

УДК 581.192.2

**ОБНАРУЖЕНИЕ ТАКСУЮННАНИНА С В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ
КЛЕТОК ТИСА КАНАДСКОГО (*Taxus canadensis*)****Д. В. Кочкин^{1,2,*}, Е. Б. Глоба², Е. В. Демидова², В. В. Гайсинский²,
член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов², А. М. Носов^{1,2}**

Поступило 28.11.2018 г.

Из биомассы суспензионной культуры клеток тиса канадского (*Taxus canadensis*) впервые выделили таксоид таксуюннанин С (группа 14-гидроксилированных таксоидов). Согласно доступным источникам, это первое сообщение о присутствии у *T. canadensis* неполярных (полиацилированных) форм 14-гидроксилированных таксоидов, к которым относится таксуюннанин С.

Ключевые слова: культура клеток высших растений, *Taxus canadensis*, таксоиды, таксуюннанин С.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524853374-376>

Дитерпеноиды таксанового ряда (таксоиды) характерны только для представителей рода *Taxus* L. (Taxaceae). В настоящее время из разных видов тиса выделено более 300 индивидуальных таксоидов [1], которые могут быть разделены на несколько структурных классов (разные авторы выделяют от 3 до 6) [1, 2]. Наиболее распространены среди видов *Taxus* spp. представители трёх групп таксоидов [1, 2]: 13-гидроксилированные (тип баккатина III — баккатин III, паклитаксел и др.), 14-гидроксилированные (тип тайванксана — таксуюннанин С, юннанксан и др.) и 11(15→1)-*abeo*-таксоиды. Наиболее важным с прикладной точки зрения является паклитаксел (коммерческий синоним — Таксол®) — востребованный препарат в лечении ряда онкологических заболеваний [3].

Особенности биологии видов тиса (строгая эндемичность, медленный рост, трудности размножения), а также низкое и нестабильное накопление паклитаксела (0,001–0,03%) в интактных растениях существенно ограничивают промышленное получение этого соединения из природного растительного сырья [4].

Альтернативным источником таксоидов может служить культура клеток растений [5]. Между тем в литературе практически отсутствуют работы по изучению особенностей состава таксоидов в культивируемых *in vitro* клетках видов *Taxus* spp.

Фундаментальное значение подобных работ определяется тем обстоятельством, что культивируемые *in vitro* клетки высших растений строго дедифференцированы и не являются в полной мере аналогичными клеткам интактных растений [5]. Многие процессы (в том числе и вторичный метаболизм) протекают в них особым, отличным от интактных растений образом. Довольно часто при культивировании растительных клеток в условиях *in vitro* отмечается изменение (по сравнению с интактными растениями) качественного и количественного состава вторичных метаболитов [5]. В связи с этим подробное исследование структурного разнообразия дитерпеноидов таксанового ряда в культурах клеток разных видов тиса представляется весьма актуальной задачей.

Настоящая работа посвящена выделению и структурной идентификации основных таксоидов из культуры клеток тиса канадского (*T. canadensis*) — одного из наименее изученных (с химической точки зрения) видов тиса.

В качестве объекта исследования использовали суспензионную культуру клеток *T. canadensis* Margshall, полученную в 2016 г. из каллусной культуры клеток, которая, в свою очередь, была получена из хвои интактного растения в 2008 г. [6]. Условия получения и выращивания культуры клеток описаны ранее [6]. Препаративное выделение дитерпеноидов осуществляли из 11 г сырой биомассы суспензионной культуры клеток *T. canadensis*, выращенной в колбах (14 сут выращивания). Разделение таксоидов проводили с помощью полупрепаративной тонкослойной хроматографии (ТСХ) [7].

Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР выделенного соединения в хлороформе-*d* регистрировали на приборе Bruker

¹Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской Академии наук, Москва

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

AV HD 500 (“Bruker Corp.”, США), внутренний стандарт — тетраметилсилан. Сигналы в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР регистрировали с помощью двумерных экспериментов ЯМР (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC и HMBC) [8]. Масс-спектры высокого разрешения с ионизацией электрораспылением получили с помощью Bruker micrOTOF focus II (“Bruker Corp.”) [9].

С помощью полупрепаративной ТСХ из биомассы суспензионной культуры клеток *T. canadensis* выделили в индивидуальном виде один таксоид с выходом 0,004% от сырой массы клеток.

На основании расшифровки ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектров выделенного соединения (табл. 1, рис. 1) установили, что оно имеет структуру $2\alpha, 5\alpha, 10\beta, 14\beta$ -тетрацетокси-4(20), 11-таксадиена и соответствует таксуюннанину С [7]. Описанная структура также согласуется с результатами масс-спектрометрии высокого разрешения: формулу $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8$ подтвердили наличием в спектре положительных ионов этого соединения и сигналов ионов-аддуктов с m/z 522,3055 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (расчётное значение m/z

Таблица 1. Данные спектра ^{13}C -ЯМР (в CDCl_3) таксоида, выделенного из суспензионной культуры клеток *T. canadensis*

Положение в молекуле	δ_c , м.д.	Положение в молекуле	δ_c , м.д.
1	59,3	2- CH_3CO	
2	71,0	CO	170,3
3	42,7	CH_3	22,2
4	142,4	5- CH_3CO	
5	78,5	CO	170,0
6	29,3	CH_3	22,3
7	33,7	10- CH_3CO	
8	39,4	CO	169,9
9	43,2	CH_3	21,5
10	70,4	14- CH_3CO	
11	135,4	CO	170,3
12	134,8	CH_3	22,2
13	39,6		
14	70,6		
15	37,1		
16	25,0		
17	32,7		
18	20,8		
19	23,3		
20	117,0		

Примечание. 2-, 5-, 10-, 14- CH_3CO — остатки уксусной кислоты, присоединённые к положениям C2, C5, C10 и C14 такса-4(20), 11-диена соответственно. Нумерация атомов, как на рис. 1.

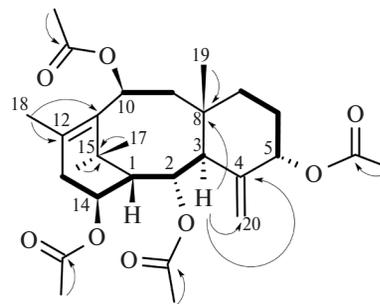


Рис. 1. Структура и ключевые ^1H - ^1H COSY (полуширные линии) и ^1H - ^{13}C HMBC (стрелки) корреляции таксоида, выделенного из культуры клеток *T. canadensis*.

522,3061); 527,2612 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (расчёт 527,2615) и 543,2350 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (расчёт 543,2355).

Важно отметить, что в культуре клеток *T. canadensis* таксуюннанин С (группа 14-гидроксилированных таксоидов) обнаружен впервые. Более того, в противоположность другим видам тисов для интактных растений *T. canadensis* согласно данным литературы [1] характерно накопление таксоидов группы тайванксана в виде гликозилированных (точнее, глюкозилированных) производных. Таким образом, настоящая работа является первым сообщением о возможности накопления неполярных (полиацилированных) форм 14-гидроксилированных таксоидов у вида *T. canadensis*.

Ранее [10] мы показали преимущественное образование 14-ОН-таксоидов в культивируемых *in vitro* клетках разных видов тиса. В настоящей работе установлено, что эта закономерность характерна и для культуры клеток даже такого уникального по составу таксоидов вида тиса, как тис канадский (*T. canadensis*). В этом случае аналогично клеткам других видов тиса *in vitro* также образуются нехарактерные для интактных растений *T. canadensis* неполярные, полиацилированные 14-гидроксилированные таксоиды. Эту закономерность можно рассматривать в качестве специфичной особенности культивируемых *in vitro* дедифференцированных клеток тиса, поскольку в интактных растениях *Taxus* spp. в основном преобладают 13-гидроксилированные таксоиды [1, 2]. Вероятно, это связано с меньшей токсичностью 14-ОН-таксоидов (по сравнению с 13-ОН-производными) для постоянно пролиферирующих клеток, однако справедливость этого заключения требует дальнейшей проверки.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 16-14-00126.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Y.-F., Shi Q.-W., Dong M., Kiyota H., Gu Y.-C., Cong B. // Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 7652–7709.
2. Baloglu E., Kingston D.G.I. // J. Nat. Prod. 1999. V. 62. P. 1448–1472.
3. Ojima I., Geney R., Ungureanu I.M., Li D. // IUBMB Life. 2002. V. 53. P. 269–274.
4. Zhong J.-J. // J. Biosci. Bioeng. 2002. V. 94. P. 591–599.
5. Nosov A., Popova E., Kochkin D. In: Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology. Netherlands: Springer, 2014. P. 563–623.
6. Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Туркин В.В., Макарова С.С., Носов А.М. // Биотехнология. 2009. № 3. С. 54–59.
7. Zhao C.F., Yu L.J., Li L.Q., Xiang F. // Z. Naturforsch. C. 2007. V. 62. P. 1–10.
8. Menhard B., Eisenreich W., Hylands P.J., Bacher A., Zenk M.H. // Phytochemistry. 1998. V. 49. P. 113–125.
9. Belyakov P.A., Kadentsev V.I., Chizhov A.O., Kolotyркина N.G., Shashkov A.S., Ananikov V.P. // Mendeleev Commun. 2010. V. 20. P. 125–131.
10. Кочкин Д.В., Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Гайсинский В.В., Галишев Б.А., Колотыркина Н.Г., Кузнецов В.В., Носов А.М. // ДАН. 2017. Т. 476. № 6. С. 706–709.

DETECTION OF TAXUYUNNANIN C IN SUSPENSION CELL CULTURE OF *Taxus canadensis*

D. V. Kochkin^{1,2}, E. B. Globa², E. V. Demidova², V. V. Gaisinsky²,
Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov², A. M. Nosov^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation

Received November 28, 2018

This is the first study to isolate the taxoid taxuyunnanin C (group of 14-hydroxylated taxoids) from the biomass of suspension cell culture of the Canadian yew (*Taxus canadensis*). According to available data, this is the first report of the presence of nonpolar (polyacylated) forms of 14-hydroxylated taxoids, including taxuyunnanin C, in *T. canadensis*.

Keywords: plant cell culture, *Taxus canadensis*, taxoids, taxuyunnanin C.