_____ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ _____ СТАТЬИ

УДК 581.1

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

© 2023 г. Д. В. Кочкин^{*a*, *c*, *, Е. В. Демидова^{*a*}, Е. Б. Глоба^{*a*}, Е. С. Глаголева^{*c*}, Б. А. Галишев^{*b*}, А. М. Носов^{*a*, *c*}}

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

 b Φ едеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

^с Федеральное государственное бюджетное образовательное 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 вилы 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 успех в исследовании структурного разнообразия дитерпеноидов таксанового ряда — основных биологически-активных 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 $11(15\rightarrow 1)$ -*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. гидроксилированные) (подгруппы таксина (таксин В, таксинин Е) и баккатина III (баккатин III, паклитаксел и др.)) таксоиды и 14-гидроксилированные (подгруппа тайванксана – таксуюннанин С, юннанксан и др.) таксоиды. Например, наиболее важным, с прикладной точки зрения, является 13-гидроксилированный 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 полиэфиры 14-гидроксилированных таксоидов (в частности, таксуюннанин С) [5]. Однако в литературе отсутствуют сведения о наличии полиэфиров 14-гидроксилированных 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 полиэфиры 14-гидроксилированных 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 эксплантах 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 субкультивирования. Условия выращивания культуры описаны ранее [8].

Образцы интактных растений. Хвоя взрослых растений T. canadensis: шесть образцов с разных растений, которые вырашиваются в Главном ботаническом салу имени Н. В. Цишина 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. (лалее 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 молекулярногенетических методов (Дополнительные материалы, раздел 1; рис. 1). Все образцы растительного материала были высушены в термостате при 40°С. 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 электрораспылением (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°С, 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: *I* – 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"("Рапгеас", Испания). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0-4.5 мин $-60 \rightarrow 80\%$, 4.5-7.5 мин $-80 \rightarrow 85\%$, 7.5-8 мин $-85 \rightarrow 95\%$, 8-10.5 мин - 95%, $10.5-13.5 \text{ мин} - 95 \rightarrow 60\%$. Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных ионов (диапазон m/z 100-1900). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 150°С, температура десольвации – 650°С, напряжение на капилляре – 3.0 кB, напряжение на конусе ввода пробы -30 B, 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-спектров, 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-deacetyltaxol, 10-deacetyltaxol, taxusin ("ChromaDex", CIIIA); cephalomannine, baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, paclitaxel, docetaxel ("Sigma Aldrich", CША), 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 помощью комбинации колоночной хроматографии и полупрепаративной TCX согласно опубликованным методикам [14, 17].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (УЭЖХ-МС) было проведено подробное изучение качественного состава литерпеноилов 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 ионыаддукты таксоидов (вида $[M + NH_4]^+, [M + H]^+$) 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-гидроксилированных) 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-, 14гидрокси таксоидов со скелетом такса-4(20),11диена 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 $[M + NH_4]^+$ или $[M + H]^+$ в источнике ионизации): ацетата (нейтральные потери 77 ($C_2H_4O_2 + NH_3$), 60 $(C_2H_4O_2)$ и/или 42 Да (C₂H₂O)), гидроксиметилбутановой (нейтральная потеря 118 Да ($C_5H_{10}O_3$)), метилбутановой (нейтральная потеря 119 Да $(C_5H_{10}O_2 + NH_3))$ или коричной (нейтральная потеря 148 Да (C₉H₈O₂)) 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-гидроксилированных) 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 порялке 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-гидрокислированные 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-гидроксилированные 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-гидроксилированные 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 сутки 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.

400

m/z

500

600

700

300

ленные результаты подтверждают полученную ранее информацию о доминировании в культивируемых in vitro клетках T. canadensis неполярных полиацилированных 14-гидроксилированных таксоидов [5]. Между тем, в доступной литературе отсутствуют сведения о наличии неполярных полиацилированных 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 полиацилированные 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.

100

200

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 pacтений ПГТУ). Установлено, что хвоя и корни T. canadensis действительно довольно сильно отличаются по составу таксоидов: в хвое присутствуют

КОЧКИН и др.



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: В3 – баккатин III; DAc – деацетоксиавстроспикатин; Сер – цефаломаннин; Pacl – паклитаксел; Yun – юннанксан; Tc – таксуюннанин C; SinC- синенксан C.

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.

¹Н-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 =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,

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 70 № 1 2023



Рис. 5. Структура и ключевые ${}^{1}H{}^{-1}H$ COSY (жирные линии) и ${}^{1}H{}^{-13}C$ 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, H-14), двух экзо-олефиновых протонов (при 5.23 и 4.85 м.д., синглет и триплет (J = 1.2 Гц), 2H-20) и 2'-метил-3'-гидрокси-бутановой кислоты (при 2.37 м.д., 1H, мультиплет, H-2'; 3.88 м.д., 1H, триплет, J = 6.6 Гц, H-3'; 1.18 м.д., 3H, дублет, J = 7.1Гц, 3H-5'; 1.23 м.д., 3H, дублет, J = 6.4 Гц, 3H-4'). Результаты расшифровки ¹³С-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 ¹Н-и ¹³С-ЯМР спектров соединения I и анализа литературы установлено, что это соединение имеет структуру 2α,5α,10β-триацетокси-14β-(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 С₃₁Н₄₆О₉ согласуется с наличием в спектре положительных ионов этого соединения сигналов ионоваддуктов с *m/z* 580,3472 [M + NH₄]⁺ (расчет – 580.3486), 585.3045 [М + Na]⁺ (расчет – 585.3040) и 601.2746 [M + K]⁺ (расчет – 601.2779). Таким образом, 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 настояшей работе впервые с помошью 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 полиацилированных 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 Тахасеае. Этот вид отличается от других видов тиса стратегией размножения [26–28], ареалом распространения, эколого-физиологическими характеристиками [29], фитохимическим составом [30] и филогенезом [31]. Межу тем, закономерности образования 14-гидроксилированных 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 исслелования.

Настоящее исследование имеет одну важную особенность: принципиально новая информация о преимущественном накоплении полиэфиров 14-гидроксилированных 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 (каллусные культуры) или глубинного (суспензионные культуры)) является каллусная клетка [32]. 2. Результаты современных молекулярно-генетических исследований показали значительную близость молекулярных механизмов регуляции формирования и развития каллусных тканей и корней (боковых, адвентивных и т.д.) растений [6, 33, 34]. З. 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 освешения 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 специализированный 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 специфичных 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. Молкановой, 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 какихлибо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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
- 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
- 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
- Baloglu E., Kingston D.G.I. The taxane diterpenoids // J. Nat. Prod. 1999. V. 62. P. 1448. https://doi.org/10.1021/np990176i
- 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
- 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. Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Туркин В.В., Макарова С.С., Носов А.М. Каллусогенез и получение суспензионных культур клеток четырех видов тисса: Taxus

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 70 № 1 2023

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
- Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Гайсинский В.В., Кочкин Д.В. Получение и характеристика каллусной и суспензионной культур клеток тиса Валлиха (*Taxus wallichiana* Zucc.) // 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., Kolotyrkina 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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/pr50111e027
 - https://doi.org/10.1021/np50111a027
- 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
- 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
- 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

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 70 № 1 2023

- 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
- 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
- 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 2α,20-Epoxy-11(15→1)abeotaxane from the needles of Taxus canadensis // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. V. 71. P. 1777. https://doi.org/10.1271/bbb.70063
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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