

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Захаренко Виктор Михайлович

Исследование структуры и биологической активности сфинголипидов и других низкомолекулярных биорегуляторов морских звезд

1.4.9 Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Малярченко Тимофей Владимирович

г. Владивосток – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ.....	4
2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
2.1 Низкомолекулярные метаболиты морских звезд	12
2.2 Церамиды морских звезд	15
2.3 Цереброзиды морских звезд	16
2.4 Гликозиды полигидроксистероидов морских звезд	31
2.5 Биологическая активность сфинголипидов морских звезд	41
2.6 Биологическая активность гликозидов полигидроксистероидов морских звезд	43
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	48
3.1 Основные подходы к выделению и установлению строения сфинголипидов и гликозидов полигидроксистероидов морских звезд	48
3.2 Сфинголипиды из морской звезды <i>Leptasterias polaris acervata</i>	49
3.3 Сфинголипиды из морской звезды <i>Ceramaster patagonicus</i>	56
3.4 Стероидолипиды из морской звезды <i>C. patagonicus</i>	68
3.5 Гликозиды полигидроксистероидов из <i>C. patagonicus</i>	74
3.6 Биологическая активность сфинголипидов	84
3.6.1 Антимикробная активность и ингибирование фермента уреазы	84
3.6.2 Цитотоксическая и цитопротекторная активность сфинголипидов из <i>L. polaris acervata</i>	84
3.6.3 Цитотоксическая активность сфинголипидов из <i>C. patagonicus</i> в отношении нормальных и опухолевых клеток и их влияние на колониобразование и рост опухолевых клеток человека	87
3.7 Биологическая активность стероидолипидов из <i>C. patagonicus</i>	89
3.8 Биологическая активность гликозидов полигидроксистероидов из <i>C. patagonicus</i>	92
4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	97
4.1 Приборы и материалы	97
4.2 Сведения о морских звездах	98
4.3 Общие методы.....	98

4.4 Выделение и установление строения метаболитов морских звезд.....	99
4.4.1 Сфинголипиды из <i>L. polaris acervata</i>	99
4.4.2 Сфинголипиды и стероидолипиды из <i>C. patagonicus</i>	101
4.4.3 Гликозиды полигидроксистероидов из <i>C. patagonicus</i>	104
4.5 Определение биологической активности выделенных соединений.....	106
4.5.1 Реагенты	106
4.5.2 Культивирование клеток	107
4.5.3 Подготовка соединений	108
4.5.4 Исследования биологической активности	108
5 ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

В современных подходах к разработке лекарственных средств основную платформу представляют природные низкомолекулярные соединения и их полусинтетические аналоги. Выделение новых биомолекул происходит преимущественно из четырех основных источников: наземных растений и грибов, микроорганизмов и морских беспозвоночных животных. Морские звезды содержат большое количество низкомолекулярных метаболитов, включая сфинголипиды и гликозиды полигидроксистероидов, которые заметно отличаются от таковых в наземных организмах. Исследования последних лет установили важную роль сфинголипидов в различных нейровоспалительных процессах, включая те, которые развиваются при болезнях Альцгеймера и Паркинсона, в процессах онкогенеза и противоопухолевой терапии, а также в процессах иммунного ответа на различные инфекционные агенты. Все это свидетельствует о важном значении к изучению сфинголипидов, выяснения их физиологической роли и поиску новых биологически активных молекул.

Гликозиды полигидроксистероидов представляют собой один из наиболее характерных классов полярных вторичных метаболитов, обнаруживаемых в морских звездах, для которых присуще значительное структурное разнообразие и широкий спектр биологической активности. Однако, несмотря на высокий потенциал данных веществ, химическое строение и биологическая активность метаболитов многих видов морских звёзд остаются малоизученными и требуют дальнейшего исследования.

Выделение индивидуальных соединений с редкими структурными фрагментами, такими, как укороченные жирные кислоты, необычные сфингозиновые основания, агликоны и моносахаридные остатки, и оценка их цитотоксической, цитопротекторной, антипролиферативной и антиоксидантной активности являются важными задачами для расширения арсенала потенциальных лекарственных препаратов. Изучение метаболитов морских звезд *Leptasterias polaris acervata* и *Ceramaster patagonicus* представляет значительный научный и практический интерес для развития методов выделения и установления строения низкомолекулярных метаболитов, а также для выявления соединений с высоким фармакологическим потенциалом, что обуславливает актуальность данной работы.

Целью настоящей работы являлось выделение, изучение структуры и биологической активности некоторых низкомолекулярных метаболитов, в частности, сфинголипидов, стероидолипидов и гликозидов полигидроксистероидов морских звезд.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1) выделить индивидуальные соединения из 2-х видов морских звезд: *Leptasterias polaris acervata* и *Ceramaster patagonicus*;

2) установить строение новых соединений, включая определение абсолютной стереохимии асимметрических центров и принадлежности моносахаридных остатков гликозидов к *D*- или *L*-ряду;

3) идентифицировать структуры ранее известных соединений, найденных в изучаемых морских звездах;

4) для ряда выделенных соединений исследовать биологическую активность *in vitro* (цитотоксическую, цитропротекторную, антипролиферативную, противомикробную и антиоксидантную) с целью выявления соединений, обладающих фармакологическим потенциалом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Морские звезды *L. polaris acervata* и *C. patagonicus* являются богатым источником низкомолекулярных метаболитов: сфинголипидов, стероидлипидов и гликозидов полигидроксистероидов.
2. В морской звезде *L. polaris acervata* найдены 2 новых цереброзида – лептастериацереброзиды А и В, содержащие уникальные сочетания жирной кислоты и сфингозинового основания.
3. В составе *C. patagonicus* обнаружены 3 новых церамида и 3 новых цереброзида, которые содержат сочетания редких длинноцепочечных оснований и жирных кислот.
4. Из морской звезды *C. patagonicus* выделены 4 новых соединения, представляющих собой редкие конъюгаты полигидроксистероидов с жирными кислотами.
5. В морской звезде *C. patagonicus* найдены 4 новых гликозида полигидроксистероидов – церамастерозиды А, В, D и Е, содержащие редкие моносахаридные остатки.
6. Некоторые метаболиты морских звезд проявили цитотоксическую, цитопротекторную, антипролиферативную, антибактериальную и антиоксидантную активности *in vitro*.

Методология и методы исследования

В ходе работы был применен широкий набор химических и физико-химических методов выделения, очистки и исследования строения химических веществ, включая: экстракцию органическими растворителями для извлечения веществ из исследованных объектов, набор хроматографических методов (колоночная хроматография, ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ на аналитических и полупрепаративных колонках) для анализа смесей и выделения индивидуальных веществ, спектроскопию ЯМР, включая 1D и 2D эксперименты, масс-спектрометрию высокого разрешения (включая тандемную), ИК и УФ спектроскопию, поляризацию, гидролиз и

получение производных для установления полной химической структуры выделенных соединений. Также использовался комплекс методов исследования биологической активности выделенных соединений в условиях *in vitro*.

Научная новизна и практическая ценность работы. В ходе проведенной работы исследованы экстракты 2-х видов морских звезд, собранных в Охотском море и Беринговом проливе. Выделены 22 индивидуальных соединения (12 сфинголипидов, 4 стероидолипида, 6 гликозидов полигидроксистероидов) и хроматографически неразделимая смесь из 2-х соединений (церамиды). Для каждого соединения установлена полная химическая структура, в результате чего определено, что 16 соединений (8 сфинголипидов, 4 стероидолипида и 4 гликозида полигидроксистероидов) являются новыми.

Показано, что некоторые из выделенных соединений имеют структурные фрагменты, являющиеся редкими для низкомолекулярных метаболитов морских звезд. Так, например, в составе сфинголипидов обнаружены необычные укороченные (C₁₄, C₁₅) жирные кислоты, жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода (C₁₅, C₁₇), редкие сфингозиновые и фитосфингозиновые основания *изо*- и *антеизо*- типов. Установлено, что выделенные стероидолипиды представлены редкими конъюгатами полигидроксистероидов с длинноцепочечными жирными кислотами, ранее только однажды найденными в морских звездах. Кроме того, в структуре гликозидов полигидроксистероидов обнаружены необычные моносахаридные остатки, отличающиеся от типичных для данного класса соединений, что расширяет представления о структурном разнообразии углеводных фрагментов гликозидов морских звезд. Проведен ряд исследований биологической активности выделенных соединений. Показано, что некоторые вещества обладают цитотоксической, кардиопротекторной, антипролиферативной и антиоксидантной активностью.

Практическое значение данного исследования состоит в развитии методов выделения и установления строения низкомолекулярных метаболитов морских звезд. Новые данные о биологической активности выделенных соединений открывают перспективы их дальнейшего изучения в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на XXII Всероссийской молодёжной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 2025); на VI Всероссийской конференции по органической химии (ИОХ РАН, Москва, 2024); на Международной конференции по химии "Байкальские чтения-2023" (ИрИХ СО РАН, Иркутск, 2023); на XVIII Всероссийской молодёжной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 2021); на Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам (ДВФУ, Владивосток, 2021) и на 8-й ежегодной студенческой научной

конференции на английском языке (The 8th annual student scientific conference in English) (ДВФУ, Владивосток, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК (Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук, Journal of Natural Medicines, Marine Drugs), четыре из которых входят в базы данных Scopus и Web of Science. Также опубликована одна статья, индексируемая базой данных РИНЦ, и 6 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из Введения, Литературного обзора, посвященного исследованию церамидов, цереброзидов, гликозидов полигидроксистероидов морских звезд и их биологической активности, Обсуждения результатов, Экспериментальной части, Выводов и Списка цитируемой литературы. Работа изложена на **124** страницах, содержит 2 схемы, 11 таблиц и 18 рисунков. Список литературы включает 104 цитируемые работы.

Личный вклад автора: Работа выполнена в Лаборатории химии морских природных соединений ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Автором при поддержке научного руководителя были осуществлены планирование, дизайн и координирование экспериментов. Автором самостоятельно было выделено 18 индивидуальных соединений и хроматографически неразделимая смесь из 2-х соединений (церамиды). При непосредственном участии автора совместно с Котляровым И.П. было выделено 4 индивидуальных стероидолипида. Автором были проанализированы все полученные данные спектроскопии ЯМР (спектры получены д.х.н. Калиновским А.И., Лаборатория физико-химических методов исследований (ЛФХМИ ТИБОХ ДВО РАН)), масс-спектрометрии (спектры получены к.х.н. Поповым Р.С., чл.-корр. РАН Дмитренко П.С. (ЛФХМИ ТИБОХ ДВО РАН) и д.б.н. Светашевым В.И. (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ ДВО РАН)) и ИК спектроскопии (спектры получены автором и к.ф.-м.н. Глазуновым В.П.), а также проведены все необходимые химические превращения и установлены структуры выделенных веществ. Изучение биологической активности проводилось сотрудниками Лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН (к.х.н. Маляренко О.С.), Лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН (к.б.н. Чингизова Е.А. и к.б.н. Юрченко Е.А.), Лаборатории морской гликобиологии ТИБОХ ДВО РАН (н.с. Кузьмич А.С.) и Лаборатории фармакологии ННЦМБ ДВО РАН (к.б.н. Манжуло И.В., к.м.н. Пономаренко А.И.). Автором проведен поиск, обработка и анализ литературных данных, касающихся структур и биологической активности сфинголипидов и полигидроксистероидов морских звезд. 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 искреннюю благодарность своему научному руководителю к.х.н. Маляренко Т.В. Также автор благодарит д.х.н. Иванчину Н.В. и д.х.н. Кича А.А. за помощь в проведении экспериментов и написании работы, д.х.н. Калиновского А.И. за получение и помощь в интерпретации спектров ЯМР, к.х.н. Попова Р.С., чл.-корр. РАН Дмитренко П.С. и д.б.н. Светашева В.И. за получение и помощь в интерпретации масс-спектров, к.ф.-м.н. Глазунова В.П. за получение ИК спектров, академика Стоника В.А. за полезные научные консультации, к.х.н. Маляренко О.С., к.б.н. Чинигизову Е.А., к.б.н. Юрченко Е.А., к.б.н. Манжуло И.В. и к.м.н. Пономаренко А.И. за проведение экспериментов по определению биологической активности полученных веществ, Гребнева Б.Б. за видовое определение морских звезд.

Постоянно используемые сокращения:

Масс-спектрометрические методы:

ББА-МС – масс-спектрометрия с ионизацией методом бомбардировки быстрыми атомами;

ВР ИЭР-МС – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией методом электрораспыления;

ДИС – диссоциация, индуцируемая соударением;

ИЭ-МС – масс-спектрометрия с ионизацией электронами;

ИЭР-МС – масс-спектрометрия с ионизацией методом электрораспыления;

ИЭР-МС/МС – tandemная масс-спектрометрия с ионизацией методом электрораспыления;

Оптические спектральные методы:

ИК – инфракрасная спектроскопия;

НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение;

УФ – ультрафиолетовая спектроскопия;

Общие химические термины:

ДМОЗ – 4,4-диметилноксазолин (производные жирных кислот);

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДЦО – длинноцепочечное основание;

ЖК – жирная кислота;

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот;

ТФУ – трифторуксусная кислота;

ЭДЦ – эквивалентная длина цепи;

Хроматографические методы:

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография;

ГЖХ-ПИД – газо-жидкостная хроматография с пламенно-ионизационным детектором;

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса:

COSY – Correlation Spectroscopy – корреляционная спектроскопия;

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Connectivity – гетероядерная многополосная корреляция;

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Connectivity – гетероядерная одноквантовая корреляция;

ROESY – Rotation-frame Overhauser Effect Spectroscopy – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат;

TOCSY – Total Correlation Spectroscopy – тотальная корреляционная спектроскопия;

KCCB – константа спин-спинового взаимодействия;

м.д. – миллионная доля;

с – синглет, д – дублет, т – триплет, к – квартет, дд – дублет дублетов, дт – дублет триплетов, тд – триплет дублетов, уш. с – уширенный сигнал, секст – секстет, м – мультиплет;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

Биологические и биохимические термины:

BME – Basal Medium Eagle – базальная среда Игла;

DAF-FM – Diacetate (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate) – диацетат (4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеин диацетат);

DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindole – 4',6-диамидино-2-фенилиндол;

DHS – Donor Horse Serum – лошадиная сыворотка;

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – модифицированная среда Игла Дульбекко;

DMEM/F12 – модифицированная среда Игла Дульбекко/Ф-12;

ERK – Extracellular Signal-Regulated Kinase – экстрацеллюлярная сигналируемая киназа;

FBS – Fetal Bovine Serum – фетальная бычья сыворотка;

H2DCF-DA – 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate – 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат;

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase – митоген-активируемая протеинкиназа;

McCoy's 5A – модифицированная среда Маккоя;

MEK – MAPK/ERK Kinase – киназа митоген-активируемой протеинкиназы;
 MEM – Minimum Essential Medium Eagle – минимальная основная среда Игла;
 MSK – Mitogen- and Stress-activated protein Kinase – митоген- и стресс-активируемая протеинкиназа;
 MTS – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий;
 NF-κB – ядерный фактор каппа-би;
 PARP – Poly(ADP-ribose) polymerase – поли(АДФ-рибозо)полимераза;
 PBS – Phosphate-Buffered Saline – фосфатно-солевой буферный раствор;
 SRB – Sulforhodamine B – сульфородамин В;
 TMRE – Tetramethylrhodamine ethyl ester – этиловый эфир тетраметилродамина;
 TNF-α – фактор некроза опухоли альфа;
 АФК – активные формы кислорода;
 ИК₅₀ – полумаксимальная ингибирующая концентрация;
 ЛПС – липополисахарид;
 МДА – малоновый диальдегид;
 ММП – митохондриальный мембранный потенциал;
 МТТ – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид;

Клеточные культуры:

H9c2 – линия кардиомиоцитов крысы;
 HEK293 – линия эмбриональных клеток почек человека;
 HepG2 – линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека;
 HT-29 – линия клеток аденокарциномы толстого кишечника человека;
 HCT-116 – линия клеток аденокарциномы толстого кишечника человека;
 JB6 C141 / JB6 P+ C141 – линия эпидермальных клеток мыши;
 JB6-Luc NF-κB – трансфектанты JB6 с репортером люциферазы;
 KB – линия клеток эпидермоидной карциномы человека;
 LNCaP – линия клеток рака простаты человека;
 MCF7 – линия клеток рака молочной железы человека;
 MDA-MB-231 – линия клеток трижды негативного рака молочной железы человека;
 RPMI-7951 – линия клеток меланомы человека;
 S180 – линия клеток саркомы мыши;
 SIM-A9 – линия микроглиальных клеток мыши;

SK-MEL-2 – линия клеток меланомы человека;

SK-MEL-28 – линия клеток меланомы человека;

T-47D – линия клеток рака молочной железы человека.

2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2.1 Низкомолекулярные метаболиты морских звезд

Морские звезды содержат большое количество низкомолекулярных метаболитов, включая сфинголипиды и стероидные гликозиды. Исследования, проведенные в различных лабораториях мира, показали, что некоторые виды этих животных синтезируют разнообразные по химической структуре соединения, которые заметно отличаются от таковых в наземных организмах [1].

Работы по изучению структур и биологической активности сфинголипидов делятся уже на протяжении нескольких десятилетий. Исследования последних лет установили важную роль сфинголипидов в различных нейровоспалительных процессах [2], включая те, которые развиваются при болезни Альцгеймера [3, 4] и болезни Паркинсона [3, 5], в процессах онкогенеза [6, 7] и противоопухолевой терапии с использованием различных химиотерапевтических препаратов [8], а также в процессах иммунного ответа на различные инфекционные агенты, включая вирусы [9]. Все это свидетельствует о повышенном внимании к изучению сфинголипидов, выяснению их физиологической роли и поиску новых биологически активных молекул.

Так, например, мерицерамид В, новый цереброзид из гриба *Meripilus giganteus*, обладает антиоксидантной активностью благодаря эффективному связыванию свободных радикалов кислорода [10]. Портулацерброзиды В–С и керамид, портулацерамид А, обнаруженные в травянистом растении *Portulaca oleracea*, продемонстрировали значительное антибактериальное действие против распространенных энтеропатогенных бактерий *in vitro* [11]. Глюкоцереброзид, антроклайцереброзид, полученный из африканского дерева *Antrocaryon klaineianum*, продемонстрировал противопаразитарную активность в отношении *Plasmodium falciparum*, чувствительных к хлорохину (3D7) и устойчивых к хлорохину (Dd2) штаммов, а также промастигот *Leishmania donovani* [12]. Цереброзид, шекаоцеренозид А из травянистого растения *Hedyotis diffusa*, продемонстрировал умеренную цитотоксическую активность против восьми линий опухолевых клеток [13]. Было показано, что керамид kCer, полученный из суммы глюкоцереброзидов клубней растения *Amorphophallus konjac*, оказывает специфическое влияние на NGF-индуцированные нейриты, облегчая неконтролируемый и сильный зуд, особенно в случаях атопической экземы [14]. Кроме того, комплекс сфинголипидов из персиков *Prunus persica* продемонстрировал значительное защитное действие против фотостарения, уменьшая образование морщин на коже, утолщение эпидермиса и дермы и улучшая увлажнение кожи [15]. Эти результаты свидетельствуют о том, что сфинголипиды обладают заметным биофармацевтическим потенциалом. Сфинголипиды морских организмов также демонстрируют

значительное структурное разнообразие и обладают широким спектром биологической активности, включая антивирусное, противоопухолевое, иммуномодулирующее и нейритогенное действия [16, 17].

В традиционном понимании сфинголипиды, как и фосфолипиды, являются структурными компонентами биологических мембран. Ими особенно насыщены так называемые липидные рафты – наиболее плотные участки плазматической мембраны, которые служат местами крепления для различных рецепторных белков [18, 19]. Последующие научные исследования во второй половине XX века, особенно в области химии и физиологической активности липидов, привели к переоценке физиологической роли сфинголипидов в живых организмах, что значительно расширило понимание функций этих биомолекул. Было установлено, что сфинголипиды играют значимую роль в различных клеточных процессах, включая дифференцировку, миграцию, старение клеток, адгезию и апоптоз [18, 19]. Кроме того, эти соединения были идентифицированы как сигнальные молекулы в различных патологических явлениях. Было показано, что различные типы сфинголипидов оказывают отличающиеся друг от друга физиологические эффекты. Например, некоторые церамиды стимулируют пролиферацию клеток через повышение экспрессии церамидсинтазы-2, а сфингозин-1-фосфат вызывает воспалительную реакцию через повышение экспрессии сфингозинкиназы 1. Кроме того, сфингозин способствует дифференцировке клеток в кератиноцитах эпидермиса человека путем модуляции активности кислых и щелочных церамидаз [20].

Сфинголипиды представляют собой класс сложных липидов, отличающихся друг от друга сфингоидными основаниями (ДЦО, длинноцепочечное основание) или остатками жирных кислот (ЖК), которые обычно присоединяются к ДЦО через амидную связь. Помимо сфингоидных оснований и остатков ЖК, сфинголипиды могут иметь различные типы заместителей, включая остатки моно- или олигосахаридов, сульфатные и фосфатные группы, а также дополнительные метильные группы. В настоящее время выделяют четыре основных класса сфинголипидов (Рисунок 1): церамиды, состоящие только из сфингоидного основания, связанного с жирной кислотой; цереброзиды – церамиды, содержащие моно- или олигосахаридный остаток; ганглиозиды, представляющие собой цереброзиды с олигосахаридным остатком, включающим сиаловую кислоту или ее производные, и сфингомиелины, содержащие обычно фосфохолин или фосфоэтаноламин в качестве заместителя (рисунок 1) [21].

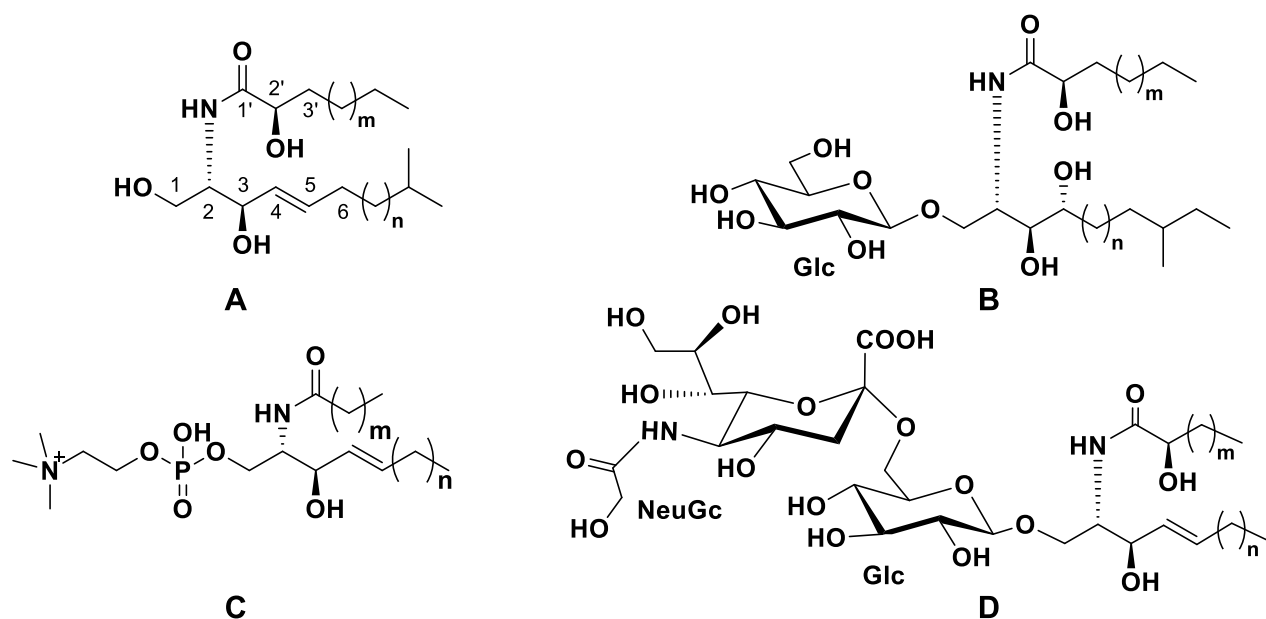


Рисунок 1 – Примеры химического строения различных классов сфинголипидов. Церамид с ДЦО сфингозинового вида, *изо*-типа (А), цереброзид с ДЦО фитосфингозинового вида, *антеизо*-типа (В), сфингомиелин с ДЦО сфингозинового вида, нормального типа (С) и ганглиозид с ДЦО сфингозинового вида, нормального типа (D)

Разнообразие химических структур сфинголипидов морских звезд зависит от ряда факторов: длины полиметиленовых цепей сфингоидного основания и жирных кислот, а также наличия или отсутствия гидроксильной группы или двойной связи в положении 4 сфингоидного основания. Жирные кислоты в сфинголипидах морских звезд могут содержать дополнительные гидроксильные группы в положениях 2, а также иметь одну или нескольких двойных связей. ω -Конец жирной кислоты и сфингоидного основания может быть нормального, *изо*- или *антеизо*-типа. Преобладающими моносахаридными остатками в сфинголипидах являются β -D-глюкопираноза (β -D-Glc_p) и β -D-галактопираноза (β -D-Gal_p). Важно отметить, что гликолипиды, включая цереброзиды, являются характерными компонентами липидного состава иглокожих, что было установлено ещё в ранних сравнительных исследованиях морских беспозвоночных [22].

Полярные стероидные соединения представляют собой один из основных классов вторичных метаболитов морских звезд. В эту группу входят полигидроксистероиды, их гликозиды (моно-, би- и тригликозиды), циклические гликозиды, а также астеросапонины – олигогликозиды, содержащие 3 β ,6 α -дигидроксистероидные фрагменты с 9(11)-двойной связью и *O*-сульфатной группой при C-3 агликона [23–31].

Химические структуры полигидроксистероидов характеризуются наличием от четырех до девяти гидроксильных групп. Они могут располагаться в стероидном ядре (в положениях 3 β , реже 3 α ; 6 α или β ; 8; 15 α или β ; 16 β ; а также реже в положениях 4 β , 5, 7 α или β , 14) и в боковых

цепях (в положениях 24 и 26 либо одновременно 25 и 26). Кроме того, гидроксильная группа может присоединяться к С-28 или С-29 эргостанового или стигмастанового скелета соответственно [23–30]. Для полигидроксистероидов морских звезд характерны сульфатированные формы, в которых сульфатная группа обычно локализована при С-3 (или С-15) стероидного ядра, либо при С-24 (или С-26) боковой цепи. В ряде случаев эти соединения и родственные гликозиды встречаются в виде конъюгатов с аминокислотами. Так, из арктической морской звезды *Asterias microdiscus* были выделены редкие полигидроксистероидные амиды, конъюгированные с таурином [32].

Биологическая активность полярных стероидов морских звезд охватывает широкий спектр физиологических эффектов. Сообщается об их цитотоксическом, противовирусном, антибактериальном, нейритогенном и противораковом действии. Кроме того, для данных соединений изучались гемолитическая, эмбриотоксическая, противогрибковая, противовоспалительная и иммуномодулирующая активности [23–30, 33].

Отдельные полигидроксилированные соединения обладают значительной цитотоксичностью. Например, цертонадостерин D2 проявил активность в отношении линий рака легких человека, меланомы, рака яичников, рака ЦНС и толстой кишки [34]. В то же время, (25S)-5 α -холестан-3 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β -гексаол-26-ил-14'Z-эйкозеноат не показал ингибирующей активности против вируса простого герпеса 1-го типа и клеток рака печени человека *in vitro* [35].

2.2 Церамиды морских звезд

Основные структурные характеристики приведенных ниже сфинголипидов внесены в сводную таблицу 1 под соответствующими им номерами.

Из морской звезды *Acanthaster planci* были выделены три новых церамида фитосфингозинового вида: АС-1-6 (1), АС-1-10 (2) и АС-1-11 (3). Их структуры были определены методами спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии как (2S,3S,4R,9Z)-2-[(2R)-2-гидроксигексадеканоиламино]-9-докозен-1,3,4-триол (1), (2S,3S,4R)-2-[(2R)-2-гидрокситрикозаноиламино]-гексадекан-1,3,4-триол (2) и (2S,3S,4R)-2-[(2R)-2-гидрокситетракозаноиламино]-гексадекан-1,3,4-триол (3). Для установления положения двойной связи в фитосфингозиновом основании получали диметилдисульфидные производные выделенных соединений. Эти производные анализировали методом ББА-МС. В полученных спектрах наблюдали характерный разрыв связи между метилсульфидными группами [36].

Из морской звезды *Distolasterias nipon* были выделены три новых церамида (4–6). Их структуры были установлены с использованием данных 2D спектров ЯМР и ББА-МС. Соединение 4 представляет собой (2S,3R,4E,8E,10E)-2-[(2R)-2-гидроксигексадеканоиламино]-9-метил-4,8,10-октадекатриен-1,3-диол. Соединение 5 является церамидом фитосфингозинового

вида, имеющего структуру (2*S*,3*S*,4*R*,13*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадекананоиламино]-13-докозен-1,3,4-триола, а соединение **6** по строению жирной кислоты аналогично соединению **4**, однако является церамидом сфингозинового вида [37].

Также из морской звезды *D. nipon* было выделено и охарактеризовано девять церамидов (DNC-A1, -A2, -B1, -B2, -C1, -C3, -C4, -D1 и -D2) (**7–15**). Структура церамида DNC-B1 (**9**) была определена как (2*S*,3*S*,4*R*,13*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадекананоиламино]-13-докозен-1,3,4-триол, а DNC-B2 (**10**) – как (2*S*,3*R*,4*E*,13*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксипентадекананоиламино]-4,13-докозадиен-1,3-диол. Показано, что картина фрагментации церамидов в масс-спектрах существенно зависит от числа и положения двойных связей в обеих углеводородных цепях, наличия гидроксильной группы или двойной связи у атома С-4 сфингоидного основания, а также наличия α-гидроксильной группы в N-ацильном остатке [38].

Из морской звезды *Luidia maculata* выделены четыре новых церамида: LMCer-1-1 (**16**), LMCer-2-1 (**17**), LMCer-2-6 (**18**) и LMCer-2-7 (**19**). Соединение **16** является церамидом сфингозинового вида с (4*E*)-двойной связью, а (**17–19**) – церамидами фитосфингозинового вида с разной длиной полиметиленовых цепей. Также соединения **16**, **17** и **19** имеют ДЦО *антеизо*-типа. Таким образом, химические структуры соединений **16–19** были установлены как (2*S*,3*R*,4*E*)-2-[(*R*)-2-гидроксигексадекананоиламино]-16-метил-4-октадецен-1,3-диол (**16**), (2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(*R*)-2-гидроксигексадекананоиламино]-16-метил-октадекан-1,3,4-триол (**17**), (2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(*R*)-2-гидроксидокозаноиламино]-гексадекан-1,3,4-триол (**18**) и (2*S*,3*S*,4*R*)-2-[(*R*)-2-гидроксидокозаноиламино]-14-метил-гексадекан-1,3,4-триол (**19**). По данным авторов, структуры соединений **16–19** были изучены впервые [39].

Из морской звезды *Asterias amurensis* был выделен церамид фитосфингозинового вида – астерацерамид А (**5**). Его структура установлена как (2*S*,3*S*,4*R*,13*Z*)-2-[(2'*R*)-2-гидроксигексадекананоиламино]-13-докозен-1,3,4-триол. Положение двойной связи в фитосфингозиновом основании определяли с помощью анализа данных масс-спектрометрии диметилдисульфидных производных выделенного соединения [40].

2.3 Цереброзиды морских звезд

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *A. planci* было выделено шесть новых цереброзидов – акантацереброзиды А–F (**20–25**). Все эти соединения представляют собой β-*D*-глюкоцереброзиды. Акантацереброзид А (**20**) содержит фитосфингозиновое основание (2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-гексадекантриол и остаток 2-гидрокситетракозановой кислоты. Акантацереброзид В (**21**) имеет аналогичное C₂₂-фитосфингозиновое основание и остаток 2-гидроксигексадекановой кислоты. Акантацереброзид С (**22**) отличается наличием мононенасыщенного фитосфингозинового основания с 13*Z*-двойной связью и также содержит 2-

гидроксигексадекановую кислоту. Акантацереброзиды D–F (**23–25**) относятся к сфингозиновому типу: их основание – (2*S*,3*R*,4*E*,10*E*)-2-амино-4,10-октадекадиен-1,3-диол, а жирнокислотные фрагменты представлены 2-гидроксидокозановой, 2-гидрокситрикозановой и 2-гидрокситетракозановой кислотами соответственно [41].

Из водорастворимой липидной фракции хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *A. planci* были выделены два новых церамиддигексозида фитосфингозинового типа – аканталактозиды А (**26**) и В (**27**). Оба соединения содержат дисахарид β-*D*-галактопиранозил-(1→4)-β-*D*-глюкопиранозы, связанный с фитосфингозиновым основанием. Аканталактозид А (**26**) содержит насыщенное фитосфингозиновое основание (1,3,4-гексадекантириол) и остаток 2-гидрокситетракозановой кислоты. Аканталактозид В (**27**) отличается наличием мононенасыщенного основания – (13*Z*)-13-докозен-1,3,4-триола – и остатка 2-гидроксигексадекановой кислоты. Стереохимия асимметрических центров в фитосфингозиновом основании установлена как 2*S*,3*S*,4*R*, а конфигурация двойной связи в 13-положении как *Z*. Аканталактозиды А и В являются новыми церамиддигексозидами фитосфингозинового типа [42].

Из морской звезды *Astropecten latespinosus* были выделены три новых цереброзида – астроцереброзиды А (**28**), В (**29**) и С (**30**), а также известный цереброзид акантацереброзид А (**20**). Все соединения представляют собой β-*D*-глюкопиранозилцерамиды фитосфингозинового типа с (2*S*,3*S*,4*R*)-конфигурацией ДЦО и содержат остатки 2*R*-гидроксижирных кислот. Астроцереброзиды А (**28**) и В (**29**) характеризуются наличием одной 9*Z*-двойной связи в длинноцепочечном основании, тогда как астроцереброзид С (**30**) имеет насыщенное основание *изо*-типа – 15-метилгексадекан-1,3,4-триол. Акантацереброзид А (**20**) идентичен ранее описанному цереброзиду из морской звезды *A. planci* и содержит насыщенное фитосфингозиновое основание и остаток 2-гидрокситетракозановой кислоты [43].

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Asterina pectinifera* была выделена и охарактеризована фракция из девяти цереброзидов, представляющих собой глюкоцереброзиды фитосфингозинового типа, содержащие остатки 2-гидроксижирных кислот. В индивидуальном виде был выделен цереброзид – акантацереброзид В (**31**). Его структура была установлена как (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксидокозаноиламино]-гексадекан-1,3,4-триол на основании данных ББА-МС и спектров ЯМР [44]. Следует отметить, что хотя его тривиальное название совпадает с названием цереброзида **21**, их химическая структура имеет отличия.

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Asterias amurensis versicolor* методами колоночной хроматографии на силикагеле и препаративной ВЭЖХ было выделено шесть новых цереброзидов, названных астериацереброзидами А–F (**32–37**), а также два

известных цереброзида – астроцереброзид А (28) и акантацереброзид С (22). Все выделенные цереброзиды являются β -D-глюкопиранозидами. Астериацицеброзиды А–С (32–34) относятся к сфингозиновому типу и содержат ДЦО с двумя двойными связями (докозодиен) и остатки 2-гидроксигирных кислот (2-гидроксипентадекановой или 2-гидроксигексадекановой). Астериацицеброзиды D (35), E (36) и F (37) содержат насыщенное или моновенасыщенное ДЦО. Астериацицеброзид E (36) обладает уникальной структурной особенностью: его ДЦО содержит 1-метилбутильный фрагмент $[-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3]$, что подтверждено данными ИЭ-МС и спектров ЯМР ^{13}C . Астериацицеброзид F (37) является первым цереброзидом из морской звезды, в котором жирнокислотный компонент содержит олефиновую связь ((15Z,2R)-2-гидрокси-15-тетракозеновая кислота) [45].

Из морской звезды *A. amurensis* были выделены два известных цереброзида, астериацицеброзиды А и В (32) и (33) и новый астериацицеброзид G (38). Структура 38 определена при помощи данных ЯМР и масс-спектров и химическими методами как (2S,3R,4E,13Z)-1-O-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидрокситетрадеcanoиламино]-4,13-докозодиен-1,3-диол [40].

Из полярной липидной фракции внутренних органов морской звезды *A. amurensis* методом препаративной ТСХ была выделена серия цереброзидов. Основными ДЦО цереброзидов были дигидроксиоснования d22:2, d22:1 и d18:3, что, по замечанию авторов, указывает на существенное отличие от сфингоидных оснований цереброзидов млекопитающих, имеющих преимущественно d18:1 основание. Внутренние органы морской звезды содержат значительное количество гликозилцерамидов – около 0,7% от сырой массы тела [46].

Из метанольного экстракта икры морской звезды *A. amurensis* было выделено шесть цереброзидов, обозначенных как АА-1–АА-6 (33, 34, 39–42). Все цереброзиды представляют собой β -D-глюкопиранозиды. Длинноцепочечные сфингоидные основания представлены алифатическими цепями C_{18} или C_{22} с двумя или тремя двойными связями, с метильным разветвлением в положении 9 и без него. N-Ацильные фрагменты представлены, в основном, насыщенными или моновенасыщенными 2-гидроксикислотами (C_{16} – C_{24}). Для цереброзида АА-1 (33) было показано, что двойные связи в сфингоидном основании (Δ^4 и Δ^{13}) имеют E и Z конфигурации соответственно. Структуры цереброзидов были охарактеризованы следующим образом:

АА-1 (33): (2S,3R,4E,13Z)-1-O-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидроксигексадеcanoиламино]-4,13-докозодиен-3-ол; АА-2 (34): (2S,3R,4E,9Z)-1-O-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидроксигексадеcanoиламино]-4,9-докозодиен-3-ол; АА-3 (39): (2S,3R,4E,8E,10E)-1-O-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2R,15Z)-2-гидрокси-15-тетракозеноиламино]-9-метил-4,8,10-октадекатриен-3-ол; АА-4 (40): (2S,3R,4E,8E,10E)-1-O-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидроксиоктадеcanoиламино]-9-метил-4,8,10-октадекатриен-3-ол; АА-5 (41):

(2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,10*E*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*,14*Z*)-2-гидрокси-14-трикозеноиламино]-4,8,10-октадекатриен-3-ол; АА-6 (42): (2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,10*E*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*,15*Z*)-2-гидрокси-15-тетракозеноиламино]-4,8,10-октадекатриен-3-ол [47].

Из морской звезды *A. amurensis* была получена смесь цереброзидов (ААС). Структурный анализ методом ГЖХ-МС показал, что углеводной частью этих цереброзидов является глюкоза. Состав жирных кислот и длинноцепочечных оснований ААС оказался сложным и разнообразным. Основными жирнокислотными остатками были 2-гидроксижирные кислоты, среди которых доминировала C_{24:1} (52,16%); также в значимых количествах присутствовали C_{22:0} (12,45%), C_{24:0} (11,96%), C_{16:0} (9,49%), C_{18:0} (6,66%) и C_{25:1} (7,28%). Сфингозиновые основания были представлены, в основном, 4,8,10-октадекатриенильным (d18:3, 48,61%) и 4,8-октадекадиенильным (d18:2, 39,92%) основаниями; также были идентифицированы минорные компоненты d22:1 (5,92%) и d22:2 (5,55%) [48].

Из морской звезды *A. amurensis* была получена смесь цереброзидов (SFC). Структурный анализ с помощью ГЖХ-МС показал, что гликозильной частью SFC является глюкоза. ДЦО SFC, в основном, представлено d18:3 и d18:2, а амидсвязанная ЖК – преимущественно C_{24:1} [49].

Из хлороформ-метанольного экстракта гонад и целых организмов морской звезды *A. amurensis* была выделена смесь цереброзидов. Структуры индивидуальных соединений были установлены с помощью комплекса методов, включая ВЭЖХ-МС, МС/МС, ЯМР, ГЖХ-МС и ГЖХ-ПВД. Основным моносахаридом, входящим в состав цереброзидов, была β-*D*-глюкоза, сфингозиновые основания были представлены следующими структурными типами: C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{22:1} и C_{22:2}, а в составе 2-гидроксижирных кислот преобладали C_{16:0} (35,0%) и C_{24:1} (20,6%). Было обнаружено, что для цереброзидов характерно специфическое распределение структур, разделяющее их на три основные группы:

- 1) комбинация длинного сфингоидного основания (C₂₂) и короткой жирной кислоты (≤ C₁₆);
 - 2) комбинация типичного сфингоидного основания C₁₈ и длинной жирной кислоты (≥ C₂₃);
 - 3) комбинация короткого сфингоидного основания и коротких жирных кислот.
- Комбинации длинного сфингоидного основания с длинной жирной кислотой обнаружено не было [50].

Из толуол-растворимой части метанольного экстракта морской звезды *Ophidiaster ophidianus* было выделено пять новых гликосфинголипидов – офидиациереброзиды А–Е (43–47). На основании данных спектров ЯМР ¹H и ¹³C, масс-спектров и продуктов кислотного гидролиза строение основного компонента, офидиациереброзида С (45), было установлено как (2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,10*E*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксидокозаноиламино]-9-метил-4,8,10-октадекатриен-3-ол. Отличительной особенностью данных соединений является наличие

в сфингозиновом основании метильного заместителя и системы сопряженных двойных связей. Офидиацереброзиды А, В, D и Е (43, 44, 46 и 47) имеют идентичные сфингозиновые и углеводные фрагменты, но различаются длиной цепи 2-гидроксигирной кислоты (C₂₀, C₂₁, C₂₃ и C₂₄ соответственно) [51].

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Stellaster equestris* хроматографическими методами было выделено восемь цереброзидов, S-1-3 (45), S-1-4 (46), S-1-5 (47), S-2a-3 (48), S-2a-11 (49), S-2b-2 (50), S-2b-4 (51) и S-2b-16 (52). Эти индивидуальные соединения были получены из трех молекулярных видов цереброзидов: S-1, S-2a и S-2b. Молекулярный вид S-1 представляет собой цереброзид сфингозинового вида, содержащий остатки β-D-глюкопиранозы и (2R)-2-гидроксигирных кислот. Индивидуальные цереброзиды 45–47 различаются длиной цепи жирной кислоты (докозановая, трикозановая и тетракозановая соответственно) и идентичны известным офидиацереброзидам С, D и Е. Молекулярный вид S-2a идентифицирован как цереброзид фитосфингозинового вида *изо*-типа, содержащий β-D-глюкопиранозу. Индивидуальные цереброзиды S-2a-3 (48) и S-2a-11 (49) являются новыми и содержат остатки (2R)-гидроксидокозановой и 2-гидрокситетракозановой кислот соответственно. Молекулярный вид S-2b представляет собой цереброзид фитосфингозинового типа, содержащий β-D-галактопиранозу, впервые обнаруженную в цереброзидах морских звезд. Индивидуальные цереброзиды S-2b-2 (50), S-2b-4 (51) и S-2b-16 (52) являются новыми и содержат остатки (2R)-гидроксидокозановой, (соединения 50 и 51), и 2-гидрокситетракозановой, (52), кислот [52].

Из метанольного экстракта морской звезды *Pentaceraster regulus*, собранной у побережья Индии, были выделены три новых гликоэфинголипида – регулозиды А (53), В (54) и С (55). Основное соединение, регулозид А (53), представляет собой новый цереброзид, в то время как регулозиды В и С являются его минорными гомологами. Спектральные данные подтвердили, что соединение 53 является цереброзидом, содержащим β-D-глюкопиранозу в качестве моносахаридного остатка и церамид фитосфингозинового вида. ДЦО было идентифицировано как 2-ацетамино-1,3,4-три-О-ацетилоктадекантриол, а его стереохимия установлена как *D*-(+)-*рибо*-(2*S*,3*S*,4*R*) на основании сравнения величины оптического вращения с литературными данными. Установлено, что в качестве жирной кислоты присутствует (2R)-2-гидроксидокозановая кислота, а также ее минорные гомологи – (2R)-2-гидрокситрикозановая (регулозид В (54)) и (2R)-2-гидрокситетракозановая (регулозид С (55)) кислоты [53].

Из дихлорметан-метанольного экстракта морской звезды *Cosmasterias lurida*, собранной у побережья Патагонии (Аргентина), была выделена смесь глюкозилцерамидов CL-1. Дальнейшее разделение методом препаративной ОФ-ВЭЖХ позволило получить четыре основные фракции, две из которых, (соединения 56 и 40), представляли собой глюкозилцерамиды, а одна, (47), была

идентифицирована как ранее известный офидиацереброзид Е. Последняя фракция представляла собой смесь из трех соединений **45**, **46** и **39**, различающихся строением остатка жирной кислоты. Все выделенные глюкозилцерамиды содержат β -D-глюкопиранозный остаток и необычное сфингозиновое основание – 2-амино-1,3-дигидрокси-9-метил-4,8,10-октадекатриен. Конфигурации двойных связей в сфингозиновом основании были установлены как 4*E*,8*E* на основании данных спектров ЯМР ^1H . Состав и структура остатков 2-гидроксижирных кислот, включая (2*R*)-2-гидроксидокозановую, (2*R*)-2-гидрокситрикозановую и (2*R*)-2-гидрокси-11*Z*-тетракозановую кислоты из соединений фракции **56**, были определены путем метанолиза фракций с последующим ГЖХ-МС анализом полученных МЭЖК [54].

Из хлороформ-метанольного экстракта гонад и стенок тела морской звезды *Allostichaster inaequalis* были выделены два новых глюкозилцерамида (соединения **42** и **57**), а также известные глюкозилцерамиды (соединения **56** и **40**) и фаллузид-1 (**58**), ранее обнаруженные в морской звезде *C. lurida* и асцидии *Phallusia fumigata* соответственно. Новый глюкозилцерамид **42** был идентифицирован как (2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,10*E*)-1-*O*-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокси-15-тетракозеноиламино]-4,8,10-октадекатриен-3-ол. Его структура характеризуется наличием сфингозинового основания с триеновой системой сопряженных двойных связей 4*E*,8*E*,10*E*, что подтверждено данными УФ-спектроскопии (λ_{max} 224 нм) и отсутствием метильной группы при С-9 в отличие от соединений **56**, **40** и **58**. Остаток жирной кислоты представлен (2*R*)-2-гидрокси-15-тетракозановой кислотой с *Z*-конфигурацией двойной связи. Структура соединения **57** была установлена как (2*S*,3*R*,4*E*,15*Z*)-1-*O*-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадеканоиламино]-4,15-докозодиен-3-ол. Она содержит сфингозиновое основание с 22-мя атомами углерода и двумя двойными связями (4*E* и 15*Z*), а также остаток (2*R*)-2-гидроксигексадекановой кислоты. Также было выделено две смеси глюкоцереброзидов, одна из которых содержала соединения **45**, **46**, **39** и **59**, в то время как другая содержала только соединения **46** и **59**. Компоненты смеси отличались от соединений **56**, **40** и **58** только строением остатка жирной кислоты [55].

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Luidia maculata* было выделено шесть индивидуальных цереброзидов. Идентифицировано два новых цереброзида: луидиацереброзиды А (**60**) и В (**61**). Луидиацереброзид А (**60**) представляет собой (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадеканоиламино]-16-метилоктадекан-3,4-диол. Луидиацереброзид В (**61**) представляет собой (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситетракозаноиламино]-16-метилоктадекан-3,4-диол. Оба соединения относятся к фитосфингозиновому виду. Кроме того, были охарактеризованы четыре известных цереброзида: СЕ-2b (**62**), астроцереброзид В (**29**), акантацереброзид В (**31**) и СЕ-3-2 (**63**). Соединение **62** относится к сфингозиновому типу, в то время как остальные соединения – к

фитосфингозиновому. Структура цереброзида **29**, астроцереброзида В, содержала (9*Z*)-двойную связь в длинноцепочечном основании [56].

Из экстракта морской звезды *L. maculata* были выделены четыре новых цереброзида, названных луидиалактозидами А (**64**), В (**65**), С (**66**) и D (**67**). Луидиалактозид А (**64**) представляет собой церамид-лактозид сфингозинового вида. ЖК в соединении **64** представлена 2-гидрокситетракозановой кислотой, а основание – 4-нонадецен-1,3-дионом *антеизо*-типа. Таким образом, его структура определена как (2*S*,3*R*,4*E*)-1-*O*-(β-*D*-галактопиранозил-(1→4)-β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситетракозаноиламино]-16-метил-4-октадецен-3-ол. Луидиалактозиды В (**65**), С (**66**) и D (**67**) являются церамидами-лактозидами фитосфингозинового вида нормального типа. Их стереохимия (2*S*,3*S*,4*R* для длинноцепочечного основания и 2*R* для 2-гидроксигирной кислоты) была подтверждена путем сравнения данных их спектров ЯМР ¹³С и величин оптического вращения с данными для синтетических диастереомеров. Особый интерес представляет луидиалактозид С (**66**), в длинноцепочечном основании которого присутствует (9*Z*) двойная связь (9-докозен-1,3,4-триол), а в качестве жирной кислоты выступает 2-гидроксигексадекановая кислота [57].

Из дихлорметан-метанольного экстракта морской звезды *Anasterias minuta* было выделено восемь глюкозилцерамидов, включая новый цереброзид, названный анастериациреброзидом А (**41**), и шесть известных соединений (**42**, **56**, **40**, **46**, **39**, **33**). Все они представляют собой 1-*O*-β-*D*-глюкопиранозиды. Анастериациреброзид А (**41**) был охарактеризован как (2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,10*E*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокси-14-трикозеноиламино]-4,8,10-октадекатриен-3-ол [58].

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Linckia laevigata* было выделено два молекулярных вида цереброзидов: LLC-1 и LLC-2. Основной молекулярный вид, LLC-2, был разделен с помощью ОФ-ВЭЖХ на 15 фракций, из которых пять (LLC-2-1, LLC-2-8, LLC-2-10, LLC-2-12, LLC-2-15) были охарактеризованы. Среди них LLC-2-1 (**68**) и LLC-2-8 (**48**) представляют собой индивидуальные глюкоцереброзиды, в то время как фракции LLC-2-10, LLC-2-12 и LLC-2-15 являются псевдогомогенными смесями, состоящими из глюкоцереброзидов с насыщенными основаниями фитосфингозинового вида, *изо*- (LLC-2-10, LLC-2-12) и *антеизо*- (LLC-2-15) типа. Соединения во фракциях содержат C₁₇-C₁₉ основания для LLC-2-12, C₁₇-C₁₈ для LLC-2-10 и C₁₈-C₁₉ для LLC-2-15. Все цереброзиды в смесях содержат насыщенную 2-гидроксигирную кислоту нормального типа, отличающуюся только длиной цепи: C₂₂-C₂₄ для LLC-2-12, C₂₂-C₂₃ для LLC-2-10 и C₂₄-C₂₅ для LLC-2-15 [59].

Соединение **68**, названное линкиациреброзидом А, является новым цереброзидом. Соединение **48** было идентифицировано как известный глюкоцереброзид S-2a-3, ранее

обнаруженный в морской звезде *S. equestris*. Все выделенные цереброзиды относятся к фитосфингозиновому виду и содержат остаток β -D-глюкопиранозы [59].

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Culcita novaeguineae* был выделен новый молекулярный вид галактозилцерамида, обозначенный как CNC-2 (69), который представляет собой смесь молекулярных видов β -D-галактоцереброзидов фитосфингозинового типа, содержащих как негидроксилированные, так и 2-гидроксилированные остатки жирных кислот. Анализ продуктов метанолиза 69 с последующим ГЖХ-МС анализом позволили идентифицировать ДЦО как 2-амино-1,3,4-тригидроксигексадекан, 2-амино-1,3,4-тригидроксигептадекан и 2-амино-1,3,4-тригидроксиоктадекан, а также остатки жирных кислот в виде метиловых эфиров (метилгексадеканоеат, метил-2-гидроксигексадеканоеат, метилоктадеканоеат, метил-2-гидроксидокозаноат и метил-2-гидрокситрикозаноат). Следует отметить, что согласно литературным источникам, выделение галактозилцерамидов из морских звезд является более редким случаем по сравнению с выделением глюкоцереброзидов [60].

Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Narcissia canariensis*, собранной у побережья Дакара (Сенегал), была выделена гликолипидная фракция F13, показавшая способность ингибировать пролиферацию клеток карциномы полости рта человека KB. Последующей препаративной хроматографией из неё была получена очищенная фракция F13-3 в виде белого аморфного порошка. Методами спектроскопии ЯМР и ИЭР-МС высокого разрешения было установлено, что фракция F13-3 содержит три гомологичных глюкозилцерамида, относящихся к группе офидиацицеброзидов. Основным компонентом (63%) является офидиацицеброзид С (45), впервые выделенный из морской звезды *O. ophidianus*. Минорные компоненты отличались длиной ацильной цепи на одну метиленовую группу и были идентифицированы как офидиацицеброзиды В (44) и D (46) [61].

Из хлороформ-метанольного экстракта пилорических выростов морской звезды *Protoreaster nodosus* был выделен двадцать один индивидуальный цереброзид (соединения 50–52, 70–87), включая шестнадцать новых веществ (соединения 70–74, 76–84, 86, 87). Все они идентифицированы как β -D-галактопиранозиды. Церамидная часть всех соединений представлена фитосфингозиновым длинноцепочечным основанием и 2-гидроксижирными кислотами [62].

В ходе ранее упомянутого исследования, в экстракте из *D. nipon* были идентифицированы четыре цереброзида (DNC-B3 (88) и DNC-C2 (89a–в)), последний представлен тремя изобарными компонентами [38]. Структуры соединений были установлены с использованием ДИС tandemной масс-спектрометрии. Характерные пики в спектрах $[M+Na]^+$ соответствовали фрагментам гексозного остатка (например, ион с m/z 185 для глюкозы), а также ионам, несущим информацию о церамидной части молекулы. Так, структура DNC-B3 была определена как 1-O-(β -D-

глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадеканоиламино]-4,13-докозациен-3-ол, а DNC-C2 – как 1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокси-15-тетракозеноиламино]-4,8,10-октадекатриен-3-ол. Для фракции DNC-C2 масс-спектрометрический анализ также указывал на присутствие минорного изобарного компонента, предположительно содержащего сфингозиновое основание (d19:3) с метильным разветвлением или удлиненное на один углеродный атом [38].

К настоящему времени, начиная с 1988 года, в научной литературе описано 90 индивидуальных сфинголипидов, выделенных из 17 видов морских звезд. Девятнадцать из этих соединений являются церамидами, 44 – глюкоцереброзидами, 21 – галактоцереброзидами, 6 – лактозидами [63].

Ключевые структурные характеристики сфинголипидов **1–89** представлены в Таблице 1.

Анализ химических структур сфинголипидов показал, что их длинноцепочечные основания представлены 15 типами, различающимися по конфигурации терминальных групп (3 варианта) и длине углеводородной цепи (6 вариантов). Амидная часть включает 6 типов исключительно неразветвленных жирных кислот с 11 вариантами длины углеводородных цепей.

Наиболее распространенными структурными особенностями рассмотренных сфинголипидов являются: фитосфингозиновое основание (43 соединения), ДЦО нормального типа (65 соединений), а наиболее распространенная длина основания – 18 атомов углерода (33 соединения).

Выявлено 27 уникальных комбинаций типа основания, длины цепи и степени насыщенности. Наиболее часто встречаются: триненасыщенное C₁₈-(8*E*,10*E*)-9-метилсфингозиновое основание нормального типа (12 случаев) и насыщенное C₁₆-фитосфингозиновое основание нормального типа (10 случаев).

Среди остатков жирных кислот наиболее характерны насыщенные 2*R*-гидрокси-замещенные формы (81 соединение), причем доминирующая длина углеводородной цепи включает 16 атомов углерода (24 соединения). Другие преобладающие насыщенные (2*R*)-гидроксикислоты: докозановая (18 соединений), тетракозановая (17 соединений) и трикозановая (11 соединений).

К сфинголипидам, которые встречались в морских звездах более одного раза, относятся 22 соединения: **5, 20, 22, 28, 29, 31–34, 39–42, 44–48, 50–52, 56**. При этом ни один из перечисленных сфинголипидов не встречался более чем в 6 различных видах морских звезд одновременно. Видоспецифичными являются 68 соединений. В то же время, в 15 видах морских звезд обнаруживались соединения, хотя бы одно из которых было уже обнаружено в другом виде морской звезды, тогда как только у одного вида (*Pentaceraster regulus*) обнаружены

исключительно таксономически специфичные структуры, не описанные ранее для других представителей класса.

Полученные данные указывают на высокую структурную вариабельность сфинголипидов морских звезд, сочетающую консервативные и видоспецифические особенности, что требует дальнейшего изучения путей их биосинтеза и их биологической роли.

Таблица 1 – Структурные характеристики сфинголипидов, выделенных из различных видов морских звезд

№	Тривиальное название	Вид ДЦО	Длина ДЦО	Тип ДЦО	Вид ЖК	Длина ЖК	Тип ЖК	Углеводная часть	Объект
1	АС-1-6	Δ^9Z фитосфингозин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>Acanthaster planci</i> [36]
2	АС-1-10	фитосфингозин	16	нормальный	2R-OH	23	нормальный	нет	<i>A. planci</i> [36]
3	АС-1-11	фитосфингозин	16	нормальный	2R-OH	24	нормальный	нет	<i>A. planci</i> [36]
4	Соединение 1	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [37]
5	Соединение 2; Астериацерамид А	Δ^{13Z} фитосфингозин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [37]; <i>Asterias amurens</i> [40]
6	Соединение 3	Δ^{13Z} сфингозин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [37]
7	DNC-A1	сфинганин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
8	DNC-A2	сфинганин	21	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
9	DNC-B1	Δ^{13E} фитосфингозин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
10	DNC-B2	Δ^{13E} сфингозин	22	нормальный	2R-OH	15	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
11	DNC-C1	$\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	Δ^{14E} 2R-OH	23	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
12	DNC-C3	Δ^{13E} сфинганин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
13	DNC-C4	Δ^{13E} сфингозин	22	нормальный	насыщ.	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
14	DNC-D1	Δ^{13E} сфингозин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
15	DNC-D2	Δ^{13E} фитосфингозин	22	нормальный	2R-OH	17	нормальный	нет	<i>D. nipon</i> [38]
16	LMCer-1-1	сфингозин	18	антеизо-	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>Luidia maculata</i> [39]
17	LMCer-2-1	фитосфингозин	18	антеизо-	2R-OH	16	нормальный	нет	<i>L. maculata</i> [39]
18	LMCer-2-6	фитосфингозин	16	нормальный	2R-OH	22	нормальный	нет	<i>L. maculata</i> [39]
19	LMCer-2-7	фитосфингозин	16	антеизо-	2R-OH	22	нормальный	нет	<i>L. maculata</i> [39]
20	Акантацереброзид А	фитосфингозин	16	нормальный	2R-OH	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [41] <i>Astropecten latespinosus</i> [43]
21	Акантацереброзид В	фитосфингозин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [41]
22	Акантацереброзид С	Δ^{13Z} фитосфингозин	22	нормальный	2R-OH	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [41] <i>Asterias amurens</i> <i>versicolor</i> [45]
23	Акантацереброзид D	Δ^{10E} сфингозин	18	нормальный	2R-OH	22	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [41]
24	Акантацереброзид E	Δ^{10E} сфингозин	18	нормальный	2R-OH	23	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [41]
25	Акантацереброзид F	Δ^{10E} сфингозин	18	нормальный	2R-OH	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [41]

Продолжение таблицы 1

№	Тривиальное название	Вид ДЦО	Длина ДЦО	Тип ДЦО	Вид ЖК	Длина ЖК	Тип ЖК	Углеводная часть	Объект
26	Аканталактозид А	фитосфингозин	16	нормальный	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Gal _p -(1→4)- β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [42]
27	Аканталактозид В	Δ^{13Z} фитосфингозин	22	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Gal _p -(1→4)- β -D-Glc _p	<i>A. planci</i> [42]
28	Астроцереброзид А	Δ^{9Z} фитосфингозин	22	нормальный	2R-ОН	15	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. latespinosus</i> [43] <i>A. amurensis versicolor</i> [45]
29	Астроцереброзид В	Δ^{9Z} фитосфингозин	22	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. latespinosus</i> [43]; <i>L. maculata</i> [56]
30	Астроцереброзид С	фитосфингозин	16	изо-	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. latespinosus</i> [43]
31	Акантацереброзид В (второй вариант)	фитосфингозин	16	нормальный	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Glc _p	<i>Asterina pectinifera</i> [44]; <i>L. maculata</i> [56]
32	Астериациереброзид А	Δ^{13Z} сфингозин	22	нормальный	2R-ОН	15	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis versicolor</i> [45]; <i>A. amurensis</i> [40]
33	Астериациереброзид В; АА-1	Δ^{13Z} сфингозин	22	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis versicolor</i> [45]; <i>A. amurensis</i> [40] [47]; <i>Anasterias minuta</i> [58]
34	Астериациереброзид С; АА-2	Δ^{9Z} сфингозин	22	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis versicolor</i> [45]; <i>A. amurensis</i> [47]
35	Астериациереброзид D	Δ^{13Z} фитосфингозин	22	нормальный	2R-ОН	15	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis versicolor</i> [45]
36	Астериациереброзид E	16-метил фитосфингозин	19	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis versicolor</i> [45]
37	Астериациереброзид F	фитосфингозин	17	нормальный	2R-ОН Δ^{15Z}	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis versicolor</i> [45]
38	Астериациереброзид G	сфингозин	22	нормальный	2R-ОН	14	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis</i> [40]
39	АА-3; Соединение 5в	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН Δ^{15Z}	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis</i> [47]; <i>Cosmasterias lurida</i> [54]; <i>Allostichaster inaequalis</i> [55]; <i>A. minuta</i> [58]
40	АА-4; Соединение 4	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	18	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis</i> [47]; <i>C. lurida</i> [54]; <i>A. inaequalis</i> [55]; <i>A. minuta</i> [58]
41	Анастериациереброзид А; АА-5	$\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН Δ^{14Z}	23	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis</i> [47]; <i>A. minuta</i> [58]

Продолжение таблицы 1

№	Тривиальное название	Вид ДЦО	Длина ДЦО	Тип ДЦО	Вид ЖК	Длина ЖК	Тип ЖК	Углеводная часть	Объект
42	АА-6; Соединение 4	$\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН Δ^{15Z}	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. amurensis</i> [47]; <i>A. inaequalis</i> [55]; <i>A. minuta</i> [58]
43	Офидиациреброзид А	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	20	нормальный	β -D-Glc _p	<i>Ophidiaster ophidianus</i> [51]
44	Офидиациреброзид В	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	21	нормальный	β -D-Glc _p	<i>O. ophidianus</i> [51]; <i>Narcissia canariensis</i> [61]
45	Офидиациреброзид С; S-1-3	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Glc _p	<i>O. ophidianus</i> [51] ; <i>Stellaster equestris</i> [52]; <i>C. lurida</i> [54]; <i>A. inaequalis</i> [55]; <i>N. canariensis</i> [61]
46	Офидиациреброзид D; S-1-4	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	23	нормальный	β -D-Glc _p	<i>O. ophidianus</i> [51]; <i>S. equestris</i> [52]; <i>C. lurida</i> [54]; <i>A. inaequalis</i> [55]; <i>A. minuta</i> [58]; <i>N. canariensis</i> [61]
47	Офидиациреброзид Е; S-1-5	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>O. ophidianus</i> [51]; <i>S. equestris</i> [52]; <i>C. lurida</i> [54]
48	S-2a-3; LLC-2-8	фитосфингозин	16	изо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Glc _p	<i>S. equestris</i> [52]; <i>Linckia laevigata</i> [59]
49	S-2a-11	фитосфингозин	17	изо-	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>S. equestris</i> [52]
50	S-2b-2	фитосфингозин	16	нормальный	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Gal _p	<i>S. equestris</i> [52]; <i>Protoreaster nodosus</i> [62]
51	S-2b-4	фитосфингозин	16	изо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Gal _p	<i>S. equestris</i> [52]; <i>P. nodosus</i> [62]
52	S-2b-16	фитосфингозин	17	изо-	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Gal _p	<i>S. equestris</i> [52]; <i>P. nodosus</i> [62]
53	Регулозид А	фитосфингозин	18	нормальный	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Glc _p	<i>Pentaceraster regulus</i> [53]
54	Регулозид В	фитосфингозин	18	нормальный	2R-ОН	23	нормальный	β -D-Glc _p	<i>P. regulus</i> [53]
55	Регулозид С	фитосфингозин	18	нормальный	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>P. regulus</i> [53]
56	Соединение 3	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	17	нормальный	β -D-Glc _p	<i>C. lurida</i> [54]; <i>A. inaequalis</i> [55] <i>A. minuta</i> [58]

Продолжение таблицы 1

№	Тривиальное название	Вид ДЦО	Длина ДЦО	Тип ДЦО	Вид ЖК	Длина ЖК	Тип ЖК	Углеводная часть	Объект
57	Соединение 7	Δ^{15Z} сфингозин	22	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. inaequalis</i> [55]
58	Фаллузид-1	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. inaequalis</i> [55]
59	Соединение 6b	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2R-ОН	25	нормальный	β -D-Glc _p	<i>A. inaequalis</i> [55]
60	Луидиациреброзид А	фитосфингозин	18	антеизо-	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [56]
61	Луидиациреброзид В	фитосфингозин	18	антеизо-	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [56]
62	СЕ-2b	сфингозин	16	антеизо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [56]
63	СЕ-3-2	фитосфингозин	16	антеизо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [56]
64	Луидиалактозид А	сфингозин	18	антеизо-	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Galp- (1→4)- β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [57]
65	Луидиалактозид В	фитосфингозин	16	антеизо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Galp- (1→4)- β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [57]
66	Луидиалактозид С	Δ^{9Z} фитосфингозин	22	нормальный	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Galp- (1→4)- β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [57]
67	Луидиалактозид D	фитосфингозин	16	нормальный	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Galp- (1→4)- β -D-Glc _p	<i>L. maculata</i> [57]
68	LLC-2-1; Линкиациреброзид А	фитосфингозин	17	изо-	2R-ОН	16	нормальный	β -D-Glc _p	<i>L. laevigata</i> [59]
69	CNC-2 молек. вид	фитосфингозин						β -D-Galp	<i>Culcita novaequineae</i> [60]
70	PNC-1-3a	фитосфингозин	17	нормальный	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
71	PNC-1-3b	фитосфингозин	16	нормальный	2R-ОН	23	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
72	PNC-1-4a	фитосфингозин	17	изо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
73	PNC-1-4b	фитосфингозин	17	антеизо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
74	PNC-1-4c	фитосфингозин	16	изо-	2R-ОН	23	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
75	PNC-1-5a	фитосфингозин	18	нормальный	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
76	PNC-1-5b	фитосфингозин	17	нормальный	2R-ОН	23	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
77	PNC-1-5c	фитосфингозин	16	нормальный	2R-ОН	24	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]
78	PNC-1-6a	фитосфингозин	18	антеизо-	2R-ОН	22	нормальный	β -D-Galp	<i>P. nodosus</i> [62]

Продолжение таблицы 1

№	Тривиальное название	Вид ДЦО	Длина ДЦО	Тип ДЦО	Вид ЖК	Длина ЖК	Тип ЖК	Углеводная часть	Объект
79	PNC-1-6b	фитосфингозин	17	<i>изо-</i>	2 <i>R</i> -ОН	23	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
80	PNC-1-6c	фитосфингозин	17	<i>антеизо-</i>	2 <i>R</i> -ОН	23	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
81	PNC-1-6d	фитосфингозин	16	<i>изо-</i>	2 <i>R</i> -ОН	24	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
82	PNC-1-7a	фитосфингозин	18	нормальный	2 <i>R</i> -ОН	23	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
83	PNC-1-7b	фитосфингозин	17	нормальный	2 <i>R</i> -ОН	24	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
84	PNC-1-8a	фитосфингозин	18	<i>антеизо-</i>	2 <i>R</i> -ОН	23	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
85	PNC-1-9	фитосфингозин	18	нормальный	2 <i>R</i> -ОН	24	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
86	PNC-1-8c	фитосфингозин	17	<i>антеизо-</i>	2 <i>R</i> -ОН	24	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
87	PNC-1-10	фитосфингозин	18	<i>антеизо-</i>	2 <i>R</i> -ОН	24	нормальный	β - <i>D</i> -Gal _p	<i>P. nodosus</i> [62]
88	DNC-B3	Δ^{13E} сфингозин	22	нормальный	2 <i>R</i> -ОН	16	нормальный	β - <i>D</i> -Glc _p	<i>Distolasterias nipon</i> [38]
89a	DNC-C2 (основной)	$\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2 <i>R</i> -ОН Δ^{15E}	24	нормальный	β - <i>D</i> -Glc _p	<i>D. nipon</i> [38]
89b	DNC-C2 (минорный)a	9-метил $\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	18	нормальный	2 <i>R</i> -ОН Δ^{14E}	23	нормальный	β - <i>D</i> -Glc _p	<i>D. nipon</i> [38]
89в	DNC-C2 (минорный)b	$\Delta^{8E,10E}$ сфингозин	19	нормальный	2 <i>R</i> -ОН Δ^{14E}	23	нормальный	β - <i>D</i> -Glc _p	<i>D. nipon</i> [38]

2.4 Гликозиды полигидроксистероидов морских звезд

Гликозиды полигидроксистероидов представляют собой один из наиболее характерных классов полярных вторичных метаболитов, обнаруживаемых в морских звездах. Химическая структура данных соединений включает стероидный агликон и один или несколько моносахаридных остатков, соединённых гликозидной связью с агликоном. Ключевой особенностью этого класса вторичных метаболитов является высокая степень окисления атомов углерода стероидного ядра: агликоны могут содержать от четырёх до семи гидроксильных групп в различных положениях. Так, в литературе описаны тетрагидроксилированные производные (например, 3 β ,6 β ,15 α ,16 β -тетраолы), пентагидроксилированные (например, 3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β -пентаолы), гексагидроксилированные (например, 3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,16 β -гексаолы) и гептагидроксилированные (например, 3 α ,4 α ,6 β ,8,15 α ,16 α ,28-гептаолы) и более окисленные стероидные скелеты.

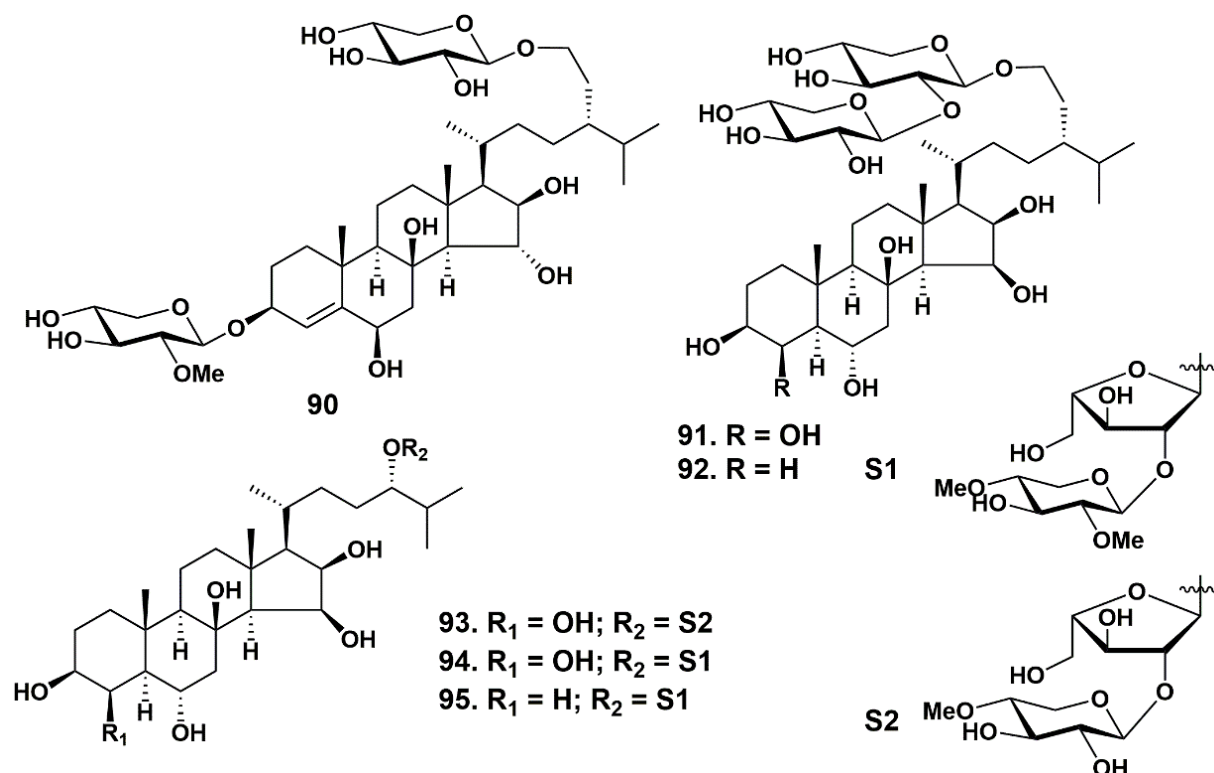
Структурное разнообразие гликозидов полигидроксистероидов обусловлено вариациями в строении боковых цепей (насыщенные, ненасыщенные, в различной степени гидроксильные холестерановые, стигматановые, эргостановые или *нор*-холестерановые), а также вариациями состава углеводной части. В качестве моносахаридных остатков чаще всего выступают ксилоза, глюкоза, галактоза и арабиноза в пиранозной или фуранозной формах, нередко модифицированные *O*-метильными или сульфатными группами. Гликозилирование обычно происходит по гидроксильным группам агликона в положениях 3, 24, 26 или 29. Высокая структурная вариабельность и широкий спектр биологической активности делают данные метаболиты перспективными объектами для хемотаксономических исследований и поиска новых биологически активных веществ.

В литературном обзоре ниже приведены гликозиды полигидроксистероидов, выделенные из морских звезд за последние 10 лет.

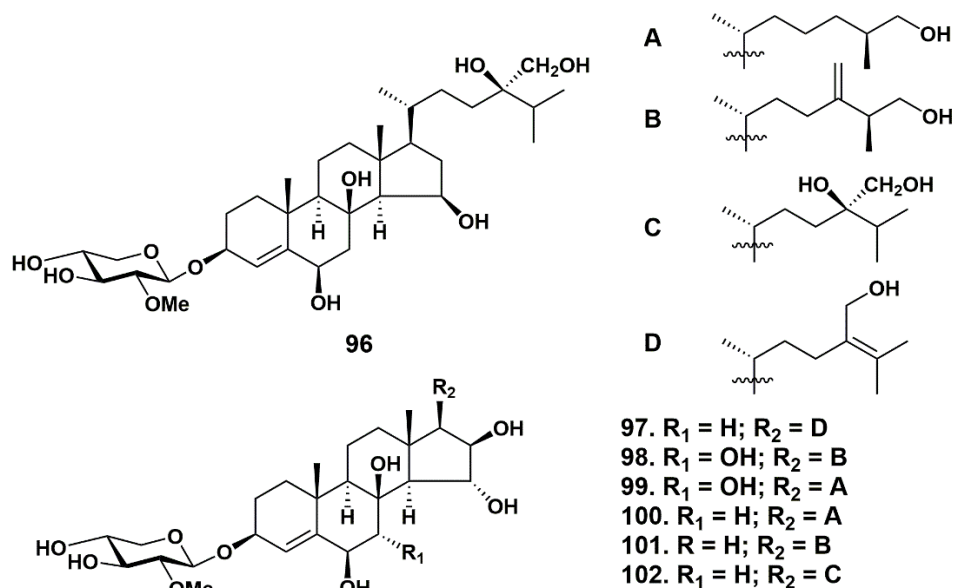
Из метанольного экстракта морской звезды *C. novaeguineae*, собранной в провинции Куангнинь (Вьетнам), с использованием комбинации хроматографических методов были выделены шесть гликозидов полигидроксистероидов (90–95) [64].

Соединения 90–95 идентифицированы как линкозид В (90), халитулозиды А (91) и В (92), кульцитозид С₅ (93), халитулозиды D (94) и Е (95). Среди них соединение 90 впервые выделено из представителей рода *Culcita*. Агликоны соединений 91–95 содержат 3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β -пентагидроксилированное (92, 95) или 3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,16 β -гексагидроксилированное (91, 93, 94) стероидное ядро с дисахаридным фрагментом в положениях 24 (93–95) или 29 (91 и 92). Линкозид В (90) содержит $\Delta^{4(5)}$ -двойную связь в

стероидном ядре, а также остатки ксилопиранозы и 2-*O*-метилксилопиранозы в положениях 29 и 3 соответственно [64].

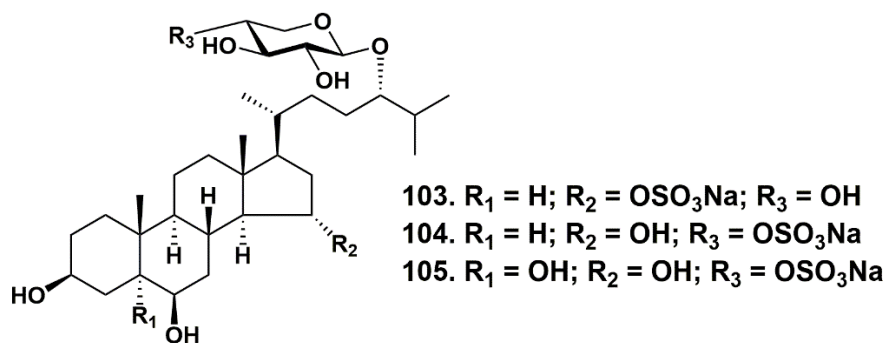


Из этанольного экстракта морской звезды *C. novaeguineae*, собранной у острова Сиша (Южно-Китайское море), были выделены четыре новых гликозида полигидроксистероидов – кульцинозиды А–D (96–99), а также три известных соединения: эхинастерозид С, линкозид F и L3 (100–102). Все соединения содержат остаток 2-*O*-метил-β-*D*-ксилопиранозы, присоединённый к С-3 агликона, а также одинаковое Δ⁴⁽⁵⁾-стероидное ядро, отличающееся наличием (98, 99) либо отсутствием (97, 100–102) 7α-гидроксильной группы. Дополнительно, соединение 96 отличается от остальных выделенных соединений отсутствием 16β-гидроксигруппы и наличием 15β гидроксильной группы. Кроме того, кульцинозиды А–D (96–99) отличаются друг от друга боковыми цепями и содержат 24,28-дигидроксиэргостановую (96), Δ²⁴⁽²⁵⁾-28-гидроксиэргостановую (97), Δ²⁴⁽²⁸⁾-26-гидроксиэргостановую (98) и 26-гидроксихолестановую (99) боковые цепи [65].



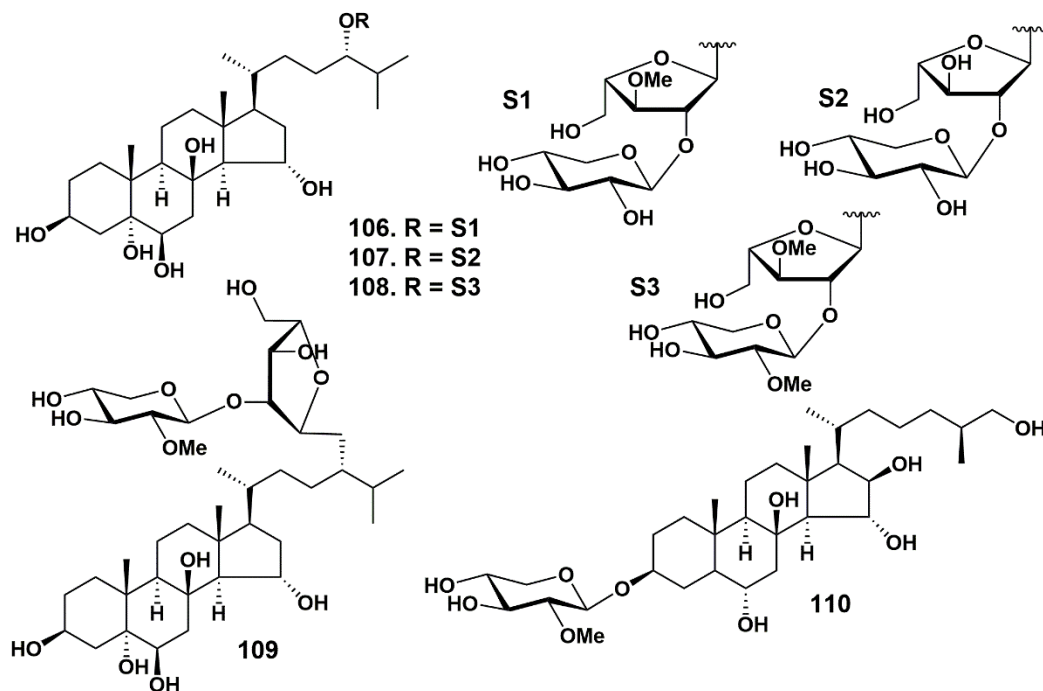
Из хлороформ-метанольного экстракта морской звезды *Leptasterias ochotensis*, собранной у острова Большой Шантар (Охотское море), хроматографическими методами были выделены три новых сульфатированных стероидных моногликозида — лептаохотенсозиды А–С (**103–105**).

Все три соединения (**103–105**) относятся к классу сульфатированных полярных стероидных моногликозидов с $3\beta,6\beta,15\alpha$ -тригидрокси- (**103**, **104**) и $3\beta,5,6\beta,15\alpha$ -тетрагидроксилированным (**105**) стероидным ядром, холестановой боковой цепью и остатком β -D-ксилопиранозы в положении 24. Лептаохотенсозид А (**103**) содержит сульфатную группу в стероидном ядре при C-15. Это первое описанное соединение с сульфатной группой в положении 15 данного стероидного ядра среди метаболитов морских звёзд. Лептаохотенсозид В (**104**) отличается от **103** местоположением сульфатной группы: она находится при C-4' остатка ксилопиранозы, а не при C-15 агликона. Лептаохотенсозид С (**105**) имеет дополнительную гидроксильную группу в положении 5 стероидного ядра и сохраняет сульфатную группу при C-4' остатка ксилопиранозы [66].

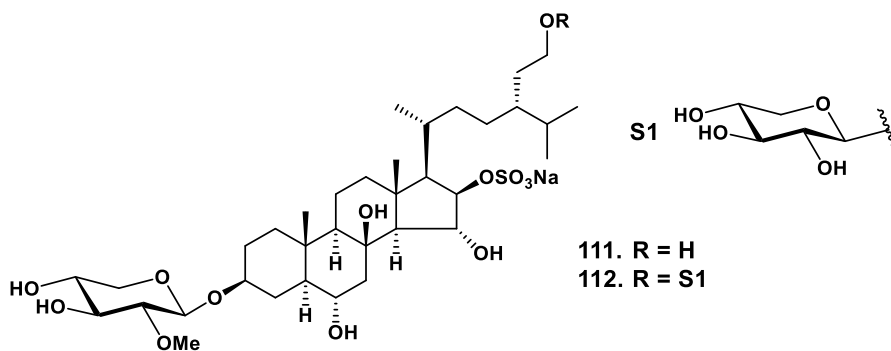


Из этанольного экстракта морской звезды *Pentaceraster regulus*, собранной в районе Чамских островов (Южно-Китайское море), с использованием комплекса хроматографических методов было выделено три новых гликозида

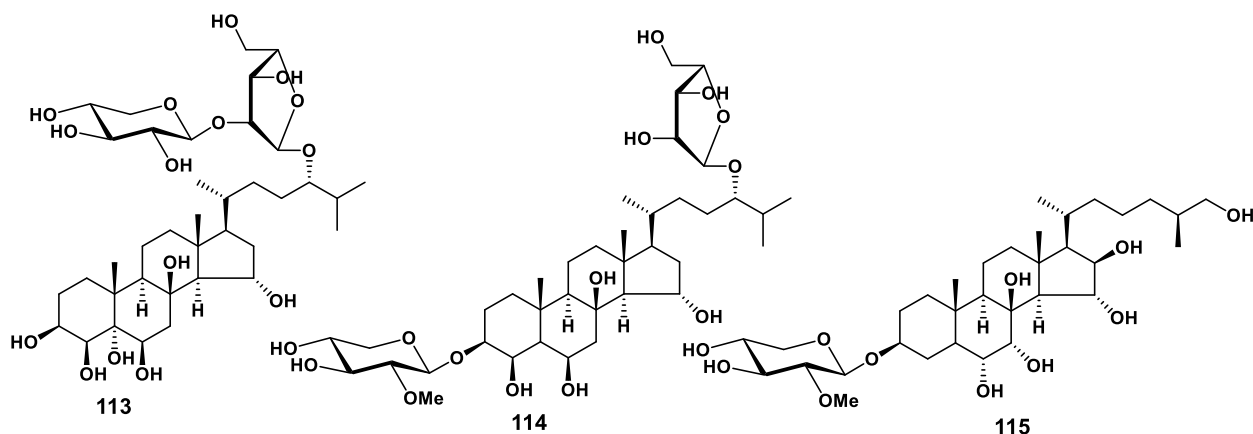
полигидроксистероидов, названных регулусозидами А–С (**106–108**), а также два ранее известных соединения (**109**, **110**). Новые регулусозиды А–С (**106–108**) имеют общий стероидный агликон – (24*S*)-5 α -холестан-3 β ,5,6 β ,8,15 α ,24-гексаол, гликозилированный по положению 24 боковой цепи. Друг от друга они отличаются строением дисахаридных фрагментов: регулусозид А (**106**) содержит β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-3-*O*-метил- α -L-арабинофуранозильный остаток, регулусозид В (**107**) – β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-арабинофуранозильный остаток, а регулусозид С (**108**) – 2-*O*-метил- β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-3-*O*-метил- α -L-арабинофуранозильный остаток [67].



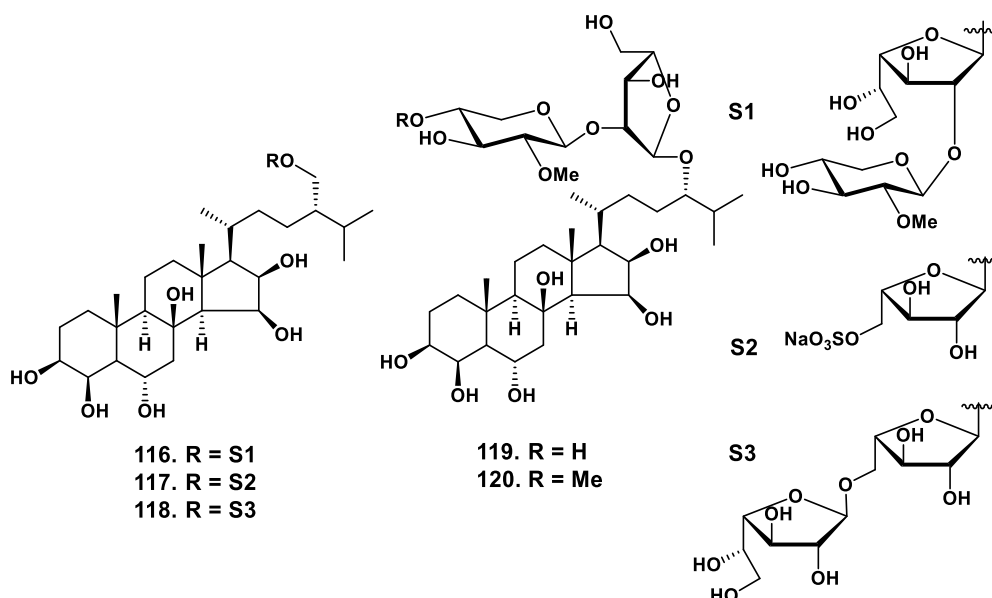
Также из этанольного экстракта морской звезды *P. regulus*, собранной у острова Чам (Южно-Китайское море), были выделены два новых сульфатированных полигидроксистероидных гликозида, регулусозиды S1 и S2 (**111**, **112**), имеющих общее 16-*O*-сульфатированное 3 β ,6 α ,8,15 α ,16 β -пентагидроксистероидное ядро, окисленную по С-29 стигмастановую боковую цепь и остаток 2-*O*-метил- β -D-ксилопиранозы, присоединённый к С-3 агликона. Регулусозид S2 (**112**) отличается от S1 (**111**) наличием дополнительного остатка β -D-ксилопиранозы, присоединённого к С-29 агликона. Особый интерес представляет то, что впервые в природных полигидроксилированных стероидных гликозидах морских звёзд выявлена сульфатная группа в положении 16 стероидного ядра, тогда как ранее сульфатные группы в таких соединениях чаще обнаруживались в положениях 3, 6 или 15 [68].



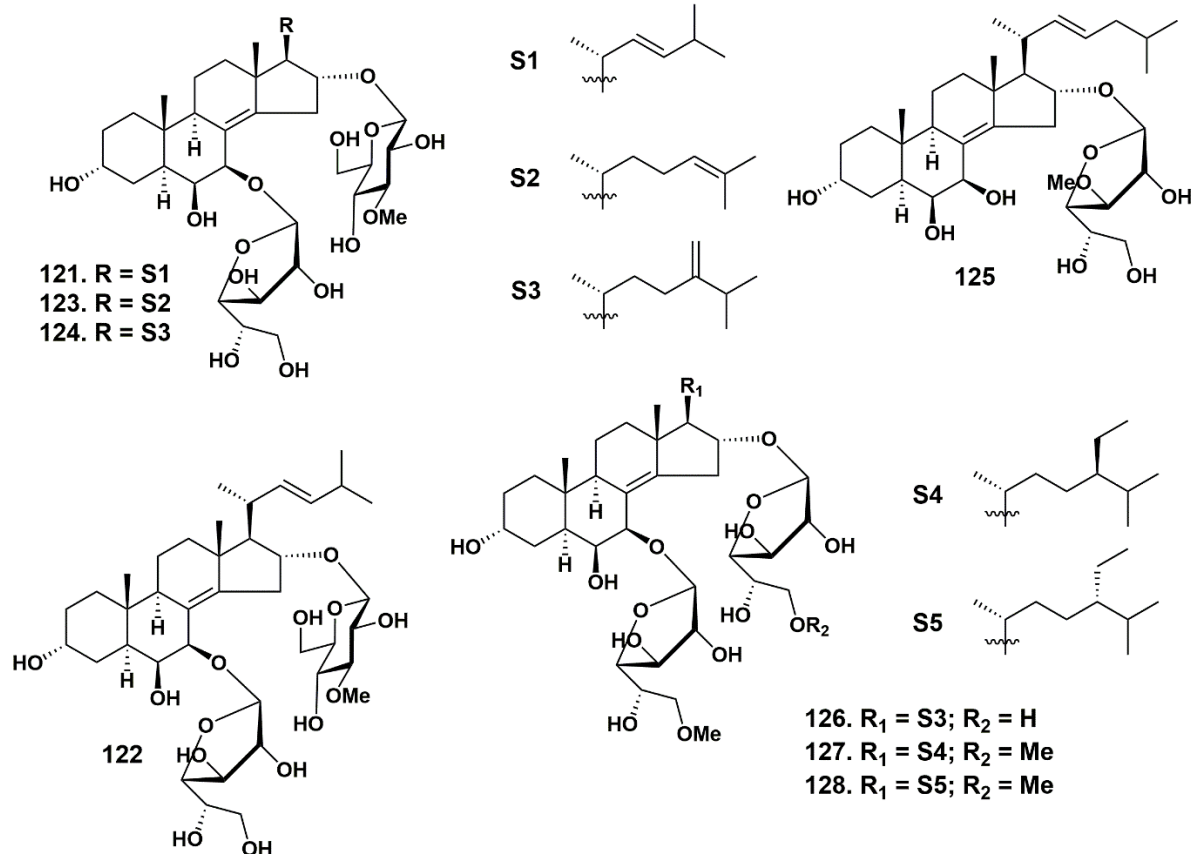
Из метанольного экстракта морской звезды *P. regulus*, собранной у островов Кон Ко (Вьетнам), были выделены четыре гликозида полигидроксистероидов: новый регулусозид D (**113**) и ранее известные регулусозид А (**106**), гранулатозид А (**114**) и стероидный гликозид **115**. Регулусозиды D (**113**) и А (**106**) имеют общую 24-гидроксихолестановую боковую цепь и β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-арабинофуранозильный остаток при C-24 и отличаются друг от друга только стероидными ядрами: 3 β ,4 β ,5,6 β ,8,15 α -гексаол в **113** и 3 β ,5,6 β ,8,15 α -пентаол в **106**. Гранулатозид А (**114**) и соединение **115** были идентифицированы путем сравнения их спектральных данных с литературными данными [69].



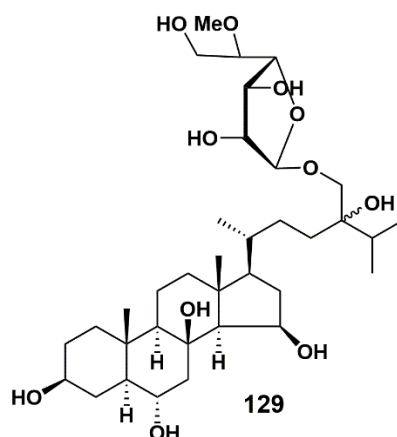
Из метанольного экстракта морской звезды *A. planci*, собранной у острова Кон Ко (Вьетнам), были выделены два новых гликозида полигидроксистероидов – плансизиды Е (116) и F (117) [66], а также три ранее известных соединения – плансизид А (118), аттенуатозид В-1 (119) и кульцитозид С₂ (120) [67]. Все выделенные соединения содержат один и тот же стероидный агликон: (24*S*)-24-метил-5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,28-гептаол. Отличия между соединениями заключаются в строении углеводной части при С-28 агликона. Плансизид Е (116) содержит дисахаридный фрагмент 2-*O*-метил- β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-галактофуранозы, а плансизид F (117) – остаток 5-*O*-сульфо- α -L-арабинофуранозы [70, 71].



Из метанольного экстракта морской звезды *Anthenea sibogae*, собранной в бухте Бай Ту Лонг (Вьетнам), были выделены шесть новых гликозидов полигидроксистероидов, названных антенозидами S1–S6 (**121–126**), а также смесь двух ранее известных соединений – антенозидов J и K (**127**, **128**). Все новые соединения содержат один и тот же стероидный агликон – 5 α -холест-8(14)-ен-3 α ,6 β ,7 β ,16 α -тетраол, характеризующийся редкими местами присоединения углеводных остатков: либо одновременно в положениях 7 и 16 (**121–124**, **126**), либо только при C-16 (**125**). Антенозид S2 (**122**) содержит ранее неописанный в гликозидах морских звезд 3-*O*-метил- β -D-глюкопиранозный остаток. Антенозид S3 (**123**) характеризуется наличием Δ^{24} -холестановой боковой цепи, также впервые обнаруженной в стероидных гликозидах морских звезд. У антенозида S5 (**125**) углеводный остаток (3-*O*-метил- β -D-галактофураноза) присоединён только к C-16, в отличие от остальных новых гликозидов. Смесь антенозидов J и K (**127**, **128**) представляет собой эписмеры по C-24 в соотношении 1:3 (24*R*:24*S*) [72].

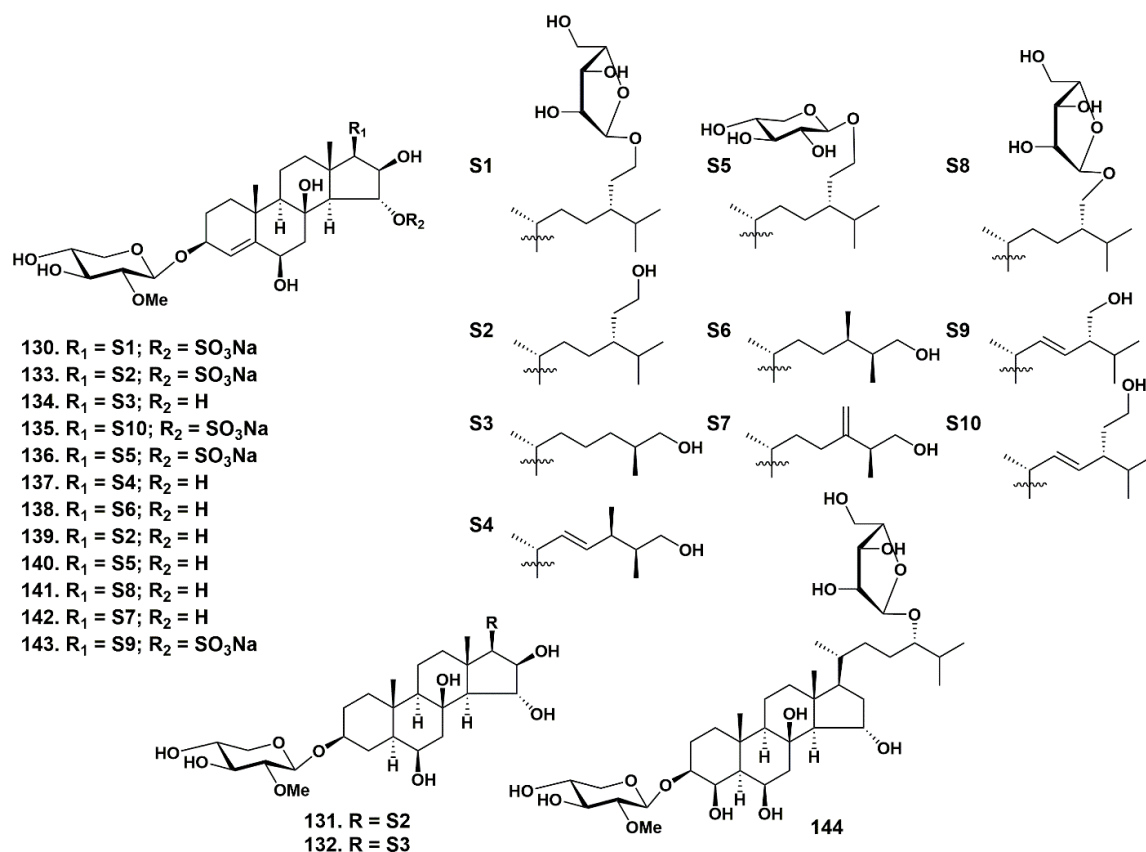


Из водорастворимой фракции метанольного экстракта морской звезды *Astropecten polyacanthus*, собранной у побережья Нята Ле (Куангбинь, Вьетнам), был выделен новый гликозид полигидроксистероида: полиакантозид А (129). Полиакантозид А (129) имеет (20*R*)-3 β ,6 α ,8,15 β ,24,28-гексагидрокси-24-метил-5 α -холестановый агликон и остаток 5-*O*-метил- β -*D*-галактофуранозы [73].



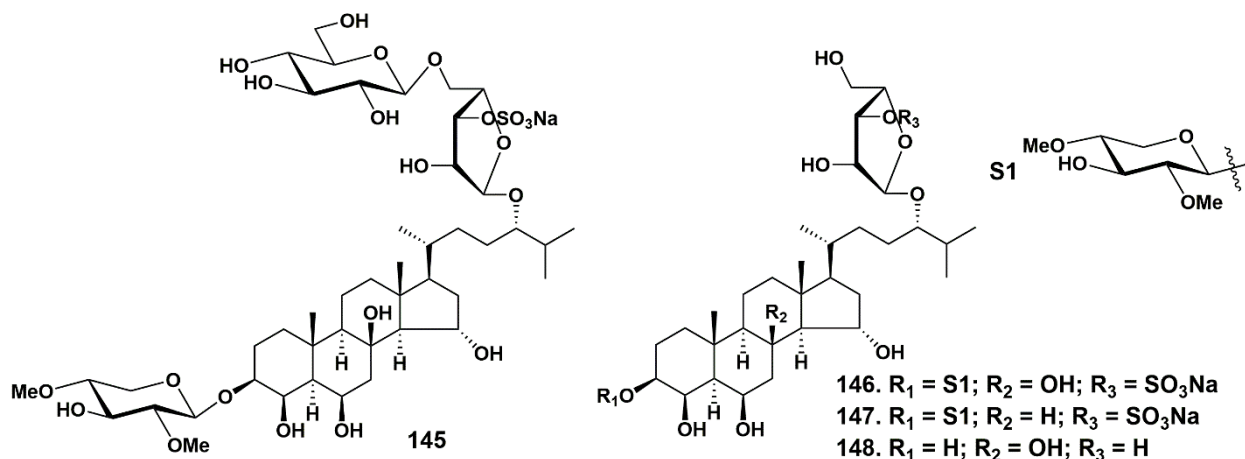
Из этанольного экстракта морской звезды *Choriaster granulatus*, собранной в заливе Ван Фонг (Южно-Китайское море, побережье Вьетнама), было выделено 15 гликозидов полигидроксистероидов, включая два новых соединения – гранулатозиды D (130) и E (131). Кроме того, были идентифицированы тринадцать ранее известных гликозидов полигидроксистероидов (132–144). Гранулатозид D (130) представляет собой бигликозид с

$\Delta^{4(5)}$ -3 β ,6 β ,8,15 α ,16 β ,29-гексагидрокси-24-этил-холестановым агликоном, сульфатированным по С-15, и двумя остатками моносахаридов – 2-*O*-метил- β -*D*-ксилопиранозой в положении 3 и α -*L*-арабинофуранозой в положении 29. Гранулатозид Е (131) является моногликозидом с тем же расположением гидроксильных групп в агликоне, но насыщенным по С-4, не имеющим сульфатной группы при С-15 и содержащим только один моносахаридный остаток – 2-*O*-метил- β -*D*-ксилопиранозу в положении 3 [74].

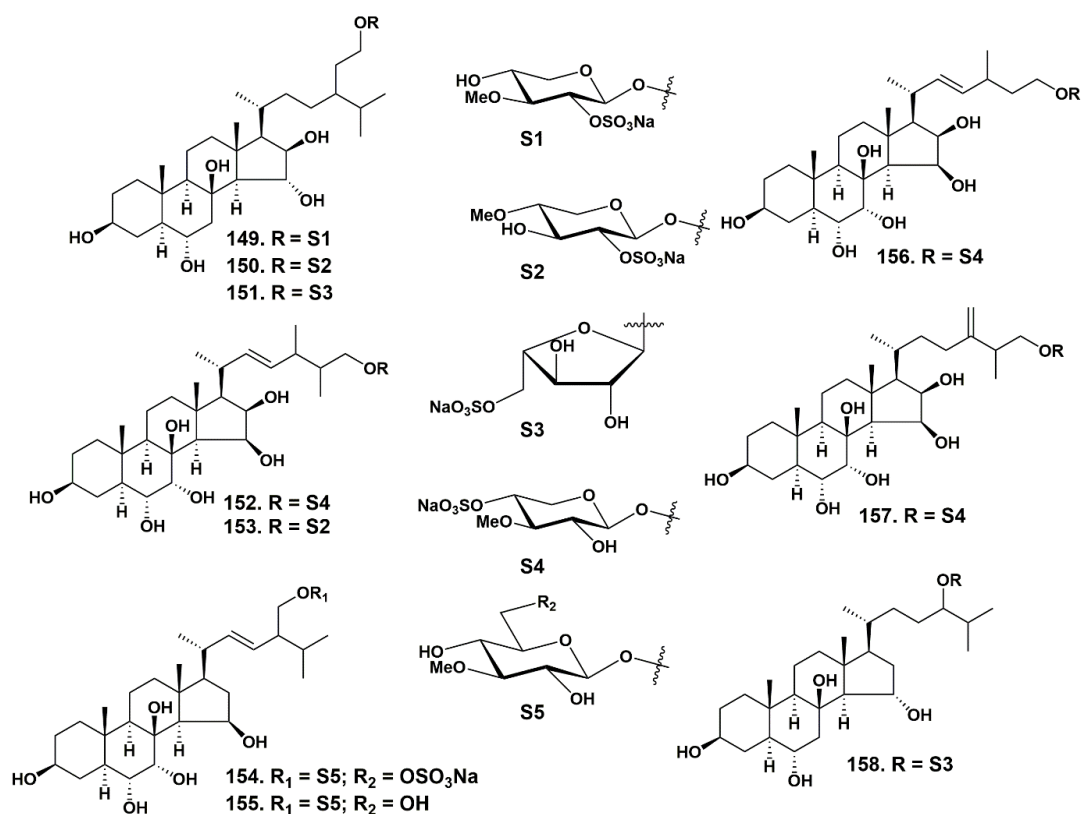


Из этанольного экстракта морской звезды *Henricia leviuscula spiculifera*, собранной в районе острова Уруп (Охотское море, Россия), были выделены четыре новых гликозида полигидроксистероидов: спикулиферозиды А–D (145–148). Спикулиферозид А (145) представляет собой редкий сульфатированный тригликозид с двумя местами присоединения углеводных фрагментов к стероидному агликону: 2,4-ди-*O*-метил- β -*D*-ксилозы к С-3 и β -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 5)-3-*O*-сульфат- α -*L*-арабинофуранозы к С-24. Структура агликона была определена как 3 β ,4 β ,6 β ,8,15 α ,24-гексагидрокси-5 α -холестан. Это первый случай обнаружения 5'-замещённого 3-*O*-сульфат- α -*L*-арабинофуранозного остатка в гликозидах морских звёзд. Спикулиферозид В (146) – моноссульфатированный биозид, имеющий 3 β ,4 β ,6 β ,8,15 α ,24-гексагидрокси-5 α -холестановый агликон и те же углеводные остатки, что и в спикулиферозиде А, но без концевой β -*D*-глюкопиранозы. Спикулиферозид С (147) практически идентичен спикулиферозиду В, но его агликон лишён гидроксильной группы при С-8. Стоит отметить, что 3-*O*-сульфат- α -*L*-арабинофуранозный фрагмент,

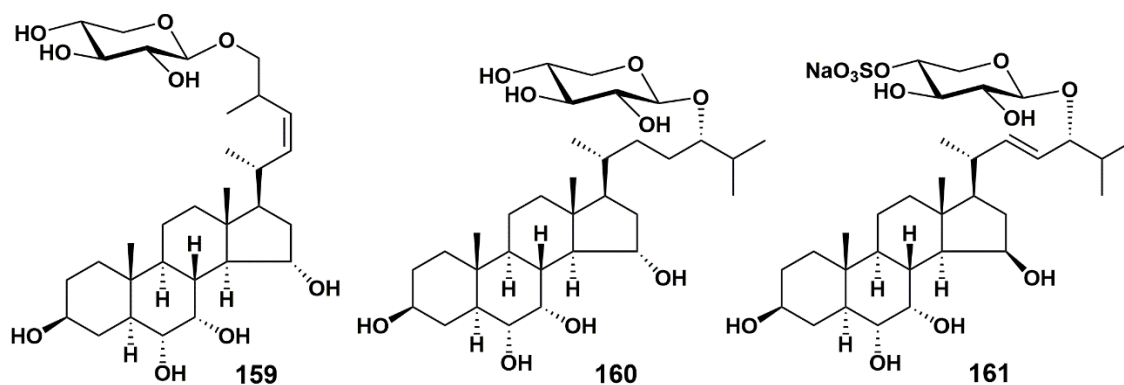
присутствующий в спикулиферозидах В и С, ранее встречался лишь в одном стероидном гликозиде из морской звезды *Oreaster reticulatus*. Спикулиферозид D (148) содержит тот же стероидный агликон, что и спикулиферозид В, но гликозилирован только одним остатком α -L-арабинофуранозы в положении 24. [75]



Из бутанольного экстракта морской звезды *Patiria pectinifera*, собранной в Жёлтом море (Китай), были выделены десять новых гликозидов полигидроксистероидов, названных пектиниферозидами А–J (149–158). Все выделенные соединения содержат пента- или гексагидроксилированные стероидные ядра, имеют разнообразные окисленные боковые цепи и сульфатированные и/или метилированные моносахаридные остатки, некоторые из которых впервые обнаружены в стероидных гликозидах морских звезд [76].



Из бутанольного экстракта морской звезды *A. amurensis*, собранной в Жёлтом море (Китай), были выделены три новых гликозида полигидроксистероидов: астамуренозиды А–С (**159**–**161**). Астамуренозид А (**159**) представляет собой (22*Z*)-26-*O*-β-*D*-ксилопиранозил-24-*нор*-5α-холестан-22(23)-ен-3β,6α,7α,15α,26-пентаол. *Z*-Конфигурация двойной связи впервые обнаружена в боковых цепях стероидных гликозидов морских звезд. Астамуренозид В (**160**) имеет структуру (24*S*)-*O*-β-*D*-ксилопиранозил-5α-холестан-3β,6α,7α,15α,24-пентаола. Отличительной особенностью является отсутствие сульфатной группы при C-15 по сравнению с ранее известными аналогами. Астамуренозид С (**161**) представляет собой (22*E*,24*S*)-24-*O*-[4-*O*-сульфо-β-*D*-ксилопиранозил]-5α-холест-9(11)-ен-3β,6α,7α,15β,24-пентаол. В отличие от соединения **159**, он содержит сульфатную группу в положении 4' ксилозы [77].



Литературные данные свидетельствуют о том, что гликозиды полигидроксистероидов остаются одним из наиболее интересных классов вторичных метаболитов морских звезд. Анализ структур этих соединений, выделенных за последние 10 лет, демонстрирует исключительное структурное разнообразие как стероидных агликонов, так и углеводных фрагментов. Характерной чертой описанных метаболитов является значительная вариабельность строения стероидного ядра и боковых цепей, включающая ненасыщенные и окисленные производные холестерина, эргостана, стигмастана и *нор*-холестана. Особое внимание привлекает расширение известных вариантов модификации углеводной части: наряду с традиционными ксилозными и арабинозными остатками, обнаружены более редкие сульфатированные и *O*-метилованные моносахариды, а также необычные места присоединения гликозидных фрагментов (C-7, C-16, C-29). Выявление соединений с ранее не описанными структурными особенностями, такими как сульфатирование по C-16 агликона, сульфатирование по C-15 или *Z*-конфигурация двойной связи в боковой цепи, подчеркивает особую привлекательность морских звезд как источника новых химических структур. Приведенные данные показывают потенциал гликозидов полигидроксистероидов в качестве маркеров для

хемотаксономических исследований и перспективных кандидатов для дальнейшего фармакологического скрининга.

2.5 Биологическая активность сфинголипидов морских звезд

Церамиды и цереброзиды **5**, **32**, **33** и **38** проявили ростстимулирующую активность в отношении проростков *B. campestris*. При этом астериацерамид А (**5**) стимулировал рост только корней, в то время как цереброзиды **32**, **33** и **38** способствовали росту всего растения [40]. Более подробные исследования показали, что астериацереброзиды А (**32**), В (**33**) и G (**38**) в концентрации 1,0 мг/мл проявили ростстимулирующую активность, увеличивая сырую массу проростков до 132, 131 и 116% соответственно, по сравнению с контролем. Астериацерамид А (**5**) в концентрации 0,5 мг/мл статистически значимо стимулировал рост корней *B. campestris* [78].

Офидиацереброзиды А–Е (**43–47**) из морской звезды *O. ophidianus* проявили выраженную цитостатическую активность в отношении клеток лимфолейкоза мыши L1210 *in vitro* [51]. В концентрации 2 мкг/мл соединения **43–47** ингибировали рост клеток на 92, 70, 96, 90 и 84% соответственно.

Сфингоидные основания, выделенные при гидролизе цереброзидов из морской звезды *A. amurensis*, в концентрации 20 мкМ индуцировали апоптоз в клетках аденокарциномы толстой кишки человека Сасо-2 при инкубировании в течение 24 ч. Апоптотические изменения, такие как конденсацию хроматина и фрагментацию ядер, визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии после окрашивания DAPI. Авторы отмечают, что выбранные доза и время инкубации являются оптимальными для индукции именно апоптоза, поскольку более высокие концентрации сфингоидных оснований (50 мкМ) вызывали некроз клеток [46].

Цитотоксическая активность фракции F13-3 из морской звезды *N. canariensis*, содержащей преимущественно офидиацереброзид С (**45**), была изучена на ряде линий раковых клеток человека. После инкубирования в течение 24 ч, фракция проявляла цитотоксичность в отношении клеток множественной миеломы человека KMS-11, колоректальной аденокарциномы человека НСТ-116 и мультиформной глиобластомы человека GBM со значениями ИК₅₀ = 15,2 ± 4,0 мкМ, 18,0 ± 3,9 мкМ и 34,6 ± 5,1 мкМ соответственно [61].

Сумма цереброзидов морской звезды *A. amurensis* (ААС) дозозависимо ингибировала пролиферацию клеток мышинной саркомы S180 *in vitro*, индуцируя апоптоз, что было подтверждено морфологическим анализом с окрашиванием акридиновым оранжевым и бромистым этидием. Цитотоксическая активность ААС была незначительной,

с величиной $IK_{50} = 216,36$ мкМ после 72 ч инкубации. Внутривентрикулярное введение ААС (50 мг/кг массы тела) *in vivo* на моделях мышей с солидной опухолью S180 и асцитной опухолью S180 значительно подавляло рост солидной опухоли (ингибирование на 35,71%), объем асцитной жидкости (ингибирование на 22,72%) и снижало жизнеспособность асцитных опухолевых клеток. Кроме того, лечение суммой цереброзидов ААС увеличивало продолжительность жизни мышей с асцитной опухолью на 35,77% по сравнению с контрольной группой. Механизм противоопухолевого действия был связан с индукцией апоптоза через митохондриальный путь: обработка цереброзидами ААС приводила к снижению экспрессии мРНК белков Bcl-2 и Bcl-xL и увеличению экспрессии мРНК белков Bax, цитохрома C, каспазы-9 и каспазы-3 в асцитных опухолевых клетках S180 [48].

В исследовании суммы цереброзидов морской звезды *A. amurensis* (SFC) на клетках феохромоцитомы крысы PC12 было продемонстрировано, что цереброзиды SFC обладают защитным действием против окислительного повреждения, индуцированного пероксидом водорода (H_2O_2) и *трет*-бутилгидропероксидом (t-BHP). Биологическая активность суммы SFC исследовалась в концентрациях 100 и 400 мкг/мл, в результате чего было обнаружено, что сумма SFC дозозависимо повышала жизнеспособность клеток (в случае концентрации 400 мкг/мл – до уровня интактного контроля), снижала высвобождение лактатдегидрогеназы и уровень внутриклеточных АФК, а также увеличивала активность супероксиддисмутазы. В модели повреждения, вызванного t-BHP, защитный эффект суммы SFC был более выражен по сравнению с цереброзидами из голотурии *Acaudina molpadioides* (SCC). Показано, что механизм нейропротекторного действия цереброзидов SFC связан с ингибированием митохондриального пути апоптоза: SFC достоверно повышали экспрессию гена Bcl-2 и снижали экспрессию цитохрома c, каспазы-9 и каспазы-3 [49].

Расчетные значения $\log P$ (коэффициент липофильности) для цереброзидов из *A. amurensis* находились в диапазоне от 6,61 до 11,43, при этом около 80% соединений имели значение $\log P$ от 9 до 11, что соответствует диапазону, характерному для цереброзидов, используемых в косметике, и указывает на их потенциал в качестве увлажняющих компонентов. По утверждению авторов, наличие разветвленного сфингозинового основания (d18:3) в составе некоторых цереброзидов позволяет предположить возможную антимикробную активность и способность подавлять образование меланина, по аналогии с известными соединениями. Прямое изучение биологической активности выделенных индивидуальных соединений в данной работе не проводилось [50].

Регулозид А из морской звезды *P. regulus* показал умеренную ранозаживляющую активность [53].

2.6 Биологическая активность гликозидов полигидроксистероидов морских звезд

Шесть соединений (**90–95**) из морской звезды *C. novaeguineae* были протестированы *in vitro* на цитотоксичность в отношении пяти линий раковых клеток человека: HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), KB (эпидермоидная карцинома), LNCaP (рак простаты), MCF7 (рак молочной железы) и SK-MEL-2 (меланома) с использованием теста с сульфородамино-В (SRB). Соединения **91–94** проявили слабую или умеренную цитотоксическую активность. В частности, халитулозиды В (**92**) и D (**94**) показали умеренную активность по отношению к клеткам KB, LNCaP, MCF7 и SK-Mel-2 ($IC_{50} = 31,80–50,09$ мкМ) и слабый эффект по отношению к клеткам HepG2 ($IC_{50} = 75,01–80,22$ мкМ). Халитулозид А (**91**) проявил умеренную активность в отношении клеток LNCaP ($IC_{50} = 48,59$ мкМ) и MCF7 ($IC_{50} = 51,61$ мкМ) и слабую – по отношению к клеткам KB и SK-MEL-2 ($IC_{50} = 70,70$ и $73,99$ мкМ соответственно). Кульцитозид С₅ (**93**) проявил слабую цитотоксичность в отношении клеток KB, LNCaP, MCF7 и SK-MEL-2 ($IC_{50} = 57,08–92,04$ мкМ). Линкозид В (**90**) и халитулозид Е (**95**) не проявили значимой цитотоксичности ($IC_{50} > 100$ мкМ) по отношению ко всем протестированным линиям клеток [64].

Цитотоксичность кульцинозидов А–D (**96–99**) была оценена *in vitro* методом МТТ по отношению к клеточным линиям глиобластомы человека U87, U251 и SHG44. Кульцинозид А (**96**) проявил выраженную активность со значениями $IC_{50} = 9,35 \pm 0,46$ (U87), $11,28 \pm 0,65$ (U251) и $8,04 \pm 0,32$ мкМ (SHG44). Кульцинозиды В (**97**), С (**98**) и D (**99**) показали умеренное действие со значениями IC_{50} в диапазоне 22,66–43,25 мкМ. В качестве положительного контроля использовали доксорубин [65].

Соединения **103–105** из морской звезды *L. ochotensis* не проявили выраженной цитотоксичности в отношении клеток меланомы RPMI-7951 и клеток рака молочной железы Т-47D в концентрациях до 200 мкМ по данным MTS-теста. Однако лептаохотенсозид А (**103**) в концентрации 50 мкМ значительно подавлял (на 48%) образование колоний клеток Т-47D в мягком агаре. Более того, соединение **103** в концентрации 200 мкМ ингибировало (на 44%) индуцированную эпидермальным фактором роста (EGF) неопластическую трансформацию эпидермальных клеток мыши JB6 Cl41. Механизм противоракового действия гликозида **103** связан с подавлением фосфорилирования ключевых компонентов MAPK-сигнального пути: ERK1/2 и MSK-1, что указывает на реализацию канцерпревентивного эффекта через регуляцию сигнального пути MAPK. Лептаохотенсозиды В и С (**104** и **105**) не проявляли значимого влияния на образование колоний ни на одной из протестированных клеточных линий [66].

Биологическая активность соединений, выделенных из морской звезды *P. regulus*, была изучена на клетках макрофагов мыши RAW 264.7. В нетоксичной концентрации 10 мкМ регулусозиды А (106) и В (107), а также известный стероидный гексаол (110) продемонстрировали потенциальную иммуномодулирующую активность, достоверно увеличивая внутриклеточное образование АФК на 35, 28 и 33% соответственно [67].

Гликозиды полигидроксистероидов 113–115 из *P. regulus* были протестированы на способность ингибировать продукцию оксида азота (NO), индуцированную ЛПС, в макрофагах RAW264.7. Регулусозид D (113) и гранулатозид А (114) проявили выраженную противовоспалительную активность со значениями ИК₅₀ в диапазоне 8,63–14,83 мкМ. Регулусозид А (106) показал значимую, но менее выраженную активность (ИК₅₀ = 24,21 мкМ), тогда как соединение 115 проявило слабую активность (ИК₅₀ = 61,16 мкМ). На основании сравнительного анализа структур и активностей авторы предположили, что наличие гидроксильной группы при С-4 и/или отсутствие гидроксила при С-7 усиливает ингибирующее действие веществ на продукцию NO [69].

Цитотоксическая активность соединений 118–120, выделенных из морской звезды *A. planci*, была протестирована *in vitro* по отношению к пяти линиям раковых клеток человека HepG2, KB, LNCaP, MCF7 и SK-MEL-2. Только кульцитозид С₂ (120) проявил слабую цитотоксическую активность со значениями ИК₅₀ = 80,08 ± 6,87, 63,87 ± 3,53, 59,96 ± 3,11, 51,05 ± 3,87 и 65,77 ± 5,15 мкМ соответственно. Аттенуатозид В-1 (119) и плансизид А (118) не проявили значимой активности (ИК₅₀ > 100 мкМ). В качестве положительного контроля использовался эллиптицин, показавший значительно более высокую активность (ИК₅₀ от 1,34 до 1,95 мкМ) [71].

Антенозиды S1, S2 и S4 (121, 122 и 124) и смесь антенозидов J и K (127 и 128) из морской звезды *A. sibogae* были исследованы *in vitro* по отношению к клеточной линии рака молочной железы человека T-47D. Ни одно из веществ не проявило цитотоксичности в концентрациях до 150 мкМ (MTS-тест). Также не наблюдалось влияния на пролиферацию клеток T-47D при обработке соединениями 121, 122 и 124 в концентрации 50 мкМ. В то же время, смесь антенозидов J и K (127 и 128) при той же концентрации ингибировала пролиферацию T-47D-клеток на 47% после обработки в течение 74 ч. В тесте на клоногенную активность в мягком агаре эта смесь не снижала количество колоний, но уменьшала их размер вдвое. Соединения 121, 122 и 124 не оказывали влияния ни на количество, ни на размер колоний [72].

Цитотоксическая активность соединения 129, выделенного из морской звезды *A. polyacanthus*, была оценена методом SRB на пяти линиях раковых клеток человека HepG2,

KB, LNCaP, MCF7 и SK-Mel2. Полиакантозид А (**129**) оказался малоактивным ($ИК_{50} > 100$ мкМ) [73].

Цитотоксическая активность соединений **130**, **131–137** и **139–144**, выделенных из морской звезды *C. granulatus*, по отношению к спленоцитам мыши. Наиболее выраженную цитотоксическую активность продемонстрировали гранулатозид D (**130**) ($ИК_{50} = 4,7 \pm 1,2$ мкМ), эхинастерозид F (**135**) ($ИК_{50} = 4,6 \pm 0,3$ мкМ), десульфатированный эхинастерозид В (**138**) ($ИК_{50} = 4,5 \pm 0,4$ мкМ) и лаевиусколизид D (**142**) ($ИК_{50} = 2,2 \pm 0,3$ мкМ).

Иммуномодулирующая активность веществ (влияние на уровень внутриклеточных АФК) изучалась при концентрации 0,1 мкМ на перитонеальных макрофагах мышей. Гранулатозид D (**130**) проявил двунаправленное действие: он увеличивал уровень АФК на 20% в интактных макрофагах и снижал его на 21% в макрофагах, предварительно обработанных ЛПС из *E. coli*. В то же время, линкозид В (**139**) снижал уровень АФК в ЛПС-активированных макрофагах на 28% [74].

Спикулиферозиды А–С (**145–147**), выделенные из морской звезды *H. leviuscula spiculifera*, были протестированы *in vitro* на цитотоксическую и антипролиферативную активности в отношении нескольких линий человеческих клеток: эмбриональных клеток почек HEK293, меланомы SK-MEL-28, рака молочной железы MDA-MB-231 и колоректального рака НСТ 116. При концентрациях до 100 мкМ все три соединения проявили незначительную цитотоксичность по отношению к клеткам HEK293, SK-MEL-28 и MDA-MB-231. Наиболее выраженный эффект наблюдался по отношению к клеткам НСТ 116. Спикулиферозид С (**147**) показал наибольшую активность при подавлении жизнеспособности со значением $ИК_{50} = 87,6$ мкМ (индекс селективности ИС = 1,5 относительно нормальных клеток HEK293). Все три соединения дозозависимо ингибировали пролиферацию и образование колоний клеток в мягком агаре в нетоксичных концентрациях (10–40 мкМ); максимальное ингибирование колониеобразования соединениями **145**, **146** и **147** составило 65, 81 и 87% соответственно.

Для соединения **147** был дополнительно исследован механизм противоопухолевого действия. Установлено, что спикулиферозид С вызывает дозозависимую остановку клеточного цикла в фазе G2/M (увеличение доли клеток в этой фазе до 71% при концентрации 40 мкМ). На молекулярном уровне выявлено дозозависимое снижение экспрессии циклинзависимой киназы CDK2 и циклина D1, повышение уровня ингибитора p21, а также подавление фосфорилирования киназ c-Raf, MEK1/2 и ERK1/2, что указывает на ингибирование сигнального пути MAPK/ERK1/2 [75].

Биологическая активность пектиниферозидов А–J (**149–158**) из морской звезды *P. pectinifera* оценивалась *in vitro* и *in vivo*. Ни одно из соединений не проявило

эмбриотоксичности или тератогенности в отношении эмбрионов *Oryzias melastigma* при концентрации 100 мкМ. Также не выявлено значимой цитотоксичности по отношению к пяти линиям раковых клеток человека (HL-60 – клетки острого миелоидного лейкоза, A549 – клетки аденокарциномы легкого человека, HepG2 – клетки гепатоцеллюлярной человека, MDA-MB-231 – клетки трижды негативного рака молочной железы, SW480 – клетки рака толстой кишки человека) при концентрации 40 мкМ и противовоспалительной активности (ингибирование продукции оксида азота в клетках RAW264.7, стимулированных ЛПС) при концентрации 50 мкМ [76].

Биологическая активность гликозидов полигидроксистероидов **159–161**, выделенных из морской звезды *A. amurensis*, была исследована *in vivo* на эмбрионах *O. melastigma*. При концентрации 100 мкМ астамуренозиды А (**159**) и С (**161**) не вызывали смертности эмбрионов в течение 96 часов после оплодотворения. Астамуренозид В (**160**) проявил умеренную тератогенность: максимальное значение показателя мальформаций превысило 9 баллов к 48 часам после оплодотворения. В то же время, летальность оставалась низкой (<27% к 96 часам после оплодотворения). Ни одно из трех соединений не проявило выраженной эмбриотоксичности, однако все три соединения индуцировали снижение спонтанной двигательной активности эмбрионов, что может указывать на нейротоксический потенциал [77].

Приведенные литературные данные свидетельствует о том, что гликозиды полигидроксистероидов морских звезд представляют собой перспективный класс биоактивных соединений с полифункциональным профилем действия. Установлено, что биологическая активность данных метаболитов не ограничивается цитотоксичностью, которая часто носит селективный характер в отношении различных линий опухолевых клеток и коррелирует с особенностями гликозилирования и гидроксирования стероидного остова. Значительный интерес представляют выявленные противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства, реализующиеся через ингибирование продукции оксида азота, модуляцию уровня внутриклеточных АФК и подавление фосфорилирования ключевых компонентов MAPK/ERK-сигнального пути. Вместе с тем, данные о снижении спонтанной двигательной активности эмбрионов под действием соединений указывают на их потенциальное взаимодействие с нервной системой, что требует углубленного изучения нейротрофического и нейропротекторного потенциала данной группы веществ. Несмотря на значительное количество полученных результатов, молекулярные механизмы действия многих гликозидов изучены фрагментарно, а взаимосвязи «структура-активность» нуждаются в дальнейших исследованиях. В связи с этим, актуальными направлениями исследований являются

расширение скрининга физиологической активности, а также детальный анализ механизмов противоопухолевого и иных видов действия для оценки перспективности данных метаболитов в качестве прототипов новых лекарственных средств.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Основные подходы к выделению и установлению строения сфинголипидов и гликозидов полигидроксистероидов морских звезд

Выделение индивидуальных низкомолекулярных метаболитов из тканей морских звезд представляет собой сложную многоэтапную задачу, обусловленную высоким содержанием липидных компонентов, структурным разнообразием вторичных метаболитов и наличием сопутствующих балластных веществ. В современной практике химии морских природных соединений основным подходом к получению липидных фракций остается использование методов жидкостной экстракции органическими растворителями различной полярности. Классическим методом, широко применяемым для выделения общих липидов из биологических тканей, является метод Фолча, предполагающий использование смеси хлороформ-метанол в соотношении 2:1. В ходе данной работы для увеличения выходов целевых соединений использовалась модификация данного подхода, включающая последовательную экстракцию смесями хлороформ-метанол и этанолом, с последующим объединением экстрактов, что позволило эффективно извлечь как неполярные, так и полярные фракции сфинголипидов и гликозидов полигидроксистероидов.

Первичное разделение полученных концентрированных экстрактов проводили методом жидкость-жидкостной экстракции в делительной воронке. Распределение веществ между водой и органическими растворителями (этилацетат, *n*-бутанол) позволяет отделить целевые метаболиты от высокополярных водорастворимых соединений и неполярных триацилглицеридов. Дальнейшее фракционирование органических экстрактов осуществлялось методом колоночной хроматографии на силикагеле. Использование ступенчатого градиента элюирования с увеличением полярности растворителей (от хлороформа к смесям с метанолом и водой) обеспечивало эффективное разделение соединений, обусловленное особенностями их адсорбционных характеристик. Для более тонкой очистки фракций, обогащенных гликозидами полигидроксистероидов, дополнительно применялась хроматография на флорисиле.

Ключевым этапом очистки соединений являлась ВЭЖХ. Применение полупрепаративных колонок с обращенно-фазовыми сорбентами (например, Diasfer-110-C18, Discovery C18) в изократическом или градиентном режиме позволило выделить индивидуальные вещества в чистом виде, пригодном для спектрального анализа. Контроль чистоты соединений и мониторинг хроматографического разделения проводили методом ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

Установление химического строения выделенных соединений базировалось на использовании комплекса физико-химических методов. Основным инструментом структурной идентификации являлась спектроскопия ЯМР. Регистрация спектров ЯМР ^1H и ^{13}C , с использованием двумерных экспериментов (COSY, HSQC, HMBC, ROESY) позволяла определить углеводородный скелет молекулы, типы функциональных групп, конфигурацию гликозидных связей и места присоединения моносахаридных остатков. ИЭР-МС высокого разрешения использовалась для определения брутто-формулы соединений, а данные тандемной масс-спектрометрии предоставляли информацию о фрагментации молекул, подтверждая наличие церебридных, стероидных и углеводных фрагментов. ИК спектроскопия служила для идентификации основных функциональных групп (гидроксильные, амидные, сложноэфирные).

Определение абсолютной стереохимии асимметрических центров и принадлежности моносахаридов к *D*- или *L*-ряду требовало применения химических методов. Кислотный гидролиз гликозидов трифторуксусной кислотой с последующим анализом полученных производных моносахаридов (ацетатов октилгликозидов) методом ГЖХ позволил отнести моносахаридные остатки к тому или иному типу энантиомеров. Анализ жирнокислотного состава сфинголипидов проводили после метанолиза соединений с использованием ГЖХ-МС анализа метиловых эфиров жирных кислот. Конфигурация двойных связей в жирных кислотах и сфингоидных основаниях устанавливалась на основании величин КССВ в спектрах ЯМР ^1H , химических сдвигов аллильных атомов углерода в спектрах ЯМР ^{13}C , а также с помощью получения производных ДМОЗ для полиненасыщенных жирных кислот.

3.2 Сфинголипиды из морской звезды *Leptasterias polaris acervata*

Концентрированный метанол-хлороформ-этанольный экстракт морской звезды *L. polaris acervata* был разделен между H_2O и органической фазой EtOAc/BuOH. Фракцию, растворимую в EtOAc/BuOH разделяли с помощью хроматографии на колонке с силикагелем, используя системы CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ и *n*-гексан/EtOAc/MeOH с последующей ВЭЖХ на полупрепаративных колонках Diasfer-110-C18 и Discovery HS F5-5. В результате было получено два новых цереброзида – лептастериациреброзида А (162) и В (163), а также два известных цереброзида – астроцереброзид В (29) и астериациреброизд С (34) (Схема 1), которые ранее были выделены из морских звезд *A. amurensis* и *A. latespinosus* соответственно.

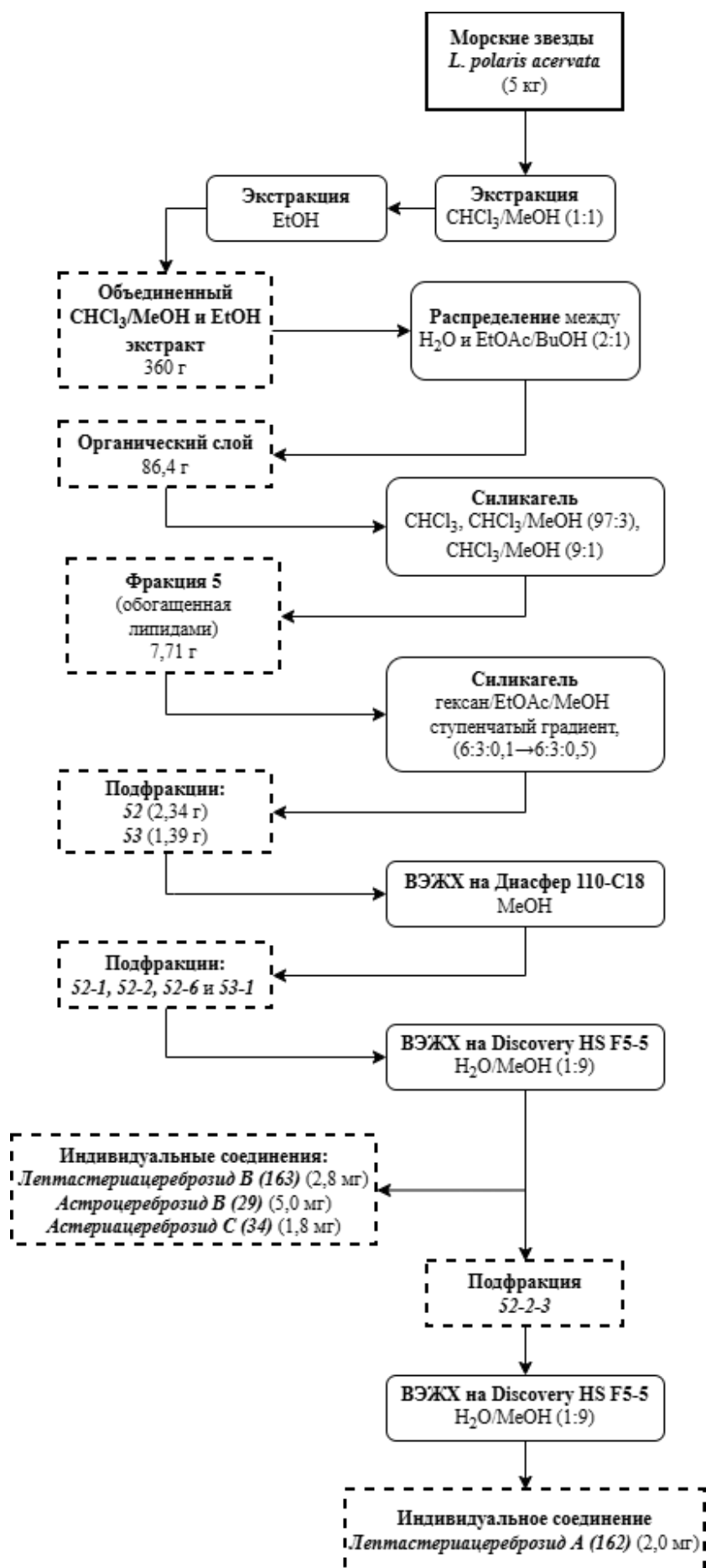
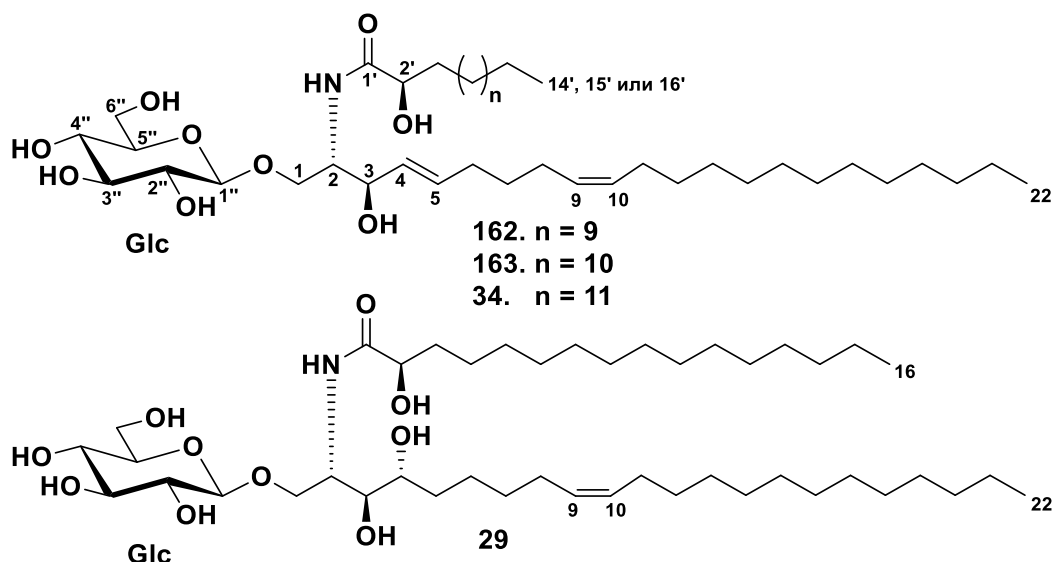


Схема 1 – Схема выделения цереброзидов из морской звезды *L. polaris acervata*



Молекулярная формула соединения **162** была определена как $C_{42}H_{79}NO_9$ на основании значений пиков ионов $[M + Na]^+$ с m/z 764,5642 в (+)ИЭР-МС высокого разрешения и $[M - H]^-$ с m/z 740,5674 в (–)ИЭР-МС высокого разрешения. В инфракрасном спектре соединения **162** наблюдаются полосы поглощения, характерные для вон гидроксильных (3333 см^{-1}) и $\nu_{C=O}$ амидных ($1643, 1543\text{ см}^{-1}$) групп. В спектрах ЯМР 1H и ^{13}C ДЦО и ЖК **162** присутствуют сигналы протонов и атомов углерода двух концевых метилов CH_3-22 и CH_3-14' [δ_H $2 \times 0,88$ м.д. (т, $J = 6,5$ Гц); δ_C $2 \times 14,0$ м.д.], трех оксигенированных групп CH_2-1 [δ_{Ha} 4,70 м.д. (м), δ_{Hb} 4,26 м.д. (дд, $J = 10,7; 3,7$ Гц); δ_C 69,9 м.д.], $CH-3$ (δ_H 4,77 м.д. (м); δ_C 72,1 м.д.) и $CH-2'$ (δ_H 4,58 м.д. (м); δ_C 72,3 м.д.), 4(5)-двойной связи [δ_H 5,97 м.д. (дд, $J = 15,4; 6,3$ Гц), 5,92 м.д. (дт, $J = 15,4; 6,5$ Гц); δ_C 131,5 м.д.; 132,5 м.д.], 9(10)-двойной связи (δ_H $2 \times 5,51$ м.д. (м); δ_C $2 \times 130,1$ м.д.), одной амидной группы $NH-CO$ [δ_H 8,33 м.д. (д, $J = 8,9$ Гц); δ_C 175,4 м.д.], и одного характеристического метина $CH-2$ (δ_H 4,81 м.д. (м); δ_C 54,4 м.д.), связанного с атомом азота (Таблица 2). Таким образом, в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C соединения **162** наблюдаются характерные сигналы ненасыщенного церамида сфингозинового вида с 2-гидроксизирной кислотой.

Таблица 2 – Данные спектров ЯМР 1H (700,13 МГц) и ^{13}C (125,76 МГц) соединений **162** и **163** в C_5D_5N при 30 °С, δ в м.д., J в Гц.

Положение	δ_H (J)	δ_C
1a,b	4,70 м; 4,26 дд (10,7; 3,7)	69,9
2	4,81 м	54,4
2-NH	8,33 д (8,9)	
3	4,77 м	72,1
3-OH	6,77 д (4,0)	
4	5,97 дд (15,4; 6,3)	131,5
5	5,92 дт (15,4; 6,5)	132,5
6	2,08 м	32,5

Продолжение таблицы 2

Положение	$\delta_H (J)$	δ_C
7	1,39 м	29,3
8	2,13 м	27,3
9	5,51 м	130,1
10	5,51 м	130,1
11	2,13 м	27,3
20	1,24 м	32,0
21	1,26 м	22,7
22	0,88 т (6,5)	14,0
ЖК		
1'	—	175,4
2'	4,58 м	72,3
2'-ОН	7,53 уш. с	
3'	2,02 м; 2,21 м	35,5
4'	1,71 м; 1,81 м	25,7
12' или 13'	1,24 м	32,0
13' или 14'	1,26 м	22,7
14' или 15'	0,88 т (6,5)	14,0
Glc		
1''	4,92 д (7,7)	105,4
2''	4,03 м	74,9
3''	4,20 м	78,3
4''	4,19 м	71,3
5''	3,90 м	78,3
6''	4,34 м	62,4
6'''-ОН	4,50 уш. с (12,0) 6,27 уш. с	—

Кроме того, керамидная часть соединения **162** имеет нормальный тип углеводородных цепей сфингозинового основания и жирной кислоты: в спектре ЯМР ^{13}C сигналы атомов концевых метильных групп наблюдаются только при δ_C 14,0 м.д. (нормальный тип). Корреляции ^1H - ^1H COSY и HSQC в спектрах соединения **162** выявили соответствующие последовательности протонов от C-1 до C-11; от C-20 до C-22; от C-2 до NH; от C-2' до C-4' и от C-12' до C-14'. Ключевые кросс-пики в спектре HMBSC, в том числе H-1a/C-2, C-3, C-1''; H-1b/C-3, C-1''; H-3/C-2; H-4/C-3, C-6; H-5/C-3, C-6; H-6/C-4, C-5, C-7; H-7/C-8, C-9; H-8/C-7, C-9, C-10; H-9/C-8, C-11; H-10/C-8, C-11; H-11/C-9, C-10; H-20/C-21; H-21/C-20, C-22; H-22/C-20, C-21; NH/C-2, C-1'; H-3'/C-2', C-4'; H-12'/C-13'; H-13'/C-12', C-14'; и H-14'/C-12', C-13' подтвердили общую структуру керамидной части соединения **162** (Рисунок 2).

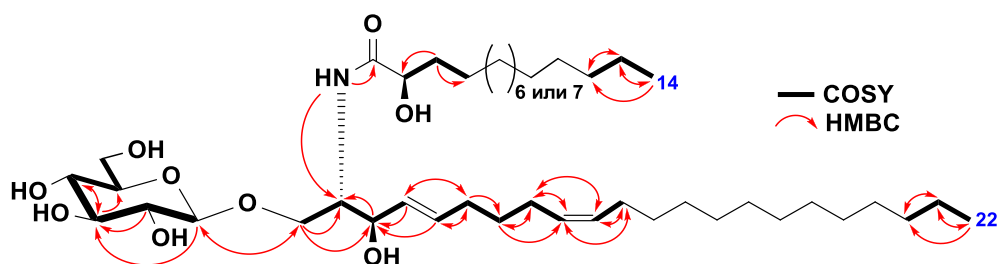


Рисунок 2 – ^1H - ^1H COSY и ключевые HMBC корреляции в спектрах соединений **162** и **163**

В спектре ЯМР ^1H соединения **162** наблюдается сигнал аномерного протона в области 4,92 м.д. (д, $J = 7,7$ Гц), коррелирующий в спектре HSQC с сигналом аномерного атома углерода при δ_{C} 105,4. Значение константы спин-спиновой взаимодействия аномерного протона (7,7 Гц) указывает на β -конфигурацию гликозидной связи. Двумерные эксперименты ЯМР позволили идентифицировать сигналы всех протонов и атомов углерода в углеводной части, характерные для остатка глюкопиранозы. Присоединение остатка глюкозы к атому C-1 церамидной части в соединении **162** было установлено на основании данных HMBC спектра, где наблюдается кросс-пик между сигналами H-1' Glc и C-1 агликона. Выявленные дополнительные корреляции H-1''/C-3''; H-2''/C-3''; H-3''/C-4'', C-5''; и H-4''/C-3'' в спектре HMBC также подтвердили структуру остатка глюкопиранозы в соединении **162**.

Данные МС/МС масс-спектров обеспечили получение дополнительных сведений о структуре. В спектре (+)ИЭР-МС/МС иона с m/z 764 наблюдаются пики, соответствующие моносахаридному звену, с m/z 203 $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{Na}]^+$ и 185 $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}]^+$, а также некоторые характерные фрагментные пики, относящиеся к церамидной части с m/z 602 $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ (потеря углеводного остатка), 538 $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2]^+$ (разрыв амидной связи) и фрагментный пик, соответствующий остатку жирной кислоты, с m/z 292 $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_2\text{Na}]^+$ (одновременная потеря углеводного фрагмента и разрыв связи между C-2 и C-3). В спектре (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 740 также наблюдаются пики, подтверждающие присутствие гексозы: с m/z 179 $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6]^-$, 149 $[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5]^-$ и 119 $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_4]^-$, наряду с рядом характерных для церамидной части пиков фрагментных ионов с m/z 578 $[(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ и 560 $[(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]^-$ (потеря углеводного фрагмента), 362 $[(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}]^-$ (одновременная потеря моносахаридного фрагмента и разрыв связи между C-1' и C-2'), 334 $[(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2]^-$ (одновременная потеря углеводного фрагмента и разрыв амидной связи), 293 $[\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}]^-$ (разрыв связи между C-2 и C-3), 268 $[(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}]^-$ (одновременная потеря углеводного фрагмента и разрыв связи между C-2 и C-3), 242 $[\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{NO}_2]^-$ (разрыв связи между NH и C-2), 225 $[\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_2]^-$ (разрыв амидной связи) и 197 $[\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}]^-$ (разрыв связи между C-1' и C-2'). Эта картина фрагментации подтвердила

наличие насыщенной 2-гидрокситетрадекановой кислоты, диненасыщенного C₂₂-ДЦО и остатка гексозы в соединении **162** (Рисунок 3).

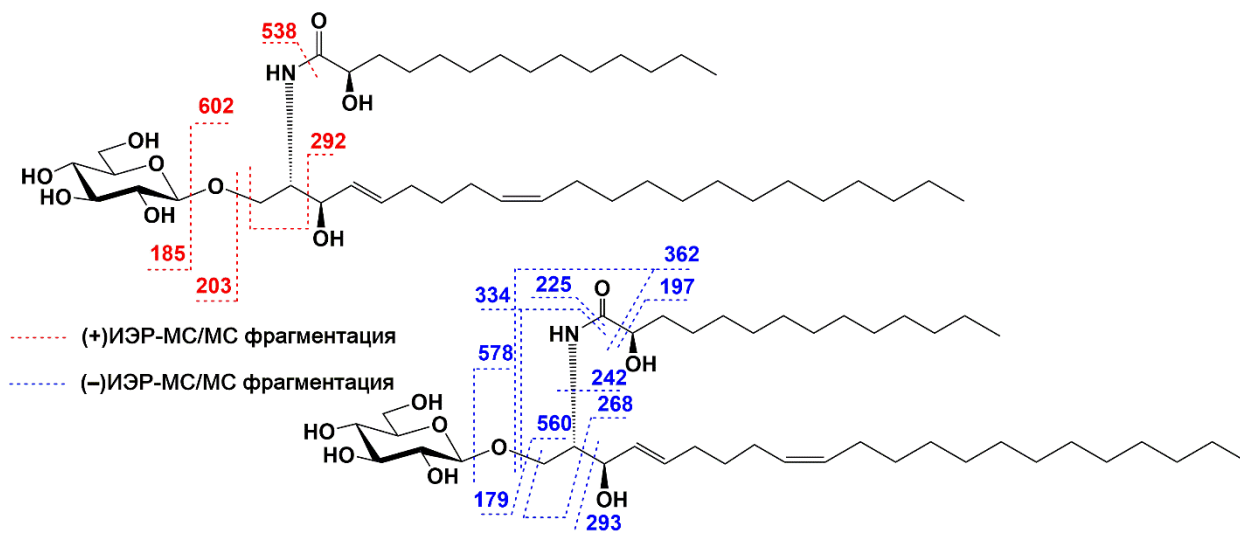


Рисунок 3 – Пики ионов ключевых фрагментов в спектрах ИЭР-МС/МС соединения **162**

Кислотный гидролиз соединения **162** под действием 2М ТФУ привел к получению свободной жирной кислоты (ЖК-1) и моносахаридного остатка. Величина оптического вращения ЖК-1 ($[\alpha]_D^{25} -3,3$ (c 1,0, CHCl₃)) согласуется с известными литературными данными для (2*R*)-2-гидроксигирных кислот [79, 80]; на основании этого абсолютная стереохимия центра С-2' была определена как *R*. Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C ДЦО церамидной части соединения **162** хорошо согласуются с данными ранее известных астерацереброзида G [40] из *A. amurensis* и цереброзидов из *C. patagonicus* [81] с (2*S*,3*R*)-конфигурацией асимметрических центров в ДЦО, что позволило предположить абсолютную конфигурацию сетреогенных атомов С-2 и С-3 как 2*S*,3*R*. (*E*)-Конфигурация 4(5)-двойной связи была определена на основании величины КССВ между Н-4 и Н-5 ($J = 15,4$ Гц) в спектре ЯМР ¹H **162**. (*Z*)-Конфигурация 9(10)-двойной связи подтверждена значениями химических сдвигов аллильных атомов углерода С-8 и С-11 ($\delta_C 2 \times 27,3$ м.д.) в спектре ЯМР ¹³C соединения **162** (27,5 м.д. для (*Z*)-геометрии и 32,9 м.д. для (*E*)-геометрии) [82]. Расположение 9(10)-двойной связи в фрагменте ДЦО определяли с помощью экспериментов ¹H-¹H COSY и HMBC. Алкоголиз моносахарида с (2*R*)-(-)-2-октанолом с последующим ацетилированием, ГЖХ-анализом и сравнением с хроматограммами соответствующих производных стандартных моносахаридов позволили установить *D*-конфигурацию β-глюкопиранозного остатка соединения **162**.

На основании всех приведенных выше данных структура лептастерацереброзида А (**162**) была установлена как (2*S*,3*R*,4*E*,9*Z*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситетрадеканоиламино]-4,9-докозадиен-3-ол.

Молекулярная формула соединения **163** была определена как $C_{43}H_{81}NO_9$ на основании присутствия пиков ионов $[M + Na]^+$ с m/z 778,5795 в (+)ИЭР-МС высокого разрешения и $[M - H]^-$ с m/z 754,5845 в (–)ИЭР-МС высокого разрешения. В ИК спектре соединения **163** наблюдаются полосы поглощения, характерные для ν_{OH} гидроксильных (3333 см^{-1}) и $\nu_{C=O}$ амидных ($1643, 1543\text{ см}^{-1}$) групп. Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C были аналогичны таковым для соединения **162** (Таблица 2). На основании тщательного анализа спектров ЯМР цереброзидов **162** и **163** было предположено, что керамидная часть соединения **163** почти идентична таковой в соединении **162**. Однако сравнение молекулярных масс соединений **162** и **163** показало, что они отличаются на 14 а.е.м.

Спектры МС/МС соединения **163** были очень похожи на таковые для соединения **162**, с незначительными различиями в значениях m/z ключевых фрагментов, что позволило предположить наличие дополнительной метиленовой группы в остатке жирной кислоты. В (+)ИЭР-МС/МС спектре иона с m/z 778 наблюдаются фрагментные пики, соответствующие моносахаридному остатку, с m/z 203 $[C_6H_{12}O_6Na]^+$ и 185 $[C_6H_{10}O_5Na]^+$, а также некоторые характерные фрагментные пики, относящиеся к керамидной части, с m/z 616 $[(M + Na) - C_6H_{10}O_5]^+$ (потеря углеводного фрагмента), 538 $[(M + Na) - C_{15}H_{28}O_2]^+$ (разрыв амидной связи), и пик фрагмента, соответствующий остатку жирной кислоты с m/z 306 $[M + Na - C_6H_{12}O_6 - C_{20}H_{36}O]^+$ (одновременная потеря моносахаридного остатка и разрыв связи между C-2 и C-3). В (–)ИЭР-МС/МС спектре иона с m/z 754 наблюдаются фрагментные пики, подтверждающие присутствие гексозы, с m/z 179 $[C_6H_{11}O_6]^-$, 149 $[C_5H_9O_5]^-$ и 119 $[C_4H_7O_4]^-$, вместе с рядом пиков фрагментных ионов, характерных для керамидной части, с m/z 592 $[(M - H) - C_6H_{10}O_5]^-$ и 574 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6]^-$ (потеря углеводного фрагмента), 362 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6 - C_{14}H_{28}O]^-$ (одновременная потеря углеводного фрагмента и разрыв связи между C-1' и C-2'), 334 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6 - C_{15}H_{28}O_2]^-$ (одновременная потеря моносахаридного остатка и разрыв амидной связи), 293 $[C_{20}H_{37}O]^-$ (разрыв связи между C-2 и C-3), 282 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6 - C_{20}H_{36}O]^-$ (одновременная потеря углеводного фрагмента и разрыв связи между C-2 и C-3), 256 $[C_{15}H_{30}NO_2]^-$ (разрыв связи между NH и C-2), 239 $[C_{15}H_{27}O_2]^-$ (разрыв амидной связи) и m/z 211 $[C_{14}H_{27}O]^-$ (разрыв связи между C-1' и C-2') (Рисунок 4). Таким образом, структура лептастериациреброзида В (**163**) была установлена как (2*S*,3*R*,4*E*,9*Z*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксипентадеcanoиламино]-4,9-докозодиен-3-ол.

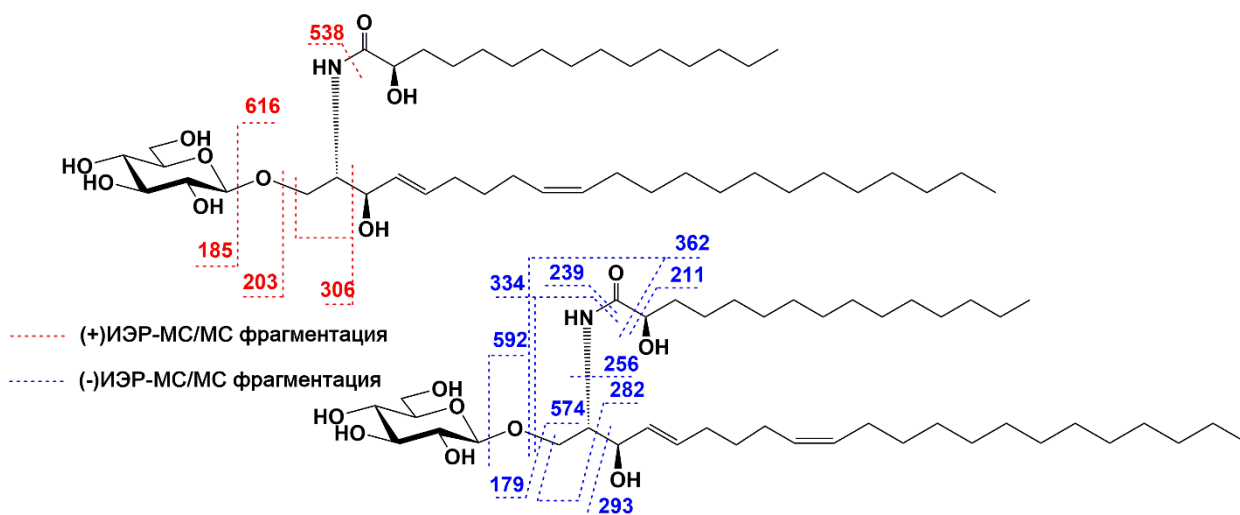


Рисунок 4 – Схема образования ионов ключевых фрагментов в спектрах ИЭР-МС/МС соединения **163**

Новые цереброзиды, названные нами лептастериациреброзидами А (**162**) и В (**163**), представляют собой глюкоцереброзиды, содержащие ДЦО Δ^9 -сфингозина нормального типа. Лептастериациреброзид А (**162**) содержит C_{22} -сфингозиновое основание, связанное с 2-гидрокситетрадекановой кислотой (2-ОН $C_{14:0}$), в то время как ДЦО в лептастериациреброзида В (**163**) связано с 2-гидроксипентадекановой кислотой (2-ОН $C_{15:0}$). Следует отметить, что для морских звезд известно 23 соединения, содержащих сфингозиновое основание с длиной в 22 атома углерода, из которых лишь одно представляет собой Δ^9 -сфингозин нормального типа. Также известно о существовании четырех сфинголипидов морских звезд, содержащих C_{15} -2-гидроксижирную кислоту, и лишь одного, содержащего C_{14} -2-гидроксижирную кислоту.

3.3 Сфинголипиды из морской звезды *Ceramaster patagonicus*

Концентрированный метанол-хлороформ-этанольный экстракт морской звезды *C. patagonicus* разделяли между H_2O и органической фазой EtOAc/BuOH, органический слой высушивали и промывали холодным ацетоном. Растворимую в ацетоне фракцию отделяли хроматографией на колонке с силикагелем с последующей ВЭЖХ на полупрепаративных колонках Diasfer-110-C18, Discovery C18 и Discovery HS C18-10 (Схема 2). В результате было получено три новых церамида (**164–166**) и три новых цереброзида (**167–169**) наряду с тремя известными цереброзидами: офидиациреброзидами С (**45**) и D (**46**), которые ранее были выделены из пурпурной морской звезды *O. ophidianus* [51] и CE-3-2 (**63**) – из голотурии *Cucumaria echinata* [83].

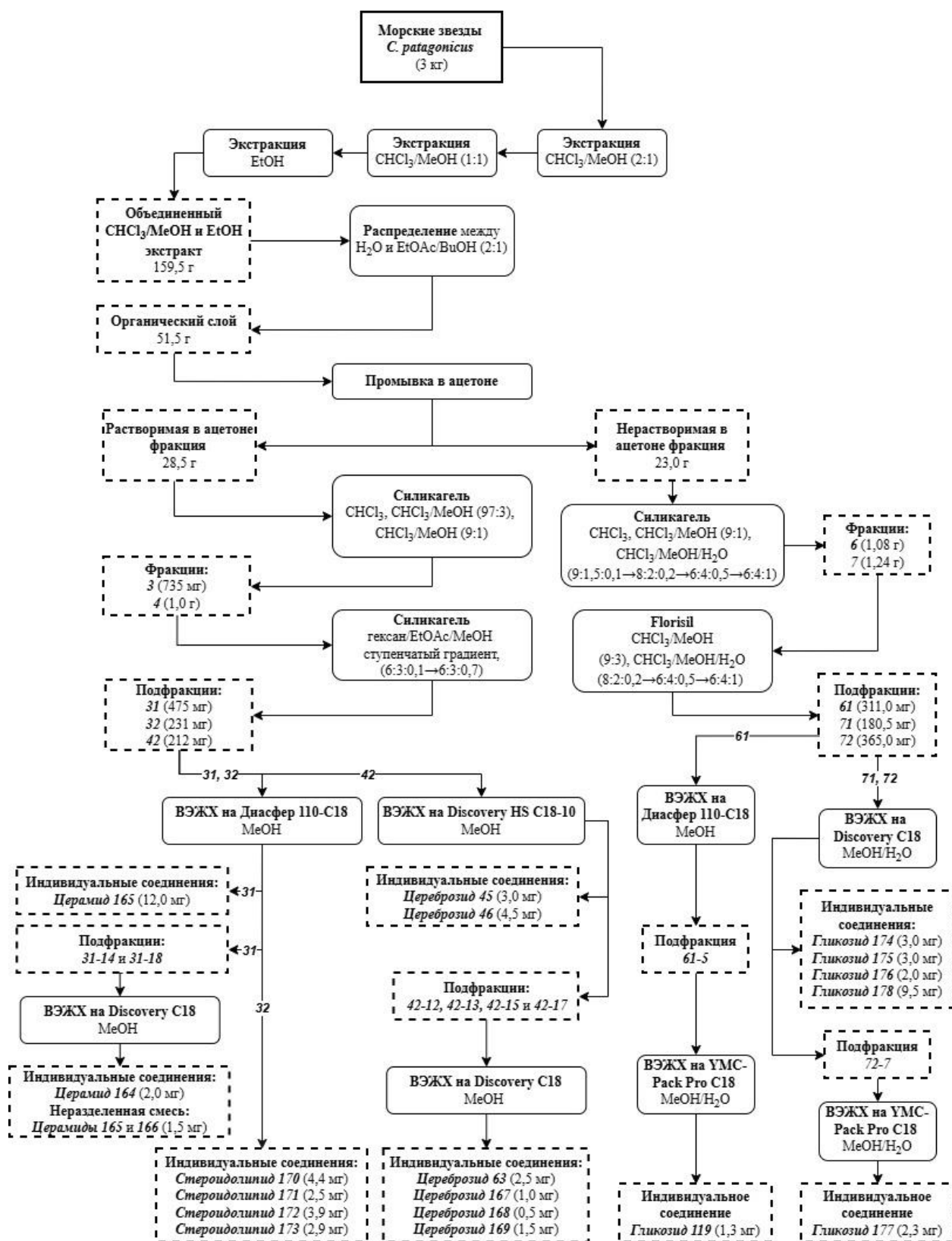
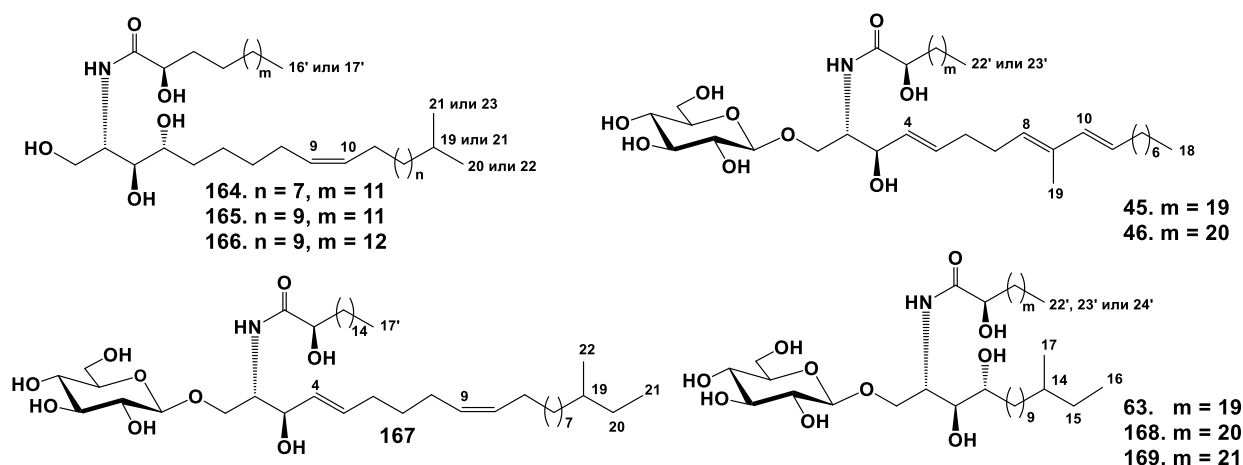


Схема 2 – Схема выделения сфинголипидов, стероидоллипидов и полигидроксистероидов из морской звезды *C. patagonicus*



Молекулярную формулу соединения **164** определили как $C_{37}H_{73}NO_5$ исходя из значений пиков ионов катионизированной молекулы $[M + Na]^+$ с m/z 634,5376 в (+)ИЭР-МС высокого разрешения и депротонированной молекулы $[M - H]^-$ с m/z 610,5412 в (–)ИЭР-МС высокого разрешения. ИК спектр соединения **164** показывает присутствие ν_{OH} гидроксильных (3402 см^{-1}) и $\nu_{C=O}$ амидной ($1656, 1523\text{ см}^{-1}$) групп. Спектры ЯМР 1H и ^{13}C соединения **164** содержат сигналы протонов и атомов углерода трех концевых метилов CH_3 -20, CH_3 -21 и CH_3 -16' [$\delta_H 2 \times 0,88$ м.д. (д, $J = 6,5$ Гц), $0,89$ м.д. (т, $J = 7,2$ Гц); $\delta_C 2 \times 22,5, 14,0$ м.д.], четырех окисгенированных групп CH_2 -1 [$\delta_{Ha} 4,51$ м.д. (дт, $J = 10,9; 4,2$ Гц), $\delta_{Hb} 4,43$ м.д. (м); $\delta_C 61,8$ м.д.], CH -3 ($\delta_H 4,34$ м.д. (м); $\delta_C 76,7$ м.д.), CH -4 ($\delta_H 4,28$ м.д. (м); $\delta_C 72,8$ м.д.) и CH -2' ($\delta_H 4,62$ м.д. (м); $\delta_C 72,3$ м.д.), одной амидной группы NH -CO [$\delta_H 8,55$ м.д. (д, $J = 9,0$ Гц); $\delta_C 175,0$ м.д.], 9(10)-двойной связи ($\delta_H 5,50$ м.д. (м), $5,48$ м.д. (м); $\delta_C 130,1, 129,9$ м.д.) и одного характерного метина CH -2 [$\delta_H 5,10$ м.д. (секстет, $J = 4.5$ Гц); $\delta_C 52,8$ м.д.], связанного с атомом азота. Таким образом, спектры ЯМР 1H и ^{13}C соединения **164** демонстрируют характерные сигналы ненасыщенного церамида фитосфингозинового типа с 2-гидроксижирной кислотой (Таблица 3). Кроме того, церамид **164** имеет нормальные и *изо*-типы боковых цепей. На это указывают сигналы атомов углерода концевых метильных групп, наблюдающиеся в спектрах ЯМР ^{13}C при $\delta_C 14,0$ м.д. (нормальный тип) и $2 \times 22,5$ м.д. (*изо*-тип). Корреляции 1H - 1H COSY и HSQC в спектрах соединения **164** выявили соответствующие последовательности протонов от C-1 до C-11; от C-20 до C-21 через C-19; от C-2 до NH; от C-2' до C-4' и от C-16' до C-14'. Ключевые кросс-пики в спектре НМВС, такие как H-1b/C-3; H-2/C-1, C-3, C-1'; H-3/C-2, C-4; H-5b/C-4, C-6, C-7; H-8/C-6, C-7, C-9, C-10; H-9 и H-10/C-8, C-11; H-11/C-9, C-10; H-19/C-20, C-21; H₃-20/C-19, C-21; H₃-21/C-19, C-20; NH/C-2, C-1'; H-2'/C-1'; H_a-3'/C-1', C-4'; H_b-3'/C-2'; H₂-15'/C-14' и H₃-16'/C-14', C-15', подтвердили общую структуру церамида **164** (Рисунок 5).

Таблица 3 – Данные спектров ЯМР ^1H (700,13 МГц) и ^{13}C (176,04 МГц) соединений **164–166** в $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ при 30 °С, δ в м.д., J в Гц.

Положение	δ_{H} (J)	δ_{C}	Положение	δ_{H} (J)	δ_{C}
1a	4,51 дт (10,9; 4,2)	61,8	11	2,10 кв (6,7)	27,3
1b	4,43 м				
1-ОН	6,60 м		19 или 21	1,51 м	27,9
2	5,10 секст (4,5)	52,8	20 или 22	0,88 д (6,5)	22,5
3	4,34 м	76,7	21 или 23	0,88 д (6,5)	22,5
3-ОН	6,59 д (6,8)		НН	8,55 д (9,0)	
4	4,28 м	72,8	1'		175,0
4-ОН	6,14 д (6,5)		2'	4,62 м	72,3
5a	2,28 м	33,9	2'-ОН	7,53 д (5,1)	
5b	1,95 м				
6a	1,74 м	26,1	3'a	2,24 м	35,5
6b	1,39 м		3'b	2,05 м	
7a	1,58 м	30,2	4'a	1,80 м	25,6
7b	1,53 м		4'b	1,73 м	
8	2,17 кв (7,0)	27,5	14' или 15'	1,25 м	31,9
9	5,50 м	130,1	15' или 16'	1,27 м	22,7
10	5,48 м	129,9	16' или 17'	0,89 т (7,2)	14,0

Длину полиметиленовых цепей в ДЦО и ЖК и абсолютную конфигурацию стереогенных центров в церамиде **164** определяли следующим образом. При метанолизе соединения **164** метанольным раствором соляной кислоты был получен МЭЖК вместе с ДЦО. Анализ МЭЖК методом ГЖХ-МС показал наличие одного компонента, который был охарактеризован как насыщенный метиловый эфир 2-гидроксигексадекановой кислоты нормального типа. Нормальный тип МЭЖК был также подтвержден спектрами ЯМР ^1H , в которых присутствовал только триплет концевой метильной группы при δ_{H} 0,89 м.д. Значение оптического вращения МЭЖК ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} -3,5$ ($c = 1,0$, CHCl_3)) соответствовало литературным данным для (2*R*)-2-гидроксижирных кислот ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} -3,21$ [44]), поэтому абсолютная стереохимия центра С-2' в **164** была определена как *R*. Основываясь на данных спектров ЯМР и масс-спектров было предположено, что ДЦО церамида **164** содержит 21 атом углерода и имеет *изо*-тип ненасыщенной полиметиленовой цепи. Геометрия двойной связи в ДЦО может быть определена на основании величины химического сдвига в спектре ЯМР ^{13}C , соответствующего сигналу метиленового углерода, примыкающего к олефиновому углероду ($\delta_{\text{C}} \approx 27$ м.д. для (*Z*)-изомеров и $\delta_{\text{C}} \approx 32$ м.д. для (*E*)-изомеров [82]). Спектр ЯМР ^{13}C соединения **164** показывает присутствие двух характерных сигналов аллильных атомов углерода С-8 (δ_{C} 27,5 м.д.) и С-11 (δ_{C} 27,3 м.д.). Таким образом, было определено, что олефиновая группа в соединении **164** имеет *цис* (*Z*)-геометрию. Местоположение двойной связи в фрагменте ДЦО при С-9 устанавливали с помощью экспериментов ^1H - ^1H COSY, HMBC и 2D TOCSY. Абсолютная конфигурация

асимметрических центров в ДЦО церамида **164** была определена как *D*-рибо-(2*S*,3*S*,4*R*) на основании сходства значения и знака оптического вращения ($[\alpha]_D^{25} +28,0$ ($c = 1,0$, CHCl_3)) ДЦО церамида **164** с соответствующими данными синтетического *D*-рибо-(2*S*,3*S*,4*R*)-фитосфингозина ($[\alpha]_D^{25} +26,8$ ($c = 1,1$, CHCl_3)) [84]. В результате, структура соединения **164** была установлена как (2*S*,3*S*,4*R*,9*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадеcanoиламино]-19-метил-9-эйкозен-1,3,4-триол.

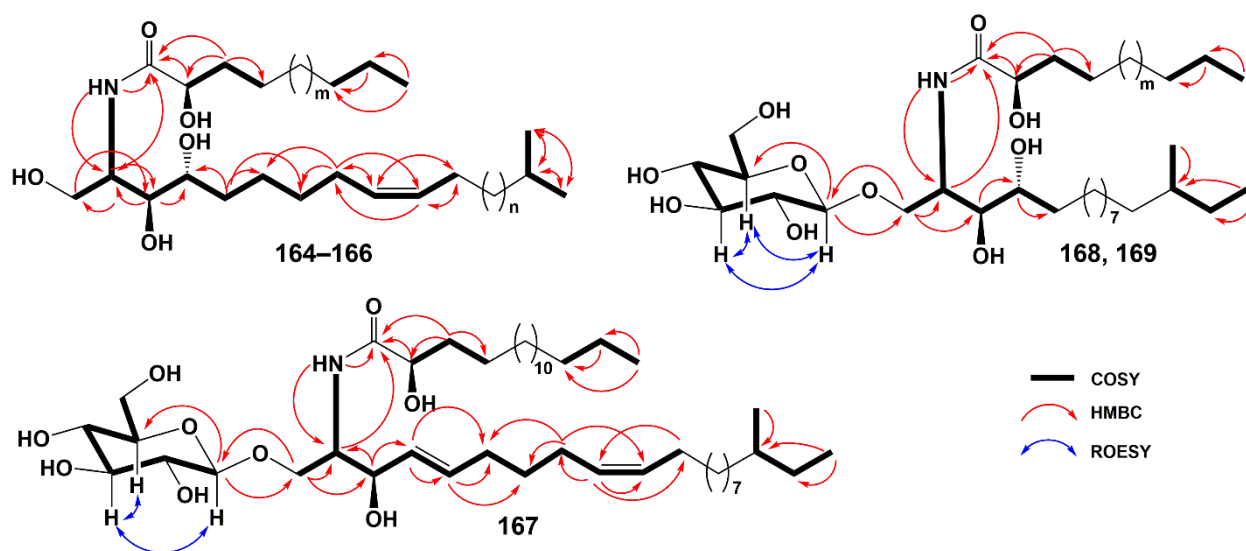


Рисунок 5 – ^1H - ^1H COSY и ключевые ROESY и HMBC корреляции в соответствующих спектрах новых сфинголипидов **164–169** из *C. patagonicus*

Молекулярную формулу соединения **165** определили как $\text{C}_{39}\text{H}_{77}\text{NO}_5$ исходя из значений пиков ионов катионизированной молекулы $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 662,5324 в (+)ИЭР-МС высокого разрешения и депротонированной молекулы $[\text{M} - \text{H}]^-$ с m/z 638,5364 в (–)ИЭР-МС высокого разрешения. ИК спектр соединения **165** показывает присутствие ν_{OH} гидроксильных (3404 cm^{-1}) и $\nu_{\text{C=O}}$ амидной ($1657, 1522 \text{ cm}^{-1}$) групп. Сравнение спектров ЯМР ^1H и ^{13}C и всеобъемлющий анализ 2D спектров ЯМР соединений **164**, **165** и **166** свидетельствуют о том, что ненасыщенные церамиды фитосфингозинового типа с 2-гидроксигирной кислотой в соединениях **165** и **166** идентичны таковому в соединении **164**, но длины полиметиленовых цепей ДЦО и/или ЖК соединений **164–166** отличаются друг от друга. Сравнение молекулярных масс соединений **164** и **165** показало, что они различаются на 28 а.е.м.

Остаток ЖК в соединении **165** был идентифицирован с помощью ГЖХ-анализа. Масс-спектры производного МЭЖК были изучены с помощью ГЖХ-МС аналогично тому, как это было сделано для соединения **164**. Анализ ГЖХ-МС показал, что МЭЖК

соединения **165** идентичен МЭЖК цереброзида **164**. Более того, нормальный тип МЭЖК был также подтвержден спектром ЯМР ^1H , который содержит только триплет протонов концевой метильной группы при δ_{H} 0,89 м.д. Таким образом, было определено, что ЖК перамида **165** представляет собой (2*R*)-2-гидроксигексадекановую кислоту. Основываясь на этом выводе, а также на данных спектров ЯМР и масс-спектров, было предположено, что ДЦО перамида **165** имеет 23 атома углерода и *изо*-тип ненасыщенной полиметиленовой цепи. Соответственно структура **165** была определена как ((2*S*,3*S*,4*R*,9*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадеканоиламино]-21-метил-9-докозен-1,3,4-триол.

Соединение **166** было охарактеризовано в смеси (2:1) с соединением **165** путем оценки интенсивностей ионных пиков в масс-спектрах ИЭР. (+)ИЭР масс-спектр высокого разрешения этой смеси содержит два пика ионов $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 662,5324, соответствующих соединению **165**, и с m/z 676,5463, соответствующих соединению **166**. Следовательно, молекулярная формула соединения **166** была определена как $\text{C}_{40}\text{H}_{79}\text{NO}_5$ исходя из значений пика иона катионизированной молекулы $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 676,5463 в (+)ИЭРМС высокого разрешения и пика депротонированной молекулы $[\text{M} - \text{H}]^-$ с m/z 652,5520 в (-)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. ИК спектр соединения **166** показывает присутствие ν_{OH} гидроксильных (3407 см^{-1}) и $\nu_{\text{C=O}}$ амидных ($1655, 1522\text{ см}^{-1}$) групп. Спектры ЯМР соединений **166** и **165** практически идентичны, но молекулярные массы соединений **166** и **165** отличаются на 14 а.е.м. ГЖХ-МС анализ метиловых эфиров жирных кислот, полученных из смеси **166** и **165**, указывал на наличие насыщенного метилового эфира 2-гидроксигексадекановой кислоты нормального типа для соединения **165**, и метилового эфира 2-гидроксигептадекановой кислоты нормального типа для соединения **166**. Таким образом, соединения **165** и **166** отличаются друг от друга остатками ЖК, C_{16} в соединении **165** и C_{17} – в **166**, и имеют идентичные C_{23} ненасыщенные ДЦО фитосфингозинового типа. В результате, было определено, что структура **166** представляет собой ((2*S*,3*S*,4*R*,9*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигептадеканоиламино]-21-метил-9-докозен-1,3,4-триол.

Молекулярную формулу соединения **167** определили как $\text{C}_{45}\text{H}_{85}\text{NO}_9$ исходя из данных ВР (+) и (-)ИЭР масс-спектров, в которых наблюдаются пик иона катионизированной молекулы $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 806,6110 и пик иона депротонированной молекулы $[\text{M} - \text{H}]^-$ с m/z 782,6154 соответственно. ИК спектр соединения **167** показывает присутствие ν_{OH} гидроксильных (3383 см^{-1}) и $\nu_{\text{C=O}}$ амидных ($1649, 1538\text{ см}^{-1}$) групп. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C соединения **167** содержат сигналы протонов и атомов углерода трех концевых метилов CH_3 -21, CH_3 -22 и CH_3 -17' [δ_{H} 0,87 м.д. (т, $J = 7,3\text{ Гц}$), 0,87 м.д. (д, $J = 6,2\text{ Гц}$), 0,89 м.д. (т, $J = 7,0\text{ Гц}$); δ_{C} 11,3, 19,1, 14,0 м.д.], трех оксигенированных групп CH_2 -1

[δ_{Ha} 4,70 м.д. (дд, $J = 10,6, 5,6$ Гц), δ_{Hb} 4,26 м.д. (дд, $J = 10,6, 4,1$ Гц); δ_C 69,9 м.д.], СН-3 (δ_H 4,77 м.д. (м); δ_C 72,1 м.д.) и СН-2' (δ_H 4,58 м.д. (м); δ_C 72,3 м.д.), одной амидной группы NH-CO [δ_H 8,32 м.д. (д, $J = 9,0$ Гц); δ_C 175,4 м.д.], 4(5)-двойной связи [δ_H 5,99 м.д. (дд, $J = 15,8, 6,2$ Гц), 5,93 м.д. (дт, $J = 15,8, 6,2$ Гц); δ_C 131,7, 132,2 м.д.], 9(10)-двойной связи (δ_H 5,50 м.д. (м), 5,49 м.д. (м); δ_C 130,3, 129,6 м.д.) и одного характеристичного сигнала метиновой группы СН-2, связанной с атомом азота [δ_H 4,81 м.д. (м); δ_C 54,4 м.д.] (Таблица 4).

Таблица 4 – Данные спектров ЯМР 1H (700,13 МГц) и ^{13}C (176,04 МГц) соединений **167–169** в C_5D_5N при 30 °С, δ в м.д., J в Гц.

Положение	167		168, 169	
	$\delta_H (J)$	δ_C	$\delta_H (J)$	δ_C
1a	4,70 дд (10,6, 5,6)	69,9	4,71 дд (10,6, 6,5)	70,3
1b	4,26 дд (10,6, 4,1)		4,53 дд (10,6, 4,4)	
2	4,81 м	54,4	5,26 м	51,5
3	4,77 м	72,1	4,32 дд (12,3, 5,5)	75,7
3-ОН	6,75 д (4,7)	131,7	6,69 д (6,0)	72,4
4	5,99 дд (15,8, 6,2)		4,21 м	
5a	5,93 дт (15,8, 6,2)	132,2	2,24 м	33,9
5b			1,91 м	
6	2,12 м	32,1		
7	1,50 м	29,4		
8	2,11 м	27,2		
9	5,50 м	130,3		
10	5,49 м	129,6		
11	2,12 м	27,0		
19 или 14	1,30 м	34,4	1,30 м	34,5
20a или 15a	1,30 м	36,7	1,30 м	36,8
20b или 15b	1,12 м		1,10 м	
21 или 16	0,87 т (7,3)	11,3	0,86 т (7,5)	11,3
22 или 17	0,87 д (6,2)	19,1	0,86 д (6,4)	19,2
НН	8,32 д (9,0)	175,4	8,54 д (9,2)	175,4
1'				
2'	4,58 м	72,3	4,58 м	72,3
2'-ОН	7,53 д (5,0)	35,4	7,55 м	35,4
3'a	2,21 м		2,20 м	
3'b	2,02 м	25,7	2,01 м	25,0
4'a	1,82 м		1,77 м	
4'b	1,73 м		1,70 м	
Концевой СН ₃	0,89 т (7,0)	14,0	0,88 т (7,0)	14,0
1''	4,92 д (7,8)	105,4	4,95 д (7,9)	105,5
2''	4,03 м	74,9	4,00 м	74,9
2''-ОН	7,11 уш. с	78,2		78,2
3''	4,20 м		4,17 м	
4''	4,20 м	71,4	4,17 м	71,4
5''	3,91 м	78,3	3,89 м	78,3

Продолжение таблицы 4

Положение	167	168, 169		
	δ_H (J)	δ_C	δ_H (J)	δ_C
6''a	4,51 уш. д (12,5)	62,5	4,48 уш. д (12,0)	62,5
6''b	4,35 м		4,33 м	
6''-ОН	6,26 уш. с		6,27 уш. с	

Таким образом, в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C , относящихся к керамидной части соединения **167**, присутствуют характерные сигналы ненасыщенного керамида сфингозинового типа, включающего остаток 2-гидрокси-ЖК. Более того, керамидная часть соединения **167** имеет нормальный и *антеизо*-типы боковых цепей, поскольку в спектре ЯМР ^{13}C сигналы атомов углерода концевых метильных групп наблюдаются при δ_C 14,0 м.д. (нормальный тип) и 11,3 и 19,1 м.д. (*антеизо*-тип). Корреляции ^1H - ^1H COSY и HSQC в спектрах ЯМР соединения **167** указывают на соответствующие последовательности протонов от C-1 до C-11; от C-21 до C-22 через C-19 и C-20; от C-2 до NH; от C-2' до C-4' и от C-16' до C-14'. Ключевые кросс-пики в спектре НМВС, такие как H-1b/C-2, C-3; H-2/C-1'; H-3/C-2, C-4; H-4/C-5, C-6; H-5/C-6, C-7; H-8/C-6, C-7, C-10; H-9/C-8, C-10, C-11; H-11/C-9; H₃-21/C-19, C-20; H₃-22/C-19; NH/C-2, C-1'; H-2'/C-1'; H-3'a/C-1', C-2', C-4'; H₂-16'/C-15'; и H₃-17'/C-15', C-16', подтвердили общую структуру керамидной части соединения **167** (Рисунок 5).

ГЖХ-МС анализ МЭЖК соединения **167** показал наличие одного компонента, принадлежащего насыщенному метиловому эфиру 2-гидроксигептадекановой кислоты нормального типа. Основываясь на этом выводе, а также на данных спектров ЯМР и масс-спектров, мы предположили, что ДЦО керамидной части соединения **167** имеет 22 атома углерода и *антеизо*-тип ненасыщенной полиметиленовой цепи. (*E*)-Конфигурация 4(5)-двойной связи в ДЦО была определена на основании значения КССВ между H-4 и H-5 (15,8 Гц) в спектре ЯМР ^1H соединения **167**. Геометрия 9(10)-двойной связи в ДЦО была определена как *Z* на основании величин химических сдвигов сигналов метиленовых углеродов при δ_C 27,2 м.д. (C-8) и δ_C 27,0 м.д. (C-11) в спектре ЯМР ^{13}C [85]. Местоположение двойной связи в фрагменте ДЦО определяли с помощью экспериментов ЯМР ^1H - ^1H COSY и НМВС. Абсолютная конфигурация центров C-2 и C-3 в ДЦО керамидной части соединения **167** была определена как (2*S*,3*R*) на основании сходства данных его спектра ЯМР ^1H с соответствующими данными для аналогичного спектра ранее известного астриацереброзида G, имеющего (2*S*,3*R*)-конфигурации асимметрических центров [40].

В дополнение к вышеупомянутым сигналам, в спектре ЯМР ^1H соединения **167** содержится сигнал аномерного протона моносахаридного остатка при δ_H 4,92 м.д., который

коррелирует в спектре HSQC с сигналом атома углерода при δ_C 105,4 м.д.. Эксперименты 1H - 1H COSY, HSQC, HMBC и ROESY позволили соотнести сигналы всех протонов и атомов углерода моносахаридного остатка соединения **167**. Величина КССВ (7,8 Гц) аномерного протона указывает на β -конфигурацию гликозидной связи. Данные спектров ЯМР моносахаридной части хорошо совпадали с данными спектров β -глюкопиранозильного остатка известного астериацереброзида **G** из *A. amurensis* [40]. Присоединение моносахарида к керамидной части соединения **167** было установлено при помощи дальних корреляций в спектре HMBC. Наблюдались кросс-пики между H-1" Glc_p и C-1 агликона, а также между H-1 керамидной части и C-1" Glc_p. Был проведен кислотный гидролиз цереброзида **167** под действием 2М ТФУ для подтверждения строения его моносахаридной части. Алкоголиз полученного моносахаридного остатка *R*-(-)-2-октанолом с последующим ацелированием, ГЖХ-анализом и сравнением с данными соответствующих производных стандартных моносахаридов позволили установить *D*-конфигурацию β -глюкопиранозного остатка в соединении **167**.

Наличие моносахаридного остатка и структура керамидной части цереброзида **167** были подтверждены данными ИЭР-МС/МС. Спектр (-)ИЭР-МС/МС пика молекулярного аниона $[M - H]^-$ с m/z 782 содержит фрагментные пики, полученные в результате потери углеводной части с m/z 602 $[(M - H) - 180]^-$ и 179 [гексоза - H] $^-$, а также несколько характерных фрагментных пиков, обусловленных разрывом керамидной части **167**: m/z 326 $[(M - H) - 456]^-$ (потеря моносахаридного остатка и разрыв связи между C-2 и C-3), 310 $[(M - H) - 472]^-$ (потеря моносахаридного остатка и разрыв связи между C-2 и C-3), 293 $[(M - H) - 489]^-$ (разрыв связи между C-2 и C-3), 283/284 $[(M - H) - 499/500]^-$, разрыв связи между C-2 и NH, 267 $[(M - H) - 515]^-$ (разрыв амидной связи) и 239 $[(M - H) - 543]^-$ (разрыв связи между C-1' и C-2') (Рисунок 6).

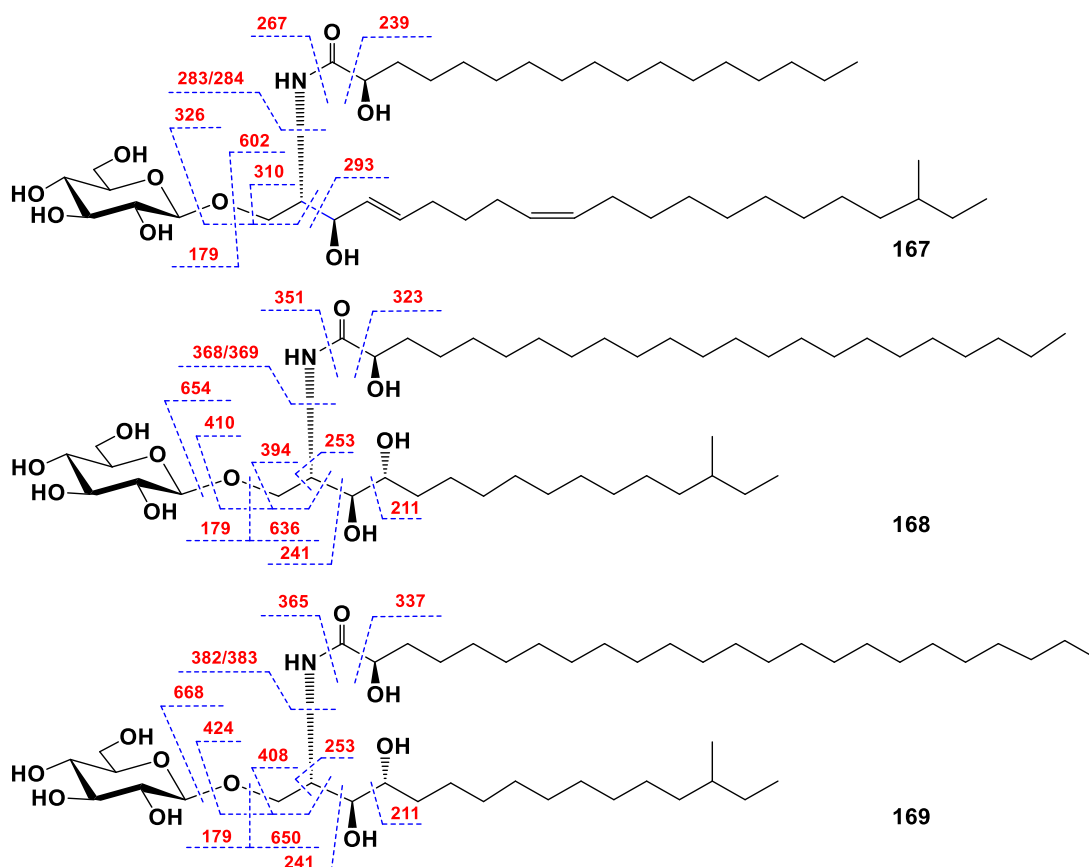


Рисунок 6 – Схема образования ионов ключевых фрагментов в спектрах ИЭР-МС/МС соединений **167–169**

На основании всех приведенных данных структура цереброзида **167** была определена как (2*S*,3*R*,4*E*,9*Z*)-1-*O*-(β -*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксигептадеканоиламино]-19-метил-4,9-геникозациен-3-ол.

Тщательный анализ данных 2D спектров ЯМР и масс-спектров цереброзидов **167**, **168** и **169** позволил предположить, что моносахаридная часть соединения **167** идентична таковой в гликозидах **168** и **169**.

Молекулярную формулу соединения **168** определили как $C_{46}H_{91}NO_{10}$ исходя из наличия пика иона катионизированной молекулы $[M + Na]^+$ с m/z 840,6336 в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения и пика иона депротонированной молекулы $[M - H]^-$ с m/z 816,6574 в (–)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. ИК спектр соединения **168** свидетельствует о присутствии вон гидроксильных (3401 см^{-1}) и $\nu_{C=O}$ амидной (1634 , 1541 см^{-1}) групп. В спектрах ЯМР 1H и ^{13}C цереамидной части соединения **168** содержатся сигналы протонов и атомов углерода трех концевых метилов CH_3 -16, CH_3 -17 и CH_3 -22' [δ_H 0,86 м.д. (т, $J = 7,5$ Гц), 0,86 м.д. (д, $J = 6,4$ Гц), 0,88 м.д. (т, $J = 7,0$ Гц); δ_C 11,3, 19,2, 14,0 м.д.], четырех оксигенированных групп CH_2 -1 [δ_{Ha} 4,71 м.д. (дд, $J = 10,6$, 6,5 Гц), δ_{Hb} 4,53 м.д. (дд, $J = 10,6$, 4,4 Гц); δ_C 70,3 м.д.], CH -3 [δ_H 4,32 м.д. (дд, $J = 12,3$, 5,5 Гц); δ_C 75,7 м.д.],

CH-4 (δ_H 4,21 м.д. (м); δ_C 72,4 м.д.) и CH-2' (δ_H 4,58 м.д. (м); δ_C 72,3 м.д.), одной амидной группы NH-CO [δ_H 8,54 м.д. (д, $J = 9,2$ Гц); δ_C 175,4 м.д.] и одного характеристичной метиновой группы CH-2 [δ_H 5,26 м.д. (м); δ_C 51,5 м.д.], связанной с атомом азота. Таким образом, в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C цереброзида **168** наблюдаются сигналы, характерные для остатка насыщенного церамида фитосфингозинового типа, содержащего 2-гидрокси-ЖК. Более того, церамидная часть соединения **168** имеет нормальный и *антеизо*-типы углеводородных цепей, поскольку сигналы атомов углерода концевых метильных групп в спектре ЯМР ^{13}C наблюдаются при δ_C 14,0 (нормальный тип) и 11,3 и 19,2 м.д. (*антеизо*-тип). Корреляции 1H - 1H COSY и HSQC в спектрах ЯМР соединения **168** указывали на соответствующие последовательности протонов от C-1 до C-5; от C-16 до C-17 через C-15 и C-14; от C-2 до NH; от C-2' до C-4', и от C-22' до C-20'. Ключевые кросс-пики в спектре НМВС, такие как H β -1/C-2, C-3; H-2/C-1'; H-3/C-4; H-4/C-5; H β -16/C-14, C-15; H β -17/C-14; NH/C-2, C-1'; H-2'/C-1'; H α -3'/C-1', C-2', C-4'; H β -21'/C-20' и H β -22'/C-21', подтвердили общую структуру церамидной части соединения **168** (Рисунок 5).

ГЖХ/МС анализ МЭЖК цереброзида **168** показал наличие одного компонента, который принадлежит насыщенному метиловому эфиру 2-гидрокситрикозановой кислоты нормального типа. Основываясь на этом выводе, а также на данных спектров ЯМР и масс-спектров, было предположено, что ДЦО церамидной части соединения **168** имеет 17 атомов углерода и *антеизо*-тип насыщенной полиметиленовой цепи. Абсолютная конфигурация ДЦО церамидного фрагмента **168** была определена как *D*-рибо-(2*S*,3*S*,4*R*) исходя из сходства данных его спектров ЯМР 1H с соответствующими данными спектра ДЦО церамида **164**. Присоединение моносахарида к церамидной части **168** было установлено на основании присутствия корреляций в спектре НМВС между H-1" Glc $_p$ и C-1 агликона, а также между H-1 церамидной части и C-1" Glc $_p$.

Наличие моносахаридного остатка и структура церамидной части цереброзида **168** были подтверждены данными ИЭР-МС/МС. Спектр (–)ИЭР-МС/МС пика молекулярного аниона [M – H] $^-$ с m/z 816 показывает присутствие фрагментных пиков, образующихся в результате потери углеводного звена, с m/z 654 [(M – H) – 162] $^-$, 636 [(M – H) – 180] $^-$ и 179 [гексоза – H] $^-$, а также несколько характерных фрагментных пиков образующихся при разрыве церамидной части **168**, с m/z 410 [(M – H) – 406] $^-$ (потеря моносахаридного остатка и разрыв связи между C-2 и C-3), 394 [(M – H) – 422] $^-$ (потеря моносахаридного остатка и разрыв связи между C-2 и C-3), 368/369 [(M – H) – 448/449] $^-$ (разрыв связи между C-2 и NH), 351 [(M – H) – 465] $^-$ (разрыв амидной связи), 323 [(M – H) – 493] $^-$ (разрыв связи между C-1' и C-2'), 253 [(M – H) – 563] $^-$ (разрыв связей между C-1 и C-2 и одновременно между C-2 и NH), 241 [(M – H) – 575] $^-$ (разрыв связи между C-2 и C-3), и 211 [(M – H) – 605] $^-$ (разрыв

связи между C-3 и C-4) (Рисунок 6). Таким образом, структура цереброзида **168** была определена как (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситрикозаноиламино]-14-метилгексадекан-3,4-диол.

Молекулярную формулу соединения **169** определили как C₄₇H₉₃NO₁₀ по пику ионов катионизированной молекулы [M + Na]⁺ с *m/z* 854,6687 в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения и пика иона депротонированной молекулы [M – H][–] с *m/z* 830,6730 в (–)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. ИК спектр соединения **169** свидетельствует о присутствии νOH гидроксильных (3401 см^{–1}) и νC=O амидной (1626, 1540 см^{–1}) групп. Основываясь на тщательном анализе 2D спектров ЯМР цереброзидов **169** и **168**, было предположено, что керамидная часть соединения **169** почти идентична таковой в соединении **168**. Однако сравнение молекулярных масс соединений **168** и **169** показало, что они отличаются на 14 а.е.м. ГЖХ/МС анализ МЭЖК соединения **169** показал присутствие одного компонента, который был охарактеризован как насыщенный метиловый эфир 2-гидрокситетракозановой кислоты нормального типа.

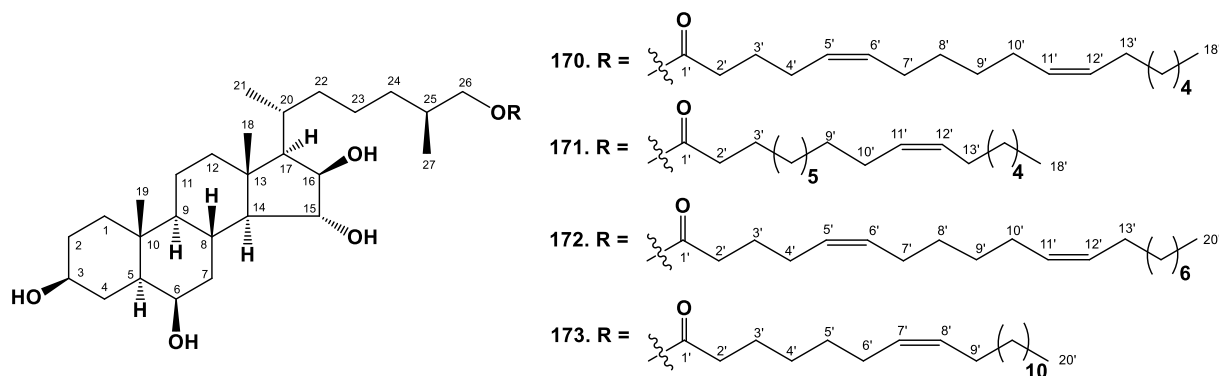
Наличие моносахаридного остатка и структура керамидной части цереброзида **169** были подтверждены данными ИЭР-МС/МС. Спектр (–)ИЭР-МС/МС пика молекулярного аниона [M – H][–] с *m/z* 830 показывает присутствие фрагментных пиков с *m/z* 668 [(M – H) – 162][–], 650 [(M – H) – 180][–] и 179 [гексоза – H][–], образующихся в результате потери углеводного звена, а также нескольких характерных фрагментных пиков образующихся при разрыве керамидной части соединения **169**, с *m/z* 424 [(M – H) – 406][–] (потеря моносахаридного остатка и разрыв связи между C-2 и C-3), 408 [(M – H) – 422][–] (потеря моносахаридного остатка и разрыв связи между C-2 и C-3), 382/383 [(M – H) – 448/449][–] (разрыв связи между C-2 и NH), 365 [(M – H) – 465][–] (разрыв амидной связи), 337 [(M – H) – 493][–] (разрыв связи между C-1' и C-2'), 253 [(M – H) – 577][–] (разрыв связей между C-1 и C-2 и одновременно между C-2 и NH), 241 [(M – H) – 589][–] (разрыв связи между C-2 и C-3) и 211 [(M – H) – 619][–] (разрыв связи между C-3 и C-4) (Рисунок 6). Таким образом, структура цереброзида **169** была определена как (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситетракозаноиламино]-14-метилгексадекан-3,4-диол.

Выделенные новые керамиды и глюкоцереброзиды из морской звезды *C. patagonicus* содержат в своем составе Δ⁹ C₂₁ – C₂₃ фитосфингозиновые основания *изо*-типа (**164** – **166**) и Δ⁹ C₂₂ сфингозиновое основание *антеизо*-типа (**167**), не встречавшиеся ранее в морских звездах. Также, в состав новых соединений **168** и **169** входит насыщенное C₁₇ фитосфингозиновое основание *антеизо*-типа, ранее встречавшееся в составе сфинголипидов морской звезды *L. maculata* [39, 56, 57]. В состав сфинголипидов, помимо

относительно распространенных 2-ОН С_{16:0} и 2-ОН С_{22:0}, входят и редко встречающиеся в морских звездах 2-ОН-С_{23:0} и 2-ОН С_{17:0} жирные кислоты.

3.4 Стероидолипиды из морской звезды *C. patagonicus*

Концентрированный метанол-хлороформ-этанольный экстракт морской звезды *C. patagonicus* был распределен между Н₂О и органической фазой EtOAc/BuOH, органический слой был промыт холодным ацетоном. Растворимая в ацетоне часть была хроматографирована на колонке с силикагелем с последующей ВЭЖХ на полупрепаративной колонке Diasfer-110-C18 (Схема 2). В результате было получено четыре новых полигидроксистероидных соединения, конъюгированных с остатками жирных кислот: (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-5'*Z*,11'*Z*-октадекадиеноат (**170**), (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-11'*Z*-октадекадиеноат (**171**), (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-5'*Z*,11'*Z*-эйкозадиеноат (**172**) и (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-7'*Z*-эйкозеноат (**173**).



ИК спектр соединения **170** показывает наличие ν_{OH} гидроксильной (3504 см⁻¹), ν_{C=O} сложноэфирной (1723 см⁻¹) и ν_{C=C} олефиновой (1602 см⁻¹) групп. Молекулярная формула соединения **170** была определена как С₄₅Н₇₈О₆ на основании значения пика иона катионизированной молекулы [M + Na]⁺ с *m/z* 737,5695 в (+) ИЭР-МС высокого разрешения, пика иона [M – H + AcOH][–] с *m/z* 773,5934 и пика депротонированной молекулы [M – H][–] с *m/z* 713,5726 в (–)ИЭР-МС высокого разрешения. В спектрах ЯМР ¹H и ¹³C тетрациклического фрагмента соединения **170** наблюдаются сигналы протонов и атомов углерода двух ангулярных метильных групп СН₃-18 и СН₃-19 (δ_H 1,27 м.д. (с), 1,47 м.д. (с); δ_C 14,9, 16,2 м.д.), и четырех окисгенированных метиновых групп НС-3 (δ_H 3,99 м.д. (м); δ_C м.д. 71,1), НС-6 (δ_H 4,15 м.д. (уш. с); δ_C 71,2 м.д.), НС-15 [δ_H 4,40 м.д. (уш. д, *J* = 10,0 Гц); δ_C 84,7 м.д.] и НС-16 [δ_H 4,66 м.д. (уш. д, *J* = 7,3 Гц); δ_C 82,2 м.д.]. Сигналы спектров ЯМР боковой цепи стероида показали наличие двух вторичных метильных групп СН₃-21 [δ_H 1,13 м.д. (д, *J* = 6,8 Гц); δ_C 18,3 м.д.] и СН₃-27 [δ_H 0,94 м.д. (д, *J* = 6,8 Гц); δ_C 17,0 м.д.], и одной

оксигенированной метиленовой группы, H₂C-26 (δ_H 4,11 м.д. (дд, $J = 10,6, 5,4$ Гц), 3,96 м.д. (дд, $J = 10,6, 6,8$ Гц); δ_C 69,1) (Таблица 5).

Таблица 5 – Данные спектров ЯМР 1H (700,13 МГц) и ^{13}C (176,04 МГц) стероидного ядра соединений **170–173** в C₅D₅N при 30 °C, δ в м.д., J в Гц.

Положение	$\delta_H (J)$	δ_C	Положение	$\delta_H (J)$	δ_C
1	1,76 дт (11,4; 3,5) 1,10 м	39,1	15	4,40 уш. д (10,0)	84,7
2	2,13 м 1,86 м	32,5	16	4,66 уш. д (7,3)	82,2
3	3,99 м	71,1	17	1,55 дд (11,1; 7,3)	59,3
4	2,45 м 2,04 уш. д (12,2)	37,0	18	1,27 с	14,9
5	1,35 м	48,3	19	1,47 с	16,2
6	4,15 уш. д (2,6)	71,2	20	2,35 м	30,0
7	2,95 дт (14,2; 3,5) 1,82 м	41,2	21	1,13 д (6,8)	18,3
8	2,55 квд (11,1; 3,5)	30,8	22	1,92 м 1,28 м	36,4
9	0,96 м	54,9	23	1,60 м 1,39 м	23,9
10	–	36,0	24	1,41 м 1,17 м	34,0
11	1,64 м 1,59 м	21,2	25	1,82 м	32,8
12	2,10 м 1,36 м	41,1	26	4,11 дд (10,6; 5,4) 3,96 дд (10,6; 6,8)	69,1
13	–	43,9	27	0,94 д (6,8)	17,0
14	1,45 т (10,4)	61,0			

Корреляции 1H - 1H COSY и HSQC, относящиеся к стероидному фрагменту в спектрах ЯМР, выявили соответствующие последовательности протонов от C-1 до C-8; от C-8 до C-12 через C-9 и C-11; от C-8 до C-17 через C-14; от C-17 до C-21 и от C-20 до конца боковой цепи. Ключевые кросс-пики в спектре HMBC, такие как H-1/C-10, C-19; H-4/C-5, C-6; H-7/C-8; H-14/C-7, C-8, C-13, C-15, C-18; H-17/C-13, C-20; H₃-18/C-12, C-13, C-14, C-17; H₃-19/C-1, C-5, C-9, C-10; H₃-21/C-17, C-20, C-22; H₂-26/C-24, C-25, C-27; H₃-27/C-24, C-25, C-26, подтвердили общую структуру стероидной части соединения **170**.

Ключевые кросс-пики в спектре ROESY показали общую стереохимию 5 α /9 α /10 β /13 β стероидного ядра и 3 β ,6 β ,15 α ,16 β -конфигурации кислородсодержащих заместителей, а также присутствие 26-гидроксистероидной боковой цепи в соединении **170**. 20*R*-Конфигурация была предположена на основании ROESY корреляций H₃-18/H-20, H β -16/H-22 и H₃-21/H β -12. Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C стероидной части соединения **170** были практически идентичны соответствующим данным (25*S*)-5 α -холестан-

3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-пентаола, который был впервые выделен из морской звезды *Hacelia attenuata* [86], а позже из морской звезды *C. patagonicus* [87], что подтвердило идентичность стероидных частей этих соединений и позволило предположить (25S)-конфигурацию центра С-25 в боковой цепи соединения **170**. На основании этих данных стероидная часть соединения **170** была определена как (20R,25S)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-пентаол.

Кроме того, данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C соединения **170** указывают на наличие одной первичной метильной группы CH_3 -18' [δ_{H} 0,88 м.д. (т, $J = 6,9$ Гц); δ_{C} 14,0 м.д.]; четырех олефиновых метиновых групп HC -5' (δ_{H} 5,44 м.д. (м); δ_{C} 128,9 м.д.), HC -6' (δ_{H} 5,51 м.д. (м); δ_{C} 130,9 м.д.), HC -11' (δ_{H} 5,48 м.д. (м); δ_{C} 129,8 м.д.) и HC -12' (δ_{H} 5,49 м.д. (м); δ_{C} 130,1 м.д.); двух характерных аллильных метиленовых групп H_2C -4' (δ_{H} 2,17 м.д. (м); δ_{C} 26,7 м.д.) и H_2C -7' (δ_{H} 2,10 м.д. (м); δ_{C} 27,4 м.д.); одной сложноэфирной группы (δ_{C} 173,3 м.д.); и одной характеристичной метиленовой группы H_2C -2' [δ_{H} 2,43 м.д. (т, $J = 7,4$ Гц); δ_{C} 33,7 м.д.], находящейся в α -положении относительно сложноэфирной группы (Таблица 6).

Таблица 6 – Данные спектров ЯМР ^1H (700,13 МГц) и ^{13}C (176,04 МГц) остатков жирных кислот соединений **170–173** в $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ при 30 °С, δ в м.д., J в Гц.

Положение	170		171		172		173	
	$\delta_{\text{H}}(J)$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(J)$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(J)$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(J)$	δ_{C}
1'	–	173,3	–	173,3	–	173,1	–	173,3
2'	2,43 т (7,4)	33,7	2,40 т (7,5)	34,3	2,43 т (7,2)	33,6	2,40 т (7,5)	34,2
3'	1,80 м	25,2	1,70 м	25,1	1,80 м	25,2	1,71 м	25,1
4'	2,17 м	26,7			2,17 к (7,2)	26,7		
5'	5,44 м	128,9			5,46 м	128,9		
6'	5,51 м	130,9			5,51 м	130,9	2,11 м	27,3
7'	2,10 м	27,4			2,10 м	27,4	5,50 м	130,2
10'	2,11 м	27,4	2,11 м	27,3	2,11 м	27,4	5,48 м	129,7
11'	5,48 м	129,8	5,49 м	130,0	5,49 м	129,8	2,11 м	27,1
12'	5,49 м	130,1	5,49 м	130,0	5,50 м	130,1		
13'	2,11 м	27,1	2,11 м	27,1	2,11 м	27,1		
16' или 18'	1,25 м	31,7	1,25 м	31,8	1,25 м	31,9	1,25 м	31,8
17' или 19'	1,28 м	22,7	1,28 м	22,8	1,28 м	22,7	1,28 м	22,8
18' или 20'	0,88 т (6,9)	14,0	0,87 т (6,9)	14,0	0,88 т (7,0)	14,0	0,89 т (6,9)	14,0

В спектре (–)ИЭР-МС/МС иона $[\text{M} - \text{H}]^-$ с m/z 713 присутствуют два пика фрагментных ионов: с m/z 449 $[\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_5]^-$ (соответствующий потере остатка жирной кислоты) и 279 $[\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_2]^-$ (соответствующий потере стероидного фрагмента). Корреляции ^1H - ^1H COSY и HSQC в соответствующих спектрах, относящихся к остатку жирной кислоты, выявили соответствующие последовательности протонов от С-2' до С-7', от С-10' до С-13' и от С-16' до С-18'. Ключевые кросс-пики в спектре НМВС, такие как H-2'/C-1', C-3', C-4';

H-3'/C-1', C-2', C-4', C-5'; H-4'/C-2', C-5', C-6'; H-5'/C-4', C-7' и H-6'/C-4', C-7' подтвердили локализацию $\Delta^{5(6)}$ -двойной связи в жирнокислотном фрагменте соединения **170** (Рисунок 7). Геометрию двойной связи в остатках жирных кислот можно определить на основании значения химического сдвига в спектре ЯМР ^{13}C сигнала аллильного атома углерода ($\delta_{\text{C}} \approx 27$ м.д. для (*Z*)-изомеров и $\delta_{\text{C}} \approx 32$ м.д. для (*E*)-изомеров) [82]. В спектре ЯМР ^{13}C соединения **170** присутствуют четыре сигнала, характерных для аллильных атомов углерода: C-4' ($\delta_{\text{C}} 26,7$ м.д.), C-7' ($\delta_{\text{C}} 27,4$ м.д.), C-10' ($\delta_{\text{C}} 27,4$ м.д.) и C-13' ($\delta_{\text{C}} 27,1$ м.д.). Таким образом, было установлено, что двойные связи в соединении **170** имеют *цис*-(*Z*)-конфигурацию.

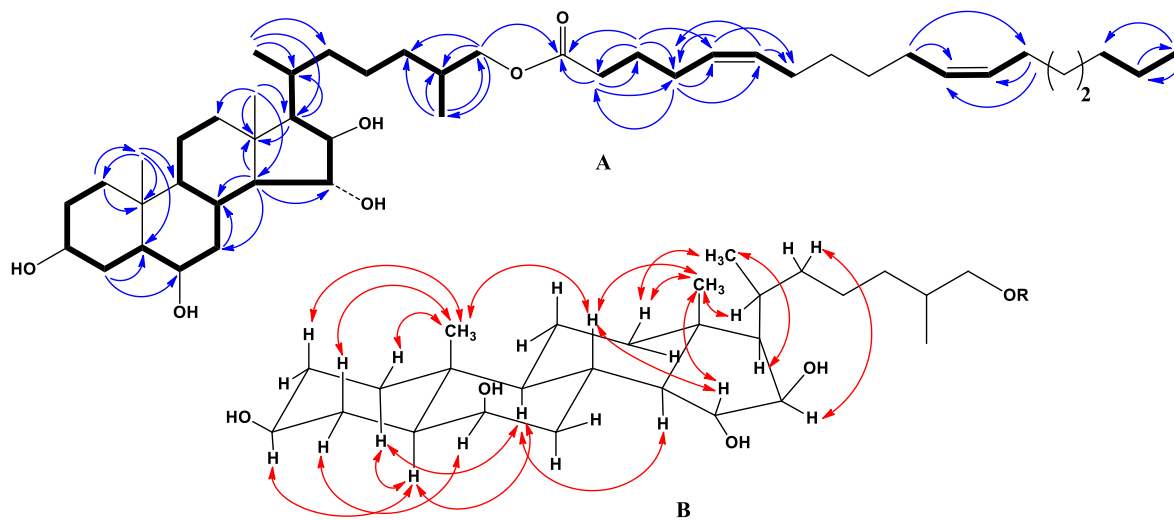


Рисунок 7 – Ключевые корреляции в спектрах ^1H - ^1H COSY и HMBC соединения **170** (A) и ключевые ROESY корреляции стероидной части соединений **170–173** (B)

Гидролизом соединения **170** под действием метанольного раствора соляной кислоты был получен МЭЖК соединения **170**. Кроме того, из МЭЖК были получены производные ДМОЗ жирных кислот соединения **170** в соответствии с ранее описанной процедурой [88]. Этот метод позволяет определять положения двойных связей в полиненасыщенных жирных кислотах. Жирные кислоты были идентифицированы по значениям ЭДЦ в ГЖХ-анализе и по данным масс-спектров производных МЭЖК и ДМОЗ в ГЖХ-МС анализе [88, 89]. ГЖХ-МС анализ показал наличие одного основного компонента, который был охарактеризован как метил-5'*Z*,11'*Z*-октадекадиеноат. Минорные компоненты и их процентное содержание показаны в таблице 7. На основании всех вышеизложенных данных структура соединения **170** была определена как (25*S*)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β -тетраол-26-ил-5'*Z*,11'*Z*-октадекадиеноат. Следует отметить, что результаты исследований методами спектроскопии ЯМР, МС, ТСХ и ВЭЖХ свидетельствовали об однородности соединений **170–173**; однако ГЖХ-МС анализ метиловых эфиров жирных кислот соединений **170–173** продемонстрировал наличие в них других жирных кислот.

Таблица 7 – Жирнокислотный состав соединений **170–173** установленный анализом ГЖХ-МС спектров.

Жирные кислоты	Соединения			
	170	171	172	173
	Содержание ЖК, %			
16:0	14,91	9,36	11,83	5,88
Δ^7 -16:1	5,11	0,75	5,06	1,07
18:0	11,23	8,92	8,13	8,03
Δ^5 -18:1	1,62	4,62	17,05	0,57
Δ^9 -18:1	5,97	6,53	6,65	4,83
Δ^{11} -18:1	4,06	51,16	3,92	2,05
$\Delta^{5,11}$ -18:2	53,31	-	3,73	6,14
Δ^7 -20:1	-	8,86	3,50	66,67
Δ^9 -20:1	-	-	0,63	3,88
$\Delta^{5,11}$ -20:2	3,78	9,79	39,51	0,87
Суммарно	100,00	100,00	100,00	100,00

ИК спектр соединения **171** показывает наличие ν_{OH} гидроксильной (3504 см^{-1}), $\nu_{C=O}$ сложноэфирной (1723 см^{-1}) и $\nu_{C=C}$ олефиновой (1602 см^{-1}) групп. Молекулярная формула соединения **174** была определена как $C_{45}H_{80}O_6$ на основании значений пика иона катионизированной молекулы $[M + Na]^+$ с m/z 739,5852 в ВР (+)ИЭР масс-спектре, пика иона $[(M - H) + AcOH]^-$ с m/z 775,6096 и пика иона депротонированной молекулы $[M - H]^-$ с m/z 715,5889 в (–)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. Сравнение молекулярных масс соединений **170** и **171** показало, что разница между ними составляет 2 а.е.м. Сравнение спектров ЯМР 1H и ^{13}C и анализ данных 2D спектров ЯМР соединений **170** и **171–173** свидетельствовали о том, что стероидные фрагменты соединений **171–173** идентичны фрагменту соединения **170**, в то время как длинноцепочечные жирнокислотные остатки соединений **171–173** отличаются друг от друга длиной углеводородных цепей, а также количеством и положением двойных связей.

Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C жирнокислотного остатка соединения **171** указывают на наличие одной первичной метильной группы CH_3 -18' [δ_H 0,87 м.д. (т, $J = 6,9$ Гц); δ_C 14,0 м.д.]; двух олефиновых метиновых групп HC -11' и HC -12' (2H, каждый δ_H 5,49 м.д. (м); δ_C 130,0); двух характерных аллильных метиленовых групп CH_2 -10' (δ_H 2,11 м.д. (м); δ_C 27,3 м.д.) и CH_2 -13' (δ_H 2,11 м.д. (м); δ_C 27,1 м.д.); одной сложноэфирной группы (δ_C 173,3 м.д.) и одной характерной метиленовой группы CH_2 -2' [δ_H 2,40 м.д. (т, $J = 7,5$ Гц); δ_C 34,3 м.д.], находящейся в α -положении к сложноэфирной группе. В (–)ИЭР-МС/МС спектре иона $[M - H]^-$ с m/z 715 были обнаружены пики фрагментных ионов: с m/z 449 [$C_{27}H_{45}O_5$] $^-$ (соответствующий потере жирной кислоты) и 281 [$C_{18}H_{33}O_2$] $^-$ (соответствующий потере стероидного фрагмента). Разница в 2 а.е.м. между пиками фрагментных ионов с m/z 281

$[C_{18}H_{33}O_2]^-$ и 279 $[C_{18}H_{31}O_2]^-$ в (–)ИЭР-МС/МС спектрах соединений **171** и **170** указывает на отсутствие одной двойной связи в жирнокислотном фрагменте соединения **171** по сравнению с соединением **170**. Сравнение данных спектров ЯМР 1H и ^{13}C соединений **171** и **170** также подтвердило этот вывод. *Цис* (Z)-конфигурация двойной связи в длинноцепочечном фрагменте жирной кислоты соединения **171** определена на основании величин химических сдвигов атомов C-10' (δ_C 27,3 м.д.) и C-13' (δ_C 27,1 м.д.) в спектре ЯМР ^{13}C .

Остатки жирных кислот в соединении **171** были идентифицированы по значениям ЭДЦ жирных кислот в ГЖХ-анализе и по данным масс-спектров производных МЭЖК и ДМОЗ в ГЖХ-МС анализе [89], по аналогии с соединением **170**. ГЖХ-МС анализ показал наличие одного основного компонента, который был идентифицирован как метил-11'-Z-октадеценоат. Минорные компоненты и их процентное содержание показаны в таблице 7. Таким образом, структура соединения **171** была установлена как (25S)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β -тетраол-26-ил-11'-Z-октадеценоат.

ИК спектр стероидолипида **172** показывает наличие ν_{OH} гидроксильной (3510 см^{-1}), $\nu_{C=O}$ сложноэфирной (1723 см^{-1}) и $\nu_{C=C}$ олефиновой (1603 см^{-1}) групп. Молекулярная формула соединения **172** была определена как $C_{47}H_{82}O_6$ на основании значений пика иона катионизированной молекулы $[M + Na]^+$ с m/z 765,6008 в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения, пика иона $[(M - H) + AcOH]^-$ с m/z 801,6254 и пика иона депротонированной молекулы $[M - H]^-$ с m/z 741,6044 в масс-спектре (–)ИЭР высокого разрешения. Сравнение молекулярных масс стероидолипидов **170** и **172** показало, что разница между ними составляет 28 а.е.м. В то же время спектры ЯМР 1H и ^{13}C соединений **170** и **172** были практически идентичны. В (–)ИЭР-МС/МС спектре иона $[M - H]^-$ с m/z 741 были обнаружены пики фрагментных ионов с m/z 449 $[C_{27}H_{45}O_5]^-$ (потеря жирной кислоты) и 307 $[C_{20}H_{35}O_2]^-$ (потеря стероидного фрагмента). Остатки жирных кислот в **172** были идентифицированы по значениям ЭДЦ жирных кислот в ГЖХ-анализе и по данным масс-спектров производных МЭЖК и ДМОЗ в ГЖХ-МС анализе [88, 89]. ГЖХ-МС-анализ показал наличие одного основного компонента, который был идентифицирован как метил-5'Z,11'Z-эйкозадиеноат (Таблица 7). Таким образом, структура соединения **172** была определена как (25S)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β -тетраол-26-ил-5'Z,11'Z-эйкозадиеноат. *Цис* (Z)-геометрия двойной связи в длинноцепочечном фрагменте жирной кислоты стероидолипида **172** была определена на основании величин химических сдвигов атомов C-10' (δ_C 27,3) и C-13' (δ_C 27,1) в спектре ЯМР ^{13}C .

ИК спектр соединения **173** показал наличие ν_{OH} гидроксильной (3515 см^{-1}), $\nu_{C=O}$ сложноэфирной (1723 см^{-1}) и $\nu_{C=C}$ олефиновой (1602 см^{-1}) групп. Молекулярная формула

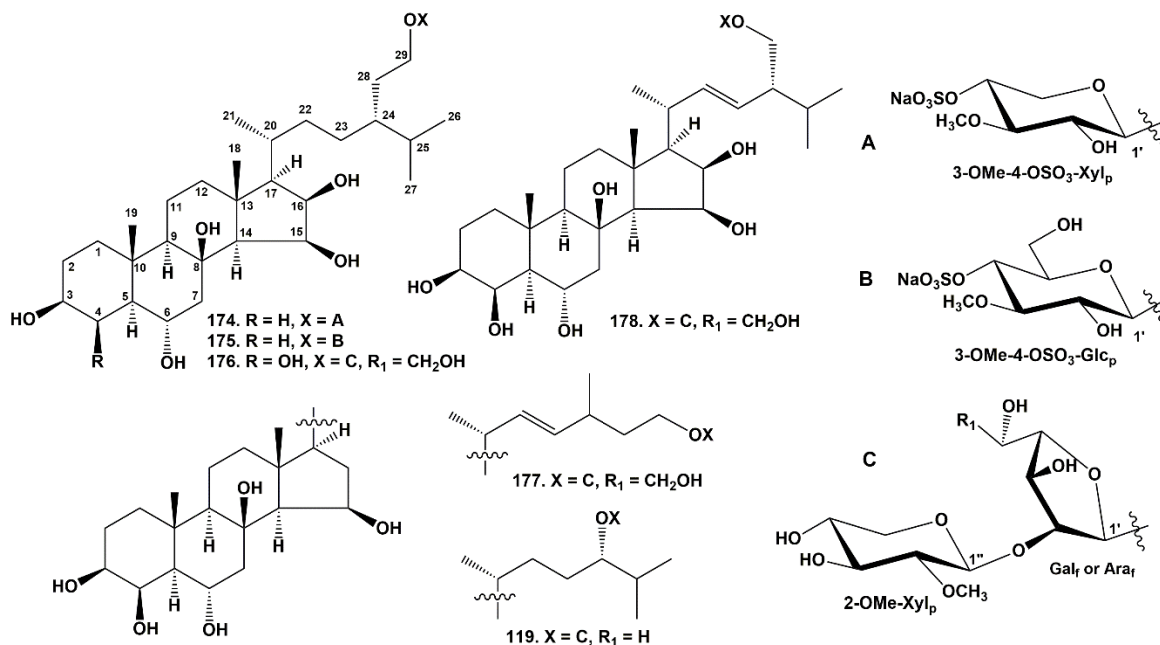
соединения **173** была определена как $C_{47}H_{84}O_6$ на основании значения пика иона катионизированной молекулы $[M + Na]^+$ с m/z 767,6157 в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения, пика иона $[(M - H) + AcOH]^-$ с m/z 803,6409 и пика иона депротонированной молекулы $[M - H]^-$ с m/z 743,6199 в (-)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. Сравнение молекулярных масс соединений **172** и **173** показало разницу между ними в 2 а.е.м. В (-)ИЭР-МС/МС иона $[M - H]^-$ с m/z 743 были обнаружены пики фрагментных ионов с m/z 449 $[C_{27}H_{45}O_5]^-$ (потеря длинноцепочечной жирной кислоты) и 309 $[C_{20}H_{37}O_2]^-$ (потеря стероидного фрагмента). Жирные кислоты были идентифицированы таким же образом, как и в других соединениях [88, 89]. ГЖХ-МС анализ показал наличие одного основного компонента, который был охарактеризован как метил-7'*Z*-эйкозеноат (таблица 7). На основании этих результатов структура соединения **173** была определена как (25*S*)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β -тетраол-26-ил-7'*Z*-эйкозеноат.

Новые стероидолипиды, выделенные из морской звезды *C. patagonicus* и обозначенные как соединения **170–173**, представляют собой 26-*O*-ацильные производные (25*S*)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-пентаола, содержащие остатки моно- и полиненасыщенных жирных кислот с *Z*-конфигурацией двойных связей. Соединение **170** ацилировано 5'*Z*,11'*Z*-октадекадиеновой кислотой ($C_{18:2}$), соединение **171** – 11'*Z*-октадеценовой кислотой ($C_{18:1}$), соединение **172** – 5'*Z*,11'*Z*-эйкозадиеновой кислотой ($C_{20:2}$), а соединение **173** – 7'*Z*-эйкозеновой кислотой ($C_{20:1}$). Следует отметить, что хотя полигидроксилированный стероидный агликон ранее был описан для морских звезд *H. attenuata* и *C. patagonicus*, его сложные эфиры с указанными жирными кислотами охарактеризованы впервые. Выявление стероидолипидов с 26-*O*-ацилированием и жирнокислотными остатками, несущими неконъюгированные *Z*-двойные связи в положениях $\Delta^{5,11}$ и Δ^7 , существенно расширяет структурное разнообразие стероидных производных иглокожих.

3.5 Гликозиды полигидроксистероидов из *C. patagonicus*

Концентрированный MeOH/ $CHCl_3$ /EtOH экстракт морской звезды *C. patagonicus* был распределен между H_2O и органической фазой EtOAc/*n*-BuOH, после чего органический слой был промыт холодным ацетоном. Нерастворимая в ацетоне часть была хроматографирована на колонках с силикагелем и флорисилом, а затем методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на полупрепаративных колонках Diasfer-110-C18 и Discovery C18 и аналитической колонке YMC-Pack Pro C18 (Схема 2). В результате было получено четыре новых стероидных гликозида, обозначенных как церамастерозиды А, В, D и Е (**174–177**) и два ранее известных стероидных гликозида (**178**

и **119**). Гликозиды **178** и **119** были идентифицированы путем сравнения данных их спектров ЯМР ^1H и ^{13}C , а также масс-спектров с данными, приведенными для цермастерозида C1, выделенного ранее из *C. patagonicus* [87], и аттенуатозида В-I из морской звезды *Hacelia attenuata* [90].



Молекулярная формула соединения **174** была определена как $\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{O}_{13}\text{SNa}$ на основании значения пика иона катионизированной молекулы $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 767,3630 в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения и пика иона анионизированной молекулы с m/z 721,3851 $[\text{M} - \text{Na}]^-$ в (-)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. Фрагментные пики с m/z 647 $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{NaHSO}_4]^+$ в спектре (+)ИЭР-МС/МС иона $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 767, а также с m/z 97 $[\text{HSO}_4]^-$ в спектре (-)ИЭР-МС/МС иона $[\text{M} - \text{Na}]^-$ с m/z 721 указывают на присутствие сульфатной группы в гликозиде **174**. ИК спектр соединения **174** свидетельствует о наличии вон гидроксильной (3440 см^{-1}) и $\nu_{\text{S=O}}$ и $\nu_{\text{S-O}}$ сульфатной ($1255, 1224, 827\text{ см}^{-1}$) групп. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C , относящиеся к стероидному ядру соединения **174**, содержат сигналы протонов и атомов углерода двух ангулярных метильных групп CH_3 -18 и CH_3 -19 (δ_{H} 1,24 м.д. (с), 0,98 м.д. (с); δ_{C} 17,9, 14,0 м.д.), четырех оксигенированных метиновых групп HC -3 (δ_{H} 3,47 м.д. (м); δ_{C} 72,2 м.д.), HC -6 [δ_{H} 3,71 м.д. (тд, $J = 11,0, 4,4$ Гц); δ_{C} 67,7 м.д.], HC -15 [δ_{H} 4,36 м.д. (дд, $J = 6,8, 5,7$ Гц); δ_{C} 71,2 м.д.], и HC -16 (δ_{H} 4,22 м.д. (м); δ_{C} 72,8 м.д.), а также сигнал третичного атома углерода, связанного с кислородом при C -8 (δ_{C} 77,2 м.д.). Значения сигналов атомов боковой цепи стероида в спектре ЯМР указывают на наличие трех метильных групп CH_3 -21 [δ_{H} 0,94 м.д. (д, $J = 6,6$ Гц); δ_{C} 18,5 м.д.], CH_3 -26 [δ_{H} 0,87 м.д. (д, $J = 6,7$ Гц); δ_{C} 20,0 м.д.] и CH_3 -27 [δ_{H} 0,84 м.д. (д, $J = 6,7$ Гц); δ_{C} 19,1 м.д.] и одной оксигенированной метиленовой группы CH_2 -29 (δ_{H} 3,83 м.д. (м), 3,54 м.д. (м); δ_{C} 70,0 м.д.) (Таблица 8). Корреляции в спектрах ^1H - ^1H COSY и HSQC, относящихся к стероидному

фрагменту, выявили соответствующие последовательности протонов: C-1–C-7; C-9–C-12 через C-11; C-14–C-17; C-17–C-21 через C-20 – до конца боковой цепи и C-24–C-29. Ключевые кросс-пики в спектре НМВС, такие как H-1/C-3; H-4/C-3; H-7/C-5, C-6, C-8, C-9; H-12/C-9, C-13; H-14/C-12, C-13, C-15; H-15/C-17; H-16/C-13; H₃-18/C-12, C-13, C-17; H₃-19/C-1, C-5, C-9, C-10; H₃-21/C-17, C-20, C-22; H₃-26/C-24, C-25, C-27 и H₃-27/C-24, C-25, C-26 подтвердили общую структуру стероидной части гликозида **174** (Рисунок 8).

Таблица 8 – Данные спектров ЯМР ¹H (700,13 МГц) и ¹³C (176,04 МГц) агликонов **174–177** в CD₃OD при 30 °C, δ в м.д., J в Гц.

Положение	174, 175		176		177	
	$\delta_{\text{H}}(J)$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(J)$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(J)$	δ_{C}
1	1,70 м 0,96 м	39,4	1,70 м 0,97 м	39,6	1,70 м 0,99 м	39,7
2	1,72 м 1,45 м	31,4	1,82 м 1,55 м	26,2	1,82 м 1,55 м	26,5
3	3,47 м	72,2	3,42 м	73,7	3,42 м	73,7
4	2,19 уш. д (12,3) 1,20 м	32,4	4,26 уш. с	69,1	4,25 уш. с	69,1
5	1,04 м	53,8	0,94 м	57,2	0,94 дд (11,2; 1,8)	57,2
6	3,71 тд (11,0; 4,4)	67,7	4,18 тд (11,2; 3,5)	64,8	4,15 м	64,8
7	2,39 дд (12,5; 4,4) 1,33 м	49,6	2,46 дд (12,5; 3,5) 1,35 дд (12,5; 11,2)	50,1	2,43 дд (12,5; 4,4) 1,30 м	49,6
8		77,2		77,2		77,4
9	0,83 м	57,4	0,82 дд (12,9; 2,9)	58,4	0,83 дд (12,7; 3,2)	58,4
10		38,0		38,2		38,2
11	1,77 м 1,47 м	19,4	1,76 м 1,41 м	18,9	1,78 м 1,44 м	19,2
12	1,94 м 1,13 м	43,5	1,94 уш. д (12,5) 1,11 м	43,5	1,97 дт (12,7; 3,0) 1,17 м	43,3
13		44,5		44,5		44,2
14	1,02 д (5,7)	61,1	1,01 д (5,6)	61,1	1,01 д (5,8)	62,9
15	4,36 дд (6,8; 5,7)	71,2	4,37 дд (6,8; 5,6)	71,2	4,39 тд (7,2; 2,0)	71,2
16	4,22 м	72,8	4,22 т (6,8)	72,8	2,21 м 1,35 м	43,6
17	0,96 м	62,9	0,95 м	63,0	1,00 м	57,6
18	1,24 с	17,9	1,23 с	17,9	1,27 с	16,7
19	0,98 с	14,0	1,15 с	17,0	1,15 с	17,0
20	1,89 м	31,5	1,91 м	31,4	2,12 м	41,1
21	0,94 д (6,6)	18,5	0,95 д (6,6)	18,6	0,99 д (6,6)	21,2
22	1,72 м 1,08 м	34,6	1,70 м 1,08 м	34,7	5,21 дд (15,1; 8,6)	137,2
23	1,43 м 1,15 м	28,8	1,41 м 1,18 м	28,6	5,15 дд (15,1; 7,8)	134,4
24	1,25 м	42,3	1,26 м	42,2	2,23 м	34,9
25	1,74 м	30,6	1,76 м	30,5	1,59 м 1,44 м	38,0
26	0,87 д (6,7)	20,0	0,87 д (6,8)	20,1	3,70 м 3,39 м	67,2
27	0,84 д (6,7)	19,1	0,85 д (6,8)	19,0		

Продолжение таблицы 8

Положение	174, 175		176		177	
	$\delta_H (J)$	δ_C	$\delta_H (J)$	δ_C	$\delta_H (J)$	δ_C
28	1,71 м	31,7	1,62 м	31,6	0,96 д (6,7)	21,7
	1,46 м		1,42 м			
29	3,83 м / 3,92 м	70,0	3,73 м	68,0		
	3,54 м		3,43 м			

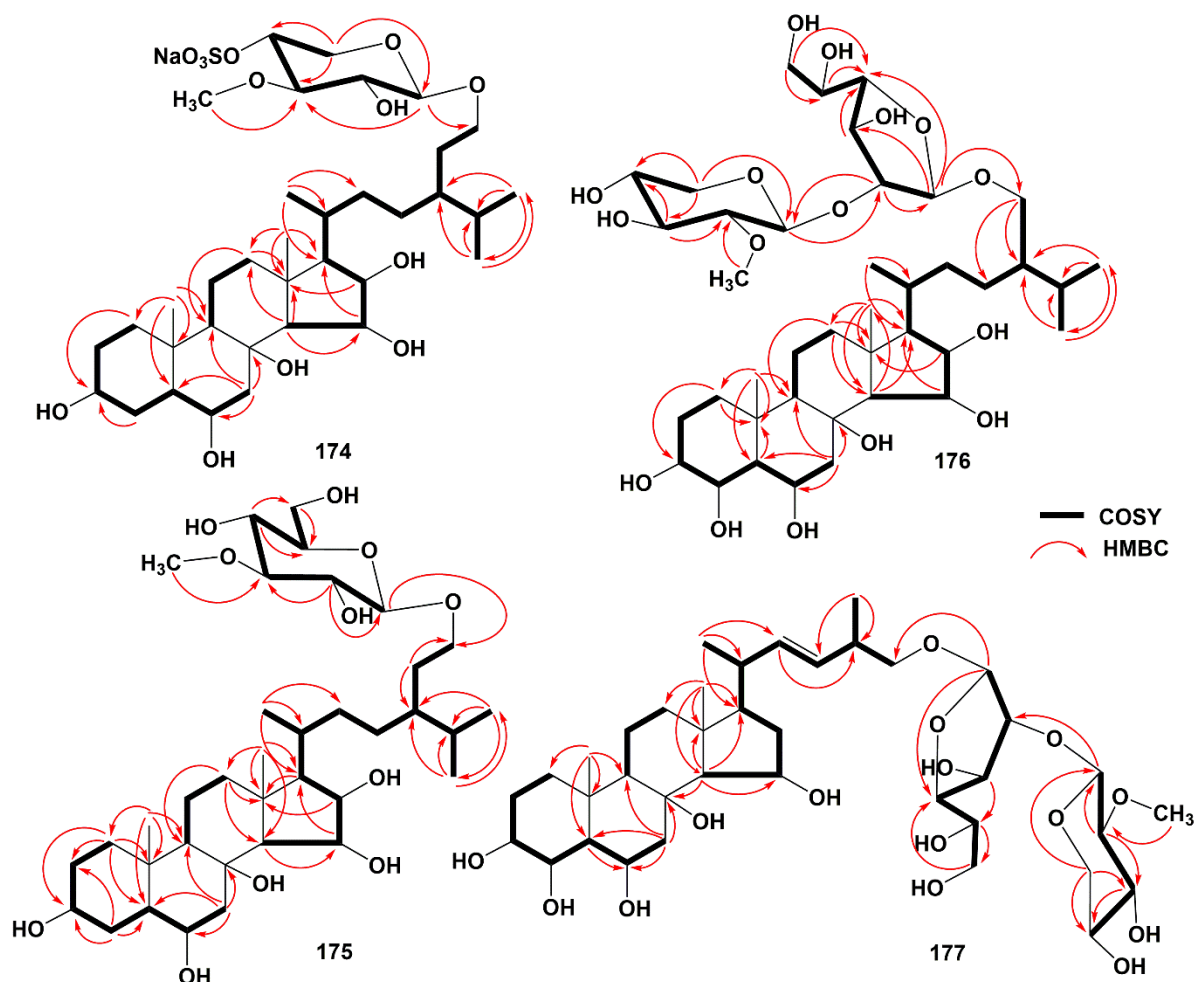


Рисунок 8 – Ключевые корреляции в спектрах ^1H - ^1H COSY и HMBC соединений 174–177

В дополнение к вышеприведенным сигналам в спектре ЯМР ^1H соединения **174** наблюдается сигнал в слабом поле при δ_H 4,23 м.д., принадлежащего аномерному протону моносахаридного остатка, который в эксперименте HSQC коррелирует с сигналом атома углерода при δ_C 104,8 м.д., а также сигнал протонов *O*-метильной группы при δ_H 3,61 м.д., который в эксперименте HSQC коррелирует с сигналом атома углерода при δ_C 60,7 м.д. (Таблица 9). Присутствие моносахаридного остатка в гликозиде **174** было подтверждено данными ИЭР-МС/МС. Фактически, спектр (–)ИЭР-МС/МС иона $[\text{M} - \text{Na}]^-$ с m/z 721 содержит фрагментный пик с m/z 495 $[(\text{M} - \text{Na}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}]^-$, образующийся в результате

потери моносахаридного остатка из декатионизированной молекулы, и фрагментный пик моносахаридного остатка с m/z 225 $[C_6H_9O_7S]^-$. Эти данные свидетельствовали о том, что сульфатная группа локализована в моносахаридном остатке гликозида **174**, а сам моносахаридный остаток является *O*-метилсульфооксипентозой.

Таблица 9 – Данные спектров ЯМР 1H (700,13 МГц) и ^{13}C (176,04 МГц) моносахаридных остатков соединений **174–177** в CD_3OD при 30 °С, δ в м.д., J в Гц.

Положение	174		175		176, 177	
	$\delta_H (J)$	δ_C	$\delta_H (J)$	δ_C	$\delta_H (J)$	δ_C
	3-OMe-4-OSO₃-Xyl_p		3-OMe-4-OSO₃-Glc_p		Gal_f	
1'	4,23 д (7,3)	104,8	4,27 д (7,5)	104,4	5,00 уш. д (1,5)	108,0
2'	3,25 дд (9,7; 7,3)	74,3	3,24 м	74,7	4,05 дд (4,1; 1,5)	91,8
3'	3,18 т (8,7)	85,1	3,22 м	86,3	4,15 дд (7,7; 4,1)	77,6
4'	4,25 м	77,2	4,18 дд (10,0; 8,6)	77,3	3,85 дд (7,7; 3,6)	83,0
5'	4,24 м	64,8	3,35 м	76,7	3,70 м	72,2
	3,34 м					
6'			3,89 дд (12,8; 2,6)	62,6	3,62 д (6,2)	64,8
			3,81 дд (12,8; 5,0)			
3'-OMe	3,61 с	60,7	3,62 с	61,1		
					2-OMe-Xyl_p	
1''					4,45 д (7,7)	104,7
2''					2,85 дд (9,2; 7,7)	84,8
3''					3,31 т (9,2)	77,4
4''					3,48 м	71,2
5''					3,83 дд (11,2; 5,6)	67,0
					3,16 дд (11,2; 10,6)	
2''-OMe					3,58 с	61,2

Корреляции в спектрах 1H - 1H COSY и HSQC, относящихся к моносахаридному остатку, выявили соответствующие последовательности протонов при C-1'–C-5'. Ключевые корреляции в спектре HMBC H-1'/C-3'; H-3'/O-CH₃; H-5'/C-1', C-3' и C-4' (Рисунок 8), а также корреляция в спектре ROESY H-3'/O-CH₃, подтвердили структуру 3-*O*-метил-4-*O*-сульфоксипиранозильного остатка (Рисунок 9). Положение метильной группы при C-3' было подтверждено сдвигом сигнала C-3' в спектре ЯМР ^{13}C в слабое поле из-за α -эффекта метилирования. Кроме того, сигнал C-3' был смещен в сильное поле (δ_C 85,1 м.д.) по сравнению с сигналом C-3' (δ_C 87,5 м.д.) в остатке 3-*O*-метилксилозы [93]. Аналогичный эффект наблюдался для сигнала C-5' (δ_C 64,8 м.д.) по сравнению с положением сигнала C-5' (δ_C 66,7 м.д.) в остатке 3-*O*-метилксилозы [93]. Также, сигнал C-4' (δ_C 77,2 м.д.) в спектре моносахаридного остатка соединения **174** был заметно смещен в слабое поле по сравнению с его положением для несulfатированной 3-*O*-метилксилозы (δ_C 70,9 м.д.) [93]. Это указывает на локализацию сульфатной группы при C-4' остатка 3-*O*-метилксилозы гликозида **174** и подтверждается данными спектров, в которых наблюдается заметный

сдвиг сигналов Н-3', Н-4' и Н-5' в слабое поле по сравнению с их положением в спектре ЯМР ^1H несультатированного остатка 3-О-метилсилозы. Сигнал аномерного протона в спектре ЯМР ^1H соединения **174** проявляется в виде дублета с КССВ $J = 7,3$ Гц, что соответствует β -конфигурации гликозидной связи. Отнесение моносахаридного остатка к D-ряду было предложено по аналогии с моносахаридными остатками сопутствующих гликозидов, ранее выделенных из того же вида морской звезды [87]. 3-О-Метил-4-О-сульфо- β -D-ксилопираноза – редко встречающийся моносахаридный остаток в стероидных гликозидах морских звезд, который ранее был обнаружен только в скопариозиде С из морской звезды *Astropecten scoparius* [94]. Присоединение моносахаридного остатка к С-29 стероидного агликона было установлено на основании данных спектров HMBC и ROESY, в которых наблюдались кросс-пики пики между Н-1' 3-ОМе-4-ОSO₃-Хyl и С-29/Н-29 агликона соответственно. На основании этих данных структура цермастерозида А (**174**) была определена как натриевая соль (20R,24R)-29-О-(3-О-метил-4-О-сульфо- β -D-ксилопиранозил)-24-этил-5 α -холестан-3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,29-гексаола (**174**).

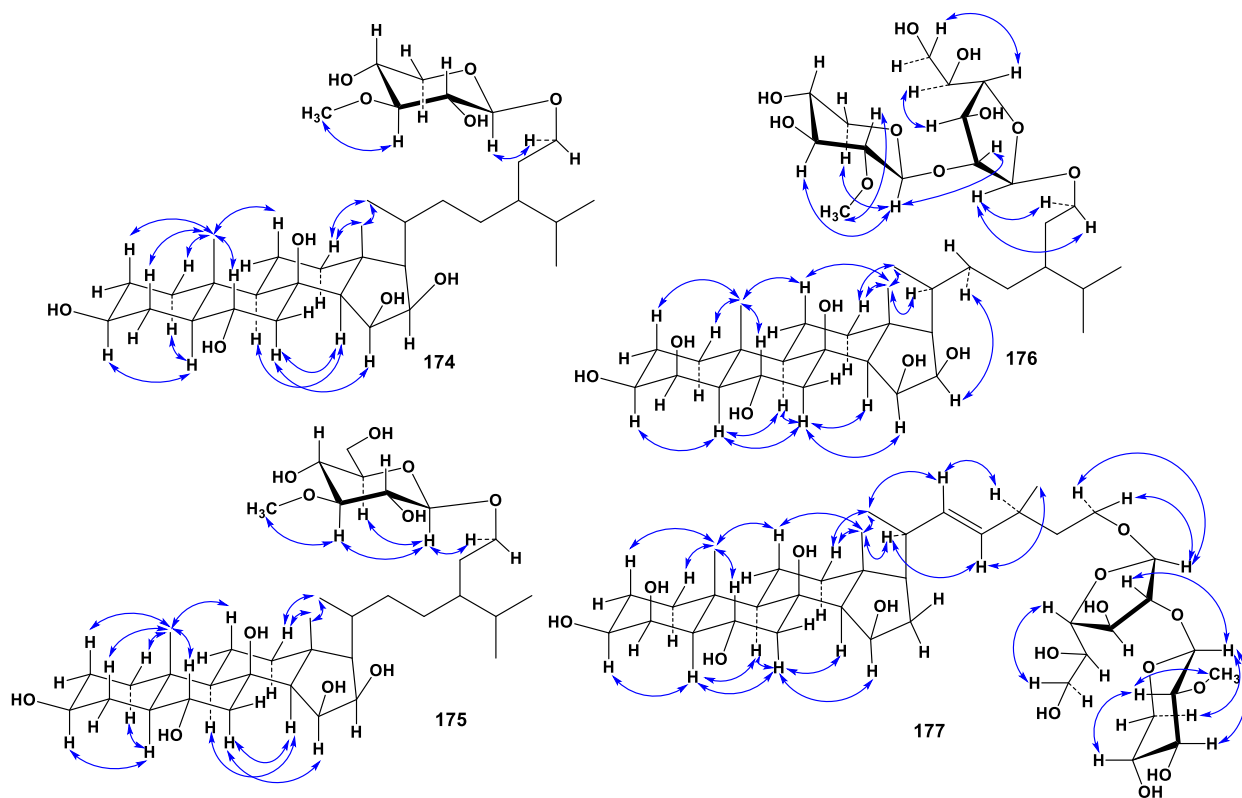


Рисунок 9 – Ключевые корреляции в спектрах ROESY соединений **174–177**

Молекулярная формула соединения **175** была определена как $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{O}_{14}\text{SNa}$ на основании значения пика иона катионизированной молекулы с m/z 797,3738 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения и пика иона анионизированной молекулы с m/z 751,3946 $[\text{M} - \text{Na}]^-$ в (–)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. Фрагментные пики с m/z

677 $[(M + Na) - NaHSO_4]^+$ в спектре (+)ИЭР-МС/МС иона с m/z 797 $[M + Na]^+$, а также с m/z 97 $[HSO_4]^-$ в спектре (-)ИЭР-МС/МС иона с m/z 751 $[M - Na]^-$ указывают на присутствие сульфатной группы в соединении **175**. ИК спектр гликозида **175** свидетельствует о наличии ν_{OH} гидроксильной (3358 см^{-1}) и $\nu_{S=O}$ и ν_{S-O} сульфатной ($1255, 1224, 827\text{ см}^{-1}$) групп. Сравнение молекулярных масс соединений **175** и **174** показало, что разница между ними составляет 30 а.е.м. (CH_2O). Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C соединения **175** отличаются от соответствующих данных спектров гликозида **174** только сигналами моносахаридного остатка (Таблица 9) и протонов H₂-29 (Таблица 8). В спектре ЯМР 1H соединения **175** наблюдается один сигнал аномерного протона моносахаридного остатка при δ_H 4,27 м.д., который в эксперименте HSQC коррелировал с сигналом атома углерода при δ_C 104,4 м.д., а также один сигнал, протонов *O*-метильной группы моносахаридного остатка при δ_H 3,62 м.д., который в эксперименте HSQC коррелировал с сигналом атома углерода при δ_C 61,1 м.д.. Спектр (-)ИЭР-МС/МС иона $[M - Na]^-$ с m/z 751 содержит фрагментный пик, образующийся в результате потери моносахаридного остатка из анионизированной молекулы с m/z 495 $[(M - Na) - C_7H_{12}O_8S]^-$, и фрагментный пик моносахаридного остатка с m/z 255 $[C_7H_{11}O_8S]^-$. Таким образом было установлено, что сульфатная группа локализована в моносахаридном остатке гликозида **175**, а сам моносахаридный фрагмент был идентифицирован как *O*-метилсульфооксигексоза. Химические сдвиги и КССВ H-1'-H-6' и химические сдвиги C-1'-C-6' в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C фрагмента *O*-метилсульфооксигексозы были определены на основании экспериментов COSY и HSQC (Таблица 9). Корреляции в спектрах HMBC H-2'/C-1', C-3'; O-CH₃/C-3'; H-4'/C-5', C-6' и ROESY H-1'/H-3'; H-5' и H-3'/O-CH₃ подтвердили полную структуру остатка 3-*O*-метил-4-*O*-сульфоглюкопиранозы. Величина КССВ (7,5 Гц) аномерного протона в спектре ЯМР 1H соединения **175** соответствует β -конфигурации гликозидной связи. Присоединение моносахаридного остатка к C-29 стероидного агликона было установлено по данным спектров HMBC и ROESY, в которых наблюдались кросс-пики между H-1' 3-OMe-4-OSO₃-Glc_p и C-29/H-29 агликона соответственно. Анализ литературы показал, что 3-*O*-метил-4-*O*-сульфоглюкопираноза ранее не была обнаружена в стероидных гликозидах морских звезд. Таким образом, структура цермастерозида В (**175**) была определена как натриевая соль (20*R*,24*R*)-29-*O*-(3-*O*-метил-4-*O*-сульфо- β -*D*-глюкопиранозил)-24-этил-5 α -холестан-3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,29-гексаола.

Молекулярная формула соединения **176** была определена как C₄₁H₇₂O₁₆ по значению пика иона катионизированной молекулы с m/z 843,4715 $[M + Na]^+$ в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения и пика депротонированной молекулы с m/z 819,4748 $[M - H]^-$ в (-)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. ИК спектр соединения **176** свидетельствует о

наличии вон гидроксильной группы (3323 см^{-1}). Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C , относящихся к стероидному ядру соединения **176**, показали присутствие сигналов протонов и атомов углерода двух ангулярных метильных групп CH_3 -18 и CH_3 -19 (δ_{H} 1,23 м.д. (с), 1,15 м.д. (с); δ_{C} 17,9, 17,0 м.д.), пяти оксигенированных метиновых групп НС-3 (δ_{H} 3,42 м.д. (м); δ_{C} 73,7 м.д.), НС-4 (δ_{H} 4,26 м.д. (уш. с); δ_{C} 69,1 м.д.), НС-6 [δ_{H} 4,18 м.д. (тд, $J = 11,2, 3,5$ Гц); δ_{C} 64,8 м.д.], НС-15 [δ_{H} 4,37 м.д. (дд, $J = 6,8, 5,6$ Гц); δ_{C} 71,2 м.д.] и НС-16 [δ_{H} 4,22 м.д. (т, $J = 6,8$ Гц); δ_{C} 72,8 м.д.], а также сигнал третичного атома углерода С-8, связанного с кислородом (δ_{C} 77,2 м.д.). Данные спектров ЯМР стероидной боковой цепи указывают на наличие трех метильных групп CH_3 -21 [δ_{H} 0,95 м.д. (д, $J = 6,6$ Гц); δ_{C} 18,6 м.д.], CH_3 -26 [δ_{H} 0,87 м.д. (д, $J = 6,8$ Гц); δ_{C} 20,1 м.д.] и CH_3 -27 [δ_{H} 0,85 м.д. (д, $J = 6,8$ Гц); δ_{C} 19,0 м.д.], и одной оксигенированной метиленовой группы CH_2 -29 (δ_{H} 3,73 м.д. (м), 3,43 м.д. (м); δ_{C} 68,0 м.д.). Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C стероидной части соединения **176** отличаются от соответствующих данных соединения **174** только сигналами протонов и атомов углерода кольца А стероидного ядра: в гликозиде **176** была обнаружена дополнительная гидроксильная группа при С-4. Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C стероидной части соединения **176** были практически идентичны соответствующим данным спектров халитулозида А из *Halityle regularis* с 24-этил-5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,29-гептаолом в качестве агликона [91].

В дополнение к вышеприведенным сигналам, в спектре ЯМР ^1H соединения **176** наблюдаются два сигнала аномерных протонов моносахаридных остатков при δ_{H} 5,00 и 4,45 м.д., которые в эксперименте HSQC коррелируют с сигналами атомов углерода при δ_{C} 108,0 и 104,7 м.д., а также сигнал *O*-метильной группы при δ_{H} 3,58 м.д., который в эксперименте HSQC коррелирует с сигналом атома углерода при δ_{C} 61,2 м.д. Присутствие двух моносахаридных остатков в гликозиде **176** было подтверждено данными ИЭР-МС/МС. (–)ИЭР-МС/МС спектр иона депротонированной молекулы $[\text{M} - \text{H}]^-$ с m/z 819 содержит фрагментные пики с m/z 655 $[(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O}]^-$ и 511 $[(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$, образующиеся в результате потери углеводных звеньев из депротонированной молекулы. Таким образом, было установлено, что моносахаридными остатками являются терминальная *O*-метилпентоза и гексоза. Корреляции ^1H - ^1H COSY и HSQC в спектрах ЯМР, относящихся к моносахаридным остаткам, выявили соответствующие последовательности протонов для С-1'–С-5' *O*-метилпентозы и С-1'–С-6' гексозы. Ключевые корреляции в спектрах HMBC и ROESY подтвердили полную структуру концевых 2-*O*-метилксилопиранозильного и галактофуранозильного остатков. Величина КССВ ($J = 7,7$ Гц) аномерного протона 2-ОМе-Ху $_{\text{f}}$ соответствует β -конфигурации гликозидной связи. Величина химического сдвига аномерного углерода Gal $_{\text{f}}$ (δ_{C} 108,0 м.д.) соответствует β -

конфигурации гликозидной связи (δ_C 109,2 м.д. для β -*O*-метилгалактофуранозы и δ_C 103,1 м.д. для α -*O*-метилгалактофуранозы [95]). Присоединение дисахаридного остатка к C-29 стероидного агликона и присоединение моносахаридных остатков друг к другу было установлено по данным спектров HMBC и ROESY, где наблюдаются кросс-пики между H-1'' 2-ОМе-Хуl_r и C-2'/H-2' Gal_f, а также H-1' Gal_f и C-29/H₂-29 агликона соответственно. Этот углеводный фрагмент ранее был обнаружен в цермастерозидах C₁, C₃ и C₄ из *C. patagonicus* [87]. Отнесение моносахаридных остатков к *D*-ряду было предложено по аналогии с отнесениями в соответствующих гликозидах, ранее выделенных из того же вида морских звезд [87]. На основании полученных данных структура цермастерозида D (**176**) была определена как (20*R*,24*R*)-29-*O*-(2-*O*-метил- β -*D*-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- β -*D*-галактофуранозил)-24-этил-5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,29-гептаол.

Молекулярная формула соединения **177** была определена как C₃₉H₆₆O₁₅ на основании значения пика иона катионизированной молекулы с m/z 797,4295 [M + Na]⁺ в (+)ИЭР масс-спектре высокого разрешения и пика депротонированной молекулы с m/z 773,4337 [M – H][–] в (–)ИЭР масс-спектре высокого разрешения. ИК спектр соединения **177** свидетельствует о наличии вон гидроксильной группы (3365 см^{–1}). В спектрах ЯМР ¹H и ¹³C, относящихся к стероидному ядру соединения **177**, наблюдаются сигналы протонов и атомов углерода двух ангулярных метильных групп CH₃-18 и CH₃-19 (δ_H 1,27 м.д. (с), 1,15 м.д. (с); δ_C 16,7, 17,0 м.д.), четырех оксигенированных метиновых групп HC-3 (δ_H 3,42 м.д. (м); δ_C 73,7 м.д.), HC-4 (δ_H 4,25 м.д. (уш. с); δ_C 69,1 м.д.), HC-6 (δ_H 4,15 м.д. (м); δ_C 64,8 м.д.) и HC-15 [δ_H 4,39 м.д. (тд, J = 7,2, 2,0 Гц); δ_C 71,2 м.д.], и сигнал третичного атома углерода C-8, связанного с кислородом (δ_C 77,4 м.д.). Сигналы спектров ЯМР стероидной боковой цепи указывали на наличие двух вторичных метильных групп CH₃-21 [δ_H 0,99 м.д. (д, J = 6,6 Гц); δ_C 21,2 м.д.] и CH₃-28 [δ_H 0,96 м.д. (д, J = 6,7 Гц); δ_C 21,7 м.д.], оксигенированной метиленовой группы H₂C-26 (δ_H 3,70 м.д. (м), 3,39 м.д. (м); δ_C 67,2 м.д.) и двойной связи $\Delta^{22(23)}$ [δ_H 5,21 м.д. (дд, J = 15,1, 8,6 Гц), 5,15 м.д. (дд, J = 15,1, 7,8 Гц); δ_C 137,2, 134,4 м.д.]. Корреляции ¹H-¹H COSY и HSQC в спектрах ЯМР, относящихся к стероидному фрагменту, выявили соответствующие последовательности протонов при C-1–C-7; C-9–C-12 через C-11; C-14–C-17 и C-17–C-21, C-20 – до конца боковой цепи и C-24–C-28. Ключевые кросс-пики в спектре HMBC, такие как H-7/C-5, C-6, C-8, C-9; H-14/C-8, C-13, C-15, C-17; H₃-18/C-12, C-13, C-14, C-17; H₃-19/C-1, C-5, C-9, C-10; H₃-21/C-17, C-20, C-22; H-22/C-24 и H₃-28/C-23, C-24, подтвердили общую структуру стероидной части соединения **177**. Ключевые кросс-пики в спектре ROESY позволили определить 5 α /9 α /10 β /13 β общую стереохимию стероидного ядра, 3 β ,4 β ,6 α ,15 β -конфигурации кислородсодержащих заместителей и Δ^{22} -24-метил-27-*нор*-холестановую боковую цепь в соединении **177**. Данные спектров ЯМР ¹H и

^{13}C стероидной части соединения **177** практически совпадали с данными соответствующих спектров плацентозида А из *Sphaerodiscus placenta* [96] с 24-метил-27-нор-5 α -холест-22-ен-3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,26-гексаолом в качестве агликона. (Е)-Конфигурация двойной связи Δ^{22} была определена по значению КССВ, равному 15,1 Гц для олефиновых протонов Н-22 и Н-23 в спектре ЯМР. На основании приведенных данных стероидная часть соединения **177** была определена как (20*R*,22*E*,24 ζ)-24-метил-27-нор-5 α -холест-22-ен-3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,26-гексаол.

В дополнение к вышеприведенным сигналам, в спектре ЯМР ^1H соединения **177** наблюдаются два сигнала аномерных протонов моносахаридного остатка при δ_{H} 5,00 и 4,45 м.д., которые в эксперименте HSQC коррелируют с сигналами углерода при δ_{C} 108,0 и 104,7 м.д., а также один сигнал *O*-метильной группы при δ_{H} 3,58 м.д., который в эксперименте HSQC коррелирует с сигналом углерода при δ_{C} 61,2 м.д. На основании анализа данных 2D спектров ЯМР и масс-спектров гликозидов **177** и **176** было предположено, что углеводная часть соединения **177** идентична таковой в соединении **176**. Таким образом, структура цермастерозида Е (**177**) была установлена как (20*R*,22*E*,24 ζ)-26-*O*-(2-*O*-метил- β -*D*-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- β -*D*-галактофуранозил)-24-метил-27-нор-5 α -холест-22-ен-3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,26-гексаол.

Новые гликозиды полигидроксистероидов, названные цермастериозидами А (**174**), В (**175**), D (**176**) и Е (**177**), представляют собой полигидроксированные холестановые производные, гликозилированные по гидроксильным группам боковой цепи. Цермастерозиды А и В содержат (20*R*,24*R*)-24-этил-5 α -холестан-3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,29-гексаольный агликон, к которому при С-29 присоединен сульфатированный метилированный моносахарид: 3-*O*-метил-4-*O*-сульфо- β -*D*-ксилопиранозный остаток (соединение **174**) или, впервые обнаруженный в гликозидах морских звезд, 3-*O*-метил-4-*O*-сульфо- β -*D*-глюкопиранозный остаток (соединение **175**). Цермастерозид D (**176**) отличается наличием дополнительной гидроксильной группы при С-4 агликона и содержит дисахаридный фрагмент 2-*O*-метил- β -*D*-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- β -*D*-галактофуранозы, присоединенный к С-29. Цермастерозид Е (**177**) содержит в своем составе тот же дисахаридный остаток, но, присоединенный к гидроксильной группе при С-26 (20*R*,22*E*,24 ζ)-24-метил-27-нор-5 α -холест-22-ен-3 β ,4 β ,6 α ,8,15 β ,26-гексаольного агликона. Следует отметить, что сульфатированные метилированные моносахариды крайне редко встречаются в стероидных гликозидах иглокожих: 3-*O*-метил-4-*O*-сульфоксилоза ранее была описана лишь в одном соединении, выделенном из морской звезды *Astropecten scoparius*, а выявленная в цермастерозиде В 3-*O*-метил-4-*O*-сульфоглюкоза до настоящего времени в природных гликозидах морских звезд не обнаруживалась.

3.6 Биологическая активность сфинголипидов

3.6.1 Антимикробная активность и ингибирование уреазы

Уреаза является важным ферментом для усвоения азота некоторыми грибами и бактериями [97]. Некоторые ингибиторы уреазы снижают рост и патогенность *Staphylococcus aureus* [98]. Влияние лептастериацереброзидов А (**162**) и В (**163**), астроцереброзида В (**29**) и астериациереброзида С (**34**) из морской звезды *L. polaris acervata* на активность уреазы измеряли в бесклеточном тесте и рассчитывали концентрации полумаксимального ингибирования (ИК₅₀) (Таблица 10). Тиомочевина, известный ингибитор уреазы, была использована в качестве положительного контроля. Соединения **162**, **163**, **34**, **29** ингибировали активность уреазы с величинами ИК₅₀ в диапазоне 6,85–8,08 мкМ, что было более эффективно, чем для самой тиомочевины.

Таблица 10 – Влияние соединений из *L. polaris acervata* на активность уреазы.

Соединение	ИК ₅₀ , мкМ
162	6,85 ± 0,49
163	7,88 ± 0,51
34	8,08 ± 0,73
29	7,69 ± 0,63
Тиомочевина	14,34 ± 1,23

Соединения **162**, **163**, **34** и **29** в концентрациях до 50 мкМ не влияли на рост *S. aureus*, *Escherichia coli* или *Candida albicans*, что показало отсутствие у них прямой антимикробной активности.

Несмотря на отсутствие антимикробной активности, эти соединения представляют интерес в качестве ингибиторов активности уреазы в почве. Высокая активность уреазы в почве является проблемой для сельского хозяйства, поскольку приводит к быстрому разложению азотных удобрений и потере их доступности для растений [99]. Использование ингибиторов уреазы может повысить эффективность использования азотных удобрений, тем самым способствуя увеличению урожайности [100].

3.6.2 Цитотоксическая и цитопротекторная активность сфинголипидов из *L. polaris acervata*

Было исследовано влияние соединений **162**, **163**, **34** и **29** на эритроциты человека и кардиомиоциты крыс линии Н9с2. Ни одно из изученных соединений не проявило гемолитической активности в отношении эритроцитов человека в концентрациях до 100

мкМ. Более того, ни одно из соединений в концентрациях до 100 мкМ не влияло на жизнеспособность кардиомиоцитов Н9с2.

Кардиопротекторные эффекты цереброзидов **162**, **163**, **34** и **29** оценивали по их способности невелировать токсическое действие хлорида кобальта (II) (CoCl_2) и $\text{TNF-}\alpha$ -индуцированное воспаление в кардиомиоцитах крыс Н9с2 (Рисунок 10).

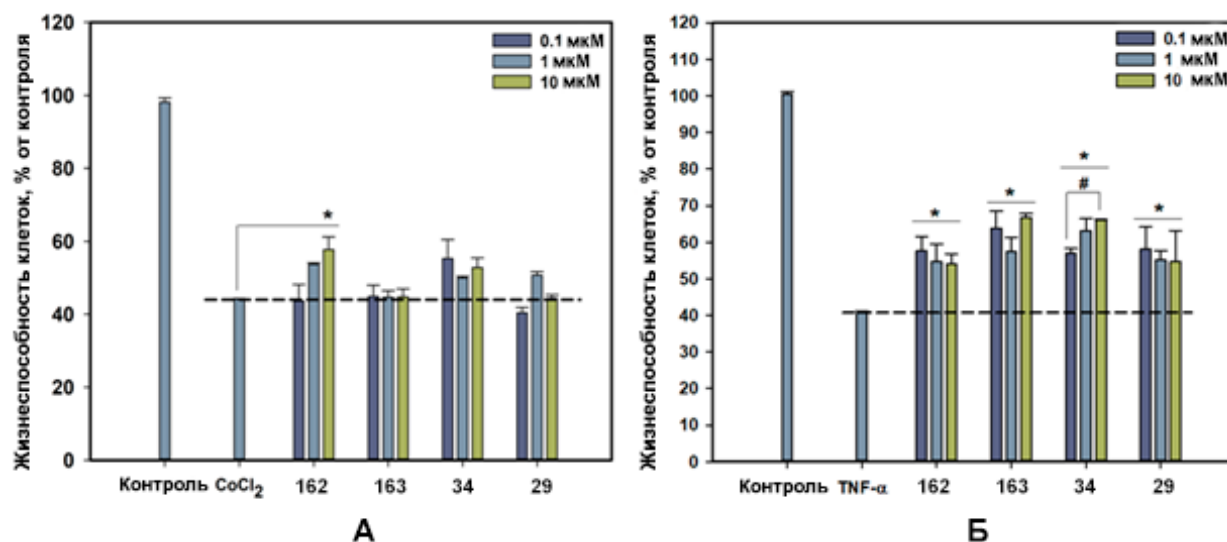


Рисунок 10 – Влияние соединений **162**, **163**, **34**, **29** на жизнеспособность кардиомиоцитов Н9с2, обработанных CoCl_2 в течение 48 ч (А) и $\text{TNF-}\alpha$ в течение 24 ч (Б).

Хлорид кобальта в дозе 500 мкМ снижал жизнеспособность кардиомиоцитов Н9с2 на 56,7%. Только цереброзид **162** в концентрации 10 мкМ достоверно увеличивал жизнеспособность клеток, обработанных CoCl_2 , на 32,6% по сравнению с клетками, обработанными только CoCl_2 . Другие соединения не предотвращали токсического воздействия CoCl_2 . Тем не менее, все соединения ослабляли воспалительный эффект $\text{TNF-}\alpha$, который снижал жизнеспособность клеток Н9с2 на 54,9%. Цереброзиды **162**, **163**, **34** и **29** увеличивали жизнеспособность клеток, обработанных $\text{TNF-}\alpha$, на 16–34%. Наиболее эффективными соединениями оказались лептастериациреброзид В (**163**) и астериациреброзид С (**34**), которые увеличивали жизнеспособность обработанных $\text{TNF-}\alpha$ клеток на 33,9 и 28,7% соответственно в концентрации 10 мкМ. Следует отметить, что цереброзид **34** проявил концентрационно-зависимую активность, в то время как соединения **162**, **163** и **29** показали повышенную активность, но их действие не зависело от концентрации.

Было исследовано влияние цереброзидов **162**, **163**, **34** и **29** на уровень АФК, мембранный митохондриальный потенциал (ММП), уровень перекисного окисления

кардиолипина в клетках H9c2, обработанных TNF- α , и люминесценцию в клетках JB6-Luc NF- κ B (Рисунок 11 А–Г).

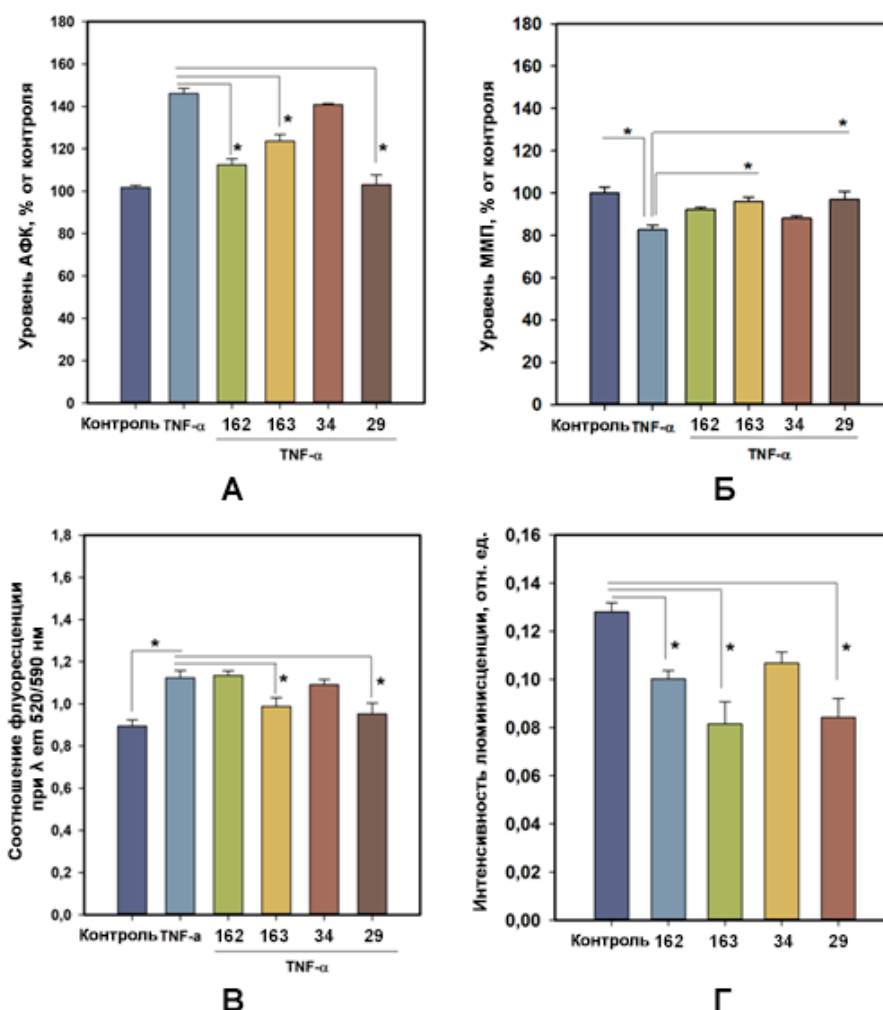


Рисунок 11 – Влияние соединений **162**, **163**, **34**, **29** на уровни АФК (А), ММП (Б), перекисного окисления кардиолипина (В) в клетках H9c2, обработанных TNF- α , и люминесценцию в клетках JB6-Luc NF- κ B (Г).

TNF- α индуцировал увеличение уровня АФК в кардиомиоцитах H9c2 на 46,1% по сравнению с необработанными клетками (контроль). Соединения **162**, **163** и **29** уменьшали его на 23,1, 15,4 и 29,4% соответственно по сравнению с клетками, обработанными TNF- α . Уровни ММП были снижены на 17,4% в клетках H9c2, обработанных TNF- α . Цереброзиды **163** и **29** значительно увеличили его на 16,1 и 17,5% соответственно. Эффекты лептастериациреброзида А (**162**) и астериациреброзида С (**34**) (11,8 и 6,6% соответственно) были очевидными, но не статистически значимыми в этом исследовании.

Интенсивность флуоресценции красителя MitoCLOx при 520/590 нм в клетках H9c2, обработанных TNF- α (1,12), по сравнению с таковой в необработанных клетках (0,89) была повышенной, что свидетельствует об увеличении уровня перекисного окисления

кардиолипина. Лептастериациреброзид В (163) и астроцереброзид В (29) предотвращали увеличение уровня перекисного окисления кардиолипина.

TNF- α представляет собой провоспалительный цитокин, который активирует транскрипционную активность NF- κ B посредством взаимодействия с толл-подобными рецепторами [38]. Для определения прямого влияния цереброзидов 162, 163 и 29 на транскрипционную активность NF- κ B использовали клетки JB6-Luc NF- κ B, в которых стабильно экспрессируется репортерный ген люциферазы под контролем промотора, содержащего сайты связывания фактора NF- κ B. Соединения 162, 163 и 29 достоверно снижали интенсивность люминесценции в клетках JB6-Luc NF- κ B на 21,7, 36,3 и 34,2% соответственно (Рисунок 11 Г), что доказывает их влияние на экспрессию NF- κ B.

Из вышесказанного следовало, что лептастериациреброзид А (162) может защищать кардиомиоциты H9c2 от токсического воздействия CoCl_2 , а лептастериациреброзид В (163) и астроцереброзид В (29) предотвращают токсическое воздействие TNF- α на эти клетки путем, по крайней мере, блокирования NF- κ B-зависимого воспалительного пути.

Таким образом, исследуемые сфинголипиды демонстрируют выраженные кардиопротекторные свойства, реализуемые за счет, по крайней мере, подавления митохондриального окислительного стресса и ингибирования NF- κ B-зависимого воспалительного пути. Сочетание отсутствия гемолитической и прямой цитотоксичности со способностью восстанавливать клеточный гомеостаз делает соединения 162, 163 и 29 перспективными кандидатами для разработки средств профилактики сердечно-сосудистых патологий воспалительной этиологии.

3.6.3 Цитотоксическая активность сфинголипидов из *C. patagonicus* в отношении нормальных и опухолевых клеток и их влияние на колониеобразование и рост опухолевых клеток человека

Была исследована цитотоксическая активность церамидов 164–166 офидиациреброзидов С (45) и D (46), цереброзидов СЕ-3-2 (63) и 169, выделенных из морской звезды *C. patagonicus*, в отношении нормальных эмбриональных клеток почек человека HEK293 и серии опухолевых клеток человека: аденокарциномы толстого кишечника человека HT-29, меланомы SK-MEL-28 и трижды негативного рака молочной железы человека MDA-MB-231. Влияние доксорубина (10, 50 и 100 мкМ), использованного в качестве положительного контроля, и сфинголипидов 45, 46, 63, 164–166 и 169 (1, 10 и 50 мкМ) на жизнеспособность клеток проводили MTS методом после 24 ч обработки клеток. В результате было обнаружено, что все соединения обладают умеренной цитотоксической активностью в отношении HEK293, HT-29 и SK-MEL-28

клеточных линий. Эти соединения незначительно ингибировали жизнеспособность клеток HEK293, HT-29 и SK-MEL-28 в концентрациях до 50 мкМ (с процентом ингибирования менее 15%). Соединения **63**, **164** и **169** обладали также незначительной цитотоксической активностью в отношении клеток MDA-MB-231 в концентрациях до 50 мкМ. ИК₅₀ сфинголипидов **45**, **46**, **165** и **166** была зарегистрирована только для клеток карциномы молочной железы MDA-MB-231, и её величина была сопоставимой для всех исследованных соединений. Значение ИК₅₀ доксорубина (Doxo) составляло 35,7, 21,8, 40,0 и 22,3 мкМ для клеточных линий HEK293, HT-29, SK-MEL-28 и MDA-MB-231 соответственно (Таблица 11).

Таблица 11 – Цитотоксическая активность сфинголипидов из *C. patagonicus* в отношении нормальных и опухолевых клеточных линий.

Соединения	Концентрация полумаксимального ингибирования (ИК ₅₀), мкМ			
	HEK293	HT-29	SK-MEL-28	MDA-MB-231
Доксорубин	35,7±1,2	21,8±3,2	40,0±5,0	22,3±0,2
164	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0
165	>50,0	>50,0	>50,0	48,7±2,4
166	>50,0	>50,0	>50,0	49,4±1,6
45	>50,0	>50,0	>50,0	48,7±1,8
46	>50,0	>50,0	>50,0	40,5±0,5
63	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0
169	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0

Поскольку соединения **45**, **46**, **63**, **164–166** и **169** подавляли жизнеспособность клеток рака молочной железы MDA-MB-231, была оценена их способность ингибировать образование колоний клеток MDA-MB-231 с использованием метода мягкого агара. Анализ ингибирования образования колоний в мягком агаре позволяет проводить первичную оценку противоопухолевой активности соединений в отношении роста незакреплённых клеток в условиях *in vitro*, что является одной из отличительных характеристик клеточной трансформации и неконтролируемого роста опухолевых клеток.

В результате было обнаружено, что соединения **164**, **166**, **63** и **169** в концентрации 20 мкМ оказывали сопоставимое влияние на образование колоний MDA-MB-231 и уменьшали количество колоний на 46, 48, 44 и 50% соответственно (Рисунок 12). Соединения **165**, **45** и **46** в концентрации 20 мкМ ингибировали образование колоний клеток MDA-MB-231 на 68, 54 и 68% соответственно. Их способность ингибировать формирование колоний опухолевых клеток была сопоставима с эффектом доксорубина, который уменьшал количество колоний на 70% в такой же концентрации.

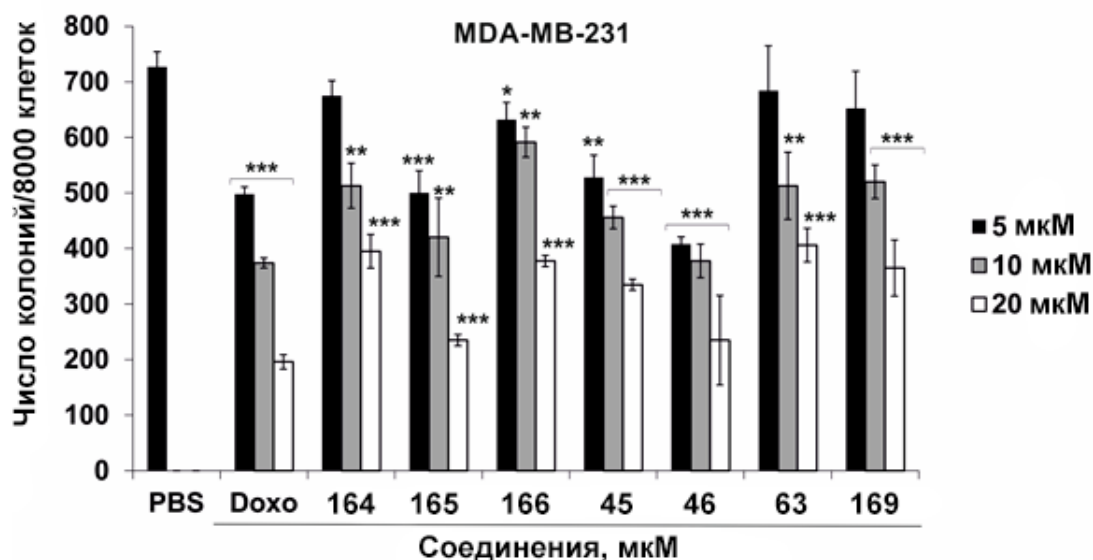


Рисунок 12 – Влияние соединений **164–166**, **45**, **46**, **63** и **169** на образование колоний клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 ($2,4 \times 10^4$), которые подвергались воздействию PBS (контроль), доксорубина (Doxo, 5, 10 и 20 мкМ) или исследованных соединений (5, 10 и 20 мкМ).

Таким образом, выделенные сфинголипиды проявляют селективную цитостатическую активность в отношении клеток карциномы молочной железы, эффективно подавляя их способность к колониеобразованию на уровне химиотерапевтического препарата, доксорубина. Отсутствие выраженной токсичности в отношении нормальных клеток HEK293 подчеркивает перспективность дальнейшего изучения данных соединений в качестве противоопухолевых агентов.

3.7 Биологическая активность стероидолипидов из *C. patagonicus*

Цитотоксическую активность четырех выделенных из *C. patagonicus* стероидолипидов **170–173** исследовали по отношению к нормальным эпидермальным клеткам мыши JB6 Cl41, а также клеткам трижды негативного рака молочной железы человека MDA-MB-231 и колоректальной карциномы человека HCT 116 методом MTS. Было обнаружено, что соединения **170–173** подавляют жизнеспособность клеток менее чем на 15% при концентрации 100 мкМ после 24 ч инкубации. Кроме того, была определена цитостатическая активность соединений **170–173** по отношению к клеточным линиям JB6 Cl41, MDA-MB-231 и HCT 116 в течение 24, 48 и 72 ч инкубации. После 72 ч инкубирования клеток было установлено, что концентрации соединений **170**, **171** и **172**, вызывающие полумаксимальное ингибирование (ИК₅₀) роста клеток JB6 Cl41 составляли 81, 40 и 79 мкМ соответственно; для клеток MDA-MB-231 значения ИК₅₀ соединений **170**, **171** и **172** составили 74, 33 и 73 мкМ соответственно; для клеток HCT 116 значения ИК₅₀ соединений

170, **171** и **172** составили 73, 31 и 71 мкМ соответственно. Цитостатический эффект соединения **171** был более выраженным в клетках колоректальной карциномы НСТ 116 (Рисунок 13 А–В), в то время как активность стероидолипида **173** была сравнительно низкой в отношении всех представленных клеточных линий.

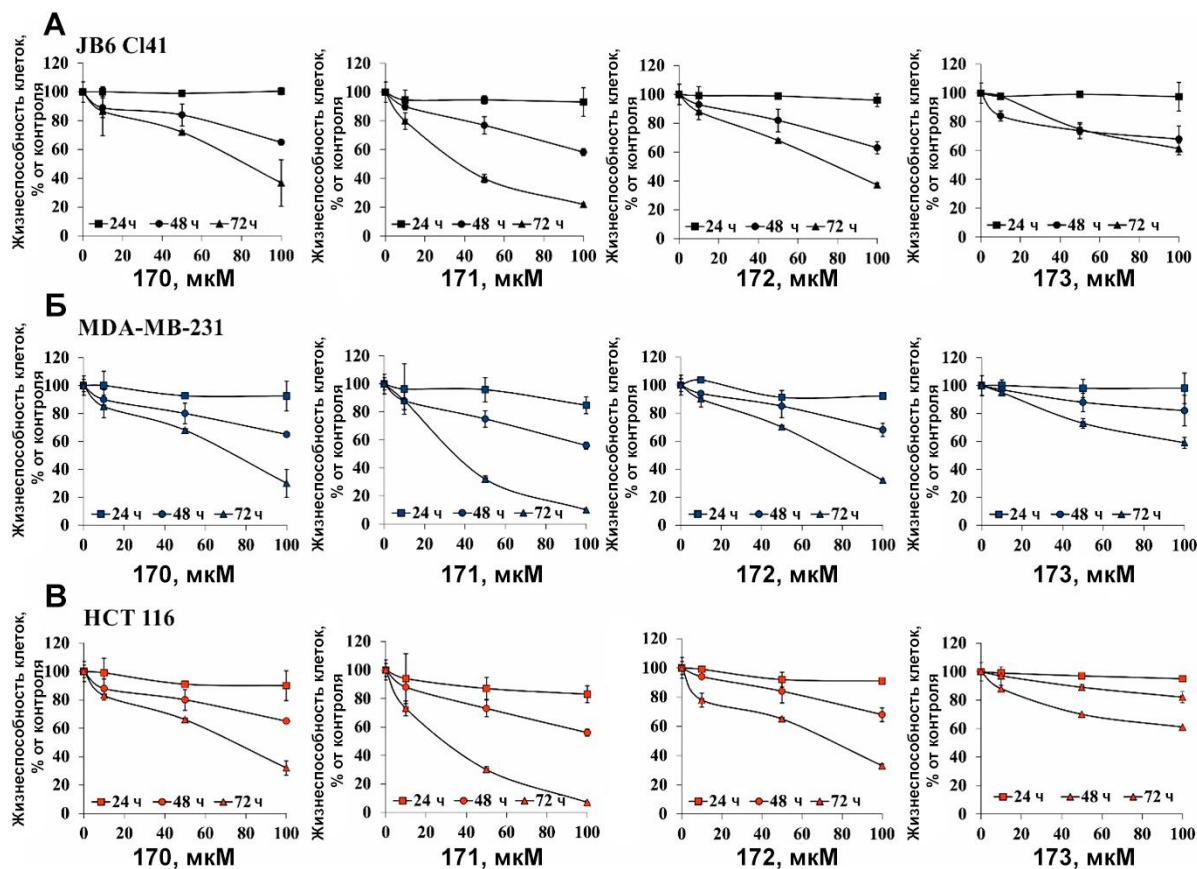


Рисунок 13 – Цитостатическая активность соединений **170–173** в отношении нормальных эпидермальных клеток JB6 Cl41, клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и клеток колоректальной карциномы НСТ 116. (А) Клетки JB6 Cl41, (Б) MDA-MB-231 или (В) НСТ 116 обрабатывали соединениями **170–173** в концентрациях 1–100 мкМ в течение 24 ч, 48 и 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа MTS.

Для изучения действия соединений **170–173** на формирование колоний опухолевых клеток использовали метод мягкого агара. Было обнаружено, что соединения **170–173** в концентрации 20 мкМ ингибируют образование колоний в клетках MDA-MB-231 на 17, 26, 15 и 10% соответственно. Между тем, соединения **170–173** ингибировали образование колоний в клетках НСТ 116 на 20, 27, 18 и 16% соответственно (Рисунок 14 А–Б).

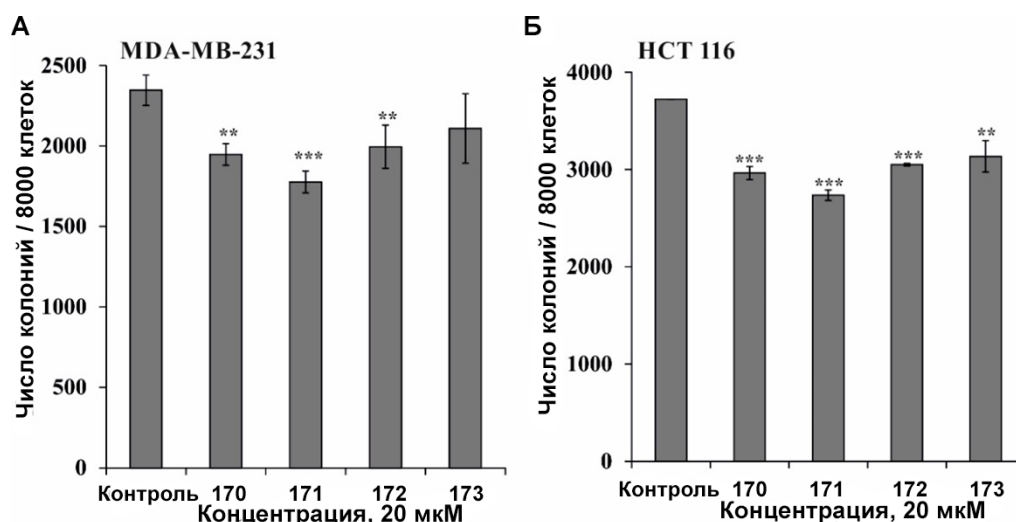


Рисунок 14 – Влияние соединений **170–173** на образование колоний в клетках MDA-MB-231 (А) или НСТ 116 (Б) рака человека.

Также была исследована способность соединений **170–173** ингибировать миграцию клеток MDA-MB-231 и НСТ 116 с высоким метастатическим потенциалом методом заживления царапины. Было установлено, что стероидолипиды **170** и **171** (в концентрации 20 мкМ) способны предотвращать миграцию клеток MDA-MB-231 на 42 и 50% соответственно по сравнению с контролем через 48 ч инкубации. Соединения **172** и **173** обладали умеренной ингибирующей активностью в отношении миграции клеток MDA-MB-231. С другой стороны, миграция клеток НСТ 116 почти полностью подавлялась соединением **171** (на 73%). Стероидолипиды **170**, **172** и **173** предотвращали миграцию клеток НСТ 116 на 36, 30 и 24% соответственно (Рисунок 15 А–Г).

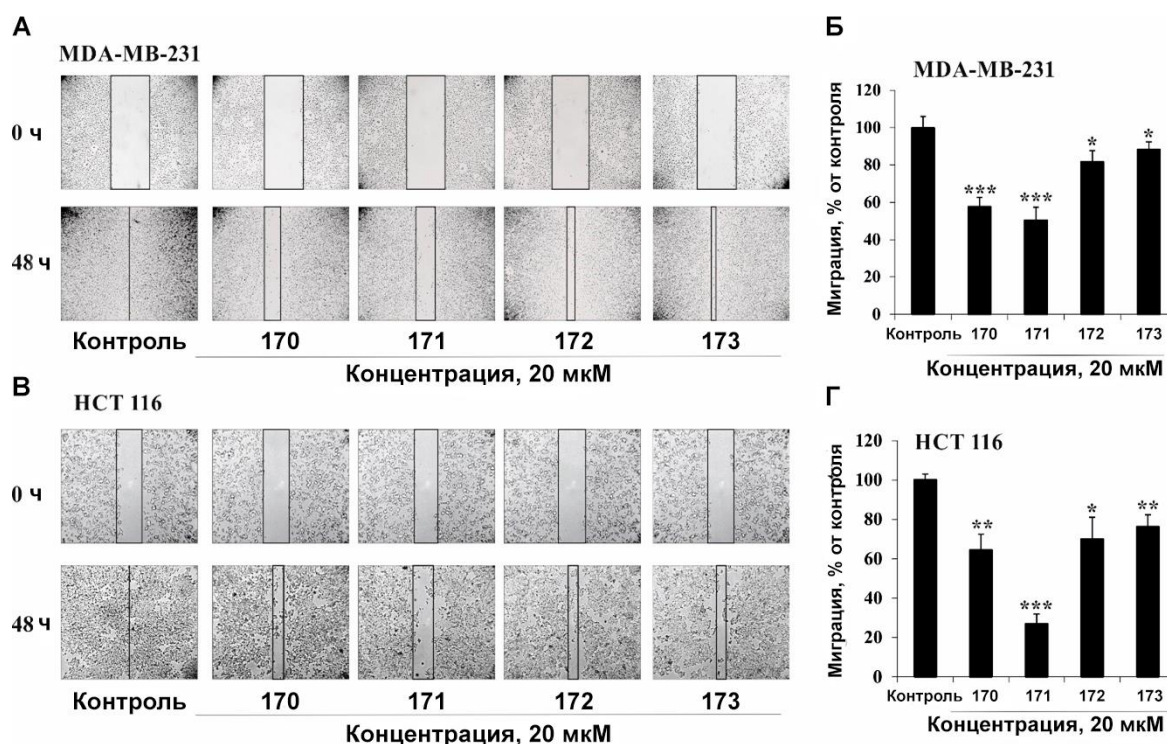


Рисунок 15 – Влияние соединений **170–173** на миграцию клеток MDA-MB-231 и HCT 116. Репрезентативные фотографии культур клеток MDA-MB-231 (**А**) и HCT 116 (**В**), в отношении которых исследовался антиметастатический эффект соединений **170–173**, и графическое представление в процентах от среднего значения площади закрытия раны для соответствующих клеточных линий (**Б**, **Г**)

Таким образом, стероидолипиды **170–173** обладают дозозависимым цитостатическим действием и эффективно ингибируют миграционную активность высокометастатичных линий клеток рака молочной железы и толстого кишечника. Наибольшую противометастатическую и антипролиферативную эффективность демонстрирует соединение **171**, что обосновывает его дальнейшее изучение в качестве потенциального агента для сдерживания опухолевой инвазии.

3.8 Биологическая активность гликозидов полигидроксистероидов из *C. patagonicus*

Было изучено влияние гликозидов полигидроксистероидов **119**, **174–178** из *C. patagonicus* на жизнеспособность, пролиферацию и морфологию микроглиальных клеток. Отсутствие цитотоксического эффекта исследованных соединений по отношению к мышинным микроглиальным клеткам SIM-A9 было подтверждено окрашиванием тетразолием (метод MTS) при обработке клеток в течение 72 ч. Обнаружено, что для исследуемых концентраций соединений (0,1, 1 и 10 мкМ), в дополнение к отсутствию цитотоксического эффекта, наоборот, наблюдалось увеличение метаболизма тетразолия,

указывающее, вероятно на усиление пролиферации и метаболизма по сравнению с контролем. Микрофотографии культуры SIM-A9 также показали отсутствие выраженных морфологических изменений, присущих клеткам в состоянии апоптоза/некроза, таких как вакуолизация, провисание и потеря связи с субстратом (Рисунок 16 А–Б).

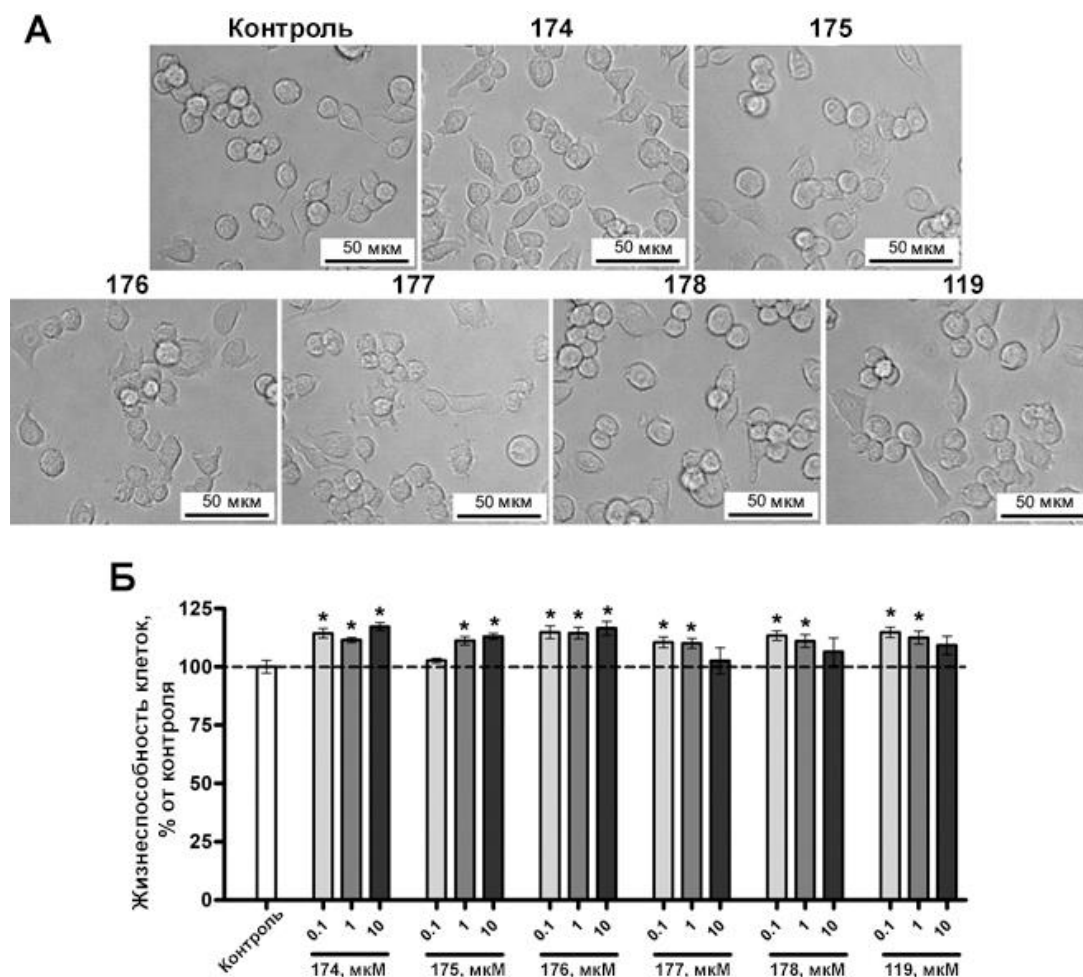


Рисунок 16 – (А) Микрофотографии культуры микроглиальных клеток, подвергнутых воздействию соединений 119 и 174–178 в концентрации 10 мкМ. (Б) Анализ цитотоксического действия соединений 119 и 174–178 на культуру микроглиальных клеток мышей SIM-A9 методом MTS.

Одной из важных форм ответа глиальных клеток на различные патологические процессы, происходящие в нервной ткани, является активация молекул окислителей, таких как оксид азота (NO), нитриты и АФК, которые реализуют защитные функции воспаления в период острого повреждения. Однако чрезмерное и длительное воспаление может быть нейротоксичным из-за высвобождения медиаторов, которые запускают циклы микроглиальной нейродегенерации. В настоящее время, поиск эффективных и нетоксичных противовоспалительных и антиоксидантных соединений является приоритетной задачей современной медицины. В ходе ЛПС-индуцированной активации,

микроглия трансформируется морфологически (из разветвленной в амeboидную форму) и функционально (начинает секретировать свободные радикалы) (Рисунок 17 А–В).

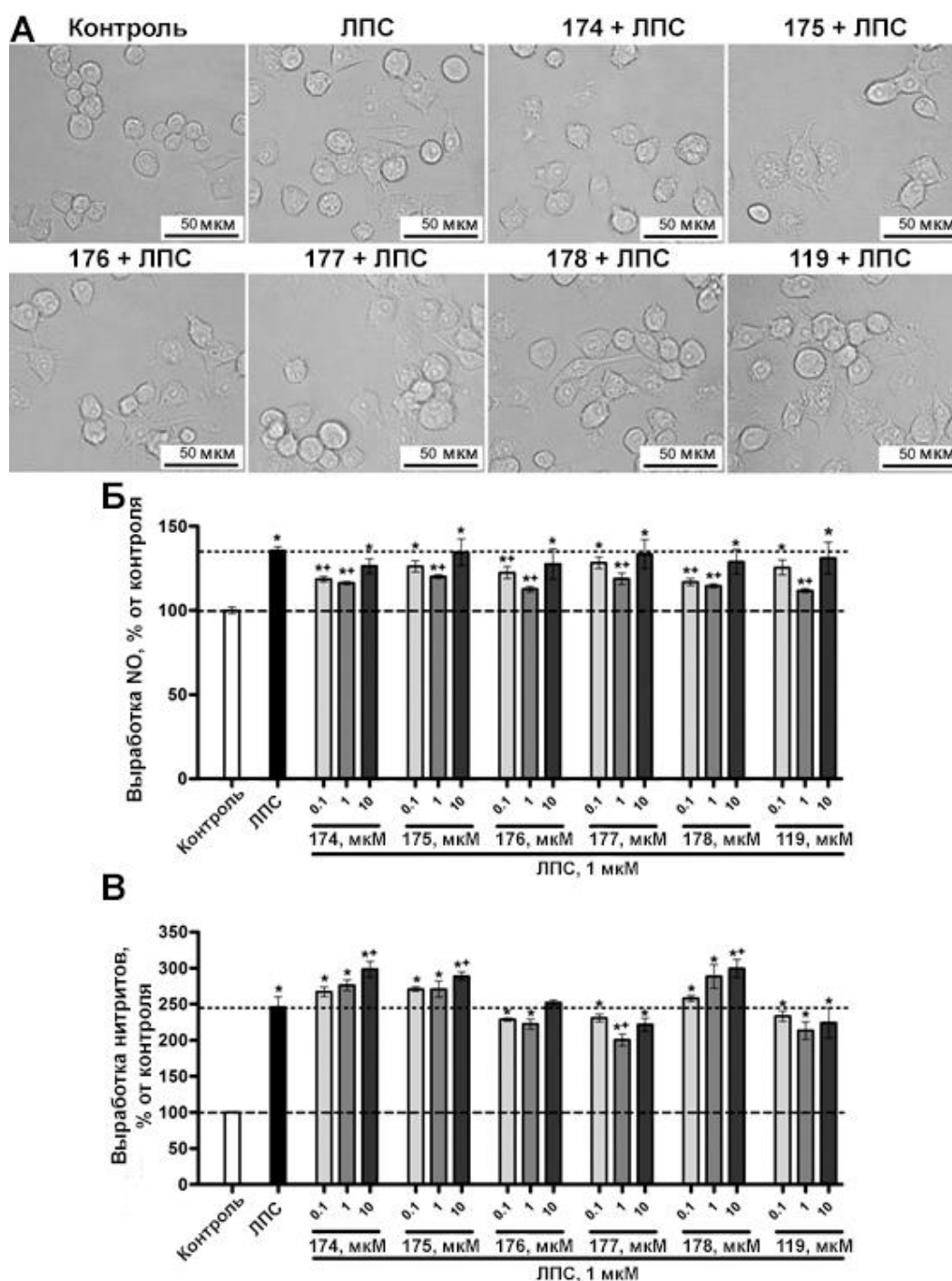


Рисунок 17 – (А) Морфологические изменения в микроглии под воздействием ЛПС и соединений 119, 174–178 в концентрации 10 мкМ. Противовоспалительная и антиоксидантная активность соединений 119, 174–178 в отношении ЛПС-индуцированной продукции NO (Б) и нитритов (В) в культуре мышиных микроглиальных клеток SIM-A9.

При изучении ЛПС-индуцированной внутриклеточной продукции NO под воздействием соединений 119 и 174–178 наблюдалась следующая закономерность:

наилучшей концентрацией, вызывающей ингибирование ЛПС-индуцированной продукции NO для всех соединений, являлась 1 мкМ, в то время как при максимальной концентрации 10 мкМ соединения практически не оказывали эффекта. Наибольшую активность при минимальной концентрации 0,1 мкМ проявили соединения **174** и **178** (Рисунок 17 Б).

Исследование уровня нитрита, секретируемого в культуральную среду под воздействием ЛПС и тестируемых соединений, выявило другие закономерности, отличающиеся от продукции NO. Соединения **174**, **175** и **178** в концентрации 10 мкМ, наоборот, увеличивали концентрацию внеклеточного нитрита в культуральной среде даже выше, чем для ЛПС. Только соединение **177** в концентрации 1 мкМ значительно снижало уровень внеклеточного нитрита (Рисунок 17 В).

Скорость развития окислительного стресса также была прямо пропорциональна интенсивности активации процессов перекисного окисления липидов в микроглиальных клетках, что проявлялось в выраженном повышении уровня малонового диальдегида (МДА) в группе, где применялся ЛПС, почти в два раза по сравнению с контрольной группой. При этом все исследованные соединения снижали ЛПС-индуцированную продукцию малонового диальдегида, тогда как в случаях с использованием соединений **174** и **177** уровень МДА был достоверно неотличим от контрольного (Рисунок 18).

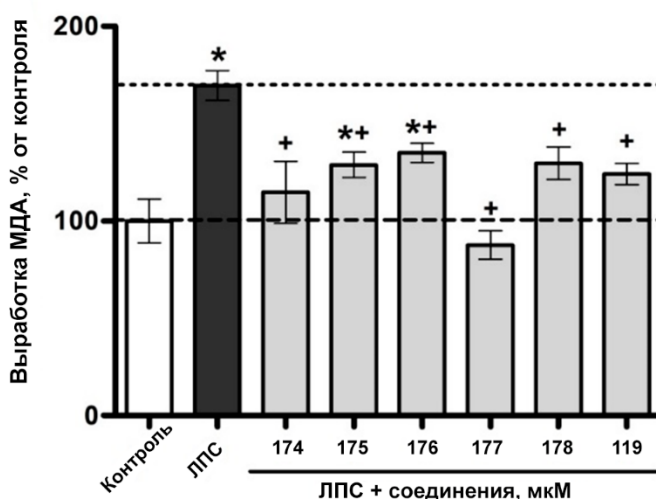


Рисунок 18 – Анализ выработки малонового диальдегида в культуре клеток SIM-A9 при воздействии ЛПС и соединений **119**, **174–178** в концентрации 1 мкМ.

Таким образом, гликозиды полигидроксистероидов демонстрируют отсутствие нейротоксичности и способность дозозависимо модулировать активационный ответ микроглии, подавляя ЛПС-индуцированную продукцию оксида азота и перекисное окисление липидов. При этом соединения **174** и **178** проявили наибольшую эффективность

в ингибировании продукции NO при низких концентрациях, а соединение **177** – в нормализации уровня нитритов, что, в совокупности, подтверждает их перспективность в качестве нейропротекторных агентов.

4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1 Приборы и материалы

Оптическое вращение определяли на поляриметре PerkinElmer 343 (Уолтем, Массачусетс, США). УФ спектры регистрировались на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 PC (Shimadzu, Киото, Япония). ИК спектры регистрировали на ИК-спектрофотометре IRTracer-100 (Shimadzu, Киото, Япония) с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения Quest GS10801-B (Specac Ltd, Орпингтон, Великобритания) и на спектрофотометре Bruker Equinox 55 в CDCl_3 (Bruker, Гёттинген, Германия).

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C получали на спектрометрах Bruker Avance III 500 (500,13 для ^1H и 125,76 МГц для ^{13}C) и Bruker Avance III 700 (700,13 для ^1H и 176,04 МГц для ^{13}C) (Bruker BioSpin, Бремен, Германия). Химические сдвиги (δ , м.д.) измерялись относительно остаточных сигналов растворителя (δ_{H} 7,21, 7,58, 8,72 / δ_{C} 123,5, 135,3, 149,7 для $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, δ_{H} 3,30 / δ_{C} 49,0 для CD_3OD и δ_{H} 4,89 для H_2O).

ИЭР масс-спектры высокого разрешения были получены на масс-спектрометре Bruker Impact II Q-TOF (Bruker, Бремен, Германия) с использованием растворов образцов в метаноле (c 0,001 мг/мл).

Разделение смесей соединений методом ВЭЖХ проводилось на хроматографе Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), оснащенном дифференциальным рефрактометром, с использованием следующих колонок: Diasfer-110-C18 (10 мкм, 250 × 15 мм, Biochemmack, Москва, Россия), Discovery HS F5-5 (5 мкм, 250 × 10 мм, Supelco, Норт-Харрисон, Пенсильвания, США), Discovery HS C18-10 (10 мкм, 250 × 21.2 мм, Supelco, Норт-Харрисон, Пенсильвания, США), Discovery C18 (5 мкм, 250 × 4 мм, Supelco, Норт-Харрисон, Пенсильвания, США), YMC-Pack Pro C18 (5 мкм, 250 × 4.6 мм, YMC CO., LTD, Киото, Япония) и Phenomenex Kinetex C18 (5 мкм, 250 × 4,6 мм, Supelco, Норт-Харрисон, Пенсильвания, США).

Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) соединений проводилась на хроматографе Agilent 6580 Series (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) с капиллярной колонкой HP-1 MS (0,32 мм × 30 м) в диапазоне температур 100–260 °C со скоростью нагрева 5 °C/мин, газом-носителем был He (1,7 мл/мин), температура инжектора 250 °C, температура детектора 280 °C. Анализы методами ГЖХ и ГЖХ-МС проводились на хроматографе GC 2010, оснащенном пламенно-ионизационным детектором, и на газовом хроматографе-масс-спектрометре GCMS-QP5050 (оба производства Shimadzu, Киото, Япония), с использованием капиллярных колонок из плавленого кварца Supelcowax 10 и

MDN-5S (обе колонки длиной 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм, Supelco, США).

Колоночная хроматография проводилась с использованием полихрома-1 (тефлоновый порошок, 0,25–0,50 мм; Biolar, Олайн, Латвия), силикагеля KSK (50–160 меш, Sorbpolimer, Краснодар, Россия) и флорисила (60–100 меш, Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Для тонкослойной хроматографии использовались пластины с закрепленным силикагелем Sorbfil (4,5 × 6,0 см, 5–17 мкм, Sorbpolimer, Краснодар, Россия).

4.2 Сведения о морских звездах

Образцы морской звезды *Leptasterias polaris acervata* Stimpson, 1862 (отряд Forcipulatida, семейство Asteroiidae) были собраны на глубине 41 м в российской части Берингова пролива во время 48-го рейса на борту научно-исследовательского судна «Академик Опарин» в сентябре 2016 года. Вид был идентифицирован Б.Б. Гребневым (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток, Россия). Образец [№ О48-№8] хранится в коллекции образцов морских беспозвоночных Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток, Россия.

Образцы морской звезды *Ceramaster patagonicus* Sladen, 1889 (отряд Valvatida, семейство Goniasteridae) были собраны на глубине 150–300 м в Охотском море, у острова Итуруп, во время 42-го рейса на борту научно-исследовательского судна «Академик Опарин» в августе 2012 года. Вид был идентифицирован Б.Б. Гребневым (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток, Россия). Образец [№ О42-№67] хранится в коллекции образцов морских беспозвоночных Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток, Россия.

4.3 Общие методы

Кислотный гидролиз и определение абсолютных конфигураций моносахаридов. Кислотный гидролиз исследованных соединений (1–2 мг) проводили в герметично закрытой вials в 2 М растворе ТФУ в воде (1 мл) при 100 °С в течение 2 ч. Водный слой промывали гексаном (3 × 1,0 мл), а затем CHCl₃ (3 × 1,0 мл). Водную фракцию, содержащую остатки моносахаридов, упаривали при пониженном давлении, после чего к остатку, в вials добавляли одну каплю концентрированной ТФУ и 0,5 мл (2R)-(-)-2-октанола (Sigma Aldrich), после чего герметично закрытую вial нагрели на глицериновой бане при 130 °С в течение 6 ч. Реакционную смесь упаривали при

пониженном давлении и остаток выдерживали в смеси пиридин/уксусный ангидрид (1:1, 0,5 мл) в течение 24 ч при комнатной температуре. Образовавшийся ацетилованный 2-октилгликозид анализировали методом ГЖХ с использованием соответствующих идентичных образцов, приготовленных по той же процедуре. Времена удерживания пиков для этих образцов было следующим: *D*-глюкоза (*Rt* 26,38; 27,00; 27,23 и 28,79 мин) и *L*-глюкоза (*Rt* 26,59; 26,81 и 27,58 мин).

Метанолиз соединений и анализ МЭЖК. Исследованные соединения (около 1 мг) нагревали с 1N HCl в 80%-ом водном растворе метанола (1 мл) при 80 °C в течение 4 ч. Затем реакционную смесь экстрагировали *n*-гексаном, объединенные экстракты упаривали при пониженном давлении. Полученные МЭЖК анализировали на колонке Supelcowax 10 при 200 °C. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 30 см³/с. Данные масс-спектров (ЭУ, 70 эВ) образцов МЭЖК сравнивали с данными библиотеки NIST и архивом масс-спектров жирных кислот, доступным онлайн.

Получение ДМОЗ производных МЭЖК. МЭЖК (1-3 мг) помещали в объемом 2-мл флакон с плотно закрывающейся крышкой, добавляли 60 мкл 50% раствора (мас./об.) 2-амино-2-метил-1-пропанола в бензоле, смесь перемешивали и добавляли 10 мкл NaOCH₃. После перемешивания флакон продували аргоном и инкубировали в темноте в течение ночи при комнатной температуре. Ацил-2-метилпропаноламида выделяли путем распределения между 0,5 мл смеси гексана/диэтилового эфира 9:1 (об./об.) и 0,5 мл смеси воды. Экстракцию повторяли с 0,5 мл гексана с эфиром.

После испарения растворителя ацил-2-метилпропаноламида превращали в ДМОЗ путем добавления 150 мкл трифторуксусного ангидрида и инкубировали при 50 °C в течение 45 мин. Трифторуксусный ангидрид упаривали в токе аргона. Производные растворяли в гексане и промывали органическую фазу водой для удаления остатков реагентов.

4.4 Выделение и установление строения метаболитов морских звезд

4.4.1 Сфинголипиды из *L. polaris acervata*

Размороженные образцы морской звезды *L. polaris acervata* (5 кг сырого веса) были разрезаны на мелкие части и проэкстрагированы смесью CHCl₃/MeOH (1:1, об./об.), после чего проведена дополнительная экстракция этанолом. После упаривания объединенных экстрактов при пониженном давлении был получен сухой остаток массой 360 г. Этот остаток был распределен между H₂O (1,3 л) и органической фазой EtOAc/BuOH (2:1, об./об.) (4 л). После упаривания органического слоя при пониженном давлении была получена менее полярная фракция (86,4 г), которую растворили в CHCl₃ и

хроматографировали на колонке с силикагелем (32 × 6 см) с использованием CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97:3, об./об.) и $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, об./об.) что дало пять фракций: 1 (343,9 мг), 2 (48,29 г), 3 (1,23 г), 4 (9,88 г) и 5 (7,71 г). Фракцию 5 дополнительно хроматографировали на колонке с силикагелем (8 × 5,5 см) с использованием CHCl_3 и смеси н-гексана/этилацетата/метанола (ступенчатый градиент, 6:3:0,1→6:3:0,5, об./об./об.), в результате чего были получены три подфракции: 51 (381,9 мг), 52 (2,34 г) и 53 (1,39 г), которые затем анализировали методом ТСХ в системе $\text{BuOH}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:2, об./об./об.). Подфракции 51, 52 и 53 содержали в основном церамиды, цереброзиды, пигменты и другие сопутствующие липиды. Разделение подфракций 52 и 53 методом ВЭЖХ на колонке Diasfer-110-C18 (метанол, 2,5 мл/мин) дало девять подфракций: 52-1 – 52-6 и 53-1 – 53-3. Разделение подфракций 52-1, 52-2, 52-6 и 53-1 методом ВЭЖХ на колонке Discovery HS F5-5 ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 9:1, 2,5 мл/мин) дало чистые соединения **163** (2,8 мг, $R_t = 18,9$ мин), **34** (1,8 мг, $R_t = 17,2$ мин), **29** (5,0 мг, $R_t = 17,1$ мин) и двадцать три подфракции. Разделение подфракции 52-2-3 методом ВЭЖХ на колонке Discovery HS F5-5 ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 9:1, 2,5 мл/мин) позволило получить чистое соединение **162** (2,0 мг, $R_t = 16,3$ мин).

Лептастериацереброзид А (162) (2S,3R,4E,9Z)-1-O-(β-D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидрокситетрадеканоиламино]-4,9-докозодиен-3-ол: аморфный порошок; ИК спектр (НПВО, твердое вещество, ν , cm^{-1}): 3340 ($\nu(\text{OH}, \text{NH})$), 2924 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$), 2854 ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), 1735 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1651 ($\nu(\text{C}=\text{O})$ амид I, $\nu(\text{C}=\text{C})$), 1558 ($\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C}-\text{N})$ амид II), 1465 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1388 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 764,5642 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ (вычислено для [$\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{NO}_9\text{Na}$]⁺ 764,5647). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 740,5674 [$\text{M} - \text{H}$][–] (вычислено для [$\text{C}_{42}\text{H}_{78}\text{NO}_9$][–] 740,5682). (+)ИЭР-МС/МС иона с m/z 764: m/z 602 [$(\text{M} + \text{Na}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$]⁺, 538 [$(\text{M} + \text{Na}) - \text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2$]⁺, 292 [$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_2\text{Na}$]⁺, 203 [$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{Na}$]⁺, 185 [$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}$]⁺. (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 740: m/z 578 [$(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$][–], 560 [$(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$][–], 362 [$(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}$][–], 334 [$(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2$][–], 293 [$\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}$][–], 268 [$(\text{M} - \text{H}) - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}$][–], 242 [$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{NO}_2$][–], 225 [$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_2$][–], 197 [$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}$][–], 179 [$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6$][–], 149 [$\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5$][–], 119 [$\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_4$][–]. Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблице 2.

Лептастериацереброзид В (163) (2S,3R,4E,9Z)-1-O-(β-D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидроксипентадеканоиламино]-4,9-докозодиен-3-ол: аморфный порошок; ИК спектр (НПВО, твердое вещество, ν , cm^{-1}): 3356 ($\nu(\text{OH}, \text{NH})$), 2924 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$), 2854 ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), 1736 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1658 ($\nu(\text{C}=\text{O})$ амид I), 1543 ($\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C}-\text{N})$ амид II), 1465 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1388 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 778,5829 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ (вычислено для [$\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{NO}_9\text{Na}$]⁺ 778,5804). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 754,5896 [$\text{M} - \text{H}$][–] (вычислено для [$\text{C}_{43}\text{H}_{80}\text{NO}_9$][–] 754,5839). (+)ИЭР-МС/МС иона с m/z 778: m/z 616 [$(\text{M} + \text{Na})$]

– $C_6H_{10}O_5]^+$, 538 $[(M + Na) - C_{15}H_{28}O_2]^+$, 306 $[M + Na - C_6H_{12}O_6 - C_{20}H_{36}O]^+$, 203 $[C_6H_{12}O_6Na]^+$, 185 $[C_6H_{10}O_5Na]^+$. (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 754: m/z 592 $[(M - H) - C_6H_{10}O_5]^-$, 574 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6]^-$, 362 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6 - C_{14}H_{28}O]^-$, 334 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6 - C_{15}H_{28}O_2]^-$, 293 $[C_{20}H_{37}O]^-$, 282 $[(M - H) - C_6H_{12}O_6 - C_{20}H_{36}O]^-$, 256 $[C_{15}H_{30}NO_2]^-$, 239 $[C_{15}H_{27}O_2]^-$, 211 $[C_{14}H_{27}O]^-$, 179 $[C_6H_{11}O_6]^-$, 149 $[C_5H_9O_5]^-$, 119 $[C_4H_7O_4]^-$. Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C приведены в таблице 2.

4.4.2 Сфинголипиды и стероидлипиды из *C. patagonicus*

Свежие экземпляры морской звезды *C. patagonicus* (3 кг сырого веса) были разрезаны на мелкие части и экстрагированы смесью $CHCl_3/MeOH$ (2:1), после чего была проведена дополнительная экстракция смесью $CHCl_3/MeOH$ (1:1) и $EtOH$. Объединенные экстракты были упарены при пониженном давлении до сухого остатка массой 159,5 г. Этот остаток был распределен между H_2O (1,5 л) и органической фазой $EtOAc/BuOH$ (2:1) (4,5 л). После упаривания органического слоя при пониженном давлении была получена менее полярная фракция (51,5 г), которую промыли холодным ацетоном (1 л). Растворимую в ацетоне фракцию (28,5 г) была хроматографирована на колонке с силикагелем (19 × 4,5 см) с использованием $CHCl_3$, $CHCl_3/MeOH$ (97:3) и $CHCl_3/MeOH$ (9:1), в результате чего были получены четыре фракции: 1 (932 мг), 2 (486 мг), 3 (735 мг) и 4 (1,04 г). Фракции 1–4 дополнительно хроматографировали на колонке с силикагелем (10 × 4 см) с использованием смеси н-гексан/этилацетат/метанол (ступенчатый градиент, 6:3:0,1→6:3:0,7, об./об./об.), в результате чего были получены шесть подфракций: 21 (123 мг), 31 (475 мг), 32 (231 мг), 41 (55 мг), 42 (212 мг) и 43 (570 мг), которые затем проанализировали методом ТСХ с использованием в качестве элюента системы $CHCl_3/MeOH/H_2O$ (8:1:0,1, об./об./об.). Подфракции 21–43 содержали в основном церамиды, цереброзиды, пигменты и другие сопутствующие липиды. Разделение подфракции 31 (475 мг) методом ВЭЖХ на колонке Diasfer-110-C18 (2,5 мл/мин) с использованием $MeOH$ в качестве элюента позволило получить чистое соединение **165** (12,0 мг, R_t 68,2 мин) и семнадцать подфракций 31-3–31-15 и 31-17–31-20. Разделение подфракций 31-14 и 31-18 методом ВЭЖХ на колонке Discovery C18 (2,5 мл/мин) с использованием метанола в качестве элюента позволило получить чистое соединение **164** (2,0 мг, R_t 15,1 мин) и неразделимую смесь соединений **166** и **165** (1,5 мг, R_t 17,8 мин). Разделение подфракции 32 (231 мг) методом ВЭЖХ на колонке Diasfer-110-C18 (2,5 мл/мин) с использованием метанола в качестве элюента позволило получить чистые соединения **170** (4,4 мг, R_t 42,3 мин), **171** (2,5 мг, R_t 51,9 мин), **172** (3,9 мг, R_t 55,7 мин) и **173** (2,9 мг, R_t 72,5 мин). Разделение подфракции 42 (212 мг) методом ВЭЖХ на колонке Discovery HS C18-10 (4,0 мл/мин) с использованием метанола в

качестве элюента позволило получить чистые соединения **45** (3,0 мг, Rt 133,2 мин), **46** (4,5 мг, Rt 153,2 мин) и тринадцать подфракций 42-4–42-15 и 42-17. Разделение подфракций 42-12, 42-13, 42-15 и 42-17 методом ВЭЖХ на колонке Discovery C18 (2,5 мл/мин) с использованием метанола в качестве элюента позволило получить чистые соединения **167** (1,0 мг, Rt 15,9 мин), **63** (2,5 мг, Rt 18,9 мин), **168** (0,5 мг, Rt 21,7 мин) и **169** (1,5 мг, Rt 26,9 мин).

(2S,3S,4R,9Z)-2-[(2R)-2-гидроксигексадеканамино]-19-метил-9-эйкозен-1,3,4-триол (164): аморфный порошок; $[\alpha]_D^{25}$: +15,4 (*c* 0,1, MeOH); ИК спектр (CDCl₃, ν , см⁻¹): 3402 (ν (OH, NH)), 2934, 2920 (ν_{as} (CH₂, CH₃)), 2855 (ν_s (CH₂, CH₃)), 1722 (ν (C=O)), 1656 (ν (C=O) амид I, ν (C=C)), 1625 (ν (C=O) амид I), 1523 (δ (NH) + ν (C-N) амид II), 1493, 1462 (δ (CH₂), δ_{as} (CH₃)), 1365 (δ_s (CH₃)), 1274 (амид III), 1186, 1130, 1080 (ν (C-O)). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 634,5376 [M + Na]⁺ (вычислено для [C₃₇H₇₃NO₅Na]⁺ 634,5381). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 610,5412 [M – H][–] (вычислено для [C₃₇H₇₂NO₅][–] 610,5416). Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблице 3.

(2S,3S,4R,9Z)-2-[(2R)-2-гидроксигексадеканамино]-21-метил-9-докозен-1,3,4-триол (165): аморфный порошок; $[\alpha]_D^{25}$: +10,8 (*c* 0,1, MeOH); ИК спектр (CDCl₃, ν , см⁻¹): 3404 (ν (OH, NH)), 2937, 2922 (ν_{as} (CH₂, CH₃)), 2853 (ν_s (CH₂)), 1724 (ν (C=O)), 1657 (ν (C=O) амид I), 1625 (ν (C=C)), 1522 (δ (NH) + ν (C-N) амид II), 1495, 1460 (δ (CH₂, CH₃)), 1365 (δ_s (CH₃)), 1275, 1187, 1131, 1080 (ν (C-O)). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 662,5324 [M + Na]⁺ (вычислено для [C₃₉H₇₇NO₅Na]⁺ 662,5694). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 638,5364 [M – H][–] (вычислено для [C₃₉H₇₆NO₅][–], 638,5729). Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблице 3.

(2S,3S,4R,9Z)-2-[(2R)-2-гидроксигептадеканамино]-21-метил-9-докозен-1,3,4-триол (166) как смесь с **165** (соотношение 2:1): аморфный порошок; $[\alpha]_D^{25}$: +10,0 (*c* 0,1, MeOH); ИК спектр (CDCl₃, ν , см⁻¹): 3407 (ν (OH, NH)), 2932, 2927 (ν_{as} (CH₂, CH₃)), 2855 (ν_s (CH₂)), 1728 (ν (C=O)), 1655 (ν (C=O) амид I, ν (C=C)), 1624 (δ (OH), ν (C=C)), 1522 (δ (NH) + ν (C-N) амид II), 1495, 1464 (δ_{as} (CH₂, CH₃)), 1366 (δ_s (CH₃)), 1278, 1183, 1130, 1081 (ν (C-O), ν (C-N)). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 676,5463 [M + Na]⁺ (вычислено для [C₄₀H₇₉NO₅Na]⁺ 676,5850). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 652,5520 [M – H][–] (вычислено для [C₄₀H₇₈NO₅][–] 652,5885). Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблице 3.

(2S,3R,4E,9Z)-1-O-(β-D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидроксигептадеканамин]-19-метил-4,9-генэйкозодиен-3-ол (167): аморфный порошок; $[\alpha]_D^{25}$: –9,7 (*c* 0,05, MeOH); ИК спектр (CDCl₃, ν , см⁻¹): 3383 (ν (OH, NH)), 2927 (ν_{as} (CH₂, CH₃)), 2854 (ν_s (CH₂)),

1718 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1649 ($\nu(\text{C}=\text{O})$ амид I, $\nu(\text{C}=\text{C})$), 1602 ($\delta(\text{OH})$, $\nu(\text{C}=\text{C})$), 1538 ($\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C}-\text{N})$ амид II), 1461 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1366 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1261, 1098, 1078, 1034 ($\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 806,6110 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (вычислено для $[\text{C}_{45}\text{H}_{85}\text{NO}_9\text{Na}]^+$ 806,6117). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 782,6154 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (вычислено для $[\text{C}_{45}\text{H}_{84}\text{NO}_9]^-$ 782,6152). (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 782: m/z 602 $[(\text{M} - \text{H}) - 180]^-$, 326 $[(\text{M} - \text{H}) - 456]^-$, 310 $[(\text{M} - \text{H}) - 472]^-$, 293 $[(\text{M} - \text{H}) - 489]^-$, 283/284 $[(\text{M} - \text{H}) - 499/500]^-$, 267 $[(\text{M} - \text{H}) - 515]^-$, 239 $[(\text{M} - \text{H}) - 543]^-$, 179 [гексоза – H] $^-$. Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C приведены в таблице 4.

(2S,3S,4R)-1-O-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидрокситрикозаноиламино]-14-метилгексадекан-3,4-диол (168): аморфный порошок; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: –14,0 (c 0,1, MeOH); ИК спектр (CDCl_3 , ν , cm^{-1}): 3401 ($\nu(\text{OH}, \text{NH})$), 2925 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 2854 ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), 1732 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1634 ($\nu(\text{C}=\text{O})$ амид I), 1602 ($\delta(\text{OH})$), 1541 ($\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C}-\text{N})$ амид II), 1457 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1363 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1261, 1078, 1018 ($\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 840,6336 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (вычислено для $[\text{C}_{46}\text{H}_{91}\text{NO}_{10}\text{Na}]^+$ 840,6335). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 816,6574 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (вычислено для $[\text{C}_{46}\text{H}_{90}\text{NO}_{10}]^-$ 816,6570). (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 816: m/z 654 $[(\text{M} - \text{H}) - 162]^-$, 636 $[(\text{M} - \text{H}) - 180]^-$, 410 $[(\text{M} - \text{H}) - 406]^-$, 394 $[(\text{M} - \text{H}) - 422]^-$, 368/369 $[(\text{M} - \text{H}) - 448/449]^-$, 351 $[(\text{M} - \text{H}) - 465]^-$, 323 $[(\text{M} - \text{H}) - 493]^-$, 253 $[(\text{M} - \text{H}) - 563]^-$, 241 $[(\text{M} - \text{H}) - 575]^-$, 211 $[(\text{M} - \text{H}) - 605]^-$, 179 [гексоза – H] $^-$. Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C приведены в таблице 4.

(2S,3S,4R)-1-O-(β -D-глюкопиранозил)-2-[(2R)-2-гидрокситетракозаноиламино]-14-метилгексадекан-3,4-диол (169): аморфный порошок; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: –17,5 (c 0,1, MeOH); ИК спектр (CDCl_3 , ν , cm^{-1}): 3401 ($\nu(\text{OH}, \text{NH})$), 2925 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 2854 ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), 1731 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1626 ($\nu(\text{C}=\text{O})$ амид I), 1602 ($\delta(\text{OH})$), 1540 ($\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C}-\text{N})$ амид II), 1455 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1297, 1103, 1078, 1029 ($\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 854,6687 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (вычислено для $[\text{C}_{47}\text{H}_{93}\text{NO}_{10}\text{Na}]^+$ 854,6692). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 830,6730 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (вычислено для $[\text{C}_{47}\text{H}_{92}\text{NO}_{10}]^-$ 830,6727). (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 830: m/z 668 $[(\text{M} - \text{H}) - 162]^-$, 650 $[(\text{M} - \text{H}) - 180]^-$, 424 $[(\text{M} - \text{H}) - 406]^-$, 408 $[(\text{M} - \text{H}) - 422]^-$, 382/383 $[(\text{M} - \text{H}) - 448/449]^-$, 365 $[(\text{M} - \text{H}) - 465]^-$, 337 $[(\text{M} - \text{H}) - 493]^-$, 253 $[(\text{M} - \text{H}) - 577]^-$, 241 $[(\text{M} - \text{H}) - 589]^-$, 211 $[(\text{M} - \text{H}) - 619]^-$, 179 [гексоза – H] $^-$. Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C приведены в таблице 4.

(25S)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β -тетраол-26-ил-5'Z,11'Z-октадекадиеноат (170): аморфный порошок; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +8,1 (c 0,44, MeOH); ИК спектр (CDCl_3 , ν , cm^{-1}): 3504 ($\nu(\text{OH})$), 2929 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 2856 ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), 1723 ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1602 ($\nu(\text{C}=\text{C})$), 1459 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1379 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1216, 1042 ($\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, $\nu(\text{C}-\text{O})$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 737,5695 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (вычислено для $[\text{C}_{45}\text{H}_{78}\text{O}_6\text{Na}]^+$ 737,5695). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z

773,5934 [(M – H) + AcOH][–] (вычислено для [C₄₇H₈₁O₈][–] 773,5937); 713,5726 [M – H][–] (вычислено для [C₄₅H₇₇O₆][–] 713,5729). (–)ИЭР-МС/МС иона с *m/z* 713: *m/z* 449 [C₂₇H₄₅O₅][–], 279 [C₁₈H₃₁O₂][–]. Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблицах 5, 6.

(25S)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-11'Z-октадеканонат (171):

аморфный порошок; [α]_D²⁵: +14,1 (*c* 0,25, MeOH); ИК спектр (CDCl₃, ν, см^{–1}): 3504 (ν(OH)), 2929 (ν_{as}(CH₂, CH₃)), 2856 (ν_s(CH₂)), 1723 (ν(C=O)), 1602 (ν(C=C)), 1465 (δ_{as}(CH₂, CH₃)), 1379 (δ_s(CH₃)), 1260, 1216, 1043 (ν(C–O–C), ν(C–O)). (+)ИЭР-МС высокого разрешения *m/z* 739,5852 [M + Na]⁺ (вычислено для [C₄₅H₈₀O₆Na]⁺ 739,5847). (–)ИЭР-МС высокого разрешения *m/z* 775,6096 [(M – H) + AcOH][–] (вычислено для [C₄₇H₈₃O₈][–] 775,6093); *m/z* 715,5889 [M – H][–] (вычислено для [C₄₅H₇₉O₆][–] 715,5882). (–)ИЭР-МС/МС иона с *m/z* 715: *m/z* 449 [C₂₇H₄₅O₅][–], 281 [C₁₈H₃₃O₂][–]. Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблицах 5, 6.

(25S)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-5'Z,11'Z-эйкозодиеноат (172):

аморфный порошок; [α]_D²⁵: +9,5 (*c* 0,39, MeOH); ИК спектр (CDCl₃, ν, см^{–1}): 3510 (ν(OH)), 2929 (ν_{as}(CH₂, CH₃)), 2856 (ν_s(CH₂)), 1723 (ν(C=O)), 1603 (ν(C=C)), 1493, 1465 (δ_{as}(CH₂, CH₃)), 1379, 1365 (δ_s(CH₃)), 1248, 1216, 1189, 1080, 1042 (ν(C–O–C), ν(C–O)). (+)ИЭР-МС высокого разрешения *m/z* 765,6008 [M + Na]⁺ (вычислено для [C₄₇H₈₂O₆Na]⁺ 765,6004). (–)ИЭР-МС высокого разрешения *m/z* 801,6254 [(M – H) + AcOH][–] (вычислено для [C₄₉H₈₅O₈][–] 801,6250); *m/z* 741,6044 [M – H][–] (вычислено для [C₄₇H₈₁O₆][–] 741,6039). (–)ИЭР-МС/МС иона с *m/z* 741: *m/z* 449 [C₂₇H₄₅O₅][–], 307 [C₂₀H₃₅O₂][–]. Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблицах 5, 6.

(25S)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-7'Z-эйкозеноат (173): аморфный порошок; [α]_D²⁵: +15,4 (*c* 0,29, MeOH); ИК спектр (CDCl₃, ν, см^{–1}): 3515 (ν(OH)), 2929 (ν_{as}(CH₂, CH₃)), 2856 (ν_s(CH₂)), 1723 (ν(C=O)), 1602 (ν(C=C)), 1466 (δ_{as}(CH₂, CH₃)), 1378 (δ_s(CH₃)), 1261, 1204, 1043 (ν(C–O–C), ν(C–O)). (+)ИЭР-МС высокого разрешения *m/z* 767,6157 [M + Na]⁺ (вычислено для [C₄₇H₈₄O₆Na]⁺ 767,6160). (–)ИЭР-МС высокого разрешения *m/z* 803,6409 [(M – H) + AcOH][–] (вычислено для [C₄₉H₈₇O₈][–] 803,6406); *m/z* 743,6199 [M – H][–] (вычислено для [C₄₇H₈₃O₆][–] 743,6195). (–)ИЭР-МС/МС иона с *m/z* 743: *m/z* 449 [C₂₇H₄₅O₅][–], 309 [C₂₀H₃₇O₂][–]. Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C приведены в таблицах 5, 6.

4.4.3 Гликозиды полигидроксистероидов из *C. patagonicus*

Полученную, как описано в п. 4.4.2, нерастворимую в ацетоне фракцию (23 г) хроматографировали на колонке с силикагелем (18 × 6 см) с использованием в качестве элюента: CHCl₃, CHCl₃/MeOH (9:1) и CHCl₃/MeOH/H₂O (9:1,5:0,1 → 8:2:0,2 → 6:4:0,5 → 6:4:1, об./об./об.), в результате чего было получено восемь фракций: 1 (7,7 г), 2 (10,3 г), 3 (1,4 г), 4 (912 мг), 5 (619 мг), 6 (1,08 г), 7 (1,24 г) и 8 (2,98 г). Фракцию 6 дополнительно

хроматографировали на колонке с флорисилом (6×4 см) с использованием смесей $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:3) и $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2:0,2→6:4:0,5→6:4:1, об./об./об.), в результате чего были получены две подфракции: 61 (311 мг) и 62 (837 мг), которые затем анализировали методом ТСХ в системе $\text{BuOH}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:2). Фракцию 7 дополнительно хроматографировали на колонке с флорисилом ($9,5 \times 4$ см) с использованием смеси $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2:0,2→6:4:0,5→6:4:1, об./об./об.), в результате чего были получены три подфракции: 71 (180,5 мг), 72 (365 мг) и 73 (406 мг), которые затем анализировали методом ТСХ в системе $\text{BuOH}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:2). Подфракции 61, 62, 71–73 содержали в основном гликозиды полигидроксистероидов с примесью пигментов и сопутствующих липидов. Разделение подфракции 61 (311 мг) методом ВЭЖХ на колонке Diasfer-110-C18 (2,5 мл/мин) с элюентом $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20) позволило получить восемь подфракций: 61-5 – 61-12. Разделение подфракции 61-5 методом ВЭЖХ на колонке YMC-Pack Pro C18 (1,0 мл/мин) с элюентом $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25) позволило получить чистое соединение **119** (1,3 мг, Rt 8,2 мин). Разделение подфракции 71 (180,5 мг) методом ВЭЖХ на колонке Discovery C18 (2,5 мл/мин) с элюентом $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70:30) позволило получить чистые соединения **174** (3,0 мг, Rt 18,8 мин) и **175** (3,0 мг, Rt 17,3 мин). Разделение подфракции 72 (365 мг) методом ВЭЖХ на колонке Discovery C18 (2,5 мл/мин) с элюентом $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25) позволило получить чистые соединения **176** (2,0 мг, Rt 37,7 мин), **178** (9,5 мг, Rt 34,2 мин) и подфракцию 72-7 (3,5 мг). Разделение подфракции 72-7 методом ВЭЖХ на колонке YMC-Pack Pro C18 (1,0 мл/мин) с использованием смеси $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35) в качестве элюента позволило получить чистое соединение **177** (2,3 мг, Rt 31,5 мин).

Церамастерозид А (174): аморфный порошок; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +4,2^\circ$ (с 0,3, MeOH); ИК спектр (НПВО твердое вещество, ν , cm^{-1}): 3350 ($\nu(\text{OH})$), 2928 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$), 2870 ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1456 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1379 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1255, 1224 ($\nu_{\text{as}}(\text{S}=\text{O})$), 1074, 1045 ($\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu_{\text{s}}(\text{S}=\text{O})$), 991, 879, 827, 588 ($\delta(\text{O}-\text{S}-\text{O})$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 767,3630 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (вычислено для $[\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{O}_{13}\text{SNa}_2]^+$, 767,3623); (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 721,3851 $[\text{M} - \text{Na}]^-$ (вычислено для $[\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{O}_{13}\text{S}]^-$, 721,3838); (+)ИЭР-МС/МС иона с m/z 767: 647 $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{NaHSO}_4]^+$, 629 $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{NaHSO}_4 - \text{H}_2\text{O}]^+$, 143 $[\text{Na}_2\text{HSO}_4]^+$; (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 721: 495 $[(\text{M} - \text{Na}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}]^-$; 225 $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}]^-$; 97 $[\text{HSO}_4]^-$. Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C приведены в таблицах 8, 9.

Церамастерозид В (175): аморфный порошок; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +4,7^\circ$ (с 0,3, MeOH); ИК спектр (НПВО твердое вещество, ν , cm^{-1}): 3358 ($\nu(\text{OH})$), 2927 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$), 2870 ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1456 ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1379 ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$), 1255, 1224 ($\nu_{\text{as}}(\text{S}=\text{O})$), 1074, 1045 ($\nu(\text{C}-\text{O})$, $\nu_{\text{s}}(\text{S}=\text{O})$), 987, 879, 827, 588 ($\delta(\text{O}-\text{S}-\text{O})$). (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 797,3738 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (вычислено

для $[C_{36}H_{63}O_{14}SNa_2]^+$ 797,3728). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 751,3946 $[M - Na]^-$ (вычислено для $[C_{36}H_{63}O_{14}S]^-$ 751,3944). (+)ИЭР-МС/МС иона с m/z 797: 779 $[(M + Na) - H_2O]^+$, 677 $[(M + Na) - NaHSO_4]^+$, 143 $[Na_2HSO_4]^+$. (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 751: 495 $[(M - Na) - C_7H_{12}O_8S]^-$; 255 $[C_7H_{12}O_8S]^-$; 97 $[HSO_4]^-$. Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C приведены в таблицах 8, 9.

Церамастерозид D (176): аморфный порошок; $[\alpha]_D^{25} -17,5^\circ$ (с 0,2, MeOH); ИК спектр (НПВО твердое вещество, ν , cm^{-1}): 3323 ($\nu(OH)$), 2924 ($\nu_{as}(CH_2)$), 2854 ($\nu_s(CH_2)$), 1573, 1456 ($\delta_{as}(CH_2, CH_3)$), 1406 ($\delta(OH)$), 1377 ($\delta_s(CH_3)$), 1082, 1045 ($\nu(C-O)$), 968, 879, 636, 432. (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 843,4715 $[M + Na]^+$ (вычислено для $[C_{41}H_{72}O_{16}Na]^+$ 843,4713). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 819,4748 $[M - H]^-$ (вычислено для $[C_{41}H_{71}O_{16}]^-$ 819,4748). (+)ИЭР-МС/МС иона с $[M + Na]^+$ с m/z 843: 825 $[(M + Na) - H_2O]^+$, 697 $[(M + Na) - C_6H_{10}O_4]^+$, 679 $[(M + Na) - C_6H_{10}O_4 - H_2O]^+$, 535 $[(M + Na) - C_6H_{10}O_4 - C_6H_{10}O_5]^+$. (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 819: 655 $[(M - H) - C_6H_{10}O_4 - H_2O]^-$, 511 $[(M - H) - C_6H_{10}O_4 - C_6H_{10}O_5]^-$. Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C приведены в таблицах 8, 9.

Церамастерозид E (177): аморфный порошок; $[\alpha]_D^{25} -17,5^\circ$ (с 0,2, MeOH); ИК спектр (НПВО твердое вещество, ν , cm^{-1}): 3365 ($\nu(OH)$), 2924 ($\nu_{as}(CH_2)$), 2854 ($\nu_s(CH_2)$), 1735, 1570, 1458 ($\delta_{as}(CH_2, CH_3)$), 1406 ($\delta(OH)$), 1377 ($\delta_s(CH_3)$), 1163 ($\nu(C-O-C)$), 1055 ($\nu(C-O)$), 966. (+)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 797,4295 $[M + Na]^+$ (вычислено для $[C_{39}H_{66}O_{15}Na]^+$, 797,4294). (–)ИЭР-МС высокого разрешения m/z 773,4337 $[M - H]^-$ (вычислено для $[C_{39}H_{65}O_{15}]^-$ 773,4329). (+)ИЭР-МС/МС иона с m/z 797: 779 $[(M + Na) - H_2O]^+$, 651 $[(M + Na) - C_6H_{10}O_4]^+$, 633 $[(M + Na) - C_6H_{10}O_4 - H_2O]^+$. (–)ИЭР-МС/МС иона с m/z 773: 627 $[(M - H) - C_6H_{10}O_4]^-$, 609 $[(M - H) - C_6H_{10}O_4 - H_2O]^-$, 465 $[(M - H) - C_6H_{10}O_4 - C_6H_{10}O_5]^-$. Данные спектров ЯМР 1H и ^{13}C приведены в таблицах 8, 9.

4.5 Определение биологической активности выделенных соединений

4.5.1 Реагенты

Среда McCoy's 5A, среда DMEM, среда BME, PBS, L-глутамин, раствор пенициллина-стрептомицина (10 000 Ед/мл, 10 мкг/мл) и трипсин были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США) и ThermoFisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США). Реагент MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий) был приобретен у компании Promega (Мэдисон, Висконсин, США) и Abscam (набор ab197010, США). Реагент МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) был приобретен у компании Sigma-Aldrich (Мюнхен, Германия) FBS, среда MEM, культуральная среда DMEM/F12,

трипсин-ЭДТА, сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), агар и гентамицин были приобретены у компании ThermoFisher Scientific. DHS и незаменимые аминокислоты приобретены у компании Gibco (США).

Для количественного определения продукции оксида азота использовали диацетат DAF-FM (Thermo Fisher Scientific). Количественное определение нитритов проводилось с использованием реактива Грисса (Sigma, G4410, США). Для определения образования малонового диальдегида, как маркера перекисного окисления липидов, при действии исследованных соединений использовался набор для определения МДА (Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit, MAK085, Sigma, США).

4.5.2 Культивирование клеток

Эмбриональные клетки почек человека HEK293 (ATCC® CRL-1573™), эпидермальные клетки мыши JB6 Cl41 (ATCC® CRL-2010™), микроглиальные клетки мыши SIM-A9 (ATCC® CRL-3265), клеточная линия аденокарциномы толстого кишечника HT-29 (ATCC® HTB-38), клеточная линия меланомы SK-MEL-28 (ATCC® HTB-72™), клеточная линия колоректальной карциномы HCT 116 (ATCC® CCL-247™) и клеточная линия аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) были получены из Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA, США).

Клетки кардиомиоцитов крысы H9c2, эпидермальные клетки мыши JB6 P+ Cl41 и их стабильные трансфектанты JB6-Luc NF-κB были предоставлены профессором, доктором Гунхильдом фон Амсбергом из Центра рака предстательной железы клиники Мартини, Университетской больницы Гамбург-Эппендорф, Гамбург, Германия. Клетки H9c2 культивировали в среде DMEM (Biolot, Санкт-Петербург, Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Biolot, Санкт-Петербург, Россия) и 1% пенициллина/стрептомицина (Biolot, Санкт-Петербург, Россия) при 37 °C во влажной атмосфере с 5% (об/об) CO₂.

Мышиную линию эпидермальных клеток JB6 P+ Cl41 и ее стабильные трансфектанты, клетки JB6-Luc NF-κB, культивировали в среде MEM с 5% FBS, 2 мкМ L-глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина при 37 °C и 5% CO₂. Трансформированные клетки селектировали с использованием миногликозидного антибиотика GeneCitrine G-418 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Клетки HT 29 культивировали в среде McCoy's 5A; клеточные линии HEK293 и SK-MEL-28 культивировали в среде DMEM; клеточные линии JB6 Cl41, MDA-MB-231 и HCT 116 культивировали в средах MEM, DMEM и McCoy's 5A соответственно. Культуральные среды дополняли 5% или 10% FBS и 1% раствором пенициллина/стрептомицина.

Клеточные культуры поддерживали при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Микроглиальные клетки мыши культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS, 5% DHS, 1% пенициллина/стрептомицина и незаменимые аминокислоты при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Количество пассажей тщательно контролировали и регулярно проводили мониторинг микоплазменной контаминации.

4.5.3 Подготовка соединений

Соединения **29, 34, 162 и 163** растворяли в стерильном растворе ДМСО при исходной концентрации 10 мМ (хранили при 4 °С) и использовали в экспериментах в диапазоне концентраций 1–100 мкМ (конечная концентрация ДМСО в культуральной среде составляла менее 0,5%).

Соединения **45, 46, 63, 164–166, 169 и 170 – 173** растворяли в стерильном растворе ДМСО для приготовления исходной концентрации 20 мМ. Клетки подвергали действию последовательно разбавленных растворов соединений **45, 46, 63, 164–166, 169 и 170–173** (1–100 мкМ) (с использованием культуральной среды в качестве разбавителя) (конечная концентрация ДМСО составляла менее 0,5%).

Доксорубин (Doxo) (Teva Pharmaceutical Industries, Ltd. (Израиль)) растворяли в стерильном PBS для приготовления исходной концентрации 10 мМ. Клетки подвергали действию последовательно разбавленного раствора доксорубина (10–100 мкМ) (с использованием культуральной среды в качестве разбавителя).

В качестве контроля использовали клетки, подвергнутые воздействию эквивалентного объема ДМСО (конечная концентрация ДМСО составляла менее 0,5%) во всех проведенных экспериментах.

Соединения **170–173** растворяли в ДМСО для приготовления исходной концентрации 20 мМ. Клетки обрабатывали последовательно разбавленными растворами соединений (в качестве разбавителя использовали культуральную среду) для получения желаемых конечных концентраций (1, 10, 20, 50 и 100 мкМ). Тестирование толерантности к растворителю (до 0,5% ДМСО в контрольных клетках) в идентичных условиях подтвердило, что жизнеспособность всех клеточных линий не изменялась. Контрольным раствором служили клетки, обработанные эквивалентным объемом ДМСО во всех представленных экспериментах.

4.5.4 Исследования биологической активности

Анализ ингибирования уреазы проводился, как описано в работе [101]. Использовались уреазы из *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, США) и мочевины (в

качестве субстрата). Тиомочевина использовалась в качестве положительного контроля. Активность уреазы определялась путем измерения образования аммиака с использованием индофенольного метода [102]. Абсорбция измерялась при 630 нм с помощью микропланшетного ридера Multiskan FS (Thermo Scientific Inc., Бевэрли, Массачусетс, США). Данные рассчитывались как концентрации полумаксимального ингибирования концентрации.

Антимикробная активность. Штаммы бактерий *S. aureus* ATCC 21027 и *E. coli* VKPM (B-7935), а также дрожжеподобные грибы *C. albicans* КММ 455 (Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН) культивировали на твердой среде, бульоне Мюллера-Хинтона с агаром (16,0 г/л), в чашке Петри при 37 °С в течение 24 ч. Анализ соединений **29**, **34**, **162** и **163** проводили в 96-луночных микропланшетах с использованием соответствующего бульона Мюллера-Хинтона. Каждая лунка содержала 90 мкл суспензии бактерий или дрожжеподобных грибов (10^6 КОЕ/мл). Затем добавляли 10 мкл раствора соединения, в концентрациях от 1,5 до 100,0 мкМ с использованием двукратного разведения (концентрация ДМСО < 1%). Чашки Петри с культурами инкубировали в течение ночи при 37 °С. Оптическую плотность при 620 нм (OD_{620}) измеряли с помощью спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Scientific Inc., Бевэрли, Массачусетс, США). В качестве положительных контролей использовали антибиотик гентамицин (Biolot, Санкт-Петербург, Россия) и противогрибковый препарат амфотерицин В (Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия) в концентрации 10 мкг/мл, а в качестве отрицательного контроля – 1% ДМСО в PBS.

Анализ жизнеспособности клеток (MTT). Клетки H9c2 высевали в концентрации 3×10^3 клеток/лунку, эксперименты начинали через 24 ч. В лунки добавляли соединения **29**, **34**, **162** и **163** в концентрациях до 100 мкМ, выдерживали 24 и 48 ч, а жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа МТТ, выполненного в соответствии с инструкциями производителя (Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия). Все соединения растворяли в ДМСО таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО в культуре клеток не превышала 1%. В качестве контроля использовали ДМСО. Предварительно оценивали влияние 1% ДМСО на клетки и установили, что 1% ДМСО не оказывает существенного влияния на функцию клеток.

Абсорбцию полученного раствора измеряли при 570 нм с помощью микропланшетного ридера Multiskan FC (Thermo Scientific Inc., Бевэрли, Массачусетс, США).

Анализ жизнеспособности клеток (MTS). Влияние соединений **45**, **46**, **63**, **164–166** и **169** на жизнеспособность исследованных клеточных линий оценивали с помощью анализа

MTS. Клетки HEK293 ($1,0 \times 10^4/200$ мкл), HT-29 ($1,0 \times 10^4/200$ мкл), SK-MEL-28 ($0,8 \times 10^4/200$ мкл) и MDA-MB-231 ($1,0 \times 10^4/200$ мкл) высевали на 96-луночный планшет и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Клетки подвергали воздействию либо ДМСО (контроль с растворителем), либо доксорубина в концентрациях 1, 10, 50 мкМ (положительный контроль), либо соединений **45**, **46**, **63**, **164–166** и **169** в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 24 ч. Затем клетки инкубировали с 15 мкл реагента MTS в течение 3 ч, и абсорбцию в каждой лунке измеряли при 490/630 нм на микропланшетном ридере Power Wave XS (BioTek, Уинуски, Вермонт, США). Концентрацию, при которой соединение проявляло половину своего максимального ингибирующего эффекта на жизнеспособность клеток (ИК₅₀), рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора AAT-Bioquest® [103].

Для определения цитотоксичности соединений **170–173** клетки JB6 Cl41, MDA-MB-231 и НСТ 116 ($1,0 \times 10^4$) высевали в 200 мкл полной среды MEM/5% FBS, DMEM/10% FBS и среды McCoy's 5A/10% FBS соответственно и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂. Прикрепившиеся клетки инкубировали в свежей среде, содержащей различные концентрации соединений **170–173** (0–100 мкМ) или эквивалентный объем ДМСО (контроль), в течение дополнительных 24 ч. Затем клетки инкубировали с 15 мкл реагента MTS в течение 3 ч, и абсорбцию в каждой лунке измеряли при 490/630 нм с помощью микропланшетного ридера Power Wave XS. Все исследованные образцы были проанализированы в трех повторениях.

Для определения влияния соединений **170–173** на пролиферацию клеток клеточные линии (8×10^3 клеток/200 мкл) обрабатывали исследованными соединениями в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ или эквивалентным объемом ДМСО (контроль) и инкубировали в течение дополнительных 24, 48 и 72 ч при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂. В каждую лунку добавляли 20 мкл реагента MTS, затем клетки инкубировали в течение дополнительных 3 ч в инкубаторе с 5% CO₂. Абсорбцию измеряли при 490/630 нм с помощью микропланшетного ридера Power Wave XS. Все исследованные образцы были проанализированы в трех повторениях.

Клетки SIM-A9 (1×10^3 клеток/лунка) высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Затем стандартную культуральную среду заменяли средой, содержащей исследованные соединения в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ. Максимально допустимая концентрация соединений выбиралась исходя из максимально допустимой концентрации растворителя (этанол), которая не превышала 0,1%. Цитотоксическую активность соединений **119**, **174–178** измеряли через 72 ч после начала воздействия. После этого среду из всех лунок аккуратно

удаляли и заменяли свежей, дополненной 1/10 объема реагента MTS. Планшет инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в течение 2 ч для развития окраски. Оптическую плотность измеряли при 490 нм на микропланшетном ридере iMark (Bio-Rad, США). Жизнеспособность клеток рассчитывали, принимая за 100% значение абсорбции в контрольных (необработанных) клетках и за 0% значение абсорбции в пустых лунках без клеток.

Анализ образования колоний. Клетки MDA-MB-231 ($2,4 \times 10^4$ /мл) подвергали воздействию либо ДМСО (контроль), либо доксорубина (положительный контроль) в концентрациях 5, 10 и 20 мкМ, либо соединений **45**, **46**, **63**, **164–166** и **169** в концентрациях 5, 10, 20 мкМ. Затем клетки вносили в лунки с 0,3% агаром BME, содержащим 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и 25 мкг/мл гентамицина. Культуры поддерживали при 37 °С в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 14 суток. Количество и размер колоний оценивались с помощью микроскопа Motic AE 20 и программного обеспечения ImageJ, входящего в состав 64-битной версии Java 1.8.0_112 (НИН, Бетесда, Мэриленд, США).

Для оценки влияния соединений **170–173** на образование колоний клеток MDA-MB-231 и НСТ 116 ($2,4 \times 10^4$ клеток/200 мкл) клетки обрабатывали эквивалентным объемом ДМСО (контроль) или соединениями **170–173** (20 мкМ) в 1 мл 0,3% BME, содержащей 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и 25 мкг/мл гентамицина. Культуры поддерживали в инкубаторе при 37 °С и 5% CO₂ в течение 14 суток, а количество клеточных колоний подсчитывали с помощью микроскопа Motic AE 20 (XiangAn, Сямэнь, Китай) и программного обеспечения ImageJ, входящего в комплект 64-битной Java 1.8.0_112 (НИН, Бетесда, Мэриленд, США).

Моделирование условий гипоксии в кардиомиоцитах H9c2 с помощью CoCl₂ и TNF-α-индуцированного воспаления. Клетки H9c2 (3×10^3 клеток/лунка) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 ч. Затем их подвергали воздействию 500 мкМ хлорида кобальта (II) в течение 1 ч, после чего добавляли растворы соединений **29**, **34**, **162**, **163** в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ. Через 48 ч жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа МТТ.

В другом эксперименте клетки H9c2 (3×10^3 клеток/лунка) обрабатывали растворами соединений **29**, **34**, **162** и **163** в концентрациях 0,1, 1 и 10,0 мкМ в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли TNF-α (Sci-Store, Сколково, Россия) в конечной концентрации 10 пг/мл и клетки инкубировали в течение 24 ч. Через 24 ч жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-анализа.

Измерение уровней активных форм кислорода (АФК), митохондриального мембранного потенциала (ММП) и перекисного окисления кардиолипина в кардиомиоцитах H9c2, обработанных TNF-α. Клетки H9c2 (3×10^3 клеток/лунка)

высекали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 24 ч. Затем клетки обрабатывали растворами соединений **29**, **34**, **162**, **163** в концентрации 10 мкМ в течение 1 ч, после чего в каждую лунку добавляли TNF- α (Sci-Store, Сколково, Россия) в конечной концентрации 10 пг/мл.

Уровни АФК и ММП измеряли через 3 ч с использованием флуоресцентных зондов H2DCF-DA (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и TMRE (Lumiprobe RUS Ltd., Москва, Россия) соответственно. Для измерения образования АФК в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора H2DCF-DA. Для измерения уровней ММП добавляли TMRE в конечной концентрации 500 нМ. Клетки инкубировали с H2DCF-DA (конечная концентрация 10,0 мкМ) для определения уровня АФК или с TMRE (500 нМ) для определения уровня ММП в течение 30 мин при 37 °С в темноте, дважды промывали PBS, и интенсивность флуоресценции измеряли с помощью высокоскоростного планшетного ридера PHERAstar FS (BMG Labtech, Ортенбург, Германия). Данные анализировали с помощью программного обеспечения MARS Data Analysis версии 3.01R2, и результаты выражали в процентах относительно положительного контроля.

Для определения величины перекисного окисления кардиолипина использовали флуоресцентный зонд MitoCLOx (Lumiprobe, Москва, Россия). Клетки инкубировали с MitoCLOx (200 нМ) в течение 1 ч, промывали PBS, и флуоресценцию измеряли в ратиометрическом режиме с $\lambda_{em} = 520/590$ нм с помощью планшетного ридера PHERAstar FS (BMG Labtech, Оффенбург, Германия). Данные обрабатывали с помощью MARS Data Analysis v. 3.01R2 (BMG Labtech, Оффенбург, Германия) и рассчитывали как отношение 520/590.

Измерение уровня NO. Для оценки потенциала соединений снижать выработку эндогенно генерируемого NO клетки SIM-A9 инкубировали в течение 24 ч в среде, содержащей ЛПС и соединения **119**, **174–178**. Клетки в стандартной среде без добавок служили отрицательным контролем; клетки в среде, содержащей только ЛПС, служили положительным контролем. Окрашивание проводили непосредственно в лунках планшетов, удаляя из них среду и заменяя ее 10 мкМ раствора диацетата DAF-FM. Клетки инкубировали в красителе в течение 40 мин при 37 °С в темноте. Затем образцы трижды промывали PBS. Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном ридере Spark 10M (TECAN, Швейцария). Флуоресценцию клеток регистрировали при эталонных длинах волн $\lambda_{ex} = 460$ нм и $\lambda_{em} = 524$ нм.

Метод Грисса. После инкубации клеток SIM-A9 в среде с ЛПС и действия соединений **119**, **174–178** в течение 24 ч, количество нитрита, накопленного в культуральной среде, измеряли в качестве индикатора продукции NO с использованием

метода Грисса. Согласно протоколу производителя, 100 мкл культуральной среды смешивали со 100 мкл реагента Грисса (смесь 1-нафтиламина, сульфаниловой кислоты и винной кислоты) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Оптическую плотность измеряли при 540 нм на микропланшетном ридере iMark (Bio-Rad, США).

Измерение концентрации малонового диальдегида (МДА). Измерение концентрации МДА использовалось для оценки влияния соединений **119, 174–178** на ЛПС-индуцированное перекисное окисление липидов. Клетки SIM-A9 высевали в 24-луночные планшеты ($1 \times 10^5/\text{см}^2$) и оставляли в инкубаторе на 1 ч для адгезии. Затем культуральную среду заменяли средой, содержащей исследованное соединение, и оставляли еще на 1 ч. После этого в каждую лунку добавляли ЛПС до достижения концентрации 1 мкг/мл. Анализ МДА проводили через 24 ч. Для анализа клетки из каждой лунки пересевали с использованием раствора трипсин/ЭДТА и переносили в отдельные пробирки. Затем клетки подвергали ультразвуковой гомогенизации. Все дальнейшие манипуляции проводились в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность измеряли на микропланшетном ридере (Biorad, США) при длине волны 532 нм. Результаты представляли относительно отрицательной контрольной группы без добавления ЛПС.

Анализ транскрипционной активности NF-κB. Эксперименты проводили, как описано в работе [104]. Жизнеспособные клетки JB6 Cl41 NF-κB (8×10^3 клеток/лунка) высевали в каждую лунку 96-луночного планшета на ночь, затем добавляли растворы соединений **29, 34, 162** и **163** в концентрации 10 мкМ и оставляли на 3 ч.

Затем клетки разрушали в течение 1 ч при комнатной температуре с помощью лизирующего буфера (0,1 М буфер состава фосфат калия при pH 7,8, 1% Тритон X-100, 1 мМ ДТТ, 2 мМ ЭДТА), и 30 мкл лизата из каждой лунки переносили на планшет для люминесцентного анализа. Активность люциферазы измеряли с использованием буфера для анализа люциферазы (100 мкл/лунка), содержащего 0,47 мМ D-люциферина, 20 мМ трицина, 1,07 мМ $4\text{MgCO}_3 \times \text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 2,67 мМ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 33,3 мМ ДТТ, 0,53 мМ АТФ, 0,27 мМ КоА и 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,8. Измерения проводились с использованием микропланшетного ридера Luminoscan Ascent Type 392 (LabSystems, Хельсинки, Финляндия). Результаты выражены в виде интенсивности люминесценции (ед.). В качестве контроля использовался 1% раствор ДМСО.

Метод заживления царапины. Клетки MDA-MB-231 и НСТ 116 (3×10^5 клеток/мл) высевали в 6-луночные планшеты и выращивали до 80% конfluenceции в течение 24 ч. После удаления культуральной среды монослой клеток соскабливали стерильным наконечником пипетки объемом 200 мкл для создания прямой царапины. Затем клетки

MDA-MB-231 и НСТ 116 обрабатывали эквивалентным объемом ДМСО (контроль) или растворами соединений **170–173** в концентрации 20 мкМ и инкубировали в течение 48 ч. Все эксперименты проводили в трех повторениях для каждой группы. Для анализа изображений миграцию клеток в область раны фотографировали на стадиях 0 и 48 ч с помощью микроскопа «Motic AE 20» и программного обеспечения ImageJ. Расстояние миграции клеток оценивали путем измерения ширины раны и выражали в процентах от каждого контрольного значения для среднего значения площади закрытия раны.

Статистическая оценка данных. Все данные были получены в трех независимых повторениях, а рассчитанные значения выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (СЭМ). Для определения статистической значимости были проведены t-критерий Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием программы SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США). Статистическая значимость устанавливалась на уровне $p < 0,05$.

5 ВЫВОДЫ

1. Исследован состав фракций сфинголипидов морской звезды *Leptasterias polaris acervata*, а также сфинголипидов, стероидлипидов и гликозидов полигидроксистероидов морской звезды *Ceramaster patagonicus*. Выделено и установлено полное химическое строение 22 индивидуальных соединений – 12 сфинголипидов, 4 стероидлипидов и 6 гликозидов полигидроксистероидов, а также хроматографически неразделимой смеси из 2 соединений (церамиды). Установлено, что 8 сфинголипидов, 4 стероидлипида и 4 гликозида полигидроксистероидов являются новыми соединениями. Химические структуры 7 выделенных соединений идентифицированы как ранее известные.

2. Химические структуры новых цереброзидов установлены как (2*S*,3*R*,4*E*,9*Z*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксигептадеканоиламино]-19-метил-4,9-генэйкозадиен-3-ол, (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситрикозаноиламино]-14-метилгексадекан-3,4-диол, (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситетракозаноиламино]-14-метилгексадекан-3,4-диол, (2*S*,3*R*,4*E*,9*Z*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидрокситетрадеканоиламино]-4,9-докозадиен-3-ол (лептастериацереброзид А) и (2*S*,3*R*,4*E*,9*Z*)-1-*O*-(β-*D*-глюкопиранозил)-2-[(2*R*)-2-гидроксипентадеканоиламино]-4,9-докозадиен-3-ол (лептастериацереброзид В).

3. Строение новых цереамидов установлено как (2*S*,3*S*,4*R*,9*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадеканоиламино]-19-метил-9-эйкозен-1,3,4-триол, (2*S*,3*S*,4*R*,9*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигексадеканоиламино]-21-метил-9-докозен-1,3,4-триол и (2*S*,3*S*,4*R*,9*Z*)-2-[(2*R*)-2-гидроксигептадеканоиламино]-21-метил-9-докозен-1,3,4-триол.

4. Строение новых стероидлипидов установлено как (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-5'*Z*,11'*Z*-октадекадиеноат, (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-11'*Z*-октадеканоат, (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-5'*Z*,11'*Z*-эйкозадиеноат и (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-7'*Z*-эйкозеноат.

5. Установлено строение новых гликозидов полигидроксистероидов – церамастерозидов А, В, D и Е, показано, что эти гликозиды имеют редкие моносахаридные остатки: метил-4-*O*-сульфо-β-*D*-ксилопиранозу и 3-*O*-метил-4-*O*-сульфоглюкопиранозу.

6. Для выделенных соединений получены данные по биологической активности в экспериментах *in vitro*. Показано, что лептастериацереброзиды А и В, астроцереброзид В и астериацереброзид С из *L. polaris acervata* обладают кардиопротекторной активностью, офидиацереброзиды С и D из *C. patagonicus* проявляют селективную цитостатическую активность, а (25*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,16β-тетраол-26-ил-11'*Z*-октадеканоат демонстрирует противометастатический и антипролиферативный эффекты. Кроме того, церамастерозиды А, В, D и Е из *C. patagonicus* обладают антиоксидантной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malyarenko T.V., Kicha A.A., Stonik V.A., Ivanchina N.V. Sphingolipids of Asteroidea and Holothuroidea: structures and biological activities // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19, N 6. Art. 330.
2. Lee J.Y., Jin H.K., Bae J. Sphingolipids in neuroinflammation: a potential target for diagnosis and therapy // *BMB Rep*. 2020. V. 53, N 1. P. 28–34.
3. Chiurchiù V., Tiberi M., Matteocci A., Fazio F., Siffeti H., Saracini S., Mercuri N.B., Sancesario G. Lipidomics of bioactive lipids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: where are we? // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23, N 11. Art. 6235.
4. Chowdhury M.R., Jin H.K., Bae J. Diverse roles of ceramide in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease // *Biomedicines*. 2022. V. 10, N 8. Art. 1956.
5. Xicoy H., Wieringa B., Martens G.J.M. The role of lipids in Parkinson's disease // *Cells*. 2019. V. 8, N 1. Art. 27.
6. Ogretmen B., Hannun Y.A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. V. 4, N 8. P. 604–616.
7. Jia W., Yuan J., Zhang J., Li S., Lin W., Cheng B. Bioactive sphingolipids as emerging targets for signal transduction in cancer development // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Rev. Cancer*. 2024. V. 1879, N 5. Art. 189176.
8. Dimanche-Boitrel M.T., Rebillard A., Gulbins E. Ceramide in chemotherapy of tumors // *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. 2011. V. 6, N 3. P. 284–293.
9. Thomas S., Samuel S.V., Hoch A., Syphurs C., Diray-Arce J. The implication of sphingolipids in viral infections // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. V. 24, N 24. Art. 17303.
10. Sárközy A., Béni Z., Dékány M., Zomborszki Z.P., Rudolf K., Papp V., Hohmann J., Ványolós A. Cerebrosides and steroids from the edible mushroom *Meripilus giganteus* with antioxidant potential // *Molecules*. 2020. V. 25, N 6. Art. 1395.
11. Lei X., Li J., Liu B., Zhang N., Liu H. Separation and identification of four new compounds with antibacterial activity from *Portulaca oleracea* L. // *Molecules*. 2015. V. 20, N 9. P. 16375–16387.
12. Amang À Ngnoung G., Sidjui L., Leutcha P., Nganso Ditchou Y., Tchokouaha L., Herbertte G., Baghdikian B., Kowa T., Soh D., Kemzeu R., Poka M., Demana P., Siwe Noundou X., Tchinda A., Fekam Boyom F., Lannang A., Nyassé B. Antileishmanial and antiplasmodial activities of secondary metabolites from the root of *Antrocaryon klaineianum* Pierre (Anacardiaceae) // *Molecules*. 2023. V. 28, N 6. Art. 2730.
13. Wang C., Zhou X., Wang Y., Wei D., Deng C., Xu X., Xin P., Sun S. The antitumor constituents from *Hedyotis diffusa* Willd // *Molecules*. 2017. V. 22, N 12. Art. 2101.

14. Usuki S., Tamura N., Sakai S., Tamura T., Mukai K., Igarashi Y. Chemoenzymatically prepared konjac ceramide inhibits NGF-induced neurite outgrowth by a semaphorin 3A-like action // *Biochem. Biophys. Rep.* 2016. V. 5. P. 160–167.
15. Kim J., Lee M., Cho W., Yoo E., Kim J., Gwon Y., Okayasu M., Lee J. Effect of ceramides derivatives from the peach on skin function improvement in UV-irradiated hairless mice // *Foods*. 2024. V. 13, N 23. Art. 3824.
16. Pendyala M., Parvataneni R., Krishna N., Rao D., Rao C. Sphingolipids from marine organisms: a review // *Nat. Prod. Sci.* 2003. V. 9. P. 117–142.
17. Barnathan G., Couzinet-Mossion A., Wielgosz-Collin G. Glycolipids from marine invertebrates // *Outstanding marine molecules*; La Barre S., Kornprobst J.M.; Wiley, 2014. P. 99–162.
18. Shayman J.A. Sphingolipids // *Kidney Int.* 2000. V. 58, N 1. P. 11–26.
19. Stiban J. Bioactive ceramides in health and disease: intertwined roles of enigmatic lipids: advances in experimental medicine and biology. *Bioactive ceramides in health and disease*. Cham : Springer International Publishing, 2019. P. 1–153.
20. Hannun Y.A., Obeid L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19, N 3. P. 175–191.
21. Fanani M.L., Maggio B. The many faces (and phases) of ceramide and sphingomyelin I – single lipids // *Biophys. Rev.* 2017. V. 9, N 5. P. 589–600.
22. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Svetashev V.I., Zhukova I.G., Smirnova G.P. Glycolipids of marine invertebrates // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. V. 34, N 1. P. 163–177.
23. Minale L., Riccio R., Zollo F. Steroidal oligoglycosides and polyhydroxysteroids from Echinoderms // *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 1993. V.62. P. 75–308.
24. Stonik V.A. Marine polar steroids // *Russ. Chem. Rev.* 2001. V. 70, N 8. P. 673–715.
25. Iorizzi M., Marino S., Zollo F. Steroidal oligoglycosides from the Asteroidea // *Curr. Org. Chem.* 2001. V. 5, N 9. P. 951–973.
26. 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.
27. Dong G., Xu T., Yang B., Lin X., Zhou X., Yang X., Liu Y. Chemical constituents and bioactivities of starfish // *Chem. Biodivers.* 2011. V. 8, N 5. P. 740–791.
28. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Stonik V.A. Steroid glycosides from marine organisms // *Steroids*. 2011. V. 76, N 5. P. 425–454.
29. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Stonik V.A. Recent studies of polar steroids from starfish: structures, biological activities and biosynthesis // *Advances in Natural Products*

- Discovery; Gomes, A.R., Rocha-Santos, T., Duarte, A., Eds.; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 2017. V. 6. P. 191–224.
30. Xia J., Miao Z., Xie C., Zhang J., Yang X. Chemical constituents and bioactivities of starfishes: an update // *Chem. Biodivers.* 2020. V. 17, N 1. Art. e1900638.
 31. 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.
 32. 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.
 33. Gomes A.R., Freitas A.C., Rocha-Santos T.A.P., Duarte A.C. Bioactive compounds derived from echinoderms // *RSC Adv.* 2014. V. 4, N 56. P. 29365–29382.
 34. Wang W., Hong J., Lee C.O., Im K.S., Choi J.S., Jung J.H. Cytotoxic sterols and saponins from the starfish *Certanardoa semiregularis* // *J. Nat. Prod.* 2004. V. 67, N 4. P. 584–591.
 35. Peng Y., Zheng J., Huang R., Wang Y., Xu T., Zhou X., Liu Q., Zeng F., Ju H., Yang X., Liu Y. Polyhydroxy steroids and saponins from China sea starfish *Asterina pectinifera* and their biological activities // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2010. V. 58, N 6. P. 856–858.
 36. Inagaki M., Isobe R., Kawano Y., Miyamoto T., Komori T., Higuchi R. Isolation and structure of three new ceramides from the Starfish *Acanthaster planci* // *Eur. J. Org. Chem.* 1998. V. 1998, N 1. P. 129–131.
 37. Rho, Jung-Rae, Kim, Yeong-Hwan. Isolation and structure determination of three new ceramides from the starfish *Distolasterias nipon* // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2005. V. 26, N 9. P. 1457–1460.
 38. Yoo J.S., Park T., Bang G., Lee C., Rho J., Kim Y.H. High-energy collision-induced dissociation of $[M+Na]^+$ ions desorbed by fast atom bombardment of ceramides isolated from the starfish *Distolasterias nipon* // *J. Mass Spectrom.* 2013. V. 48, N 2. P. 164–171.
 39. Inagaki M., Ikeda Y., Kawatake S., Nakamura K., Tanaka M., Misawa E., Yamada M., Higuchi R. Isolation and structure of four new ceramides from the starfish *Luidia maculata* // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2006. V. 54, N 12. P. 1647–1649.
 40. Ishii T., Okino T., Mino Y. A ceramide and cerebroside from the starfish *Asterias amurensis* Lütken and their plant-growth promotion activities // *J. Nat. Prod.* 2006. V. 69, N 7. P. 1080–1082.
 41. Kawano Y., Higuchi R., Isobe R., Komori T. Biologically active glycosides from Asteroidea, XIII. Glycosphingolipids from the starfish *Acanthaster planci*, 2. Isolation and structure of six new cerebroside // *Liebigs Ann. Chem.* 1988. Bd. 1988, N. 1. P. 19–24.

42. Kawano Y., Higuchi R., Isobe R., Komori T. Biologically active glycosides from Asteroidea, XVII. Glycosphingolipids from the starfish *Acanthaster planci*, 3. Isolation and structure of two new ceramide lactosides // Liebigs Ann. Chem. 1988. Bd. 1988, N 12. P. 1181–1183.
43. Higuchi R., Kagoshima M., Komori T. Biologically active glycosides from Asteroidea, XXII. Glycosphingolipids from the starfish *Astropecten latespinosus*, I. Structures of three new cerebroside, astrocerebroside A, B, and C and of related nearly homogeneous cerebroside // Liebigs Ann. Chem. 1990. Bd. 1990, N 7. P. 659–663.
44. Higuchi R., Natori T., Komori T. Biologically active glycosides from Asteroidea, XX. Glycosphingolipids from the starfish *Asterina pectinifera*, 1. Isolation and characterization of acanthacerebroside B and structure elucidation of related, nearly homogeneous cerebroside // Liebigs Ann. Chem. 1990. Bd. 1990, N 1. P. 51–55.
45. Higuchi R., Jhou J.X., Inukai K., Komori T. Biologically active glycosides from Asteroidea, XXVIII. Glycosphingolipids from the starfish *Asterias amurensis versicolor* Sladen, 1. Isolation and structure of six new cerebroside, asteriacerebroside A–F, and two known cerebroside, astrocerebroside A and acanthacerebroside C // Liebigs Ann. Chem. 1991. Bd. 1991, N 8. P. 745–752.
46. Shah A.K.M.A., Kinoshita M., Kurihara H., Ohnishi M., Takahashi K. Glycosylceramides obtain from the starfish *Asterias amurensis* Luetken // J. Oleo Sci. 2008. V. 57, N 9. P. 477–484.
47. Park T., Park Y.S., Rho J.R., Kim Y.H. Structural determination of cerebroside isolated from *Asterias amurensis* starfish eggs using high-energy collision-induced dissociation of sodium-adducted molecules // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011. V. 25, N 5. P. 572–578.
48. Du L., Li Z.J., Xu J., Wang J.F., Xue Y., Xue C.H., Takahashi K., Wang Y.M. The anti-tumor activities of cerebroside derived from sea cucumber *Acaudina molpadioides* and starfish *Asterias amurensis* *in vitro* and *in vivo* // J. Oleo Sci. 2012. V. 61, N 6. P. 321–330.
49. Wu F.J., Xue Y., Tang Q.J., Xu J., Du L., Xue C.H., Takahashi K., Wang Y.M. The protective effects of cerebroside from sea cucumber and starfish on the oxidative damage in PC12 Cells // J. Oleo Sci. 2013. V. 62, N 9. P. 717–727.
50. Yamaguchi R., Kanie Y., Kanie O., Shimizu Y. A unique structural distribution pattern discovered for the cerebroside from starfish *Asterias amurensis* // Carbohydr. Res. 2019. V. 473. P. 115–122.
51. Jin W., Rinehart K.L., Jares-Erijman E.A. Ophidiacerebroside: cytotoxic glycosphingolipids containing a novel sphingosine from a sea star // J. Org. Chem. 1994. V. 59, N 1. P. 144–147.

52. Higuchi R., Harano Y., Mitsuyuki M., Isobe R., Yamada K., Miyamoto T., Komori T. Biologically active glycosides from Asteroidea, XXXIV. Isolation and structure of cerebrosides from the starfish *Stellaster equestris* // Liebigs Ann. 1996. Bd. 1996, N 4. P. 593–599.
53. Venkannababu U., Bhandari S.P.S., Garg (The Late) H.S. Regulosides A–C: glycosphingolipids from the starfish *Pentaceraster regulus* // Liebigs Ann. 1997. Bd. 1997, N 6. P. 1245–1247.
54. Maier M.S., Kuriss A., Seldes A.M. Isolation and structure of glucosylceramides from the starfish *Cosmasterias lurida* // Lipids. 1998. V. 33, N 8. P. 825–827.
55. Díaz De Vivar M.E., Seldes A.M., Maier M.S. Two novel glucosylceramides from gonads and body walls of the patagonian starfish *Allostichaster inaequalis* // Lipids. 2002. V. 37, N 6. P. 597–603.
56. Kawatake S., Nakamura K., Inagaki M., Higuchi R. Isolation and structure determination of six glucocerebrosides from the starfish *Luidia maculata*. // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2002. V. 50, N 8. P. 1091–1096.
57. Inagaki M., Nakamura K., Kawatake S., Higuchi R. Isolation and structural determination of four new ceramide lactosides from the starfish *Luidia maculata* // Eur. J. Org. Chem. 2003. V. 2003, N 2. P. 325–331.
58. Chludil H.D., Seldes A.M., Maier M.S. Anasterocerebroside A, a new glucosylceramide from the patagonian starfish *Anasterias minuta* // Z. Für Naturforschung C. 2003. Bd. 58, N 5–6. P. 433–440.
59. Maruta T., Saito T., Inagaki M., Shibata O., Higuchi R. Biologically active glycosides from Asteroidea, 41. Isolation and structure determination of glucocerebrosides from the starfish *Linckia laevigata* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2005. V. 53, N 10. P. 1255–1258.
60. Inagaki M., Nakata T., Higuchi R. Isolation and structure of a galactocerebroside molecular species from the starfish *Culcita novaeguineae* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2006. V. 54, N 2. P. 260–261.
61. Farokhi F., Wielgosz-Collin G., Clement M., Kornprobst J.M., Barnathan G. Cytotoxicity on human cancer cells of ophidiocerebrosides isolated from the African starfish *Narcissia canariensis* // Mar. Drugs. 2010. V. 8, N 12. P. 2988–2998.
62. Pan K., Inagaki M., Ohno N., Tanaka C., Higuchi R., Miyamoto T. Identification of sixteen new galactocerebrosides from the starfish *Protoreaster nodosus* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2010. V. 58, N 4. P. 470–474.
63. Zakharenko V.M., Malyarenko T.V., Kicha A.A., Ivanchina N.V. Biological activity of sphingolipids from marine organisms // Nat. Prod. Chem. Pharmacol. Nutr. 2025. V. 1, N 1. P. 80–117.

64. Ngoan B.T., Hanh T.T.H., Vien L.T., Diep C.N., Thao N.P., Thao D.T., Thanh N.V., Cuong N.X., Nam N.H., Thung D.C., Kiem P.V., Kim Y.H., Minh C.V. Asterosaponins and glycosylated polyhydroxysteroids from the starfish *Culcita novaeguineae* and their cytotoxic activities // J. Asian Nat. Prod. Res. 2015. V. 17, N 10. P. 1010–1017.
65. Lu Y., Li H., Wang M., Liu Y., Feng Y., Liu K., Tang H. Cytotoxic polyhydroxysteroidal glycosides from starfish *Culcita novaeguineae* // Mar. Drugs. 2018. V. 16, N 3. Art. 92.
66. Malyarenko T.V., Malyarenko (Vishchuk) O.S., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Popov R.S., Kicha A.A. Four new sulfated polar steroids from the Far Eastern starfish *Leptasterias ochotensis*: structures and activities // Mar. Drugs. 2015. V. 13, N 7. P. 4418–4435.
67. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Pisyagin 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.
68. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S. Sulfated steroidal glycosides, regulosides S1 and S2, from the tropical starfish *Pentaceraster regulus* // Chem. Nat. Compd. 2017. V. 53, N 1. P. 88–92.
69. Vien L.T., Hanh T.T.H., Quang T.H., Cuong N.X., Thao D.T., Nam N.H., Thung D.C., Kiem P.V., Minh C.V. Polyhydroxylated steroid derivatives from the starfish *Pentaceraster regulus* // Nat. Prod. Res. 2020. V. 36, N 9. P. 2223–2229.
70. Vien L.T., Hanh T.T.H., Huong P.T.T., Tu V.A., Thanh N.V., Lyakhova E.G., Cuong N.X., Nam N.H., Kiem P.V., Minh C.V., Kicha A.A., Stonik V.A. New steroidal glycosides from the starfish *Acanthaster planci* // Chem. Nat. Compd. 2016. V. 52, N 6. P. 1056–1060.
71. Vien L.T., Hong Hanh T.T., Thanh Huong P.T., Thao D.T., Thanh N.V., Cuong N.X., Nam N.H. Structure elucidation and cytotoxic activity of attenuatoside B-1, planciside A, and culcitoside C2 from the starfish *Acanthaster planci* // Vietnam J. Sci. Technol. 2018. V. 56, N 1. P. 1–6.
72. Kicha A.A., Ha D.T., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Hung N.A., Thuy T.T.T., Long P.Q. Six new polyhydroxysteroidal glycosides, anthenosides S1–S6, from the starfish *Anthenea sibogae* // Chem. Biodivers. 2018. V. 15, N 3. Art. e1700553.
73. Vien L.T., Hanh T.T.H., Hong P.T., Thanh N.V., Huong T.T., Cuong N.X., Nam N.H., Thung D.C., Kiem P.V., Minh C.V. Polar steroid derivatives from the Vietnamese starfish *Astropecten polyacanthus* // Nat. Prod. Res. 2018. V. 32, N 1. P. 54–59.

74. 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. 2019. V. 33, N 18. P. 2623–2630.
75. Kicha A.A., Tolkanov D.K., Malyarenko T.V., Malyarenko O.S., Kuzmich A.S., Kalinovsky A.I., Popov R.S., Stonik V.A., Ivanchina N.V., Dmitrenok P.S. Sulfated polyhydroxysteroid glycosides from the Sea of Okhotsk starfish *Henricia leviuscula* spiculifera and potential mechanisms for their observed anti-cancer activity against several types of human cancer cells // Mar. Drugs. 2024. V. 22, N 7. Art. 294.
76. Zhang R., Lu Z., Wang D., Yan Z., Sun X., Li X., Yin X., Wang S., Li K. Pectiniferosides A–J: diversified glycosides of polyhydroxy steroids isolated from the sea star *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* // Mar. Drugs. 2024. V. 22, N 12. Art. 545.
77. Li X., Lu Z., Wang D., Yan Z., Yin X., Xu Y., Wang S., Li K. New polyhydroxysteroids derivatives from starfish *Asterias amurensis* induce embryotoxicity in marine medaka // J. Chem. Ecol. 2025. V. 51, N 2. Art. 37.
78. Ishii T., Okino T., Mino Y., Tamiya H., Matsuda F. Plant-growth regulators from common starfish (*Asterias amurensis* Lütken) waste // Plant Growth Regul. 2007. V. 52, N 2. P. 131–139.
79. Masuda Y., Mori K. Synthesis and absolute configuration of 6-hydroxylated new ceramides in human skin, ceramides B, 4, 7 and 8 // Eur. J. Org. Chem. 2005. V. 2005, N 22. P. 4789–4800.
80. Bodlenner A., Glueck S.M., Nestl B.M., Gruber C.C., Baudendistel N., Hauer B., Kroutil W., Faber K. Biocatalytic racemization of α -hydroxycarboxylic acids using a stereo-complementary pair of α -hydroxycarboxylic acid dehydrogenases // Tetrahedron. 2009. V. 65, N 36. P. 7752–7755.
81. Malyarenko T.V., Zakharenko V.M., Kicha A.A., Kuzmich A.S., Malyarenko O.S., Kalinovsky A.I., Popov R.S., Svetashev V.I., Ivanchina N.V. New ceramides and cerebrosides from the deep-sea Far Eastern starfish *Ceramaster patagonicus* // Mar. Drugs. 2022. V. 20, N 10. Art. 641.
82. De Haan J.W., Van De Ven L.J.M. Configurations and conformations in acyclic, unsaturated hydrocarbons. A ^{13}C NMR study // Org. Magn. Reson. 1973. V. 5, N 3. P. 147–153.
83. Yamada K., Hara E., Miyamoto T., Higuchi R., Isobe R., Honda S. Isolation and structure of biologically active glycosphingolipids from the sea cucumber *Cucumaria echinata* // Eur. J. Org. Chem. 1998. V. 1998, N 2. P. 371–378.

84. Sugiyama S., Honda M., Komori T. Biologically active glycosides from Asteroidea, XXIV. Stereochemistry of the four diastereomers of phytosphingosine // *Liebigs Ann. Chem.* 1990. Bd. 1990, N 11. P. 1069–1078.
85. Fischer C.L., Drake D.R., Dawson D.V., Blanchette D.R., Brogden K.A., Wertz P.W. Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against gram-positive and gram-negative bacteria // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56, N 3. P. 1157–1161.
86. Minale L., Pizza C., Zollo F., Riccio R. 5 α -cholestane-3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-pentol: a polyhydroxylated sterol from the starfish *Hacelia attenuata* // *Tetrahedron Lett.* 1982. V. 23, N 17. P. 1841–1844.
87. Кича А.А., Калиновский А.И., Стоник В.А. Новые полигидроксистероиды и стероидные гликозиды из дальневосточной морской звезды *Ceramaster patagonicus* // *Изв. АН. Серия химич.* 1997. № 1. С. 190–195.
88. Svetashev V.I. Mild method for preparation of 4,4-dimethyloxazoline derivatives of polyunsaturated fatty acids for GC–MS // *Lipids.* 2011. V. 46, N 5. P. 463–467.
89. Stránský K., Jursík T., Vitek A. Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene interrupted) fatty acids // *J. High Resolut. Chromatogr.* 1997. V. 20, N 3. P. 143–158.
90. Minale L., Pizza C., Riccio R., Zollo F. Starfish saponins. Part 101. Further 24-O-glycosidated steroids from the starfish *Hacelia attenuata* // *Experientia.* 1983. V. 39, N 6. P. 569–571.
91. Iorizzi M., Minale L., Riccio R., Debray M., Menou J.L. Starfish saponins, Part 23. Steroidal glycosides from the starfish *Halityle regularis* // *J. Nat. Prod.* 1986. V. 49, N 1. P. 67–78.
92. Vanderah D.J., Djerassi C. Marine natural products. Synthesis of four naturally occurring 20 β -H cholanolic acid derivatives // *J. Org. Chem.* 1978. V. 43, N 7. P. 1442–1448.
93. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Menchinskaya E.S., Pisyagin 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.
94. Iorizzi M., Minale L., Riccio R., Kamiya H. Starfish Saponins, 45. Novel sulfated steroidal glycosides from the starfish *Astropecten scoparius* // *J. Nat. Prod.* 1990. V. 53, N 5. P. 1225–1233.
95. Шашков А.С., Чижов О.С. Спектроскопия ¹³C-ЯМР в химии углеводов и родственных соединений // *Биоорг. химия.* 1976. Т. 2, № 4. С. 437–497.

96. Zollo F., Finamore E., Minale L. Starfish saponins, XXXI. Novel polyhydroxysteroids and steroidal glycosides from the starfish *Sphaerodiscus placenta* // J. Nat. Prod. 1987. V. 50, N 5. P. 794–799.
97. Xiong Z., Zhang N., Xu L., Deng Z., Limwachiranon J., Guo Y., Han Y., Yang W., Scharf D.H. Urease of *Aspergillus fumigatus* is required for survival in macrophages and virulence // Microbiol. Spectr. 2023. V. 11, N 2. Art. e03508-22.
98. Zhou C., Bhinderwala F., Lehman M.K., Thomas V.C., Chaudhari S.S., Yamada K.J., Foster K.W., Powers R., Kielian T., Fey P.D. Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection // PLOS Pathog. 2019. V. 15, N 1. Art. e1007538.
99. Hu Y., Schmidhalter U. Urease inhibitors: opportunities for meeting EU national obligations to reduce ammonia emission ceilings by 2030 in EU countries // Environ. Res. Lett. 2021. V. 16, N 8. Art. 084047.
100. Cantarella H., Otto R., Soares J.R., Silva A.G.D.B. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review // J. Adv. Res. 2018. V. 13. P. 19–27.
101. Starnovskaya S.S., Nesterenko L.E., Popov R.S., Kirichuk N.N., Chausova V.E., Chingizova E.A., Chingizov A.R., Isaeva M.P., Yurchenko E.A., Yurchenko A.N. Metabolite profiles of *Paragliomastix luzulae* (formerly named as *Acremonium striatisporum*) KMM 4401 and its co-cultures with *Penicillium hispanicum* KMM 4689 // Nat. Prod. Bioprospecting. 2024. V. 14, N 1. Art. 38.
102. Weatherburn M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia // Anal. Chem. 1967. V. 39, N 8. P. 971–974.
103. AAT Bioquest Inc. IC50 Calculator / Inc. AAT Bioquest. 2026.
104. Chingizova E.A., Yurchenko E.A., Chingizov A.R., Klimovich A.A., Pislyagin E.A., Menchinskaya E.S., Kuzmich A.S., Trinh P.T.H., Ngoc N.T.D., Van T.T.T., Guzhova I.V., Aminin D.L., Yurchenko A.N. The effects of marine fungal asterriptides A–C on *in vitro* and *in vivo* *Staphylococcus aureus* skin infection // Pharmaceuticals. 2024. V. 17, N 10. Art. 1345.