

Е.В. ЛЕЩЕНКО, Е.В. ИВАНЕЦ, М.П. СОБОЛЕВСКАЯ

Вторичные метаболиты грибов-микромикетов морских растений

*Из четырех изолятов факультативных морских грибов рода *Penicillium* (*P. thomii* KMM 4667, *P. thomii* Maire KMM 4675, *P. thomii* KMM 4674 и *P. sp.* KMM 4672), ассоциированных с морскими растениями, выделено 30 новых вторичных метаболитов различной химической природы. Структуры соединений установлены на основе данных ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Абсолютные конфигурации ряда соединений определены с помощью вычислений спектров электронного кругового дихроизма (ECD) в рамках нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) и сравнения КД-спектров с литературными данными, а также с помощью метода Мошера. Исследована цитотоксическая и противовоспалительная активность ряда выделенных соединений.*

Ключевые слова: морские грибы, вторичные метаболиты, поликетиды, сесквитерпены, цитотоксическая активность, противовоспалительная активность.

Secondary metabolites of micromycetes fungi of marine plants. E.V. LESHCHENKO (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Far Eastern Federal University, Vladivostok), E.V. IVANETS, M.P. SOBOLEVSKAYA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*Thirty new secondary metabolites of various chemical nature were isolated from marine fungi of the genus *Penicillium*: *P. thomii* KMM 4667, *P. thomii* Maire KMM 4675, *P. thomii* KMM 4674 and *Penicillium sp.* KMM 4672, associated with the marine plants. The structures of the compounds were established based on NMR spectroscopy and high resolution mass spectrometry. The absolute configurations of several compounds were determined using the Mosher's method and by time-dependent density functional theory (TD-DFT) calculation of ECD spectra and comparison of these spectra with published data. The cytotoxic and anti-inflammatory activity of a number of isolated compounds was examined.*

Key words: marine fungi, secondary metabolites, polyketides, sesquiterpenes, cytotoxic activity, anti-inflammatory activity.

Введение

Интенсивные исследования наземных микроорганизмов, продуцирующих биологически активные соединения, были начаты в середине прошлого века и продолжают в настоящее время. В то же время число новых метаболитов, продуцируемых ими, снижается, так как около 90 % культур синтезируют уже известные соединения. Поэтому закономерен интерес к изучению метаболитов микроорганизмов из других биологических сообществ, в том числе из морских. Активное изучение грибов-микромикетов из морских источников как продуцентов биологически активных соединений началось в начале 2000-х годов.

Анализ литературных данных показывает, что значительное число новых биологически активных метаболитов морских грибов выделены из грибов, ассоциированных

ЛЕЩЕНКО Елена Владиславовна – младший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток), научный сотрудник (Дальневосточный федеральный университет, Владивосток), ИВАНЕЦ Елена Валерьевна – младший научный сотрудник, *СОБОЛЕВСКАЯ Мария Павловна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: afiyat@piboc.dvo.ru

с морскими водорослями и травами [13]. Грибы морских водорослей и трав, имеющие биологически активные вторичные метаболиты, играют важную роль в химической защите организма хозяина от растительноядных животных, подводных насекомых и патогенных микроорганизмов [9]. В то же время грибы морских водорослей и трав дальневосточных морей до сих пор остаются малоисследованными.

Заметные антибиотические свойства проявляют многие метаболиты из грибов морских водорослей. Так, хлорированный бензофенон – песталон из гриба *Pestalotia* sp., выделенного из бурой водоросли *Rosenvingea* sp., и цереброзиды – флавуциды А и В, выделенные из гриба *Aspergillus flavus*, ассоциированного с зеленой водорослью *Codium fragile*, обнаруживают высокую активность в отношении клинических изолятов метициллин- и мультилекарственно-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* [4, 16]. Антифунгальную и антибактериальную активность в отношении культур *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Colletotrichum lagenarium* и *Fusarium oxysporum* проявляют ксантоновые производные – уйказины В и С из гриба *A. wentii*, выделенного из красной водоросли *Gymnogongrus flabelliformis* [15].

Мощной антипротозойной активностью обладают необычные нерегулярные терпеноиды из гриба *Drechslera dematioidea*, выделенного из водоросли *Liagora viscida*, макролид – айгиаломицин D из водорослевого гриба *Aigialus parvus* ВСС 5311, производное тетрамовой кислоты – аскосалипираллидин А из облигатного гриба *Ascochyta alicorniae*, ассоциированного с зеленой водорослью *Ulva* sp. [7, 11, 12].

Ряд метаболитов различных химических классов из грибов морских водорослей и трав рассматриваются в настоящее время в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов [3, 5]. Среди них ингибитор формирования тубулиновых микротрубочек дикетопиперазинплинабулин из гриба *Aspergillus* sp. CNC-139, ассоциированного с морской водорослью [3] (фаза II клинических испытаний), лептозин А и сансалваמיד – ингибиторы топоизомеразы II из грибов *Leptosphaeria* sp. и *Fusarium* sp., выделенных из морской травы *Halodule wrightii* [6].

В этой обзорной статье мы обсуждаем сведения о структурах и свойствах некоторых метаболитов из морских изолятов грибов, изученных в лаборатории химии микробных метаболитов ТИБОХ ДВО РАН совместно с кафедрой биоорганической химии и биотехнологии Дальневосточного федерального университета. В работе использовались коллекция морских микроорганизмов и оборудование Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрия) ТИБОХ ДВО РАН.

Результаты и обсуждение

В ранее опубликованных работах мы описали выделение и идентификацию шести новых природных алкалоидов, карнехиназолинов А–С и карнеамидов А–С, двух новых арилгликозидов, карнемицинов А и В, нового дриманового сесквитерпеноида из морского гриба *Aspergillus carneus* КММ 4638, ассоциированного с бурой водорослью *Laminaria sachalinensis* (Miyabe) [7], десяти новых меротерпеноидов–аусталидов и семи новых 6,6-спирокеталей – саргассопениллинов А–G из грибов *P. thomii* КММ 4645 и *P. lividum* КММ 4663, ассоциированных с бурой водорослью *Sargassum miyabei* [18, 19].

Продолжая нашу работу по поиску новых биоактивных метаболитов из морских грибов, мы исследовали штамм *Penicillium thomii* КММ 4667, выделенный с поверхности ризома морской травы *Zostera marina* (Японское море) [1]. Гриб культивировали в течение 21 суток на специально модифицированной рисовой среде. Мицелий гриба со средой экстрагировали этилацетатом. Сухой экстракт растворяли в системе этанол–вода (1 : 4) и последовательно экстрагировали гексаном и этилацетатом. Этилацетатный экстракт хроматографировали последовательно на колонке с силикагелем и методом обращенно-фазной ВЭЖХ. В результате были получены сесквитерпены зудесманового типа – томимарины А–D (1–4) (рис. 1).

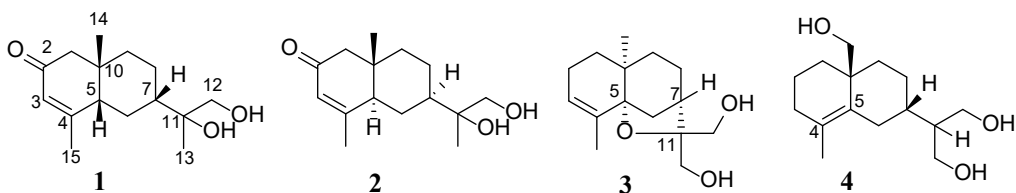


Рис. 1. Структуры томимаринов А–D (1–4)

Молекулярная формула соединения **1** была определена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании данных масс-спектрометрии высокого разрешения HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 275.1623) и ^{13}C ЯМР-анализа. Анализ двумерных ЯМР-спектров **1** показал присутствие в структуре молекулы циклогексен-2-еновой системы, метильных групп при С-4 и С-10 и 1,2-дигидроксипропильного остатка при С-7 в качестве боковой цепи. Относительная конфигурация соединения **1** была определена с помощью NOESY эксперимента.

Абсолютная стереохимия **1** установлена при сравнении экспериментальных и теоретически вычисленных КД-спектров. Для получения статистически усредненных спектров были выбраны стабильные конформации **1** в соответствии с их свободными энергиями Гиббса. В результате вычислены и статистически усреднены индивидуальные КД-спектры для десяти конформаций со стереохимией $5S$, $7S$, $10S$, $11S$ и для двенадцати конформаций с иной стереохимией – $5S$, $7S$, $10S$, $11R$. Сравнение теоретических спектров с экспериментальным (рис. 2) показало, что все спектры качественно подобны в области $\lambda \leq 280$ nm, где наблюдаются значительные эффекты Коттона. Конфигурация асимметрического центра при С-11 в соединении **1** не была установлена. Таким образом, абсолютные конфигурации других стереоцентров **1** были определены как $5S$, $7S$, $10S$. Соединение получило название томимарин А.

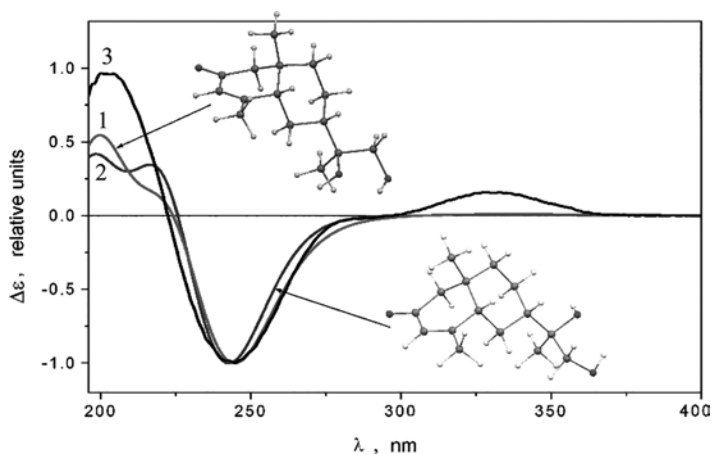


Рис. 2. КД-спектры томимарина А (1): 1 – рассчитанные для $5S$, $7S$, $10S$, $11S$; 2 – рассчитанные для $5S$, $7S$, $10S$, $11R$; 3 – полученные экспериментально

Молекулярная формула соединения **2** определена на основании пика $[M+H]^+$ (m/z 253.1816) в APPI-MS и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. ЯМР-спектры соединения **2** были близки к соответствующим спектрам томимарина А (**1**), за исключением сигналов Н-5 и С-5, С-7 и С-9. COSY и HMBC корреляции устанавливали структуру колец А и В и показали присутствие 1,2-дигидроксипропильного остатка в боковой цепи **2**. Абсолютная стереохимия **2** была установлена так же, как и для томимарина А. КД-спектры для семи конформаций со стереохимией $5R$, $7S$, $10S$, $11R$ и двенадцати конформаций иной альтернативной стереохимии ($5R$, $7S$, $10S$, $11S$) были вычислены и статистически

усреднены. Таким образом, абсолютная конфигурация стереоцентров **2** установлена как *5R, 7S, 10S*. Соединение названо томимарином В.

Молекулярная формула соединения **3** была установлена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании данных HRESIMS спектра m/z 275.1621 $[M+Na]^+$ и ^{13}C ЯМР анализа. Сигналы ^{13}C ЯМР-спектра **3** были практически идентичны сигналам для известного соединения α -агарофурана [8], за исключением сигналов C-7 и C-11–C-13. HMBC корреляции свидетельствовали о присутствии двух гидроксиметиленовых групп при C-11. Абсолютная структура соединения **3** была доказана с помощью методов КД-спектроскопии. Сравнение статистически усредненных теоретических КД-спектров (девять более стабильных конформеров) стереоизомера *5S, 7S, 10S* с экспериментальным спектром показало, что оба спектра качественно подобны в области $195 \leq \lambda \leq 240$ нм, где наблюдаются характеристические эффекты Коттона. Таким образом, абсолютная структура соединения **3** была установлена как *5S, 7S, 10S*. Соединение получило название томимарин С.

Молекулярная формула соединения **4** была установлена как $C_{15}H_{26}O_3$ (m/z 277.1780) $[M+Na]^+$ на основании HRESIMS и ^{13}C ЯМР анализа. Корреляции, наблюдаемые в COSY, HSQC и HMBC спектрах **4**, показали наличие циклогексенового кольца (A), положение метильной и гидроксиметильной групп при C-4 и C-10 установили соответственно структуру кольца B и пропан-1,3-диольного остатка при C-7. Сравнение статистически усредненных теоретических КД-спектров стереоизомера *7S, 10S* с экспериментальным КД показало, что оба спектра качественно подобны, и, таким образом, абсолютная структура соединения **4** была установлена как *7S, 10S, 11S*. Соединение получило наименование томимарин D.

Было показано, что соединения **1, 2** и **4** при концентрации $10,0 \mu M$ индуцируют значительное снижение продукции NO в ЛПС-стимулированных макрофагах. Уровень NO в этих клетках был снижен на $24,9 \pm 0,9 \%$ ($p < 0,01$), $43,4 \pm 1,5 \%$ ($p < 0,01$) и $20,9 \pm 5,7 \%$ ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с контрольными клетками, стимулированными липополисахаридом. Томимарин В показал максимальное ингибирование NO в ЛПС-стимулированных RAW 264.7 клетках.

Из этилацетатного экстракта культуры гриба *Penicillium thomii* Maire KMM 4675, ассоциированного с бурой водорослью *Sargassum pallidum*, были выделены 11 новых метаболитов поликетидного биогенеза – паллидопениллинов **5–15** (рис. 3) [14].

HRESIMS соединения **5** содержит пик m/z 291.1582 $[M+Na]^+$. Молекулярную формулу соединения **5** установили как $C_{15}H_{24}O_4$ на основании данных масс-спектрометрии высокого разрешения и спектра ЯМР ^{13}C . Анализ спектров ЯМР 1H и ^{13}C , DEPT, HSQC, COSY и HMBC показал наличие в данном соединении декалиновой скелетной системы, Δ^{11} двойной связи, метильных групп при C-4, C-8 и C-13, гидроксильных групп при C-9 и C-13, а также присутствие 3-гидрокси-1-оксипропильного остатка в качестве боковой цепи.

Молекулярная структура и относительная конфигурация соединения **5** были подтверждены данными рентгеноструктурного анализа монокристалла, полученного при кристаллизации в этаноле. Абсолютная конфигурация была установлена методом Мошера и на основании NOESY взаимодействий. Так, этерификация соединения **5** с (*R*)- и (*S*)-МТРА хлорангидридами привела к образованию (*S*)- и (*R*) МТРА эфиров **5a** и **5b** соответственно. Разница химических сдвигов $\Delta\delta(\delta_S - \delta_R)$ в протонных спектрах полученных эфиров указывала на *9R* конфигурацию, что позволило нам установить конфигурацию асимметрических центров соединения **5** как *4R, 5S, 8S, 9R, 10R, 13R*. Соединение **5** было названо паллидопениллином А.

Для соединения **6** молекулярная формула $C_{17}H_{26}O_5$ установлена на основании значений пиков квазимолекулярных ионов m/z 333.1678 $[M+Na]^+$, полученных при HRESIMS. Данные 1H и ^{13}C ЯМР-спектров соединения **6** показали присутствие ацетокси группы при C-1 вместо гидроксильной группы в соединении **5**. Абсолютная конфигурация соединения **6** как *4R, 5S, 8S, 9R, 10R, 13R* была установлена на основании КД-спектроскопии. Соединение **6** получило наименование 1-ацетил-паллидопениллин А.

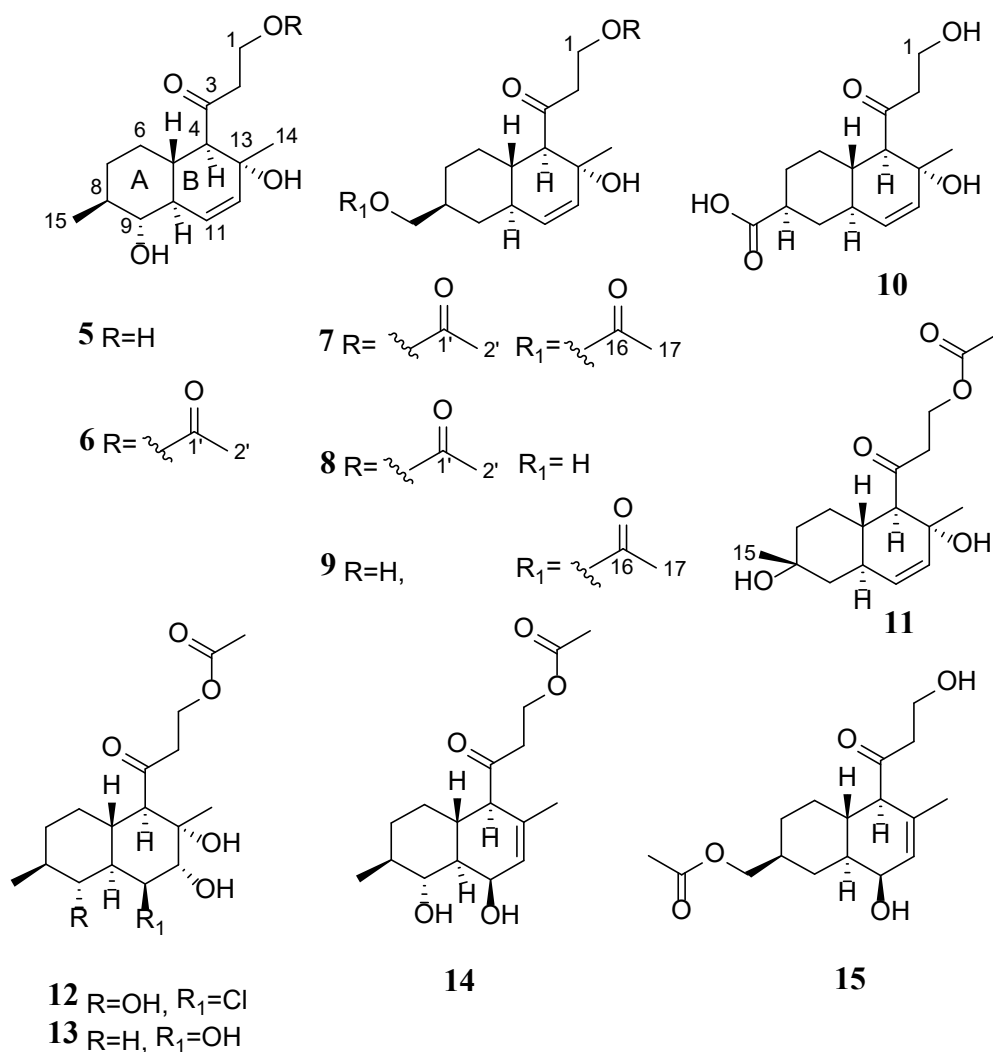


Рис. 3. Метаболиты гриба *Penicillium thomii* KMM 4675

Молекулярная формула соединения **7** установлена как $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_6$ на основании HRESIMS и данных ^{13}C ЯМР-спектра. Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C соединения **7** показали, что в структуре кольца А отсутствует гидроксильная группа в положении С-9 и присутствует ацетоксиметильная группа в положении С-8. NOESY взаимодействия Н-4/Н-10, ОН-13; Н-5/Н₃-14; Н-8/Н-10 указывали на *trans*-сочленение колец А и В, β -ориентацию метильной группы в положении С-14 и ацетоксиметильной группы при С-8, а также на α -ориентацию гидроксильной группы при С-13. Абсолютная конфигурация соединения **7** установлена методом КД-спектроскопии как *4R, 5S, 8S, 10R, 13R*. Соединение **7** получило название паллидопениллин В.

Молекулярная формула соединения **8** установлена как $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_5$ на основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Данные ЯМР ^1H и ^{13}C спектров этого соединения совпадают с данными ЯМР-спектров для паллидопениллина В (**7**), за исключением сигналов протонов и углеродов при С-8 и С-15. Эти данные и разница в 42 Да между молекулярными массами соединений **7** и **8** указывают на присутствие гидроксиметильной группы при С-8 в соединении **8**. Соединение имеет характерные эффекты Коттона при $\lambda_{192} +0,26$, $\lambda_{204} -0,72$, $\lambda_{294} -0,85$ в КД-спектре, записанном в гексане. Эти данные хорошо соответствуют данным

для соединений **6** и **7**, за исключением полосы поглощения низкой интенсивности, соответствующей положительному эффекту Коттона в области $215 \leq \lambda \leq 250$ нм. В результате абсолютная конфигурация соединения **8** была установлена как *4R, 5S, 8S, 10R, 13R*. Данное соединение названо 15-деацетил-паллидопениллином В.

Молекулярная формула соединения **9** установлена как $C_{17}H_{26}O_5$ на основании данных HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Структура соединения и положение 3-гидрокси-1-оксипропильной группы при С-4 определены на основании HMBC и COSY взаимодействий также, как и для соединения **5**. В КД-спектре соединения **9** в гексане наблюдали эффекты Коттона при $\lambda_{192} +0,46$, $\lambda_{204} -0,15$, $\lambda_{294} -0,25$, которые находились в хорошем соответствии с эффектами Коттона, наблюдаемыми для **6**, **7** и **8**. Эти данные позволили установить абсолютную конфигурацию **9** как *4R, 5S, 8S, 10R, 13R*. Соединение получило название 1-деацетилпаллидопениллин В.

На основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C данных молекулярная формула соединения **10** установлена как $C_{15}H_{22}O_5$, ЯМР-спектральные данные для него соответствуют данным, полученным для **9**, за исключением сигналов протонов и углерода при С-8. HMBC корреляции показали присутствие в соединении **10** карбоксильной группы в положении С-8. Относительная конфигурация была определена на основании NOESY взаимодействий. Соединение было названо паллидопениллином С.

Молекулярная формула соединения **11** установлена как $C_{17}H_{26}O_5$ на основании данных HRESIMS и ЯМР ^{13}C спектров. ЯМР-спектры данного соединения близко соответствовали спектрам паллидопениллина В (**7**), за исключением С-6–С-10 протонных и углеродных сигналов. HMBC взаимодействия Н-9 (δ_H 1.56)/С-8 (δ_C 67.7), С-10 (δ_C 36.4); Н₃-15 (δ_H 1.07)/С-7 (δ_C 38.4), С-8, С-9 (δ_C 44.6) позволили установить структуру соединения **11** с гидроксильной и метильной группами в положении С-8. Относительная конфигурация **11** определена на основании наблюдаемых NOESY взаимодействий. Соединение было названо паллидопениллином D.

Молекулярная формула соединения **12** установлена как $C_{17}H_{21}ClO_6$ на основании пиков квазимолекулярных ионов $[M-H]^-$ при m/z 361.1427 и $[M+Cl]^-$ при m/z 397.1179 в HRESIMS и была подтверждена данными ЯМР ^{13}C . Интенсивность изотопных пиков $M+2$ указывала на присутствие атома хлора. HMBC взаимодействия позволили установить структуру кольца А и присутствие 3-ацетокси-1-оксипропильного фрагмента в положении С-4, как и в 1-ацетил-паллидопениллине А. Путем анализа констант спин-спинового взаимодействия Н-11 и Н-12, химических сдвигов С-11 (δ_C 61.4) и С-12 (δ_C 76.9) и HMBC взаимодействия определена структура кольца В, включая положение атома хлора при С-11, метильной и гидроксильной групп при С-13, а также гидроксильной группы при С-12. Наблюдаемые NOESY корреляции указали на *trans*-сочленение колец А и В, β -ориентацию атома хлора и метильных групп при С-14 и С-15 и на α -ориентацию ОН-9, ОН-12 и ОН-13. Соединение **12** получило название паллидопениллин Е.

Молекулярная формула **13** установлена как $C_{17}H_{28}O_6$ на основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Корреляции, наблюдаемые в COSY и HMBC спектрах, позволили выявить строение колец А и В, положение метильных групп при С-8, С-13 и гидроксильных групп при С-11, С-12 и С-13. Структура и положение 3-ацетокси-1-оксипропильного остатка в положении С-4 в соединении **13** установлены на основании HMBC и COSY взаимодействий также как и в паллидопениллине Е. Относительные конфигурации С-4, С-5, С-8, С-10, С-11, С-12 и С-13 ассиметрических центров в соединении **13** идентичны конфигурациям ассиметрических центров в соединении **12**, что следует из анализа NOESY спектра. Соединение **13** было названо паллидопениллином F.

Молекулярная формула соединения **14** была определена как $C_{17}H_{26}O_5$ на основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Структура кольца А и 3-ацетокси-1-оксипропильного фрагмента установлены также, как и для паллидопениллина Е. Данные COSY-45 и HMBC спектров позволили определить структуру кольца В, включая двойную связь при С-12, С-13 и положение гидроксильной и метильной групп при С-11 и С-13. Относительная конфигурация

соединения **14** выявлена на основании NOESY взаимодействий H-5/H-9, H₃-14; H-4/H-10 и H-8/H-10. Соединение **14** было названо паллидопениллином G.

Молекулярная формула соединения **15** идентифицирована как C₁₇H₂₆O₅ на основании HRESIMS и ЯМР ¹³C. Структура кольца B и боковая цепь были установлены как и для паллидопениллина G. HMBC корреляции позволили определить структуру кольца A и положение ацетоксиметильной группы при C-8. Относительная конфигурация была установлена на основании NOESY корреляций. Соединение названо паллидопениллином H.

Соединения **5**, **9**, **11–13** были протестированы на цитотоксическую активность в отношении трех линий опухолевых клеток рака простаты человека 22Rv1, PC-3 и LNCaP. Паллидопениллин G (**14**) обнаружил активность в отношении 22Rv1 клеточных линий с ИК₅₀ 9,8 мкМ. Изучено действие паллидопениллинов на формирование и рост клеточной колонии 22Rv1 методом мягкого агара. Показано, что паллидопениллин G и 1-ацетилпаллидопениллин A ингибируют рост колонии этих клеток на 40 % в концентрациях 1 и 2 мкМ соответственно. Таким образом, его можно рассматривать в качестве перспективного канцер-превентивного агента.

15-деацетилпаллидопениллин B (**8**), паллидопениллин E (**12**) и паллидопениллин G (**14**) при концентрации 10 мкМ индуцируют достоверное снижение образования активной формы кислорода в макрофагах (АФК), стимулированных ЛПС. Уровень АФК уменьшился на 27 ± 1 (*p* < 0,01), 37 ± 3 (*p* < 0,01) и 36 ± 2 % (*p* < 0,01) соответственно по сравнению с контролем (клетками, обработанными ЛПС). Эти данные указывают на потенциальные иммуномодулирующие свойства изученных веществ.

Из липофильного экстракта штамма *P. thomii* КММ 4674, изолированного из микобиоты ризома морской травы *Z. marina*, были выделены 12 новых поликетидных метаболитов декалинового ряда – зостеропениллинов A–L (**16–27**) (рис. 4) [2].

Молекулярная формула соединения **16** установлена как C₁₅H₂₂O₃ на основании данных HRESIMS [M+Na]⁺ (*m/z* 273.1461) и подтверждена данными ¹³C ЯМР-спектра. COSY и HMBC спектры соединения **16** показали присутствие декалинового фрагмента в структуре молекулы, положение двойной связи при C-11, C-12 и метильных групп при C-8 и C-13. HMBC взаимодействия H-1a (δ_H 4.11)/C-2 (δ_C 39.9), C-3 (δ_C 210.2) и C-13; H-2a (δ_H 2.64)/C-1 (δ_C 60.9), C-3; H-2b (δ_H 2.21)/C-3, C-4 свидетельствуют о наличии γ-пиронового фрагмента в соединении **16**. Относительная конфигурация соединения была установлена на основании анализа NOESY спектра подтверждена рентгеноструктурным анализом кристалла, полученного из смеси ацетонитрил–вода.

Абсолютная конфигурация **16** с помощью модифицированного метода Мошера определена как 4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*R*, 10*R*, 13*S* (рис. 5). Соединение **16** было названо зостеропениллином A.

Молекулярная формула соединения **17** установлена как C₁₅H₂₂O₃ на основании данных HRESIMS [M+Na]⁺ (*m/z* 273.1474) и подтверждена данными ¹³C ЯМР-спектра. Сигналы ¹³C ЯМР-спектра соединения оказались очень близки соответствующим сигналам зостеропениллина A, за исключением сигналов C-9–C-11 и C-15 углеродных атомов в кольце A. COSY и HMBC корреляции в спектрах **17** позволили установить структуру кольца A, положение гидроксильной группы при C-9 и гидроксиметильной группы при C-8. Данные NOESY спектра указывали на транс-сочленение колец A и B, дис-сочленение колец B и C, а также на β-ориентацию гидроксиметильной группы при C-8. Соединение **17** получило наименование зостеропениллин B.

Молекулярная формула соединения **18** определена как C₁₅H₂₂O₃ на основании данных HRESIMS [M+Na]⁺ (*m/z* 273.1461) и подтверждена данными ¹³C ЯМР-спектра. Сигналы углеродных атомов для соединения **18** оказались близки соответствующим сигналам зостеропениллина B, за исключением сигналов C-6–C-10 и C-15 атомов в кольце A. Детальный анализ ¹H, ¹³C ЯМР и HMBC спектров позволил установить структуру соединения **18**, включая гидроксильную и метильную группы при C-8. Относительная конфигурация

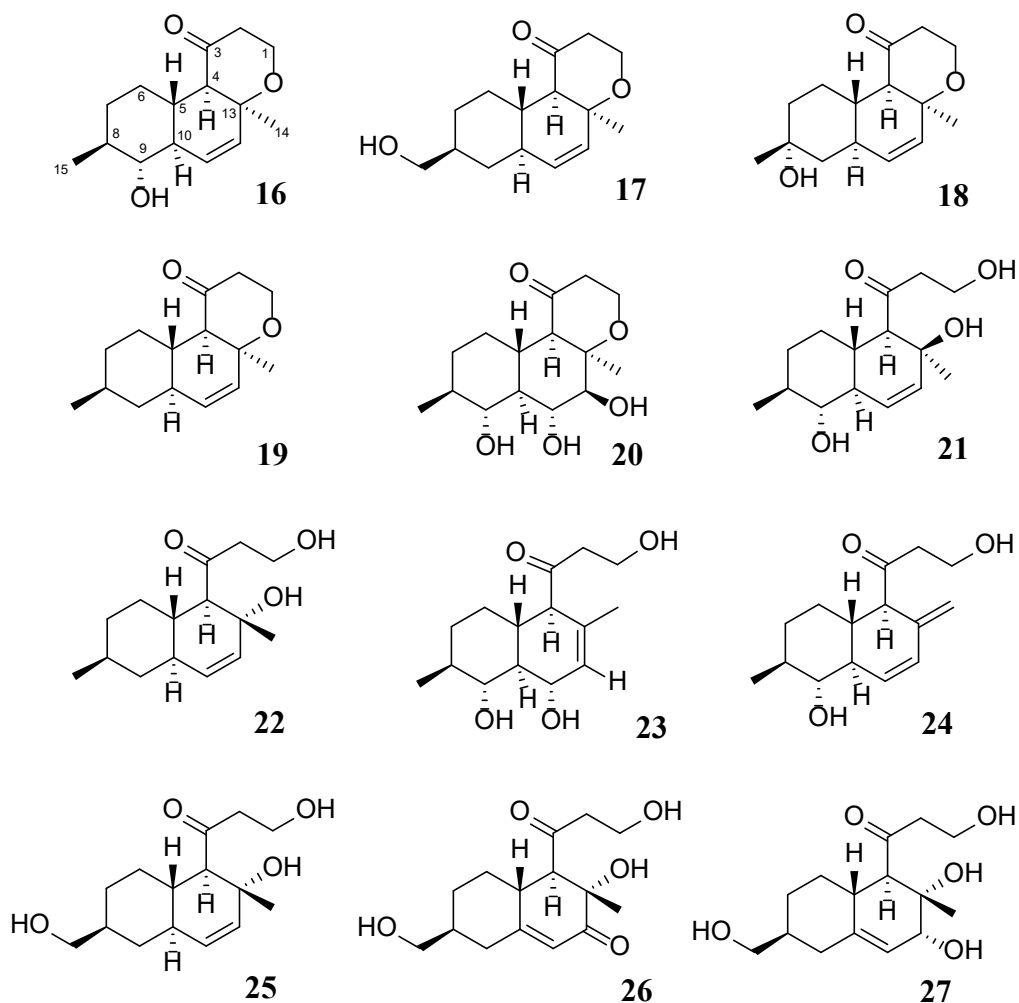


Рис. 4. Структуры зостеропениллинов А–L (16–27)

выявлена на основании NOESY взаимодействий. Соединение было названо зостеропениллином С.

Молекулярная формула соединения **19** установлена как $C_{15}H_{22}O_2$ на основании данных HRESIMS (m/z 257.1510 $[M+Na]^+$) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Сигналы водородных и углеродных атомов в спектрах **19** были близки соответствующим сигналам зостеропениллина В, за исключением сигналов С-7–С-9 и С-15. Взаимные HMBC корреляции $H_3-15/C-7$ и С-9 позволили установить структуру кольца А и положение метильной группы при С-8. Соединение **19** было названо зостеропениллином D.

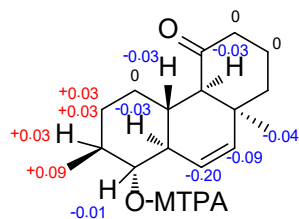


Рис. 5. $\Delta\delta$ ($\delta_s - \delta_r$) уровни химических сдвигов (в м.д.) для S (**16a**) и R-MTPA эфиров (**16b**)

Сравнение теоретических статистически усредненных КД-спектров соединений **16–19** с соответствующими экспериментальными спектрами показало, что все спектры качественно подобны в области $\lambda \geq 200$ нм, где наблюдались выраженные эффекты Коттона. Таким образом, абсолютные конфигурации были определены как 4*R*, 5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*R*, 13*S* для **16**; 4*R*, 5*S*, 8*S*, 10*R*, 13*S* – для **17**; 4*R*, 5*S*, 8*R*, 10*R*, 13*S* – для **18**; 4*R*, 5*S*, 8*S*, 10*R*, 13*S* – для **19**.

Молекулярная формула соединения **20** определена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании пика псевдомолекулярного иона с m/z 283.1538 $[M-H]^-$ в HRESIMS и подтверждена ^{13}C ЯМР анализом. По данным COSY спектров и наблюдаемым корреляциям в HMBC спектре установили присутствие декалиновой системы, насыщенного γ -пиронового фрагмента в соединении **20** и положение метильных групп при C-8 и C-13 и гидроксильных групп при C-9, C-11 и C-12. Относительная конфигурация соединения определена на основании данных NOESY спектра и анализа констант спин-спинового взаимодействия (KCCSB). Наблюдаемые NOESY корреляции и значение вицинальных констант спин-спинового взаимодействия между H-4 и H-5; H-5 и H-10; H-9 и H-10; H-10 и H-11; H-11 и H-12 указывают на транс-сочленение колец A и B, цис-сочленение колец B и C, α -ориентацию H_3 -14, 9-OH, 11-OH групп и β -ориентацию H_3 -15 и 12-OH групп. Соединение **20** названо зостеропениллином E.

Молекулярная формула **21** идентифицирована как $C_{15}H_{24}O_4$ на основании пика псевдомолекулярного иона с m/z 291.1579 $[M+Na]^+$ в HRESIMS и подтверждена ^{13}C ЯМР анализом. Сигналы углеродных атомов в спектре этого соединения близки соответствующим сигналам в спектрах зостеропениллина A, за исключением сигналов C-1–C-3, C-13 и C-14. Структура декалинового фрагмента и положение метильных групп при C-8 и C-13 и кислородных функций при C-9 и C-13 установлены с помощью COSY и HMBC корреляций также, как и для **16**. COSY и HMBC корреляции указывают на присутствие 3-гидрокси-1-оксопропильного остатка при C-4. Относительная конфигурация **21** определена в результате NOESY эксперимента и анализа KCCSB. Соединение **21** получило наименование зостеропениллин F.

Молекулярная формула соединения **22** установлена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании пика псевдомолекулярного иона с m/z 275.1621 $[M+Na]^+$ в HRESIMS и подтверждена ^{13}C ЯМР анализом. Сигналы углеродных атомов в спектре **22** оказались близки соответствующим сигналам в спектре зостеропениллина D (**19**), за исключением сигналов C-1–C-3 и C-13, C-14. Структура декалиновой части, положение метильных групп при C-8 и C-13, кислородной функции при C-13 и 3-гидрокси-1-оксопропильного остатка при C-4 были определены на основании HMBC и COSY корреляций. Относительная конфигурация соединения **22** выявлена на основании данных NOESY эксперимента. Соединение **22** было названо зостеропениллином G.

Молекулярная формула соединения **23** установлена как $C_{15}H_{22}O_4$ на основании HRESIMS (m/z 291.1571) $[M+Na]^+$ и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Структуры 1-, 2-, 3-, 4-замещенного циклогексанового кольца и боковой цепи в **23** определены, как и для зостеропениллинов E (**20**) и F (**21**). Данные HMBC позволили установить структуру кольца B, положение двойной связи при C-12, C-13 и гидроксильной группы при C-11. Относительная конфигурация **23** была предложена на основании NOESY и KCCSB. Соединение получило название зостеропениллин H.

Молекулярная формула соединения **24** идентифицирована как $C_{15}H_{22}O_3$ на основании данных HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 273.1462) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Структуры кольца A и боковой цепи были установлены как для зостеропениллинов E (**20**) и F (**21**). Наблюдаемые COSY и HMBC корреляции указывали на присутствие диеновой системы при C-11 и C-13(14) в соединении **24**. Относительная конфигурация соединения была предложена на основании NOESY взаимодействий H-4/H-10; H-8 (δ_H 1.43)/H-10 и H-5 (δ_H 1.68)/H-9, H_3 -15 (δ_H 1.05). Соединение названо зостеропениллином I.

Молекулярная формула соединения **25** определена как $C_{15}H_{22}O_3$ с помощью HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 291.1573) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Сигналы углеродных атомов в этом соединении практически совпадали с соответствующими сигналами в спектре соединения **22**, за исключением сигналов C-7–C-9 и C-15 атомов. Эти данные и разница в 16 массовых единиц между молекулярными массами соединений **22** и **25** свидетельствуют о присутствии гидроксиметильной группы при C-8 в **22** вместо метильной группы в соединении **25**. Наблюдаемые NOESY взаимодействия указывали на трансочленение

колец А и В, β -ориентацию боковой цепи, метильной группы при С-14 и гидроксиметильной группы при С-8. Соединение названо зостеропениллином J.

Молекулярная формула соединения **26** установлена как $C_{15}H_{22}O_5Na$ методом HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 305.1370) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. В УФ-спектре данного соединения наблюдалась полоса поглощения при 242 нм, соответствующая еноновой хромофорной системе. Данные COSY и HMBC спектров позволили установить структуру колец А и В и указывали на 10-ен-12-он положение енонового хромофора в соединении **26**. Структура боковой цепи была установлена на основании ЯМР-спектроскопии, как для зостеропениллина F (**21**). Относительная конфигурация **26** была предложена на основании анализа данных NOESY спектра и КССВ. Соединение **26** получило название зостеропениллин К.

Молекулярная формула соединения **27** определена как $C_{15}H_{24}O_5$ на основании пика при m/z 307.1501 $[M+Na]^+$ в HRESIMS и ^{13}C NMR анализа. Структура кольца А в **27** была установлена также, как и для зостеропениллина К (**26**). Данные HMBC спектра соединения **27** позволили установить структуру кольца В, положение кислородных функций при С-12, С-13 и метильной группы при С-13. Относительная конфигурация соединения **27** выявлена на основании наблюдаемых NOESY корреляций H-5/H₃-14; H₃-14/H-12; H-4/H-6b; H-6b/H-8 и значения КССВ для H-4 (δ_H 3.09, $J = 10,0$ Hz). Соединение **27** было названо зостеропениллином L.

Было показано, что соединения **17**, **23** и **25** индуцировали в липополисахарид-индуцированных мышинных макрофагах RAW 264.7 снижение выработки оксида азота на 27, 21 и 22 % соответственно в нецитотоксической концентрации 10 мкМ. Мы исследовали эффект зостеропениллинов **16–18**, **22**, **23**, **25** и **26** на экспрессию белка p62, связанного с аутофагией. Анализ показал незначительное увеличение уровня p62 в клетках PC3, инкубированных с исследуемыми веществами. Эффект на экспрессию белка был схож с действием бафиломицина A1 (Baf), хорошо известного ингибитора аутофагии. Эти результаты показывают, что зостеропениллины способны ингибировать аутофагию в нецитотоксических концентрациях и могут повышать чувствительность клеток рака простаты человека для антиопухолевых препаратов.

В рамках продолжающегося поиска структурно новых биологически активных метаболитов из морских грибов, ассоциированных с морскими водорослями, мы исследовали гриб *Penicillium* sp. KMM 4672, выделенный из вьетнамской бурой водоросли *Padina* sp. в 38-м рейсе НИС «Академик Опарин». Химические исследования привели к получению и идентификации трех новых 1,2-оксазадекалиновых эпидитиодикетипиперазинов претриходермамидов D–F (**28–30**) совместно с известными претриходермидом С (**31**) и N-метилпретриходермамидом В (**32**) (рис. 6) [17].

Брутто-формула соединения **28** была определена как $C_{21}H_{24}N_2O_9S_2$ на основании псевдомолекулярного пика HRESIMS при m/z 511.0857 $[M-H]^-$, что соответствует данным ^{13}C ЯМР.

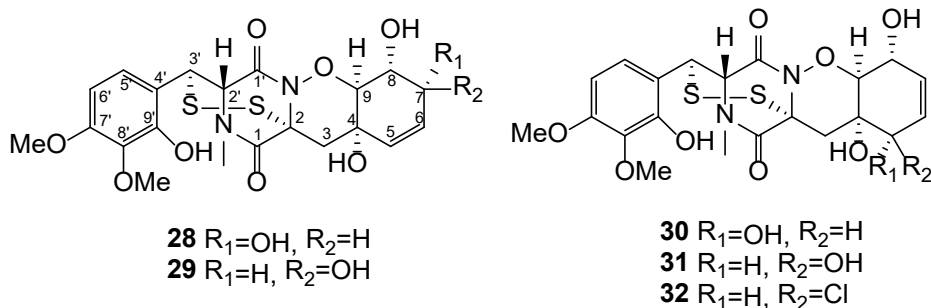


Рис. 6. Структуры соединений, выделенных из гриба *Penicillium* sp. KMM 4672

Прямое сравнение спектров ^1H и ^{13}C ЯМР соединения **28** со спектрами претриходермамида **С (31)** [10] показало их сходство, включая сигналы двух метоксильных (δ_{H} 3.68, 3.78; δ_{C} 55.7, 60.2), одной *N*-метильной (δ_{H} 2.96; δ_{C} 32.6), одной фенольной гидроксильной (δ_{H} 9.43) групп, двух ароматических метинов (δ_{H} 6.55, 7.32; δ_{C} 103.3, 122.6) и двух амидных карбонильных групп (δ_{C} 164.2, 165.4), что говорит о близости углеродных скелетов соединений **28** и **31**.

Корреляции, наблюдаемые в НМВС спектре, позволили установить наличие в структуре молекулы циклогексенового кольца с двойной связью между С-5 и С-6. Положение вторичных гидроксильных групп при С-7 и С-8 было доказано НМВС взаимодействиями от 7-ОН (δ_{H} 4.89) к С-7 и от 8-ОН (δ_{H} 4.35) к С-8. Таким образом была установлена плоская структура соединения **28**.

Этерификация гидроксильных групп при С-7 и С-9' в соединении **28** (*R*)- и (*S*)-МТРА хлорангидридами привела к получению (*S*)- и (*R*)-ди-МТРА-эфиров соответственно. Разница химических сдвигов $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$) указывает на 7*R* конфигурацию (рис. 7).

Абсолютные конфигурации остальных стереоцентров в циклогексеновом кольце были определены как 4*S*, 8*R*, 9*S*. Абсолютные конфигурации установлены на основании ROESY корреляций 7-ОН с Н-9 и Н-9 с 4-ОН и 8-ОН, а также значений КССВ $^3\text{J}_{\text{H8-H9}}$ (9,4 Гц) и $^3\text{J}_{\text{H7-H8}}$ (4,6 Гц), которые соответствуют расчетным диэдральным углам (177° и 46° соответственно). Абсолютные конфигурации при С-2, С-2' и С-3' были предложены такими же, как в известных адаметизине А (*N*-метилпретриходермамиде В) и адаметизине В (претриходермамиде С), на основании сходства химических сдвигов С-2, С-2' и С-3' для этих биогенетически родственных соединений. Соединение **28** было названо претриходермамидом D.

Брутто-формула соединения **29** определена как $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$ (идентично соединению **28**) на основании пика HRESIMS при m/z 511.0869 $[\text{M}-\text{H}]^-$ и ^{13}C ЯМР анализа. Основные сигналы спектров ^1H и ^{13}C ЯМР соединения **29** соответствовали таковым в соединении **28**, за исключением протонных и углеродных сигналов С-7 и С-8. Корреляции, наблюдаемые в НМВС спектре, подтверждают, что «плоская» структура соединения **29** идентична «плоской» структуре претриходермамида D (**28**). Вицинальные КССВ $\text{J}_{\text{H7-H8}}$ (7,7 Гц) и $\text{J}_{\text{H8-H9}}$ (10,7 Гц) в соответствии с уравнением Карплуса (расчетные диэдральные углы 168° и 174° соответственно) указывают на аксиальное положение Н-7, Н-8 (δ_{H} 3.56) и Н-9. Эти относительные конфигурации были дополнительно подтверждены ROESY корреляциями Н-7 с 8-ОН (δ_{H} 4.64) и Н-9. Абсолютные конфигурации хиральных центров соединения **29** были предложены такими же, как в претриходермамиде D (**28**) в соответствии с биогенетическими соображениями. Таким образом, соединение **29** было определено как эписмерпретриходермамида D по С-7 и названо претриходермамидом E.

Брутто-формула соединения **30** установлена как $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$ (идентично соединениям **28** и **29**) на основании данных HRESIMS и ^{13}C ЯМР. Данные ЯМР для этого соединения были очень близки к таковым для претриходермамида С (**31**), за исключением протонных и углеродных сигналов при С-3–С-6 и С-9. НМВС взаимодействия в спектре **30** подтверждают «плоскую» структуру циклогексенового кольца с двойной связью между С-6 и С-7. Взаимные ROESY корреляции Н-9 с 4-ОН (δ_{H} 4.96), 5-ОН (δ_{H} 5.19) и 8-ОН (δ_{H} 5.15) указывают на α -ориентацию 5-ОН и позволяют определить соединение **30** как С-5-эписмер претриходермамида С (**31**). Относительные конфигурации 1,2-оксазадекалинового фрагмента были дополнительно подтверждены константой взаимодействия W-типа между Н-9 (δ_{H} 3.97, дд, 7.3, 1.5) и Н-3 β (δ_{H} 2.06, дд, 15.4, 1.5). Абсолютные конфигурации

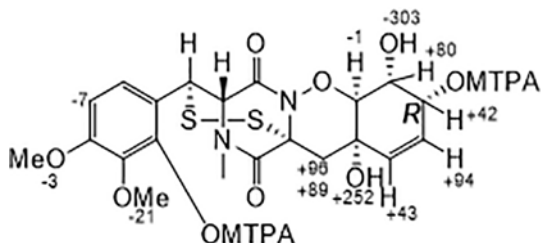


Рис. 7. Значения $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$) (в Гц) в МТРА-эфирах соединения **28**

в соединении **30** были предложены на основании биогенетического родства с соединениями **28**, **29**, **31** и **32**. Соединение **30** названо претриходермамидом F.

Кроме новых претриходермамидов D–F (**28–30**) из гриба *Penicillium* sp. КММ 4672 выделены также известные претриходермамид С (**31**) и *N*-метилпретриходермамид В (**32**).

Было исследовано действие соединений **28–32** на выживаемость и индукцию апоптоза в клетках рака простаты человека. В недавно опубликованной работе *N*-метилпретриходермамид В в концентрации до 10 мкМ не показал какого-либо цитотоксического действия в отношении ряда различных раковых клеток. МТТ метод выявил, что и *N*-метилпретриходермамид В (**32**) является высокоцитотоксичным для клеток 22Rv1, РС-3 и LNCaP с ИК₅₀ 0,51, 5,11 и 1,76 мкМ соответственно, при этом соответствующие значения ИК₅₀ для доцетакселя (вещество сравнения) составляли 0,013, 0,015 и 0,004 мкМ. Стоит отметить, что соединение **32** индуцировало апоптоз в клетках простаты человека линии 22Rv1 (31,3 ± 8,2 % апоптоза после инкубирования с соединением в концентрации 1 мкМ в течение 48 ч), которые являются высокоустойчивыми к терапии, направленной на андрогеновый рецептор из-за потери лигандсвязывающего домена в этом рецепторе. Соединения **28–31** не проявили цитотоксической активности в отношении использованных клеток в концентрации до 100 мкМ. Также ни одно из исследованных соединений не оказало значительного эффекта на прогрессию клеточного цикла в той же концентрации. Стоит отметить, что *N*-метилпретриходермамид В (**32**), показывающий ингибирующую концентрацию (ИК₅₀) в наномолярном диапазоне концентраций, был наиболее активен в отношении именно таких клеток, которые устойчивы к гормональной терапии. Кроме того, было исследовано действие соединений **28–32** на клетки мышинной карциномы Эрлиха и нетрансформированные клетки мышей (спленоциты и эритроциты). *N*-метилпретриходермамид В не показал гемолитической активности в концентрации до 100 мкМ и был цитотоксичным для спленоцитов только в высоких концентрациях (ED₅₀ 62,1 мкМ).

Таким образом, из четырех морских изолятов грибов рода *Penicillium*, живущих на морских растениях, выделено несколько структурных серий новых вторичных метаболитов, включая декалиновые сесквитерпеноиды томимарины, соединения поликетидного происхождения – паллидопениллины, структурно близкие к ним зостеропениллины и 1,2-оксазадекалиновые эпидитиодикетипиперазины претриходермамиды D–F. Была изучена биологическая активность полученных метаболитов и показаны перспективные цитотоксические свойства по отношению к опухолевым клеткам, а для некоторых из них – иммуномодулирующие и канцер-превентивные свойства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Afyatullof S.S., Leshchenko E.V., Sobolevskaya M.P., Denisenko V.A., Kirichuk N.N., Khudyakova Y.V., Hoai T.P.T., Dmitrenko P.S. Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., Berdyshev D.V. New eudesmane sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // Phytochem. Lett. 2015. Vol. 14. P. 209–214.
2. Afyatullof S.S., Leshchenko E.V., Berdyshev D.V., Sobolevskaya M.P., Antonov A.S., Denisenko V.A., Popov R.S., Pivkin M.V., Udovenko A.A., Pisyagin E.A., Von Amsberg G., Dyshlovoy S.A. Zosteropenillines: Polyketides from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // Mar. Drugs. 2017. Vol. 15, N 2. P. 5020046.
3. Bhatnagar I., Se-Kwon Kim. Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies // Mar. Drugs. 2010. Vol. 8, N 10. P. 2702–2720.
4. Cueto M., Jensen P.R., Kauffman C., Fenical W., Lobkovsky E., Clardy J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge // J. Nat. Prod. 2001. Vol. 64. P. 1444–1446.
5. Debbab A., Aly A.H., Lin W.H., Proksch P. Bioactive compounds from marine Bacteria and Fungi // Microbial Biotechnology. 2010. Vol. 3, N 5. P. 544–563.
6. Folmer F., Jaspars M., Diederich M. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds // Phytochem. Rev. 2010. Vol. 9. P. 557–579.
7. Isaka M., Suyarnsestakorn C., Tanticharoen M., Kongsaeer P., Thebtaranonth Y. Aigialomycins A–E, new resorcylic macrolides from the marine mangrove fungus *Aigialus parvus* // J. Org. Chem. 2002. Vol. 67. P. 1561–1566.
8. Itokawa H., Morita H., Watanabe K., Mihashi S., Iitaka Y. Agarofuran-type, eudesmane-type and eremophilane-type sesquiterpenoids from *Alpinia-Japonica* (Thunb.) // Chem. Pharm. Bull. 1985. Vol. 33 (3). P. 1148–1153.

9. Mathan S., Subramanian V., Nagamony S., Ganapathy K. Isolation of endophytic fungi from marine algae and its bioactivity // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2013. Vol. 4, N 1. P. 45–49.
10. Orfali R.S., Aly A.H., Ebrahim W., Abdel-Aziz M.S., Müller W.E.G., Lin W., Daletos G., Proksch P. Pretrichoderamide C and N-methylpretrichoderamide B, two new cytotoxic epidithiodiketopiperazines from hyper saline lake derived *Penicillium* sp. // *Phytochem. Lett.* 2015. Vol. 11. P. 168–172.
11. Osterhage C., Kaminsky R., König G.M., Wright A.D. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae* // *J. Org. Chem.* 2000. Vol. 65. P. 6412–6417.
12. Osterhage C., König G.M., Holler U., Wright A.D. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea* // *J. Nat. Prod.* 2002. Vol. 65. P. 306–313.
13. Rateb M.E., Ebel R. Secondary metabolites of fungi from marine habitants // *Nat. Prod. Rep.* 2011. Vol. 28. P. 290–344.
14. Sobolevskaya M.P., Leshchenko E.V., Hoai T.P.T., Denisenko V.A., Dyshlovoy S.A., Kirichuk N.N., Khudyakova Y.V., Kim N.Y., Berdyshev D.V., Pisyagin E.A., Kuzmich A.S., Popov R.S., Antonov A.S., Afiyatullof S.S. Pallidopenillines: polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675 // *J. Nat. Prod.* 2016. Vol. 79. P. 3031–3038.
15. Sun R.R., Miao F.P., Zhang J., Wang G., Yin X.L., Ji N.Y. Three new xanthone derivatives from an algicolous isolate of *Aspergillus wentii* // *Magn. Reson. Chem.* 2012. Vol. 51. P. 65–68.
16. Yang G., Sandjo L., Yun K., Leutou A.S., Kim G.D., Choi H.D., Kang J.S., Hong J., Son B.W. Flavusides A and B, antibacterial cerebrosides from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus* // *Chem. Pharm. Bull.* 2011. Vol. 59. P. 1174–1177.
17. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Ivanets E.V., Kalinovsky A.I., Khudyakova Y.V., Kirichuk N.N., Popov R.S., Bokemeyer C., Amsberg G., Chingizova E.A., Afiyatullof S.S., Dyshlovoy S.A. Pretrichoderamides D–F from a marine algicolous fungus *Penicillium* sp. KMM 4672 // *Mar. Drugs.* 2016. Vol. 14, N 7. P. 122.
18. Zhuravleva O.I., Sobolevskaya M.P., Leshchenko E.V., Kirichuk N.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Dyshlovoy S.A., Zakharenko A.M., Kim N.Yu., Afiyatullof Sh.Sh. Meroterpenoids from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* Maire and *Penicillium lividum* Westling // *J. Nat. Prod.* 2014. Vol. 77. P. 1390–1395.
19. Zhuravleva O.I., Sobolevskaya M.P., Afiyatullof Sh.Sh., Kirichuk N.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Dyshlovoy S.A. Sargassopenillines A–G, 6,6-spiroketal from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* and *Penicillium lividum* // *Mar. Drugs.* 2014. Vol. 12, N 12. P. 5930–5943.
20. Zhuravleva O.I., Afiyatullof Sh.Sh., Denisenko V.A., Ermakova S.P., Slinkina N.N., Dmitrenok P.S., Kim N.Yu. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* Blochwitz // *Phytochemistry.* 2012. Vol. 80. P. 123–131.