

УДК 581.1

ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *IN VITRO* *Taxus* spp.

© 2023 г. С. В. Томилова^{а, *}, Е. Б. Глоба^а, Е. В. Демидова^а, А. М. Носов^{а, б, **}

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

*e-mail: lanatomilova@yandex.ru

**e-mail: al_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.2022 г.

После доработки 23.12.2022 г.

Принята к публикации 23.12.2022 г.

Род *Taxus* (тис) является источником ряда фармацевтически ценных веществ, в частности паклитаксела (таксола) – сложного дитерпеноидного соединения с мощным противоопухолевым действием (коммерческое название – Taxol®). Паклитаксел является одним из самых успешных препаратов в химиотерапии, благодаря своему специфическому действию на подавление пролиферации опухолевых клеток в опухолях путем стабилизации их микротрубочек. Мировой спрос на таксол составляет 800–1000 кг в г., и этот показатель ежегодно увеличивается на 20%. Растущая потребность в паклитакселе и его производных и, как следствие, дефицит растительных ресурсов для их получения, сделал соединения таксанового ряда одним из наиболее важных объектов для разработки биотехнологических способов их производства. Из всех возможных методов получения таксола (из дикорастущих или выращенных на плантациях деревьев, полный химический синтез или полусинтез, использование культур клеток тиса, технологии метаболической инженерии, использование эндофитных грибов тиса) наиболее многообещающим представляется промышленное выращивание культур клеток *Taxus* spp. В представленном обзоре проведен анализ работ, посвященных изучению вторичного метаболизма в дедифференцированных клетках *in vitro* разных видов тиса и возможностям промышленного применения культур клеток для получения таксоидов. Выявлен ряд закономерностей, характерных для культур клеток *Taxus* spp.: для цитофизиологических аспектов – сложность получения культур клеток, их низкие ростовые характеристики, специфические среды и условия культивирования; для фитохимических аспектов – отличия, по сравнению с интактными растениями, в качественном составе и количественном содержании вторичных метаболитов, которые обусловлены спецификой культуры клеток как биологической системы; образование преимущественно С14-гидроксированных, но не С13-гидроксированных таксоидов; возможность повышения уровня содержания таксоидов – в том числе коммерчески ценных (паклитаксела, бакатина III) с применением различных подходов (элиситация, стрессовые воздействия, двухфазное культивирование и ряд других); для биотехнологических аспектов – возможность промышленного выращивания культур клеток тиса; наличие нескольких успешных производств (Германия, Республика Корея).

Ключевые слова: *Taxus* spp., вторичный метаболизм, культура клеток высших растений, паклитаксел, таксоиды, тис

DOI: 10.31857/S0015330322600784, EDN: IBVNQP

ВВЕДЕНИЕ

Род *Taxus*, широко известный как тис, относится к голосеменным растениям семейства *Taxaceae*. Тис является источником фармацевтически ценных соединений, в частности противоопухолевого препарата Taxol® (паклитаксел) [1].

Паклитаксел – это один из самых успешных препаратов в химиотерапии, годовой объем его продаж в 2000 г. превысил 1.5 миллиарда долларов США. Однако история его применения имела

много сложностей, и в ряде случаев он был практически отброшен как лидирующий препарат (низкая растворимость в воде, структурная сложность, отсутствие большого и возобновляемого запаса ресурсов для получения чистого вещества) [2].

Мировой спрос на таксол составляет 800–1000 кг в г., при этом показатель растет со скоростью 20% ежегодно. Содержание паклитаксела в коре тиса находится на уровне 0.01–0.03%, при этом для полного режима противоопухолевого лечения требуется до 2 г чистого вещества. Высокий спрос

на растение в сочетании с низким накоплением целевого соединения и медленным ростом дерева привели к риску полного уничтожения многих видов рода *Taxus* [3].

Первоначально для получения паклитаксела осуществлялся сбор коры тихоокеанских тисов (*T. brevifolia* Nutt.). Однако из-за ограниченной доступности целевого соединения (0.01% от сухого веса коры), медленного роста растения и запрета на экспорт растительного продукта (поскольку удаление коры в массовом порядке приводит к гибели дерева) спрос на альтернативные источники противоопухолевого вещества значительно возрос. К альтернативным способам получения таксола можно отнести плантационные посадки, полный химический синтез, полусинтез (химический синтез из баккатина III и 10-деацетилбаккатина III), культуры клеток *in vitro* *Taxus* spp., создание продуцентов (в том числе бактериальных и грибных) методами метаболической инженерии, использование эндофитных грибов тиса [4, 5].

В 1991 г. начали изучать микроорганизмы — эндофиты *T. brevifolia* в поисках гриба или бактерии, которые могли бы продуцировать паклитаксел *de novo*. Несмотря на способность эндофитных грибов тиса продуцировать целевое соединение, скорость образования и концентрация вещества оставались очень низкими [5, 6].

В 1994 г. впервые было сообщено о полном химическом синтезе паклитаксела [5]. Считается, что его биосинтез в растении включает приблизительно 19–20 стадий [7–9]. Паклитаксел представляет собой сложную молекулу, содержащую более 11 хиральных центров и уникальную химию оксетанового кольца, его полный органический синтез до сих пор не привел к каким-либо экономически эффективным способам получения соединения. Промежуточный продукт паклитаксела, 10-деацетилбаккатин III, был химически модифицирован для получения полусинтетической версии таксола в 1990 г. и использовался в качестве основного пути поставки соединения компанией Bristol Myers Squibb более десяти лет [5, 10].

Культуры клеток *Taxus* spp. считаются многообещающим способом производства высококачественного растительного сырья для выделения паклитаксела [8]. В 1991 г. был выдан первый патент на суспензионную культуру клеток *T. brevifolia* для получения таксола (заявленный выход соединения — 1–3 мг/л). В 1995 г. компания Phyton Biotech лицензировала свой процесс производства вещества для Bristol Myers Squibb. В настоящее время мировые поставки паклитаксела осуществляются компанией Phyton Biotech (Германия) [11].

Целью настоящего обзора является рассмотрение основных закономерностей вторичного метаболизма в культуре клеток *Taxus* spp.

СИСТЕМАТИКА И РАСПРОСТРАНЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА *Taxus*

Род *Taxus* — это хвойные деревья или кустарники семейства *Taxaceae* высотой 3–9 м, редко до 25 м. Разные виды тиса широко распространены во влажных лесах умеренной зоны по всему миру, особенно на Тихоокеанском и Атлантическом побережьях, в районах Великих озер Северной Америки, в Западной, Северной и Южной Европе, Алжире, на юго-востоке России, в Восточном Китае, Непале, Бирме, Лаосе, Таиланде, Вьетнаме, Иране, на островах Суматра и Целебес [12, 13].

T. baccata L. был первым видом тиса, который описан Карлом Линнеем в 1753 г. На сегодняшний день по морфологическим признакам выделяют 24 вида и 55 разновидностей рода *Taxus* [12, 13].

Виды подразделяются на три группы по различиям в эпидермальных и устьичных признаках листьев. Группа *Wallichiana* с 11 видами встречается от центральных Гималаев до Индонезии и Филиппин, в Северной Америке (на северо-западе Тихого океана) и от Мексики до Центральной Америки с изолированным появлением во Флориде; группа *Baccata* с 9 видами — в умеренной Евразии, Северной Африке и восточной части Северной Америки; группа *Sumatrana* с 4 видами перекрывается по распространению с *Wallichiana* в Азии, но отсутствует в Северной Америке [12, 14].

Несмотря на то, что 24 вида и 55 разновидностей таксона можно различить по морфологическим признакам, данная классификация остается спорной. Более консервативный систематический подход признает только 7–11 видов, которые выделяются по географическим границам: *T. baccata*, *T. brevifolia*, *T. canadensis* Marshall., *T. chinensis* Rehd., *T. cuspidata* Siebold. et Zucc. ex Endl., *T. floridana* Nutt. ex Chapm., *T. fauna* Nan Li & RR Mill, *T. globosa* Schltdl., *T. mairei* S.Y.Hu, *T. sumatrana* de Laub. и *T. wallichiana* Zucc. [12–15].

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ *Taxus* spp.

Из разных видов тиса было выделено более 500 таксоидов (таксанов) — дитерпеноидных соединений специфичного строения, а также “таксиновые алкалоиды”, флавоноиды и лигнаны. Основными вторичными метаболитами *Taxus* spp. являются таксаны. Наиболее знаменитым соединением этой группы считается паклитаксел, который был впервые выделен из коры *T. brevifolia* в 1971 г. [10].

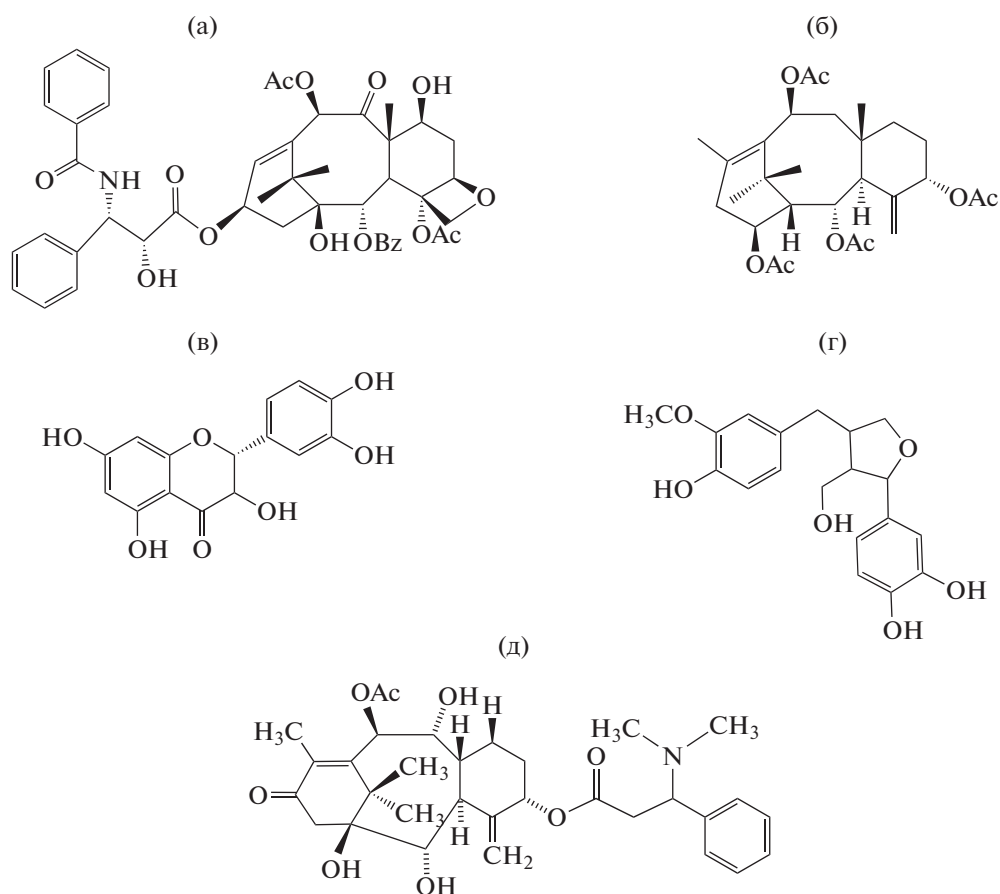


Рис. 1. Химические структуры вторичных метаболитов растений *Taxus* spp.: (а) – паклитаксел (С13-гидроксилированный таксоид) [10]; (б) – таксуюннин С (С14-гидроксилированный таксоид) [10]; (в) – таксифолин (флавоноид) [20]; (г) – таксирезинол (лигнан) [17]; (д) – таксин В (таксиновый алкалоид) [22].

Таксоиды (таксаны)

Классификация таксанов включает 11 типов соединений и основана на расположении их кольцевых систем. Обычные таксаны 6/8/6 (цифры указывают размер каждого кольца) имеют линейную трициклическую кольцевую систему. Другие трициклические кольцевые системы обнаружены в 11(15→1)-абеотаксанах (5/7/6), 11(15→1), (10→9)-диабеоотаксанах (5/6/6) и 2(3→20)-абеотаксанах (6/10/6). Тетрациклические кольцевые системы характерны для 3,11-циклотаксанов (6/5/5/6) и 14,20-циклотаксанов (6/8/6/6). 3,11:12,20-дициклотаксаны (6/5/5/5/6) и 3,11:4,12-дициклотаксаны (6/5/5/4/6) имеют пентациклические скелеты. Гексациклическая кольцевая система содержится в 3,11:4,12:14,20-трициклотаксанах (5/5/4/6/6/6). Бициклические кольцевые системы являются типичными для 3,8-секотаксанов (6/12) и 11,12-секотаксанов (8/6) [10, 16].

Метаболиты с кольцевой системой 6/8/6 (номенклатура основана на количестве атомов углерода в кольцах А, В и С) представляют собой наи-

более распространенный класс таксанов и имеют 349 известных структур, встречающихся в роде *Taxus*. Обыкновенные таксаны 6/8/6 подразделяются на 12 подгрупп в зависимости от функциональных групп, присоединенных к таксановому ядру. Большинство 6/8/6-таксанов (11 подгрупп) оксигенированы или гидроксилированы в С-13 положении, только одна подгруппа включает таксоиды, оксигенированные по С-14 (эти соединения не имеют функциональной группы в положении С-13). Паклитаксел относится к 6/8/6-таксанам с оксетановым кольцом и фенилизосериновой боковой цепью в С13-положении (рис. 1). Метаболиты с кольцевой системой 5/7/6 (11(15→1)-абеотаксаны) представляют собой еще один многочисленный класс таксанов, для представителей рода *Taxus* известно около 127 структур [10, 16].

6/8/6-таксаны и 11(15→1)-абеотаксаны были обнаружены у всех исследованных видов тиса. 2(3→20)-абеотаксаны встречаются у всех видов рода *Taxus*, кроме трех: пока не обнаружены у *T. brevifolia*, *T. chinensis* и *T. wallichiana*. Секотаксаны были охарактеризованы у *T. canadensis*, *T. chinensis*

sis, *T. cuspidata*, *T. mairei* и *T. sumatrana*. Циклотаксаны обнаружены в *T. baccata*, *T. canadensis*, *T. cuspidata* и *T. yunnanensis* Cheng et L.K.Fu. Диабетаксаны выделены только из трех видов тиса: *T. sumatrana*, *T. wallichiana* и *T. yunnanensis* [10, 16].

Предполагается, что классы таксанов с небольшим числом представителей, как правило, встречаются у меньшего числа видов рода *Taxus*. Кроме того, низкие концентрации некоторых классов таксанов могут быть еще одной причиной того факта, что они не были обнаружены у большинства видов тиса [10, 16].

Формирование дитерпеноидного скелета таксоидов начинается с образования изопентенилдифосфата и диметилаллилдифосфата в пластидах по 2-С-метил-D-эритритол-фосфатному пути (МЕР-пути). Путем циклизации геранилгеранилдифосфата таксадиенсинтазой образуется таксадиен (основная структура таксанового кольца). В дальнейшем таксановое кольцо проходит через ряд окислительных модификаций, реакций ацетилирования и гидроксирования, превращаясь в полноценное соединение. Путь биосинтеза таксола и подобных ему таксоидов имеет приблизительно 19–20 стадий и в нем участвуют порядка 16 ферментов [9].

Фенольные соединения

В *Taxus* spp. содержится целый ряд лигнанов. Из тисов выделено около 50 соединений этого класса, включая неолигнаны и несколько терпенолигнанов. В частности, в *T. wallichiana* были обнаружены изолиовил, конидендрин, матаирезинол, таксирезинол, (–)-секоизоларицирезинол, изотаксирезинол, (–)-7'-О-метилтанеол, формозанол, (+)-тсуацеталь, α-интермедианол, оксабициклоокталигнан, ланцелатанин. Пять лигнанов, которые являются димерными фенилпропаноидами, были идентифицированы у *T. baccata*: ларицирезинол, 3'-деметилизоларицирезинол-9'-гидроксиизопропиловый эфир, таксирезинол и 3-деметилизоларицирезинол (рис. 1) [17, 18].

В разных видах тиса также встречается целый спектр флавоноидов. В растениях *Taxus* spp. обнаружены сциадопитизин, аментофлавоин, гинкгетин, лютеолин, таксифолин, апигенин, изорамнетин, робустафлавоин и др. У разных видов тиса ветви и листья представляют большой интерес из-за наличия в них значительных количеств изокверцитрина, кверцитрина, билобетина и сциадопитизина [19]. Четырнадцать флавоноидов были идентифицированы с поверхности игл *T. baccata*, среди них доминировали 3-О-рутинозид мирицетин, 3-О-рутинозид кверцетин и кверцетин. Непосредственно из хвои *T. baccata* были выделены 3-О-рутинозиды кверцетина, 7-О-глюкозиды кемпферола и кверцетина, мирицетин, кверцитин и кемпферол (рис. 1) [20, 21].

Таксины (“таксиновые алкалоиды”)

Все части растений *Taxus* spp., за исключением ариллуса, ядовиты как в свежем, так и в высушенном виде, из-за наличия в них “таксиновых алкалоидов” – таксинов. По современной классификации таксины являются псевдоалкалоидами, так как представляют собой соединения, образованные из безазотистых полигидроксильных дитерпенов (таксицинов) этерифицированных с β-диметиламино-β-фенилпропионовой и уксусной кислотами. Существуют две основные группы таксинов: группа таксина А и группа таксина В. Структурный аналог таксина А, 2-деацетилтаксин А, был выделен из листьев *T. baccata* в 1994 г. Предварительная структура таксина В была впервые описана в 1986 г., но молекулярные и структурные формулы не были выяснены до 1991 г. Изотаксин В, структурный изомер таксина В, присутствует в качестве основного компонента в алкалоидных фракциях разных видов тиса (рис. 1) [22].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *Taxus* spp.

Биологическая активность таксоидов

Паклитаксел (таксол) является противоопухолевым препаратом, оказывающим влияние на стабилизацию микротрубочек, и представляет собой широко используемое химиотерапевтическое средство при многочисленных видах рака. Механизмы действия таксола, связанные с ингибированием роста опухоли, могут действовать на разных уровнях – он инициирует каскад сигнальных путей, приводящих к запрограммированной гибели клеток; может регулировать экспрессию определенных микроРНК, связанных с прогрессированием рака; оказывает множество положительных влияний на модуляцию иммунного ответа посредством регуляции хемокинов, цитокинов или иммунных клеток [5]. В отличие от других тубулин-связывающих противоопухолевых препаратов, которые предотвращают сборку тубулина в микротрубочки, паклитаксел способствует сборке тубулина в микротрубочки и предотвращает их диссоциацию, что приводит к стабилизации микротрубочек на G2-M этапе клеточного цикла, блокируется их деполимеризация в растворимый тубулин и происходит подавление пролиферации клеток [23].

Паклитаксел был открыт в 1971 г. и после серии клинических испытаний Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило его для лечения запущенного рака яичника в 1992 г. С тех пор таксол широко применяется в химиотерапии рака молочной железы, колоректального рака и плоскоклеточного рака мочевого пузыря. Кроме того, он был использован при

лечении таких заболеваний, как рак головы и шеи, мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких и саркома Капоши, ассоциированной со СПИДом [23].

В настоящее время, помимо таксола, существует ряд его полусинтетических вариантов, а именно доцетаксел и кабазитаксел, которые также широко используются в качестве химиотерапевтических средств [24].

Биологическая активность фенольных соединений

Лигнаны тиса обладают противоопухолевым потенциалом. Таксирезинол, выделенный из *T. wallichiana*, проявлял подобную активность в отношении рака яичников, толстой кишки, молочной железы и печени в системе *in vitro*. Три лигнана (секоизоларицирезинол, таксирезинол и изотаксирезинол), выделенные в качестве основных компонентов из древесины *T. yunnanensis*, были оценены на их антипролиферативную активность в отношении клеточных линий рака толстой кишки мыши и фибросаркомы человека, среди протестированных соединений наибольшая активность наблюдалась у секоизоларицирезинола в случае с фибросаркомой [17].

Было показано, что изотаксирезинол и секоизоларицирезинол из древесины *T. yunnanensis*, обладают мощной активностью по удалению радикалов DPPH и значительным ингибирующим действием в отношении продукции оксида азота. Оба лигнана предотвращают повреждение печени, вызванное D-галактозамином/липополисахаридом, путем ингибирования апоптоза гепатоцитов через блокирование TNF- α и выработку IFN- γ [17].

Изотаксирезинол, секоизоларицирезинол и таксирезинол были протестированы на их гипогликемическое действие. В дозе 100 мг/кг (внутривенно) изотаксирезинол снижал уровень глюкозы в крови натошак у крыс с диабетом на 34.5%, в то время как секоизоларицирезинол и таксирезинол снижали его на 33.4% и 20.9%, соответственно. Лигнаны *T. baccata* проявляли умеренное ингибирование бутирилхолинэстеразы и липоксигеназы, которые играют роль в патогенезе болезни Альцгеймера [17].

Высокая антирадикальная активность была продемонстрирована для флавоноидов из *T. wallichiana*, *T. cuspidata*, *T. baccata*. Хвоя *T. baccata* оказывает гепатопротекторную, транквилизирующую и седативную активности, что предположительно связано с бензодиазепиноподобным действием обнаруженных в ней флавоноидов. Сциадопитизин демонстрировал нейропротекцию против повреждений в первичных кортикальных нейронах, вызванных A β -белком [20, 21, 25–27].

Биологическая активность “таксиновых алкалоидов”

Изменения сердечной деятельности после интоксикации тисом приписывают главным образом действию “таксиновых алкалоидов”, влияющих на проницаемость натрия и кальция в клетках миокарда (блокируют натриевые и кальциевые каналы). Таксины нарушают натрий-калиевый транспорт и приводят к увеличению цитоплазматического кальция в клетках, что стимулирует возникновение и прогрессирование опасной для жизни формы аритмии. Сначала наблюдается появление головокружения, мидриаза, тошноты, рвоты, боли в животе, тахикардии и судорог, за которыми следуют брадикардия, паралич, диастолическая остановка сердца и смерть [28]. Таксиновые алкалоиды всасываются через пищеварительный тракт очень быстро, и признаки отравления проявляются через 30–90 минут [29]. При введении таксина В как *in vivo*, так и *in vitro* было показано, что он более кардиотоксичен, чем таксин А. Механизм действия таксина В напоминает антиаритмические препараты класса I, такие как флекаинид, прокаинамид и хинидин [22].

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Taxus* spp. И СПЕЦИФИКА ОБРАЗОВАНИЯ В НИХ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Получение культур клеток Taxus spp.

Для получения культур клеток высших растений наиболее сложными объектами являются хвойные деревья. Для *Taxus* spp. ситуация осложняется высокой вероятностью наличия в эксплантах значительного количества вторичных метаболитов, многие из которых достаточно токсичны [30].

Каллусная культура клеток тиса (*T. baccata*) впервые была получена в 1973 г. В дальнейшие годы многие исследователи проводили работы по оптимизации условий каллусогенеза и выращивания полученных культур клеток разных видов тиса, при этом особое внимание обращали на выбор экспланта, методов его стерилизации, оптимизации состава сред и условий культивирования [1, 4, 31].

В ряде работ была обнаружена зависимость частоты и эффективности каллусообразования от фенологического состояния донорного растения, при этом были получены неоднозначные результаты. В одном случае максимальная частота каллусогенеза при использовании в качестве экспланта хвои *T. baccata* и *T. canadensis* была отмечена для растительного материала, собранного в июле — августе, тогда как при использовании хвои, собранной весной (март — апрель) и осенью (сентябрь — ноябрь), частота каллусообразования снижалась в три раза, а время до начала формирования каллуса увеличивалось в два раза [31]. В дру-

гом исследовании лучшие результаты были получены с “зимними” эксплантами (январь), по сравнению с летними (июль). Авторы связывают зависимость эффективности каллусообразования от фенологического состояния донорного растения с различным уровнем содержания фенольных соединений в эксплантах — в “зимней” хвое их существенно меньше [32].

Многие авторы отмечают, что “потемнение” каллусов, вызванное образованием значительного количества фенольных соединений при получении культур клеток тиса наблюдается достаточно часто [33]. Это может приводить к гибели клеток, и требует специальных мер для предотвращения данного процесса.

В ряде работ для инактивации свободных фенолов и улучшения роста каллусов в питательную среду добавляли антиоксиданты — аскорбиновую кислоту (10–100 мг/л) или поливинилпирролидон (0.1–0.5%), а также сорбенты — активированный уголь (0.1–1.0%). Результаты экспериментов с несколькими видами тиса показали, что добавление поливинилпирролидона препятствовало потемнению питательной среды, но лишь незначительно уменьшило некротизацию каллуса; введение в среду активированного угля в 3–4 раза уменьшало степень некротизации каллуса по сравнению с контролем, но в 7 раз снижало частоту каллусообразования; добавление аскорбиновой кислоты в 2 раза уменьшило некротизацию экспланта и первичного каллуса и увеличило скорость роста каллуса [31].

Наиболее важными компонентами питательной среды, определяющими каллусогенез, являются фитогормоны. Во многих работах проводили исследования влияния гормонального состава сред на частоту каллусообразования. В частности, для хвои *T. baccata* используемой в качестве экспланта наибольшая эффективность каллусогенеза отмечена на среде Гамборга с добавлением 2 мг/л 2,4-Д и на среде Весткотта для хвойных растений с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (α -НУК, 4 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) [31]. Однако из анализа доступных источников, можно заключить, что оптимального гормонального состава среды для каллусогенеза *Taxus* spp. не определено; для каждого случая желателен его индивидуальный подбор.

Суспензионные культуры клеток *Taxus* spp. в основном получают путем переноса первичного каллуса в жидкую питательную среду, при этом они состоят преимущественно из мелких агрегатов клеток. В ряде работ отмечается высокая степень изменчивости по параметрам роста и физиологическим характеристикам суспензионных культур клеток, полученных из каллусных культур, а также из однотипных эксплантов растений разных видов [1, 4, 8].

Оптимизация выращивания культур клеток *Taxus* spp.

Эффективность процессов культивирования *in vitro* в значительной степени определяется правильным выбором питательной среды [30]. Как для каллусных, так и для суспензионных культур клеток различных видов рода *Taxus*, в большинстве работ не было на первом этапе получено высокопродуктивных линий, которые можно было бы использовать сразу для промышленной продукции паклитаксела. Ранние исследования показали, что клетки *Taxus* spp. *in vitro* могут синтезировать таксол и подобные ему таксоиды при оптимизированных условиях. В каллусной культуре *T. baccata*, который был выращен на среде Мурасиге и Скуга с различными регуляторами роста, было выявлено восемь аналогов паклитаксела [1, 2, 8].

Стандартным приемом повышения продуктивности культур клеток является отбор линий, характеризующихся высоким содержанием таксола. Основной проблемой при использовании этого подхода для культур клеток тиса является медленный прирост биомассы. По данным ряда авторов, удвоение биомассы культур клеток *T. brevifolia* и *T. cuspidata* происходит к 14–20 сут., что в 5–6 раз ниже, по сравнению с большинством других культур клеток [8, 34].

Существенное влияние на рост и биосинтез целевых соединений в культурах клеток оказывает состав углеводов в питательной среде. В ряде исследований изучали эффект концентрации углеводов на формирование таксоидов в клетках *in vitro* *Taxus* spp. В результате работ было получено содержание таксола на уровне 0.02% на сухой вес клеток, что вполне сопоставимо с концентрацией этого соединения в коре интактных растений. Отмечено, что различные углеводы по-разному влияют на синтез паклитаксела в культуре клеток тиса, который усиливается при использовании фруктозы и подавляется глюкозой [1, 8].

В результате многочисленных исследований, в ряде лабораторий получены каллусные и суспензионные культуры клеток различных видов *Taxus* с удовлетворительными ростовыми характеристиками [35]. Эффективные в отношении продукции различных таксоидов культуры клеток тиса получены из растений видов: *T. baccata*, *T. media* (гибрид *T. baccata* и *T. cuspidata*), *T. cuspidata*, *T. brevifolia*, *T. chinensis*, *T. globosa*, *T. wallichiana* [1, 4, 8, 36, 37].

Следует отметить, что культурам клеток *Taxus* spp. принадлежит своеобразный рекорд, достойный книги рекордов Гиннеса — несколько хороших растущих культур были получены от растения *T. baccata*, произрастающего в Никитском ботаническом саду (Республика Крым), возраст которого оценивается не менее 800 лет (по мнению ряда экспертов — около 1000 лет). Исходя из доступных источников, можно утверждать, что к



Рис. 2. 800-летнее дерево *T. baccata* (Никитский ботанический сад) (а) и процесс каллусогенеза на его эксплантах (б).

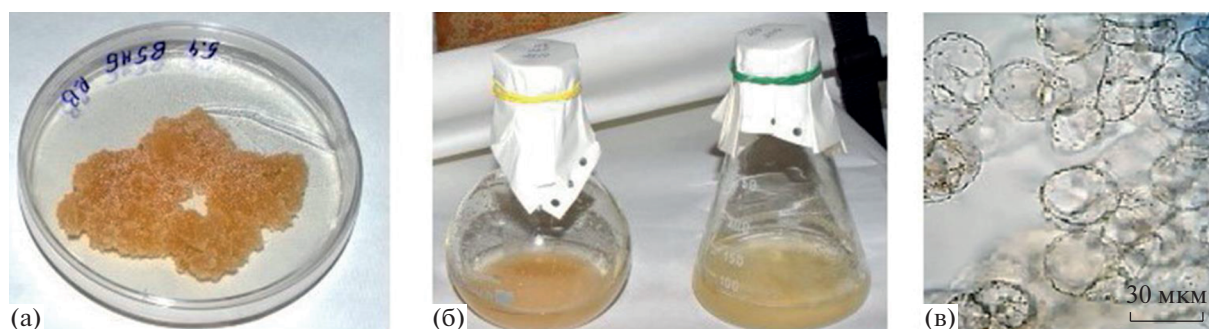


Рис. 3. Каллусная (а), суспензионная (б) культуры *T. baccata* и микрофотография клеток тиса (в) в суспензии.

настоящему времени это самый большой возраст растения, из которого были получены культуры клеток (рис. 2, 3) [38].

Образование таксоидов в культурах клеток Taxus spp.

Подавляющее количество работ посвящены изучению культур клеток разных видов *Taxus* с целью изучения образования в них таксоидов. Чаще в работах используют каллусные культуры клеток, для которых осуществляют поиск и идентификацию в основном паклитаксела. В литературе есть сообщения о получении культур клеток, содержащих таксол в количествах, сопоставимых с его содержанием в интактных растениях, однако в большинстве случаев авторы отмечают его отсутствие или наличие в следовых количествах [2, 4, 35, 36]. В суспензионной культуре паклитаксел был впервые обнаружен в 1989 г. (культура клеток *T. brevifolia*) [39].

Следует сказать, что большинство работ направлено на исследование образования в культу-

рах клеток практически значимых С13 – гидроксированных таксоидов – паклитаксела и баккатина III, тогда как образование С14-гидроксированных таксоидов в культурах клеток изучено гораздо слабее. Тем не менее, имеющиеся результаты свидетельствуют, что в культурах клеток тиса, как правило, образуется именно эта группа соединений, и их качественный состав и количественное содержание существенно выше, по сравнению с 13-ОН-производными [40]. Считается, что в интактных растениях *Taxus* spp. преимущественно накапливаются 13-гидроксированные таксоиды, однако при этом необходимо отметить существенные различия содержания разных групп таксанов в разных органах растения [10, 16].

Необходимо отметить, что токсичность 14-гидроксированных соединений существенно ниже, по сравнению с 13-ОН-производными, и это может быть важным фактором, определяющих их преимущественное образование в пролиферирующих дедифференцированных растительных клетках *in vitro* [41].

Способы интенсификации образования
фармацевтически ценных таксоидов
в культурах клеток *Taxus spp.*

Влияние сигнальных веществ (фитогормоны, регуляторы роста, элиситоры). Одним из хорошо изученных стимуляторов образования паклитаксела в культурах клеток *Taxus spp.* является фитогормон метилжасмонат (MeJA), который во многих работах не совсем корректно относят к группе элиситоров [4]. MeJA был впервые использован при работах с культурами клеток *T. baccata* в 1996 г., в результате которых было обнаружено, что он может усилить синтез таксоидов более чем в 120 раз. Метилжасмонат применяли для увеличения продукции паклитаксела в клеточных культурах *T. baccata*, *T. canadensis* и *T. cuspidata* [36, 42–44].

В каллусной культуре *T. cuspidata* после стимуляции 100 мкМ MeJA, появлялись пять таксоидов (цефаломанин, 1 β -дегидроксибаккатин VI, таксинин NN-11, баккатин I, 2 α -ацетокситаксузин), а также один абиетан — таксамаирин C, в дополнение к уже имеющимся там соединениям, таким как паклитаксел, 7-эпи-таксол, таксол C, баккатин VI, таксаюнтин C, таксуюннанин C и его аналоги, юннанксан и таксамаирин A. Эти результаты показывают, что MeJA может изменять качественный состав таксоидов, влияя на определенные пути синтеза соединений в растительных клетках *in vitro* [45].

Эффект MeJA может усиливаться в комбинации с другими стимуляторами биосинтеза вторичных метаболитов. Комбинация из хитозана, MeJA и Ag⁺ преводила к увеличению продукции паклитаксела в суспензионной культуре *T. chinensis*, которая была почти в 40 раз выше, чем у контрольной культуры (без добавления элиситоров), в 10 раз выше, чем у культуры, подвергшейся воздействию только Ag⁺, в 6 раз выше, чем у культуры с добавлением только хитозана, и в 2 раза выше, чем у культуры с добавлением только MeJA [46]. Элиситор из гриба *Rhizopus stolonifera*, использованный в сочетании с метилжасмонатом и салициловой кислотой, повышает производство паклитаксела в 16 раз при добавлении на 25–30 день выращивания суспензионной культуры клеток *T. baccata* [47].

Конечная концентрация MeJA в среде имеет ключевое значение для стимуляции биосинтеза. Было показано, что MeJA в концентрации 200 мкМ стимулирует синтез паклитаксела и баккатина III в культуре клеток *T. baccata* менее эффективно, чем в концентрации 100 мкМ [48].

Есть данные об использовании коронатина — токсина, вырабатываемого патогеном *Pseudomonas syringae*. Общая максимальная концентрация таксоидов в суспензионной культуре *T. media* при воздействии коронатина составляла 77.46 мг/л и увеличилась даже больше, чем при добавлении метилжасмоната (21.48 мг/л), при этом в кон-

трольных условиях она была на уровне 8.14 мг/л [49]. Любопытно, что конфигурация молекулы коронатина “мимикрирует” строение конъюгата жасмонатов с изолейцином и токсичность коронатина во многом обусловлена его “жасмонато-подобным” действием на растения.

В каллусной культуре *T. cuspidata* концентрация паклитаксела увеличивалась с 89 мкг/г до 139 мкг/г сухой массы после добавления хитозана — компонента клеточных стенок некоторых грибов [50]. Продукция таксола в суспензионной культуре клеток *T. baccata* повышалась примерно в три раза при добавлении в питательные среды комплекса аминокислот в сочетании с хитозаном [51].

Для интенсификации образования таксоидов в ряде работ используют ванадилсульфат, нитрат серебра, хлорид кобальта, арахидоновую кислоту, цитрат аммония, салициловую кислоту и полисахариды бактериального и грибного происхождения, как по отдельности, так и в комбинации [36].

Показано изменение содержания таксанов в суспензионной культуре *T. media* при использовании перфтордекалина (фторуглерод, в котором все атомы водорода заменены атомами фтора) и гексенола (природное летучее органическое соединение, вырабатываемое в поврежденных зеленых тканях, которое участвует в защитных взаимодействиях между растениями) по отдельности и в сочетании с коронатином и β -циклодекстринами. Общее содержание таксоидов в клеточных культурах *T. media*, обработанных перфтордекалином совместно с коронатином и β -циклодекстринами повышалось в 3.3 раза. Гексенол в суспензии *T. media* блокировал формирование таксола, но усиливал производство баккатина III [52].

Для оценки влияния сигнальных веществ (метилжасмонат, этанол, бутионин сульфоксимин, пероксид водорода) на продукцию таксоидов была исследована суспензионная культура клеток *T. globosa*. Использование комбинации из бутионин сульфоксимины и пероксида водорода приводило к значительному увеличению концентрации 10-деацетилбаккатина (1662 мкг/г сухого веса), цефаломанина (334.32 мкг/г сухого веса) и таксола (157 мкг/г сухого веса) [53].

Эффективность стимуляции синтеза фармацевтически ценных таксоидов под влиянием сигнальных веществ в различных суспензионных культурах клеток *Taxus spp.* представлена в табл. 1.

Предшественники синтеза. Большое внимание во многих работах было уделено исследованиям действия предшественников синтеза, сахаров и ингибиторов роста на накопление паклитаксела в культурах клеток тиса. Синтез деацетилбаккатина III, баккатина III или паклитаксела в культуре клеток *T. wallichiana* усиливался при добавлении фенилаланина, бензоата натрия, гиппуровой кислоты и лейцина. Ингибиторы роста, такие как

Таблица 1. Элиситация суспензионных культур клеток *Taxus* spp.

Вид тиса	Вариант элиситации	Продуктивность по таксоидам	Литературный источник
<i>T. baccata</i>	Метилжасмонат	Паклитаксел – 48.3 мг/л Баккатин III – 53.6 мг/л Цефаломанин – 3.6 мг/л	[4]
	Метилжасмонат, салициловая кислота, элиситор из <i>Rhizopus stolonifera</i>	Таксол – 39.5 мг/л	[47]
	Комплекс аминокислот, хитозан	Таксол – 1.96 мг/г сухого веса	[51]
<i>T. canadensis</i>	Метилжасмонат, этилен	Сумма таксоидов (10-деацетилбаккатин III, баккатин III, 10-деацетилтаксол, паклитаксел) – 25.3 мг/л	[43]
<i>T. cuspidata</i>	Метилжасмонат, этилен	Таксол – 3.4 мг/л	[44]
<i>T. chinensis</i>	Хитозан, метилжасмонат, Ag ⁺	Паклитаксел – 25 мг/л	[46]
<i>T. media</i>	Коронатин	Сумма таксоидов (10-деацетилбаккатин III, баккатин III, цефаломанин, 10-деацетилтаксол, паклитаксел) – 77.46 мг/л	[49]
	Перфтордекалин, коронатин, β-циклодекстрины	Сумма таксоидов (баккатин III, цефаломанин, 10-деацетилтаксол, таксол) – 9.4 мг/л	[52]
<i>T. globosa</i>	Бутионин сульфоксимин, пероксид водорода	10-деацетилбаккатин – 1662 мкг/г сухого веса Цефаломанин – 334.32 мкг/г сухого веса Таксол – 157 мкг/г сухого веса	[53]

2-хлорэтилфосфоновая кислота и хлорохалин хлорид были полезны для получения паклитаксела и деацетилбаккатина III в культуре клеток *T. wallischiana*. Подобные эффекты могут быть связаны с влиянием предшественников синтеза и ингибиторов роста на 2α-бензоилтрансферазу, 10-О-ацетилтрансферазу, фенилпропаноилтрансферазу и 3-N-дебензоил-2-дезокситаксол-N-бензоилтрансферазу и различной реакцией этих ферментов на внешние стимулы [54]. Было зафиксировано увеличение содержания паклитаксела в культуре клеток *T. cuspidata* после введения фенилаланина, бензойной кислоты и N-бензоилглицина, которые являются предшественниками боковой цепи целевого соединения. Высокий уровень продукции таксола у культуры клеток *T. chinensis* был получен путем периодического введения 3%, 1% и 2% сахарозы в начале, на 7 и 21 сут. цикла выращивания, соответственно [1].

Физические факторы культивирования. Изучено влияние ряда физических факторов культивирования на формирование таксоидов в культурах клеток *Taxus* spp. (состав газовой смеси, осмотический стресс, температура) [1]. Было отмечено, что соотношение 10% кислорода:0.5% диоксида углерода:5 ppm этилена являются наиболее оптимальным составом газовой смеси для производства паклитаксела из суспензионной культуры клеток *T. cuspidata* [55, 56]. Влияние осмотическо-

го стресса на производство таксола исследовали в суспензионной культуре *T. chinensis*. Оптимальное накопление паклитаксела было достигнуто при начальной концентрации сахарозы 60 г/л. При этом даже осмотическое давление, создаваемое маннитом, сорбитом, полиэтиленгликолем, усиливало образование целевого соединения [1, 57]. На биосинтез таксоидов в культуре клеток тиса влияло изменение температуры во время культивирования. При повышении температуры с 24°C до 29°C на 21 сут. культивирования суспензионной культуры клеток *T. chinensis*, происходило увеличение выхода паклитаксела до 137.5 мг/л (исходное содержание целевого соединения в культуре было на уровне 49.6 мг/л). Напротив, концентрация таксуюннанина С снижалась при изменении температуры с 24°C на 29°C в пределах от 885.9 до 512.9 мг/л, соответственно [58].

Иммобилизация клеток, различные системы культивирования и биотрансформация. Иммобилизация в некоторых случаях является одним из полезных подходов для увеличения образования вторичных метаболитов в растительных клетках *in vitro*. Альгинат кальция использовали для иммобилизации клеток *T. baccata* и отметили трехкратное увеличение выработки паклитаксела [1, 4].

Как и для многих вторичных метаболитов, интенсивное образование таксола в культурах клеток, как правило, происходит в фазе замедления

роста и стационарной фазе. Двухступенчатая система культивирования, в которой растительные клетки сначала выращивают для получения биомассы, а затем переносят в питательную среду, благоприятную для получения таксанов, является эффективной стратегией увеличения производства целевых соединений. Дополнительное преимущество состоит в том, что подобный способ культивирования позволяет добавлять предшественники синтеза и элиситоры, когда выработка вторичных метаболитов находится на максимально высоком уровне. Эта стратегия была успешно использована для улучшения продукции паклитаксела и баккатина III в суспензионных культурах *T. baccata* [1, 4].

Небольшие количества вторичных метаболитов, выделяющиеся в питательную среду, могут приводить к различным нарушениям биосинтеза целевых веществ. Формирование места для накопления фитохимических соединений в виде второй фазы (органический растворитель или твердое соединение) позволяет получить более высокие концентрации фармацевтически ценных субстанций. Удаление продуктов вторичного метаболизма из водной среды *in situ* с использованием двухфазной системы культивирования облегчает их высвобождение из внутриклеточных органелл. Для культур *in vitro Taxus spp.* было обнаружено, что накопление таксола в клетках вызывает нарушения в регуляции синтеза целевого соединения и приводит к деградации продукта, поэтому, его извлечение из суспензионных культур имеет важное значение для повышения их продуктивности. Высвобождение таксола и баккатина III из клеток в среду было усилено на 120 и 97%, соответственно, в присутствии сульфата ванадия. Двухфазная система культивирования была успешно применена для культур клеток *T. brevifolia* и *T. cuspidata* [1, 4].

Стоит также сказать, что большой интерес представляют исследования процессов биотрансформации соединений таксанового ряда, поскольку эти реакции могут осуществляться с использованием бактерий, грибов, растительных клеток *in vitro* и даже выделенными ферментами, а это может быть перспективно для получения конкретных целевых веществ [59].

Промышленное выращивание культур клеток Taxus spp.

К настоящему времени коммерческое получение таксола в промышленных биореакторах организовано в ряде стран – Phyton Biotech (Германия), ESCA genetics (Калифорния, США), Phyton (Нью-Йорк, США) и Samyang Biopharm (Республика Корея) [4, 11, 36].

Компания Phyton Catalytic (сейчас – Phyton Biotech, принадлежащий DFB Pharmaceuticals) начала

масштабирование суспензионных культур клеток *Taxus chinensis* в начале 1990 г. с целью запуска крупномасштабного производства паклитаксела (Taxol®). В настоящее время компания Phyton Biotech (Германия) является крупнейшим производителем таксола с использованием культуры клеток *T. chinensis*, которую выращивают в ферментерах объемом до 75000 л [2]. Технология ферментации растительных клеток была лицензирована для Bristol Myers Squibb в 1995 г. В 2004 г. компания Bristol Myers Squibb выиграла престижный Президентский конкурс “Зеленая химия” Американского химического общества, вследствие перехода в 2002 г. на выращивание культуры клеток растений в качестве единственного источника для своего противоракового препарата Taxol® [11].

Патентная защита для Taxol® истекла в 2000 г., что стимулировало конкуренцию среди производителей, в том числе исследование новых культур клеток тиса, а также процессов разработки и усовершенствования методов получения паклитаксела и родственных ему таксанов. На сегодняшний день коммерческое выращивание культур клеток *Taxus spp.* реализовано в США (ESCA genetics) и Южной Корее (Samyang Biopharm). Компания Samyang Biopharm использует культуры клеток *Taxus* в ферментерах объемом 35000 л для производства паклитаксела под торговым названием Genexol® [11].

Однако точные сведения о коммерческом производстве таксоидов, в том числе с использованием культур клеток, как правило, в открытом доступе отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Природный дитерпеноид паклитаксел является одним из самых эффективных противоопухолевых препаратов (Taxol®) со специфическим механизмом действия. Традиционным источником таксола считается кора растений *Taxus spp.*, но его низкое содержание (~0.02% от сухого веса), сложность выделения и очистки определяет высокую стоимость конечного продукта. Принципиально важно, что использование для получения таксола дикорастущих деревьев создает реальную угрозу их исчезновения. Растущий спрос на паклитаксел и его производные в условиях дефицита растительных ресурсов для их получения, сделал соединения таксанового ряда одним из наиболее важных объектов для разработки альтернативных способов их получения и производства, в том числе биотехнологических [1, 2].

В настоящее время рассматриваются три стратегии решения этой проблемы: полный химический синтез или “полусинтез” целевых соединений; поиск альтернативных источников сырья и использование методов генетической или метаболической

инженерии (создание трансгенных организмов с введенными генами биосинтеза таксоидов).

Полный синтез и полусинтез паклитаксела, как правило, коммерчески невыгоден из-за слишком большой химической сложности целевого соединения.

Создание трансгенных организмов (бактерий, дрожжей) может оказаться достаточно эффективным способом получения таксоидов, однако в настоящее время, когда еще не известны детали их биосинтеза, о его перспективах говорить преждевременно. Значительный интерес представляет получение трансгенных по ключевым генам биосинтеза культур клеток или культур трансформированных корней (*hairy roots*) — однако эти системы, скорее всего, имеет смысл относить к альтернативным источникам растительного сырья.

К альтернативным источникам сырья можно отнести плантационные посадки, использование эндофитных грибов тиса, а также культуры клеток и культуры органов (трансформированных или адвентивных корней) *in vitro Taxus* spp. Основным недостатком плантационного выращивания деревьев тиса является его длительность (десятки лет). Несмотря на этот существенный минус данный способ активно реализуют в Китае.

Таким образом, к настоящему времени наиболее многообещающий и удобный подход к устойчивому производству таксола и подобных ему соединений — это промышленное выращивание культур клеток *Taxus* spp. [5, 8].

Культура клеток *in vitro* имеет много преимуществ: выращивание не подвержено влиянию погоды, времен года и загрязнению окружающей среды; этот способ позволяет непрерывно получать паклитаксел достаточной чистоты из постоянно возобновляемого высококачественного растительного сырья; можно контролировать накопление целевых веществ в культурах, а также увеличивать их продуктивность различными способами (оптимизация состава питательных сред, использование предшественников синтеза и элиситоров, двухстадийное и двухфазное культивирование, метаболическая и генная инженерия). Однако существуют и трудности: медленный рост клеток; невысокая производительность по целевым метаболитам; высокие затраты на организацию подобного крупномасштабного биотехнологического производства [35].

При создании биотехнологического производства на основе культур клеток тиса основной проблемой является получение высокопродуктивного штамма-продуцента целевых продуктов — паклитаксела или других таксоидов. Для проведения подобных работ важно учитывать свойства культуры клеток как особой биологической системы — популяции соматических клеток со специфическими особенностями вторичного метаболизма. Для культур клеток *Taxus* spp. возможно именно этим обу-

словлено преимущественное образование C14-гидроксилированных таксоидов.

К настоящему времени известен ряд биотехнологических производств на основе культур клеток тиса. В 1995 г. компания Phytion Biotech лицензировала процесс получения таксола из суспензионной культуры клеток *T. chinensis* для Bristol Myers Squibb. На сегодняшний день подобные технологии для производства паклитаксела и родственных ему таксанов используют на коммерческом уровне компании Phytion Biotech (Германия), ESCA genetics (Калифорния, США), Phytion (Нью-Йорк, США) и Samyang Biopharm (Республика Корея) [4, 11, 36].

Подводя итог вышесказанному, можно отметить, что таксаны — это одна из наиболее интересных и перспективных групп дитерпеноидов в отношении химиотерапии различных онкологий. Исследование механизмов их биологической активности, регуляции биосинтеза, в том числе на молекулярно-генетическом уровне, поиск новых альтернативных источников получения соединений и усовершенствование уже имеющихся технологий имеет как фундаментальную, так и значительную практическую значимость. Несмотря на то, что знания в этой области постоянно дополняются и расширяются, пока еще нет четких ответов на многие вопросы. Вероятно, что молекулярно-генетические достижения, связанные с изучением генов таксанового метаболизма и закономерностей их регуляции в интактном растении и культуре клеток *in vitro*, а также более полный фитохимический анализ растительных ресурсов и их биотехнологических аналогов позволят оптимизировать различные способы получения фармацевтически ценных таксоидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (темы № 121050500047–5 и 121041200194–7).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murthy H.N., Dandin V.S., Joseph K.S., Park S.Y., Paek K.Y. Plant cell and organ culture as an alternative for the production of anticancer compounds // Anticancer plants: natural products and biotechnological implements / Eds. M. S. Akhtar, M. K. Swamy. Singapore: Springer Nature, 2018. P. 429. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8064-7_18
2. Exposito O., Bonfill M., Moyano E., Onrubia M., Mirjalili M.H., Cusido R.M., Palazon J. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects // Anticancer Agents Med. Chem. 2009. V. 9. P. 109. <https://doi.org/10.2174/187152009787047761>

3. Nimasow G., Nimasow O.D., Rawat J.S., Norbu L. Conservation efforts of an important medicinal plant (*Taxus baccata* Linn.) in West Kameng district of Arunachal Pradesh (India) // *Earth Sci.* 2015. V. 4. P. 1. <https://doi.org/10.11648/j.earth.s.2015040301.11>
4. Malik S., Cusido R.M., Mirjalili M.H., Moyano E., Palazon J., Bonfill M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review // *Process Biochem.* 2011. V. 46. P. 23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.004>
5. Zhu L., Chen L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2019. V. 24. P. 40. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0164-y>
6. Ismaiel A.A., Ahmed A.S., Hassan I.A., El-Sayed E.S.R., Karam El-Din A.Z.A. Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 5831. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8354-x>
7. Maheshwari P., Garg S., Kumar A. Taxoids: biosynthesis and *in vitro* production // *Biotech. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 3. P. 071.
8. McElroy C., Jennewein S. Taxol® biosynthesis and production: from forests to fermenters // *Biotechnology of Natural Products* / Eds. W. Schwab, B.M. Lange, M. Wust. Cham: Springer International Publishing. 2018. P. 145. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_7
9. Wang T., Li L., Zhuang W., Zhang F., Shu X., Wang N., Wang Z. Recent research progress in taxol biosynthetic pathway and acylation reactions mediated by *Taxus* acyltransferases // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 2855. <https://doi.org/10.3390/molecules26102855>
10. 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>
11. Wilson S.A., Roberts S.C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V. 10. P. 249. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x>
12. Spjut R.W. Taxonomy and nomenclature of *Taxus* (Taxaceae) // *J. Bot. Res. Inst. Tex.* 2007. V. 1. P. 203.
13. Hao D.C., Xiao P.G., Ge G.B., Liu M. Biological, chemical, and omics research of *Taxus* medicinal resources // *Drug. Development Res.* 2012. V. 73. P. 477. <https://doi.org/10.1002/ddr.21040>
14. Spjut R.W. A phytogeographical analysis of *Taxus* (Taxaceae) based on leaf anatomical characters // *J. Bot. Res. Inst. Texas.* 2007. V. 1. P. 291.
15. Li J., Davis C.C., Tredici P.D., Donoghue M.J. Phylogeny and biogeography of *Taxus* (Taxaceae) inferred from sequences of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA // *Harv. Pap. Bot.* 2001. V. 6. P. 267.
16. Lange B.M., Conner C.F. Taxanes and taxoids of the genus *Taxus* – A comprehensive inventory of chemical diversity // *Phytochem.* 2021. V. 190. P. 112829. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112829>
17. Topcu G., Demirkiran O. Lignans from *Taxus* species // *Top Heterocycl. Chem.* 2007. V. 11. P. 103. https://doi.org/10.1007/7081_2007_082
18. Dang P.H., Nguyen H.X., Nguyen H.H.T., Vo T.D., Le T.H., Phan T.H.N., Nguyen M.T.T., Nguyen N.T. Lignans from the roots of *Taxus wallichiana* and their α -glucosidase inhibitory activities // *J. Nat. Prod.* 2017. V. 80. P. 1876. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00171>
19. Krauze-Baranowska M. Flavonoids from the genus *Taxus* // *Z Naturforsch C J Biosci.* 2004. V. 59. P. 43. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-1-210>
20. Bekhouche M., Benyammi R., Slaoui M.K., Krimat S., Paris C., Khelifi L., Morsli A. Flavonoid profile and antioxidant properties of Algerian common yew (*Taxus baccata* L.) // *Clinical Phytosci.* 2022. V. 8. P. 17. <https://doi.org/10.1186/s40816-022-00348-x>
21. Bekhouche M., Morsli A., Slaoui M.K., Benyammi R., Krimat S., Paris C., Khelifi L. Antioxidant properties of the needles of *Taxus baccata* L. growing in Algeria and characterization of their antioxidant constituents by LC–DAD–ESI–MSⁿ // *J. Global Trends Pharm. Sci.* 2021. V. 12. P. 9026.
22. Wilson C.R., Hooser S.B. Toxicity of yew (*Taxus* spp.) alkaloids // *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles* / Ed. by R.C. Gupta. USA: Academic Press. 2018. P. 947. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00066-0>
23. Sinha D. A review on taxanes: an important group of anticancer compound obtained from *Taxus* sp. // *IJPSR.* 2020. V. 11. P. 1969. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11\(5\).1969-85](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).1969-85)
24. Nicolaou K.C., Valiulin R.A. Synthesis and biological evaluation of new paclitaxel analogs and discovery of potent antitumor agents // *Org. Biomol. Chem.* 2013. V. 11. P. 4154. <https://doi.org/10.1039/c3ob40654g>
25. Tabaszewska M., Antoniewska A., Rutkowska J., Skoczylas L., Slupski J., Skoczen-Slupska R. Bioactive components, volatile profile and *in vitro* antioxidative properties of *Taxus baccata* L. red arils // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 4474. <https://doi.org/10.3390/molecules26154474>
26. Bekhouche M., Benyammi R., Khelifi Slaoui M., Khelifi L., Morsli A. Free radical scavenging activity and detailed flavonoid profiling of Algerian yew (*Taxus baccata* L.) by LC–ESI–MS/MS // *IJPSR.* 2021. V. 12. P. 2613. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(5\).2613-19](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(5).2613-19)
27. Филиппова С.Н., Логвина А.О., Спиридович Е.В. Органо- и тканеспецифические особенности проявления антирадикального потенциала и содержания фенольных соединений в растениях рода *Taxus* spp. // *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2022. Т. 1. С. 48. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-1-48-58>
28. Pinto A., Lemos T., Silveira I., Aragao I. *Taxus baccata* intoxication: the sun after the electrical storm // *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2021. V. 33. P. 172. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20210019>

29. Valis M., Koci J., Tucek D., Lutonsky T., Kopova J., Barton P., Vysata O., Krajickova D., Korabecny J., Masopust J., Klzo L. Common yew intoxication: a case report // J. Med. Case Rep. 2014. V. 8. P. 4. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-4>
30. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Москва: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
31. Некопа С.В., Комов В.П. Способность к каллусогенезу у эксплантов хвои пяти видов рода *Taxus* L. // Растительные ресурсы. 2001. Т. 37. С. 100.
32. Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дедифференциации тканей тисса ягодного и тисса канадского в условиях *in vitro* // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 755.
33. Загоскина Н.В., Зайцева С.М., Александрова М.С. Изменения в образовании фенольных соединений при введении клеток тисса ягодного (*Taxus baccata* L.) и тисса канадского (*Taxus canadensis* Marsh.) в культуру *in vitro* // Биотехнология. 2007. В. 1. С.29.
34. Fett-Neto A.G., Melanson S.J., Nicholson S.A., Pennington J.J., DiCosmo F. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata* // Biotech. Bioeng. 1994. V.44. P. 967. <https://doi.org/10.1002/bit.260440813>
35. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors // Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology / Eds. K.Y. Paek, H.N. Murthy, J.J. Zhong. Dordrecht: Springer. 2014. P. 563. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_23
36. Cusido R.M., Onrubia M., Sabater-Jara A.B., Moyano E., Bonfill M., Goossens A., Angeles Pedreno M., Palazon J. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. // Biotechnol. Adv. 2014. V. 32. P. 1157. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.002>
37. 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 СВФУ. 2018. № 2. С. 18. <https://doi.org/10.25587/SVFU.2018.64.12127>
38. Глоба Е.Б., Черняк Н.Д., Носов А.М. Получение культуры клеток из уникального растения тиса *Taxus baccata* // Материалы Международной конференции с элементами научной школы для молодежи “Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере”. Якутск, 2010. С. 97.
39. Ketchum R.E.B., Gibson D.M. Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus* // Plant Cell Tiss Organ Cult. 1996. V. 46. P. 9. <https://doi.org/10.1007/BF00039691>
40. Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Galishev B.A., Kolotyrkina N.G., Kuznetsov V.I., 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>
41. Кочкин Д.В., Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Гайсинский В.В., Кузнецов В.В., Носов А.М. Обнаружение таксуюннанина С в суспензионной культуре клеток тиса канадского (*Taxus canadensis*) // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. С. 374. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524853374-376>
42. Bonfill M., Exposito O., Moyano E., Cusido R.M., Palazon J., Pinol M.T. Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2006. V. 42. P. 422. <https://doi.org/10.1079/IVP2006761>
43. Senger R.S., Phisalaphong M., Karim M.N., Linden J.C. Development of a culture sub-population induction model: signaling pathways synergy and taxanes production by *Taxus canadensis* // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. P. 1671. <https://doi.org/10.1021/bp0602552>
44. Mirjalili N., Linden J.C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models // Biotechnol. Prog. 1996. V. 12. P. 110. <https://doi.org/10.1021/bp9500831>
45. Bai J., Kitabatake M., Toyozumi K., Fu L., Zhang S., Dai J., Sakai J., Hirose K., Yamori T., Tomida A., Tsuruo T., Ando M. Production of biologically active taxoids by a callus culture of *Taxus cuspidata* // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. P. 58. <https://doi.org/10.1021/np0301083>
46. Zhang C.H., Mei X.G., Liu L., Yu L.J. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* // Biotechnol. Letters. 2000. V. 22. P. 1561. <https://doi.org/10.1023/A:1005684901329>
47. Khosroushahi A.Y., Valizadeh M., Ghasempour A., Khosrowshahli M., Naghdibadi H., Dadpour M.R., Omid Y. Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* // Cell Biol. Intern. 2006. V. 30. P. 262. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.11.004>
48. Bonfill M., Bentebibel S., Moyano E., Palazon J., Cusido R.M., Eibl R., Pinol M.T. Paclitaxel and baccatin III production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cells of *Taxus baccata* // Biol. Plant. 2007. V. 51. P. 647. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0137-2>
49. Onrubia M., Moyano E., Bonfill M., Cusido R.M., Goossens A., Palazon J. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate // J. Plant. Physiol. 2013. V. 170. P. 211. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.004>
50. Furmanowa M., Oledzka H., Syklovska-Baranek K., Jozefowicz J., Gieracka S. Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus × media* by some elicitors and precursors // Biotechnol. Letters. 2000. V. 22. P. 1449. <https://doi.org/10.1023/A:1005611114628>
51. Amirkavei Najafabadi B., Qavami N., Ebrahimi M.A., Ebrahimi P., Zarinpanjeh N. Enhancement of taxol production by applying amino acid complex along with chitosan in suspension culture of *Taxus baccata* L. //

- J. Med. Plants. 2020. V. 19. P. 99.
<https://doi.org/10.29252/jmp.19.76.99>
52. Vidal-Limon H.R., Almagro L., Moyano E., Palazon J., Pedreno M.A., Cusido R.M. Perfluorodecalins and hexenol as inducers of secondary metabolism in *Taxus media* and *Vitis vinifera* cell cultures // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 335.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00335>
53. Barrales-Cureno H.J., Ramos Valdivia A.C., Soto Hernandez M. Increased production of taxoids in suspension cultures of *Taxus globosa* after elicitation // Future Pharm. 2022. V. 2. P. 45.
<https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2010004>
54. Veeresham C., Mamatha R., Prasad Babu Ch., Srisilam K., Kokate C.K. Production of taxol and its analogues from cell cultures of *Taxus wallichiana* // Pharm. Biol. 2003. V. 41. P. 426.
<https://doi.org/10.1076/phbi.41.6.426.17822>
55. Mirjalili N., Linden J.C. Gas phase composition effects on suspension of *Taxus cuspidata* // Biotechnol Bioeng. 1995. V. 48. P. 123.
<https://doi.org/10.1002/bit.260480206>
56. Linden J., Haigh J.R., Mirjalili N., Phisaphalong M. Gas concentration effects on secondary metabolite production by plant cell cultures // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2001. V. 72. P. 27.
https://doi.org/10.1007/3-540-45302-4_2
57. Kim S.I., Choi H.K., Kim J.H., Lee H.S., Hong S.S. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis* // Enzym. Microb. Technol. 2001. V. 28. P. 202.
[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00292-1](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00292-1)
58. Choi H., Kim S., Son J., Hong S., Lee H., Lee H. Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis* // Enzyme Microb. Technol. 2000. V. 27. P. 593.
[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00255-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00255-6)
59. Zhong J.J., Yue C.J. Plant cells: secondary metabolite heterogeneity and its manipulation // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2005. V. 100. P. 53.
<https://doi.org/10.1007/b136412>