefa, Нидерланды) (3,16 г/л), сахарозу (30 г/л), агар-агар (6,5 г/л). 1) и различные комбинации НУК и кинетин; рН среды доводили до 5,7. Среду автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. Культуры поддерживали в темных условиях [21].

3. Для инициации эмбрионного каллуса в среду МС добавляли 4,52 мкМ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Для пролиферации соматического зародыша в ту же среду добавляли нафталин-уксусную кислоту, НУК (5,37 мкМ) с различными концентрациями N6-бензиладенина (БАП) (2,22–8,90 мкМ). Среда для созревания и прорастания содержала оптимизированный уровень 2,60 мкМ гибберелловой кислоты (GA3) и 2,24 мкМ ВАР соответственно. Каллус был обильно иницирован в твердой среде MS с добавлением 4,52 мкМ 2,4-D, который хорошо рос в жидкой среде. Формирование и пролиферация соматических зародышей происходили в большей степени в твердой среде, чем в жидкой [1].

## 1.5. Биотехнологические методы культивирования изолированных соматических клеток *Catharanthus roseus* L.

Клональное микроразмножение – массовое бесполое размножение растений в культуре клеток и тканей [22].

Используется для получения безвирусного посадочного материала, размножения растений, трудно размножаемых традиционными способами [23].

Клональное размножение через культуру тканей, широко известное как микроразмножение, было иницировано Г. Морелем (1960), который обнаружил, что это единственный коммерчески жизнеспособный подход к размножению орхидей, с тех пор было микроразмножено несколько видов культур.

Преимущества клонального микроразмножения *Catharanthus roseus* L :

А. Производство очень большого количества клональных ростков за короткий промежуток времени.

Б. Получение безболезненного материала

В. Производство большого запаса.



Г.Возможность авиаперевозки большого количества растительного материала быстро, эффективно и относительно недорого. От 30000 до 50000 in-vitro в закрытых ёмкостях или маленьких контейнерах.

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Общая характеристика каллусных клеток

Для лучшего понятия материала сначала мы дадим понятие нескольким связанным между собой определениям.

Каллус — это особый тип ткани, представляющий собой скопления недифференцированных клеток. Любая живая растительная клетка имеет возможность развиваться в организм, из которого она была изолирована и произрастала в определенных условиях. Данное свойство называется тотипотентность.

Образование каллуса позволяет защитить место травмы при помощи регенерации утраченного органа или защитного слоя, при этом накапливая питательные вещества необходимые для роста и развития. Регуляция роста и образования каллуса *in vitro* осуществляется ауксинами и цитокининами. Фрагмент ткани или органа помещенный на подходящую питательную среду это эксплантат после начинается рост недифференцированных клеток. Данный процесс называется каллусогенез или каллусообразование. Комплекс процессов приводящие к различиям между дочерними клетками и между дочерними и материнскими клетками. В результате дифференциации клетки начинают приобретать морфологические различия и выполнять разные физиологические функции. Дедифференциация это обратный процесс при котором: клетки теряют характерные для них специфичные функции, структуру и возвращаются к состоянию делящейся клетки.

### 2.2 Аппараты

#### 1. Ламинарный бокс

Ламинарные боксы представляют собой устройства физического сдерживания, которые действуют как первичные барьеры либо для защиты материала, с которым манипулируют в боксе, от источников загрязнения, создаваемых работниками или окружающей средой, либо для защиты лабораторного работника и лабораторной среды от воздействия инфекционных или других опасных факторов. материалы, которые присутствуют внутри капота (Рисунок 4). В приложениях для культивирования клеток используются два типа вытяжных шкафов с ламинарным потоком: чистая скамья с горизонтальным потоком и бокс биологической безопасности. Горизонтальный чистый стол с ламинарным потоком используется для обеспечения почти стерильной среды для чистой (т. е. незагрязняющей) работы с неопасными материалами, такими как стерильные среды или оборудование. Поскольку схема воздушного потока направляет поток воздуха в вытяжном шкафу непосредственно обратно к оператору вытяжного шкафа и в помещение, вытяжные шкафы с горизонтальным потоком нельзя использовать с инфекционными агентами или токсичными химическими веществами.

## 2.Микроскоп

Микроскоп это устройство которое используют для получения увеличенных изображений. В данной работе применяем при отборе экспланта и их измерения.

## 3.Сушильный шкаф

Аппарат используемый для стерилизации и сушки различных материалов.

4.Газовый хроматограф Agilent 6890N с масс-селективным детектором Agilent 5973N и пламенно ионизационным детектором .

Аппарат используемый для анализа и разделения веществ в смеси .Так же позволяет идентифицировать и определить количественное содержание вещества.

## 5.Стерилизатор

Аппарат используемый для обеззараживания. Процесс стерилизации осуществляет путем нагревания до температуры при которой погибают многие микроорганизмы



Рисунок 4- Ламинарный бокс

## 2.3 Стерилизация

### 2.3.1 Стерилизации посуды и питательных сред

Стерилизация – важнейший этап и главное условие получения чистых культур микроорганизмов.

### 2.3.1 Заражение

Клеточные культуры являются биологическими объектами, которые реагируют на окружающую их среду и, следовательно, на загрязнение окружающей среды. Биологическое заражение представляет наибольшую угрозу для системы культивирования клеток, поскольку живые организмы метаболизируют и размножаются. Репликация увеличивает титр загрязнителя. Следовательно, возрастает риск распространения инфекции путем перекрестного заражения других клеточных культур. Биологическое заражение в системе культивирования клеток, по сути, *in vitro* эквивалентно возникающему заболеванию. Разница между локализованной изолированной инфекцией и лабораторной эпидемией заключается в установлении стандартизированных, надежных методов культивирования клеток и процедур контроля качества. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком работает по принципу высокоскоростной завесы из отфильтрованного чистого воздуха, блокирующего проникновение загрязняющих веществ из внешней среды и удерживающего аэрозольные загрязнения внутри бокса биобезопасности. Внешние поверхности всех материалов, поступающих в ламинарный бокс и выходящих из него, должны быть продезинфицированы в соответствии с рисками, связанными с материалом и работой. Со всеми материалами внутри шкафа следует обращаться как с рабочими поверхностями, так как они регулярно подвергаются воздействию аэрозолей, оседающих на их поверхностях всякий раз, когда жидкости переносятся пипетированием, заливкой или любым другим способом, который может привести к попаданию жидкости в виде аэрозоля внутрь колпака. Осаждение аэрозолей представляет собой серьезный риск для целостности материалов, расположенных в вытяжке, что приводит к распространению любого присутствующего загрязнения. Поэтому, чтобы снизить риск перекрестного загрязнения, количество материалов находящихся внутри бокса всегда должно быть сведено к минимуму [24].

Источники заражения:

#### 1. Питательная среда

Большинство химических загрязнений попадает в систему культивирования клеток через среду для культивирования клеток. Загрязнение исходит от сырья, используемого для изготовления базовой среды, и/или от реагентов, добавок и добавок. Все материалы, поступающие в систему культивирования клеток, должны быть наивысшей чистоты.

#### 2. Вода

Вода является растворителем и содержит растворенные ионы металлов, органические соединения, бактериальные эндотоксины и т. д. . Он становится лучшим растворителем с повышением очистки. Высокоочищенная вода выселяет ионы металлов, органические соединения, эндотоксины из стеклянной посуды, трубок и трубок. Для приготовления сред, а также для мытья и ополаскивания стеклянной посуды, используемой при приготовлении и хранении сред и добавок к средам, следует использовать стандартные процедуры с использованием свеженабранной воды высокой степени очистки.

### **2.3.2 Обеззараживания при асептических работах**

1. Стерилизация пламенем используется в качестве прямого локального средства обеззараживания при асептических работах на открытом столе. Чаще всего он используется для удаления потенциальных контаминантов из открытых отверстий флаконов со средой, культуральных колб или пробирок во время переноса, для стерилизации небольших инструментов, таких как щипцы, или для стерилизации проволочных инокуляционных петель и иглы до и после переноса. По возможности стерилизация пламенем должна быть сведена к минимуму в среде с ламинарным потоком, поскольку турбулентность, создаваемая пламенем, может значительно нарушить поток стерильного воздуха [25].

2. Персонал лаборатории должен носить защитные очки при работе с биологическими агентами за пределами бокса биобезопасности. Часто дезинфицируйте руки в перчатках 70% этанолом при выполнении асептических работ. Хотя перчатки изначально могли быть стерильными при первом ношении, они, несомненно, соприкасались со многими нестерильными предметами во время использования. Обратите внимание, что 70% этанол может не подходить для дезинфекции латексных перчаток при работе с культурами, содержащими вирусы животных, поскольку исследования показали, что этанол увеличивает проницаемость латекса, снижая защиту пользователя в случае воздействия. Ультрафиолетовый свет эффективен только для обеззараживания чистых твердых поверхностей, с которыми он соприкасается. Он неэффективен для обеззараживания воздушного потока бокса. Ультрафиолетовый свет не эффективен против бактериальных спор. Протрите всю внутреннюю рабочую поверхность шкафа 70% этанолом или другим подходящим дезинфицирующим средством [25].

3. Вентилятор должен поработать в течение 10 минут, чтобы отфильтровать воздух в шкафу от любых твердых частиц.

Большинство экспертов по стерилизации указывают, что недостаточное удаление воздуха является наиболее распространенной причиной неэффективной стерилизации в паровых стерилизаторах. В наиболее часто используемых предвакуумных паровых стерилизаторах имеется множество источников утечек воздуха, в том числе прокладки дверных уплотнений, седла клапанов, трубные фитинги, а также изношенные или подвергшиеся коррозии компоненты, работающие под давлением [26].

### **2.3.3 Стерилизация экспланта**

Этап стерелизации является наиболее важным, так как поверхность растительной ткани может быть заражена грибами или бактериями. Стерилизация была проведена данным образом:

1. Наш экасплат помещаем в раствор хлоргиксидина на 5 минут
2. После помещаем растение в 70 % этиловый спирт на 1 минуту.
3. Промываем эксплант дистиллированной водой в течении 1 минуты.

## 2.4 Питательная среда

Питательная среда - смесь в которую входят природные и/или синтетические ингредиенты, предназначенные для поддержания размножения (с ингибированием роста определенных микроорганизмов или без него), идентификации или сохранения жизнеспособности микроорганизмов [27].

Существует множество питательных сред и они отличаются по составу, но несмотря на это их объединяет то, что все они содержат витамины, фитогормоны, углеводы, макроэлементы, микроэлементы необходимые для роста и развития растения.

В данной работе использовались среды Мурасиге-Скуга и Гамбурга В5. Мы модифицировали питательные среды и добавили в их состав ауксин и цитокинин. Регуляция роста и образования каллуса *in vitro* осуществляется ауксинами и цитокининами, которые являются важными компонентами питательной среды.

1. В питательную среду Гамборга и Эвелега было добавлено 2 мл/л 2,4-D и pH среды 5,8.

2. В питательную среду Мурасиге и Скуга было добавлено 2мл/л БАП и pH среды 5,7.

### 3 Результаты исследований и их обсуждение

В результате культивирования лекарственного растения *Catharanthus roseus*.L в условиях *in vitro* были получены каллусы на питательных средах В5 с добавлением 2.4-D и МС с добавлением БАП. На рисунке 5 изображен каллус который мы получили. Стоит отметить то, что калусогенез и процес пролиферации проходил с разной скоростью и эффективностью в следствии прямой зависимости от питательной среды, количества посаженных на питательную среду эксплантов их качества стерилизации эксплантов. Существует множество факторов влияющих на процесс калусогенеза.



Рисунок 5-Каллус *Catharanthus roseus*.L

Ниже приведены статистические данные показывающие динамику калусогенеза, роста в зависимости от питательной среды а также представлена общая сводка.

1. Динамика калусогенеза катарантуса розовый на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 6). Исходные данные указаны в таблице 1.

1 Таблица - Исходные данные

Катарантус розовый		
Питательная среда В5 с 2.4-D		
Кол-во эксплант	Кол-во каллуса	%
2	5	250%
2	2	100%
3	7	233%
2	3	150%
2	2	100%
2	1	50%
1	0	0%

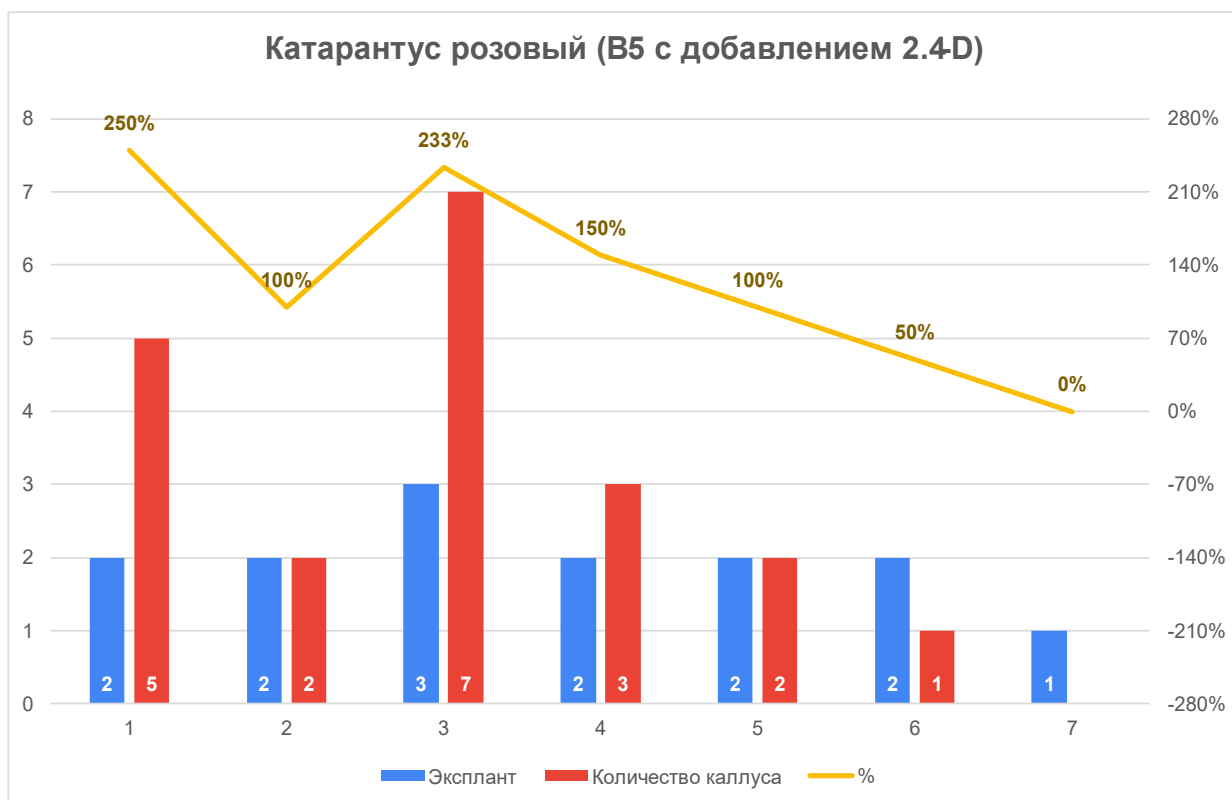


Рисунок 6.-Динамика каллусогенеза

2. Динамика каллусогенеза катарантуса розовый на питательной среде МС с добавлением БАП (Рисунок 7). Исходные данные указаны в таблице 2.

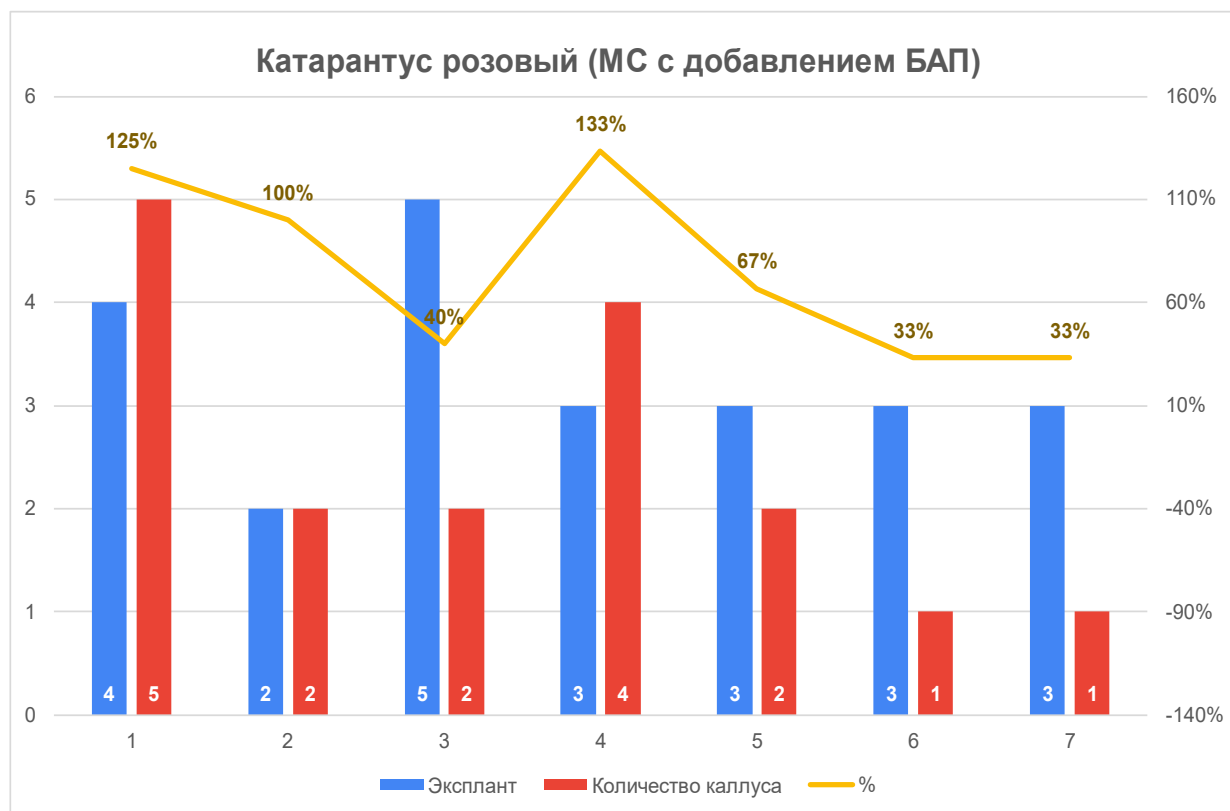


Рисунок 7.-Динамика каллусогенеза



2 Таблица - Исходные данные

Катарантус розовый		
Питательная среда МС с БАП		
Кол-во эксплант	Кол-во каллуса	%
4	5	125%
2	2	100%
5	2	40%
3	4	133%
3	2	67%
3	1	33%
3	1	33%

3. Динамика каллусогенеза катарантуса белого на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 8). Исходные данные указаны в таблице 3.

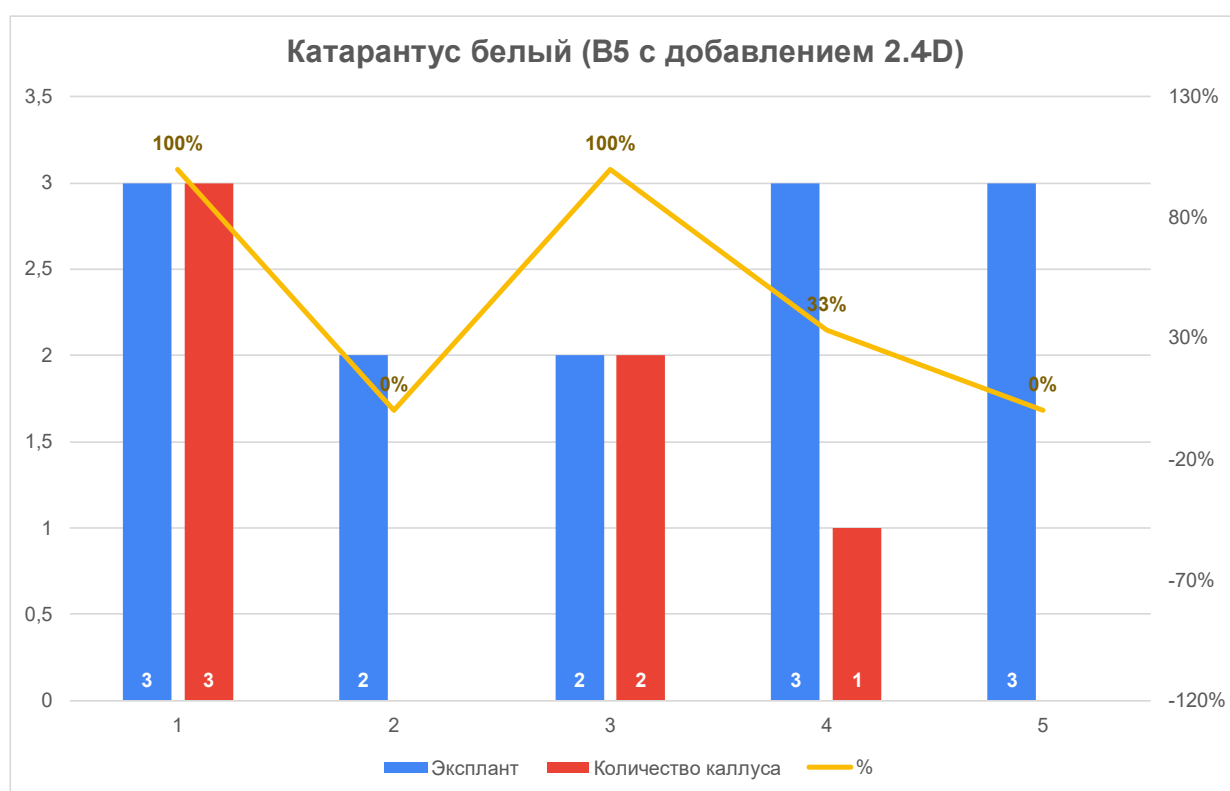


Рисунок 8- Динамика каллусогенеза

3 Таблица - Исходные данные

Катарантус белый		
Питательная среда В5 с 2.4-D		
Кол-во эксплант	Кол-во каллуса	%
3	3	100%
2	0	0%
2	2	100%
3	1	33%
3	0	0%

4. Динамика каллусогенеза катарантуса белого на питательной среде МС с добавлением БАП (Рисунок 9). Исходные данные указаны в таблице 4.

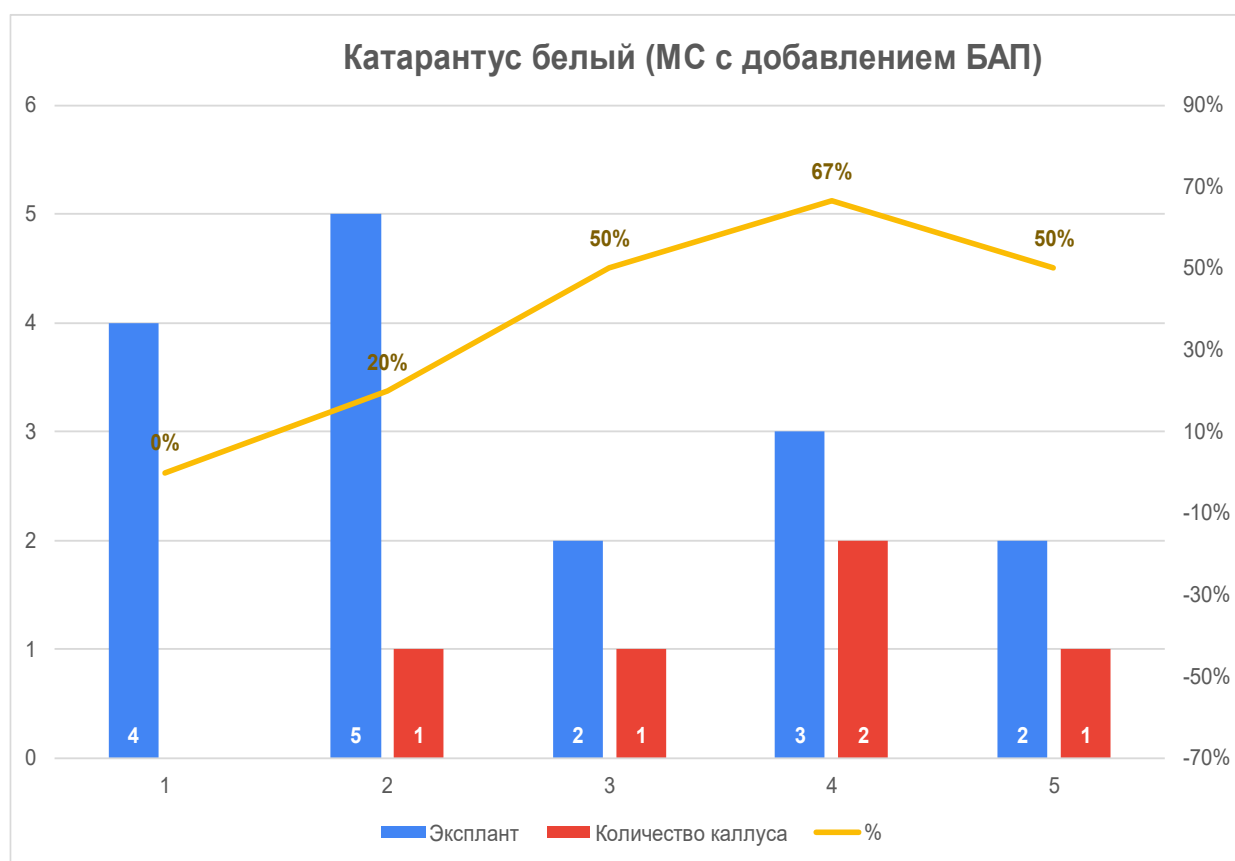


Рисунок 9- Динамика каллусогенеза

4 Таблица - Исходные данные

Катарантус белый		
Питательная среда МС с БАП		
Кол-во экспланто	Кол-во кallуса	%
4	0	0%
5	1	20%
2	1	50%
3	2	67%
2	1	50%

5.Общая сводка(Рисунок 10). Исходные данные указаны в таблице 5.

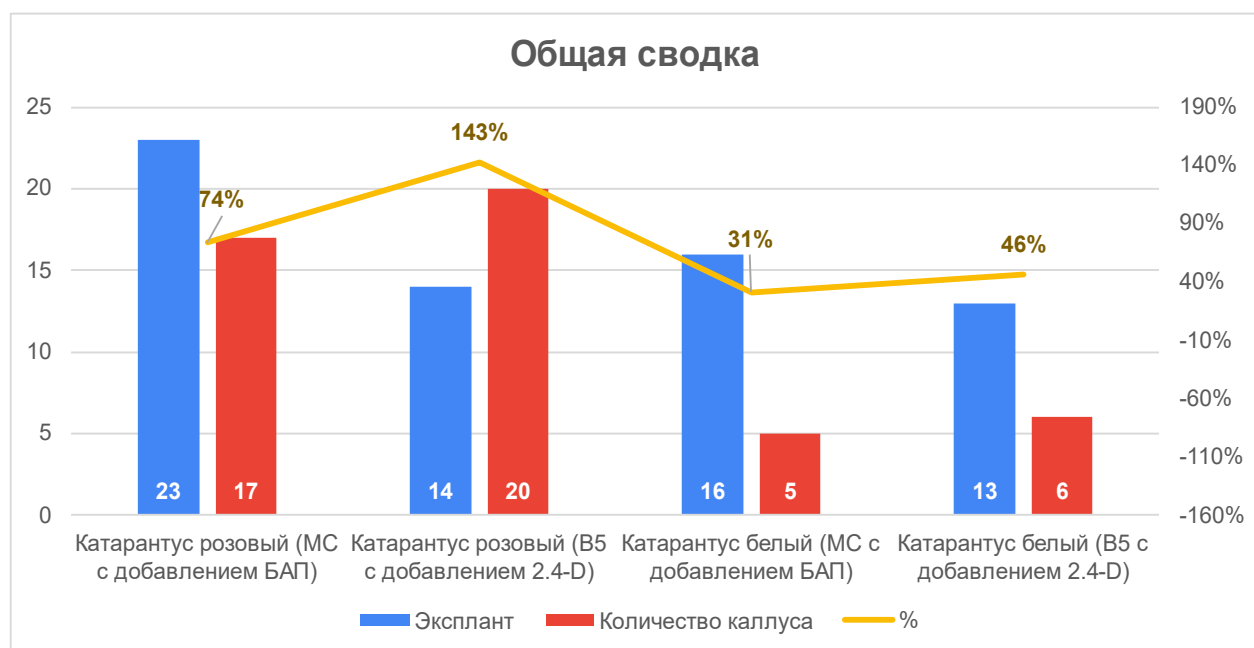


Рисунок 10- Динамика каллусогенеза

5 Таблица- Исходные данные

Варианты	Количество эксплантов	Количество кallуса	%
Катарантус розовый (МС с БАП)	23	17	74%
Катарантус розовый (B5 с 2.4-D)	14	20	143%
Катарантус белый (МС с БАП)	16	5	31%
Катарантус белый (B5 с 2.4-D)	13	6	46%

6.График показателя роста катарантуса розовый на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 11).

### Питательная среда В5 с добавлением 2.4-D



Рисунок 11- График показателя роста

7.График показателя роста катарантуса розовый на питательной среде МС с добавлением(Рисунок 12).

### Питательная среда МС с добавлением БАП



Рисунок 12- График показателя роста

8. График показателя роста катарантуса белого на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 13).

### Питательная среда В5 с добавлением 2.4-D

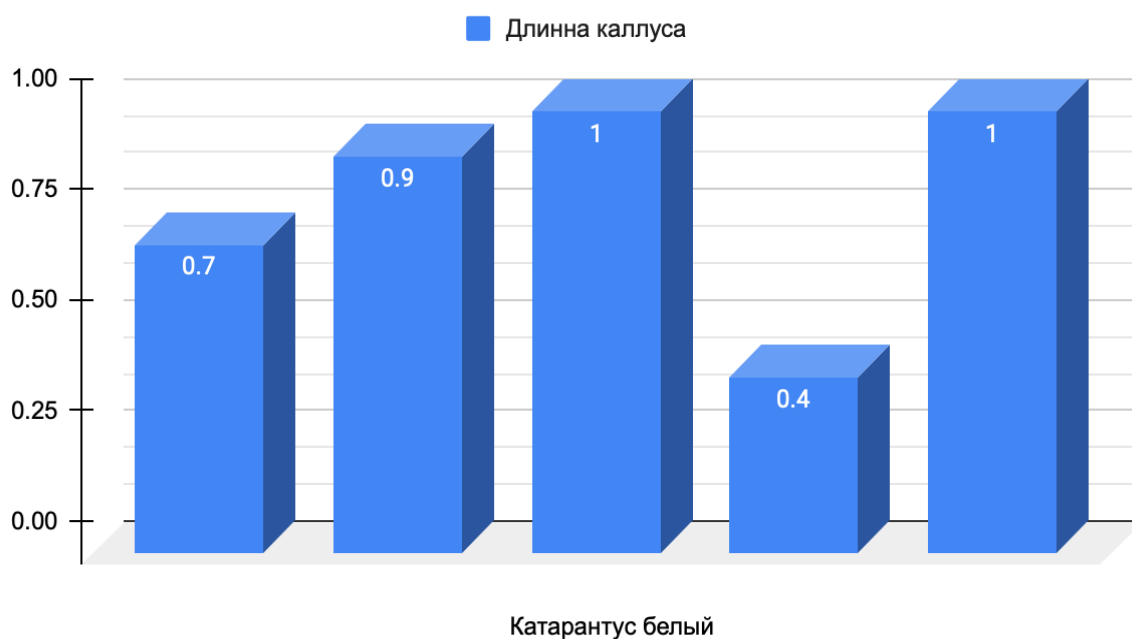


Рисунок 13- График показателя роста

9. График показателя катарантуса белого на питательной среде МС с добавлением БАП (Рисунок 14).

### Питательная среда МС с добавлением БАП

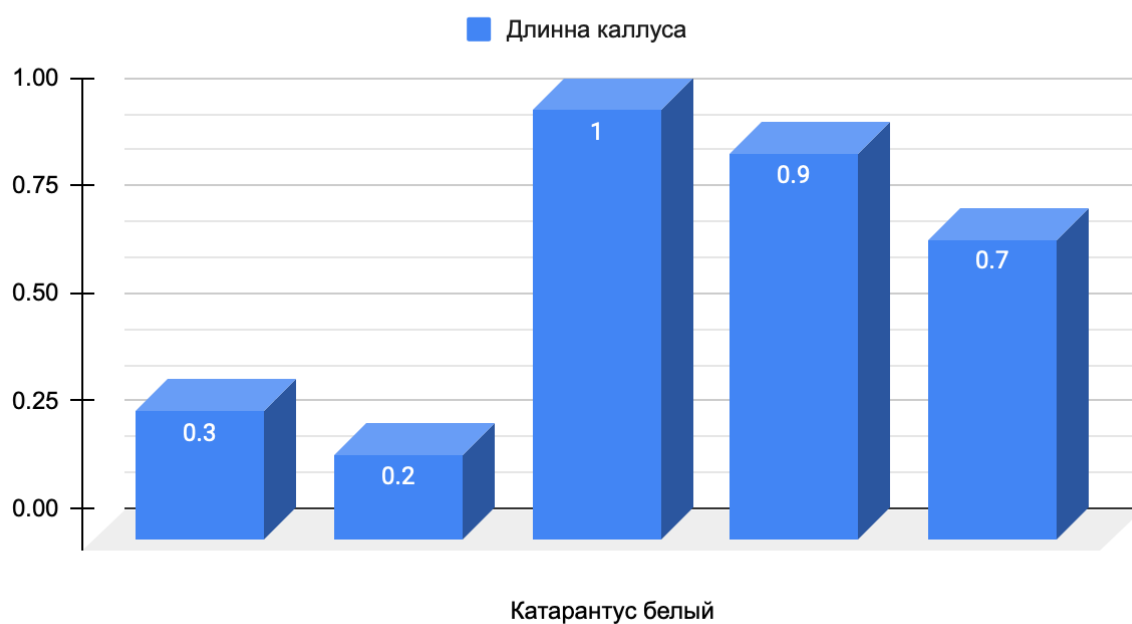


Рисунок 14- График показателя роста

### 3.1 Анализы

В ходе нашей работы мы провели 2 анализа *Catharanthus roseus*.L.

1.ГХ-МС.

2.Количественное определение алкалоидов.

#### 3.1.1 ГХ-МС

Приготовление экстракта является одним из важнейших этапов так как при неправильном приготовлении хроматограф может не обнаружить вещества в нашем образце. Для приготовления мы используем 98 % раствор этилового спирта с добавлением уксусной кислоты. Парралельно мы отбираем у катарануса розового зеленные листья так как в них содержится наибольшее количество алкалоидов. Зеленные листья массой 1 гр мы измельчаем в ступке в течении 2 минут. После мы добавляем 2 мл нашего спиртово-уксусного раствора и повторно перемешиваем. Далее наш почти готовый экстракт нужно отфильтровать. Промываем ступку 3 мл раствора. По итогу мы получаем 3 мл экстракта. При приготовлении экстракта тарры нужно тщательно промыть 98 % спиртовым раствором. Таким образом подготовленные образцы были проанализированы на газовом хроматографе ГХ-МС. Данные представлены на Рис. 15 и в Таблице 6.

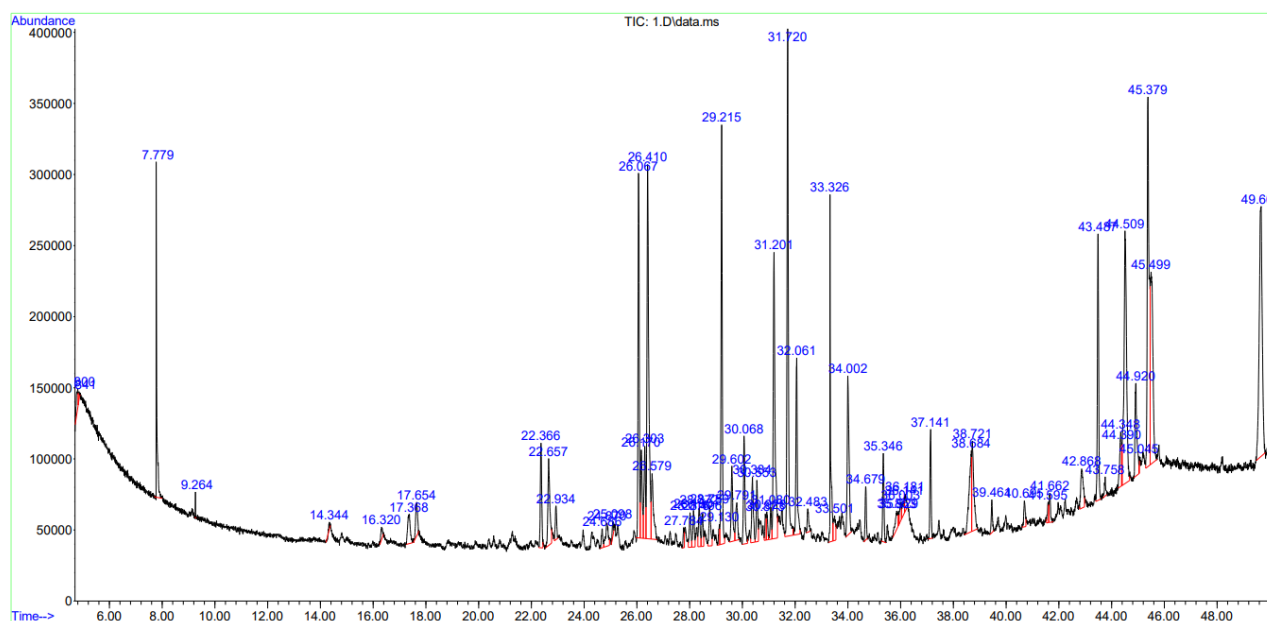


Рисунок 15-ГХ-МС

Таблица 6 - Результат ГХ-МС

Результат ГХ				
Pk#	RT min	Library/ID	Peak height	Corr area
1	4.800	Acetic acid	13282	688721
2	4.841	2-Butanol, 3-methyl	6262	182447
3	7.779	Ethyne	221776	3674850
4	9.264	Formamide	13878	86182
5	14.344	Benzaldehyde	4766	88594
6	16.320	Octanoic acid	8761	367944
7	17.368	Decane	20569	1426936
8	17.654	Benzene, 1,2,3-trimethyl	23364	1210939
9	22.366	Undecane	73482	2751448
10	22.657	Nonanal	59641	3065489
11	22.934	Hexanoic acid, 2-ethyl	23636	904845
12	24.686	(3-Methylphenyl) methanol, n-butyl	13451	507743
13	24.870	Oxalic acid	16126	1133735
14	25.098	Benzene, 1-methyl-3	8925	297908
15	26.067	Dodecane	256987	8347661
16	26.170	Butanedioic acid	62195	2657487
17	26.303	Naphthalene	64637	2484059
18	26.410	Decanal	263740	12733764
19	26.579	Decane	45106	2585406
20	27.784	Tridecane	13867	399399
21	28.016	1-Octanol	24408	1003212
22	28.150	10-Methylnonadecane	25966	1013972
23	28.372	Dodecane, 3-methyl	27639	1171083
24	28.496	Octane, 2,6-dimethyl	22862	873574
25	28.759	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-5	28052	1259345
26	29.130	Ethyl tetradecyl ether	14028	367475
27	29.215	Tridecane	292580	9462572
28	29.602	Oxirane, tridecyl	52505	2292359
29	29.791	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl	26455	1373252
30	30.068	Naphthalene, 2-methyl	75923	3074347
31	30.384	Glutaric acid	45329	1971568
32	30.553	Naphthalene, 1-methyl-	42791	1492502
33	30.873	n-Decanoic acid	18011	546580
34	30.928	Tridecane, 4-methyl-	19752	702027
35	31.080	Dodecane, 3-methyl	22568	809851
36	31.201	Propanoic acid, 2-methyl-	200178	9307124
37	31.720	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-ethyl	354487	12527081
38	32.061	Tetradecane	123385	4786307
39	32.483	17-Octadecynoic acid	16369	639146
40	33.326	6H-Pyrazolo[1,2-a][1,2,4,5]tetrazi	216496	4135663
41	33.501	Cyclohexane	17281	946608
42	34.002	Dimethyl phthalate	110919	5175935
43	34.679	Pentadecane	37492	1229729
44	35.346	Octanoic acid	61600	2102437
45	35.853	Benzoic acid,	12185	905382

Наличие соединений с временем удержания 4.800, 24.870, 28.016, 35.346 характерны для карбоновых кислот и спиртов это позволяет сделать предположение о распаде сложных эфиров до исходных спиртов и кислот.

### 3.1.2 Количественное определение алкалоидов в растении *Catharanthus roseus*.L.

В начале нашего анализа необходимо отобрать и просушить наше растение катарантус белый в сушильном шкафу в течении 2-3 дней при температуре 60°C. После этого был проведен анализ общего содержания алкалоидов в Научно-исследовательский центр лекарственных растений НАО “Казахский национальный университет имени аль-Фараби”. Была определена влажность растительного сырья и общее содержание алкалоидов. Влажность сырья составило 6 %. Общее содержание алкалоидов составило 5,8 %. Данный показатель общего содержания алкалоидов является очень высоким. Согласно лабораторным исследованиям, Научно-исследовательского центра лекарственных растений НАО “Казахский национальный университет имени аль-Фараби” данный показатель в других лекарственных растениях не превышает 1% (Рисунок 16).



Рисунок 16 -Сравнительная таблица.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом все поставленные цели были достигнуты, задачи выполнены. Растение *Catharanthus roseus* L было культивировано в условиях *in vitro* на модифицированных питательных средах. Получены каллусы катарантуса белого и розового. Проведены анализы подтверждающие наличие алкалоидов в растении.

Полученные результаты:

1. В результате проведенных исследований получены каллусы из соматических клеток лекарственного растения *Catharanthus roseus* L.
2. Образование каллусных клеток из соматических клеток лекарственного растения *Catharanthus roseus* L. наблюдали спустя 2 недели после помещения на питательные среды простерилизованных эксплантов.
3. Было обнаружено, что процесс каллусогенеза и его пролиферация активнее проходил на среде с добавлением 2,4-D в модифицированной нами питательной среде Гамборга В5. На питательной среде МС с БАП (6-Бензиламинопурин) процесс образования каллусов и его пролиферация начиналось после трех недель культивирования в условиях *in vitro*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Mujib A, Ali M., Isah T. Somatic embryo mediated mass production of *Catharanthus roseus* in culture vessel (bioreactor) – A comparative study // [Saudi Journal of Biological Sciences](#).-Volume 21, Issue 5, - November, - 2014, - P. 442-449.
- 2 Santhosh M.A., Surya P. N., Santhi P. *Catharanthus roseus*: ornamental plant is now medicinal boutique// *J. of Drug Delivery & Therapeutics*, - 2015, - V 5, - N 3, DOI <https://doi.org/10.22270/jddt.v5i3.1095>
- 3 Monika S. Biotechnological Studies on *Catharanthus roseus* L: Thesis/Monika Sain-2018.-15 p.
- 4 Sain M., Sharma V. *Catharanthus roseus* (An anti-cancerous drug yielding plant) - A Review of Potential Therapeutic Properties // *International Journal of Pure & Applied Bioscience*,-2013, -V. 1, - I. 6, - P. 139-142.
- 5 Plaizier A.C. A Revision of *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) A Revision of *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae)//*Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*.-1981,-V 81, -I 9 ,-P. 12.
- 6 Rajeshwari P. L., Hari S. Y., Anil K. D., Yogesh K. B. An Updated Review on Phytochemical and Pharmacological Properties of *Catharanthus rosea*// *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*,-2020,- V. 6,-I. 12,-P. 759-766.
- 7 Stockigt J., Soll H.J. Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* and *C. ovalis* // *Journal of Medicinal Plants Research*,-2020, - V. 40, - P. 22-30.
- 8 Koel M., Kuintinskaja M., Vaher M. Extraction of bioactive compounds from *Catharanthus roseus* and *Vinca minor* // *Separation and Purification Technology*,-2020,-V. 252. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117438>
- 9 Svoboda G.H.,BARNES A.J. Alkaloids of *Vincu roseu* Linn. (*Cutburanthus roseus* G. Don) XXIV Vinaspine, Vincathicine, Rovidine, Desacetyl VLB, and Vinaphamine // *Journal of Pharmaceutical Sciences*-1964,-V. 53,- I. 10,-P. 1227-1231.
- 10 Shahin A., Koushik S.,Nasim S., Husna P., Aminul A., Shamim A., Kamal H. Comparative studies of elemental composition in leaves and flowers of *Catharanthus roseus* growing in Bangladesh // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, - 2016, -V. 6, -P. 50-54.
- 11 Agrawal K. Vincristine // *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, - 2007, - P. 1-4. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62853-3>
- 12 Shaker A. Natural Products That Changed Society // *Biomedicines*, - 2021, - 9(5),-P. 472.
- 13 Johnson S. A. N. Vinorelbine: An Update and Review of Activity // *Clinical Oncology*,- 1996,-V. 8,-I. 6,-P 353-357.

- 14 Wang X.D., Li C.M., Jiang M.M. Induction of apoptosis in human leukemia cells through an intrinsic pathway by cathachunine, a unique alkaloid isolated from *Catharanthus roseus* // *J. Phytomedicine*, - 2016, - V. 23, -N. 6, - P. 641-653.
- 15 Waghray D., Zhang Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-glycoprotein in Cancer Treatment // *J Med Chem*, - 2018, - 61(12), - P. 5108–5121.
- 16 Almagro L., Fernández-Pérez F., Pedreño M. Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and Their Effect on Human Health // *Molecules*, -2015,-V. 20,-I. 2,-P. 2973-3000.
- 17 Mittal B., Tulsyan S., Kumar S., Mittal R. D., Agarwal G. Chapter Four - Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment // -2015, -V. 71, -P. 77-139.
- 18 Barnetta S., Hellmann F., Parkea E., Makin G., Tweddle D .A., Osborne C., Hempel G., Veala J.G. Vincristine dosing, drug exposure and therapeutic drug monitoring in neonate and infant cancer patients // *European Journal of Cancer*.-2022,-V. 164, - P 127-136.
- 19 Rossi D. Metronomic oral vinorelbine and lung cancer therapy during the COVID 19 pandemic-A single-center experience // *Lung Cancer*, -2020, - V. 145,- P. 83-84.
- 20 Mekky, H., Al-Sabahi, J., & Abdel-Kreem, M. F. M. Potentiating biosynthesis of the anticancer alkaloids vincristine and vinblastine in callus cultures of *Catharanthus roseus*. // *South African Journal of Botany*, -2018,-V. 114,-P. 29-31.
- 21 Moon, S. H., Venkatesh, J., Yu, J.-W., & Park, S. W. Differential induction of meristematic stem cells of *Catharanthus roseus* and their characterization // *Comptes Rendus Biologies*, -2015,-V. 338,- I. 11, - P 745-756
- 22 О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая Клональное микроразмножение растений :учебно пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
- 23 Kumar G., Kumar R., Gautam GK., Rana H. The phytochemical and pharmacological properties of *Catharanthus roseus* (Vinca) // *SPR*, -2021, -V. 2, -I. 1, -P. 379 - 384.
- 24 Lincoln, C. K., & Gabridge, M. G. Chapter 4 Cell Culture Contamination: Sources, Consequences, Prevention, and Elimination // *Methods in Cell Biology*, -1998,-V.57,-P. 49-65.
- 25 Coté R. J. Aseptic Technique for Cell Culture // *Current Protocols in Cell Biology*, - 1998. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0103s00>
- 26 Crow S. Steam Sterilizers: An Evolution in Design // *Infection Control and Hospital Epidemiology*, -1993,-V. 14,-N. 8,-P. 488-490.
- 27 ГОСТ ISO 11133-2016

## ОТЗЫВ

### НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

На дипломную работу

Кенжалиева Ризана Курмангазыевна  
5В070100 – «Биотехнология»

Тема: «Совершенствование методов культивирования *in vitro* лекарственного растения *Catharanthus roseus* L.»

В данной дипломной работе четко указана актуальность, которая заключается в необходимости культивирования растения *Catharanthus roseus* L. в условиях *in vitro* для использования его в дальнейшем в фармацевтической промышленности. Метод культивирования *in vitro* обладает огромным преимуществом так как производит большое количество каллусов за короткий промежуток времени. Работа написана логически, последовательно, четко и ясно.

Выполненная работа в полной мере отвечает поставленной цели и является законченным исследованием. Обоснованность и убедительность фактов свидетельствуют о полноте исследований, представленных в научной работе. Оформление работы отвечает принятым стандартам..

При выполнении дипломной работы Кенжалиева Р. выказала самостоятельность в проведении исследований. После полученных результатов были сформулированы обоснованные и четкие выводы. Кенжалиева Р. проявила себя творческим исследователем, способным самостоятельно и на высоком научном уровне выполнять научную работу, обобщать и внедрять полученные результаты.

Подводя итог можно отметить, что тема дипломной работа Кенжалиевой Р. очень актуальна, отличается теоретической и практической ценностью. Считаю, что дипломная работа Кенжалиевой Ризаны соответствует всем требованиям для присвоения квалификации бакалавр по специальности 5В070100 – «Биотехнология» и заслуживает очень высокой оценки «Отлично» - 98 %.

#### Научный руководитель

доктор биологических наук,  
профессор



Анапияев Б. Б.  
« 7 » июня 2022 г.

## РЕЦЕНЗИЯ

НА ДИПЛОМНУЮ РАБОТУ

КЕНЖАЛИЕВА РИЗАНА КУРМАНГАЗЫЕВНА

«Биотехнология» - 5В070100

На тему: «Совершенствование методов культивирования *in vitro* лекарственного растения *Catharanthus roseus* L.»

Выполнено:

- а) графическая часть на 4 листах
- б) пояснительная записка на 35 страницах

### ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ

Выполнение дипломной работы было нацелено на культивирование лекарственного растения *Catharanthus roseus* L в условиях *in vitro*. Для этого автором проанализированы основные источники литературы по данному вопросу. В работе дана подробная характеристика исследуемого объекта.

Дипломная работа соответствует требованиям государственного стандарта, направлению и профилю профессиональной подготовки студента.

Процесс выполнения исследований был направлен на постановку и изучение процесса культивирования лекарственного растения на модифицированных питательных средах в условиях *in vitro*. Автором были проанализированы основные источники литературы по данному вопросу. Изучены алкалоиды в составе растения *Catharanthus roseus* L. Проведен анализ по количественному определению алкалоидов в растении *Catharanthus roseus*.L. Существенных замечаний к работе нет.

Существенных недостатков работа не имеет

### Оценка работы

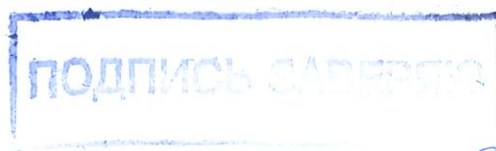
Дипломная работа соответствует предъявляемым требованиям и заслуживает оценки «отлично», автор Кенжалиева Ризана Курмангазыевна достойна степени бакалавра по специальности 5В070100 - «Биотехнология».

### Рецензент

Канд. х. н., ст. преподаватель  
Кафедры ХиТОВПСиП  
КазНУ имени Аль-Фараби;  
Рахметуллаева Р.К.

(подпись)

« 21 » Июня 2022 г.



## Метаданные

Подразделение

ИГИНГД

## Список возможных вариантов манипуляции с текстом

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся текстовых искажений. Эти искажения в тексте могут говорить о ВОЗМОЖНЫХ манипуляциях в тексте. Искажения в тексте могут носить преднамеренный характер, но чаще характер технических ошибок при преобразовании документа и его сохранении, поэтому мы рекомендуем вам подходить к анализу этого модуля со всей долей структуры. В случае возникновения вопросов просим обращаться в службу поддержки.

Замена буквы		1
Интервалы		0
Микропробелы		1
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		6

## Объем найденных подоби

Обратите внимание! Высокие коэффициенты значений не вызывают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.



КП1

25

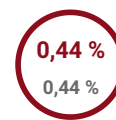
Длина фразы для фактора подоби 2



КП2

5003

Количество слов



КЦ

38272

Количество символов

## Подобия по списку источников

Просмотрите список и проанализируйте, в особенности, те фрагменты, которые превышают КП №2 (выделенные жирным шрифтом). используйте посылания «Обозначить» и обратите внимание на то, ли выделенные фрагменты повторяющиеся фрагменты, разбросанные в документе (совпадающие сходства), многочисленными обширными фрагментами, расположенными рядом с другим фрагментом (парафразирование) или обширными фрагментами без источников («криптоциты»).

### 10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	<a href="https://pickurules.ru/онкология-2">https://pickurules.ru/онкология-2</a>	65	1,30 %
2	<a href="https://standartgost.ru/g/%D0%93%D0%9E%D0%A1%D0%A2_%D0%A0_57095-2016">https://standartgost.ru/g/%D0%93%D0%9E%D0%A1%D0%A2_%D0%A0_57095-2016</a>	25	0,50 %
3	<a href="https://docplayer.ru/80779852-Основы-биотехнологии.html">https://docplayer.ru/80779852-Основы-биотехнологии.html</a>	17	0,34 %
4	<a href="https://docplayer.ru/80779852-Основы-биотехнологии.html">https://docplayer.ru/80779852-Основы-биотехнологии.html</a>	10	0,20 %

из базы данных RefBooks (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ЗНАЧЕНИЙ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---------------------------------------

из стабильной базы данных (0,00 %)



## из программ базами данных ( 0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР

НАЗВАНИЕ

КОЛИЧЕСТВО ЗНАЧЕНИЙ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)

## из интернета ( 2,34 %)

ПОРЯДКОВЫЙ  
НОМЕР

URL ИСТОЧНИКА

КОЛИЧЕСТВО ЗНАЧЕНИЙ СЛОВ  
(ФРАГМЕНТОВ)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	URL ИСТОЧНИКА	КОЛИЧЕСТВО ЗНАЧЕНИЙ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	<a href="https://pickurules.ru/онкология-2">https://pickurules.ru/онкология-2</a>	65 (1)	1,30 %
2	<a href="https://docplayer.ru/80779852-Основы-биотехнологии.html">https://docplayer.ru/80779852-Основы-биотехнологии.html</a>	27 (2)	0,54 %
3	<a href="https://standartgost.ru/g/%D0%93%D0%9E%D0%A1%D0%A2_%D0%A0_57095-2016">https://standartgost.ru/g/%D0%93%D0%9E%D0%A1%D0%A2_%D0%A0_57095-2016</a>	25 (1)	0,50 %

## Список повторяемых фрагментов (нет повторяющихся фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)

## СОДЕРЖАНИЕ

## ВВЕДЕНИЕ 9

1 Основная часть 10

1.1 Происхождение *Catharanthus roseus* 10

1.1.1 Подробное описание 10

1.1.2 Применение 11

1.2 Алкалоиды *Catharanthus roseus*.L 12

1.3 Механизм действия в клетке 13

1.4 Результаты культивирования других исследователей 15

1.4.1 Клинические исследования 15

1.4.2 Результаты культивирования других ученых 16

1.5 Биотехнологические методы культивирования изолированных соматических клеток *Catharanthus roseus* L. 16

2 Экспериментальная часть 18

2.1 Общая характеристика каллусных клеток 18

2.2 Аппараты 18

2.3 Стерилизация 20

2.3.1 Заражение 20

2.3.2 Обеззараживания при асептических работах 21

2.3.3 Стерилизация экспланта 21

2.4 Питательная среда 22

3 Результаты исследований и их обсуждение 23

3.1 Анализы 30

3.1.1 ГХ-МС 30

3.1.2 Количественное определение алкалоидов в растении *Catharanthus roseus*.L. 32

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 33

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 34

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одной из главных проблем современности является большая смертность людей от такой болезни онкологические заболевания. **Рак - собирательный термин, охватывающий широкую группу заболеваний, которые могут поражать любые органы и системы организма человека. Для обозначения этой категории заболеваний используются также термины «злокачественные опухоли» и «новообразования».** Одной из характерных особенностей рака является быстрое размножение аномальных клеток, разрастающихся за пределы своих обычных границ и способных проникать в окружающие ткани, а также мигрировать в другие органы, то есть метастазировать. Распространенные метастазы - основная причина смерти от рака. Согласно Всемирной Организации Здравоохранения в 2020 году данное заболевание унесло жизни 10 млн человек. Культивирование лекарственного растения *Catharanthus roseus* L. в условиях *in vitro* позволяет увеличить эффективность роста и количество ростков за короткий промежуток времени. Культивирование данного растения актуально тем что в нем содержится приблизительно от 50 до 70

индольных алкалоидов включая такие вещества как винкрестин (VCR), винбластин (VBL) и винорелбин (VRL). Именно эти вещества обладают свойствами апоптоза раковых клеток.

Цель исследования:

Изучение факторов влияющих на процессы каллусогенеза в культуре соматических клеток катарантуса розового и белого. лекарственного растения *Catharanthus roseus* L.

Задачи исследования:

1. Введение в культуру *in vitro* соматических клеток лекарственного растения *Catharanthus roseus* L.
2. Изучение влияния генотипа *Catharanthus roseus* L. на частоту процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток *Catharanthus roseus* L.
3. Изучение влияния состава питательных сред на частоту процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток *Catharanthus roseus* L. ;

## 1 Основная часть

### 1.1 Происхождение *Catharanthus roseus*

В 1759 году Линней описал род *Vinca* и выделил 4 вида, среди которых *Vinca rosea*. За неимением описания его род неправомерно опубликован. Тем временем, т. е. между 1835 г. и 10 апреля 1838 г., Г. Дон поместил барвинок розовый в свой новый род *Catharanthus*, дав ему четкое описание. Род *Catharanthus* включает 8 видов. *Catharanthus roseus* относится к семейству Аросупасеае и

является чрезвычайно важным лекарственным растением. Растение широко распространено и натурализовано в Африке, Америке, Азии, Австралии, Южной Европе и некоторых частях островов Тихого океана [1].

Лекарственное растение семейства Аросупасеае, производит большое количество фитосоединений, таких как терпеноидные индольные алкалоиды, фенолы, антоцианы, жирные кислоты, стероиды, белки, ферменты и т. д., Их используют для лечения: диабета, артериального давления, астмы, запора и рака. Существует около двух распространенных сортов *C. roseus*, названных в честь их цвета цветка: «Розеа» с розовыми цветками и «Альба» с белыми цветками (Рисунок 1). Синонимы названия растения включают *Vinca rosea*, *Ammocallis rosea* и *Lochnera rosea*, другие английские названия, иногда используемые для растения, включают *Cape Periwinkle*, *Rose Periwinkle*, *Rosy Periwinkle* и «Old Maid» [2-4].

Рисунок 1- *Catharanthus roseus* L.

В дикой природе это растение находится под угрозой исчезновения, и основной причиной их сокращения является разрушение среды обитания подсечно-огневым сельским хозяйством. Обильное естественное свечение во многих регионах, особенно в засушливых прибрежных районах. Культивируется как декоративное растение почти во всех тропических и субтропических регионах мира. Однако климатические условия и свойства почвы в некоторых европейских странах неблагоприятны для выращивания *Catharanthus roseus* [3].

#### 1.1.1 Подробное описание

Кустарник высотой 30-100 см, прямостоячий или лежащий, обычно с белым латексом; корни до 70 см длиной. Стебли примерно круглые, зеленые или желтовато-зеленые, иногда от слабого до сильного красного или пурпурного цвета, слабо опушенные или голые. Листья крестообразные, черешковые; черешок 0,3-1 см длиной, рыхлоопушенный или голый, с бахромой в пазухе сопочков, наружные из которых длиннее внутренних и с несколькими полосатыми волосками; пластинка довольно изменчивая по форме, эллиптическая, обратнойцевидная или узкойцевидная, в 1,9-3 раза длиннее ширины, в 4-9 раз больше ширины. Соцветие: прицветники отсутствуют. Цветоножка зеленая, 0,1-0,2 мм длиной, слабоопушенная до голой. Цветки 4-5 см длиной. Чашелистики зеленые, у основания слегка сросшиеся, иногда слегка неравные, в 2,7 раза длиннее ширины, 3-5 x 1-1,5 мм, снаружи слабоопушенные или голые, внутри голые, иногда к вершине с несколькими мелкими белыми волосками, цельнокрайние. Чаша слегка зеленоватая, с длинным узкоцилиндрическим основанием и короткой широкой верхней частью, в 5-8 раз длиннее чашечки, 2-3 см длиной, в узкой части 0,1-0,2 см шириной, до 0,3 в расширенной части. Наружная часть слабоопушенная или голая, внутри в зеву на уровне пыльников с полосатым кольцом. В расширенной части бархатисто-пушистая на протяжении 1 мм на жилках от основания нитей и ниже находится его серозное кольцо шириной 1,5-2 мм, расположенное чуть ниже уровня ключицы. Узкая базальная часть голая, зев 1,5-2 мм в диаметре лопасти обычно снаружи светлее. Почти округлые, голые, раскидистые, плоские до волнистых, цельнокрайние, иногда реснитчатые. Длина вершины составляет 1 мм. Тычинки вставлены на 0,4-0,6 см ниже устья венчика. Нить белая, очень коротка. Пыльники почти на верхушке острые, у основания сердцевидные. Пестик 17-26 мм длиной; плодолистики 1,5-2 x 0,8-1 x 0,5-1 мм, в основании сросшиеся, на вершине закругленные, на вершине опушенные, к основанию голые. Диск состоит из двух желез размером 2-2,8 x 1-2 мм, которые часто длиннее яичника [5].

#### 1.1.2 Применение

Пекольт в 1910 году описал использование *Catharanthus roseus* L. в Бразилии настой листьев для остановки кровотечения и цинги, в качестве жидкости для полоскания рта при зубной боли, а также для заживления и очистки хронических ран [2].

В Индии сок листьев данного растения используется в качестве аппликации при укусах пчел и ос. Экстракт цветка использовался для промывания глаз младенцев на Кубе и Ямике. Настояем листьев лечат меноррагию и ревматизм. На Филиппинах листья использовали для лечения диабета, желудочных спазмов, а корни - при кишечных паразитах. Неочищенный экстракт листьев и корней использовали для лечения рака. На Мадагаскаре вяжущие и горькие листья использовали для предотвращения рвоты, корни использовали как слабительное, а также использовали как средство от зубной боли. Сок листьев применяют на Маврикии при



диспепсии и расстройстве желудка. Растение применяли при туберкулезе, астме и метеоризме на Багамах. Жители Вост-Индии и Нигерии использовали это растение для лечения диабета. Растение использовали в Малайзии при гипертонии, диабете, бессоннице и раке. Кровотечение предотвращали прикладыванием кипяченого настоя растения. В Африке листьями растения лечат ревматизм и меноррагию. В Британской Вост-Индии растение используется для лечения диабетической язвы, а на Филиппинах - как гипогликемическое средство. В Индии листья растения традиционно использовались для лечения диабета, рака, меноррагии и болезни Ходжкина. На Тайване всего экстракт растения использовался перорально для лечения диабета. Экстракт листьев курили как эйфоризант в США [6].

## 1.2 Алкалоиды *Catharanthus roseus*.L

Катарантус розовый (*Vinca rosea*) известен как превосходный источник основных классов монотерпеноидных индольных алкалоидов [7].

Алкалоиды барвинка представляют собой встречающиеся в природе или полусинтетические азотистые основания [8]. Это растение синтезирует около 90 различных алкалоидов, в том числе фармацевтически важные соединения с цитотоксическими и гипотензивное действие. Самое раннее химическое исследование растения было проведено М. Грешоффом, который указал на наличие алкалоидных компонентов, но не смог получить однородных кристаллических соединений. Прогресс в фитохимии этого растения был сделан Коули и Беннеттом в 1928 г., когда им удалось получить два кристаллических сульфата и тартрат из общей алкалоидной фракции; однако никакие химические или физические свойства этих солей не описаны. В 1953 г. R. Paris и Moyses Migron сообщили о неидентифицированном кристаллическом алкалоиде этого растения [9].

Алкалоиды барвинка имеют димерную химическую структуру, состоящую из двух основных многокольцевых единиц индольного ядра (катарантин) и дигидроиндольного ядра (виндолин), соединенных вместе с другими сложными системами [10].

### Рисунок 2-Химическая структура алкалоидов барвинка

Винкрестин и винбластин представляют собой алкалоиды барвинка, выделенные из листьев мадагаскарского барвинка *Catharanthus roseus*, ранее известного как барвинок розовый. Винкрестин и винбластин структурно сходны, за исключением того, что первый содержит метильную группу, тогда как винкрестин содержит альдегидную группу, присоединенную к атому азота центральной индольной части (Рисунок 2). Это структурное различие приводит к значительным различиям как в противоопухолевой активности, так и в токсичности этих агентов [11].

К полусинтетическим алкалоидам относятся виндезин, винорелбин и винфлунин, которые получают химическими модификациями винкрестина и винбластина, причем два последних экстрагируются из *Catharanthus roseus*. Исходные соединения, винбластин и винкрестин, оба состояли из катарантинового фрагмента, связанного с виндолиновым кольцом. Последующее синтетически модифицированное соединение, виндезин, было получено путем изменения виндолиновой группы. В середине 1970-х новый синтетический подход позволил изменить катарантиновую группу, и, как следствие, была получена новая серия соединений, одним из которых являлся винорелбин. Производство одного килограмма винбластина стоит 1 млн долларов, тогда как для производства такого же количества винкрестина необходимо 3,5 миллиона. Эти вещества находятся в очень низких концентрациях в наземной части растения (около 0,0005% ФС), поэтому для получения 1 г винбластина требуется полтонны сухих листьев *C. roseus*, в то время как для производства 1 кг винкрестина требуется 530 кг. Кроме того, его экстракция очень сложна, так как осуществляется в присутствии 200 других соединений со сходными физико-химическими свойствами [12-13].

## 1.3 Механизм действия в клетке

Среди димерных индольных алкалоидов выделим представителей со значительной противоопухолевой активностью винбластин и винкрестин являются типичными соединениями, которые широко используются для клинического лечения рака человека, такого как карцинома яичка, острый лейкоз, рабдомиосаркома и рак молочной железы. Винбластин индуцирует апоптоз в клетках меланомы посредством митохондриальных и немитохондриальных путей, опосредованных белком Rho A. Апоптоз - строго регулируемый процесс запрограммированной гибели клеток, который может запускаться как внешними, так и внутренними путями. Внешний путь (рецептор смерти) начинается со стимуляции рецепторов смерти на клеточной мембране. Внутренний (митохондриальный) путь инициируется дисфункцией митохондрий, что приводит к высвобождению сигнальных факторов, таких как цитохром c (cyto c), в цитозоль. Пермеабиллизация митохондриальной мембраны зависит от семейства белков В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), где проапоптотические Bcl-2-ассоциированные белки X (Bax) или гомологичные Bcl-2 белки-киллеры (Bak) олигомеризуются с образованием пор на наружная митохондриальная мембрана. Эти два пути осуществляются в основном каспазами (семейство цистеиновых протеаз), причем каспазы-8 и -9 участвуют во внешнем и внутреннем пути соответственно. Кроме того, активные формы кислорода (АФК), ряд побочных продуктов метаболизма кислорода, тесно связаны с апоптозом раковых клеток, вызванным природными алкалоидами [14].

Резистентность к винкрестину возникает из-за усиленной экспрессии Р-гликопротеина, который способствует выходу алкалоидов барвинка из клетки. Множественной лекарственной резистентности (МЛУ) является основной причиной неудачи в химиотерапии рака. Многие раковые клетки приобретают устойчивость к широкому спектру структурно и механистически различных противоопухолевых препаратов в результате явления, называемого множественной лекарственной резистентностью (МЛУ). Развитие МЛУ создает серьезные проблемы для химиотерапии рака, особенно при лечении пациентов с метастатическим раком, устойчивыми к традиционной терапии МЛУ происходит по своей природе при некоторых видах рака из-за генетических и эпигенетических изменений, которые влияют на чувствительность к лекарствам без предварительного воздействия химиотерапевтических агентов. МЛУ также может быть приобретен в ходе химиотерапевтического лечения рака, который изначально был чувствительным к лекарствам, но позже повторялся в лекарственно-устойчивой форме. Также признается, что рак обычно состоит из гетерогенной популяции чувствительных к лекарствам и лекарственно-устойчивых клеток. В ходе лечения чувствительные к лекарствам клетки избирательно удаляются, а резистентные клетки доминируют в популяции раковых клеток.

Огромное влияние химиотерапевтической лекарственной устойчивости привело к обширным исследованиям механистических аспектов и стратегий понимания, модуляции или уклонения от МЛУ [15].

Микротрубочки (МТ) являются компонентами цитоскелета и играют очень важную роль во многих клеточных процессах. Они участвуют в разделении хромосом во время митоза и мейоза и являются основными составляющими митотических веретен, кроме того, они участвуют в поддержании клеточной структуры, транспорте и многих других функциях клетки. МТ синтезируются из гетеродимеров  $\alpha, \beta$ -тубулина, которые полимеризуются «конец в конец» в линейные протофиламенты. Эти структуры при динамической полимеризации и деполимеризации находятся на своих концах (Рисунок 3). Сборка и разборка полимеров МТ регулируется связыванием тубулина и гуанозин-5-трифосфата. Любое вмешательство в эту динамику МТ может спровоцировать остановку клеточного цикла и привести к запрограммированной гибели клеток или апоптозу. Динамика МТ и, следовательно, клеточное деление также могут нарушаться небольшими молекулами, которые обычно делят на две группы: (i) МТ-стабилизирующие агенты, препятствующие последующей деполимеризации; и (ii) МТ-деполимеризующие агенты, ингибирующие их образование. Алкалоиды барвинка попадают во вторую группу, поскольку они останавливают опухолевые клетки во время митоза, связываясь на поверхности между двумя гетеродимерами тубулина рядом с заменяемым сайтом связывания гуанозин-5-трифосфата и деполимеризуя МТ. Это приводит к остановке клеточного цикла в митозе. В высоких концентрациях алкалоиды барвинка приводят к образованию крупных полимеров тубулина, в результате чего опухолевые клетки останавливаются в митозе и немедленно погибают. Однако, когда уровни алкалоидов барвинка низкие, клетки останавливаются в митозе и клетки погибают после длительного времени инкубации. Поскольку связывание природных алкалоидов барвинка, винбластин и винкристин, а также их полусинтетических аналогов, винорелбин и винфлунин связаны с само ассоциацией тубулина, их сродство может быть определено, и их связывание управляется энтропией, так что общее сродство уменьшается в следующем порядке: винкристин > винбластин > винорелбин > винфлунин [16].

Винфлунин - первый фторированный ингибитор микротрубочек, синтезированный из винорелбина. Винфлунин отличается от других алкалоидов барвинка тем, что это соединение слабо связывается с тубулином. Описаны три возможных эффекта винфлунина: его действие на тубулин и микротрубочки, его способность разрушать новообразованные кровеносные сосуды и его способность уменьшать метастатический процесс. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что винфлунин может оказывать не только опухолево-цитостатическое действие, но и специфическое антиангиогенное действие. Клинически винфлунин рассматривается в связи с его потенциальной ролью в лечении карциномы молочной железы и немелкоклеточного рака легкого, среди прочих.

#### Рисунок 3- Сборка и разборка полимеров МТ

Метаболизм лекарств или ксенобиотиков представляет собой ферментативный процесс, посредством которого липофильные химические соединения превращаются в гидрофильные побочные продукты, так что они легко выводятся из организма. Скорость метаболизма определяет продолжительность и интенсивность фармакологического действия препаратов. Эти реакции также необходимы для детоксикации ядовитых соединений [17].

Винкристин быстро распределяется по всему организму и связывается с белками плазмы после внутривенного введения. административная. Его модель выведения является трехфазной, с периодом полувыведения 5 минут, 2,3 часа и 85 часов. Винкристин метаболизируется главным образом в печени с участием цитохрома CYP450-3A, при этом 50% введенной дозы выводится с желчью в виде метаболитов. Приблизительно 80% введенной дозы выводится с калом, а остальная часть выводится с мочой. До 33% введенной дозы выводится с калом в течение 24 часов и 67% в течение 72 часов. Дозу следует уменьшить на 50% у пациентов с нарушением функции печени (концентрация билирубина выше 3 мг/дл) [11].

### 1.4 Результаты культивирования других исследователей

#### 1.4.1 Клинические исследования

1. Подходящими пациентами были пациенты в возрасте <math>\geq 21</math> года, которые получали винкристин в рамках стандартной химиотерапии для ряда типов рака. Для участия в исследовании пациенты должны были иметь центральный венозный катетер для облегчения сбора последовательных образцов крови для фармакокинетического анализа и скорость клубочковой фильтрации <math>\geq 60</math> мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Были зарегистрированы характеристики пациентов, включая возраст, пол, массу тела и площадь поверхности тела. Базовые данные о токсичности собирали до и после введения винкрестина. Винкристин вводили в виде короткой болюсной инфузии в дозах 0,02-0,05 мг/кг или 0,75-1,5 мг/м<sup>2</sup> у новорожденных и детей в возрасте до 1 года или 12 кг и в дозах 1,5 мг/м<sup>2</sup> (с дозой укупорки в дозе 2 мг) у детей старшего возраста или в рамках их стандартной схемы лечения [18].

2. В 2017 году начали использовать пероральную метрономную форму с винорелбином в дозе 40 мг три раза в неделю (понедельник, среда, пятница) непрерывно. Не было зарегистрировано каких-либо побочных эффектов 3 или 4 степени у 10 из 10 пациентов [19].

Генетика может играть важную роль в исходе, поскольку сообщалось о больших межрасовых различиях в реакции. Фактически, в клинических испытаниях была отмечена более высокая выживаемость у представителей европеоидной расы по сравнению с афроамериканцами.

#### 1.4.2 Результаты культивирования других ученых

1. Поверхность листьев стерилизовали в 20% отбеливателе Clorox (30 мин) и трижды промывали в стерильной очищенной воде. Затем листья надрезали на их абаксиальных сторонах стерильным лезвием скальпеля и разрезали на кусочки по 1 см. Эксплантаты культивировали на аликвотах по 25 мл среды для регенерации MS с добавлением 1,5 мг/л BAP, 1,5 мг/л 2,4D, 30 г/л сахарозы и полуотвержденного 0,8% (масса/объем) агара, pH 5,6. Наилучшая биомасса была получена из комбинаций 2,4D/NAA (11 г), IAA/NAA (9,5 г), BAP/24D (6,8 г) и 2,4D/IAA (6,8 г). Эти результаты свидетельствуют о том, что добавление в среду ауксинов с более высоким содержанием, чем кинетин, увеличивает биомассу. Однако увеличение биомассы приводило к снижению биосинтеза Vb, а увеличение Vc [20].

2. Семена катарантуса были поверхностно стерилизованы 70% этиловым спиртом в течение 1 мин, затем 1% раствором гипохлорита натрия в течение 15 мин, ополаскивали 5-10 раз стерилизованной дистиллированной водой, после чего семена высушивали на

воздухе на чистой фильтровальной бумаге. Семена культивировали на среде Мурасиге-Скуга (МС) с 0,65% агар-агара; pH доводили до 5,8 перед автоклавированием. После инокуляции культуры семян выдерживали в темноте в течение 3-5 дней для индукции прорастания. После прорастания семян культуры содержали при 16-часовом световом периоде и температуре 25°C. Выделенные ткани переносили на дифференциальную индукционную среду, содержащую соли и витамины Гамборга В5 (Duchefa, Нидерланды) (3,16 г/л), сахарозу (30 г/л), агар-агар (6,5 г/л). 1) и различные комбинации НУК и кинетина; pH среды доводили до 5,7. Среду автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. Культуры поддерживали в темных условиях [21].

3. Для инициации эмбрионного каллуса в среду МС добавляли 4,52 мкМ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Для пролиферации соматического зародыша в ту же среду добавляли нафталин-уксусную кислоту, НУК (5,37 мкМ) с различными концентрациями N6-бензиладенина (БАП) (2,22-8,90 мкМ). Среда для созревания и прорастания содержала оптимизированный уровень 2,60 мкМ гибберелловой кислоты (GA3) и 2,24 мкМ ВАР соответственно. Каллус был обильно иницирован в твердой среде MS с добавлением 4,52 мкМ 2,4-Д, который хорошо рос в жидкой среде. Формирование и пролиферация соматических зародышей происходили в большей степени в твердой среде, чем в жидкой [1].

1.5. Биотехнологические методы культивирования изолированных соматических клеток *Catharanthus roseus* L.

Клональное микроразмножение - массовое бесполое размножение растений в культуре клеток и тканей [22].

Используется для получения безвирусного посадочного материала, размножения растений, трудно размножаемых традиционными способами [23].

Клональное размножение через культуру тканей, широко известное как микроразмножение, было иницировано Г. Морелем (1960), который обнаружил, что это единственный коммерчески жизнеспособный подход к размножению орхидей, с тех пор было микроразмножено несколько видов культур.

Преимущества клонального микроразмножения *Catharanthus roseus* L :

А. Производство очень большого количества клональных ростков за короткий промежуток времени.

Б. Получение безболезненного материала

В. Производство большого запаса.

Г. Возможность авиаперевозки большого количества растительного материала быстро, эффективно и относительно недорого. От 30000 до 50000 in-vitro в закрытых ёмкостях или маленьких контейнерах.

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Общая характеристика каллусных клеток

Для лучшего понятия материала сначала мы дадим понятие нескольким связанным между собой определениям.

**Каллус - это особый тип ткани, представляющий собой скопления недифференцированных клеток.** Любая **живая растительная клетка имеет возможность развиться в организм, из которого она была изолирована и произрастала в определенных условиях.** Данное **свойство называется тотипотентность.**

Образование каллуса позволяет защитить место травмы при помощи регенерации утраченного органа или защитного слоя, при этом накапливая питательные вещества необходимые для роста и развития. Регуляция роста и образования каллуса in vitro осуществляется ауксинами и цитокинами. Фрагмент ткани или органа помещенный на подходящую питательную среду это эксплантат после начинается рост недифференцированных клеток. Данный процесс называется каллусогенез или каллусообразование. Комплекс процессов приводящие к различиям между дочерними клетками и между дочерними и материнскими клетками. В результате дифференциации клетки начинают приобретать морфологические различия и выполнять разные физиологические функции. Дедифференциация это обратный процесс при котором: клетки теряют характерные для них специфичные функции, структуру и возвращаются к состоянию делящейся клетки.

### 2.2 Аппараты

#### 1. Ламинарный бокс

Ламинарные боксы представляют собой устройства физического сдерживания, которые действуют как первичные барьеры либо для защиты материала, с которым манипулируют в боксе, от источников загрязнения, создаваемых работниками или окружающей средой, либо для защиты лабораторного работника и лабораторной среды от воздействия инфекционных или других опасных факторов. материалы, которые присутствуют внутри капота (Рисунок 4). В приложениях для культивирования клеток используются два типа вытяжных шкафов с ламинарным потоком: чистая скамья с горизонтальным потоком и бокс биологической безопасности. Горизонтальный чистый стол с ламинарным потоком используется для обеспечения почти стерильной среды для чистой (т. е. незагрязняющей) работы с неопасными материалами, такими как стерильные среды или оборудование. Поскольку схема воздушного потока направляет поток воздуха в вытяжном шкафу непосредственно обратно к оператору вытяжного шкафа и в помещение, вытяжные шкафы с горизонтальным потоком нельзя использовать с инфекционными агентами или токсичными химическими веществами.

#### 2. Микроскоп

Микроскоп это устройство которое используют для получения увеличенных изображений. В данной работе применяем при отборе эксплантат и их измерении.

#### 3. Сушильный шкаф

Аппарат используемый для стерилизации и сушки различных материалов.

#### 4. Газовый хроматограф Agilent 6890N с масс-селективным детектором Agilent 5973N и пламенно ионизационным детектором .

Аппарат используемый для анализа и разделения веществ в смеси . Так же позволяет идентифицировать и определить количественное содержание вещества.

#### 5. Стерилизатор

Аппарат используемый для обеззараживания. Процесс стерилизации осуществляет путем нагревания до температуры при которой

погибают многие микроорганизмы

## Рисунок 4- Ламинарный бокс

### 2.3 Стерилизация

#### 2.3.1 Стерилизации посуды и питательных сред

Стерилизация - важнейший этап и главное условие получения чистых культур микроорганизмов.

#### 2.3.1 Заражение

Клеточные культуры являются биологическими объектами, которые реагируют на окружающую их среду и, следовательно, на загрязнение окружающей среды. Биологическое заражение представляет наибольшую угрозу для системы культивирования клеток, поскольку живые организмы метаболизируют и размножаются. Репликация увеличивает титр загрязнителя. Следовательно, возрастает риск распространения инфекции путем перекрестного заражения других клеточных культур. Биологическое заражение в системе культивирования клеток, по сути, *in vitro* эквивалентно возникающему заболеванию. Разница между локализованной изолированной инфекцией и лабораторной эпидемией заключается в установлении стандартизированных, надежных методов культивирования клеток и процедур контроля качества. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком работает по принципу высокоскоростной завесы из отфильтрованного чистого воздуха, блокирующего проникновение загрязняющих веществ из внешней среды и удерживающего аэрозольные загрязнения внутри бокса биобезопасности. Внешние поверхности всех материалов, поступающих в ламинарный бокс и выходящих из него, должны быть продезинфицированы в соответствии с рисками, связанными с материалом и работой. Со всеми материалами внутри шкафа следует обращаться как с рабочими поверхностями, так как они регулярно подвергаются воздействию аэрозолей, оседающих на их поверхностях всякий раз, когда жидкости переносятся пипетированием, заливкой или любым другим способом, который может привести к попаданию жидкости в виде аэрозоля внутрь колпака. Осаждение аэрозолей представляет собой серьезный риск для целостности материалов, расположенных в вытяжке, что приводит к распространению любого присутствующего загрязнения. Поэтому, чтобы снизить риск перекрестного загрязнения, количество материалов находящихся внутри бокса всегда должно быть сведено к минимуму [24].

Источники заражения:

##### 1. Питательная среда

Большинство химических загрязнений попадает в систему культивирования клеток через среду для культивирования клеток. Загрязнение исходит от сырья, используемого для изготовления базовой среды, и/или от реагентов, добавок и добавок. Все материалы, поступающие в систему культивирования клеток, должны быть наивысшей чистоты.

##### 2. Вода

Вода является растворителем и содержит растворенные ионы металлов, органические соединения, бактериальные эндотоксины и т. д. Он становится лучшим растворителем с повышением очистки. Высокоочищенная вода выщелачивает ионы металлов, органические соединения, эндотоксины из стеклянной посуды, трубок и трубок. Для приготовления сред, а также для мытья и ополаскивания стеклянной посуды, используемой при приготовлении и хранении сред и добавок к средам, следует использовать стандартные процедуры с использованием свеженабранной воды высокой степени очистки.

#### 2.3.2 Обеззараживания при асептических работах

1. Стерилизация пламенем используется в качестве прямого локального средства обеззараживания при асептических работах на открытом столе. Чаще всего он используется для удаления потенциальных контаминантов из открытых отверстий флаконов со средой, культуральных колб или пробирок во время переноса, для стерилизации небольших инструментов, таких как щипцы, или для стерилизации проволочных инокуляционных петель и иглы до и после переноса. По возможности стерилизация пламенем должна быть сведена к минимуму в среде с ламинарным потоком, поскольку турбулентность, создаваемая пламенем, может значительно нарушить поток стерильного воздуха [25].

2. Персонал лаборатории должен носить защитные очки при работе с биологическими агентами за пределами бокса биобезопасности. Часто дезинфицируйте руки в перчатках 70% этанолом при выполнении асептических работ. Хотя перчатки изначально могли быть стерильными при первом ношении, они, несомненно, соприкасались со многими нестерильными предметами во время использования. Обратите внимание, что 70% этанол может не подходить для дезинфекции латексных перчаток при работе с культурами, содержащими вирусы животных, поскольку исследования показали, что этанол увеличивает проницаемость латекса, снижая защиту пользователя в случае воздействия. Ультрафиолетовый свет эффективен только для обеззараживания чистых твердых поверхностей, с которыми он соприкасается. Он неэффективен для обеззараживания воздушного потока бокса. Ультрафиолетовый свет не эффективен против бактериальных спор. Протрите всю внутреннюю рабочую поверхность шкафа 70% этанолом или другим подходящим дезинфицирующим средством [25].

3. Вентилятор должен поработать в течение 10 минут, чтобы отфильтровать воздух в шкафу от любых твердых частиц.

Большинство экспертов по стерилизации указывают, что недостаточное удаление воздуха является наиболее распространенной причиной неэффективной стерилизации в паровых стерилизаторах. В наиболее часто используемых предвакуумных паровых стерилизаторах имеется множество источников утечек воздуха, в том числе прокладки дверных уплотнений, седла клапанов, трубные фитинги, а также изношенные или подвергшиеся коррозии компоненты, работающие под давлением [26].

#### 2.3.3 Стерилизация экспланта

Этап стерилизации является наиболее важным, так как поверхность растительной ткани может быть заражена грибами или бактериями. Стерилизация была проведена данным образом:

1. Наш эксплант помещаем в раствор хлоргиксидина на 5 минут
2. После помещаем растение в 70 % этиловый спирт на 1 минуту.
3. Промываем эксплант дистиллированной водой в течении 1 минуты.

### 2.4 Питательная среда

Питательная среда - смесь **в которую входят природные и/или синтетические ингредиенты, предназначенные для поддержания размножения (с ингибированием роста определенных микроорганизмов или без него), идентификации или сохранения**

## жизнеспособности микроорганизмов [27].

Существует множество питательных сред и они отличаются по составу, но несмотря на это их объединяет то, что все они содержат витамины, фитогормоны, углеводы, макроэлементы, микроэлементы необходимые для роста и развития растения.

В данной работе использовались среды Мурасиге-Скуга и Гамбурга В5. Мы модифицировали питательные среды и добавили в их состав ауксин и цитокинин. Регуляция роста и образования каллуса *in vitro* осуществляется ауксинами и цитокинами, которые являются важными компонентами питательной среды.

1. В питательную среду Гамборга и Эвелега было добавлено 2 мл/л 2.4-D и pH среды 5,8.

2. В питательную среду Мурасиге и Скуга было добавлено 2мл/л БАП и pH среды 5,7.

### 3 Результаты исследований и их обсуждение

В результате культивирования лекарственного растения *Catharanthus roseus.L* в условиях *in vitro* были получены каллусы на питательных средах В5 с добавлением 2.4-D и МС с добавлением БАП. На рисунке 5 изображен каллус который мы получили. Стоит отметить то, что калусогенез и процес пролиферации проходил с разной скоростью и эффективностью в следствии прямой зависимости от питательной среды, количества посаженных на питательную среду эксплантов их качества стерилизации эксплантов. Существует множество факторов влияющих на процесс калусогенеза.

Рисунок 5-Каллус *Catharanthus roseus.L*

Ниже приведены статистические данные показывающие динамику калусогенеза, роста в зависимости от питательной среды а также представлена общая сводка.

1. Динамика калусогенеза катарантуса розовый на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 6). Исходные данные указаны в таблице 1.

1 Таблица - Исходные данные

Рисунок 6-Динамика калусогенеза

2. Динамика калусогенеза катарантуса розовый на питательной среде МС с добавлением БАП (Рисунок 7). Исходные данные указаны в таблице 2.

Рисунок 7-Динамика калусогенеза

2 Таблица - Исходные данные

3. Динамика калусогенеза катарантуса белого на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 8). Исходные данные указаны в таблице 3.

Рисунок 8- Динамика калусогенеза

3 Таблица - Исходные данные

4. Динамика калусогенеза катарантуса белого на питательной среде МС с добавлением БАП (Рисунок 9). Исходные данные указаны в таблице 4.

Рисунок 9- Динамика калусогенеза

4 Таблица - Исходные данные

5. Общая сводка (Рисунок 10). Исходные данные указаны в таблице 5.

Рисунок 10- Динамика калусогенеза

5 Таблица- Исходные данные

Варианты	Количество эксплантов	Количество каллуса	%
----------	-----------------------	--------------------	---

Катарантус розовый (МС с БАП)	23	17	74%
-------------------------------	----	----	-----

Катарантус розовый (В5 с 2.4-D)	14	20	143%
---------------------------------	----	----	------

Катарантус белый (МС с БАП)	16	5	31%
-----------------------------	----	---	-----

Катарантус белый (В5 с 2.4-D)	13	6	46%
-------------------------------	----	---	-----

6. График показателя роста катарантуса розовый на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 11).

Рисунок 11- График показателя роста

7. График показателя роста катарантуса розовый на питательной среде МС с добавлением (Рисунок 12).

Рисунок 12- График показателя роста

8. График показателя роста катарантуса белого на питательной среде Гамбурга В5 с 2.4-D (Рисунок 13).

Рисунок 13- График показателя роста

9. График показателя катарантуса белого на питательной среде МС с добавлением БАП (Рисунок 14).

Рисунок 14- График показателя роста

### 3.1 Анализ

В ходе нашей работы мы провели 2 анализа *Catharanthus roseus.L*.

1.ГХ-МС.

2.Количественное определение алкалоидов.

### 3.1.1 ГХ-МС

Приготовление экстракта является одним из важнейших этапов так как при неправильном приготовлении хроматограф может не обнаружить вещества в нашем образце. Для приготовления мы используем 98 % раствор этилового спирта с добавлением уксусной кислоты. Параллельно мы отбираем у катарануса розового зеленые листья так как в них содержится наибольшее количество алкалоидов. Зеленые листья массой 1 гр мы измельчаем в ступке в течении 2 минут. После мы добавляем 2 мл нашего спиртово-уксусного раствора и повторно перемешиваем. Далее наш почти готовый экстракт нужно отфильтровать. Промываем ступку 3 мл раствора. По итогу мы получаем 3 мл экстракта. При приготовлении экстракта тарры нужно тщательно промыть 98 % спиртовым раствором. Таким образом подготовленные образцы были проанализированы на газовом хроматографе ГХ-МС. Данные представлены на Рис. 15 и в Таблице 6.

Рисунок 15-ГХ-МС

Таблица 6 - Результат ГХ-МС

Наличие соединений с временем удержания 4.800, 24.870, 28.016, 35.346 характерны для карбоновых кислот и спиртов это позволяет сделать предположение о распаде сложных эфиров до исходных спиртов и кислот.

3.1.2 Количественное определение алкалоидов в растении *Catharanthus roseus*.L.

В начале нашего анализа необходимо отобрать и просушить наше растение катарантус белый в сушильном шкафу в течении 2-3 дней при температуре 60°C. После этого был проведен анализ общего содержания алкалоидов в Научно-исследовательский центр лекарственных растений НАО "Казахский национальный университет имени аль-Фараби". Была определена влажность растительного сырья и общее содержание алкалоидов. Влажность сырья составило 6 %. Общее содержание алкалоидов составило 5,8 %. Данный показатель общего содержания алкалоидов является очень высоким. Согласно лабораторным исследованиям, Научно-исследовательского центра лекарственных растений НАО "Казахский национальный университет имени аль-Фараби" данный показатель в других лекарственных растениях не превышает 1% (Рисунок 16).

Рисунок 16 -Сравнительная таблица.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом все поставленные цели были достигнуты, задачи выполнены. Растение *Catharanthus roseus* L было культивировано в условиях *in vitro* на модифицированных питательных средах. Получены каллусы катарантуса белого и розового. Проведены анализы подтверждающие наличие алкалоидов в растении.

Полученные результаты:

1. В результате проведенных исследований получены каллусы из соматических клеток лекарственного растения *Catharanthus roseus* L.
2. Образование каллусных клеток из соматических клеток лекарственного растения *Catharanthus roseus* L. наблюдали спустя 2 недели после помещения на питательные среды простерилизованных эксплантов.
3. Было обнаружено, что процесс каллусогенеза и его пролиферация активнее проходил на среде с добавлением 2,4-D в модифицированной нами питательной среде Гамборга В5. На питательной среде МС с БАП (6-Бензиламинопурин) процесс образования каллусов и его пролиферация начиналось после трех недель культивирования в условиях *in vitro*.