

На правах рукописи



Иванчина Наталья Владимировна

Полярные стероиды морских звезд: структура, биологическая активность и биосинтез

1.4.9 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Владивосток – 2024

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

Научный консультант: академик РАН, доктор химических наук,
профессор **Стоник Валентин Аронович**

Официальные оппоненты: **Усов Анатолий Иванович**
доктор химических наук, профессор, заслуженный
деятель науки Российской Федерации, Институт
органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН,
главный научный сотрудник лаборатории химии
гликоконъюгатов

Невинский Георгий Александрович
доктор химических наук, профессор, Институт
химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией ферментов репарации

Булгаков Виктор Павлович
член-корреспондент РАН, доктор биологических
наук, Федеральный научный центр
биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии
ДВО РАН, руководитель подразделения, главный
научный сотрудник лаборатории биоинженерии

Ведущая организация: Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск

Защита состоится «15» октября 2024 г. в 10 часов на заседании диссертационного
совета 24.1.213.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б.
Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку,
159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423)231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ТИБОХ ДВО РАН
(г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН,
www.piboc.dvo.ru).

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.



Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследования структур, функций и биологической активности низкомолекулярных биорегуляторов морского происхождения безусловно являются актуальными, поскольку ежегодно приводят к открытию большого числа ранее неизвестных молекул с разнообразными структурами и потенциальными фармакологическими свойствами. Одним из наиболее богатых источников вторичных метаболитов являются морские звезды. Эти беспозвоночные относятся к типу иглокожие (Echinodermata), в котором они выделены в отдельный класс (Asteroidea), насчитывающий почти 1900 видов. Они распространены по всему Мировому океану, от тропиков до полюсов. Морские звезды обитают как на шельфе, так и на континентальном склоне океана. Среди них имеются и глубоководные виды, заселяющие океаническое ложе и впадины.

Морские звезды продуцируют биологически активные вещества различных структурных классов, при этом большинство работ по исследованию их химического состава связано с изучением стероидных метаболитов. Морские звезды содержат большое количество разнообразных соединений стероидной природы, включая гормоны, стерины, полиокисленные и гликозилированные стероиды. Наибольшее внимание исследователей привлекают полярные стероидные соединения, к которым относятся полигидроксистероиды, моно-, би- и триозиды полигидроксистероидов, а также олигогликозиды. Они могут встречаться как в сульфатированной, так и несulfатированной формах. Стероиды морских звезд обладают уникальными структурными особенностями, существенно отличаясь от соответствующих метаболитов наземных растений и животных, что свидетельствует о необычных путях их биосинтеза и наличии в этих беспозвоночных многих еще не изученных ферментов. В целом, полярные стероиды морских звезд можно считать хемотаксономическими маркерами этого класса животных. В то же время, некоторые структурные группы полярных стероидов являются специфичными для отдельных родов морских звезд.

Интерес к изучению полярных стероидов морских звезд связан с широким спектром биологической активности, проявляемым этими метаболитами. Для них известны ихтиотоксическое, цитотоксическое, противовирусное, противомикробное, противовоспалительное, иммуномодулирующее, противоопухолевое и нейритогенное действия. Выделение и установление структур таких природных соединений, включая абсолютную стереохимию всех асимметрических центров, необходимы для дальнейших исследований механизмов их биологического действия, а также выявления взаимосвязей «структура-активность». Известно, что в некоторых азиатских странах суммарные препараты из морских звезд используют в комплексной терапии различных заболеваний.

Работы по изучению полярных стероидов морских звезд в мире были начаты в конце 60-х годов XX века и были связаны с изучением причин токсичности экстрактов этих животных. В России, а именно в ТИБОХ ДВО РАН, первые публикации, касающиеся изучения составов фракций астеросапонинов серии морских звезд, появились в середине 1970-х годов, а первые данные по структурам полигидроксилированных стероидов были опубликованы в начале 1980-х годов и касались установления структур стероидного гликозида астеросапонины Р₁ и нескольких полигидроксистероидов из морской звезды *Patiria pectinifera*. В настоящее время описаны структуры более 700 полярных стероидов морских звезд, из них около 300 соединений были выделены сотрудниками Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН. Исследования этих веществ, тем не менее, до сих пор не потеряли своей актуальности, работы по изучению стероидных метаболитов морских звезд ежегодно публикуются учеными из России, Японии, Южной Кореи, Китая, Италии, Аргентины и других стран. Эти публикации посвящены как выделению и установлению строения новых соединений, так и данным об их биологической активности и биологическим функциям. Развитие хроматографических методов, а также совершенствование физико-химических методов исследований структуры веществ в настоящее время позволяет изучать не только основные метаболиты, но и минорные компоненты метаболомного профиля каждого вида морских звезд, что важно для понимания путей биосинтеза этих соединений. Интерес к изучению полярных стероидов морских звезд подтверждается также

тем, что в последние годы были осуществлены синтезы ряда астросапонинов, полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов, проявивших перспективные фармакологические свойства.

Кроме того, исследования полярных стероидов морских звезд могут иметь и практическое значение, что отчасти связано с необходимостью утилизации хищных морских звезд при очистке от них марикультурных плантаций. В этом случае знания о содержании отдельных метаболитов в таком биологическом сырье могут оказаться полезными для разработки предложений о применении утилизируемых видов морских звезд в качестве источников определенных веществ с ценными фармакологическими активностями.

Следует отметить, что на данный момент основным подходом к получению индивидуальных полярных стероидов морских звезд остается их выделение и установление строения с помощью традиционных хроматографических, физико-химических и химических методов.

Целью настоящей работы явилось выделение, установление строения, изучение биосинтеза, биологической активности и биологических функций новых полярных стероидов, включая полигидроксистероиды, гликозиды полигидроксистероидов, астросапонины и циклические гликозиды из ряда ранее не изученных или малоизученных видов морских звезд, собранных в различных районах Мирового океана, в том числе с применением методов метаболомики и аквариальных экспериментов с биосинтетическими предшественниками, мечеными стабильными изотопами.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Выделить из 18-ти видов морских звезд серии новых полярных стероидов различных структурных групп, включая полигидроксистероиды, гликозиды полигидроксистероидов, астросапонины и циклические гликозиды.

2. С помощью современных физико-химических методов, таких как 1D и 2D ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения и тандемная масс-спектрометрия с различными методами ионизации, а также химических превращений установить строение выделенных соединений, включая определение абсолютной стереохимии асимметрических центров.

3. Для ряда выделенных соединений выполнить исследования биологической активности (гемолитической, цитотоксической, противоопухолевой, иммуномодулирующей, нейритогенной и нейропротекторной) с целью выявления наиболее перспективных соединений, обладающих фармакологическим потенциалом.

4. Определить предпочтительные направления окисления стероидного скелета (введения гидроксильных групп) при биосинтезе полигидроксилированных стероидов. Применить выявленные закономерности при структурном анализе метаболомных профилей полигидроксилированных стероидов морских звезд.

5. Проанализировать метаболомные профили полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов дальневосточных морских звезд *Aphelasterias japonica*, *Patiria pectinifera* и *Lethasterias fusca* с целью установления гипотетических путей биосинтеза этих стероидов в данных видах морских звезд.

6. Выполнить анализ структур и таксономического распределения известных астросапонинов с целью определения общих структурно-функциональных закономерностей, применить выявленные закономерности при анализе профилей астросапонинов морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca*, полученных с помощью метаболомного подхода.

7. Исследовать возможные пути биосинтеза полигидроксилированных стероидов и стероидов в дальневосточной морской звезде *P. pectinifera* с помощью аквариальных экспериментов с мечеными стабильными изотопами предшественниками, включая холестерин и сульфат холестерина.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Морские звезды являются богатым источником полярных стероидных соединений, причем большинство этих вторичных метаболитов относится к полигидроксистероидам, гликозидам полигидроксистероидов и астросапонином.

2. Исследование полярных стероидных соединений 18-ти видов морских звезд, собранных в различных районах Мирового океана, позволило выделить 196 индивидуальных веществ, включая полигидроксилированные стероиды и их гликозиды, астросапонины и циклические гликозиды. Среди них 90 стероидов оказались новыми природными соединениями, их химические структуры были установлены с применением современных физико-химических методов и химических превращений.

3. Показано, что в изученных нами видах морских звезд протекают разнообразные процессы трансформации стероидных предшественников: окисление (прежде всего гидроксилирование), гликозилирование, сульфатирование, образование конъюгатов с таурином и др. Каждый вид содержит большой набор стероидных метаболитов, причем эти наборы различаются от вида к виду. Вероятно, это связано с очень продолжительной эволюцией стероидогенеза в разных таксонах морских звезд.

4. Многие изученные нами виды морских звезд содержат разнообразные по структуре гликозиды (монозиды, биозиды и триозиды) полигидроксистероидов. Разделение фракций гликозилированных полигидроксистероидов позволило получить большую серию новых метаболитов (35 новых соединений), включая гликозиды с редкими или ранее неизвестными агликонами и/или углеводными цепями.

5. Стероидные олигогликозиды, называемые астросапонидами, являются еще одной характеристичной группой полярных стероидов во многих морских звездах. Нами были выделены и изучены астросапонины с новыми типами агликонов, например, с агликонами, имеющими 5 α -фураностановый цикл. Были также найдены стероиды этой структурной серии, имеющие ранее неизвестные углеводные цепи, например, олигосахаридную цепь, состоящую только из остатков 6-дезоксигексоз, или гексасахаридную цепь с редким терминальным остатком β -D-ксилопиранозы.

6. Морская звезда *Choriaster granulatus* содержит уникальный гликозид – гранулатозид С, имеющий ряд структурных особенностей, не характерных для метаболитов морских звезд, но типичных для метаболитов других классов морских беспозвоночных.

7. Морская звезда *Echinaster luzonicus* (отряд Spinulosida, семейство Echinasteridae) содержит соединения, принадлежащие к уникальной структурной группе стероидных гликозидов с макроциклическим углеводным фрагментом. Морская звезда *Leiaster* sp. (отряд Valvatida, семейство Ophidiasteridae) также содержит циклический гликозид – лузониозид А. Таким образом показано, что таксономическое распределение циклических гликозидов не ограничивается только морскими звездами рода *Echinaster*.

8. Установлено, что в морских звездах содержатся полярные стероиды, которые в нецитотоксических концентрациях могут значительно подавлять рост колоний опухолевых клеток человека. Некоторые из исследованных стероидов являются веществами, перспективными для дальнейшего изучения в качестве иммуномодулирующих соединений. Нейритогенная и нейропротекторная активности являются, вероятно, общими свойствами полигидроксистероидов и родственных гликозидов морских звезд, а структурные особенности их молекул влияют на степень выраженности проявляемых эффектов.

9. При биосинтезе полярных стероидов морских звезд реализуются предпочтительные и второстепенные пути введения гидроксильных групп, что выявляется при сравнительном анализе их структур. Очевидно, что во многих случаях сульфатирование является терминальной стадией в процессах биосинтеза полигидроксилированных соединений. Исследования метаболомных профилей астросапонинов дальневосточных морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca* показывают, что при их биосинтезе реализуются пути как последовательного наращивания олигосахаридных цепей при уже сформированных агликонах, так и дальнейшей трансформации агликонов при уже сформированных углеводных цепях.

10. Использование аквариальных экспериментов с кормлением морских звезд веществами-предшественниками, мечеными стабильными изотопами, экспериментально подтверждает, что пищевые стероиды и сульфаты стероидов являются биосинтетическими предшественниками полярных стероидов морских звезд и Δ^7 -стероидов. Анализ мест включения атомов дейтерия в целевые соединения с помощью ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии

открывает возможности установления процессов, протекающих на отдельных стадиях биосинтеза полярных стероидов в морской звезде *P. pectinifera*.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Впервые был изучен состав фракций полярных стероидов 18-ти ранее не исследованных видов или популяций морских звезд, собранных в различных районах Мирового океана. В результате хроматографического разделения смесей этих природных продуктов выделено 90 новых индивидуальных соединений и установлены их полные химические структуры. Показано, что большинство из них имеют холестановую, эргостановую или стигмастановую скелетные системы с редкими или уникальными структурными фрагментами. Их отличия от других известных стероидов состоят в необычных направлениях окисления, гликозилирования, сульфатирования, циклизации и в образовании конъюгированных форм. Например, впервые были найдены стероиды с (23*R*,24*S*)-23,24- и (24*R*)-24,25-дигидроксихолестановыми, (23*E*)-27-*нор*-25-оксохолест-23-еновой, (22*E*)-24-*нор*-26-сульфооксихолест-22-еновой и 24-метил-28-сульфооксихолестановой боковыми цепями. Из морской звезды *Anthenoides laevigatus* выделены новые стероиды с редким 5 β -холестановым скелетом.

В морской звезде *Asterias microdiscus* были обнаружены новые полигидроксилированные стероидные конъюгаты с таурином. Из экстрактов морской звезды *Pteraster marsippus* впервые получены новые дисульфатированные стероиды «офиурного» типа, один из которых имеет ранее не описанную Δ^{24} -22-сульфооксихолестановую боковую цепь.

Были установлены структуры ряда новых гликозидов полигидроксистероидов, найдены редкие триозиды и гликозиды с (1 \rightarrow 5) связями между моносахаридными остатками. Впервые в морских звездах обнаружены гликозиды, имеющие агликаны с неокисленным атомом С-6, а также гликозид с редкой 4,5-эпоксигруппой в стероидном ядре. В морской звезде *Choriaster granulatus* найден уникальный гранулатозид С, имеющий ряд структурных особенностей, не характерных для стероидных соединений морских звезд, но встречающихся в стероидах других классов морских беспозвоночных.

Было найдено 19 новых астеросапонинов, содержащих ряд уникальных структурных фрагментов. Обнаружены астеросапонины с ранее не описанными агликанами, такими как агликаны с 22,23-эпокси-20-гидроксистигмастановой боковой цепью и 16 β -гидроксильной группой из морской звезды *Archaster typicus*, и агликаны с 5 α -фуростановым скелетом из *Pentacaster regulus*. Найдены астеросапонины, имеющие углеводные цепи, не встречавшиеся ранее в олигогликозидах морских звезд.

Из морской звезды *Echinaster luzonicus* выделено 4 новых циклических гликозида, один из которых содержит уникальный 7 α -гидрокси-8 α ,9 α -эпоксифрагмент в стероидном ядре, впервые найденный в полярных стероидах морского происхождения. Был обнаружен родственный гликозид с открытой углеводной цепью. Выделение и установление строения циклического гликозида – лузониозида А из морской звезды *Leiaster* sp. позволило сделать вывод, что таксономическое распределение циклических гликозидов шире, чем предполагалось, поскольку ранее гликозиды этого структурного класса были найдены только в морских звездах рода *Echinaster*.

Впервые для ряда выделенных нами полярных стероидов были исследованы гемолитическая, эмбриотоксическая, цитотоксическая, противоопухолевая, иммуномодулирующая, нейритогенная и нейропротекторная активности. Показана перспективность изучения полярных стероидов морских звезд в качестве противоопухолевых средств, поскольку некоторые исследованные стероиды в нецитотоксических концентрациях значительно ингибировали рост колоний ряда опухолевых клеток человека. Были выявлены соединения, являющиеся перспективными иммуномодулирующими агентами. Установлено, что нейротрофиноподобная нейритогенная и нейропротекторная активности являются общими свойствами полигидроксистероидов и родственных им гликозидов морских звезд, в то время как степень проявляемых эффектов зависит от структурных особенностей исследованных соединений.

Анализ структур всех изученных к настоящему времени полигидроксилированных стероидных соединений позволил выявить основные закономерности последовательности

окисления стероидного скелета (введения гидроксильных групп) при биосинтезе полярных стероидов морских звезд. Выявленные закономерности были использованы при структурном анализе состава метаболитов морских звезд, проведенном при помощи метаболомного подхода.

Впервые проанализированы составы метаболомных профилей полигидроксилированных стероидов дальневосточных морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca*. На основе анализа структур идентифицированных метаболитов были предложены гипотетические пути биосинтеза полигидроксилированных стероидов в этих видах морских звезд. Были установлены преимущественные места окисления в полигидроксистероидах и различия в моносахаридных составах родственных им гликозидов. Сделан вывод о том, что различия в скелетных системах найденных полярных стероидов исследованных видов морских звезд могут быть связаны с разными типами их питания. Высказано предположение, что сульфатирование во многих случаях является терминальной стадией в процессах биосинтеза полигидроксилированных соединений морских звезд.

Анализ составов фракций астеросапонинов дальневосточных морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca*, изученных с помощью метаболомного подхода, позволил установить возможные пути биосинтеза соединений этого структурного класса. Показано, что биогенез астеросапонинов протекает по «мозаичному» типу, когда происходит как последовательное наращивание углеводных цепей при уже сформированных агликонах, так и трансформация агликонов, когда олигосахаридная цепь уже сформирована. Кроме того, предложен путь биосинтеза астеросапонинов посредством дополнительного окисления и трансформации первого от агликона моносахаридного остатка.

Впервые экспериментально был изучен биосинтез полигидроксилированных стероидов в морских звездах. С помощью аквариальных экспериментов по кормлению животных мечеными дейтерием холестерином и сульфатом холестерина показана трансформация использованных предшественников в (25S)-5 α -холестан-3 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-гептаол, 5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 β ,16 β ,26-октаол и стероидный монозид – астеросапонин P₁. Применение ЯМР спектроскопии и ИЭР масс-спектрометрии позволило однозначно определить места включения атомов дейтерия в эти соединения и в Δ^7 -стерины, а также предложить схему начальных этапов биосинтеза полярных стероидов в *P. pectinifera*.

Публикации. Основные результаты данных исследований опубликованы в рецензируемых научных журналах: Journal of Natural Products, Marine Drugs, Steroids, Molecules, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Metabolomics, Natural Product Communications, Natural Product Research, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Chemistry & Biodiversity, Известия Академии наук. Серия химическая, Биоорганическая химия, Химия природных соединений. Общий список работ автора включает 133 статьи (РИНЦ), включая 109 статей, индексированных Web of Science, в том числе по теме диссертации подготовлено 42 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Апробация работы. Результаты работ представлены на: XI International Symposium on Marine Natural Products, 2004, Sorrento, Italy; I и II Региональных научных конференциях «Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии», 2004 и 2006, Владивосток; IX и X Молодежных школах-конференциях по актуальным проблемам химии и биологии, 2005 и 2006, Владивосток; Всероссийской конференции «Фундаментальные науки – медицине», 2005, Новосибирск; II Международной конференции «Химия, структура и функции биомолекул», 2006, Минск; II Международной научной конференции «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений», 2007, Алматы, Казахстан; XIV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, 2012, Владивосток; 2nd International Symposium on Life Sciences, 2013, Vladivostok, Russia; Второй Всероссийской конференции по иглокожим, посвященной памяти Г.М. Беляева, 2015, Москва; IV Всероссийской конференции по органической химии, 2015, Москва; 24th Conference on Isoprenoids, 2018, Bialystok, Poland; Future of Biomedicine Conference FEFU School of Biomedicine, Russky Island, 2019, Vladivostok, Russia; XVI International Symposium on Marine Natural Products and XI European Conference on Marine Natural Products, 2019, Peniche, Portugal; Юбилейной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его

основателя академика Г.Б. Елякова, 2019, Владивосток; New Frontiers in Natural Product Chemistry. Scientific Seminar with International Participation, 2021, Kishinev, Moldova.

Личный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории химии морских природных соединений ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Автором самостоятельно были осуществлены планирование, дизайн и координирование экспериментов. При непосредственном участии автора были выделены индивидуальные полярные стероидные соединения, в работе также участвовали д.х.н. Кича А.А. и к.х.н. Маляренко Т.В., проанализированы полученные данные ЯМР спектроскопии (ЯМР спектры были получены д.х.н. Калиновским А.И., Лаборатория физико-химических методов исследований (ЛФХМИ ТИБОХ ДВО РАН)), масс-спектрометрии (масс-спектры были получены д.х.н. Дмитренко П.С. и к.х.н. Поповым Р.С., ЛФХМИ ТИБОХ ДВО РАН), проведены необходимые химические превращения и установлены структуры выделенных веществ. Автором проведен анализ литературных данных, касающийся структур полярных стероидов морских звезд. Полученные знания о структурных закономерностях полярных стероидов были применены при метаболомных исследованиях морских звезд, осуществленных д.х.н. Дмитренко П.С. и к.х.н. Поповым Р.С. (ЛФХМИ ТИБОХ ДВО РАН), при непосредственном участии автора. Изучение биологической активности полярных стероидов проводилось сотрудниками Лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН (зав. лаб., д.х.н. Ермаковой С.П. и к.х.н. Маляренко О.С.), Лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН (зав. лаб., д.б.н., чл-корр. РАН Амининым Д.Л., к.б.н. Агафоновой И.Г., к.б.н. Пислягиным Е.А., к.б.н. Менчинской Е.С., к.б.н. Юрченко Е.А. и н.с. Чайкиной Е.Л.), Лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН (к.б.н. Соколовой Е.В.), Лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН (н.с. Кузьмич А.С.), а также сотрудниками Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ), Новосибирск (м.н.с. Пальяновой Н.В. и к.б.н. Панковой Т.М. под руководством к.б.н. Старостиной М.В. и д.б.н., академика Штарка М.Б.). Автор осуществлял анализ полученных экспериментальных данных и подготовку публикаций. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному консультанту академику РАН д.х.н. Стонику В.А. за всестороннюю поддержку и помощь при выполнении диссертационной работы. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам Лаборатории химии морских природных соединений д.х.н. Кича А.А. и к.х.н. Маляренко Т.В. за сотрудничество в получении и структурных исследованиях полярных стероидов морских звезд. Также автор благодарит д.х.н. Калиновского А.И. за получение ЯМР спектров и помощь в интерпретации; к.х.н. Дмитренко А.С. за получение ЯМР данных для определения абсолютной стереохимии гептаола из *Henricia leviuscula*; д.х.н. Дмитренко П.С. и к.х.н. Попова Р.С. за получение масс-спектров и проведение метаболомных исследований морских звезд; д.х.н. Ермакову С.П., к.х.н. Маляренко О.С., д.б.н. чл-корр. РАН Аминина Д.Л., к.б.н. Агафонову И.Г., к.б.н. Пислягина Е.А., к.б.н. Менчинскую Е.С., к.б.н. Юрченко Е.А., н.с. Чайкину Е.Л., к.б.н. Соколову Е.В., н.с. Кузьмич А.С. (ТИБОХ ДВО РАН), а также м.н.с. Пальянову Н.В., к.б.н. Панкову Т.М., к.б.н. Старостину М.В. и д.б.н. академика РАН Штарка М.Б. (ФИЦ ФТМ) за изучение биологической активности выделенных соединений; к.б.н. Смирнова А.В. (ЗИН, Санкт-Петербург, Россия), к.б.н. С.Ш. Даутова (ННЦМБ ДВО РАН, Владивосток), н.с. Краснохина В.Б. (ТИБОХ ДВО РАН), н.с. Гребнева Б.Б. (ТИБОХ ДВО РАН), н.с. Антохину Т.И. (ИПЭЭ РАН), доктора Молло Э. (Институт биомолекулярной химии, Неаполь, Италия) и доктора До Конг Тунга (Институт Морских ресурсов и окружающей среды, Вьетнам) за видовое определение морских звезд. Кроме того, автор выражает искреннюю признательность коллективу Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН за всестороннюю помощь и поддержку.

Часто используемые сокращения. **Хроматография:** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГЖХ – газо-жидкостная хроматография; ГЖХ-МС – газовая

хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; **ТСХ** – тонкослойная хроматография на пластинках с закрепленным слоем. **Масс-спектрометрия:** **ББИ МС** – масс-спектрометрия с бомбардировкой быстрыми ионами; **ВР МС** – масс-спектрометрия высокого разрешения; **ИЭ МС** – масс-спектрометрия с ионизацией электронами; **ИЭР МС** – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением; **МАЛДИ-ВП МС** – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией; **МС/МС** – тандемная масс-спектрометрия. **Спектроскопия ядерного магнитного резонанса:** **COSY** – **Correlation Spectroscopy** – корреляционная спектроскопия; **DEPT** – **Distortionless Enhancement by Polarization Transfer** – неискаженное усиление переносом поляризации; **HSQC** – **Heteronuclear Single Quantum Connectivity** – гетероядерная одноквантовая корреляция; **NOESY** – **Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy** – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена; **ROESY** – **Rotation-frame Overhauser Effect Spectroscopy** – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; **TOCSY** – **Total Correlation Spectroscopy** – тотальная корреляционная спектроскопия; **КССВ** – константа спин-спинового взаимодействия; **м.д.** – миллионная доля; **НМВС** – **Heteronuclear Multiple Bond Connectivity** – гетероядерная многополосная корреляция; **с** – синглет, **д** – дублет, **т** – триплет, **кв** – квартет, **дд** – дублет дублетов, **дт** – дублет триплетов, **м** – мультиплет, **уш. с.** – уширенный сигнал; **ХС** – химический сдвиг; **ЯМР** – ядерный магнитный резонанс. **Прочие сокращения:** **AGL** – агликон; **BDNF** – **Brain-Derived Neurotrophic Factor** – нейротрофический фактор мозга; **дHex** – дезоксигексоза; **DXHU** – гидратированная форма 6-дезоксидеокси-4-гексулозы; **Hex** – гексоза; **МТРА** – α -метокси- α -(трифторметил)фенилуксусная кислота; **NGF** – **Nerve Growth Factor** – фактор роста нервов; **OHSC** – **Organotypic Hippocampal Slice Cultures** – органотипическая культура срезов гиппокампа крыс; **Pent** – пентоза; **АФК** – активные формы кислорода; **ГК₅₀** – расчетная концентрация, вызывающая гемолиз 50% клеток; **ИК₅₀** – расчетная концентрация, вызывающая гибель 50% клеток; **МТС** – метод определения цитотоксической активности с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолия; **МТТ** – метод определения цитотоксической активности с использованием бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия; **ОВУ** – относительное время удерживания; **ТФУ** – трифторуксусная кислота.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Структурные исследования полярных стероидных соединений морских звезд

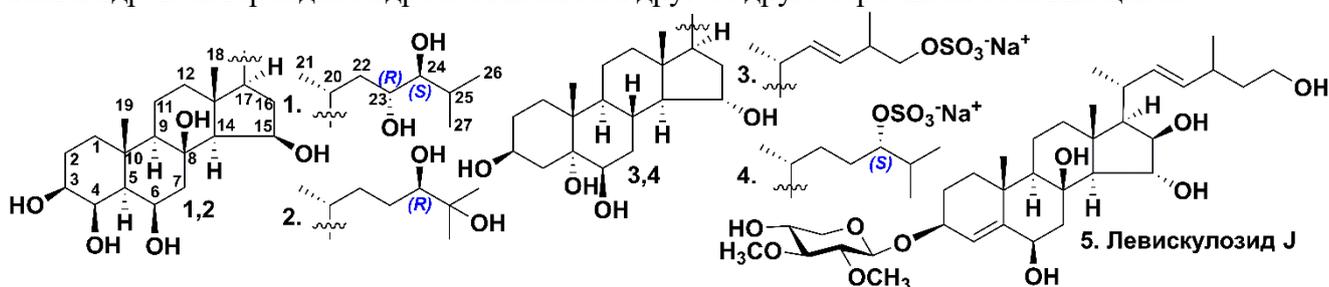
В качестве объектов нашей работы были выбраны ранее неисследованные виды морских звезд и/или новые популяции малоизученных видов морских звезд, собранных в различных районах Мирового океана¹. Для выделения индивидуальных полярных стероидов использовали разнообразные хроматографические методы, причем в каждом случае используемые сорбенты и системы элюентов подбирались в зависимости от сложности состава смесей и полярности целевых метаболитов. Общая схема выделения индивидуальных веществ была следующая: на первой стадии проводили обессоливание экстрактов с помощью гидрофобной хроматографии низкого давления на Полихrome-1 или Амберлите XAD-2; затем полученные суммарные фракции полярных стероидов подвергали разделению на фракции с помощью гель-проникающей хроматографии на сефадексе LH-20, силикагеле и флорисиле; выделение чистых метаболитов проводили с помощью ВЭЖХ, преимущественно на колонках с обращенной фазой. Строение полярных стероидных соединений морских звезд устанавливали с помощью современных физико-химических методов, в основном одно- (1D) и двумерной (2D) спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), включая ¹H-¹H COSY, HSQC, НМВС, ROESY, NOESY, H2BC и 1D TOCSY эксперименты, и масс-спектрометрии с различными способами ионизации, включая МАЛДИ-ВП, ББИ и ИЭР МС. Кроме того, применялись химические методы, такие как гидролиз,

¹ Далее мы используем термины «дальневосточные», «вьетнамские», «арктические» и «антарктические» для краткого указания географического региона сбора исследуемой морской звезды. Так, например, дальневосточные морские звезды собраны в морях Дальнего Востока России, а вьетнамские – в Южно-Китайском море у побережья Республики Вьетнам.

ацетилирование, десульфатирование и др., чтобы получить и изучить соответствующие производные и/или продукты. Для определения абсолютных конфигураций асимметрических центров в ряде случаев получали оптически активные производные, которые затем анализировали с помощью ЯМР спектроскопии или, в случае определения *D*- или *L*-ряда моносахаридных остатков, с помощью ГЖХ.

1.1 Полярные стероиды дальневосточной морской звезды *Henricia leviuscula*

Исследования морской звезды *H. leviuscula* (отряд Spinulosida, семейство Echinasteridae), собранной в Охотском море, привели к выделению 9-ти стероидов, включая 4 новых полигидроксистероида **1–4** и новый стероидный гликозид – левискулозид **5**. Ранее стероидный состав этой морской звезды не был изучен. На основании данных масс-спектров высокого разрешения (+)-МАЛДИ-ВПМС соединениям **1** и **2** была приписана одинаковая молекулярная формула $C_{27}H_{48}O_7$. В (+)-ББИ масс-спектрах стероидов **1** и **2** наблюдались отличия в значениях пиков, указывающие на потерю фрагментов боковых цепей этих соединений. Детальное сравнение спектральных данных, относящихся к стероидным ядрам соединений **1** и **2**, с соответствующими данными для совместно выделенного известного 5α -холестан- $3\beta,4\beta,6\beta,8,15\beta,24$ -гексаола показало, что эти вещества имеют $3\beta,4\beta,6\beta,8,15\beta$ -пентагидроксистероидное ядро и отличаются друг от друга строением боковых цепей.



Присутствие в ЯМР 1H спектрах стероида **1** сигналов протонов боковой цепи: трех дублетов метильных групп CH_3 -27, CH_3 -26 и CH_3 -21, дублета дублетов H-24 при 3.11 м.д. (δ_c 81.4) и мультиплета H-23 при 3.55 м.д. (δ_c 73.2), показало, что соединение **1** имеет 23,24-дигидроксихолестановую боковую цепь. Относительная конфигурация асимметрических центров C-23 и C-24 в **1** была определена с помощью анализа гетероядерных геминальных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^{2,3}J_{C,H}$ и гомоядерных вицинальных КССВ $^3J_{H,H}$ («*J*-based configuration analysis», метод Мурата)². Установлено, что конформация C-23/C-24 диольного фрагмента боковой цепи является равновесной для альтернативных В-2/В-3 ротамеров с *эритро*-ориентацией гидроксильных групп (рис. 1А). Отсутствие РОЕ-эффекта между протонами H-22 и H-25, а также регистрация РОЕ-эффекта между протонами H-22 и H-24 подтвердили *эритро*-конфигурацию ОН-групп в **1**. Для определения абсолютной стереохимии асимметрических центров C-23 и C-24 в боковой цепи соединения **1** были получены его 23,24-ди-(*R*)-(+)- и 23,24-ди-(*S*)-(–)-МТРА эфиры. Анализ ЯМР спектров полученных МТРА эфиров стероида **1** показал отрицательные значения $\Delta\delta^{SR}$ для ХС сигналов H₂-22 и H-23 и положительные значения $\Delta\delta^{SR}$ для ХС сигналов H-24, H-25, H₃-26 и H₃-27 (рис. 1Б), что указывало на (23*R*,24*S*)-конфигурацию стереогенных центров в **1**.

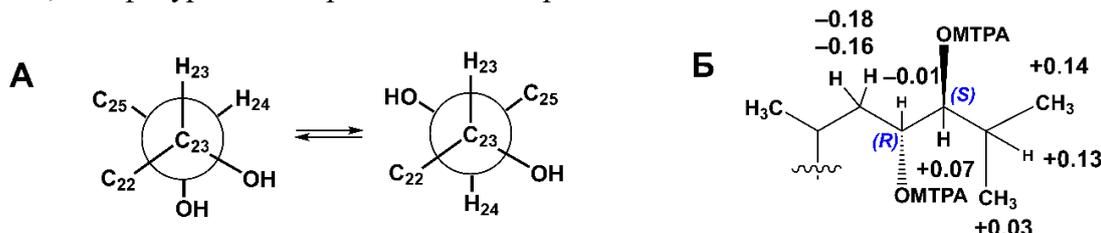


Рисунок 1 – (А) В-2/В-3 ротамеры 23,24-диольной системы соединения **1**. (Б) Данные $\Delta\delta^{SR}$ 23,24-ди-(*R*)-(+)- и 23,24-ди-(*S*)-(–)-МТРА эфиров **1**

² ЯМР эксперименты были проведены к.х.н. Дмитренко А.С. в Институте биоорганических исследований Сантори, Япония (Suntory Institute for Bioorganic Research, Japan) на ЯМР-спектрометре Bruker DMX-750.

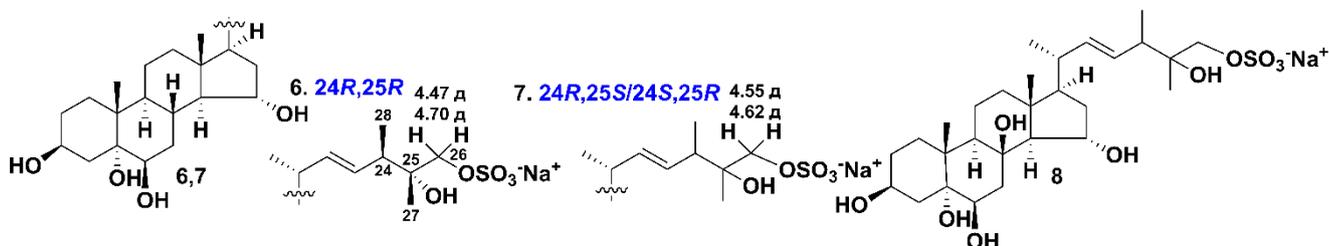
Анализ спектров ЯМР ^{13}C и DEPT, а также 2D ЯМР спектров соединения **2** позволил установить, что полигидроксистероид **2** имеет редкую 24,25-дигидроксилированную боковую цепь. Абсолютная конфигурация С-24 была определена с помощью метода Мошера. Анализ ЯМР ^1H спектров (*R*)-(+)-МТРА и (*S*)-(-)-МТРА эфиров соединения **2** показал положительное значение $\Delta\delta^{RS}$ для ХС сигналов протонов H₂-23 и H₃-21 и отрицательное значение $\Delta\delta^{RS}$ для ХС сигналов протонов CH₃-27 и CH₃-26, что указывало на (*R*)-конфигурацию С-24.

Соединению **3** была приписана молекулярная формула C₂₆H₄₃O₈Na на основании данных ВР (+)-МАЛДИ-ВП и ББИ МС. Анализ данных ЯМР спектров указывал на 3 β ,5 α ,6 β ,15 α -тетрагидроксистероидное ядро в **3**, а также на 26-*O*-сульфоокси- Δ^{22E} -24-*нор*-холестановую боковую цепь, впервые обнаруженную в стероидных метаболитах морских звезд. Стероид **4** имеет 3 β ,5,6 β ,15 α -тетрагидроксистероидное ядро и 24-*O*-сульфатированную (24*S*)-гидроксихолестановую боковую цепь. Молекулярная формула левискулозида **5** была установлена как C₃₄H₅₆O₁₀ на основании данных ВР (+)-МАЛДИ-ВП МС. В (+)-ББИ масс-спектре **5** наблюдались пики фрагментных ионов, соответствующие потере ди-*O*-метилпентозного остатка. Детальный анализ ЯМР спектров гликозида **5** показал, что он имеет Δ^4 -3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β -пентагидроксистероидное ядро с остатком 2,3-ди-*O*-метил- β -ксилопиранозы при С-3, а также редкую Δ^{22E} -27-*нор*-24-метил-26-гидроксихолестановую боковую цепь.

1.2 Полигидроксистероиды дальневосточной морской звезды *Ctenodiscus crispatus*

Исследование фракции сульфатированных полигидроксистероидов морской звезды *C. crispatus* (отряд Paecillosida, семейство Stenodiscidae), собранной в заливе Посьета Японского моря, привело к выделению трех новых полигидроксистероидов и одного ранее известного родственного соединения, структуры которых, включая стереохимию боковых цепей, были установлены с помощью ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии. Были получены 4 соединения: ранее известный 26-*O*-сульфат (22*E*)-24-метил-5 α -холест-22-ен-3 β ,5,6 β ,15 α ,25,26-гексаола (**6**), его новый стереоизомер по боковой цепи (**7**), а также новые стероиды – 26-*O*-сульфат (22*E*,24 ξ ,25 ξ)-24-метил-5 α -холест-22-ен-3 β ,5,6 β ,8,15 α ,25,26-гептаола (**8**) и выделенный одновременно из *H. leviuscula* пентаол (**3**).

Ранее стереохимия стероида **6** не была установлена. Мягкое сольволитическое расщепление **6** привело к получению десульфатированного производного, которое было восстановлено над катализатором Адамса (восстановленный PtO₂). В результате было получено 22,23-дигидропроизводное, которое в реакции с МТРА-Cl дало 3,15,26-три-(*R*)-МТРА эфир. Сравнение данных спектров ЯМР гидрированного производного стероида **6** с соответствующими данными модельных (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*)-диметилпентан-1,2-диолов позволило предположить только два варианта стереохимии боковых цепей: с (24*R*,25*R*)- или с (24*R*,25*S*)-конфигурацией асимметрических центров. Сравнение ХС протонов H-26 и H'-26 в ЯМР ^1H спектрах 3,15,26-три-(*R*)-(+)-МТРА эфира **6** с соответствующими литературными данными позволило определить конфигурации стереогенных центров в стероиде **6** как (24*R*) и (25*R*).



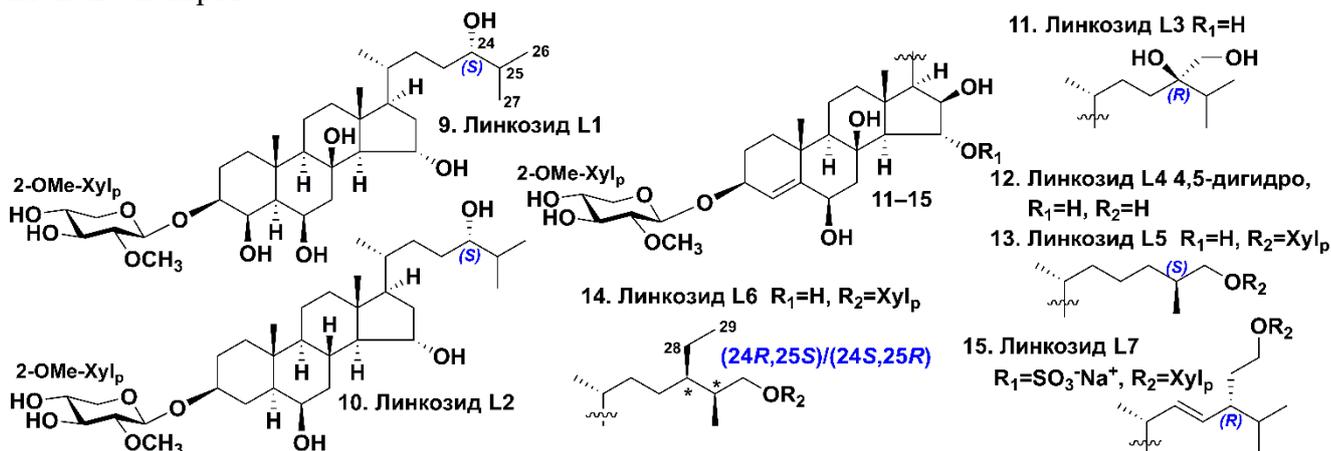
Соединение **7** отличается от стероида **6** только конфигурацией асимметрических центров при С-24 и С-25. По аналогичной схеме для **7** были получены МТРА производные, анализ ЯМР спектров которых позволил предположить (24*S*,25*R*)- или (24*R*,25*S*)-конфигурации асимметрических центров. Строение стероида **8** было установлено как 26-*O*-сульфат (22*E*,24 ξ ,25 ξ)-24-метил-5 α -холест-22-ен-3 β ,5,6 β ,8,15 α ,25,26-гептаола. Так как соединение **8** было выделено в небольшом количестве (1.2 мг), к сожалению, не было возможности получить

необходимые производные для определения абсолютной конфигурации асимметрических центров С-24 и С-25.

1.3 Гликозиды полигидроксистероидов морской звезды *Linckia laevigata*, собранной во вьетнамских водах

Нами был исследован состав фракций полигидроксилированных стероидных соединений из голубой морской звезды *L. laevigata* (отряд Valvatida, семейство Ophiodiasteridae), собранной у побережья Вьетнама. Было выделено 7 новых гликозидов, названных линкозидами L1–L7 (9–15), и 18 известных ранее соединений.

В ВР (+)-ИЭР масс-спектре линкозида L1 (9) наблюдался пик катионизированной молекулы с m/z 637.3915 $[M + Na]^+$, что указывало на молекулярную формулу $C_{33}H_{58}O_{10}$. Спектры ЯМР 1H , ^{13}C и DEPT 9 показали присутствие в молекуле 33-х атомов углерода, включая 5 метильных, 9 метиленовых и 15 метиновых групп, 3 четвертичных атома углерода и 1 метоксигруппу. Сигналы аномерного протона при 4.45 м.д. ($J = 7.5$ Гц), аномерного атома углерода при 102.6 м.д. и атомов углерода, связанных с кислородом, при 80.5, 74.6, 76.2, 76.8, 70.1, 78.1, 84.7, 77.6, 71.3 и 66.8 м.д. указывали на β -пентозидный фрагмент, присоединенный к гексагидроксизамещенному стероидному ядру. Анализ 2D ЯМР спектров позволил отнести все сигналы H и C в молекуле. Установлено, что линкозид L1 имеет $3\beta,4\beta,6\beta,8,15\alpha,24$ -гексагидроксихолестановый агликон с остатком 2-*O*-метил- β -ксилопиранозы при С-3. Кислотный гидролиз гликозида 9 дал 2-*O*-метил-*D*-ксилозу (по данным ТСХ, ГЖХ и оптического вращения). Присоединение моносахаридного остатка к С-3 было подтверждено корреляциями H-1'/C-3 в HMBC спектре и H-3/H-1' в NOESY спектре. Сравнение данных ЯМР спектров 9 с соответствующими литературными данными подтвердило присутствие 24-гидроксихолестановой боковой цепи в 9. Стереохимия центра С-24 была определена на основе анализа ЯМР 1H спектров (*R*)- и (*S*)-МТРА производных. В спектре ЯМР 1H 4',15,24-три-(*R*)-МТРА эфира сигналы CH_3 -26 и CH_3 -27 находились в более сильном поле (0.80 и 0.82 м.д.), чем в соответствующем спектре 4',15,24-три-(*S*)-МТРА эфира (0.89 и 0.92 м.д.). Эти данные хорошо согласовывались с аналогичными данными для (*R*)- и (*S*)-МТРА производных (24*S*)-24-гидроксистероидов. В спектрах ЯМР агликонной части линкозида L2 (10) присутствовали сигналы редкого $3\beta,6\beta,15\alpha$ -тригидроксистероидного ядра. Стереохимия С-24 была определена как (*S*) по аналогии со стереохимией в гликозиде 9 и на основании сравнения их ЯМР спектров.



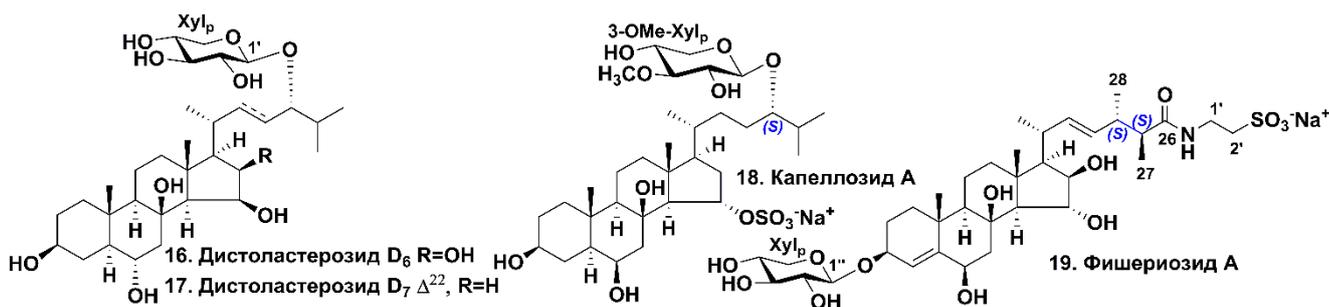
Анализ данных спектров ЯМР и МС линкозида L3 (11) указывал на наличие в молекуле 2-*O*-метил- β -*D*-ксилопиранозного остатка и Δ^4 - $3\beta,6\beta,8,15\alpha,16\beta$ -пентагидроксихолестанового агликона. Место присоединения моносахаридного остатка в 11 было подтверждено корреляцией сигналов аномерного протона H-1' и С-3 агликона в HMBC спектре. Сравнение данных ЯМР спектров 11 с соответствующими литературными данными подтвердило присутствие 24-гидроксиметил-24-гидроксихолестановой боковой цепи. Согласно литературным данным, сигналы атомов H-28, H'-28 и С-28 в ЯМР спектрах синтетических (24*R*)- и (24*S*)-эпимеров

24-гидроксиметил-24-гидроксихолестерина различаются, данные ЯМР спектров гликозида **11** для сигналов H-28, H'-28 и C-28 ($\Delta\delta_H = 0.00$ ppm, 66.1 м.д.) ближе к соответствующим значениям для (24*R*)-эпимера. Анализ ЯМР ^1H спектров, полученных для (*R*)- и (*S*)-МТРА эфиров **11**, подтвердил (24*R*)-конфигурацию.

Молекулярная формула линкозида L4 (**12**) была определена на основании данных (+)-МАЛДИ-ВП масс-спектра как $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{O}_{10}$. Анализ спектров ЯМР показал, что соединение **12** является 4,5-дигидропроизводным известного эхинастерозида С. (25*S*)-Конфигурация стереоцентра С-25 в соединении **12** была предложена по аналогии с эхинастерозидом С. Спектры ЯМР линкозида L5 (**13**) содержали сигналы дополнительного моносахаридного остатка по сравнению со спектрами эхинастерозида С, которые, согласно литературным данным, являлись сигналами β -D-ксилопиранозного звена. Присоединение остатка ксилозы к С-26 боковой цепи агликона было установлено на основании сдвигов в слабое поле сигналов С-26 и H-26 (от 68.4 к 76.3 м.д. и от 3.42 к 3.68 м.д. соответственно) в ЯМР ^{13}C и ^1H спектрах по сравнению со спектрами эхинастерозида С. Места присоединения 2-ОМе- β -Хуl_p к С-3 и β -Хуl_p к С-26 были подтверждены также НМВС корреляциями сигналов аномерных протонов и атомов углерода: H-1'/C-3 и H-1''/C-26. Линкозид L6 (**14**) содержит идентичный гликозиду **13** агликон и моносахаридные остатки и отличается только присутствием редкой 26-*O*-(β -D-ксилопиранозил)-24-этилхолестановой боковой цепи. Относительные конфигурации при С-24 и С-25 были установлены сравнением данных ЯМР ^{13}C спектра **14** с данными спектров модельных синтетических соединений, в результате чего были предположены (24*R*,25*S*)- или (24*S*,25*R*)-конфигурации. Поскольку этот гликозид был выделен в небольшом количестве, не было возможности получить его 26-(*R*)- и 26-(*S*)-МТРА производные, необходимые для определения абсолютной конфигурации асимметрических центров С-24 и С-25. Сравнение спектральных данных линкозида L7 (**15**) с данными совместно выделенного известного эхинастерозида F подтвердило присутствие Δ^4 -3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β ,29-гексагидроксистероидного агликона с сульфоксигруппой при С-15, 2-ОМе- β -D-Хуl_p при С-3 и β -D-Хуl_p при С-29. Отличия наблюдались только в сигналах ядер H и C боковой цепи. Установлено, что гликозид **15** содержит редкую 29-*O*-(β -D-ксилопиранозил)-24-этилхолест-22-еновую боковую цепь. Структура **15** была подтверждена анализом ЯМР спектров полученного мягким сольволизом десульфатированного производного.

1.4 Полигидроксилированные стероидные соединения дальневосточной морской звезды *Distolasterias nipon*

В продолжение изучения минорных полярных стероидов морских звезд нами была исследована дальневосточная морская звезда *D. nipon* (отряд Forcipulatida, семейство Asteroiidae), собранная в заливе Посьета Японского моря. В результате были выделены и охарактеризованы 2 новых стероидных гликозида – дистоластерозиды D₆ (**16**) и D₇ (**17**), а также 5 ранее известных соединений. Для выделения индивидуального гликозида **16** пришлось ацетилировать содержащую его подфракцию, разделять полученные перацетаты с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе, а потом дезацетилировать выделенный индивидуальный перацетат **16a** с получением чистого дистоластерозида D₆ (**16**).



Данные ВР (+)-МАЛДИ-ВП масс-спектра дистоластерозида D₆ (**16**) позволили установить молекулярную формулу $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{O}_{10}$. Сравнение данных ЯМР спектров с литературными данными

показало присутствие в **16** 5 α -холестан-3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β -пентагидроксистероидного ядра с β -D-ксилопиранозным остатком при центре C-24, имеющем (S)-конфигурацию. Анализ данных ЯМР спектров дистоластерозида D₇ (**17**) и их сравнение с соответствующими данными для **16** позволили установить отсутствие ОН-группы при C-16 в агликоне **17** и наличие Δ^{22} -связи. Данные 2D ЯМР спектров полностью подтвердили предложенную структуру **17**.

1.5 Новый стероидный гликозид из вьетнамской морской звезды *Ogmaster capella*

Был изучен стероидный состав тропической морской звезды *O. capella* (отряд Valvatida, семейство Goniasteridae), собранной драгированием в водах Вьетнама. Ранее полярные стероиды этой морской звезды не исследовались. Были выделены 2 стероидных гликозида, один из которых, капеллозид А (**18**), является новым природным соединением.

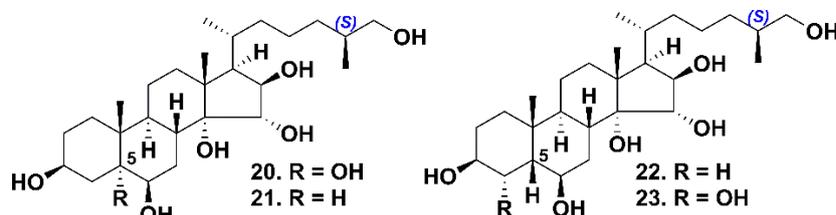
Молекулярная формула соединения **18** была установлена как C₃₃H₅₇O₁₂SNa на основании данных ВР ИЭР масс-спектров. ИЭР МС/МС спектры содержали пики фрагментных ионов, указывающие на одновременную потерю сульфатной группы и остатка метилпентозы. ЯМР ¹³C и DEPT спектры **18** содержали сигналы 33-х атомов углерода, включая сигналы 5-ти метильных, 10-ти метиленовых, 14-ти метиновых групп, 2-х четвертичных атомов углерода, одного оксигенированного третичного атома С и одной MeO-группы. В ЯМР ¹H спектре стероида **18** присутствовал в слабом поле сигнал аномерного протона при 4.22 м.д. (д, J = 7.5 Гц), который коррелировал в HSQC спектре с соответствующим сигналом атома углерода при 105.1 м.д. Отнесение сигналов всех протонов и атомов углерода в **18** было осуществлено с помощью 2D ЯМР экспериментов, включая ¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC и ROESY. Место присоединения моносахаридного остатка к агликону было подтверждено HMBC экспериментом. Таким образом, структура капеллозида А (**18**) была установлена как натриевая соль 15-O-сульфата (24S)-24-O-(3-O-метил- β -D-ксилопиранозил)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,8,15 α ,24-пентаола. Этот гликозид имеет редкую 24-O-(3-O-метил- β -D-ксилопиранозил)-холестановую боковую цепь.

1.6 Новый стероидный гликозид из дальневосточной морской звезды *Leptasterias fisheri*

Изучение полярных стероидных соединений морской звезды *L. fisheri* (отряд Forcipulatida, семейство Asteroidea), собранной в заливе Анива Охотского моря у побережья о. Сахалин, привело к выделению нового стероидного гликозида фишерииозида А (**19**). Данные ВР (+)- и (-)-ИЭР масс-спектров фишерииозида А (**19**) вместе с данными ЯМР спектров указывали на молекулярную формулу C₃₅H₅₆NO₁₃SNa, а также на наличие в молекуле **19** β -ксилопиранозного остатка. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C агликонной части гликозида **19** содержали сигналы протонов и атомов углерода, характеристичные для Δ^4 -3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β -пентагидроксистероидного ядра, гликозилированного по C-3. В спектрах боковой цепи агликона присутствовали сигналы атомов, принадлежащие остатку таурина. Значения ХС этих сигналов были близки к соответствующими значениям для спектров Δ^{22E} -26-амидэргостановой боковой цепи полигидроксистероида из *Muxoderma platyacanthum* и минутозида В из *Anasterias minuta*. Присутствие в боковой цепи стероидного агликона амидной связи с остатком таурина подтверждалось также наличием в тандемном ИЭР масс-спектре пика иона [M + Na]⁺ с m/z 776 пиков фрагментных ионов с m/z 126 [SO₃Na₂]⁺, 153 [C₂H₃SO₃Na₂]⁺, 225 [C₃H₉NSO₄Na₂]⁺, а в тандемном ИЭР масс-спектре пика иона [M - Na]⁻ с m/z 730 – пиков фрагментных ионов с m/z 80 [SO₃]⁻, 108 [C₂H₄SO₃]⁻, 123 [C₂H₅NSO₃]⁻, 151 [C₃H₅NSO₄]⁻, 179 [C₅H₉NSO₄]⁻, 207 [C₇H₁₃NSO₄]⁻ и 246 [C₁₀H₁₆NSO₄]⁻, соответствующих последовательному отщеплению фрагментов боковой цепи агликона. Применение 2D ЯМР экспериментов, включая ¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC и ROESY, позволило отнести сигналы всех протонов и атомов углерода гликозида **19**. Сравнение данных ЯМР с соответствующими данными для синтетических этиловых эфиров Δ^{22E} -24-метил-26-карбоксистероидов позволило предположить, что гликозид **19** является эритро-изомером с (24S,25S)-конфигурациями асимметрических центров. Фишерииозид А является первым природным соединением с (24S,25S)-конфигурациями асимметрических центров в Δ^{22E} -26-амидэргостановой боковой цепи.

1.7 Новые полигидроксилированные стероиды морской звезды *Anthenoides laevigatus*, собранной у побережья Вьетнама

Исследование ранее неизученной морской звезды *A. laevigatus* (отряд Valvatida, семейство Goniasteridae), собранной у побережья провинции Кинхон, Вьетнам, привело к выделению четырех новых полигидроксилированных стероидов (**20–23**) вместе с двумя известными соединениями.



Молекулярная формула стероида **20** была установлена как $C_{27}H_{48}O_7$, основываясь на значениях пиков ионов $[M + Na]^+$ с m/z 507.3292 и $[M - H]^-$ с m/z 483.3321 в ВР ИЭР масс-спектрах соответственно. Тщательный анализ ЯМР спектров позволил установить 5α -холестановый скелет соединения **20** с редким для полярных стероидов $3\beta, 5, 6\beta, 14, 15\alpha, 16\beta, 26$ -гептагидроксизамещением. ЯМР 1H спектр $3, 15, 26$ -три-(*R*)-МТРА эфира, полученного из **20**, содержал сигналы H_2-26 в виде двух близких дублетов при 4.15 и 4.18 м.д., в то время как спектр $3, 6, 15, 26$ -тетра-(*S*)-МТРА эфира содержал два хорошо разделенных дублета дублетов при 4.08 и 4.24 м.д. Эти значения ХС были близки к таковым в спектрах МТРА эфиров ($25S$)- 26 -гидроксистероидов. Так, структура полигидроксистероида **20** была установлена как ($20R, 25S$)- 5α -холестан- $3\beta, 5, 6\beta, 14, 15\alpha, 16\beta, 26$ -гептаол. Аналогичным образом структура соединения **21** была установлена как ($20R, 25S$)- 5α -холестан- $3\beta, 6\beta, 14, 15\alpha, 16\beta, 26$ -гексаол.

Молекулярная формула стероида **22** оказалась идентичной таковой для **21**. Детальное сравнение ЯМР спектров стероидов **22** и **21** показало, что ХС сигналов протонов и атомов углерода стероидных колец C/D и боковой цепи были близки, что указывало на $14, 15\alpha, 16\beta, 26$ -тетрагидроксизамещение в **22**, в то время как ХС сигналов колец A/B в спектрах соединения **22** существенно отличались от ХС соответствующих сигналов в спектрах **21**. В ЯМР ^{13}C спектрах **22** сигнал CH_3-19 стероида **22** смещался в слабое поле от 16.1 к 26.3 м.д. по сравнению со спектром **21**. Этот факт указывал на *цис*-A/B сочленение колец в **22**. КССВ протона H-3 в спектре ЯМР 1H (уш. кв, $J = 2.7$ Гц) соответствовала 3β -ОН-группе в 5β -холестановом ядре, а КССВ протона H-6 (кв, $J = 2.7$ Гц) указывала на 6β -ОН-группу в **22**. Таким образом, установлено, что стероид **22** является *цис*-A/B изомером стероида **21** и имеет структуру ($20R, 25S$)- 5β -холестан- $3\beta, 6\beta, 14, 15\alpha, 16\beta, 26$ -гексаола.

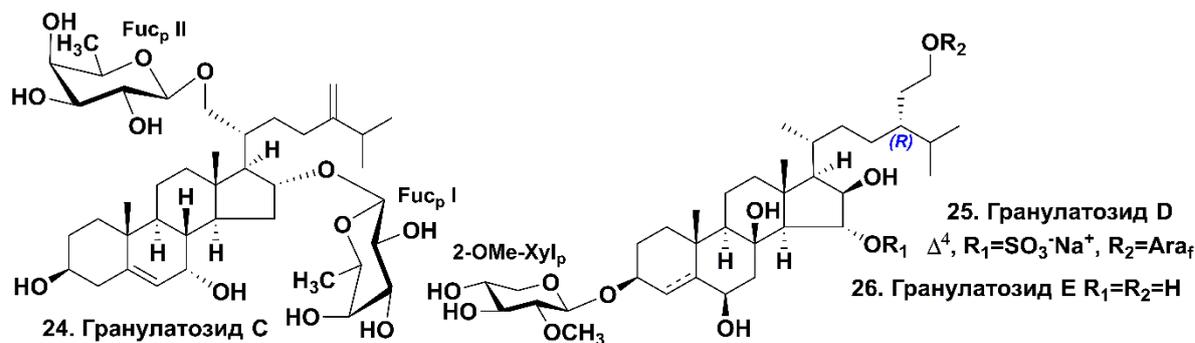
Стероид **23** имеет молекулярную формулу $C_{27}H_{48}O_7$ согласно данным ВР ИЭР масс-спектров. Анализ данных ЯМР 1H спектров показал редкое 5β -сочленение колец A и B, подобное сочленению колец в **22**. Дополнительная ОН-группа расположена в **23** при C-4, небольшие значения КССВ протонов H-3, H-4 и H-6 в спектре указывают на отсутствие аксиально-аксиального взаимодействия между соседними протонами. В результате был установлен $3\beta, 4\alpha, 6\beta$ -тригидроксилированный фрагмент в *цис*-A/B-сочлененном стероидном ядре. Структура **23** была определена как ($20R, 25S$)- 5β -холестан- $3\beta, 4\alpha, 6\beta, 14, 15\alpha, 16\beta, 26$ -гептаол. Соединения **22** и **23** имеют редкий для полярных стероидов морских звезд 5β -холестановый скелет.

1.8 Полярные стероиды вьетнамской морской звезды *Choriaster granulatus*

Нами был исследован состав фракций полярных стероидных соединений из ранее неизученной популяции морской звезды *C. granulatus* (отряд Valvatida, семейство Oreasteridae). В результате были найдены 3 новых гликозида полигидроксистероидов, гранулатозиды C–E (**24–26**), и ряд известных соединений, включая 13 гликозидов полигидроксистероидов и 1 стероидный гептаол.

Молекулярная формула гранулатозида C (**24**) была определена как $C_{40}H_{66}O_{12}$ из данных ВР ИЭР МС. ЯМР спектры указывали на наличие в **24** тетрациклического агликона с $5(6)$ -двойной связью и тремя ОН-группами при C-3, C-7 и C-16. Конфигурации ОН-групп были

определены как 3β , 7α и 16β из значений ХС и КССВ сигналов соответствующих протонов и атомов углерода и были подтверждены ROESY корреляциями. В ЯМР спектрах боковой цепи агликона **24** наблюдались сигналы двух вторичных метильных групп CH_3 -26 и CH_3 -27, 24(28)-двойной связи и оксигенированной CH_2 -21 группы, связанной с моносахаридным остатком. ЯМР ^1H спектр **24** также содержал в слабом поле два дублета аномерных протонов при 4.20 ($J = 7.1$ Гц) и 4.19 ($J = 7.0$ Гц) м.д., которые коррелировали в HSQC спектре с сигналами атомов углерода при 103.2 и 105.5 м.д. соответственно. (+)-ИЭР-МС/МС спектр иона $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 761 содержал пики фрагментных ионов, соответствующие последовательной потере двух остатков дезоксигексоз. Значения КССВ (7.0 и 7.1 Гц) аномерных протонов указывали на β -конфигурации гликозидных связей. Присутствие в **24** двух 6-дезоксигексоз также подтверждалось наличием в ЯМР ^1H спектре сигналов двух метильных дублетов при 1.23 и 1.26 м.д. Облучение сигналов аномерных протонов в 1D TOCSY экспериментах дало значение ХС и соответствующих КССВ протонов Н-1 – Н-4 фукозных остатков; а облучение сигналов протонов дезокси групп позволило установить сигналы Н-5. Все полученные данные указывали на присутствие в **24** двух остатков β -фукопиранозы. Места присоединения моносахаридных звеньев к агликону были установлены с помощью ROESY и HMBC спектров. Кислотный гидролиз гликозида **24** 2М ТФУ с последующим алкоголизом (*R*)-(-)-2-октанолом, ацелированием и ГЖХ анализом полученных производных в сравнении с соответствующими производными стандартных образцов моносахаридов позволили определить принадлежность обоих остатков β -фукопиранозы к *D*-ряду. Таким образом, установлено, что уникальный гликозид **24** имеет ряд структурных особенностей, которые ранее не были найдены в гликозидах полигидроксистероидов морских звезд, а именно: Δ^5 - $3\beta,7\alpha,16\alpha$ -тригидроксистероидное ядро с углеводным фрагментом при С-16, гликозилированную по С-21 $\Delta^{24(28)}$ -21-гидрокси-24-метилхолестановую боковую цепь и β -*D*-фукопиранозные остатки, которые характерны для астеросапонинов, но впервые найдены в гликозидах полигидроксистероидов. В то же время, эти структурные особенности характерны для представителей других классов морских беспозвоночных. Так, присоединение полярных заместителей к С-21 найдено в метаболитах офиур, присутствие $\Delta^{5(6)}$ - $3\beta,7\alpha$ -дигидрокси-фрагмента в стероидном ядре – в некоторых стероидах губок, а наличие 24(28)-двойной связи в боковой цепи – во многих стероидах мягких кораллов.



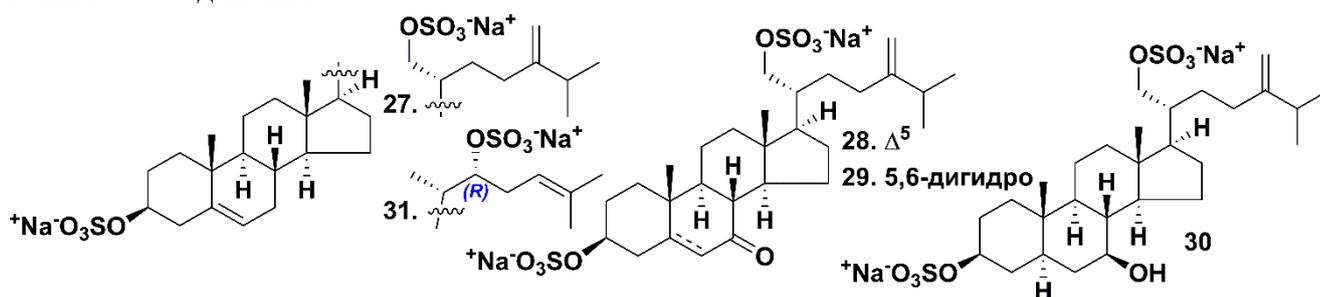
Анализ данных ВР ИЭР масс-спектров гранулатозид D (**25**) позволил установить молекулярную формулу $\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{NaO}_{17}\text{S}$. ИЭР МС/МС спектры подтвердили присутствие сульфатной группы, и остатков метилпентозы и пентозы в **25**. ЯМР спектры показали, что гранулатозид D структурно схож с известным линкозидом А, но имеет дополнительно сульфатную группу при С-15 агликона. Места присоединения моносахаридных остатков к агликону подтверждались корреляциями Н-1'/С-3 и Н-1''/С-29 в HMBC спектре и Н-1'/Н-3 и Н-1''/Н-2-29 в ROESY спектре. Анализ спектральных данных гранулатозид E (**26**) показал, что он структурно сходен с известным лаевиусколизидом Е, но отличается от него отсутствием сульфатной группы при С-15.

Можно отметить сходство стероидных составов морских звезд *C. granulatus* и *L. laevigata*, 11 из выделенных веществ были найдены в обоих видах. Эти морские звезды принадлежат к одному отряду – Valvatida, но к разным семействам, *C. granulatus* к семейству Oreasteridae, а *L. laevigata* – к семейству Ophiodiasteridae. Как нам представляется, это сходство, возможно,

связано с одинаковыми местами и условиями обитания этих морских звезд и получением с пищей одних и тех же стероидных предшественников полярных стероидов.

1.9 Дисульфатированные стероиды «офиурного» типа дальневосточной морской звезды *Pteraster marsippus*

Был изучен состав фракции полярных стероидов дальневосточной морской звезды *P. marsippus* (отряд Velatida, семейство Pterasteridae), собранной в Охотском море у острова Уруп. Были выделены один известный стероид **27**, ранее обнаруженный в смеси дисульфатированных 3,21-дигидроксистероидов из морской звезды *Euretaster insignis*, три новых дисульфатированных стероидных 3 β ,21-диола (**28–30**) и один новый дисульфатированный стероидный 3 β ,22-диол (**31**). Поскольку строение **27** было установлено ранее на основании анализа спектров его десульфатированного производного, нами было установлено полное химическое строение этого нативного соединения.



Молекулярные формулы исследованных стероидов **27–31** определяли исходя из значений пиков ионов $[M - Na]^-$ и $[M - 2Na]^{2-}$, а также из пика иона аддукта натрия $[M + Na]^+$ в ВР ИЭР масс-спектрах. Присутствие сульфатных групп также подтверждалось ВР (–)-ИЭР МС/МС спектрами исследованных дисульфатов. Тщательный анализ 1D и 2D ЯМР спектров позволил установить структуры стероидов **27–31**. Так, строение стероида **27** определили как динариевую соль 3,21-дисульфата (20*R*)-24-метилхолест-5,24(28)-диен-3 β ,21-диола. ЯМР 1H и ^{13}C спектры нативного стероида **27** были получены впервые.

Попытка разделить соединения **28** и **29** с помощью многократной обращенно-фазовой ВЭЖХ не удалась. В результате структуры данных метаболитов были установлены путем тщательного анализа 1D и 2D спектров ЯМР их суммы с применением экспериментов 1D TOCSY, 1H - 1H COSY, HSQC, HMBC и ROESY. Показано, что **28** и **29** имеют аналогичную стероиду **27** $\Delta^{24(28)}$ -21-сульфоокси-24-метилхолестановую боковую цепь, в то же время они отличаются наличием дополнительной 7-оксогруппы в тетрациклической части. Оценка интенсивностей сигналов CH_3 -18 и CH_3 -19 в ЯМР 1H и ^{13}C спектрах показала, что соотношение соединений **28** и **29** в смеси равно примерно 1:1 с небольшим преимуществом **28**. Сольволизом смеси **28** и **29** в смеси диоксан/пиридин была получена сумма десульфатированных производных, которая была разделена с помощью ВЭЖХ на колонке YMC-Pack-Pro C18 на индивидуальные соединения. Анализ ЯМР и МС данных полученных десульфатированных стероидов дополнительно подтвердил структуры соединений **28** и **29**.

Детальное сравнение данных ЯМР 1H и ^{13}C спектров соединений **30** и **29** указывало на 3 β -гидроксизамещение в тетрациклическом ядре и присутствие $\Delta^{24(28)}$ -21-сульфоокси-24-метилхолестановой боковой цепи в **30**. Отличия наблюдались в кольце В, где вместо 7-оксогруппы присутствовала 7-ОН группа. Ключевые ROESY кросс-пики, уширенный мультиплет сигнала H-3 и вид сигнала аксиального протона H-7 (тд, $J = 10.6$ Гц) в спектре ЯМР 1H соответствовали 3 β ,7 β относительным конфигурациям соответствующих оксигенированных атомов углерода в **30**.

ЯМР спектры стероидного ядра **31** были подобны таковым для **27**, что указывало на идентичную $\Delta^{5(6)}$ -3 β -сульфоокситетрациклическую часть, но ХС протонов и атомов углерода стероидной боковой цепи значительно отличались. Было установлено, что стероид **31** содержит сульфатную группу при С-22 Δ^{24} -холестановой боковой цепи. Исходя из (S) конфигурации С-20, мы предположили, что асимметрический центр С-22 имеет (R) конфигурацию, так как

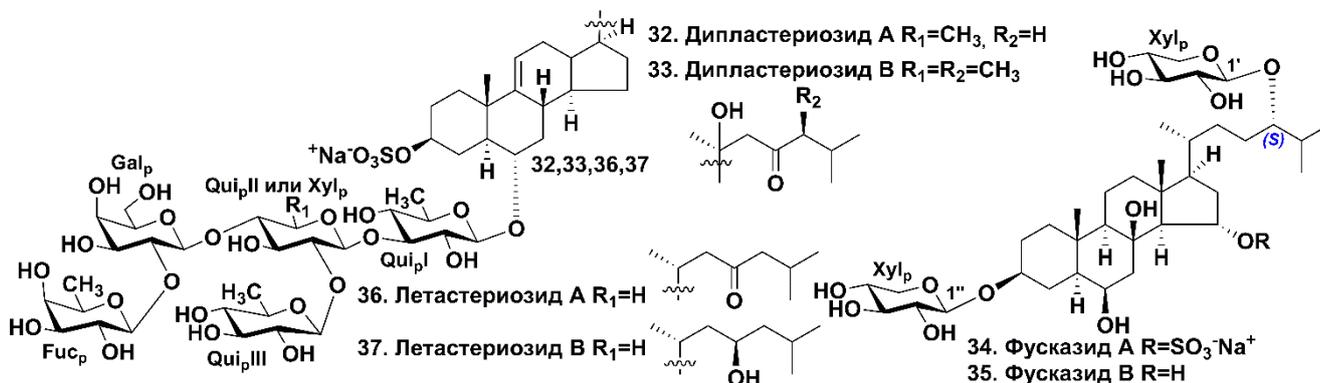
наблюдались ROESY корреляции сигналов H-22/H₂-16. Δ²⁴-22-Сульфохолестановая боковая цепь не была ранее найдена в других стероидах из морских звезд и офиур.

Таким образом, еще у одного вида морских звезд, *P. marsippus*, относящегося к семейству Pterasteridae, как и у ранее исследованных шести видов морских звезд того же семейства, обнаружены дисульфатированные стероиды «офиурного» типа, т.е. имеющие сульфатные группы при C-3 и C-21. В то же время, полигидроксилированные соединения и астеросапонины, характерные для морских звезд, отсутствовали у *P. marsippus*, как и у ранее исследованных видов этого семейства. Этот факт еще раз подтверждает предположение о более тесном филогенетическом родстве классов Asteroidea и Orphiuroidea по сравнению с другими классами иглокожих.

1.10 Полярные стероиды антарктической морской звезды *Diplasterias brucei*

Антарктическая морская звезда *D. brucei* (отряд Forcipulatida, семейство Asteroidea), собранная в ходе итальянской научной экспедиции 1999–2000 гг. у побережья моря Росса (залив Терра-Нова, Антарктика), была любезно предоставлена нам итальянскими коллегами для совместного изучения ее полярных стероидов. В результате были выделены известные сульфат торнастерина А (агликон многих астеросапонинов) и два гликозида полигидроксистероидов, астериидозиды Н и L, а также три других астеросапонины, два из которых, дипластериозиды А и В (**32**, **33**), оказались новыми природными соединениями и один – известным ранее астериидозидом А.

Молекулярная формула дипластериозид А (**32**) была установлена как C₅₇H₉₃O₂₈SNa исходя из данных ВР ИЭР масс-спектров. В его ИЭР МС/МС спектре наблюдались пики, указывающие на присутствие сульфатной группы в **32**. ЯМР ¹H и ¹³C спектры агликонной части соединения **32** содержали сигналы двух угловых СН₃-групп, 9(11)-двойной связи, СН-группы, связанной с сульфатной группой, и СН-группы, связанной с олигосахаридной цепью, характерные для стероидного ядра астеросапонинов. Среди сигналов, относящихся к боковой цепи агликона, наблюдались сигналы третичной СН₃-группы, двух вторичных СН₃-групп, двух СН₂-групп, одной СН-группы, третичного атома С, связанного с гидроксильной группой, и карбонильного атома углерода. Кроме того, фрагментные пики в (-) и (+)-ИЭР МС/МС спектрах с m/z 1157 [(M - Na) - 100]⁻ и 1203 [(M + Na) - 100]⁺ соответственно указывали на потерю остатка C₆H₁₂O в результате разрыва боковой цепи по ретро-альдольному механизму, что характерно для астеросапонинов, имеющих агликон с 20-гидрокси-23-кетохолестановой боковой цепью. На основании полученных данных было доказано, что агликоном дипластериозид А является известный 3-О-сульфат (20S)-5α-холест-9(11)-ен-23-он-3β,6α,20-триола (сульфат торнастерина А).



В ЯМР ¹H спектре гликозида **32** наблюдались сигналы пяти аномерных протонов при 4.81, 4.89, 4.91, 4.93 и 5.21 м.д., связанных в спектре HSQC с пятью сигналами атомов углерода при 104.8, 103.0, 103.6, 107.0 и 104.9 м.д. соответственно. Вместе с данными масс-спектров это свидетельствовало о наличии в углеводной цепи **32** пяти остатков гексоз. Значения КССВ аномерных протонов (7.4–7.8 Гц) указывали на β-конфигурации всех гликозидных связей. Четыре дублета метильных групп при 1.43, 1.58, 1.73 и 1.79 м.д. в ЯМР ¹H спектре **32** свидетельствовали о присутствии четырех β-дезоксигексозных остатков. Анализ ЯМР ¹³C

спектров дипластериозида А показал, что в углеводной цепи имеются терминальные остатки β -D-фукопиранозы и β -D-хиновопиранозы, а также внутренние остатки 3-O-замещенной β -хиновопиранозы, 2,4-ди-O-замещенной β -хиновопиранозы и 2-O-замещенной β -галактопиранозы. Последовательность моносахаридов в углеводной цепи была подтверждена тандемной ИЭР масс-спектрометрией, в спектрах наблюдались сигналы, соответствующие последовательной потере моносахаридных остатков. D-Конфигурация всех моносахаридов (хиновозы, галактозы и фукозы) была определена ГЖХ анализом полученных после гидролиза ацетатов (-)-2-октилгликозидов.

Сопоставление спектральных данных дипластериозидов В (33) и А (32) показало идентичность их стероидного ядра и углеводной цепи, а также присутствие в боковой цепи 33 дополнительной метильной группы при С-24. Установлено, что агликоном дипластериозида В является известный сульфат торнастерина В. (24S)-Конфигурация центра С-24 в 33 предложена в соответствии с отсутствием эффекта Коттона в КД-спектрах в сравнении с литературными данными. Пентасахаридная углеводная цепь дипластериозидов А и В ранее не встречалась в астеросапонидах морских звезд.

1.11 Полярные стероиды дальневосточной морской звезды *Lethasterias fusca*

Из ранее неизученной морской звезды *L. fusca* (отряд Forcipulatida, семейство Asteriidae), собранной в заливе Посьета Японского моря, выделено 9 стероидных соединений средней полярности, включая 3 новых стероидных гликозида – фусказиды А (34) и В (35) и десульфатированный минутозид А, который одновременно был выделен нами из *D. nipon* и назван дистоластерозидом D₇ (17), а также 6 ранее известных стероидных соединений. Изучение фракции астеросапонинов привело к выделению двух новых астеросапонинов – летастериозидов А (36) и В (37) вместе с тремя известными соединениями.

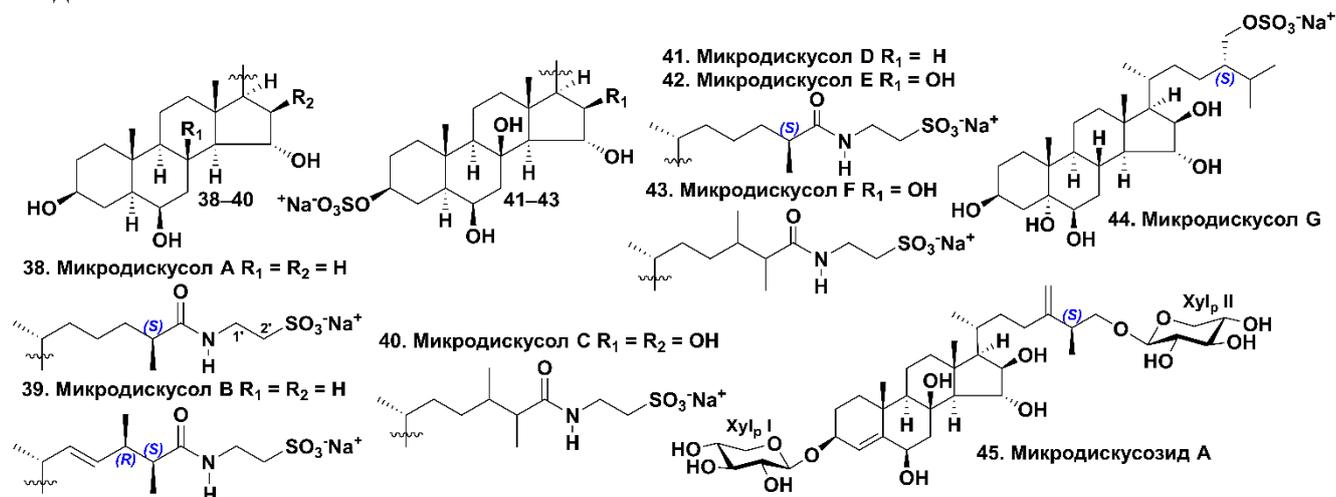
Для фусказида А (34) была установлена молекулярная формула C₃₇H₆₃O₁₆NaS на основании данных ВР МАЛДИ-ВП масс-спектров. Данные МС и ЯМР спектров указывали на то, что 34 является биозидом с 15-O-сульфатированным 3 β ,6 β ,8,15 α ,24-пентагидроксилированным агликоном, к которому присоединены β -D-ксилопиранозные остатки по положениям С-3 и С-24. Места присоединения моносахаридных остатков в 34 были подтверждены корреляциями аномерных протонов H-1'/C-24 и H-1''/C-3 в спектре НМВС. Анализ спектральных данных фусказида В (35) показал, что он является нативным десульфатированным аналогом фусказида А (34). Мягкое сольволитическое расщепление гликозида 34 дало десульфатированное производное, спектры которого полностью соответствовали спектрам фусказида В (35).

Молекулярная формула летастериозида А (36) была определена как C₅₆H₉₁O₂₇SNa на основании данных ВР ИЭР МС спектров. На основании данных ЯМР и МС структура агликона 36 была установлена как 3-O-сульфат (20R)-5 α -холест-9(11)-ен-23-он-3 β ,6 α -диола. Этот агликон, называемый 3-O-сульфатом 24,25-дигидромартастерона, был выделен из этой же морской звезды как нативное соединение. Было показано также присутствие в 36 пентасахаридной цепи с терминальными остатками β -Fuc_p и β -Qui_p и внутренними остатками 3-O-замещенной β -Qui_p, 2,4-ди-O-замещенной β -Xyl_p и 2-O-замещенной β -Gal_p. Последовательность моносахаридных остатков была подтверждена ИЭР-МС/МС данными. ГЖХ анализом ацетилированных (-)-октилпроизводных установлены D-конфигурации для всех моносахаридных остатков в 36. Анализ спектров летастериозида В (37) показал наличие в нем углеводной цепи, аналогичной цепи 36, и аналогичного стероидного ядра, отличия наблюдались в сигналах боковой цепи агликона. Данные ЯМР спектров 37 указывали на присутствие холестановой боковой цепи с вторичной ОН-группой. В результате, структура агликона 37 была установлена как 3-O-сульфат (20R,23R)-3 β ,6 α ,23-тригидрокси-5 α -холест-9(11)-ена. Ранее такой агликон был найден только в нипогликозиде D из *D. nipon*.

1.12 Полярные стероидные соединения арктической морской звезды *Asterias microdiscus*

Морская звезда *A. microdiscus* (отряд Forcipulatida, семейство Asteriidae) была собрана в восточной части Чукотского моря (Северный Ледовитый океан). Следует отметить, что морские звезды, обитающие в арктических водах, до этого времени практически не были изучены. Было

выделено шесть новых полигидроксистероидных конъюгатов с таурином, названных нами микродискусолами А–F (38–43), новый полигидроксистероид, микродискусол G (44), и новый биозид, микродискусозид А (45), вместе с восьмью ранее известными стероидными соединениями.



Молекулярная формула микродискусолола А (38) была установлена как C₂₉H₅₀NO₇SNa в соответствии с данными ВР ИЭР масс-спектров. Данные ЯМР ¹H и ¹³C спектров 38 соответствовали тетрациклическому стероидному агликону с 3β,6β,15α-гидроксилированием. Сигналы протонов и атомов углерода боковой цепи 38 показали присутствие двух вторичных Me-групп CH₃-21 и CH₃-27, 26-оксогруппы в амидной связи и двух CH₂-групп остатка таурина. Эти данные свидетельствовали о наличии 26-амидхолестановой боковой цепи, представляющей собой конъюгат с остатком таурина. (20R)-Конфигурация в 38 была определена на основании ROESY корреляций H₃-21/Hβ-12, H₃-18/H-20 и H-22/H-16 и значения ХС H₃-21. Большинство найденных ранее 26-гидроксистероидов морских звезд имеют (25S)-конфигурацию стереогенного центра, на основании чего мы предположили аналогичную (25S)-конфигурацию в 38.

Сравнение данных ЯМР спектров соединений 39 и 38 показало идентичность их стероидных ядер, в то время как сигналы протонов и атомов углерода боковой цепи отличались. Структура боковой цепи в 39 была установлена как (20R)-Δ^{22E}-26-амидэргостановая. Боковая цепь стероида 39 содержит два асимметрических центра С-24 и С-25, т.е. для нее возможны два *трео*-изомера (24R,25S и 24S,25R) и два *эритро*-изомера (24R,25R и 24S,25S). Как было показано для четырех синтезированных модельных этиловых эфиров Δ^{22E}-24-метил-26-карбоксистероидов, эти стереоизомеры отличаются друг от друга сигналами протонов H₃-21, H-22, H-23, H₃-27 и H₃-28. ХС H-22 и H-23 в ЯМР ¹H спектре соединения 39 и соответствуют *трео*-конфигурации. Мы предположили (22E)-двойную связь и (24R,25S)-конфигурации асимметрических центров С-24 и С-25 на основании сходства данных ЯМР ¹H и ¹³C спектров боковой цепи 39 с таковыми для синтезированных модельных этиловых эфиров Δ^{22E}-24-метил-26-карбоксистероидов и природного тауринового полигидроксистероидного конъюгата из *M. platyacanthum*. Значение КССВ J_{22,23}, равное 15.2 Гц, в ЯМР ¹H спектре соответствует (22E)-двойной связи.

Анализ данных МС и ЯМР в сравнении с литературными данными позволил определить структуру микродискусолола С (40) как натриевую соль N-(2'-сульфоэтил)амида (20R,24ξ,25ξ)-24-метил-3β,6β,8,15α,16β-пентагидрокси-5α-холестан-26-оевой кислоты. Конфигурации асимметрических центров С-24 и С-25 в 40 не были установлены, т.к. оказалось, что их невозможно определить на основании данных ЯМР спектров. Для микродискусолола D (41) было определено присутствие 3β,6β,8,15α-тетрагидроксистероидного ядра с сульфатной группой при С-3. Боковая цепь в 41 была идентична таковой в стероиде 38. Микродискусолол E (42) является структурным аналогом микродискусолола D (41) с дополнительной 16β-ОН-группой. Микродискусолол F (43) имеет 3β,6β,8,15α,16β-пентагидроксистероидное ядро, сульфатированное

по С-3 как в микродискусоле Е (42) и (20R)-26-амидэргостановую боковую цепь как в микродискусоле С (40).

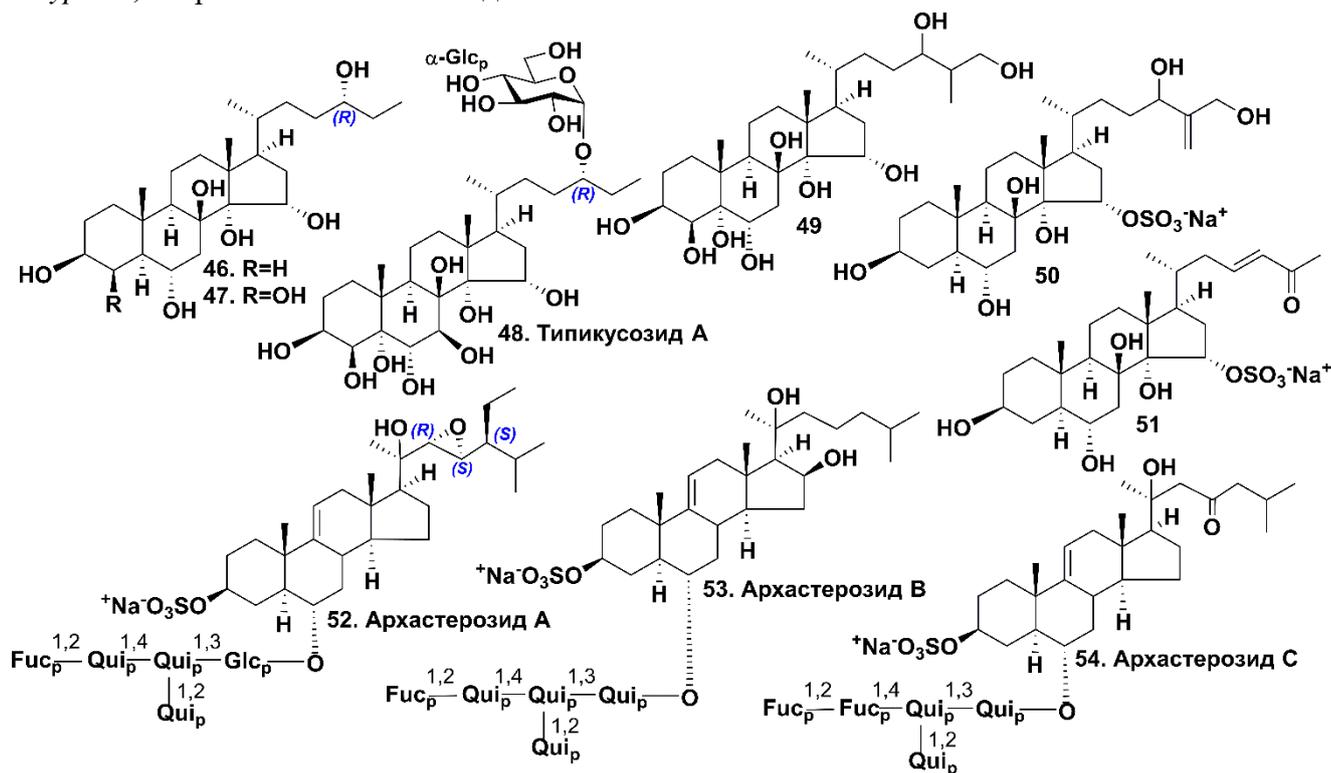
Микродискусол G (44) имеет 3 β ,5,6 β ,15 α ,16 β -пентагидроксилированное стероидное ядро и сульфатную группу в положении С-28 эргостановой боковой цепи. Конфигурация асимметрического центра С-24 была установлена как (S) поскольку ХС протонов Н₂-28 имели различное значение, а ХС протонов Н₃-27 и Н₃-26 – одинаковое. В случае (24R)-конфигурации сигнал протонов Н₂-28 наблюдается как уширенный дублет, а сигналы Н₃-26 и Н₃-27 имеют разное значение ХС. 28-Сульфокси-24-метилхолестановая боковая цепь была впервые обнаружена в стероидных метаболитах морских звезд.

Выделенный стероидный биозид микродискусозид А (45) имеет Δ^4 -3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β -пентагидроксистероидное ядро, гликозилированное по С-3 остатком β -ксилопиранозы. ЯМР ¹H и ¹³C спектры боковой цепи 45 были близки таковым для описанных в литературе спектров $\Delta^{24(28)}$ -26-гидрокси-24-метилхолестановой боковой цепи, гликозилированной по С-26 β -ксилопиранозным остатком. (S)-конфигурация центра С-25 была установлена на основании сходства данных ЯМР боковой цепи 45 с таковыми для линкозида I, в котором данная конфигурация была установлена с помощью метода Мошера.

Можно отметить, что выделение новых полигидроксистероидных тауриновых конъюгатов 38–43 из морской звезды *A. microdiscus* и аналогичных соединений из других видов морских звезд, напоминающих по своей структуре соли желчных кислот и спиртов низших позвоночных, является дополнительным аргументом в поддержку ранее предложенной нами гипотезы о возможной биологической роли полигидроксистероидов у морских звезд как веществ, участвующих в процессах пищеварения.

1.13 Полярные стероиды вьетнамской морской звезды *Archaster typicus*

Исследования морской звезды *A. typicus* (отряд Valvatida, семейство Archasteridae), собранной у побережья Вьетнама, привели к выделению 6-ти новых стероидных соединений, включая 5 новых высокогидроксилированных стероидов (46, 47, 49–51) и гликозида, названного нами типикусозидом А (48), а также 10-ти ранее известных соединений. Изучение фракции астеросапонинов позволило выделить три новых астеросапонины, архастерозиды А–С (52–54), и известный регулариозид А. Ранее группой итальянских ученых была изучена другая популяция *A. typicus*, собранная в Новой Каледонии.



Молекулярная формула стероида **46** была определена как $C_{26}H_{46}O_6$ в соответствии с данными ВР ИЭР масс-спектров. Тандемный (–)-ИЭР МС/МС спектр иона $[M - H]^-$ с m/z 453 содержал пики фрагментных ионов с m/z 435 $[(M - H) - H_2O]^-$, 417 $[(M - H) - 2H_2O]^-$, 399 $[(M - H) - 3H_2O]^-$, 381 $[(M - H) - 4H_2O]^-$ и 363 $[(M - H) - 5H_2O]^-$. Все эти данные подтверждали присутствие шести ОН-групп в молекуле **46**. Спектры ЯМР ^{13}C и DEPT указывали на гексагидрокси-*нор*-холестановое стероидное ядро в **46**, в котором отсутствовала одна из пяти характеристичных для холестановых стероидов метильных групп. Триплет при 0.92 (3H) м.д. свидетельствовал о наличии одной этильной группы, а гидроксиметиновый мультиплет при 3.36 (H-24) указывал на присутствие 24-гидрокси-27-*нор*-фрагмента в боковой цепи в **46**. Сравнение полученных данных ЯМР с соответствующими данными для 24-замещенных стероидов подтвердило, что стероид **46** имеет 24-гидрокси-27-*нор*-холестановую боковую цепь. ЯМР спектры стероидного ядра **46** соответствовали наличию 3 β ,6 α ,8,14,15 α -ОН-групп.

Спектральные данные стероида **47** указывали на структуру подобную **46** с дополнительной 4 β -ОН-группой. Абсолютная конфигурация центра C-24 в **47** была определена с помощью метода Мошера. Положительное значение $\Delta\delta^{SR}$ для ХС сигналов H₂-25 и H₃-26 и отрицательное значение $\Delta\delta^{SR}$ для ХС сигналов H₂-23, H₂-22, H-20 и H₃-21 указывали на (24*R*)-конфигурацию в **47**.

Данные МС и ЯМР спектров типикусозида А (**48**) указывали на наличие высокоокисленного агликона, определенного как 27-*нор*-5 α -холестан-3 β ,4 β ,5,6 α ,7 β ,8,14,15 α ,24-нонаол. Боковая цепь **48** подобна таковой для стероидов **46** и **47**, но сигнал C-24 при 79.4 м.д. в ЯМР ^{13}C спектре **48** сдвинут в слабое поле, а сигналы C-23 при 29.8 м.д. и C-25 при 27.5 м.д. сдвинуты в сильное поле благодаря α - и β -эффектам гликозилирования по сравнению с сигналами в ЯМР ^{13}C спектре известного ранее из этой морской звезды наонаола. Присоединение моносахаридного остатка к C-24 было также подтверждено корреляцией H-1'/C-24 в НМВС спектре. Спектральные данные углеводного фрагмента в **48** были похожи на соответствующие данные для стандартного α -метил-*D*-глюкопиранозиды, а значение КССВ аномерного протона (д, $J = 3.9$ Гц) указывало на α -стереохимию гликозидной связи. Глюкопиранозный остаток в **48** был отнесен к *D*-ряду с помощью ГЖХ анализа полученного ацетата (–)-2-октилгликозида. α -*D*-Глюкозиды, в отличие от β -*D*-глюкозидов, являются весьма редкими природными соединениями.

Строение стероидов **49–51** было установлено аналогичным образом с помощью тщательного анализа данных ЯМР и ИЭР МС. Определено, что **49** является (20*R*)-5 α -холестан-3 β ,4 β ,5,6 α ,8,14,15 α ,24,26-нонаолом с редкой 24,26-дигидроксилированной боковой цепью. Стероид **50** имеет 3 β ,6 α ,8,14,15 α -пентаокисленное стероидное ядро и уникальную 24,26-дигидроксихолест-25(27)-еновую боковую цепь. ЯМР ^{13}C и 1H спектры (CD₃OD) стероида **50** содержали двойные сигналы атомов C-23, C-24, C-26, C-27, H-23, H-24, H-26 и H-27. Были получены ЯМР 1H спектры соединения **50** при 25, 35, 45 и 55 °С. Так как мы не наблюдали каких-либо уширений сигналов в спектрах, был сделан вывод, что стероид **50** получен в виде смеси двух эпимеров, а не двух конформеров. Сравнение интегральных интенсивностей соответствующих сигналов атомов H и C показало, что эпимеры **50** находятся в смеси в соотношении 2:1. Стероид **51** содержит аналогичное соединению **50** стероидное ядро и имеет уникальную 27-*нор*-25-оксохолест-23-еновую боковую цепь. Значение КССВ, равное 15.5 Гц, подтвердило *транс*-конфигурацию для 23(24)-двойной связи. Насколько нам известно, соединения с такой боковой цепью ранее никогда не были найдены в морских или наземных полярных стероидах.

Необходимо отметить, что найденные в *A. typicus* полигидроксистероиды принадлежат к редкой структурной группе стероидов с окисленным атомом C-14, помимо *A. typicus* они были найдены только в морской звезде *Dermasterias imbricata* и недавно нами в морской звезде *A. laevigatus*. Из новых соединений четыре являются 27-*нор*-холестановыми производными, а два из них имеют 24,26-дигидроксихолестановые боковые цепи.

Строение астеросапонина архастерозиды А (**52**) было установлено с помощью подробного анализа данных его ЯМР и ИЭР МС спектров. Он содержит типичное для астеросапонинов

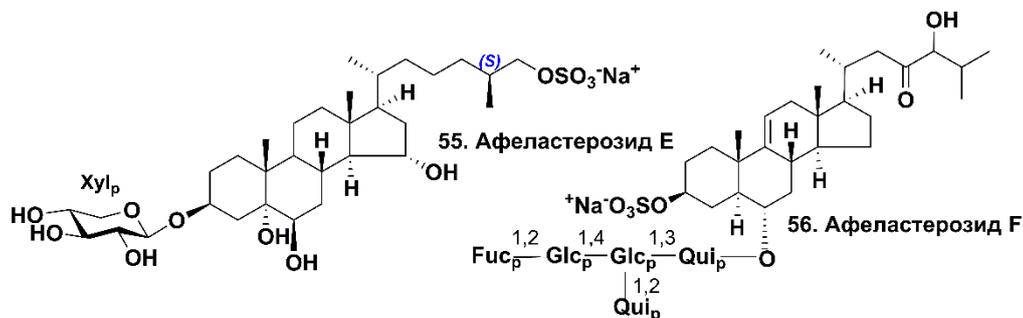
стероидное ядро и пентасахаридную β -D-фукопиранозил-(1 \rightarrow 2)- β -D-хиновопиранозил-(1 \rightarrow 4)-[β -D-хиновопиранозил-(1 \rightarrow 2)]- β -D-хиновопиранозил-(1 \rightarrow 3)- β -D-глюкопиранозил– углеводную цепь. Данные ЯМР спектров стероидного агликона **52** были близки к таковым для агликона совместно выделенного известного регуларозида А. Отличие в структурах заключалось в том, что боковая цепь **52** содержит в положении С-24 Et-группу, а боковая цепь – Me-группу, что согласуется с разницей в 14 а.е.м. в молекулярных массах этих астеросапонинов. Установлено, что **52** имеет 22,23-эпокси-24-этилхолестановую боковую цепь. Наблюдаемые NOESY корреляции протонов боковой цепи предполагали только 2 варианта конфигураций асимметрических центров С-22, С-23 и С-24 – (22R,23S,24S) или (22S,23R,24R) из 8-ми возможных. Мы полагаем, что (20R,22R,23S,24S)-конфигурации для **52** являются наиболее предпочтительными по аналогии с природным гликозидом регуларозидом А, в котором были определены аналогичные конфигурации сравнением с модельными соединениями.

ЯМР и МС спектры архастерозида В (**53**) указывали на присутствие пентасахаридной цепи, похожей на олигосахаридную цепь архастерозида А, но с заменой в цепи **53** 3-О-замещенного остатка β -D-Glc_p при С-6 агликона на 3-О-замещенный остаток β -D-Qui_p. ЯМР ¹H и ¹³C спектры агликонной части гликозида **53** были подобны таковым для других астеросапонинов с агликоном, содержащим ОН-группу при С-20, но сигналы четырех атомов углерода С-14, С-15, С-16, С-18 и протонов H₃-18 в ЯМР спектрах **53** отличались от сигналов аналогичных атомов в спектрах других астеросапонинов. Сигналы С- и Н-атомов Me-группы СН₃-18 были сдвинуты в слабое поле от 13.2 к 14.8 м.д. и от 1.00 к 1.42 м.д. соответственно. Вместе с данными масс-спектров это явилось подтверждением присутствия дополнительной 16 β -ОН-группы в кольце D. Углеводная цепь в гликозиде **53** состоит только из остатков β -D-фукопиранозы и β -D-хиновопиранозы, что найдено в астеросапонилах впервые. Агликонная часть гликозида **53** ранее не встречалась в структурах астеросапонинов.

Спектры ЯМР архастерозида С (**54**) указывали на то, что его агликоном является 5 α -холест-9(11)-ен-23-он-3 β ,6 α ,20-триол (торнастерин А). Строение углеводной цепи было установлено как β -D-Fuc_p-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fuc_p-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Qui_p-(1 \rightarrow 2)]- β -D-Qui_p-(1 \rightarrow 3)- β -D-Qui_p. Архастерозид С является вторым астеросапонином, наряду с архастерозидом В (**53**), олигосахаридная цепь которого состоит только из остатков 6-дезоксигексоз – β -D-фукозы и β -D-хиновозы.

1.14 Новые стероидные гликозиды дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica*

Морская звезда *A. japonica* (отряд Forcipulatida, семейство Asteroiidae) широко распространена в дальневосточных морях. Стероидный состав этой морской звезды ранее изучался несколько раз. Нами было продолжено исследование минорных полярных стероидов *A. japonica* и изучено несколько ее коллекций, собранных в разное время в заливе Посьета Японского моря. В результате были выделены новый полигидроксилированный гликозид афеластерозид Е (**55**), новый астеросапонин – афеластерозид F (**56**) и 3 известных астеросапонинов.



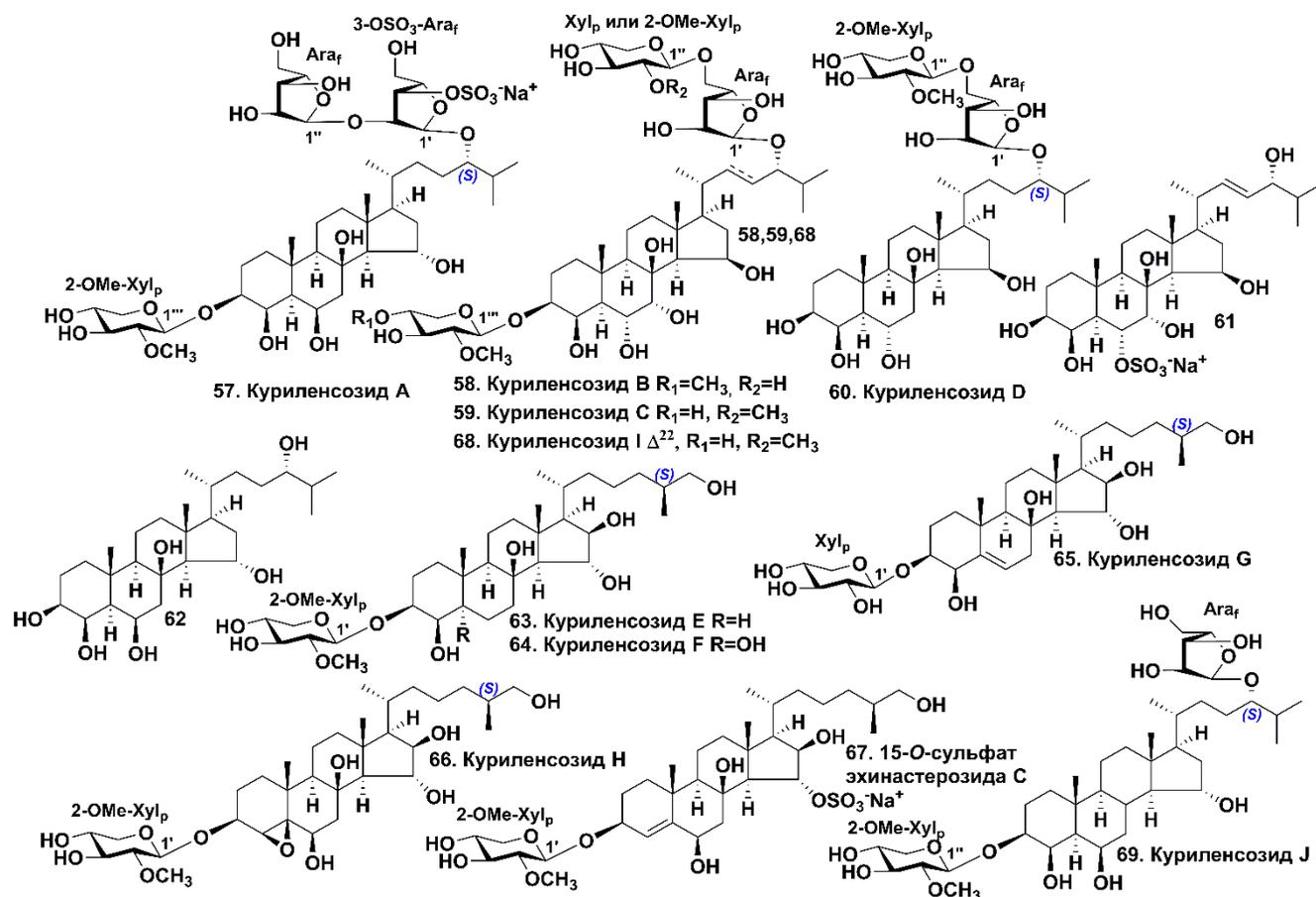
Структура афеластерозида Е (**55**) была установлена с помощью тщательного анализа 2D ЯМР и ИЭР МС данных. Они указывали на наличие в молекуле пентозидного фрагмента и 3 β ,5,6 β ,15 α ,26-пентазамещенного стероидного агликона. Положение сульфатной группы при С-26 было подтверждено подробным анализом МС/МС спектров. (2S)-Конфигурация центра

C-25 была определена на основании совпадения данных ЯМР ^{13}C спектров для боковой цепи **55** с соответствующими литературными данными. Сульфатирование по положению C-26 является редким для полярных стероидов морских звезд, найденный нами афеластерозид E является первым стероидным гликозидом из морских звезд с 26-O-сульфатированной холестановой боковой цепью.

Анализ спектральных данных афеластерозида F (**56**) позволил установить строение его агликона как 5α -холест-9(11)-ен-23-он-3 β ,6 α ,24-триол. Этот агликон, названный афелакетотриолом, был выделен нами ранее из *A. japonica* как индивидуальное соединение. Строение углеводной цепи **56** было полностью установлено с помощью спектров 2D ЯМР, ИЭР МС/МС и химических превращений как β -D-Fucp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Quip-(1 \rightarrow 2)]- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Quip-. Такой тип углеводной цепи ранее не был найден в астеросапонилах морских звезд.

1.15 Полярные стероиды дальневосточной морской звезды *Hippasteria kurilensis*

Нами впервые был исследован стероидный состав морской звезды *H. kurilensis* (отряд Valvatida, семейство Goniasteridae), собранной в Охотском море. Изучение наиболее полярной фракции гликозидов полигидроксистероидов привело к выделению 3-х новых стероидных триозидов, куриленсозидов А, В и С (**57–59**), нового стероидного биозида, куриленсозида D (**60**), а также одного известного и двух новых (**61, 62**) полигидроксистероидов. Исследование фракции монозидов привело к выделению 5-ти новых соединений, куриленсозидов E–H (**63–66**), и 15-O-сульфатированного эхинастерозида С (**67**) вместе с ранее известным эхинастерозидом С. Продолжение изучения минорных соединений из *H. kurilensis* позволило обнаружить дополнительно 8 стероидных соединений, включая 2 новых стероидных гликозида, триозид куриленсозид I (**68**) и биозид куриленсозид J (**69**), и 6 известных ранее гликозидов. Анализ фракции астеросапонинов *H. kurilensis* привел к выделению 4-х новых гексаозидов – гиппастериозидов А–D (**70–73**).



Молекулярные формулы стероидов из *H. kurilensis* устанавливали с помощью ВР МАЛДИ-ВП, ББИ и ИЭР масс-спектров. 1D и 2D ЯМР эксперименты позволили однозначно

установить все структурные особенности молекул. Отнесение моносахаридов в исследованных гликозидах к *D*- или *L*-ряду проводилось с помощью ГЖХ анализа ацетилированных (–)-октилгликозидов или по аналогии с выделенными совместно соединениями. Далее отмечены только основные структурные особенности выделенных метаболитов.

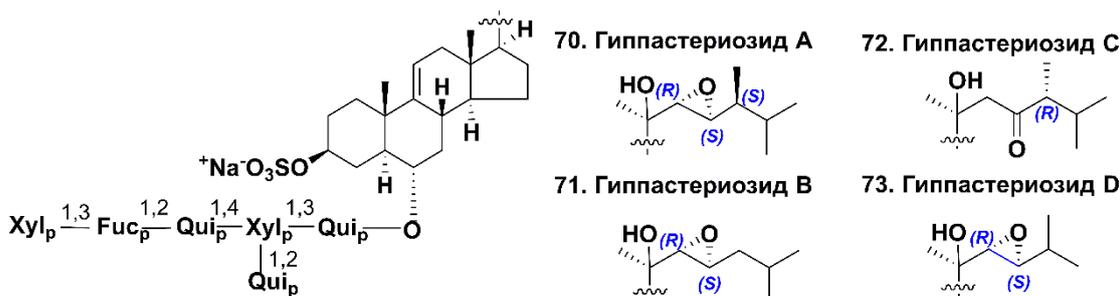
Куриленсозид А (**57**) имеет 3 β ,4 β ,6 β ,8,15 α ,24-гексагидроксихолестановый агликон с остатком 2-*O*-метил- β -*D*-ксилопиранозы при С-3. В то же время, дополнительно в **57** присутствует дисахаридный фрагмент при С-24. Кислотный гидролиз **57** 2М ТФУ дал арабинозу и 2-*O*-метилксилозу в соотношении 2:1, что было подтверждено с помощью ТСХ и ГЖХ их перацетатов альдонитрилов. В результате тщательного анализа ^1H - ^1H COSY и HMBC спектров было установлено, что дисахаридный фрагмент α -*L*-Ara $_f$ -(1 \rightarrow 2)-3'-*O*-SO $_3^-$ Na $^+$ - α -*L*-Ara $_f$ находится при С-24. Стереохимия С-24 была определена как (*S*) с помощью анализа ЯМР ^1H спектра полученного из этого монозида (*R*)-МТРА эфира. Куриленсозид В (**58**) также является редким среди гликозидов этого класса триозидом и имеет 3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 β ,24-гептагидроксихолестановый агликон с остатком 2,4-ди-*O*Me-Хул $_p$ при С-3 и β -*D*-Хул $_p$ -(1 \rightarrow 5)- α -*L*-Ara $_f$ дисахаридным звеном при С-24. Куриленсозид С (**59**) отличается положениями метилирования в ксилозном остатке. Куриленсозид D (**60**) является биозидом с дисахаридным фрагментом 2-*O*Me- β -*D*-Хул $_p$ -(1 \rightarrow 5)- α -*L*-Ara $_f$ при С-24 боковой цепи агликона. Следует отметить, что куриленсозиды В, С и D (**58–60**) имеют редкий тип углеводных цепей с (1 \rightarrow 5) связями между моносахаридными остатками.

Полигидроксистероид **61** содержит 3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 β -гексагидроксистероидное ядро с редкой сульфатной группой при С-6. Стероид **62** является нативным агликоном гликозида **57**. Хотя несколько гликозидов полигидроксистероидов с подобными агликонами были найдены ранее в морских звездах, в негликозилированном виде этот стероид был найден впервые.

Монозиды куриленсозиды Е (**63**) и F (**64**) имеют 2-*O*Me- β -*D*-Хул $_p$ звено при С-3 и необычное стероидное ядро без ОН-группы при С-6. Гликозид **64**, помимо этого, содержит ОН-группу при С-5 агликона. Куриленсозид G (**65**) содержит редкую для полигидроксистероидов $\Delta^{5(6)}$ -двойную связь. В структуре куриленсозида H (**66**) присутствует эпокси группа при С-4 и С-5. Для определения взаимной ориентации эпокси группы и Н-3 в **66**, был проведен MM2-минимизированный расчет всех возможных конформаций кольца А. Из двух наиболее устойчивых (низкоэнергетических) конформеров с β -ориентацией эпокси группы был выбран конформер, наиболее предпочтительный по результатам сравнения рассчитанных и наблюдаемых КССВ. ROE корреляции Н-1'/Н-3 α и Н-4 α подтвердили β -ориентацию ОН-группы при С-3 и 4,5-эпокси группы в **66**. Структура монозида **67** была определена как 15-*O*-сульфатированный аналог эхинастерозида С. Позже были выделены новые гликозиды: триозид куриленсозид I (**68**) с (1 \rightarrow 5)-гликозидной связью между моносахаридными остатками в дисахаридной цепи и куриленсозид J (**69**) с редким 3 β ,4 β ,6 β ,15 α -тетрагидроксистероидным ядром.

Моногликозиды куриленсозиды Е–G (**63–65**) являются необычными молекулами. Как правило, полигидроксистероиды и родственные гликозиды, выделенные из морских звезд, обладают ОН-группой, присоединенной к С-6 стероидного ядра. Соединения, в которых эта группа отсутствует, впервые найдены в полярных стероидах морских звезд. Обнаружение соединений **63–65** показывает, что в *H. kurilensis* реализуется уникальное запаздывание гидроксирования по С-6 в процессе биосинтеза полигидроксистероидов.

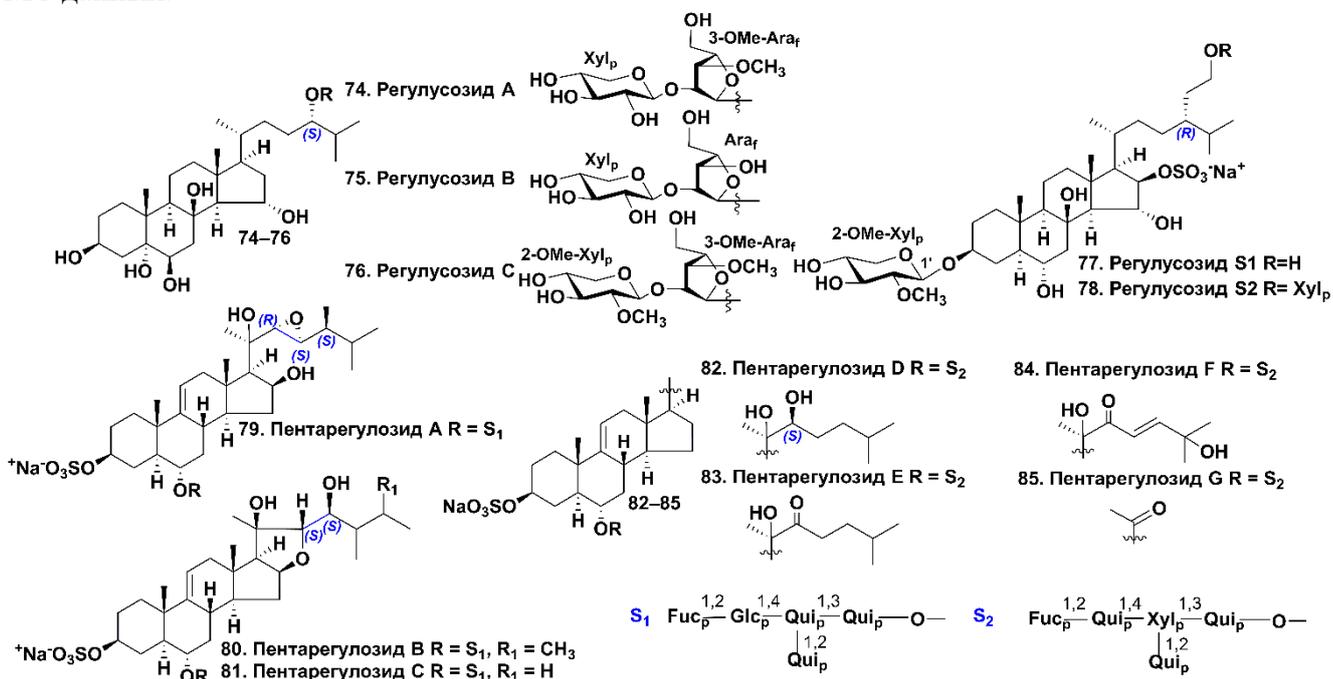
Анализ спектральных данных гиппастериозидов А–D (**70–73**) показал, что они имеют одинаковые β -*D*-Хул $_p$ -(1 \rightarrow 3)- β -*D*-Fuc $_p$ -(1 \rightarrow 2)- β -*D*-Qui $_p$ -(1 \rightarrow 4)-[β -*D*-Qui $_p$ -(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-Хул $_p$ -(1 \rightarrow 3)- β -*D*-Qui $_p$ - углеводные цепи. Это новый тип углеводной цепи, ранее не найденный в астеросапонилах, с редким терминальным остатком β -*D*-ксилопиранозы. Астеросапонины **70–73** отличаются структурой боковых цепей агликонов. Агликон гиппастериозида А (**70**) имеет 22,23-эпокси-24-метилхолестановую боковую цепь. (20*R*,22*R*,23*S*,24*S*)-Конфигурации стереогенных центров были установлены сравнением с известным регуларозидом А, в котором эти конфигурации были определены сравнением с модельными соединениями. Гиппастериозид В (**71**) отличается от **70** отсутствием метильной группы при С-24.



Агликоном гиппастериозида С (**72**) является торнастерин В, 3-*O*-сульфат 24-метил-5 α -холест-9(11)-ен-23-он-3 β ,6 α ,20-триола. Отрицательное значение эффекта Коттона ($[\theta]_{289} = -7748$) в КД спектре **72** было подобно значениям этого эффекта в спектрах версикозидов В и С ($[\theta]_{284} = -6028$ и $[\theta]_{284} = -6884$ соответственно), имеющих (20*S*,24*R*)-торнастерин В как агликон, и значительно отличалось от значения эффекта Коттона для акантагликозида F ($[\theta]_{275} = -685$) с (20*S*,24*S*)-торнастерином В в качестве агликона. Соответственно была установлена (20*S*,24*R*)-конфигурация асимметрических центров в гиппастериозиде С (**72**). Гиппастериозид Д (**73**) имеет редкий 22,23-эпокси-24-*нор*-5 α -холест-9(11)-ен-3 β ,6 α ,20-триол в качестве агликона.

1.16 Полярные стероиды тропической морской звезды *Pentaceraster regulus*

Изучение морской звезды *P. regulus* (отряд Valvatida, семейство Oreasteridae), собранной у островов Чам (Вьетнам) в Южно-Китайском море, привело к выделению трех новых несulfатированных гликозидов, регулусозидов А–С (**74–76**), вместе с пятью ранее известными соединениями, двух новых сульфатированных регулусозидов S1 и S2 (**77** и **78**), семи новых астеросапонинов, пентарегулозидов А–G (**79–85**), и четырех ранее известных астеросапонинов. Структуры выделенных соединений были установлены с помощью подробного анализа ЯМР и МС данных.



Регулусозиды А–С (**74–76**) имеют одинаковые 5 α -холестан-3 β ,5,6 β ,8,15 α ,24-гексагидроксилированные агликоны и отличаются только структурой дисахаридного фрагмента, присоединенного к С-24 боковой цепи. Они имеют β -*D*-Xylp-(1 \rightarrow 2)-3-ОМе- α -*L*-Ara_f, β -*D*-Xylp-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-Ara_f и 2-ОМе- β -*D*-Xylp-(1 \rightarrow 2)-3-ОМе- α -*L*-Ara_f дисахаридные фрагменты соответственно. Регулусозиды S1 и S2 (**77** и **78**) имеют одинаковые стероидные агликоны с уникальной сульфатной группой в положении 16 и остатком 2-ОМе- β -*D*-Xylp в положении 3 и отличаются только присутствием β -*D*-Xyl при С-29 в окисленной стигмастановой боковой цепи.

Структуры астеросапонинов, пентарегулозидов А–G (**79–85**), были установлены с помощью подробного анализа 2D ЯМР и ИЭР масс-спектров. Для всех них было показано присутствие типичного для астеросапонинов $\Delta^{9(11)}$ -3 β ,6 α -дигидроксилированного стероидного ядра с сульфатной группой при С-3 и углеводной цепью при С-6. В то же время, в ЯМР спектрах пентарегулозида А (**79**) дополнительно наблюдались сигналы окиснированного метина СН-16 [5.00 (м) м.д.; 73.7 м.д.]. Подобный агликон был найден ранее в архастерозиде В (**53**). Сигналы Н- и С-атомов боковой цепи агликона **79** соответствовали 20-гидрокси-22,23-эпокси-24-метилхолестановой цепи. Конфигурации стереогенных центров С-22, С-23 и С-24 были определены как (22*R*,23*S*,24*S*) на основании сходства данных ЯМР ^1H и ^{13}C спектров боковой цепи агликона **79** с таковыми регуларозида А, в котором эти конфигурации были определены сравнением с данными ЯМР спектров синтезированных модельных соединений. Пространственная структура боковой цепи гликозида **79** была также подтверждена ключевыми ROESY корреляциями Н-22/Н-17, Н-24; Н-23/Н-25, Н₃-26, Н₃-28 и Н-24/Н₃-27. Строение углеводной цепи в **79** было установлено как β -D-Fuc_p-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glc_p-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Qui_p-(1 \rightarrow 2)]- β -D-Qui_p-(1 \rightarrow 3)- β -D-Qui_p-. При этом сравнением данных ЯМР спектров олигосахаридной цепи в **79** с соответствующими данными для пентарегулозидов В и С (**80**, **81**) была показана идентичность углеводных фрагментов в этих гликозидах.

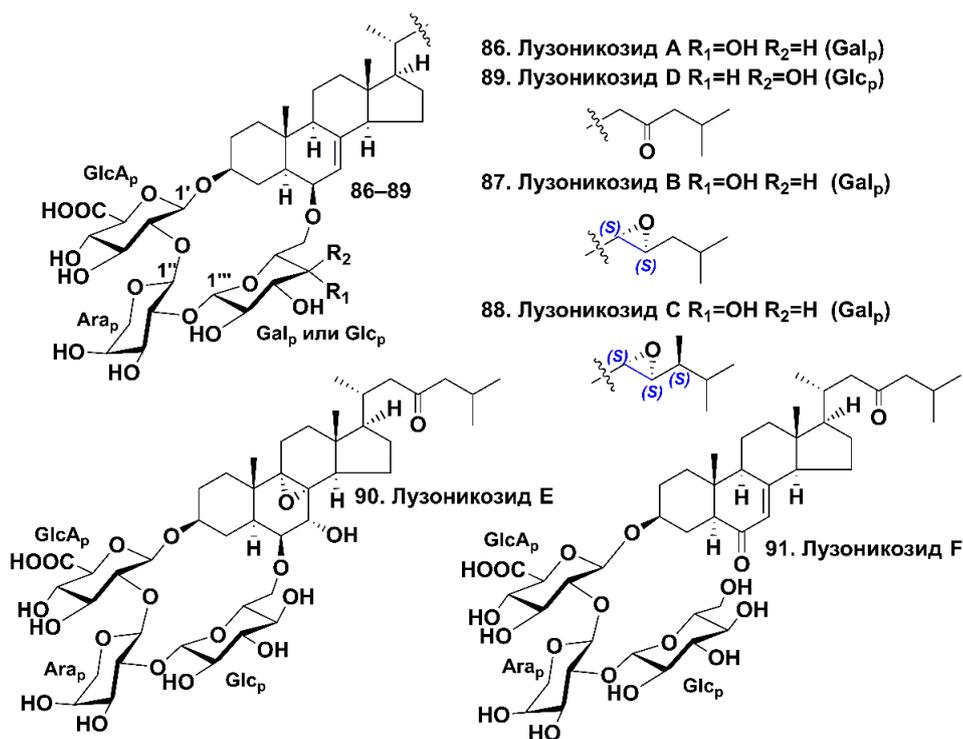
Большинство сигналов в спектрах ЯМР стероидного ядра пентарегулозида В (**80**) были идентичны таковым в спектрах **79**, за исключением сигналов атомов кольца D, а именно, СН₂-15, СН-16, СН-17, СН₃-18, и боковой цепи. Сигналы атомов Н-16 и С-16 в ЯМР спектрах **80** были сдвинуты от 5.00 к 4.57 м.д. и от 73.7 к 82.1 м.д. соответственно по сравнению с аналогичными сигналами в спектрах **79**. Это указывало на то, что стероидный агликон имеет 5 α -фуростановый скелет с простой эфирной связью между С-16 и С-22 боковой цепи. Это предположение было подтверждено сравнением данных ЯМР с подобными данными спектров даунеозидов А и В из морской звезды *H. downeyae*, что также дало возможность предположить (20*R*,22*S*,23*S*)-конфигурации асимметрических центров С-20, С-22, С-23, но не конфигурацию С-24. ROESY корреляции сигналов протонов боковой цепи подтвердили строение боковой цепи гликозида **80**. Можно предположить, что гликозид **79** является биогенетическим предшественником гликозида **80**, который образуется из **79** за счет атаки 16-гидроксигруппы на 20-гидрокси-22,23-эпокси-24-метил-стероидную боковую цепь. Было установлено, что пентарегулозид С (**81**) отличается от **80** только отсутствием СН₃-27 группы в боковой цепи агликона.

Анализ ЯМР и МС/МС спектров пентарегулозидов D–G (**82–85**) позволил установить для них одинаковое строение β -D-Fuc_p-(1 \rightarrow 2)- β -D-Qui_p-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Qui_p-(1 \rightarrow 2)]- β -D-Xyl_p-(1 \rightarrow 3)- β -D-Qui_p- углеводной цепи. Пентарегулозид D (**82**) содержит 3-*O*-сульфатированный 3 β ,6 α ,20,22-тетрагидрокси-5 α -холест-9(11)-еновый стероидный агликон, конфигурации стереогенных центров С-20 и С-22 были установлены как (20*R*,22*S*) сравнением с литературными данными для стероидов с подобными боковыми цепями. Пентарегулозид E (**83**) имеет агликон с 20-гидрокси-22-оксохолестановой боковой цепью. Пентарегулозид F (**84**) имеет (20*R*)- Δ^{23} -20,25-дигидрокси-22-оксохолестановую боковую цепь. Агликоном пентарегулозида G (**85**) является известный сульфат астерона.

Можно отметить, что стероидные агликоны, подобные агликонам астеросапонинов **79** и **81**, не встречались ранее в стероидных гликозидах морских звезд, а агликоны, подобные агликонам соединений **80**, **82–84**, являются редкими для этой структурной группы. Было определено, что стероидные части пентарегулозидов В и С (**80** и **81**) имеют 5 α -фуростановый скелет. Они являются первыми астеросапонидами с фуростановыми агликонами, найденными в морских звездах.

1.17 Циклические гликозиды морских звезд *Echinaster luzonicus* и *Leiaster* sp.

Изучение этанольного экстракта морской звезды *E. luzonicus* (отряд Spinulosida, семейство Echinasteridae), собранной у побережья Вьетнама, привело к выделению известного циклического стероидного гликозида, лузониозида А (**86**), и пяти новых гликозидов **87–91**. Эти соединения принадлежат к редкой структурной группе циклических гликозидов. До нашего исследования было известно только пять гликозидов, принадлежащих к этой группе.



Молекулярные формулы выделенных лузоникизидов были установлены с помощью ВР ИЭР МС. Ранняя работа, касающаяся выделения лузоникизида А (**86**), содержала только ограниченные спектральные данные, поэтому нами был выполнен дополнительный структурный анализ соединения **86**. Показано, что **86** имеет характерный для циклических гликозидов агликон с 7(8)-двойной связью и 3 β ,6 β -окислением. Анализ 2D ЯМР данных показал, что лузоникид В (**87**) отличается от **86** только строением боковой цепи агликона. Все ХС и ККСВ протонов и атомов углерода указывали на 22,23-эпоксистероидную боковую цепь в **87**. (2*S*,23*S*)-Конфигурации стереогенных центров были установлены сравнением с литературными данными. Лузоникид С (**88**) отличается от **87** только присутствием Me-группы при С-24 в боковой цепи, что согласуется с разницей в 14 а.е.м. между молекулярными массами **88** и **87**. Лузоникид D (**89**) имеет агликон, аналогичный агликону лузоникизида А (**86**).

ВР ИЭР масс-спектр лузоникизида Е (**90**) показал различие молекулярных масс на 32 а.е.м. между **90** и **89**, что подтвердило присутствие дополнительных гидроксильной и эпоксигрупп в стероидном ядре соединения **90** по сравнению с гликозидом **89**. НМВС корреляции Н₃-19/С-9 и Н β -12/С-9, а также ХС С-9 (70.1 м.д.) указывали на присутствие атома кислорода при С-9. Сигнал С-5 в ЯМР ¹³С спектре **90** был сдвинут в соответствии с γ -эффектом присутствия кислородного заместителя при С-9. Эти данные указывали на α -ориентацию кислородного заместителя при С-9. НМВС корреляции Н-6/С-7 и С-8, Н β -11/С-8, значения ХС Н-7 (4.30 м.д.), С-7 (70.7 м.д.), С-8 (65.0 м.д.) и ROESY корреляции Н-7/Н₃-18, Н₃-19 свидетельствовали о присутствии двух атомов кислорода при С-7 и С-8, а также указывали на β -ориентацию протона при С-7 в **90**. Расчет КССВ для протона Н β -7 по уравнению Карплуса, основанный на возможных протон-протонных торсионных углах в Н-С-6-С-7-Н фрагменте гликозида **90** (ММ2 минимизация), показал, что в случае α -ОН-7 замещения КССВ_{Н-7,Н-6} должна быть небольшой (~0.4 Гц) и сигнал протона Н-7 должен выглядеть как синглет. Так как в ЯМР ¹Н спектре гликозида **90** сигнал протона Н-7 имел форму синглета, мы предположили присутствие α -ОН-группы при С-7 и 8 α ,9 α -эпоксигруппы в агликоне. ХС сигналов С-8 (65.0 м.д.) и С-9 (70.1 м.д.) в ЯМР ¹³С спектре **90** были близки к значениям ХС аналогичных сигналов при 68.2 и 70.7 м.д. соответственно в спектре известного 8 α ,9 α -эпоксиланостан-3 β -ола, что также подтверждало присутствие 8 α ,9 α -эпоксигруппы в **90**.

Структуры трисахаридных фрагментов в выделенных лузоникизидах были установлены с помощью анализа 2D ЯМР и ИЭР МС/МС спектров, который подтвердил присутствие в них трех моносахаридных остатков: одного остатка глюкуроновой кислоты, одного остатка пентозы (Ara) и одного остатка гексозы (Gal или Glc). Кислотным гидролизом гликозидов 2М ТФУ с

последующим алкоголизом полученной смеси моносахаридов (*R*)-(-)-октанолом, ацелированием, ГЖХ анализом и сравнением полученных образцов с полученными аналогично стандартными образцами моносахаридов были определены конфигурации моносахаридных остатков как *D*-глюкуроновая кислота, *L*-арабиноза и *D*-галактоза (или *D*-глюкоза). Значения КССВ аномерных протонов *D*-глюкуроновой кислоты и *D*-галактозы (8.4 и 7.8 Гц) в ЯМР ¹H спектре указывали на β-конфигурации гликозидных связей. Значение КССВ аномерного протона *L*-арабинозного звена (4.4 Гц) было немного ниже обычного значения α-*L*-арабинопиранозы (6.9 Гц). ХС атомов углерода и КССВ_{H-1/H-2} = 4.4 Гц и КССВ_{H-1/C-1} = 165.6 Гц *L*-арабинозного звена хорошо согласовывались с таковыми для фрагмента 2-*O*-β-*D*-глюкопиранозил-α-*L*-арабинопиранозида и отличались от таковых для 2-*O*-β-*D*-глюкопиранозил-β-*L*-арабинопиранозида, известных из литературы. Было установлено, что 2-*O*-замещенный *L*-арабинопиранозный остаток имеет α-ориентацию аномерного центра и конформационное равновесие этого моносахаридного звена, вероятно, сдвинуто в сторону ¹C₄ конформера. Присоединение трисахаридной цепи к стероидному агликону гликозидной связью по С-3 и эфирной связью по С-6, а также позиции межгликозидных связей между моносахаридными остатками были определены из ROESY и HMBC спектров. В результате было установлено, что лузоникозиды А–С (**86–88**) имеют 3-*O*-[6-*O*-(β-*D*-галактопиранозил)-(1→2)-α-*L*-арабинопиранозил-(1→2)-β-*D*-глюкуронопиранозил]– углеводный фрагмент. Лузоникозиды D и E (**89, 90**) отличаются заменой остатка галактозы на глюкозу, такой тип углеводной цепи не был ранее найден в циклических гликозидах морских звезд.

Агликон лузоникозида F (**91**) отличается от агликона гликозида **89** только структурой кольца В, в спектрах присутствовали сигналы α,β-ненасыщенного кетона С-6 (202.4 м.д.) и 7(8)-двойной связи. Структура углеводной цепи **91** оказалась родственной углеводным цепям **89** и **90**, но не циклической. При сравнении ЯМР ¹³C спектров открытой и циклической углеводных цепей соединений **91** и **89**, некоторые отличия наблюдались для сигналов С-1 и С-2 остатка глюкуроновой кислоты и С-1 арабинопиранозного остатка. Как и в случае лузоникозида А (**86**) и ранее известного его артефактного производного с открытой углеводной цепью, можно заключить, что эти отличия возникают в результате конформационных изменений гликозидных связей при трансформации циклических гликозидов типа **86–90** в ациклические гликозиды типа **91**. Возможно, гликозид **91** является биосинтетическим предшественником лузоникозида D (**89**). Он может быть превращен в **89** либо взаимодействием гидроксигруппы углеводного звена с карбонильной группой с последующей дегидратацией и дальнейшими превращениями агликона, либо восстановлением карбонила С-6 с последующей циклизацией и дальнейшими трансформациями.

Кроме того, лузоникозид А (**86**) был выделен нами в ходе исследований морской звезды *Leiaster* sp. (отряд Valvatida, семейство Ophidiasteridae), собранной во вьетнамских водах на банке Маклсфилда в Южно-Китайском море. Обнаружение лузоникозида А в морских звездах рода *Leiaster* опровергает существовавшее ранее мнение о таксономической специфичности циклических гликозидов для рода *Echinaster*. Следует отметить, что таксономически роды *Leiaster* и *Echinaster* находятся достаточно далеко друг от друга и относятся к разным семействам Ophidiasteridae и Echinasteridae соответственно. Таким образом, наши исследования показывают, что циклические гликозиды не могут быть использованы в качестве хемотаксономических маркеров морских звезд рода *Echinaster*, если нынешний таксономический статус двух вышеупомянутых родов обоснован. В этом случае распределение циклических гликозидов должно быть значительно шире, чем предполагалось ранее.

2 Исследования биологической активности полярных стероидов морских звезд

Гемолитическая и эмбриотоксическая активность.³ Выделенные из *H. leviuscula* полярные стероидные соединения показали гемолитическую активность на суспензии

³Изучение гемолитических и эмбриотоксических свойств полярных стероидов, а также их способности ингибировать оплодотворение яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus* было выполнено к.б.н., с.н.с. Агафоновой И.Г. и н.с. Чайкиной Е.Л. (Лаборатория биотестирования и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН).

эритроцитов крови мышей со значениями $ГК_{50}$ от 5.3×10^{-5} М до 2.1×10^{-4} М. Сравнительное изучение стероидов, отличающихся друг от друга боковыми цепями, показало, что гемолитическая активность зависит от строения боковых цепей исследуемых стероидов.

Были изучены цитотоксические эффекты полярных стероидов морских звезд *A. typicus* и *L. laevigata* на моделях оплодотворенных яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* на стадии 8-ми бластомеров и их ингибирующая активность в сперм-тесте. Наибольшую активность продемонстрировали сульфатированные полигидроксистероиды, причем самым активным был 6-*O*-сульфатированный наоал, который показал эффективную ингибирующую концентрацию $ИК_{50} = 12$ мкг/мл в сперм-тесте и $ИК_{50} = 23$ мкг/мл в тесте на эмбриотоксичность на стадии 8-ми бластомеров. Кроме того, было изучено действие полигидроксистероидов и родственных им гликозидов из морской звезды *H. kurilensis* на ингибирование оплодотворения яйцеклеток морского ежа *S. nudus* в сперм-тесте. Триозиды, куриленсозиды В, С и D (**58–60**), и стероид **62** были наиболее активны, вызывая 100% ингибирование в дозах ниже 5×10^{-5} М. Наиболее активным был гексаол **62** с $ИК_{100} = 1.3 \times 10^{-5}$ М соответственно.

В результате было установлено, что полярные стероиды морских звезд проявляют умеренные гемолитические и эмбриотоксические свойства, степень проявляемых эффектов гликозидов зависит как от строения агликона, так и от строения углеводной цепи. В большинстве случаев увеличение числа моносахаридных остатков вызывает усиление ингибирующих эффектов на оплодотворение яйцеклеток морских ежей.

Противоопухолевая активность.⁴ Цитотоксическая активность была изучена для полигидроксилированных стероидов и гликозидов из морских звезд *A. laevigatus* и *A. microdiscus*, стероидных дисульфатов из *P. marsippus* и астеросапонинов из *A. microdiscus*, *D. brucei*, *L. fusca*, *H. kurilensis* и *A. japonica*. В качестве моделей для исследований были использованы линии нормальных эпидермальных клеток мыши JB6 Cl41 и эмбриональных клеток почки человека НЕК 293 и следующие линии опухолевых клеток человека: НСТ-116 и НТ-29 (карцинома толстого кишечника), НuTu80 (аденокарцинома двенадцатиперстной кишки), Т-47D, MDA-MB-231 и ZR-75-1 (рак молочной железы), RPMI-7951, SK-Mel-28 и SK-Mel-5 (меланома), ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз) и Raji (лимфома Беркитта). Исследованные полигидроксистероиды и родственные им гликозиды не проявили какой-либо значимой цитотоксической активности на всех исследованных линиях опухолевых клеток. Астеросапонины также не обладали заметной цитотоксической активностью, умеренную цитотоксичность в концентрациях 24–65 мкМ показали торнастерозид А и версикозид А на клеточных линиях НТ-29 и MDA-MB-231, а также летастериозид А и торнастерозид А в концентрациях 34–82 мкМ на клетках НСТ-116 и RPMI-7951. Следует отметить, что умеренная цитотоксичность не говорит о полной бесперспективности полярных метаболитов морских звезд в качестве противоопухолевых агентов.

Для дальнейшего изучения антипролиферативной активности полярных стероидов и их влияния на образование колоний опухолевых клеток человека все полученные нами вещества были исследованы в концентрациях, значительно меньших, чем цитотоксические.

Антипролиферативное действие полигидроксилированных стероидов и астеросапонинов из *A. microdiscus* определяли во времени (24, 48 и 72 ч) на клетках JB6 Cl41, НТ-29 и MDA-MB-231 в нецитотоксической концентрации 10 мкМ. Наибольшую активность показали астеросапонины, торнастерозид А и версикозид А, которые подавляли пролиферацию клеток JB6 Cl41, НТ-29 и MDA-MB-231 на 15, 34, 40% и 15, 26, 35% соответственно через 72 ч обработки. Летастериозид А (**36**) из *L. fusca* (20 мкМ) избирательно действовал на опухолевые клетки: он уменьшал количество клеток НСТ-116 и RPMI-7951 на 34 и 36% соответственно через 72 ч, но не показал значительного ингибирования пролиферации клеток Т-47D. Офидианозид F и афеластериозид F (**56**) из *A. japonica* ингибировали пролиферацию клеточных линий меланомы SK-Mel-28, SK-Mel-5 и RPMI-7951 в концентрациях от 10 до 40 мкМ в течение 48 часов. Наибольшее ингибирование на 66% проявил астеросапонин **56** на клетках SK-Mel-5.

⁴ Изучение цитотоксической, антипролиферативной и противоопухолевой активности выполнялось д.х.н., зав. лаб. Ермаковой С.П. и к.х.н., с.н.с. Маляренко О.С. (Лаборатория химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН).

Для ряда выделенных стероидов противоопухолевое действие было исследовано с помощью метода мягких агаров: определено их влияние на формирование и рост колоний опухолевых клеток человека. Три полигидроксистероида из *A. laevigatus* в концентрации 20 мкМ показали сопоставимую ингибирующую активность и снижали количество колоний клеток HT-29 на 12–18% и MDA-MB-231 на 30–35% по сравнению с необработанными клетками (контроль). Стероиды из *A. microdiscus* (10 мкМ) продемонстрировали сравнимую ингибирующую активность на клетках HT-29 и MDA-MB-231. С другой стороны, астеросапонины торнастерозид А и версикоид А, выделенные из *A. microdiscus*, в концентрации 10 мкМ эффективно ингибировали колониюобразование карциномы толстого кишечника человека HT-29 на 73 и 37% соответственно и клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 на 81 и 40% соответственно. Афеластерозид F (**56**) и офидианозид F из *A. japonica* в нецитотоксической концентрации 20 мкМ ингибировали образование колоний опухолевых линий меланомы человека на 32 и 20% (SK-Mel-28), на 23 и 18% (SK-Mel-5) и на 23 и 18% (RPMI-7951) соответственно.

Влияние летастериозида А (**36**) из *L. fusca* на образование колоний раковых клеток T-47D, HCT-116 и RPMI-7951 было оценено методом мягкого агара при 5, 10 и 20 мкМ в течение двух недель. Результаты показали, что **36** уменьшает количество колоний клеток T-47D, HCT-116 и RPMI-7951 дозозависимым образом. Существенно, что этот астеросапонин в концентрации 10 мкМ более чем на 50% уменьшал количество колоний исследуемых клеток: на 81 (T-47D), 53 (HCT-116) и 65% (RPMI-7951) по сравнению с необработанными клетками (контроль, 0% ингибирования), а в концентрации 20 мкМ почти полностью ингибировал их образование: на 97 (T-47D), 90 (HCT-116) и 90% (RPMI-7951).

Влияние гиппастериозидов А–D (**70–73**) из *H. kurilensis* на количество и размер колоний карциномы толстого кишечника человека HT-29 было оценено в нецитотоксической концентрации 60 мкг/мл. Гиппастериозид D (**73**) снижал не только количество колоний клеток HT-29 на 23% по сравнению с контрольными клетками, но также размер колоний. Гиппастериозиды А (**70**) и В (**71**) обладали более слабой активностью, они уменьшали число колоний на 17 и 16% соответственно, но не уменьшали их размер. Гиппастериозид С (**72**) не продемонстрировал какого-либо значительного снижения количества и размера колоний.

Таким образом, можно отметить, что, обладая слабой цитотоксичностью, полярные стероиды морских звезд способны эффективно ингибировать пролиферацию и образование колоний опухолевых клеток *in vitro*. Астеросапонины более эффективно проявляли противоопухолевую активность по сравнению с полигидроксилированными стероидами. Установлено, что структура агликона астеросапонинов играет важную роль в их противоопухолевой активности, как правило, укорочение боковой цепи агликона приводит к снижению их цитотоксической и противоопухолевой активности. Наибольшую активность среди всех исследованных стероидов проявил астеросапонин летастериозид А, который значительно ингибировал образование колоний опухолевых клеток T-47D, HCT-116 и RPMI-7951. В результате проведенных исследований были отобраны стероиды, перспективные для дальнейшего изучения в качестве противоопухолевых средств.

Иммуномодулирующая активность.⁵ В качестве моделей для исследования использовались клеточная линия мышинных макрофагов RAW 264.7 и мышинные спленоциты. Предварительную цитотоксичность исследуемых соединений *in vitro* оценивали с помощью МТТ или МТС методов.

Была изучена цитотоксическая активность и потенциальные иммуномодулирующие свойства капеллозида А (**18**) и коскинастерозида В, выделенных из морской звезды *O. capella*, с использованием мышинных макрофагов линии RAW 264.7. В нецитотоксических концентрациях 10 мкМ гликозид **18** показал незначительное увеличение образования АФК (активных форм

⁵ Изучение иммуномодулирующей активности полярных стероидов морских звезд было проведено к.б.н., с.н.с. Пислягиным Е.А., к.б.н., с.н.с. Менчинской Е.С. и к.б.н., с.н.с. Юрченко Е.А. под руководством д.б.н., чл-корр. РАН Аминина Д.Л. (Лаборатория биоспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН), а также к.б.н., н.с. Соколовой Е.В. (Лаборатория молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН) и н.с. Кузьмич А.С. (Лаборатория химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН).

кислорода) в клетках RAW 264.7, в то время как коскинастерозид В был полностью неактивен. Вместе с тем эти гликозиды в концентрациях 10 мкМ показали значительное снижение уровней АФК на 60 и 41% соответственно, когда клетки стимулировали провоспалительным эндотоксином, липополисахаридом (ЛПС) из *E. coli*. Были изучены цитотоксичность и потенциальные иммуномодулирующие свойства полигидроксилированных стероидов и гликозидов, выделенных из морской звезды *P. regulus*, на клетках RAW 264.7. Ни одно соединение не показало цитотоксического эффекта в диапазоне концентраций 0.001–100 мкМ. В нецитотоксической концентрации 10 мкМ регулусозиды А (74), В (75) и стероидный гексаол увеличивали образование АФК в клетках RAW 264.7 на 35, 8 и 33% соответственно.

Для ряда стероидов из *C. granulatus* исследована способность влиять на уровень АФК в мышинных перитонеальных макрофагах в нецитотоксичной концентрации 0.1 мкМ. Новый гранулатозид D (25) продемонстрировал иммуномодулирующую активность, поскольку повышал уровень внутриклеточных АФК в перитонеальных мышинных макрофагах на 20% и снижал уровень внутриклеточных АФК на 21% в макрофагах, предварительно обработанных эндотоксическим ЛПС из *E. coli*.

Большинство астеросапонинов из *P. regulus* также не проявили заметного цитотоксического действия в пределах концентраций 1.25–10.0 мкМ на культуре клеток RAW 264.7. В концентрации 5 мкМ исследованные астеросапонины были полностью неактивны в индукции образования АФК в клетках RAW 264.7 по сравнению с необработанными клетками. В то же время, пентарегулозиды С–Е (81–83) снижали уровень АФК, когда клетки RAW 264.7 стимулировались провоспалительным эндотоксином, ЛПС из *E. coli*, на 40, 28 и 55% соответственно.

Была изучена иммуномодулирующая активность, включая лизосомальную стимуляцию, повышение уровня внутриклеточных АФК и усиление синтеза оксида азота NO, циклических гликозидов из морской звезды *E. luzonicus*, лузоникозида А (86) и лузоникозида D (89), на клетках макрофагов мыши RAW 264.7. Оценка цитотоксичности показала, что ни одно из соединений не проявляло цитотоксических эффектов в диапазоне концентраций 0.001–50.0 мкМ. В нецитотоксических дозах 86 регулировал лизосомальную активность клеток RAW 264.7, зависимость доза-эффект имела форму колокола. Обработка клеток соединением 86 в концентрации 10 мкМ немного снижала лизосомальную активность. В то же время это соединение значительно стимулировало лизосомальную активность в диапазоне концентраций от 0.001 до 1.0 мкМ с максимальной стимуляцией при 0.1 мкМ до примерно 50% по сравнению с контрольными клетками. Соединение 89 было менее эффективным в этом эксперименте. Лузоникозид А (86) индуцировал образование АФК в тех же клетках в диапазоне концентраций 0.01–10.0 мкМ и максимально увеличивал уровень АФК примерно в два раза при дозе 0.01 мкМ. Однако стероид 89 не продемонстрировал какой-либо значительной стимуляции образования АФК в диапазоне концентраций 0.001–10 мкМ. Также 86 индуцировал увеличение продукции NO в макрофагах дозозависимым и колоколообразным образом, сходным с таковым для лизосомальной активности. Наиболее эффективные концентрации, действие которых усиливало образование NO в клетках RAW 264.7 до 15–30% по сравнению с контролем, составляли 0.01 и 0.1 мкМ соответственно. Лузоникозид D (89) был менее эффективным и незначительно повышал содержание NO в клетках без заметной зависимости от дозы.

Таким образом, установлено, что полярные стероидные соединения морских звезд различных структурных классов проявляют иммуномодулирующие свойства. В нецитотоксических концентрациях некоторые из них способны вызывать индукцию образования активных форм кислорода. В то же время большинство из исследованных соединений показали способность в нецитотоксических концентрациях снижать уровень АФК, когда клетки совместно стимулировались провоспалительным эндотоксином. Продемонстрирована способность циклических гликозидов стимулировать лизосомальную активность и синтез NO в клетках макрофагов мыши. Можно сделать вывод, что исследованные стероидные гликозиды представляются перспективными для дальнейшего изучения в качестве иммуномодулирующих агентов.

Нейритогенные и нейропротекторные свойства.⁶ Исследования нейритогенной и нейропротекторной активности ряда полярных стероидов морских звезд проводили на культуре клеток мышины нейробластомы (NB C-1300) и органотипической культуре срезов гиппокампа крыс.

Так, была изучена нейритогенная активность линкозидов L1 (**9**), L2 (**10**) и эхинастерозида C, выделенных из морской звезды *L. laevigata*. Прижизненные наблюдения за клетками показали, что эти соединения в дозе 5 мкМ увеличивали процент дифференцировки (процент клеток, имеющих нейриты длиннее двух клеточных диаметров или имеющих более двух нейритов) после 4-х дневной инкубации в такой же степени, как и фактор роста нервов (NGF) в концентрации 10 нг/мл после аналогичной экспозиции. В экспериментах на клеточных препаратах, импрегнированных серебром, подобное увеличение дифференцировки клеток наблюдали при концентрации тестируемых веществ 7.5 мкМ. Исследованные гликозиды увеличивали процент клеточной дифференцировки, длину первичных нейритов и число нейритов на клетку. Эхинастерозид C более активно индуцировал нейрональную дифференциацию NB C-1300 клеток, чем соединения **9** и **10**. Чтобы проанализировать способность этих гликозидов усиливать NGF-эффекты роста нейритов NB C-1300 клеток, клетки культивировали в присутствии низких концентраций как NGF (2 нг/мл), так и исследуемых соединений (0.3 мкМ). Такая совместная обработка клеток NGF и гликозидами увеличивала их нейрональную дифференцировку до 55, 49 и 54% (около 30% в контроле) соответственно. Таким образом, данные гликозиды продемонстрировали значительные синергетические эффекты при действии на нейрональную дифференцировку NB C-1300 клеток, вызываемую NGF.

Были изучены нейритогенные эффекты дистоластерозидов D₁–D₃ из морской звезды *D. piron*. Показано, что в малых концентрациях эти гликозиды проявляют способность стимулировать дифференцировку клеток нейробластомы C-1300. Культивирование клеток в присутствии дистоластерозидов D₁ (2 мкМ) и D₂ (0.5 мкМ) вызывало достоверное увеличение длины нейритов по сравнению с контролем. Было отмечено, что отличительной особенностью дистоластерозидов D₁–D₃ по сравнению с ранее изученными полярными стероидами является способность стимулировать дифференцировку гигантских многоотростчатых нейронов, количественное содержание которых в полиморфной культуре нейробластомы C-1300 невелико.

Кроме того, были исследованы нейритогенные эффекты еще 9-ти полярных стероидов, выделенных из морских звезд *P. pectinifera*, *M. murrayi*, *C. crispatus* и *H. derjugini*, включая 5 гликозидов полигидроксистероидов и 4 полигидроксистероида. Прижизненные наблюдения за ростом и развитием клеток нейробластомы C-1300 в присутствии исследуемых соединений показали, что в концентрации 2–10 мкМ полигидроксистероиды и стероидные гликозиды морских звезд вызывают увеличение числа дифференцирующихся клеток. В этих же концентрациях вещества способствовали выживанию и дифференцировке клеток в условиях редкой смены среды и высокой плотности клеток. Более высокие концентрации (20–40 мкМ) не оказывали выраженного действия, а для некоторых веществ были токсичными. Нейритогенное действие проявлялось уже после 2-х суток культивирования и выражалось как в изменении количества дифференцированных клеток, так и в увеличении длины и ветвления отростков. Максимальные эффекты были зарегистрированы на 4-е сутки эксперимента. Анализ импрегнированных серебром препаратов нейробластомы C-1300 подтвердил способность изучаемых веществ увеличивать число дифференцированных нейронов. Нами впервые установлено, что не только гликозиды полигидроксистероидов, но и сами полигидроксистероиды проявляют высокую нейротрофическую активность.

По результатам исследований были отобраны 6 соединений для более детального изучения нейротрофической активности. Три из них, астеросапонин P₁, (25S)-5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-октаол и (25S)-5 α -холестан-3 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-гептаол (далее обозначены как **PP1**, **PP2** и **PP3** соответственно), были выделены из морской звезды *P. pectinifera*, другие три – дистоластерозиды D₁–D₃ (далее обозначены как **D1**, **D2** и **D3**

⁶ Изучение нейритогенных и нейропротекторных свойств некоторых полярных стероидов морских звезд было выполнено м.н.с. Пальяновой Н.В. и к.б.н. с.н.с. Панковой Т.М. под руководством к.б.н. в.н.с. Старостиной М.В. и академика РАН Штарка М.Б. (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск).

соответственно) – из морской звезды *D. nipon*. Были проведены более детальные исследования нейритогенных свойств соединений **PP1–PP3** и **D1–D3** при значительно более низких концентрациях в пределах 10–100 нМ для соединений **PP1–PP3** и 1–50 нМ для гликозидов **D1–D3** в клетках NB C-1300 с использованием импрегнированных серебром препаратов. Было показано, что соединения **PP1** и **PP3** увеличивают число дифференцированных нейронов после 4-х дней инкубации в концентрации 50 нМ и выше. Соединение **PP2** продемонстрировало тот же эффект в концентрации 10 нМ и выше, а соединения **D1, D2** и **D3** – в концентрации 5 нМ и выше. Также для всех соединений наблюдалась выраженная зависимость эффекта от концентрации после 4-х дней инкубации.

Культивирование NB C-1300 клеток в присутствии стероидных соединений морских звезд также показало быстрое удлинение первичных нейритов. Нейритогенные эффекты исследованных соединений в культуре клеток нейробластомы были сравнимы с действием NGF. Соединение **PP3** (0.5 мкМ) значительно увеличивало среднее число отростков на клетку (2.4 ± 0.2) по сравнению с контролем (1.7 ± 0.2); подобный эффект не был отмечен для клеток NB C-1300, культивируемых с другими стероидами или NGF. Данное исследование подтвердило отмеченную ранее способность дистоластерозидов D₁, D₂ и D₃ из *D. nipon* стимулировать дифференцировку больших нейронов, имеющих несколько отростков, что является отличительной чертой по сравнению с другими стероидами морских звезд.

Также было установлено, что нейритогенные эффекты стероидов морских звезд на NB клетках были синергичны эффектам нейротрофинов NGF или BDNF. Было показано, что неэффективными (не вызывающими клеточную дифференцировку) концентрациями являются 1 нг/мл для NGF и 0.1 нг/мл для BDNF. Одновременная обработка культуры нейробластомы соединениями **PP1–PP3** и **D1–D3** и нейротрофическими факторами в неэффективных концентрациях значительно увеличивали нейрональную дифференцировку.

Нейропротекторные эффекты полярных стероидов морских звезд были оценены с использованием культуры клеток NB C-1300 и органотипической культуры гиппокампа крыс (OHSC). Были получены воспроизводимые результаты в клеточных культурах NB C-1300, которые были подвержены кислородно-глюкозной депривации (Oxygen-Glucose Deprivation, OGD) в течение 20 часов. Наблюдалась некоторая разница в нейропротекторных свойствах стероидов **PP1–PP3** из *P. pectinifera* и **D1–D3** из *D. nipon*. Нейропротекторные эффекты не были отмечены для стероидов **PP1, PP2** и **PP3** из *P. pectinifera* в концентрации 25 нМ, но заметные нейропротекторные свойства эти вещества проявляли в концентрации 50 нМ. Эффективность защиты при более высоких концентрациях данных стероидов, до 2 мкМ, не превышала значений, установленных при концентрации 50 нМ. Стероиды из *D. nipon* были более токсичны и снижали число выживших клеток NB C-1300 в условиях OGD в концентрациях 0.5 или 2 мкМ. В то же время при концентрации 50 нМ эти вещества демонстрировали значительные нейропротекторные эффекты.

Кроме того, нейропротекторная активность была исследована на органотипической культуре срезов гиппокампа крыс (OHSC). Исследования проводились со стероидами **PP1, D1** и **D3**, которые показали большую активность в предыдущих экспериментах. Выживание OHSC в присутствии **PP1, D1** и **D3** (1 мкМ) оценивали визуально во время культивирования. После 7–8-ми дней культивирования культуры OHSCs фиксировали, окрашивали кризоловым фиолетовым или импрегнировали серебром и изучали под световым микроскопом. Ни одно из исследуемых соединений не повлияло на развитие срезов гиппокампа в культуре или их адгезии к коллагену при отсутствии OGD. В то же время, наблюдалась массовая гибель клеток в различных зонах гиппокампа в срезах, подвергшихся воздействию кислородно-глюкозной депривации. Соединения **PP1, D1** и **D3** в концентрации 1 мкМ были протестированы на срезах OHSCs в условиях OGD. Данные стероиды снижали число меченных иодидом пропидия мертвых клеток, свидетельствуя о нейропротекторных свойствах, подобных тем, которые проявляют эндогенные стероиды млекопитающих.

Таким образом, было установлено, что полярные стероиды морских звезд проявляют нейритогенную активность в культуре клеток нейробластомы, и их эффекты синергичны нейритогенному действию нейротрофинов NGF и BDNF. Они также действуют как

нейропротекторы в культуре клеток нейробластомы и органотипической культуре клеток гиппокампа крыс в условиях кислородно-глюкозной депривации. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют, что нейротрофиноподобная нейритогенная и нейропротекторная активности являются, вероятно, общими свойствами полигидроксистероидов и родственных гликозидов морских звезд, хотя степень проявляемых эффектов зависит от особенностей структуры молекул. Молекулярный механизм действия этих веществ остается неизвестным, но они представляются многообещающими кандидатами для дальнейшего изучения в качестве возможных нейротрофических и нейропротекторных медицинских препаратов.

3 Исследования биосинтеза полярных стероидных соединений морских звезд

Работы по изучению биосинтеза полярных стероидных соединений морских звезд выполнялись очень давно и дали мало достоверных результатов. Некоторые данные по биосинтезу стероидов и агликонов астеросапонинов были много лет назад получены с использованием предшественников с радиоизотопными метками. Данных по биосинтезу полигидроксилированных стероидов морских звезд и родственных им гликозидов не найдено.

Можно выделить два главных подхода в исследовании биосинтеза сложных природных соединений: 1) исследование биосинтеза с помощью введения меченых предполагаемых биосинтетических предшественников с последующим анализом включения метки в целевые соединения; 2) анализ структур большого набора метаболитов определенных структурных классов, найденных в организмах-продуцентах, включая выделение и структурную идентификацию минорных соединений, которые могут дать дополнительную информацию, указывающую на последовательность биосинтетических превращений. В ходе нашей работы мы использовали оба этих подхода с целью получения новых данных о биогенезе полигидроксистероидов и родственных им гликозидов, а также астеросапонинов морских звезд.

Чтобы определить, какие направления окисления стероидов предшествуют друг другу в большинстве видов морских звезд, мы воспользовались компьютерной базой данных, созданной д.х.н., гл.н.с. Калиновским А.И. (Лаборатория физико-химических методов исследований ТИБОХ ДВО РАН). Эта база данных в настоящий момент содержит информацию, касающуюся структур, биологических источников и ЯМР спектров 723 высокоокисленных стероидных производных, выделенных более чем из 70-ти видов морских звезд. Распределение этих веществ в изученных видах морских звезд в соответствии с их степенью окисления дало следующие результаты. Из 68 наименее окисленных стероидов, содержащих только две или три гидроксильные группы в молекуле, 45 имели эти группы при С-3 и С-6, и 4 имели гидроксигруппу при С-3 и кетон при С-6. Все эти метаболиты были дополнительно окислены в боковых цепях. Это подтверждает, что введение гидроксигруппы в положение 6 и в боковые цепи может предшествовать другим окислительным процессам в морских звездах. Очевидно, что многие соответствующие метаболиты не аккумулируются в этих животных, но быстро трансформируются в классические астеросапонины и/или в более окисленные в ядре негликозидные метаболиты. Из 38 известных тетраолов 32 имели гидроксигруппы в положениях 3, 6 и 15. Из 138 пентаолов 95 содержали гидроксильные функции при С-3, С-6, С-15 и С-8, 22 – при С-3, С-6, С-15 и С-4, и 20 – при С-3, С-6, С-15 и С-5. Из 216 гексаолов 115 были 3,6,8,15,16-пентагидроксилированными стероидами и 88 были 3,4,6,8,15-пентагидроксилированными стероидами. Дальнейшее гидроксирование может происходить по С-7 и очень редко – С-14. Боковые цепи были окислены, в основном, по положениям 20 и/или 23 при биосинтезе олигогликозидных астеросапонинов и по положениям 24 и/или 26 при биосинтезе полигидроксилированных стероидов. В случае боковых цепей эргостанового и стигмастанового типа окисление может идти также по С-28 и С-29 соответственно. Таким образом, по результатам наших и предшествующих работ других авторов были выявлены предпочтительные направления гидроксирования при биосинтезе полярных стероидов морских звезд.

Полученные данные были использованы при проведении метаболомных исследований морских звезд, которые были предложены и осуществлены сотрудниками Лаборатории физико-химических методов исследований ТИБОХ ДВО РАН д.х.н. Дмитренко П.С. и к.х.н. Поповым Р.С. при непосредственном участии автора. Этот подход заключается в метаболомном

профилировании соединений определенного класса с помощью сочетания высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ-ИЭР МС). При применении данного подхода суммарные фракции целевых метаболитов анализируются без разделения на индивидуальные вещества с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения и тандемной масс-спектрометрии. Идентификация детектируемых соединений происходит на основании данных МС спектров веществ, их хроматографического поведения, сравнения с соответствующими данными для известных соединений, структуры которых были установлены ранее с применением всего набора физико-химических методов, включая ЯМР и МС, а также на основании биогенетических представлений. В случае изучения метаболомных профилей полярных стероидов морских звезд важную роль для предположения структур ранее неидентифицированных метаболитов играли выявленные нами закономерности, в которых обобщены предпочтительные пути окисления стероидных ядер и общая архитектура углеводных цепей исследуемых молекул.

3.1 Биосинтез полигидроксилированных стероидов и родственных им гликозидов морских звезд

3.1.1 Биосинтез 27-нор-стероидов в морской звезде *Archaster typicus*

Три популяции морской звезды *A. typicus* были исследованы группами итальянских и китайских ученых и нашей группой. Эта морская звезда содержит уникальные стероидные соединения с редким 27-нор-холестановым скелетом. Риччи с соавт. выделили 9 полигидроксистероидов, включая четыре 27-нор-стероида. Они предполагали, что такие нор-стероиды могут образовываться как продукты ретроальдольного распада возможных 24-кето-26-гидроксистероидных предшественников. Наши исследования *A. typicus* привели к выделению 6-ти новых стероидных соединений, а также 10-ти ранее известных соединений, 6 из которых были впервые найдены Риччи с соавт. (см. главу 1.13). Действительно, нами были найдены стероиды **49** и **50**, родственные гипотетическому предшественнику 27-нор-стероидов, которые гидроксилированы по обеим 24 и 26 позициям, хотя сами 24-кето-26-гидроксистероиды обнаружены не были. Наши данные показали, что биосинтез 27-нор-холестановых стероидов по пути, предложенному Риччи с соавт., не может быть исключен. В настоящее время мы имеем структурную информацию, касающуюся 18-ти полигидроксилированных стероидов из этой морской звезды. На основании их структур мы предположили, что 27-нор-стероиды могут, вероятно, образовываться по схеме, аналогичной ранним стадиям биосинтеза желчных спиртов в примитивных позвоночных и у людей с заболеваниями печени. Она включает в себя первоначальное окисление по положению 26, типичное для многих полярных стероидов морских звезд, с последующим гидроксилированием по положениям 24, 25 или 27. Стероиды с 25,26-дигидроксибоксовой цепью также были найдены в *A. typicus*. Дальнейшие стадии биосинтеза желчных спиртов, очевидно, включают образование 26-карбоксильных производных с последующим декарбоксилированием, причем в биосинтезе желчных спиртов важную роль играют интермедиаты с 26-карбокси-24-кето-, 27-нор-24-кето-, 27-нор-24-гидрокси- и 27-нор-24,25-дигидроксибоксовыми цепями. Стероиды с такими же или родственными боковыми цепями были найдены в *A. typicus*. На этом основании мы считаем, что в морских звездах реализуется путь образования 27-нор-стероидов и других стероидов с необычными боковыми цепями, найденных в *A. typicus*, через 26-карбоксильные производные с последующим декарбоксилированием.

3.1.2 Анализ структур и биосинтетических путей образования полигидроксилированных стероидов в морской звезде *Aphelasterias japonica*

Как уже упоминалось выше, применение метаболомных подходов позволило в несколько раз увеличить число идентифицированных метаболитов в исследуемом виде. Классические химические методы исследования морской звезды *A. japonica* привели к выделению 17-ти стероидных соединений, включая 14 сульфатированных полигидроксистероидов и их гликозидов и 3 «классических» астеросапонина. При метаболомном профилировании дальневосточной

морской звезды *A. japonica* обнаружено 68 метаболитов, включающих 7 сульфатированных полигидроксистероидных соединений, 28 сульфатированных моно- и биозидов полигидроксистероидов и 33 астеросапонина.

Анализ структур стероидов, выделенных ранее из *A. japonica*, позволил сделать вывод о замедленном гидроксировании в положении 8 и раннем дигидроксилировании части метаболитов в положениях 5 и 6 в сочетании с гидроксированием по боковой цепи. Эти закономерности, а также хроматографическое поведение компонентов анализируемой смеси облегчили их идентификацию. Можно отметить, что практически все найденные в *A. japonica* полигидроксилированные стероиды имеют холестерановый скелет. Найденные стероиды не являются высокоокисленными, большинство веществ имеет тетраокисленный и пентаокисленный скелеты (4 и 10 соединений соответственно). Двойные связи в полигидроксилированных стероидах *A. japonica* находятся в 22(23)- или в 4(5)-положениях.

Практически все стероиды *A. japonica* являются монозидами, а именно, ксилозидами, за исключением двух соединений, имеющих остаток глюкозы. Все найденные метаболиты содержат сульфатные группы, которые находятся либо в моносахаридном остатке, либо в агликоне в положениях 3, 15, 24 и 26. Можно предположить, что сульфатирование является терминальной стадией биосинтетических превращений.

Таким образом, биогенез полиокисленных стероидов в данной морской звезде осуществляется путем последовательного введения гидроксильных групп в стериновые предшественники с последующим гликозилированием и сульфатированием.

3.1.3 Анализ структур и биосинтетических путей образования полигидроксилированных стероидов в морской звезде *Patiria pectinifera*

В ходе предыдущих исследований морской звезды *P. pectinifera* с помощью традиционных химических подходов было найдено 22 полярных стероида, включая 14 полигидроксилированных стероидов и родственных им сульфатированных гликозидов и 8 астеросапонинов. С помощью метаболомного подхода в *P. pectinifera* были охарактеризованы 72 соединения – 22 полигидроксилированных стероида, 15 гликозидов полигидроксистероидов и 35 астеросапонинов.

Анализ метаболомного профиля полигидроксилированных стероидов *P. pectinifera* позволяет выявить структурные особенности полярных стероидов, характерные для данной морской звезды. В ней найдено большое количество высокоокисленных соединений, содержащих от 6-ти до 9-ти гидроксильных групп в стероидном ядре и боковой цепи. Только два монозида имеют пентаокисленный стероидный агликон. Также можно отметить, что большинство полигидроксистероидов *P. pectinifera* сульфатированы, причем в случае гликозилированных соединений сульфатная группа всегда находится в моносахаридном остатке. В то же, время, обнаружены и нессульфатированные метаболиты, при этом их число заметно меньше, чем сульфатированных стероидов.

Все найденные гликозиды полигидроксистероидов *P. pectinifera* являются монозидами. Моносахаридным остатком во всех гликозидах является сульфатированная арабинофураноза, которая присоединена к боковой цепи агликона. Кроме того, остаток сульфатированной арабинофуранозы часто дополнительно метилирован.

Помимо стероидов с холестерановым скелетом, в *P. pectinifera* обнаружены также стероидные метаболиты с дополнительными Me- и Et-группами при C-24 в боковой цепи, т.е. имеющие эргостановый и стигмастановый скелеты соответственно. Поскольку наиболее вероятным путем биосинтеза полигидроксилированных соединений морских звезд является биосинтетическая трансформация стеринов, полученных с пищей, можно предположить, что присутствие стероидов с эргостановым и стигмастановым скелетами связано с тем, что эта морская звезда использует в процессах биосинтеза как стерины животного происхождения, так и фитостерины. Всего в ходе данной работы найдено 12 стероидов с холестерановым скелетом, по 6 стероидов с эргостановым и стигмастановым скелетами и один гликозид с 24-метил-27-нор-холестерановым скелетом.

Разнообразие структур обнаруженных соединений не дало возможности предложить единую схему их биосинтеза, можно сделать только предположения о биогенетической связи отдельных стероидов. Так, найдены гликозиды, которые содержат остаток сульфатированной арабинозы и родственные им соединения, в которых остаток сульфатированной арабинозы дополнительно метилирован. Некоторые стероиды образуются в результате сульфатирования соответствующих предшественников, например, найдено несколько полигидроксистероидов и их сульфатированных аналогов.

3.1.4 Анализ структур и биосинтетических путей образования полигидроксилированных стероидов в морской звезде *Lethasterias fusca*

При химическом изучении морской звезды *L. fusca*, проведенном нашей группой, было выделено 14 стероидных соединений, включая 3 полигидроксистероида, 6 гликозидов полигидроксистероидов и 5 астеросапонинов. Для метаболомного профилирования полярных стероидных метаболитов *L. fusca* была применена нанопоточная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (наноВЭЖХ-ИЭР МС/МС). Это позволило значительно повысить количество обнаруженных метаболитов. В результате, было обнаружено и охарактеризовано 207 соединений, включая 106 астеросапонинов, 81 гликозидов полигидроксистероидов и 14 полигидроксистероидов.

Проанализированный профиль стероидных метаболитов выявил не менее 95-ти полигидроксистероидных соединений и родственных гликозидов, для 91-го метаболита были предположены структуры. Подавляющее число обнаруженных стероидов имеет сульфатную группу, что согласуется с предположением, что сульфатирование прекращает дальнейшие биосинтетические превращения. Сульфатная группа может находиться или в моносахаридном остатке (55 из найденных соединений) или в стероидном ядре (20 соединений).

Абсолютное большинство стероидов *L. fusca* имеет пента- или гексагидроксилированные агликоны. Основными положениями окисления стероидных ядер являются 3, 6, 8 и 15, места окисления боковых цепей являются теми же, что и во многих других полигидроксистероидах из морских звезд. Метаболомный профиль *L. fusca* характеризуется присутствием стероидов как с холестановым, так и с эргостановым и стигмастановым скелетами (45, 31 и 10 соединений соответственно). Также найдены редкие агликоны с 24-метил-27-*нор*-боковой цепью. Интересно отметить, что найдены агликоны как с 22(23)-двойной связью, так и с редкой 20(22)-двойной связью в боковой цепи.

Большинство найденных соединений являются монозидами, но, в отличие от *A. japonica* и *P. pectinifera*, в *L. fusca* содержится достаточно большое число биозидов. Среди обнаруженных биозидов только одно соединение имеет дисахаридный фрагмент в боковой цепи, остальные биозиды содержат сульфатированные или несulfатированные пентозы и гексозы в агликоне и боковой цепи одновременно. Кроме того, для *L. fusca* характерно примерно одинаковое содержание гексоз в качестве моносахаридных остатков (39 соединений) по сравнению с гликозидами, содержащими пентозные остатки (36 соединений).

В целом, разнообразие структур полигидроксилированных стероидов *L. fusca* не позволяет предложить единую схему биосинтеза, как и в случае *P. pectinifera*. Тем не менее, можно отметить возможные биогенетические связи между отдельными соединениями. Так, были найдены полигидроксистероиды, связанные между собой последовательными реакциями окисления, гидрирования/дегидрирования или гликозилирования. Также найдены вещества, которые могут образовываться из промежуточных продуктов при метилировании их моносахаридных остатков.

Таким образом, с помощью метаболомного ВЭЖХ-МС профилирования нами были получены данные о возможных путях биосинтеза полигидроксилированных стероидов дальневосточных морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca*. Интересно отметить, что все эти морские звезды собраны практически в одном месте обитания – в бухте Троица на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН, а значит, имеют близкие географические, климатические и экологические условия обитания. Тем не менее, составы их стероидных метаболомов значительно отличаются.

Наименее окисленные стероиды найдены в *A. japonica*, а наиболее окисленные – в *P. pectinifera*. В целом преимущественные направления окисления стероидных ядер и боковых цепей соответствуют выявленным нами при анализе структур известных полярных стероидов морских звезд, можно отметить только замедленное гидроксильное в положении 8 и раннее гидроксильное в положении 5 в *A. japonica*.

В *A. japonica* полярные стероиды найдены только в сульфатированной форме, а стероидные соединения *P. pectinifera* и *L. fusca* находятся как в сульфатированной, так и в несulfатированной формах. Для всех этих видов морских звезд характерно сульфатирование моносахаридных остатков.

В хищной морской звезде *A. japonica* практически все найденные соединения имеют холестерановую скелетную систему, а в *P. pectinifera* и *L. fusca* найдены также соединения с эргостановым и стигмастановым скелетами. Вероятно, это связано с тем, что *P. pectinifera* и *L. fusca*, очевидно, являются планктонофагами и/или детритофагами и используют, помимо холестерина, фитостерины пищевого происхождения в процессах биосинтеза полярных стероидов.

Практически все гликозиды, найденные в *A. japonica* и *P. pectinifera*, являются монозидами, в то время как для *L. fusca* характерно присутствие большого количества т.н. «двухцепочечных» гликозидов, имеющих моносахаридные остатки, присоединенные как к стероидному ядру, так и к боковой цепи агликонов. Моносахаридными остатками в *A. japonica* являются ксилоза и, редко, глюкоза. Для гликозидов *P. pectinifera* характерно присутствие остатка сульфатированной арабинофуранозы, в некоторых случаях дополнительно метилированной. В полностью идентифицированных гликозидах из *L. fusca* моносахаридными остатками являются ксилоза и глюкоза, как и в гликозидах из *A. japonica*, но для более точной характеристики моносахаридных остатков в метаболитах этой морской звезды требуются дополнительные химические исследования.

3.2 Исследования биосинтеза астросапонинов морских звезд

В настоящее время известны структуры 138-ми астросапонинов. Анализ их структур позволили установить основные типы агликонов и выявить основные структурные закономерности построения углеводных цепей, общие для всех соединений этого класса. Первая углеводная единица (S1), присоединенная к гидроксильной группе С-6 в агликоне, в большинстве случаев является хиновозой. У некоторых видов также были обнаружены более редкие углеводные фрагменты с глюкозой или гидратированной 6-дезоксиглюкозой (DXHU) в качестве первой моносахаридной единицы. Следующее моносахаридное звено (S2) (обычно хиновоза или ксилоза) связано с этим сахаром 1,3-связью и всегда несет хиновозный остаток, присоединенный β -1,2-связью в точке ветвления. Третий сахар в основной цепи присоединен к S2 1,4-связью. Концевые моносахаридные звенья соединены с S3 1,2-связью. В углеводной цепи, состоящей из шести углеводных единиц с пятью моносахаридами в основной цепи, концевая сахарная единица связана с S4 1,3-связью. В углеводных цепях гексасахаридов с двумя разветвлениями второе концевое моносахаридное звено связано с S3 1,4-связью. Знания об этих структурных закономерностях были применены нами при изучении метаболомных профилей астросапонинов морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca*.

3.2.1 Анализ структур и биосинтетических путей образования астросапонинов в морской звезде *Aphelasterias japonica*

Исследование метаболомного профиля астросапонинов морской звезды *A. japonica* привело к структурной идентификации 33-х астросапонинов, включая 3 олигогликозида, выделенных при химических исследованиях этой морской звезды. Установлено, что практически все астросапонины *A. japonica* являются пентаозидами за исключением двух гексаозидов. Принимая во внимание описанные выше закономерности построения углеводных цепей астросапонинов, были предложены структуры углеводных цепей обнаруженных соединений. Все найденные в *A. japonica* пентаозиды имеют схожую архитектуру углеводных цепей с одним разветвлением у второго моносахаридного остатка. Обнаруженные гексаозиды имеют

углеводные цепи с пятью сахарами в основной цепи и одним разветвлением у второго моносахаридного остатка. Первым моносахаридным остатком в большинстве соединений является дезоксигексоза (хиновоза в идентифицированных нами гликозидах), но найдены гликозиды с остатком DXHU и с другими неидентифицированными моносахаридами. Остаток DXHU является достаточно редким для астеросапонинов, поэтому нахождение 7 гликозидов с таким моносахаридом в *A. japonica* может свидетельствовать о дополнительном окислении углеводной цепи в этой морской звезде. Вторым моносахаридным остатком в углеводных цепях астеросапонинов *A. japonica* могут являться как пентоза, так и гексоза, моносахаридный остаток при разветвлении – всегда дезоксигексоза, а именно, хиновоза во всех идентифицированных гликозидах. Кроме того, в *A. japonica* были идентифицированы 5 нативных сульфатированных агликонов астеросапонинов, а также 3 «укороченных» астеросапонинов, найденные ранее в этой морской звезде при химических исследованиях. Следует отметить, что «укороченные» астеросапонины, имеющие один моносахаридный остаток, являются достаточно редкой группой стероидов морских звезд.

Большинство обнаруженных астеросапонинов в зависимости от структур их агликонов образует на хроматограммах кластеры со схожими временами удерживания. Это дало возможность выявить 7 основных групп агликонов (AGL_AI – AGL_AVII). Можно отметить, что все обнаруженные типы агликонов *A. japonica* имеют холестерановый скелет, как и в случае полигидроксированных соединений, за исключением астерона (AGL_AI), который, вероятно, является продуктом ретроальдольного распада агликона торнастерина А (AGL_AII). Боковые цепи найденных агликонов являются моно- или диокисленными, позиции окисления обычные для астеросапонинов: это атомы С-20, С-22, С-23 и С-24. Агликоны AGL_AIII, AGL_AVI, AGL_AVII и, возможно, AGL_AV, имеют дополнительные двойные связи.

Анализ структур астеросапонинов *A. japonica* показал, что они могут являться продуктами смешанного биосинтеза т.н. «мозаичного» типа, когда процессы биосинтеза, приводящие к образованию агликонов и углеводных цепей, протекают независимо друг от друга и одновременно. Так, найдены астеросапонины с одинаковыми типами агликонов и с олигосахаридными цепями разной длины. Обнаружение в *A. japonica* «укороченных» астеросапонинов вместе с нативными агликонами также может свидетельствовать о том, что одним из путей биосинтеза астеросапонинов является наращивание углеводных цепей уже сформированных агликонов. Также показано, что некоторые астеросапонины могут образовываться при дополнительном окислении и модификации первого остатка хиновозы в углеводной цепи.

В то же время, обнаружены соединения с одинаковыми углеводными цепями и разными агликонами, например, астероновый аналог офидианозида F и офидианозид F, имеющие одинаковые пентасахаридные цепи Fuc–Xyl–Xyl(–Qui)–Qui– и агликоны AGL_AI и AGL_AII типов соответственно. Аналогично были найдены другие серии таких гликозидов, возможно с одинаковыми типами углеводных цепей (таблица 1).

Таблица 1 – Структуры астеросапонинов, имеющих схожие углеводные цепи и различные агликоны, обнаруженные в *A. japonica* методом ВЭЖХ-ИЭР МС.

Предполагаемая углеводная цепь	Астеросапонины и их агликоны*
Fuc–Xyl–Xyl(–Qui)–Qui–	A5 (AGL _A I), A42 (AGL _A II)
dHex–dHex–Hex(–Qui)–Qui–	A4 (AGL _A I), A26 (AGL _A III), A40 (AGL _A II), A57 (AGL _A VI), A62 (AGL _A V)
dHex–dHex–dHex(–Qui)–DXHU–	A32 (AGL _A III), A48 (AGL _A II), A50 (AGL _A II), A58 (AGL _A VII), A59 (AGL _A VI), A63 (AGL _A V)
dHex–Hex–Pent(–Qui)–Qui–	A39 (AGL _A II), A43 (AGL _A IV), A60 (AGL _A V)
dHex–dHex–dHex(–Qui)–Qui–	A52 (AGL _A II), A53 (AGL _A IV), A65 (AGL _A V)
dHex–dHex–Pent(–Qui)–Qui–	A45 (AGL _A II), A49 (AGL _A IV)
dHex–dHex–dHex(–Qui)–126–	A54 (AGL _A II), A56 (AGL _A IV)
dHex–dHex–dHex(–Qui)–171–	A61 (AGL _A II), A67 (AGL _A VI)
Hex–dHex–Hex–Pent(–Qui)–Qui–	A30 (AGL _A II), A36 (AGL _A IV)

*Номера соединений соответствуют номерам пиков на ВЭЖХ-МС хроматограмме.

3.2.2 Анализ структур и биосинтетических путей образования астеросапонинов в морской звезде *Patiria pectinifera*

Метаболомный анализ полярных стероидов *P. pectinifera* выявил 35 астеросапонинов. Анализ структур найденных олигогликозидов показал, что 21 соединение имело пентасахаридную, 13 – гексасахаридную и 1 – тетрасахаридную углеводные цепи. Все ранее выделенные астеросапонины из *P. pectinifera* в качестве терминальных остатков содержат фукозу или галактозу, а третьим остатком – глюкозу. Как и большинство астеросапонинов, большинство из них содержит первым от агликона моносахаридным звеном остаток хиновозы. Эти общие структурные особенности позволили предложить структуры астеросапонинов *P. pectinifera* на основе данных ВЭЖХ-МС. Обнаружено, что 27 соединений содержат дезоксигексозу (хиновозу) в качестве первого моносахарида и звена при разветвлении и пентозу или дезоксигексозу (ксилозу или хиновозу) в качестве второго моносахаридного остатка. Пять соединений в качестве первого моносахаридного остатка содержат остаток DXHU, а два гликозида – моносахаридный остаток с массой 126 Да, который, возможно, является ненасыщенным моносахаридом с 4-кетогруппой и 2'(3')-двойной связью за счет потери H₂O. Эти моносахаридные остатки, вероятно, являются продуктами дальнейшего биологического окисления первой хиновозы в их углеводных цепях. Интересно, что 19 астеросапонинов содержат гексозу (глюкозу) в качестве третьего моносахаридного звена, как и ранее выделенные из этого вида гликозиды.

Преыдушие исследования морской звезды *P. pectinifera* привели к выделению пяти гексаозидов, которые можно разделить на два типа по структуре их олигосахаридных фрагментов. Четыре гексаозида имеют олигосахаридные цепи с двумя разветвлениями на втором и третьем моносахаридных звеньях, а один имеет линейную основную олигосахаридную цепь с пятью моносахаридными звеньями и одним разветвлением на втором моносахаридном звене. Мы подтвердили присутствие этих соединений, а также указали на присутствие некоторых других гексаозидов обоих типов. Также в *P. pectinifera* найдены 4 нативных агликона астеросапонинов. В отличие от *A. japonica*, «укороченных» астеросапонинов обнаружено не было.

В соответствии с хроматографическим поведением и характером фрагментации в тандемных масс-спектрах все обнаруженные астеросапонины *P. pectinifera* были разделены на 8 групп по типам агликонов (AGL_PI–AGL_PVIII). Интересно, что, как и в случае полигидроксилированных стероидов *P. pectinifera*, агликоны астеросапонинов имеют как холестановый, так и эргостановый и стигмастановый скелеты. Это, вероятно, также связано с использованием стеринов как животного, так и растительного происхождения в процессах биосинтеза агликонов астеросапонинов морской звезды *P. pectinifera*. Боковые цепи AGL_PI–AGL_PVIII имеют одно или два места окисления, в агликонах AGL_PVI, AGL_PVIII и, вероятно, AGL_PV присутствуют дополнительные двойные связи.

Как и в случае *A. japonica*, некоторые из астеросапонинов *P. pectinifera* имеют одинаковую олигосахаридную часть и отличаются друг от друга только структурой агликонов. Это указывает на то, что трансформация агликона может происходить, когда углеводная цепь уже сформирована. В то же время нами были найдены астеросапонины, имеющие одинаковый агликон и отличающиеся длиной олигосахаридной цепи. Также найдены астеросапонины, связанные дополнительным окислением первого от агликона моносахаридного остатка.

3.2.3 Анализ структур и биосинтетических путей образования астеросапонинов в морской звезде *Lethasterias fusca*

Как было сказано выше, применение для метаболомного профилирования метода наноВЭЖХ-ИЭР МС/МС позволило значительно увеличить количество идентифицированных метаболитов. Проанализированный образец дальневосточной морской звезды *L. fusca* показал наличие не менее 112-ти астеросапонинов. Анализ структур показал, что 28 соединений являются гексаозидами, 66 – пентаозидами, 7 – триозидами, 5 – «укороченными» астеросапонины, а 6 относятся к нативным агликонам астеросапонинов.

Большинство обнаруженных гексаозидов *L. fusca* имеют олигосахаридные цепи, тесно связанные друг с другом. Все гексаозиды из *L. fusca* имеют основную олигосахаридную цепь, состоящую из пяти моносахаридных остатков только с одним разветвлением. Остаток

дезоксигексозы находится в качестве 4-го сахарного звена и моносахарида при разветвлении, а большинство из них содержат гексозу в качестве 5-го, пентозу (ксилозу) в качестве 2-го и дезоксигексозу (хиновозу) в качестве 1-го моносахаридного остатка. Из охарактеризованных пентаозидов 38 гликозидов имеют дезоксигексозу в качестве 2-го моносахаридного звена, в 42-х соединениях найден остаток дезоксигексозы в качестве 3-го моносахарида, хотя большинство известных астеросапонинов имеют пентозу в качестве 2-го и гексозу в качестве 3-го звена.

В *L. fusca* также были обнаружены астеросапонины с редкими и нетипичными моносахаридными звеньями в первом положении от агликона. Среди них 10 соединений имеют остаток DXHU в качестве первой моносахаридной единицы, 2 гликозида имеют моносахаридный остаток с массой 126 Да ($C_6H_6O_3$), вероятно, являющийся ненасыщенным сахаром с 4'-кетогруппой и 2'(3')-двойной связью из-за потери H_2O , а 5 соединений имеют моносахаридный фрагмент с массой 171 Да ($C_7H_9NO_4$). Несколько подобных астеросапонинов, содержащих звено DXHU и звено $C_6H_6O_3$, ранее были обнаружены у *A. japonica* и *P. pectinifera*, тогда как звено $C_7H_9NO_4$ было обнаружено в астеросапонидах *A. japonica*. Кроме того, в *L. fusca* обнаружен астеросапонин, имеющий фрагмент с массой 143 Да ($C_6H_9NO_3$) в качестве первого моносахаридного звена, моносахариды этого типа до сих пор не были найдены в морских организмах. Вероятно, гликозиды с подобными моносахаридными остатками в первом положении являются продуктами биологического окисления первой хиновозы в их углеводных цепях.

Пять обнаруженных в *L. fusca* соединений являются «укороченными» астеросапонидами с одним моносахаридным звеном, а 7 соединений являются триозидами. Также было найдено 6 нативных агликонов астеросапонинов. Как и в случае других исследованных морских звезд в соответствии с хроматографическим поведением и характером фрагментации в tandemных масс-спектрах все обнаруженные астеросапонины *L. fusca* были разделены на группы (I – XXIII) по типам агликонов ($AGL_L I - AGL_L XXIII$). Большинство агликонов астеросапонинов *L. fusca* имеет холестановый скелет, но также найдены стероиды с прегнановым ($AGL_L I$ и $AGL_L II$), эргостановым ($AGL_L XIII$, $AGL_L XIV$, $AGL_L V$ и $AGL_L XXIII$), стигмастановым ($AGL_L XVI$) и 24-*нор*-холестановым ($AGL_L X$) скелетами. Обнаружены необычный тригидроксилированный агликон ($AGL_L III$) и агликоны с двумя двойными связями в боковой цепи ($AGL_L XII$ и $AGL_L XXI$). Также для некоторых астеросапонинов *L. fusca* характерно дополнительное окисление стероидного ядра ($AGL_L VI$, $AGL_L VII$, $AGL_L VIII$ и $AGL_L XIV$).

Процессы биосинтеза астеросапонинов в *L. fusca*, вероятно, протекают по «мозаичному» типу, как и в двух других исследованных нами с помощью метаболомного профилирования видах морских звезд. Стероидные триозиды, а также «укороченные» астеросапонины могут быть биосинтетическими предшественниками астеросапонинов с более длинными углеводными цепями. Это предположение подтверждается идентификацией астеросапонинов, имеющих одинаковую агликоновую часть и разные олигосахаридные цепи, образованные последовательным присоединением моносахаридных звеньев от нативных агликонов к «укороченным» астеросапонидам и через триозиды к пентаозидам и гексаозидам. Ряд астеросапонинов может биосинтезироваться при дополнительном окислении и/или модификации первого моносахаридного остатка. В то же время найден ряд астеросапонинов, имеющих одинаковые или подобные олигосахаридные цепи и различные агликоны. Например, углеводная цепь Fuc-Gal-Xyl(-Qui)-Qui- найдена в трех известных астеросапонидах: торнастерозиде А ($AGL_L V$), летастериозиде В ($AGL_L XVIII$) и летастериозиде А ($AGL_L XVII$).

Таким образом, можно отметить, что астеросапонины исследованных нами с помощью метаболомного подхода дальневосточных морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca* являются продуктами смешанного биосинтеза т.н. «мозаичного» типа. Были найдены как соединения с одинаковыми углеводными цепями и различными агликонами, так и соединения с одинаковыми агликонами и олигосахаридными цепями разной длины. Во всех исследованных видах найдены нативные агликоны астеросапонинов. В морских звездах *A. japonica* и *L. fusca* найдены «укороченные» астеросапонины. Увеличение числа идентифицированных метаболитов с помощью использования метода наноВЭЖХ-МС/МС для исследования *L. fusca* позволило

обнаружить, помимо «укороченных» астеросапонинов, триозиды, которые, вероятно, являются промежуточными продуктами биосинтеза астеросапонинов.

Все обнаруженные астеросапонины имеют одну и ту же архитектуру углеводных цепей с одинаковой последовательностью β -1,3, β -1,4 и β -1,2 гликозидных связей в линейной части углеводных цепей и β -1,2-связи в разветвлении у второго моносахарида. Все гексаозиды, обнаруженные в *A. japonica* и *L. fusca*, имеют олигосахаридные цепи с одним разветвлением в пентасахаридной линейной цепи. В *P. pectinifera* найдены гексаозиды как с одним, так и с двумя разветвлениями в углеводной цепи.

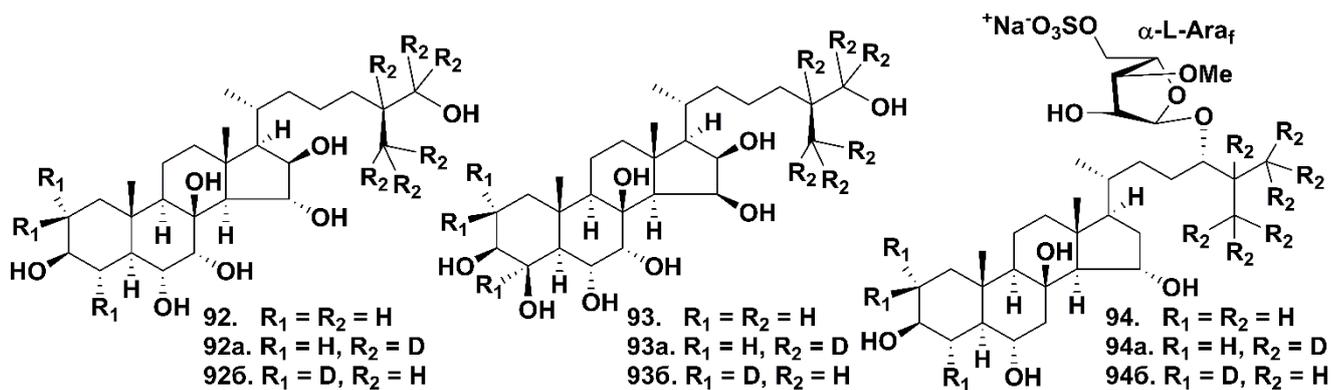
В *A. japonica* и *P. pectinifera* первым от агликона моносахаридным остатком всегда является хиновоза или продукты ее дополнительного окисления и/или модификации. В *L. fusca* найден ряд астеросапонинов с гексозой в качестве первого моносахаридного звена.

В целом, можно отметить, что применение метаболомного подхода, дающего возможность получить структурные характеристики для больших серий метаболитов конкретного структурного класса, открывает возможности выявления закономерностей биогенетических трансформаций метаболитов в организмах-продуцентах и построения гипотетических путей биосинтеза исследуемых соединений.

3.3 Исследования биосинтеза полярных стероидов в морской звезде *Patiria pectinifera* с помощью экспериментов по кормлению морских звезд мечеными предшественниками

Как было сказано ранее, одним из путей изучения биосинтеза природных соединений является использование меченых предшественников, которые вводятся в гомогенаты тканей или в организм животного-продуцента с целью оценки их биогенетических трансформаций. Нами были впервые экспериментально исследованы возможные пути биосинтеза полигидроксистероидов и родственных гликозидов в морской звезде *P. pectinifera* (отряд Valvatida, семейство Asterinidae). С этой целью были проведены эксперименты по кормлению морских звезд с использованием меченых стабильными изотопами предшественников: $[1-^{13}\text{C}]$ ацетата натрия, $[1-^{13}\text{C}]D$ -глюкозы, $[25,26,26,26,27,27,27-^2\text{H}_7]$ холестерина и 3-*O*-сульфата $[2,2,3,4,4,6-^2\text{H}_6]$ холестерина. Использовались коммерческие реагенты, при этом 3-*O*-сульфат $[2,2,3,4,4,6-^2\text{H}_6]$ холестерина был синтезирован нами из соответствующего $[2,2,3,4,4,6-^2\text{H}_6]$ холестерина. Были выделены и проанализированы фракции свободных стероидов и астеросапонинов и индивидуальные соединения **92**, **93** и **94** из органов пищеварения и гонад *P. pectinifera*. Данные о включении изотопов и их положении в этих стероидах были получены с помощью ГЖХ-МС, ИЭР МС и ИЭР МС/МС масс-спектрометрии, а также ЯМР спектроскопии.

Эксперименты по кормлению животных мечеными предшественниками проводили на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН. Пять групп морских звезд (по 5 экземпляров в каждой группе) были помещены в аквариумы и выдерживались без пищи в течение 7-ми дней. Затем морских звезд кормили в течение 5-ти дней (одна контрольная порция без меченых соединений и четыре порции с мечеными предшественниками), а затем снова 14 дней выдерживали без пищи. Для приготовления каждой порции пищи смешивались альгиновая кислота, сушеный измельченный кальмар и отмытый морской песок. Меченое соединение добавлялось в эту смесь. Затем к полученной смеси добавлялась дист. H_2O , все тщательно перемешивалось, помещалось в 5-ти мл шприц и выдавливалось в 10 мл 0.25 М раствора хлорида кальция, где застывало в течение 2 мин. Полученные в результате спагетти-образные нити разрезали на куски длиной в 10 мм. Контрольная порция пищи готовилась подобным образом без добавления меченых предшественников. В каждой группе звезд для дальнейшего изучения были взяты отдельно пищеварительные органы (желудок и пилорические выросты) и гонады, которые экстрагировали EtOH при комнатной температуре. Этанольные супернатанты экстрагировали бензолом. Бензольные слои отделяли, концентрировали в вакууме и получали фракции, содержащие суммы свободных стероидов. Водно-этанольные слои концентрировали в вакууме и получали фракции, содержащие суммы полярных стероидов. Необходимо отметить, что включения метки в целевые соединения при кормлении $[1-^{13}\text{C}]$ ацетатом натрия и $[1-^{13}\text{C}]D$ -глюкозой не наблюдалось.



С помощью ГЖХ-МС анализа фракций ацетатов стеринов, полученных после экспериментов по кормлению морских звезд, был определен их состав, который был практически идентичен составу стериновых фракций из различных органов *P. pectinifera*, описанному нами ранее. Все идентифицированные стерины относились к Δ^7 -стеринам. Основным компонентом во всех фракциях был латостерин (5α -холест-7-ен- 3β -ол) (ОВУ=1.08; молекулярный ион в ЭУ масс-спектре ацетата с m/z 428 $[M]^+$), содержание которого составляло 33.5–38.7% от общей суммы фракций стеринов в гонадах и 48.1–56.5% во фракциях стеринов из пищеварительных органов. Включение стабильных изотопов из меченых предшественников в свободные стерины определялось с помощью ГЖХ-МС их ацетатов.

Сравнительный анализ контрольной стериновой фракции и фракции, полученной из пищеварительных органов *P. pectinifera* после кормления меченым по боковой цепи $[25,26,26,26,27,27,27\text{-}^2H_7]$ холестерином, показал присутствие дополнительного пика ацетата стерина с ОВУ=1.07, содержание которого составляло около 1.6% от общего состава фракции. В ЭУ масс-спектре этого ацетата D_7 -меченого 5α -холест-7-ен- 3β -ола присутствовал пик $[M + 7]^+$ с m/z 435, что указывало на включение 7-ми атомов дейтерия в боковую цепь молекулы. Действительно, фрагментные пики, такие как с m/z 420 $[M - CH_3]^+$ и 360 $[M - AcOH]^+$, соответствующие фрагментам, содержащим боковую цепь, были сдвинуты на 7 а.е.м. по сравнению с соответствующими пиками в масс-спектре латостерина (m/z 413 $[M - CH_3]^+$ и 353 $[M - AcOH]^+$). Напротив, пики ионов, образованные в результате потери фрагментов боковой цепи (m/z 315, 255, 229 и 213), были идентичны соответствующим пикам в масс-спектре недеийтерированного латостерина. Эти данные указывают на трансформацию полученного с пищей холестерина в латостерин в морских звездах.

Для изучения биосинтеза полигидроксистероидов и родственных им низкомолекулярных стероидных гликозидов нами были выделены соединения **92**, **93** и **94** из пищеварительных органов животных и проанализированы их спектральные данные. На основании данных ЯМР и ИЭР МС известные соединения идентифицированы как (25*S*)- 5α -холестан- $3\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\alpha,16\beta,26$ -гептаол (**92**), (25*S*)- 5α -холестан- $3\beta,4\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\beta,16\beta,26$ -октаол (**93**) и сульфатированный монозид астеросапонин P_1 (**94**). Анализ данных 2D ЯМР спектров (1H - 1H COSY и HSQC) позволил сделать отнесения всех сигналов H- и C-атомов в спектрах молекул.

(–)-ИЭР масс-спектр соединения **92**, полученного из пищеварительных органов *P. pectinifera* после кормления меченым $[25,26,26,26,27,27,27\text{-}^2H_7]$ холестерином, содержал, помимо основного пика с m/z 483 $[M - H]^-$, дополнительный пик депротонированной молекулы с m/z 489 $[(M - H) + 6]^-$ соединения **92a**. В ВР (–)-ИЭР масс-спектре **92a** наблюдался пик с m/z 489.3711 $[M - H]^-$ (рассчит. для $C_{27}H_{41}D_6O_7$, 489.3704), что указывало на включение шести атомов дейтерия в молекулу. (–)-ИЭР МС/МС спектр иона $[(M - H) + 6]^-$ с m/z 489 в **92a** показал пики фрагментных ионов, соответствующие потере одной, двух, трех и четырех молекул H_2O с m/z 471 $[(M - H) + 6 - H_2O]^-$, 453 $[(M - H) + 6 - 2H_2O]^-$, 435 $[(M - H) + 6 - 3H_2O]^-$ и 417 $[(M - H) + 6 - 4H_2O]^-$ соответственно. Эти данные подтвердили, что **92a** является D_6 -меченым (25*S*)- 5α -холестан- $3\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\alpha,16\beta,26$ -гептаолом, который образуется из полученного с пищей D_7 -холестерина с потерей одного атома дейтерия из-за окисления положения C-26.

Места включения атомов дейтерия в молекулу **92a** были установлены с помощью ЯМР спектроскопии. В ЯМР ^2H спектре гептаола **92**, содержащего его дейтерированный аналог **92a**, наблюдались сигналы, относящиеся к $^2\text{H}_3$ -27 (1.02 м.д.), ^2H -25 (1.78 м.д.), ^2H -26 (3.59 м.д.) и $^2\text{H}'$ -26 (3.72 м.д.) соединения **92a**. Отнесения этих сигналов были сделаны на основании сравнения этого спектра с ЯМР ^1H спектром **92**. Таким образом, нами было установлено, что полученный с пищей $[25,26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_7]$ холестерин трансформируется в $[25,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6](25S)\text{-}5\alpha\text{-холестан-}3\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\alpha,16\beta,26\text{-гептаол}$ (**92a**) в пищеварительных органах морской звезды *P. pectinifera*.

(+)-ИЭР масс-спектр гептаола **92**, полученного из пищеварительных органов *P. pectinifera* после кормления меченым 3-*O*-сульфатом $[2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6]$ холестерина, содержал дополнительный катионизированный молекулярный пик с m/z 510 $[(M + Na) + 3]^+$ вместе с основным пиком катионизированной молекулы с m/z 507 $[M + Na]^+$. Аналогично дополнительный пик $[(M - H) + 3]^-$ с m/z 486 вместе с основным пиком депротонированной молекулы с m/z 483 $[M - H]^-$ наблюдался в (-)-ИЭР масс-спектре, что указывало на присутствие тридейтерированного соединения **92b** в этой фракции. ВР (-)-ИЭР масс-спектр **92b** содержал пик депротонированной молекулы с m/z 486.3517 $[M - H]^-$ (рассчит. для $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{D}_3\text{O}_7$, 486.3516), что подтверждало включение трех атомов дейтерия в молекулу. (-)-ИЭР МС/МС спектр иона $[(M - H) + 3]^-$ с m/z 486 соединения **92b** показал пики фрагментных ионов, соответствующие потере одной, двух, трех и четырех молекул H_2O с m/z 468 $[(M - H) + 3 - \text{H}_2\text{O}]^-$, 450 $[(M - H) + 3 - 2\text{H}_2\text{O}]^-$, 432 $[(M - H) + 3 - 3\text{H}_2\text{O}]^-$ и 414 $[(M - H) + 3 - 4\text{H}_2\text{O}]^-$ соответственно. Все эти данные подтверждали, что **92b** является D_3 -меченым (25*S*)-5 α -холестан-3 $\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\alpha,16\beta,26$ -гептаолом, биосинтезированным из полученного с пищей сульфата D_6 -холестерина с потерей трех атомов дейтерия в процессе введения гидроксильной группы в положение С-6.

Места включения атомов дейтерия в молекулу **92b** были установлены с помощью ЯМР спектроскопии. ЯМР ^2H спектр соединения **92**, содержащего его дейтерированный аналог **92b**, показал сигналы, относящиеся к ^2H -2 (~1.90 м.д.), $^2\text{H}'$ -2 (~2.09 м.д.) и ^2H -4 α (2.97 м.д.) соединения **92b**. Таким образом, нами установлено, что полученный с пищей 3-*O*-сульфат $[2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6]$ холестерина трансформируется в $[2,2,4\text{-}^2\text{H}_3](25S)\text{-}5\alpha\text{-холестан-}3\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\alpha,16\beta,26\text{-гептаол}$ (**92b**) в пищеварительных органах морской звезды *P. pectinifera*.

Аналогично с помощью ИЭР МС и ЯМР ^2H спектров установлено, что пищевые холестерин и сульфат холестерина трансформируются в стероидный октаол **93** с получением соответствующих дейтерированных аналогов **93a** и **93b**. Для астеросапонина P_1 (**94**) данные ИЭР МС и ЯМР ^2H также показали включения атомов дейтерия, но в случае кормления $[25,26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_7]$ холестерином было обнаружено соединение **94a**, имеющее семь атомов дейтерия. Эти данные подтвердили, что **94a** является D_7 -меченым астеросапоном P_1 , который образуется из полученного с пищей D_7 -холестерина с сохранением всех атомов дейтерия, поскольку в астеросапонине P_1 не происходит окисления по положению, содержащему атомы дейтерия.

Потеря атома дейтерия из положения С-3 в соединениях **92–94** подтверждает, что биосинтез полярных стероидов идет через образование 3-кето производных, а потеря одного атома дейтерия из положения С-4 указывает на то, что 4,5-ненасыщенный 3-кетон должен быть промежуточным продуктом в биосинтетических путях, приводящих к введению гидроксильной группы в положение С-6. На основании полученных данных мы предложили схему начальных стадий биосинтеза А,В-кольцевых фрагментов полярных стероидов морской звезды *P. pectinifera*, протекающих в процессе биосинтеза этих соединений из пищевых холестерина и сульфата холестерина (рис. 2).

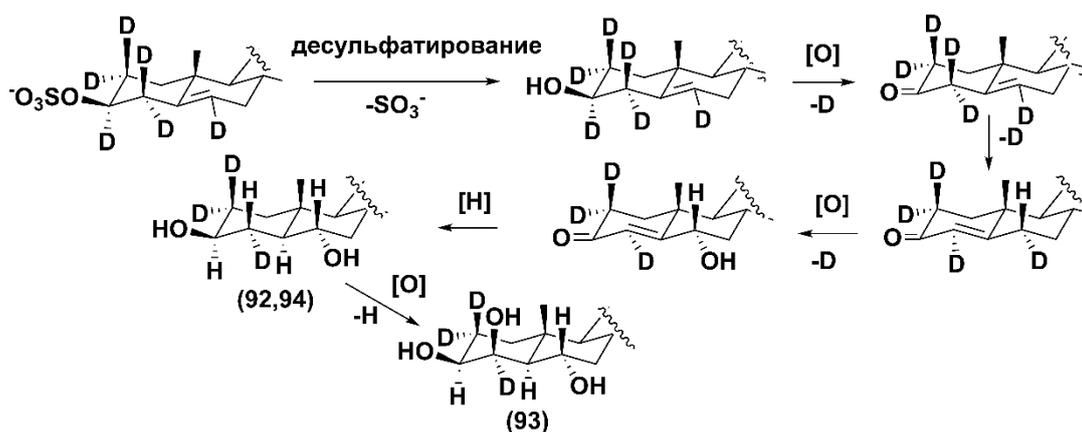


Рисунок 2 – Схема путей биосинтеза фрагментов А,В-колец в [2,2,4-²H₃]меченых полярных стероидах **926**, **936** и **946**, полученных при кормлении животных 3-*O*-сульфатом [2,2,3,4,4,6-²H₆]холестерина

Обобщая вышесказанное, можно отметить, что мы экспериментально изучили биосинтез свободных стеринов и полярных стероидных соединений морских звезд с помощью экспериментов с мечеными стабильными изотопами потенциальными предшественниками (ацетатом натрия, глюкозой, холестерином и сульфатом холестерина). При этом мы установили, что полигидроксистероиды и родственные им низкомолекулярные стероидные гликозиды биосинтезируются из полученных с пищей холестерина и сульфата холестерина. На основании данных о местах включения атомов дейтерия в биосинтетические продукты было определено, что трансформации в кольцах А и В включают окисление в соответствующие 3-кетопроизводные и образование 4(5)-ненасыщенных кетонов как биосинтетических интермедиатов. Кроме того, нами было экспериментально показано, что полученный с пищей холестерин в морских звездах трансформируется в латостерин. Биосинтез астеросапонинов из использованных предшественников также как *de novo* биосинтез полярных стероидов не был обнаружен.

ВЫВОДЫ

1. Исследован состав полярных стероидов 18-ти видов морских звезд, собранных в различных районах Мирового океана, большинство из них было изучено впервые. В результате в индивидуальном виде выделены 196 соединений, принадлежащих к различным структурным группам, включая полигидроксилированные стероиды и их гликозиды, астеросапонины и циклические гликозиды, установлены полные химические структуры 90 новых метаболитов.

2. Найлены новые полигидроксистероиды с редкими и уникальными структурными фрагментами. Так, впервые описаны стероиды с 23,24- и 24,25-дигидроксихолестановыми, (23*E*)-27-*нор*-25-оксохолест-23-еновой, (22*E*)-24-*нор*-26-сульфооксихолест-22-еновой и 24-метил-28-сульфооксихолестановой боковыми цепями. Выделены стероиды с редким 5β-холестановым скелетом, новые полигидроксилированные стероидные конъюгаты с таурином и дисульфатированные стероиды «офиурного» типа, один из которых имеет ранее неописанную Δ²⁴-22-сульфооксихолестановую боковую цепь.

3. Описан ряд новых гликозидов полигидроксистероидов, включая редкие триозиды, гликозиды с (1→5) связями между моносахаридными остатками, впервые найденные в морских звездах гликозиды с неокисленным атомом С-6, а также гликозид с редкой 4,5-эпоксигруппой. Найден уникальный гранулатозид С, имеющий ряд структурных особенностей, не характерных для морских звезд, но типичных для представителей других классов морских беспозвоночных.

4. Исследование астеросапонинов ряда морских звезд привело к выделению соединений с ранее не описанными агликонами, такими как агликоны с 22,23-эпокси-20-гидроксистигмастановой боковой цепью и 16β-гидроксильной группой. Найлены астеросапонины, имеющие углеводные цепи, ранее не встречавшиеся в гликозидах этого структурного класса, как, например, астеросапонины с олигосахаридной цепью, состоящей

только из остатков б-дезоксигексоз, и гексасахаридной цепью с редким терминальным остатком β-D-ксилопиранозы.

5. Из морской звезды *Echinaster luzonicus* выделено 4 новых циклических гликозида, один из них, впервые найденный в стероидах морского происхождения, имеет уникальный 7α-гидрокси-8α,9α-эпоксифрагмент в стероидном ядре. Был обнаружен родственный гликозид с открытой углеводной цепью. Обнаружение циклического гликозида, лузониозида А, в морской звезде *Leiaster* sp. позволило сделать вывод о том, что таксономическое распределение циклических гликозидов не ограничивается только морскими звездами рода *Echinaster*.

6. Впервые для ряда выделенных полярных стероидов были исследованы гемолитическая, эмбриотоксическая, цитотоксическая, противоопухолевая, иммуномодулирующая, нейритогенная и нейропротекторная активности. Некоторые из этих стероидов эффективно ингибировали рост колоний опухолевых клеток в нецитотоксических концентрациях. Были выявлены соединения, являющиеся перспективными иммуномодулирующими агентами. Установлено, что нейротрофиноподобная нейритогенная и нейропротекторная активности являются общими свойствами полигидроксистероидов и родственных гликозидов морских звезд, при этом величина проявляемых ими эффектов зависит от структурных особенностей исследованных соединений.

7. Анализ структур исследованных полярных стероидных соединений морских звезд позволил предложить схему гипотетических путей процессов окисления (введения гидроксильных групп) при биосинтезе полигидроксистероидов, а также выяснить основные структурные закономерности построения стероидных гликозидов, включая гликозиды полигидроксистероидов и астеросапонины. Полученные данные были использованы при анализе метаболомных профилей полярных стероидов морских звезд методом ВЭЖХ-МС для структурной идентификации соединений.

8. С помощью метаболомного профилирования были получены новые данные о возможных путях биосинтеза полигидроксилированных стероидов дальневосточных морских звезд *Aphelasterias japonica*, *Patiria pectinifera* и *Lethasterias fusca*. Установлены преимущественные места окисления в полигидроксистероидах этих видов морских звезд и различия в моносахаридных составах их гликозидов. Обнаружены различия в составах скелетных систем полярных стероидов *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca*, предположено, что они связаны с различными типами питания этих видов морских звезд. Высказано предположение, что сульфатирование во многих случаях является терминальной стадией в процессах биосинтеза полигидроксилированных соединений морских звезд.

9. Использование метаболомного подхода позволило получить данные о возможных путях биосинтеза астеросапонинов дальневосточных морских звезд *Aphelasterias japonica*, *Patiria pectinifera* и *Lethasterias fusca*. Показано, что эти олигогликозиды являются продуктами смешанного биосинтеза т.н. «мозаичного» типа, при их биогенезе реализуются как путь последовательного наращивания олигосахаридных цепей при уже сформированных агликонах, так и путь трансформации агликонов при уже сформированной углеводной цепи. Во всех исследованных морских звездах найдены также астеросапонины, которые биосинтезируются путем дополнительного окисления и трансформации первого от агликона моносахаридного остатка.

10. Впервые экспериментально установлено, что полученные с пищей холестерин и сульфат холестерина являются биосинтетическими предшественниками полигидроксистероидов и родственных им низкомолекулярных стероидных гликозидов морских звезд. В результате экспериментов с дальневосточной морской звездой *Patiria pectinifera* показано, что эти полученные с пищей меченные дейтерием предшественники трансформируются в частично дейтерированные 5α-холестан-3β,6α,7α,8,15α,16β,26-гептаол, 5α-холестан-3β,4β,6α,7α,8,15β,16β,26-октаол и стероидный монозид астеросапонин Р₁. Была предложена схема начальной стадии биосинтеза полярных стероидов в этой морской звезде. Кроме того, было показано, что меченый холестерин трансформируется также в латостерин (5α-холест-7-ен-3β-ол) в органах пищеварения и гонадах *P. pectinifera*.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Иванчина Н.В.**, Маляренко Т.В., Кича А.А., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. Астеросапонин офидианозид F из гонад дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica* // Химия природ. соедин. 2005. № 4. С. 392–393. doi: 10.1007/s10600-005-0187-7.
2. Кича А.А., **Иванчина Н.В.**, Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Стоник В.А. Структура новых полярных стероидов из дальневосточной морской звезды *Stenodiscus crispatus* // Изв. АН, Сер. хим. 2005. № 5. С. 1229–1234. doi: 10.1007/s11172-005-0392-3.
3. **Иванчина Н.В.**, Маляренко Т.В., Кича А.А., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Молло Э. Полярные стероидные соединения из антарктической морской звезды *Diplasterias brucei* // Химия природ. соедин. 2006. № 5. С. 502–503. doi: 10.1007/s10600-006-0235-y.
4. **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Dmitrenok A.S., Chaikina E.L., Stonik V.A., Gavagnin M., Cimino G. Polar steroidal compounds from the Far Eastern starfish *Henricia leviuscula* // J. Nat. Prod. 2006. V. 69, N 2. P. 224–228. doi: 10.1021/np050373j.
5. Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Palyanova N.V., Pankova T.M., Starostina M.V., Gavagnin M., Stonik V.A. New neuritogenic steroid glycosides from the Vietnamese starfish *Linckia laevigata* // Nat. Prod. Commun. 2007. V. 2, N 1. P. 41–46. doi: 10.1177/1934578X0700200108.
6. Кича А.А., **Иванчина Н.В.**, Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Соколова Е.В., Агафонова И.Г. Сульфатированные стероидные гликозиды из вьетнамской морской звезды *Linckia laevigata* // Химия природ. соедин. 2007. № 1. С. 64–67. doi: 10.1007/s10600-007-0036-y.
7. Кича А.А., **Иванчина Н.В.**, Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Соколова Е.В., Агафонова И.Г., Стоник В.А. Четыре новых стероидных гликозида из вьетнамской морской звезды *Linckia laevigata* // Изв. АН. Сер. хим. 2007. № 4. С. 792–799. doi: 10.1007/s11172-007-0123-z.
8. **Иванчина Н.В.**, Маляренко Т.В., Кича А.А., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. Полярные стероидные соединения из дальневосточной морской звезды *Lethasterias fusca* // Изв. АН. Сер. хим. 2008. № 1. С. 196–200. doi: 10.1007/s11172-008-0030-y.
9. Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Agafonova I.G., Stonik V.A. Steroidal triglycosides, kurilensosides A, D, and C, and other polar steroids from the Far Eastern starfish *Hippasteria kurilensis* // J. Nat. Prod. 2008. V. 71, N 5. P. 793–798. doi: 10.1021/np070637x.
10. Кича А.А., Капустина И.И., **Иванчина Н.В.**, Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Стоник В.А., Пальянова Н.В., Панкова Т.М., Старостина М.В. Полигидроксилированные стероидные соединения из дальневосточной морской звезды *Distolasterias nipon* // Биоорг. химия. 2008. Т. 34, № 1. С. 129–135. doi: 10.1134/s1068162008010160.
11. Stonik V.A., **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A. New polar steroids from starfish // Nat. Prod. Commun. 2008. V. 3, N 10. P. 1587–1610. doi: 10.1177/1934578X0800301005.
12. Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Steroidal monoglycosides from the Far Eastern starfish *Hippasteria kurilensis* and hypothetical pathways of polyhydroxysteroid biosynthesis in starfish // Steroids. 2009. V. 74, N 2. P. 238–244. doi: 10.1016/j.steroids.2008.11.007.
13. Кича А.А., **Иванчина Н.В.**, Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Смирнов А.В. Два новых стероидных гликозида из дальневосточной морской звезды *Hippasteria kurilensis* // Биоорг. химия. 2009. Т. 35, № 4. С. 557–562. doi: 10.1134/s106816200904013x.
14. **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Huong T.T.T., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Agafonova I.G., Long P.Q., Stonik V.A. Highly hydroxylated steroids of the starfish *Archaster typicus* from the Vietnamese waters // Steroids. 2010. V. 75, N 12. P. 897–904. doi: 10.1016/j.steroids.2010.05.012.
15. Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Huong T.T.T., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Long P.Q., Fedorov S.N., Dyshlovoy S.A., Stonik V.A. Two new asterosaponins, archasterosides A and B, from the Vietnamese starfish *Archaster typicus* and their anticancer properties // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20, N 12. P. 3826–3830. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.04.005.
16. Кича А.А., **Иванчина Н.В.**, Хьюнг Т.Т.Т., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Лонг Ф.К. Минорный астеросапонин архастерозид С из морской звезды *Archaster typicus* // Изв. АН. Сер. хим. 2010. № 11. С. 2079–2082. doi: 10.1007/s11172-010-0368-9.

17. **Иванчина Н.В.**, Маляренко Т.В., Кича А.А., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Ермакова С.П. Два новых астеросапонина из антарктической морской звезды *Diplasterias brucei*. Структуры и цитотоксические активности // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37, № 4. С. 559–566. doi: 10.1134/s1068162011030083.
18. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., **Ivanchina N.V.**, Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. Four new asterosaponins, hippasteriosides A, B, C, and D, from the Far Eastern starfish *Hippasteria kurilensis* // Chem. Biodivers. 2011. V. 8, N 1. P. 166–175. doi: 10.1002/cbdv.200900402.
19. **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Stonik V.A. Steroid glycosides from marine organisms // Steroids. 2011. V. 76, N 5. P. 425–454. doi: 10.1016/j.steroids.2010.12.011.
20. **Ivanchina N.V.**, Kalinovsky A.I., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. Two new asterosaponins from the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* // Nat. Prod. Commun. 2012. V. 7, N 7. P. 853–858. doi: 10.1177/1934578X1200700711.
21. Кича А.А., **Иванчина Н.В.**, Маляренко Т.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. Фишерииозид А – новый стероидный гликозид из морской звезды *Leptasterias fisheri* // Химия природ. соедин. 2012. № 5. С. 719–721. doi: 10.1007/s10600-012-0388-9.
22. Попов Р.С., **Иванчина Н.В.**, Кича А.А., Маляренко Т.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. Минорные стероидные гликозиды из дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica* // Химия природ. соедин. 2013. № 2. С. 243–247. doi: 10.1007/s10600-013-0583-3.
23. **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Biosynthesis of polar steroids from the Far Eastern starfish *Patiria (=Asterina) pectinifera*. Cholesterol and cholesterol sulfate are converted into polyhydroxylated sterols and monoglycoside asterosaponin P₁ in feeding experiments // Steroids. 2013. V. 78, N 12–13. P. 1183–1191. doi: 10.1016/j.steroids.2013.08.008.
24. Palyanova N.V., Pankova T.M., Starostina M.V., Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Stonik V.A. Neuritogenic and neuroprotective effects of polar steroids from the far east starfishes *Patiria pectinifera* and *Distolasterias nipon* // Mar. Drugs. 2013. V. 11, N 5. P. 1440–1455. doi: 10.3390/md11051440.
25. Popov R.S., **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Metabolite profiling of polar steroid constituents in the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* using LC–ESI MS/MS // Metabolomics. 2014. V. 10, N 6. P. 1152–1168. doi: 10.1007/s11306-014-0654-x.
26. **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Menchinskaya E.S., Pislyagin E.A., Dmitrenok P.S. The influence on LPS-induced ROS formation in macrophages of capelloside A, a new steroid glycoside from the starfish *Ogmaster capella* // Nat. Prod. Commun. 2015. V. 10, N 11. P. 1937–1940. doi: 10.1177/1934578X1501001133.
27. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Malyarenko T.V., **Ivanchina N.V.**, Dmitrenok P.S., Menchinskaya E.S., Yurchenko E.A., Pislyagin E.A., Aminin D.L., Huong T.T.T., Long P.Q., Stonik V.A. Cyclic steroid glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: structures and immunomodulatory activities // J. Nat. Prod. 2015. V. 78, N 6. P. 1397–1405. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00332.
28. Popov R.S., **Ivanchina N.V.**, Kalinovsky A.I., Kharchenko S.D., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Ermakova S.P., Dmitrenok P.S. Aphelasteroside F, a new asterosaponin from the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11, N 9. P. 1247–1250. doi: 10.1177/1934578X1601100913.
29. Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Pislyagin E.A., Yurchenko E.A. Regulosides A, B, and C, three new polyhydroxysteroid glycosides from the starfish *Pentaceraster regulus* // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11, N 9. P. 1243–1246. doi: 10.1177/1934578X1601100912.
30. Malyarenko T.V., Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Unusual steroid constituents from the tropical starfish *Leiaster* sp. // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11, N 9. P. 1251–1252. doi: 10.1177/1934578X1601100914.
31. Popov R.S., **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. LC-ESI MS/MS profiling of polar steroid metabolites of the Far Eastern starfish *Patiria (=Asterina) pectinifera* // Metabolomics. 2016. V. 12, N 2. Art. 21[1–18]. doi: 10.1007/s11306-015-0939-8.
32. **Ivanchina N.V.**, Malyarenko T.V., Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. A new steroidal glycoside granulatoside C from the starfish *Choriaster granulatus*, unexpectedly

- combining structural features of polar steroids from several different marine invertebrate phyla // Nat. Prod. Commun. 2017. V. 12, N 10. P. 1585–1588. doi: 10.1177/1934578X1701201015.
33. Кича А.А., **Иванчина Н.В.**, Маляренко Т.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. Сульфатированные стероидные гликозиды, регулосиды S1 и S2, из тропической морской звезды *Pentaceraster regulus* // Химия природ. соедин. 2017. № 1. С. 75–79. doi: 10.1007/s10600-017-1917-3.
34. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., **Ivanchina N.V.**, Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Kuzmich A.S., Sokolova E.V., Stonik V.A. Furostane series asterosaponins and other unusual steroid oligoglycosides from the tropical starfish *Pentaceraster regulus* // J. Nat. Prod. 2017. V. 80, N 10. P. 2761–2770. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00574.
35. **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Malyarenko T.V., Ermolaeva S.D., Yurchenko E.A., Pislyagin E.A., Van Minh C., Dmitrenok P.S. Granulosides D, E and other polar steroid compounds from the starfish *Choriaster granulatus*. Their immunomodulatory activity and cytotoxicity // Nat. Prod. Res. 2018. V. 33, N 18. P. 2623–2630. doi: 10.1080/14786419.2018.1463223.
36. Kicha A.A., **Ivanchina N.V.**, Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Popov R.S., Stonik V.A. Six new polyhydroxylated steroids conjugated with taurine, microdiscusols A-F, from the Arctic starfish *Asterias microdiscus* // Steroids. 2019. V. 150. Art. 108458. doi: 10.1016/j.steroids.2019.108458.
37. Popov R.S., **Ivanchina N.V.**, Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S. Structural characterization of polar steroid compounds of the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* by nanoflow liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2019. V. 30, N 5. P. 743–764. doi: 10.1007/s13361-019-02136-3.
38. **Иванчина Н.В.**, Кича А.А., Маляренко Т.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Стоник В.А. Исследования полярных стероидов морских звезд: структуры, биологические активности, биологическая роль, биосинтез // Вестник ДВО РАН. 2019. № 5. С. 35–39. doi: 10.25808/08697698.2019.207.5.004.
39. Kicha A.A., Ha D.T., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Popov R.S., Malyarenko O.S., Thuy T.T.T., Long Ph.Q., Ha N.T.T., **Ivanchina N.V.** Unusual polyhydroxylated steroids from the starfish *Anthenoides laevigatus*, collected of the coastal waters of Vietnam // Molecules. 2020. V. 25, N 6. Art. N 1440[1–12]. doi: 10.3390/molecules25061440.
40. Stonik V.A., Kicha A.A., Malyarenko T.V., **Ivanchina N.V.** Asterosaponins: structures, taxonomic distribution, biogenesis and biological activities // Mar. Drugs. 2020. V. 18, N 12. Art. 584[1–30]. doi:10.3390/md18120584.
41. Kicha A.A., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Popov R.S., Malyarenko O.S., Ermakova S.P., **Ivanchina N.V.** Polar steroid compounds from the Arctic starfish *Asterias microdiscus* and their cytotoxic properties against normal and tumor cells *in vitro* // Nat. Prod. Res. 2021. V. 35, N 24. P. 5765–5772. doi: 10.1080/14786419.2020.1834551.
42. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Malyarenko T.V., Malyarenko O.S., Ermakova S.P., Popov R.S., Stonik V.A., **Ivanchina N.V.** Disulfated ophiuroid type steroids from the Far Eastern starfish *Pteraster marsippus* and their cytotoxic activity on the models of 2D and 3D cultures // Mar. Drugs. 2022. V. 20, N 3. Art. 164[1–18]. doi: 10.3390/md20030164.