

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

ПОЛИЭФИРЫ 14-ГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ ТАКСОИДОВ
ВПЕРВЫЕ ОБНАРУЖЕНЫ В ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЯХ *Taxus canadensis*¹

© 2023 г. Д. В. Кочкин^{а, с, *}, Е. В. Демидова^а, Е. Б. Глоба^а, Е. С. Плаголева^с,
Б. А. Галишев^б, А. М. Носов^{а, с}

^а Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^б Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

^с Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: dmitry-kochkin@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2022 г.

После доработки 19.06.2022 г.

Принята к публикации 21.06.2022 г.

Дитерпеноиды таксанового ряда (таксоиды) встречаются только у представителей семейства Тахасеае (разные виды тисов), однако уникальная структура и востребованные в медицине терапевтические свойства таксоидов сделали эти соединения одними из самых изучаемых вторичных метаболитов высших растений. В настоящей работе впервые проведено подробное изучение структурного разнообразия полиэфиров 14-гидроксилированных таксоидов у *Taxus canadensis* — вида тисов, для интактных растений которого неполярные 14-гидроксилированные таксоиды ранее описаны не были. На первом этапе работы с помощью хромато-масс-спектрометрии было показано, что в каллусной культуре клеток *T. canadensis* полиэфиры 14-гидроксилированных таксоидов (юннанксан, таксуюннанин С, синенксан В, синенксан С) являются доминирующими дитерпеноидными вторичными метаболитами. На основании этих результатов, а также описанного многими исследователями сходства метаболизма культивируемых *in vitro* растительных клеток и клеток корней *in planta*, высказано предположение, что в интактных растениях *T. canadensis* полиэфиры 14-гидроксилированных таксоидов преимущественно будут накапливаться в корнях. Справедливость этой гипотезы была подтверждена с помощью хромато-масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). По данным хромато-масс-спектрометрического скрининга в хвое *T. canadensis* полиэфиры 14-гидроксилированных таксоидов действительно обнаруживаются только в следовых количествах, а в корнях они являются одними из мажорных (в количественном отношении) дитерпеноидов. Один из основных 14-гидроксилированных таксоидов корней *T. canadensis* — юннанксан — был препаративно выделен в индивидуальном виде и однозначно идентифицирован с применением спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. Данная работа является первым сообщением о наличии полиэфиров 14-гидроксилированных таксоидов в интактных растениях тиса канадского.

Ключевые слова: *Taxus*, *Taxus canadensis*, дитерпеноиды, таксоиды, 14-гидроксилированные таксоиды, юннанксан, культура клеток

DOI: 10.31857/S0015330322600401, EDN: AMIVWU

ВВЕДЕНИЕ

Современный этап фитохимического изучения различных видов тиса (*Taxus* spp.) начался в 60-х годах XX века [1]. К настоящему времени достигнут значительных успехов в исследовании структурного разнообразия дитерпеноидов таксанового ряда — основных биологически-актив-

ных веществ в интактных растениях *Taxus* spp. [1, 2]. Так, сейчас известно более 500 индивидуальных таксоидов, которые могут быть разделены на 11 различных структурных типов/классов, и, по некоторым подсчетам, таксоиды составляют около 4% от числа известных в настоящее время дитерпеноидов растительного происхождения [1, 3]. Наиболее распространены среди видов *Taxus* spp. представители двух групп соединений [1, 4]: таксоиды с т.н. “нормальным” 6/8/6 таксановым скелетом и 11(15→1)-*abeo*-таксоиды (5/7/6 скелет).

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322600401 для авторизованных пользователей.

Первый тип таксоидов далее может быть разделен на несколько структурных подтипов, из которых наибольший интерес (с точки зрения количества индивидуальных структур, встречаемости в разных объектах *Taxus* spp. и/или практической значимости) вызывают 13-оксигенированные (в т.ч. гидроксильированные) (подгруппы таксина (таксин В, таксинин Е) и баккатина III (баккатин III, паклитаксел и др.)) таксоиды и 14-гидроксильированные (подгруппа тайванксана – таксуюннанин С, юннанксан и др.) таксоиды. Например, наиболее важным, с прикладной точки зрения, является 13-гидроксильированный таксоид паклитаксел (коммерческий синоним – “Таксол®”) – один из востребованных в лечении ряда онкологических заболеваний препаратов растительного происхождения [1, 4]. В настоящее время наблюдается некоторое замедление развития “статической” фитохимии видов *Taxus* spp. – число работ, посвященных описанию новых структур таксоидов, существенно сократилось. Поэтому наиболее актуальными становятся работы по изучению функциональных (физиолого-биохимических) аспектов образования и накопления разных групп таксоидов в интактных растениях и культивируемых *in vitro* клетках *Taxus* spp. Например, довольно слабо изучены закономерности распределения таксоидов разных структурных групп по органам и тканям интактных растений видов тиса.

Ранее нами было показано, что в суспензионной культуре клеток *in vitro* тиса канадского (*Taxus canadensis*) доминирующими дитерпеноидами являются полиэферы 14-гидроксильированных таксоидов (в частности, таксуюннанин С) [5]. Однако в литературе отсутствуют сведения о наличии полиэфиров 14-гидроксильированных таксоидов в интактных растениях *T. canadensis* [1–4]. На основании имеющихся в литературе сведений о заметном сходстве некоторых метаболических процессов (в т.ч. вторичного метаболизма) в клетках растений, культивируемых *in vitro*, и клетках корней *in planta* [6, 7] нами было выдвинуто предположение о том, что в интактных растениях *T. canadensis* полиэферы 14-гидроксильированных таксоидов будут преимущественно накапливаться в корнях. Проверке этой гипотезы и посвящена настоящая статья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Культура клеток. Каллусная культура клеток *Taxus canadensis* Marshall (линия Tc-msu/R-PB-PVP) получена в Институте физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН в 2008 г. на эксплантатах листового происхождения (донорное растение из Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) [8]. Для исследования использовали воздушно-сухую биомассу, собранную на 70 сутки выращивания (стационарная фаза роста) 43-го субкультивирова-

ния. Условия выращивания культуры описаны ранее [8].

Образцы интактных растений. Хвоя взрослых растений *T. canadensis*: шесть образцов с разных растений, которые выращиваются в Главном ботаническом саду имени Н. В. Цицина РАН (Москва) (собраны в июне 2018 г.; материал предоставлен О.И. Молкановой; далее обозначаются шифром ГБС РАН); один образец с растения из Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова (собраны в марте 2018 г.; материал предоставлен С.В. Купцовым; далее обозначается шифром МГУ). Хвоя и корни саженцев *T. canadensis* (5–7 лет, два растения, выращенные в Ботаническом саду-институте Поволжского государственного технологического университета, г. Йошкар-Ола; предоставлены Р.В. Сергеевым), собранные и высушенные в октябре–ноябре 2018 г. (далее обозначаются шифром ПГТУ). Поскольку для исследования были использованы ювенильные растения *T. canadensis*, которые по морфологии трудно отличить от других растений тиса [9], то видовая принадлежность была проверена и подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов (Дополнительные материалы, раздел 1; рис. 1). Все образцы растительного материала были высушены в термостате при 40°C. Фотографии использованных растений представлены на рисунках 2–4 Дополнительных материалов.

Фитохимический анализ. Подготовку проб экстрактов для хромато-масс-спектрометрии проводили по опубликованной ранее методике [10]. Хромато-масс-спектрометрический анализ экстрактов проводили с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией при ионизации электро-распылением (УЭЖХ-МС). УЭЖХ-МС параллельно приводили на двух разных приборах.

Хромато-масс-спектрометрия (методика 1; использовали для анализа образцов интактных растений и культуры клеток). Анализ осуществляли на хроматографе Waters ACQUITY UPLC (“Waters”, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (“Waters”, США). Условия анализа описаны ранее [11]. Эту же методику использовали для записи масс-спектров высокого разрешения для таксоида, выделенного из корней *T. canadensis*.

Хромато-масс-спектрометрия (методика 2; использовали для анализа образцов интактных растений). Анализ проводили на хроматографе ACQUITY UPLC H-Class PLUS (“Waters”, США), оснащенном гибридным времяпролетным масс-спектрометром Xevo G2-XS ToF (“Waters”, США). Пробу в объеме 0.1 мкл наносили на колонку Titan C18 (100 × 2.1 мм, 1.9 мкм; “Supelco”, США). Температура колонки составляла 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. В ка-

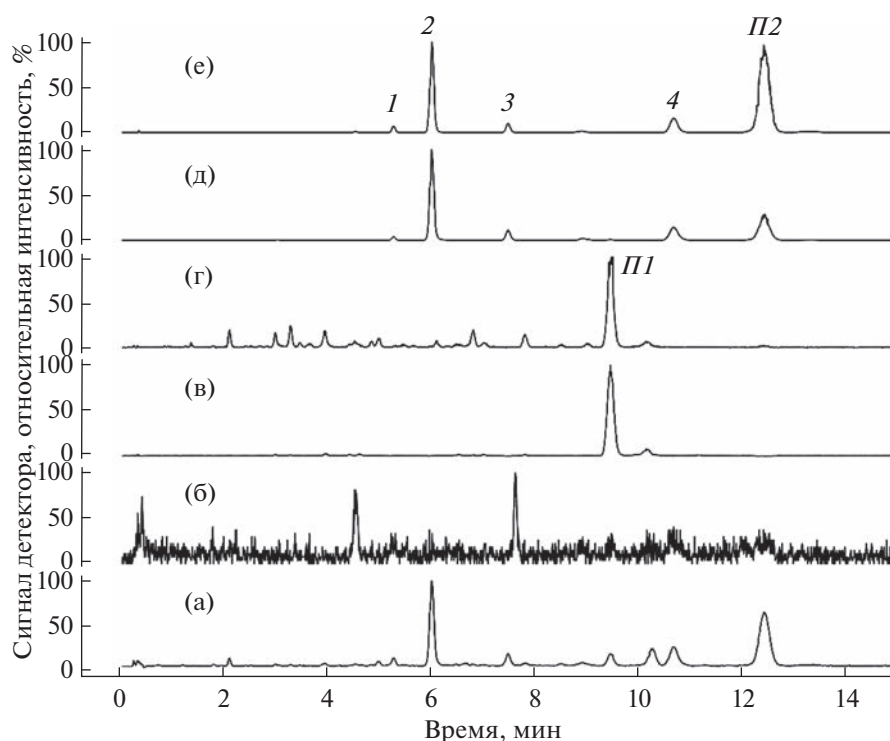


Рис. 1. Результаты УЭЖХ-МС (положительные ионы; методика №1 в Материалах и методах) скрининга таксоидов основных структурных групп (13-гидроксилированные, 14-гидроксилированные таксоиды) в образце экстракта из биомассы каллусной культуры клеток *T. canadensis* (линия Tc-msu/R-PB-PVP; 70 сутки выращивания 43-го субкультивирования). Представлена хроматограмма, записанная в режиме полного ионного тока (TIC; панель а), и результаты фильтрации сигнала TIC по значениям m/z конкретных характеристических (для разных структурных групп таксоидов) ионов (иона с m/z 509.2 (панель б), пар ионов с m/z 281.2/263.2 (панели в и г) и 283.2/265.2 (панели д и е). Идентифицированные таксоиды: 1 – юннанксан, 2 – таксуюннанин С, 3 – синенксан В, 4 – синенксан С. Примеси амидов жирных кислот: П1 – линолеамид, П2 – олеамид.

честве подвижной фазы использовали 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Для подготовки растворителя “А” использовали деионизированную воду (получена на установке Simplicity UV, “Millipore”, Франция). Ацетонитрил квалификации “LC-MS” (“Panreac”, Испания). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0–4.5 мин – 60 → 80%, 4.5–7.5 мин – 80 → 85%, 7.5–8 мин – 85 → 95%, 8–10.5 мин – 95%, 10.5–13.5 мин. – 95 → 60%. Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных ионов (диапазон m/z 100–1900). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 150°C, температура десольватации – 650°C, напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) – 1101 л/час. Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (“Waters”, США). Идентификацию компонентов проводили с помощью расшифровки масс-спек-

тров, сравнения хромато-масс-спектрометрических характеристик обнаруженных компонентов с данными литературы [1, 12–16], а также сопоставлением со стандартными образцами некоторых таксоидов. Коммерческие стандартные образцы 13-оксигенированных таксоидов: 7-xylosyl-10-deacetyl-taxol, 10-deacetyl-taxol, taxusin (“ChromaDex”, США); cephalomannine, baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, paclitaxel, docetaxel (“Sigma Aldrich”, США), 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, taxinin M (“TRC”, Канада). Стандартные образцы 14-гидроксилированных таксоидов таксуюннанина С и синенксана С ранее выделены в нашей лаборатории [5, 11]. Относительные стандартные отклонения для времен удерживания при анализе образцов таксоидов с помощью использованных методик УЭЖХ-МС анализа не превышали 3%. Нижний предел хромато-масс-спектрометрического определения таксоидов (по стандартным образцам) составлял 3.5 мкг/г сухого веса образцов.

Препаративное выделение таксоидов из корней *Taxus canadensis*. Препаративное выделение таксоидов осуществляли из 3.1 г высушенных и измельченных корней *T. canadensis* (растения ПГТУ) с по-

мощью комбинации колоночной хроматографии и полупрепаративной ТСХ согласно опубликованным методикам [14, 17].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР выделенного таксоида в хлороформе- d регистрировали на приборе Bruker Avance AV500 (“Bruker”, Германия), внутренний стандарт тетраметилсилан. Сигналы в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР были отнесены с помощью двумерных экспериментов ЯМР (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC и HMBC) [1, 14, 17]. Обработку результатов производили с помощью программы SpinWorks 4.2.10 (Dr. Kirk Marat, University of Manitoba, Канада).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (УЭЖХ-МС) было проведено подробное изучение качественного состава дитерпеноидов в биомассе каллусной культуры клеток *T. canadensis* (поддерживается в активно растущем состоянии более 7 лет). Запись всех хроматограмм проводили в режиме детектирования положительно заряженных ионов. Выбор именно этого режима масс-спектрометрического детектирования обусловлен следующими обстоятельствами: чувствительность масс-селективного детектора при анализе гидрофобных дитерпеноидов таксанового ряда значительно выше при детектировании положительных ионов; положительно заряженные ионы-аддукты таксоидов (вида $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$, $[\text{M} + \text{H}]^+$) подвержены достаточно быстрой фрагментации уже в источнике ионизации с образованием набора характеристических фрагментных ионов (в результате образуются “псевдотандемные” масс-спектры (МС-спектры), которые могут быть использованы для оперативной первичной структурной (в т.ч. групповой) идентификации таксоидов при ограниченном числе хроматографических разделений [12–14].

Из литературы известно [1, 12–16], что для экспрессной групповой идентификации таксоидов может быть использован ограниченный набор характеристических фрагментных/осколочных ионов. Например, для идентификации таксоидов группы паклитаксела можно использовать наличие в их МС-спектрах положительных ионов характерного осколочного иона с m/z 509.2. Для выявления в результатах хромато-масс-спектрометрии таксоидов с регулярным дитерпеновым “скелетом” такса-4(20),11-диена (13- и 14-гидроксированных) можно использовать следующие пары характеристических ионов (для соединений с разным числом заместителей в таксановом ядре/скелете): для производных, содержащих пять заместителей, — пара характеристических ионов с m/z 281.2

и 263.2); для соединений с четырьмя заместителями — пары характеристических ионов с m/z 283.2 и 265.2. Дальнейшая дифференциация 13-, 14-гидрокси таксоидов со скелетом такса-4(20),11-диена может быть осуществлена на основании более детальной расшифровки МС-спектров. Например, наличие/отсутствие и/или последовательность нейтральных потерь различных ацильных остатков (при фрагментации ионов-аддуктов $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ или $[\text{M} + \text{H}]^+$ в источнике ионизации): ацетата (нейтральные потери 77 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{NH}_3$), 60 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) и/или 42 Да ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$)), гидроксиметилбутановой (нейтральная потеря 118 Да ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$)), метилбутановой (нейтральная потеря 119 Да ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2 + \text{NH}_3$)) или коричной (нейтральная потеря 148 Да ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$)) кислот. Для идентификации можно также использовать сопоставление хроматографического и масс-спектрометрического поведения конкретных соединений со стандартными образцами и/или данными литературы [1, 12–16].

Результаты хромато-масс-спектрометрического скрининга таксоидов (по характеристическим ионам) разных структурных групп (13- и 14-гидроксированных) в биомассе каллусной культуры клеток *T. canadensis* представлены на рисунке 1. Установлено, что в данной культуре клеток присутствует не менее четырех разных таксоидов, которые элюируются с обращенно-фазовой хроматографической колонки в пределах 5–13 мин. В порядке уменьшения полярности (увеличения времени удерживания на хроматографической колонке с обращенной фазой) обнаруженные соединения обозначены номерами 1–4. Анализ результатов хромато-масс-спектрометрии и их сопоставление с данными литературы [1, 12–16] позволяют заключить, что соединения 1–4 являются таксановыми дитерпеноидами из структурной группы тайванксана (14-гидроксированные таксоиды). Данное заключение основывается на наличии в масс-спектрах соединений 1–4 пары характеристических ионов с m/z 283.2/265.2 (масс-спектры компонентов 1–4 представлены на рисунке 2), а также на хроматографических характеристиках этих соединений (более полярные 13-гидроксированные таксоиды из группы баккатина III элюируются в использованной хроматографической системе в пределах 0–6 минут; Дополнительные материалы, рис. 5). После детальной расшифровки масс-спектров компоненты 1–4 идентифицированы следующим образом: 1 — юннанксан, 2 — таксуюннанин С, 3 — синенксан В, 4 — синенксан С. Компоненты 2 и 4 идентифицированы также путем сравнения со стандартными образцами таксуюннанина С и синенксана С, выделенными нами ранее из культур клеток *Taxus* spp. [5, 11]. 13-гидроксированные таксоиды в биомассе культуры клеток *T. canadensis* в заметных количествах обнаружить не удалось. Таким образом, представ-

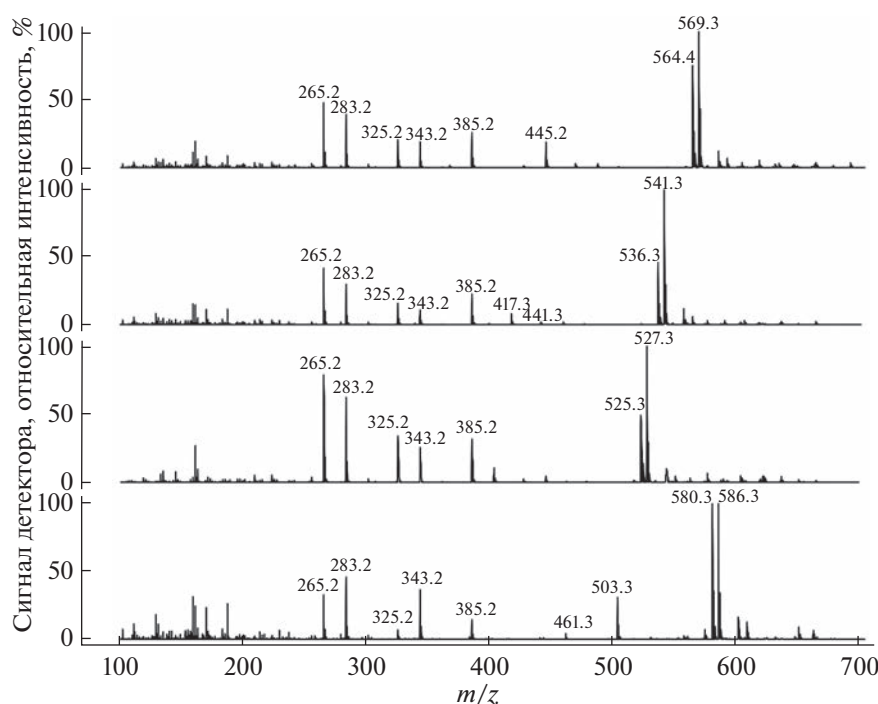


Рис. 2. Масс-спектры (положительные ионы; методика №1 в Материалах и методах), записанные для хроматографических пиков компонентов 1–4, обнаруженных в экстракте из биомассы каллусной культуры клеток *T. canadensis* (линия Tc-msu/R-PB-PVP; 70 суток выращивания 43-го субкультивирования). Порядок спектров на рисунке (снизу вверх) соответствует номерам компонентов 1–4: 1 – юннанксан, 2 – таксуюннанин С, 3 – синенксан В, 4 – синенксан С.

ленные результаты подтверждают полученную ранее информацию о доминировании в культивируемых *in vitro* клетках *T. canadensis* неполярных полиацелированных 14-гидроксилированных таксоидов [5]. Между тем, в доступной литературе отсутствуют сведения о наличии неполярных полиацелированных 14-гидроксилированных таксоидов в интактных растениях *T. canadensis* (один из четырех североамериканских видов тиса) [1, 2, 4]. Также стоит отметить, что фитохимическое изучение растений *T. canadensis* до настоящего времени в основном проводилось на примере хвои [18]. Известно, что по своему метаболизму клетки растений, культивируемые *in vitro*, имеют значительное сходство с клетками корней *in planta* [6, 7]. В частности, для евразийских видов тиса подробно описано разнообразие 14-гидроксилированных таксоидов в культурах клеток *in vitro*, а также в корнях и некоторых других гетеротрофных органах/тканях (древесина, ткани-производные камбия, кора) интактных растений [19–22]. Обобщая эту информацию можно высказать предположение, что в растениях *T. canadensis* неполярные полиацелированные 14-гидроксилированные таксоиды также в основном будут накапливаться в гетеротрофных органах/тканях, например, в корнях. Проверке (с помощью хромато-масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса) этой гипотезы и посвящен следующий этап нашей работы.

В целях исключения влияния характеристик хромато-масс-спектрометрического оборудования (возможное перекрестное загрязнение хроматографических колонок, различные условия и режимы эксплуатации и т.д.) на результаты анализа, УЭЖХ-МС экстрактов из хвои и корней растений *T. canadensis* параллельно проводили на разных хроматографических системах – ACQUITY UPLC XEVO QTOF (методика 1 в Материалах и методах) и ACQUITY UPLC H-Class PLUS Xevo G2-XS ToF (методика 2 в Материалах и методах). Необходимость подобной тщательной проверки результатов объясняется низким содержанием таксоидов в интактных растениях (часто содержание многих таксоидов не превышает 10^{-3} – $10^{-4}\%$ от сухой массы растительных тканей [4]), поэтому любое, даже незначительное, загрязнение хромато-масс-спектрометрической системы может существенно исказить результаты скрининга. Стоит отметить, что полученные с использование двух хроматографических систем результаты скрининга таксоидов в растениях *T. canadensis* оказались одинаковыми. На рисунке 3 приведены результаты скрининга, полученные с помощью методики 2 (Материалы и методы), а на рисунке 4 – УЭЖХ-МС хроматограмма (методика 1 в Материалах и методах) экстракта из корней *T. canadensis* (одно из растений ПГТУ). Установлено, что хвоя и корни *T. canadensis* действительно довольно сильно отличаются по составу таксоидов: в хвое присутствуют

Шифр образцов <i>T. canadensis</i>	C13-оксигенированные/ гидроксилированные таксоиды										C14-гидроксилированные таксоиды				
	10-деацетилтаксол	Ацетил-9-дигидробаккатин III	Деацетил-7-ксилозилтаксол	Таксузин	Баккатин III	Паклитаксел	Деацетоксиавстропикатин	13-оксо-10-деацетилбаккатин III	10-деацетилбаккатин III	Цефаломаннин	Таксинин М	Юннанксан	Синексан В	Таксуюннанин С	Синенксан С
	Хвоя														
ПГТУ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
МГУ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ГБС РАН	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Корни														
ПГТУ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Рис. 3. Результаты УЭЖХ-МС скрининга (методика №2 в Материалах и методах) таксоидов основных структурных групп (13-гидроксилированные, 14-гидроксилированные таксоиды) в образцах экстрактов из корней и хвои разных интактных растений *T. canadensis*. Шифры образцов растений: ПГТУ – растения из Ботанического сада-института Поволжского государственного технологического университета (по два образца корней и хвои); МГУ – растение из Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова (один образец хвои); ГБС РАН – растения из Главного ботанического сада РАН (шесть образцов хвои). Обозначения: красный цвет – таксоид обнаружен; синий цвет – таксоид не обнаружен; розовый цвет – таксоид обнаружен в следовых количествах (менее 3.5 мкг/г сухого веса образцов).

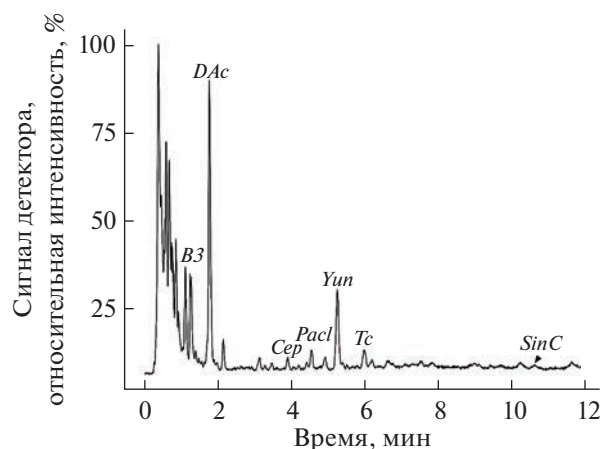


Рис. 4. УЭЖХ-МС хроматограмма экстракта из корней интактных растений *T. canadensis* (растение из Ботанического сада-института Поволжского государственного технологического университета), записанная в режиме полного ионного тока (TIC) положительные ионы; методика №1 в Материалах и методах). Обозначения: B3 – баккатин III; DAc – деацетоксиавстропикатин; Cep – цефаломаннин; PacI – паклитаксел; Yun – юннанксан; Tc – таксуюннанин С; SinC – синенксан С.

почти исключительно 13-гидроксилированные, а в корнях – и 13- и 14-гидроксилированные таксоиды. При этом в корнях *T. canadensis*, судя по интенсивности соответствующих хроматографических пиков, 14-гидроксилированные таксоиды являются одними из доминирующих в количественном отношении компонентов (рис. 4; основной компонент – юннанксан). Для подтверждения структурной идентификации основной (в количественном отношении) 14-гидроксилированный таксоид был препаративно выделен в индивидуальном виде из корней *T. canadensis* (**компонент I**, выход составил 0.07% от сухого веса корней) и исследован с помощью спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения.

¹H-ЯМР спектр **компонента I** содержал сигналы трех метильных групп ацетильных остатков (при 2.05, 2.08 и 2.19 м.д. (миллионные доли), все синглеты), четырех третичных метильных групп (при 2.10, 1.69, 1.15 и 0.94 м.д., все синглеты), четырех замещенных (сложноэфирной функцией) метиновых групп (при 5.37 м.д., дублет дублетов, $J = 5.5, 2.4$ Гц, H-2; 6.08 м.д., дублет дублетов, $J = 12.2, 6.3$ Гц, H-10; 5.32 м.д., триплет, $J = 2.9$ Гц,

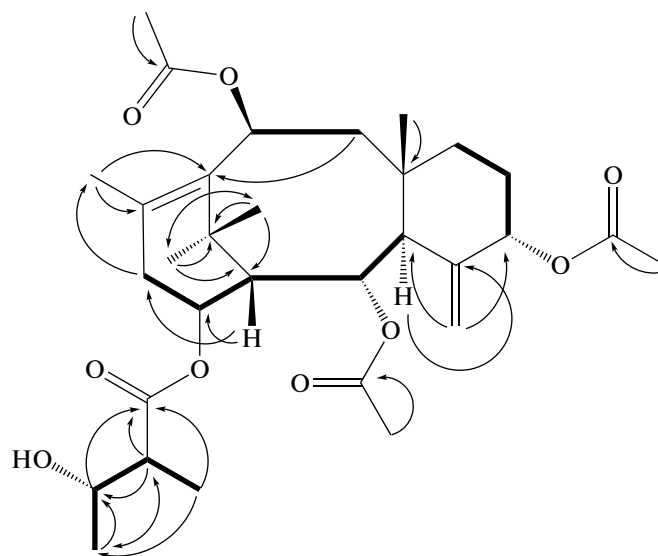


Рис. 5. Структура и ключевые ^1H - ^1H COSY (жирные линии) и ^1H - ^{13}C HMBC (изогнутые стрелки) ЯМР корреляции компонента **I**, выделенного из корней *T. canadensis*.

Н-5; 5.06 м.д., дублет дублетов, $J = 9.2, 4.4$ Гц, Н-14), двух экзо-олефиновых протонов (при 5.23 и 4.85 м.д., синглет и триплет ($J = 1.2$ Гц), 2Н-20) и 2'-метил-3'-гидрокси-бутановой кислоты (при 2.37 м.д., 1Н, мультиплет, Н-2'; 3.88 м.д., 1Н, триплет, $J = 6.6$ Гц, Н-3'; 1.18 м.д., 3Н, дублет, $J = 7.1$ Гц, 3Н-5'; 1.23 м.д., 3Н, дублет, $J = 6.4$ Гц, 3Н-4'). Результаты расшифровки ^{13}C -ЯМР спектра соединения **I** представлены в Дополнительных материалах, табл. 1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что выделенное соединение имеет скелет такса-4(20),11-диена, замещенного гидроксильными группами в положениях С-2, С-5, С-10 и С-14. Эти гидроксильные группы ацилированы тремя остатками уксусной кислоты и остатком 2'-метил-3'-гидрокси-бутановой кислоты соответственно. Стереохимия заместителей в молекуле компонента **I** установлена на основании анализа величин констант спин-спинового взаимодействия соответствующих протонов и сопоставления их с данными литературы [14, 17]. Таким образом, на основании расшифровки ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектров соединения **I** и анализа литературы установлено, что это соединение имеет структуру $2\alpha, 5\alpha, 10\beta$ -триацетокси-14 β -(2'-метил-3'-гидрокси)бутирилокси-4(20),11-таксадиена и соответствует юннанксану (рис. 5), который впервые был выделен из коры *T. yunnanensis* [23]. Описанная структура также подтверждается результатами масс-спектрометрии высокого разрешения соединения **I**: формула $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_9$ согласуется с наличием в спектре положительных ионов этого соединения сигналов ионов-аддуктов с m/z 580.3472 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (расчет – 580.3486), 585.3045 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (расчет – 585.3040) и 601.2746 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (расчет – 601.2779). Таким об-

разом, результаты прямой идентификации препаративно выделенного мажорного таксоида из корней *T. canadensis* подтверждают данные хромато-масс-спектрометрии (рис. 4) – в изученном образце доминирующим 14-гидроксилированным таксоидом является юннанксан.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые с помощью различных методов (хромато-масс-спектрометрия, спектроскопия ЯМР) показано, что характерные для культивируемых *in vitro* клеток *Taxus* spp. полиэфиры 14-гидроксилированных таксоидов [5, 11] в интактных растениях *T. canadensis* накапливаются преимущественно в корнях. Следует подчеркнуть, что это первое сообщение об обнаружении в интактных растениях *T. canadensis* неполярных полиацелированных 14-гидроксилированных таксоидов вообще, и юннанксана в частности. Ранее подобные производные были идентифицированы только в культивируемых *in vitro* клетках канадского тиса [5]. В интактных растениях *T. canadensis* задокументировано присутствие свободных спиртов и гликозидов 14-гидрокси таксоидов [24, 25].

Отсутствие в литературе сведений о наличии полиэфиров 14-гидроксилированных таксоидов в интактных растениях *T. canadensis* вероятно можно объяснить тем, что для этого вида тиса до настоящего времени фитохимическое изучение в основном проводилось для образцов хвои [18, 24, 25]. Обобщая разрозненные данные литературы [19–22] можно заключить, что для других видов *Taxus* spp. 14-гидроксилированные таксоиды преимущественно обнаруживаются в образцах гетеротрофных органов/тканей (корни, древесина,

ткани-производные камбия, кора), а вот выделение этих соединений из хвои тисов является весьма редким, уникальным событием. Примечательно, что изложенные в настоящей работе результаты получены для *T. canadensis* — вида тиса, занимающего особое положение в семействе Taxaceae. Этот вид отличается от других видов тиса стратегией размножения [26–28], ареалом распространения, эколого-физиологическими характеристиками [29], фитохимическим составом [30] и филогенезом [31]. Между тем, закономерности образования 14-гидроксированных таксоидов (преимущественное накопление в гетеротрофных клетках культивируемых *in vitro* и функционирующих *in planta* (прежде всего — в корнях)) у *T. canadensis* имеют значительное сходство с другими видами тиса. Принимая во внимание это обстоятельство можно предположить, что выявленная новая закономерность распределения 14-ОН таксоидов по интактным растениям будет справедлива для всех видов *Taxus* spp. Однако для подтверждения этого предположения требуются дополнительные исследования.

Настоящее исследование имеет одну важную особенность: принципиально новая информация о преимущественном накоплении полиэфиров 14-гидроксированных таксоидов в корнях *T. canadensis* была спрогнозирована на основании уже имеющихся результатов, свидетельствующих о присутствии данных компонентов в культурах клеток *in vitro* этого вида тиса [5]. Этот прогноз был основан на предположении о существенном сходстве метаболизма (первичного и вторичного) в клетках растений *in vitro* и клетках корней *in planta*, которое, в свою очередь, базируется на трех группах фактов. 1. Еще в 1970–80-х гг. Р. Г. Бутенко сформулировала и обосновала постулат о том, что основным типом культивируемых *in vitro* клеток растений (вне зависимости от способа выращивания — поверхностного (калусные культуры) или глубинного (суспензионные культуры)) является калусная клетка [32]. 2. Результаты современных молекулярно-генетических исследований показали значительную близость молекулярных механизмов регуляции формирования и развития калусных тканей и корней (боковых, адвентивных и т.д.) растений [6, 33, 34]. 3. Внешние условия, в которых “существуют” растительные клетки *in vitro*, весьма напоминают условия, окружающие клетки растений в корнях *in planta* (наличие обильных внешних источников углеводов, отсутствие регулярного освещения и возможность периодического дефицита кислорода, которое предопределяет необходимость быстрого переключения начальных этапов энергетического метаболизма на пути спиртового брожения) [7]. В совокупности все эти данные позволяют объяснить, почему вторичный метаболизм культивируемых *in vitro* клеток растений часто напоминает специализиро-

ванный метаболизм в корнях соответствующих видов растительных организмов. Таким образом, представленная работа может рассматриваться в качестве первого конкретного примера новой стратегии фитохимического скрининга, заключающегося в использовании результатов изучения вторичных метаболитов в культурах клеток определенного растения в качестве основы для прогнозирования и целенаправленного поиска специфических для корней (возможно и других гетеротрофных органов/тканей) данного растения специализированных метаболитов. Однако применимость этой стратегии для изучения самых разных видов растений требует дальнейшей проверки.

Авторы выражают благодарность О.И. Молчановой, С.В. Купцову и Р.В. Сергееву за предоставление растительного материала тиса канадского, а также А.А. Меденцовой за помощь в подготовке проб для химического анализа. Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-54-00014 Бел_а.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Y.-F., Shi Q.-W., Dong M., Kiyota H., Gu Y.-C., Cong B. Natural taxanes: Developments since 1828 // Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 7652. <https://doi.org/10.1021/cr100147u>
2. Lange B.M., Conner C.F. Taxanes and taxoids of the genus *Taxus* — A comprehensive inventory of chemical diversity // Phytochemistry. 2021. V. 190. P. 112829. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112829>
3. Johnson S.R., Bhat W.W., Bibik J., Turmo A., Hamberger B., Evolutionary Mint Genomics Consortium, Hamberger B. A database-driven approach identifies additional diterpene synthase activities in the mint family (Lamiaceae) // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 1349. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006025>
4. Baloglu E., Kingston D.G.I. The taxane diterpenoids // J. Nat. Prod. 1999. V. 62. P. 1448. <https://doi.org/10.1021/np990176i>
5. Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Kuznetsov V.V., Nosov A.M. Detection of taxuyunnanin C in suspension cell culture of *Taxus canadensis* // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. V. 485. P. 129. <https://doi.org/10.1134/S1607672919020145>
6. Shin J., Seo P.J. Varying auxin levels induce distinct pluripotent states in callus cells // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1563. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01653>
7. Wink M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids // Cell Culture in Phytochemistry / Eds. F. Constabel, I. Vasil. K. Academic Press, 1987. P. 17.
8. Globa E.B., Демидова Е.В., Туркин В.В., Макарова С.С., Носов А.М. Каллусогенез и получение суспензионных культур клеток четырех видов тисса: *Taxus*

- canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata* и *T. media* // Биотехнология. 2009. Т. 3. С. 54.
9. Elpe C., Knopf P., Stützel T., Schulz C. Diversity and evolution of leaf anatomical characters in Taxaceae s.l. — fluorescence microscopy reveals new delimitating characters // J. Plant Res. 2018. V. 131. P. 125. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0973-x>
 10. Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Гайсинский В.В., Кочкин Д.В. Получение и характеристика каллусной и суспензионной культур клеток тиса Валиха (*Taxus wallichiana* Zuss.) // Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова. 2018. Т. 2. С. 18. <https://doi.org/10.25587/SVFU.2018.64.12127>
 11. Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Galishev B.A., Kolotyckina N.G., Kuznetsov V.V., Nosov A.M. Occurrence of 14-hydroxylated taxoids in the plant *in vitro* cell cultures of different yew species (*Taxus* spp.) // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. V. 476. P. 337. <https://doi.org/10.1134/S1607672917050131>
 12. Madhusudanan K. P., Chattopadhyay S. K., Tripathi V., Sashidhara K. V., Kumar S. MS/MS profiling of taxoids from the needles of *Taxus wallichiana* // Phytochem. Anal. 2002. V. 13. P. 18. <https://doi.org/10.1002/pca.610>
 13. Madhusudanan K.P., Chattopadhyay S.K., Tripathi V.K., Sashidhara K.V., Kukreja A.K., Jain S.P. LC-ESI-MS analysis of taxoids from the bark of *Taxus wallichiana* // Biomed. Chromatogr. 2002. V. 16. P. 343. <https://doi.org/10.1002/bmc.163>
 14. Zhao C. F., Yu L. J., Li L. Q., Xiang F. Simultaneous identification and determination of major taxoids from extracts of *Taxus chinensis* cell cultures // Z. Naturforsch. C, J. Biosci. 2007. V. 62. P. 1. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-1-201>
 15. Morikawa K., Tanaka K., Li F., Awale S., Tezuka Y., Nobukawa T., Kadota S. Analysis of MS/MS fragmentation of taxoids // Nat. Prod. Commun. 2010. V. 5. P. 1551. <https://doi.org/10.1177/1934578x1000501007>
 16. Sanchez-Muñoz R., Perez-Mata E., Almagro L., Cusido R.M., Bonfill M., Palazon J., Moyano E. A Novel Hydroxylation Step in the Taxane Biosynthetic Pathway: A New Approach to Paclitaxel Production by Synthetic Biology // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. P. 410. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00410>
 17. Ma W., Stahlhut R.W., Adams T.L., Park G.L., Evans W.A., Blumenthal S.G., Gomez G.A., Nieder M.H., Hylands P.J. Yunnanxane and its homologous esters from cell cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* // J. Nat. Prod. 1994. V. 57. P. 1320. <https://doi.org/10.1021/np50111a027>
 18. Shi Q.-W., Sauriol F., Mamer O., Zamir L. O. New minor taxane derivatives from the needles of *Taxus canadensis* // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. P. 1480. <https://doi.org/10.1021/np000053u>
 19. Topcu G., Sultana N., Akhtar F., Habib ur r., Hussain T., Choudhary M. I., Atta-ur R. Taxane diterpenes from *Taxus baccata* // Nat. Prod. Let. 1994. V. 4. P. 93. <https://doi.org/10.1080/10575639408044919>
 20. Banskota A.H., Usia T., Tezuka Y., Kouda K., Nguyen N.T., Kadota S. Three new C-14 oxygenated taxanes from the wood of *Taxus yunnanensis* // J. Nat. Prod. 2002. V. 65. P. 1700. <https://doi.org/10.1021/np020235j>
 21. Zhang H., Takeda Y., Minami Y., Yoshida K., Matsumoto T., Xiang W., Mu O., Sun H. Three new taxanes from the roots of *Taxus yunnanensis* // Chem. Let. 1994. V. 23. P. 957. <https://doi.org/10.1246/cl.1994.957>
 22. Gabetta B., Peterlongo F., Zini G., Barboni L., Rafaiani G., Ranzuglia P., Torregiani E., Appendino G., Cravotto G. Taxanes from *Taxus x media* // Phytochemistry. 1995. V. 40. P. 1825. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00474-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00474-L)
 23. Chen W. M., Zhang P. L., Wu B., Zheng Q. T. Studies on the chemical constituents of *Taxus yunnanensis* // Yao Xue Xue Bao. 1991. V. 26. P. 747. [In Chinese].
 24. Shi Q.-W., Dong M., Huo C.-H., Su X.-H., Li C.-F., Zhang X.-P., Wang Y.-F., Kiyota H. New 14-Hydroxytaxane and 2 α ,20-Epoxy-11(15 $\rightarrow$ 1)abeotaxane from the needles of *Taxus canadensis* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. V. 71. P. 1777. <https://doi.org/10.1271/bbb.70063>
 25. Li N., Wang J., Yan H.-M., Zhang M.-L., Shi Q.-W., Sauriol F., Kiyota H., Dong M. Two new taxane-glycosides from the needles of *Taxus canadensis* // Z. Naturforsch. B. 2015. V. 70 P. 829. <https://doi.org/10.1515/znb-2015-0074>
 26. Allison T. Self-fertility in Canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.) // J. Torrey Bot. Soc. 1993. V. 120. P. 115. <https://doi.org/10.2307/2996940>
 27. Wilson P., Buonopane M., Allison T. Reproductive biology of the monoecious clonal shrub *Taxus canadensis* // Bull. Torrey Bot. Club. 1996. V. 123. P. 7. <https://doi.org/10.2307/2996301>
 28. Collins D., Mill R.R., Möller M. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis*, and *T. cuspidata* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data // Am. J. Bot. 2003. V. 90. P. 175. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.2.175>
 29. Windels S.K.W.K., Flaspohler D.J.F.J. The ecology of Canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.): A review // Botany. 2011. V. 89. P. 1. <https://doi.org/10.1139/B10-084>
 30. van Rozendaal E.L.M., Kurstjens S.J.L., van Beek T.A., van den Berg R. G. Chemotaxonomy of *Taxus* // Phytochemistry. 1999. V. 52. P. 427. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00229-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00229-0)
 31. Möller M., Liu J., Li Y., Li J.-H., Ye L.-J., Mill R., Thomas P., Li D.-Z., Gao L.-M. Repeated intercontinental migrations and recurring hybridizations characterise the evolutionary history of yew (*Taxus* L.) // Mol. Phylogenet. Evol. 2020. V. 153. P. 106952. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106952>
 32. Butenko R.G. Some features of cultured plant cell // Plant cell culture. Advances in science and technology in the USSR / Ed. R.G. Butenko. Mir Publishers. 1985. P. 11.
 33. Fan M., Xu C., Xu K., Hu Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration // Cell Res. 2012. V. 22. P. 1169. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.63>
 34. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: Mechanisms of induction and repression // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 3159. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>