

На правах рукописи

Васильева Елена Андреевна

**Спинохромы морских ежей тихоокеанского региона:
распространение и биологическая активность**

02.00.10 - Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Владивосток – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук
Мищенко Наталья Петровна

**Официальные
оппоненты:**

Имбс Андрей Борисович
доктор биологических наук, Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, главный научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии

Слабко Олег Юрьевич
кандидат химических наук, доцент,
Дальневосточный федеральный университет, доцент кафедры органической химии

Ведущая организация:

Тихоокеанский океанологический институт
им. В.И. Ильичева ДВО РАН, г. Владивосток

Защита состоится « » 2019 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.005.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423) 231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН).

Текст диссертации и автореферата размещен на сайте www.piboc.dvo.ru

Автореферат разослан

« »

2019 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Черников О. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Морские гидробионты и, в частности, морские ежи являются источником уникальных по химическому строению и биологической активности природных соединений, которые могут стать основой для создания различных биоматериалов, эффективных лекарственных препаратов, а также продуктов функционального питания. Многие виды морских ежей являются промысловыми, потому что их гонады употребляются в пищу во многих странах Азии, Средиземноморья и Северной Америки. После извлечения гонад остается большое количество панцирей, богатых биоактивными хиноидными пигментами, которые выбрасываются в виде отходов. Поэтому исследование состава и содержания хиноидных пигментов в панцирях морских ежей и установление их биологической активности является актуальной задачей.

В основе метаболических процессов в организме лежат окислительно-восстановительные реакции, в ходе которых образуются различные свободные радикалы и перекисные соединения, выполняющие роль медиаторов важных внутриклеточных сигнальных путей. Чрезмерная активация свободнорадикальных процессов на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов и дефицита эндогенных антиоксидантов способствует развитию свободнорадикальных патологий, таких как атеросклероз, ишемические болезни сердца, артериальная гипертензия и др. Поэтому одной из актуальных проблем современной биоорганической химии является исследование возможностей регуляции окислительно-восстановительных процессов в организме. Один из путей ее решения – применение экзогенных природных антиоксидантов, способных оказывать благоприятное воздействие на организм в условиях окислительного стресса. Примером может служить разработанный сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН антиоксидантный лекарственный препарат Гистохром®, созданный на основе одного из наиболее распространенных хиноидных пигментов морских ежей – эхинохрома А. Препарат успешно применяется в кардиологии при инфаркте миокарда и ишемических заболеваниях сердца и в офтальмологии для лечения внутриглазных кровоизлияний, диабетической ретинопатии, тромбоза центральной вены сетчатки и др. В последнем десятилетии появляется всё больше сведений о физиологических свойствах эхинохрома А, которые нельзя объяснить только его хорошо исследованной способностью взаимодействовать с активными свободными радикалами. Установлено, что эхинохром А обладает противовоспалительной, антидиабетической, гастропротекторной активностями, регулирует экспрессию апоптотического белка р53 и активирует биогенез митохондрий. В связи с таким разнообразием оказываемых эхинохромом А эффектов представляет интерес изучение биологической активности ряда родственных ему соединений – спинохромов морских ежей, являющихся уникальными вторичными метаболитами этого класса иглокожих. Эти соединения представляют собой производные 1,4-нафтохинона, содержащие, как правило, гидроксильные, этильные или ацетильные заместители. Спинохромы также могут существовать в виде димеров – бинафтохинонов. В основном все исследования биологической активности спинохромов проводились с использованием экстрактов морских ежей, поэтому исследования активности индивидуальных соединений позволят определить, какие функциональные группы вносят наибольший вклад в проявляемый эффект, и получить новые знания о молекулярных механизмах действия природных антиоксидантов. Кроме того, эхинохром А и родственные ему соединения легко подвергаются окислительной деструкции. Продукты окисления эхинохрома А могут определять эффективность препарата «Гистохром», его токсичность и другие свойства. В связи с этим, представляет интерес исследование состава основных продуктов деструкции эхинохрома А, а также их биологической активности.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение состава, содержания и биологической активности хиноидных соединений панцирей и целомической жидкости морских ежей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методы определения состава и количественного содержания хиноидных пигментов в морских ежах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) и спектрофотометрии.
2. Исследовать состав и содержание хиноидных пигментов в морских ежах тихоокеанского региона.
3. Выделить новые хиноидные пигменты и установить их строение.
4. Определить продукты окислительной деструкции эхинохрома А.
5. Изучить восстанавливающую, антиоксидантную, цитотоксическую активность хиноидных пигментов морских ежей на различных моделях.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Разработан метод ВЭЖХ-МС для количественной оценки состава хиноидных пигментов в экстрактах морских ежей.
2. Исследованы состав и содержание хиноидных пигментов в панцирях 21 вида морских ежей тихоокеанского региона.
3. Состав пигментов целомической жидкости коррелирует с основными пигментами панцирей морских ежей.
4. Из морских ежей *Strongylocentrotus pallidus* и *Mesocentrotus nudus* впервые выделен спинамин Е, его структура установлена как 2-амино-3,5,6,7,8-пентагидрокси-1,4-нафтохинон. Из морского ежа *Scaphechinus mirabilis* впервые выделен несимметричный бинафтохинон мирабихинон, его структура установлена как 7,5'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксиафтазарин).
5. Выделены и структурно охарактеризованы 5 основных продуктов окислительной деструкции эхинохрома А в водной среде.
6. Спирохромы с аминогруппой во втором положении 1,4-нафтохиноидной молекулы проявляют более высокую антиоксидантную активность *in vitro*, чем их гидроксильированные аналоги.
7. 7,7'-Ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксиафтазарин) и спирохромы D и Е на модели доксорубин-индуцированной кардиотоксичности в клетках кардиомиоцитов человека AC16 проявляют потенциальную кардиопротекторную активность.
8. На модели цисплатин-индуцированной нефротоксичности у мышей эхинамин В и спирохром Е проявляют антиоксидантные свойства, снижая экспрессию биомаркеров окислительного стресса и сохраняя нормальную ренальную архитектуру.

Научная новизна и практическая значимость работы.

1. Разработан метод ВЭЖХ-МС для качественного и полуколичественного определения хиноидных пигментов морских ежей. Дополнена библиотека ВЭЖХ-МС параметров природных и синтетических хиноидных пигментов. Модифицирован спектрофотометрический метод определения эхинохрома А для оценки суммарного содержания хиноидных пигментов в морских ежах.
2. Исследованы состав и содержание хиноидных пигментов в 21-ом виде морских ежей тихоокеанского региона. Хиноидные пигменты морских ежей видов *Astropyga radiata*, *Strongylocentrotus pallidus*, *S. polyacanthus*, *Phyllacanthus imperialis*, *Echinocardium cordatum*, *Maretia planulata*, *Brisaster latifrons*, *Evechinus chloroticus* изучены впервые. Наибольшее содержание хиноидных пигментов обнаружено в морских ежах *Astropyga radiata*, *Scaphechinus mirabilis*, *Diadema savignyi*, *D. setosum*. Установлено, что состав и

содержание пигментов некоторых видов морских ежей зависит от места и глубины их сбора.

3. Впервые исследован состав пигментов целомической жидкости морских ежей 11-ти видов: *Strongylocentrotus intermedius*, *S. pallidus*, *S. droebachiensis*, *S. polyacanthus*, *Mesocentrotus nudus*, *Echinocardium cordatum*, *Scaphechinus mirabilis*, *Echinarachnius parma*, *Astropyga radiata*, *Diadema setosum*, *Echinothrix calamaris*. Установлено, что в целомической жидкости помимо эхинохрома А содержатся все основные спинохромы. Показано, что состав пигментов целомической жидкости коррелирует с составом основных пигментов панцирей морских ежей.
4. Из морских ежей *Strongylocentrotus pallidus* и *Mesocentrotus nudus* впервые выделено аминокислотное производное спинохрома Е – спинамин Е, его структура установлена как 2-амино-3,5,6,7,8-пентагидрокси-1,4-нафтохинон. Из морского ежа *S. mirabilis* впервые выделен несимметричный бинафтохинон мирабихинон, его структура установлена как 7,5'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксиафтазарин).
5. В морских ежах *S. droebachiensis* и *S. polyacanthus* впервые обнаружены моно- и диметилловые эфиры спинохрома Е, ранее встречавшиеся только в голотуриях и морских звездах. В *S. droebachiensis* впервые идентифицированы 2-О- и 3-О-мометилловые эфиры эхинохрома А, ранее обнаруженные только в морских ежах рода *Diadema*. Впервые выполнено отнесение сигналов атомов углерода и протонов для моно-, ди- и триметилловых эфиров эхинохрома А с использованием двумерной ЯМР-спектроскопии.
6. Методами ЯМР-спектроскопии уточнены структуры двух природных бинафтохинонов морских ежей как этилиден-3,3'-бис(2,6,7-тригидроксиафтазарин) и 7,7'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксиафтазарин).
7. Выделены 5 основных продуктов окисления эхинохрома А, их структуры установлены как 2,2,3,3,5,6,8-гептагидрокси-7-этил-2,3-дигидро-1,4-нафтохинон, 3,5,6-тригидрокси-2-оксало-4-этилбензойная кислота, 3,5,6-тригидрокси-2-формил-4-этилбензойная кислота, 2,3,5-тригидрокси-4-этилбензойная кислота и 2,5-дигидрокси-3-этилбензохинон.
8. Изучены восстанавливающая способность хиноидных пигментов на моделях взаимодействия со свободным радикалом ДФПГ и восстановления ионов железа (II) и антиоксидантная активность на модели ингибирования автоокисления линетол. Наиболее высокую восстанавливающую и антиоксидантную активности проявляют эхинамин В, спинамин Е, эхинохром А, спинохром Е. Спинохромы, имеющие аминокислотную группу во втором положении, проявляют более высокие антиоксидантные свойства *in vitro*, чем их гидроксильные аналоги.
9. Изучено влияние хиноидных пигментов на окисление и термоагрегацию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Спинохром С и эхинохром А наиболее эффективно сохраняют активность ГАФД в условиях окисления пероксидом водорода. Спинохром Е полностью предотвращает термоагрегацию ГАФД.
10. Определена цитотоксическая активность спинохромов по отношению к эмбрионам морского ежа *M. nudus* и к опухолевым клеткам человека линий НТ 29, Т-47D, MCF-7. Эхинохром А, эхинамины А и В показали умеренную токсичность по отношению к эмбрионам морского ежа. Все исследованные соединения проявляют слабую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам человека.
11. Установлено, что 7,7'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксиафтазарин) и спинохромы D и E на модели доксорубин-индуцированной кардиотоксичности в клетках кардиомиоцитов человека AC16 дозозависимо снижают продукцию АФК до

1.5 раз и сохраняют выживаемость клеток AC16 в присутствии доксорубина на уровне контроля, проявляя потенциальную кардиопротекторную активность.

12. Установлено, что на модели цисплатин-индуцированной нефротоксичности у мышей эхинохром А при внутривнутреннем введении не влияет на экспрессию p53, глутатион-S-трансферазы (GST) и каспазы 12 (Cas12), достоверно снижая экспрессию лишь супероксиддисмутазы (SOD1). Эхинамин В и спинохром Е нормализуют экспрессию p53, GST, Cas12, супероксиддисмутазы (SOD1) и NADPH-оксидазы 4 (RENOS) и сохраняют нормальную архитектуру тканей почек мышей.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены автором в виде устных сообщений на таких всероссийских и международных научных мероприятиях как «6-й международный симпозиум «Химия и химическое образование» (Владивосток, Россия, 2014); «XV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии» (Владивосток, Россия, 2014); «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине» (Владивосток, Россия, 2014); «Korea-Russia seminar on science and technology» (Хабаровск, Россия, 2015), «Future of biomedicine conference» (Владивосток, Россия, 2015); «Korea-Russian joint symposium «KORUS 2016» (Владивосток, 2016); «10th European Conference on Marine Natural Products» (Коливари, Греция, 2017); «The 22nd International Congress Phytopharm 2018» (Хорген, Швейцария, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей в журналах, реферируемых в "Web of Science" и рекомендованных ВАК РФ, 10 тезисов докладов в материалах научных конференций и один патент.

Личный вклад соискателя в проведение исследования. Соискателем был выполнен анализ литературных данных по теме исследования, планирование экспериментов, получена основная часть результатов, написаны статьи и подготовлены доклады на конференциях. На защиту вынесены только те положения и результаты, в получении которых роль автора была определяющей.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного хиноидным пигментам морских ежей, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 178 источников. Работа изложена на 148 страницах, содержит 21 таблицу и 26 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность своему научному руководителю к.х.н. Мищенко Наталье Петровне и заведующему ЛХПХС д.х.н. Федореву Сергею Александровичу. Автор благодарит главного научного сотрудника лаборатории эмбриологии Национального научного центра морской биологии ДВО РАН д.б.н. Дроздова Анатолия Леонидовича за определение видовой принадлежности морских ежей. Автор выражает благодарность сотрудникам отдела биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ за проведение экспериментов с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой. Автор благодарен сотруднику лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ Кузьмичу Александре Сергеевну за определение цитотоксичности хиноидных пигментов морских ежей по отношению к опухолевым клеткам человека, а также сотрудникам лаборатории биоинженерии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН Махазену Дмитрию Сергеевичу, к.х.н. Горпенченко Татьяне Юрьевне, к.х.н. Шкрылю Юрию Николаевичу за помощь в исследовании нефропротективного действия хиноидных пигментов морских ежей. За помощь при проведении исследований кардиопротекторной активности спинохромов автор благодарит сотрудников Центра сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний Чанг Шин Юна,

Хьонг Кью Кима и Джин Хана. Автор выражает признательность вед.н.с. лаборатории органического синтеза природных соединений ТИБОХ д.х.н. Новикову Вячеславу Леонидовичу за обсуждение структур продуктов окисления эхинохрома А. За съёмку ЯМР-спектров автор благодарит вед.н.с. группы ЯМР-спектроскопии ТИБОХ к.х.н. Денисенко Владимира Анатольевича. За съёмку масс-спектров высокого разрешения автор благодарен ведущему инженеру лаборатории клеточной биологии и биологии развития ФНЦ Биоразнообразия к.х.н. Григорчук Валерии Петровне. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории химии природных хиноидных соединений ТИБОХ за поддержку и участие.

Используемые обозначения и сокращения: ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия; $\tau_{\text{уд}}$ – время удерживания; ESI-MS – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением; HR-ESI-MS – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением; М – молекулярная масса; m/z – отношение массы иона к его заряду; ^1H и ^{13}C ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса на протонах и ядрах углерода; КССВ – константа спин-спинового взаимодействия; с – синглет; д – дублет; дд – дублет дублетов; к – квартет; м – мультиплет; т – триплет; м.д. – миллионная доля; уш.с – уширенный сигнал; НМВС – Heteronuclear Multiple Bond Connectivity – эксперимент гетероядерной корреляции через несколько связей; АОО – антиоксидантная активность; АРА – антирадикальная активность; АСК – аскорбиновая кислота; АФК – активные формы кислорода; БГТ – бутилгидрокситолуол; ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ДФПГ – дифенилпикрилгидразильный радикал; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; α -Ток – α -токоферол; ЦП – цисплатин; ЦЖ – целомическая жидкость; ЭАК – эквивалент аскорбиновой кислоты; DCF-DA – 2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетат; Dox – доксорубин; EC₅₀ – 50%-ная эффективная концентрация; FRAP – Ferric Reducing Ability of Plasma, модель определения железозоостванавливающей активности; IC₅₀ – 50%-ная ингибирующая концентрация.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Хиоидные пигменты панцирей морских ежей тихоокеанского региона

Для идентификации хиоидных пигментов и оценки их содержания в экстрактах морских ежей разработан и валидирован метод ВЭЖХ-МС с использованием прибора Shimadzu LCMS-2020, снабженного фотодиодной матрицей и масс-спектрометрическим детектором. ВЭЖХ-МС характеристики всех соединений, обнаруженных в ходе данной работы, приведены в таблице 1, для соединений 7–10, 15–29 они получены впервые.

С целью поиска новых хиоидных соединений и источников, богатых эхинохромом А, методом ВЭЖХ-МС нами были исследованы состав и количественное соотношение хиоидных пигментов панцирей 21 вида морских ежей из 11 семейств, собранных в различных климатических зонах Тихого океана – boreальной (Берингово море), умеренной (Охотское и Японское моря) и тропической (Южно-Китайское и Тасманово моря) (табл. 2). Состав хиоидных пигментов панцирей 8 видов морских ежей – *Astropyga radiata*, *Brisaster latifrons*, *Evechinus chloroticus*, *Maretia planulata*, *Scaphechinus griseus*, *Strongylocentrotus pallidus*, *Strongylocentrotus polyacanthus* и *Phyllacanthus imperialis* – был исследован впервые.

Таблица 1 – ВЭЖХ-МС параметры хиноидных пигментов морских ежей и их производных

	Т _{уд} , мин	m/z [M-H] ⁻	λ _{макс} , нм	Формула	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Название соединения
1	10.62	265	254, 338, 471	C ₁₂ H ₁₀ O ₇	OH	OH	OH	C ₂ H ₅	OH	Эхинохром А
2	10.64	263	266, 312, 508	C ₁₂ H ₈ O ₇	OH	COCH ₃	H	OH	OH	Спинохром А
3	7.45	221	265, 320, 390, 471	C ₁₀ H ₆ O ₆	OH	OH	H	OH	H	Спинохром В
4	9.77	279	290, 456	C ₁₂ H ₈ O ₈	OH	COCH ₃	OH	OH	OH	Спинохром С
5	7.09	237	251, 327, 463	C ₁₀ H ₆ O ₇	OH	OH	OH	H	OH	Спинохром D
6	5.56	253	264, 350, 478	C ₁₀ H ₆ O ₈	OH	OH	OH	OH	OH	Спинохром Е
7	8.40	221	270, 315, 515, 559	C ₁₀ H ₆ O ₆	OH	H	H	OH	OH	Момпаин
8	10.40	247	219, 268, 299	C ₁₂ H ₈ O ₆	COCH ₃	OH	H	H	OH	2-Ацетил-3-гидроксинафтазарин
9	11.56	279	252, 330, 491, 525	C ₁₃ H ₁₂ O ₇	OCH ₃	OH	OH	C ₂ H ₅	OH	3,5,6,8-Тетрагидрокси-2-метокси-7-этил-1,4-нафтохинон
10	11.73	279	256, 332, 474, 497, 538	C ₁₃ H ₁₂ O ₇	OH	OCH ₃	OH	C ₂ H ₅	OH	2,5,6,8-Тетрагидрокси-3-метокси-7-этил-1,4-нафтохинон
11	10.42	501	254, 339, 471	C ₂₂ H ₁₄ O ₁₄	-	-	-	-	-	Этилиден-3,3'-бис(2,6,7-тригидрокси-нафтазарин)
12	9.83	483	265, 316, 470	C ₂₂ H ₁₂ O ₁₃	-	-	-	-	-	7,7'-Ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксинафтазарин)
13	11.35	264	278, 352, 477	C ₁₂ H ₁₁ NO ₆	OH	NH ₂	OH	C ₂ H ₅	OH	Эхинамин А
14	11.66	264	274, 352, 477	C ₁₂ H ₁₁ NO ₆	NH ₂	OH	OH	C ₂ H ₅	OH	Эхинамин В
15	8.86	483	264, 325, 452	C ₂₂ H ₁₂ O ₁₃	-	-	-	-	-	Мирабихинон
16	14.02	553	274, 470	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₃	-	-	-	-	-	5,8,13-Тригидрокси-2,3,6,10,11-пентаметокси-7-метил-1 <i>H</i> -дibenzo[<i>b,h</i>]ксантен-1,4,9,12(7 <i>H</i>)-тетраон
17	11.06	483	260, 335, 495, 542	-	-	-	-	-	-	Не идентифицировано
18	6.67	252	275, 370, 473	C ₁₀ H ₇ NO ₇	NH ₂	OH	OH	OH	OH	Спинамин Е
19	11.64	295	221, 265, 344, 482	C ₁₃ H ₁₃ NO ₇	NH ₂	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	Аминодигидрокситриметоксинафтохинон
20	8.95	281	262, 332, 488, 529	C ₁₂ H ₁₀ O ₈	-	-	-	-	-	Тетрагидроксидиметоксинафтохинон
21	7.51	267	262, 340, 480, 524	C ₁₁ H ₈ O ₈	OCH ₃	OH	OH	OH	OH	Намакохром
22	12.79	293	236, 325, 493, 532	C ₁₄ H ₁₄ O ₇	C ₂ H ₅	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	3,5,8-Тригидрокси-6,7-диметокси-2-этил-1,4-нафтохинон
23	13.81	307	237, 319, 471, 497, 536	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	C ₂ H ₅	OH	5,8-Дигидрокси-2,3,6-триметокси-7-этил-1,4-нафтохинон
24	8.49	262	272, 319, 511	C ₁₂ H ₉ NO ₆	-	-	-	-	-	Аминоацетилтригидроксинафтохинон
25	7.53	299	256, 321, 391	C ₁₂ H ₁₂ O ₉	-	-	-	-	-	2,2,3,3,5,6,8-Гептагидрокси-7-этил-2,3-дигидро-1,4-нафтохинон
26	10.14	499	264, 304, 408, 469, 532	-	-	-	-	-	-	Не идентифицировано
27	8.11	535	260, 333, 394, 473	-	-	-	-	-	-	Не идентифицировано
28	10.46	765	217, 273, 344, 473	-	-	-	-	-	-	Не идентифицировано

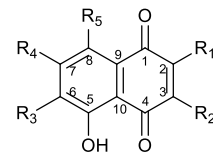


Таблица 2 – Содержание спинохромов в панцирях морских ежей

Семейство Вид	Содержание основных спинохромов, % от суммы пигментов						Другие пигменты, %	Содержание хиноидных пигментов, мкг/г панцирей
	1	2	3	4	5	6		
ПРАВИЛЬНЫЕ МОРСКИЕ ЕЖИ								
Отряд Camarodonta								
Echinometridae <i>Evechinus chloroticus</i>	20.8±1.5	7.3±1.1	32.6±2.4	0.9±0.3		28.9±1.5	13 (0.6±0.1), 14 (0.6±0.1), 18 (6.4±0.2)	-
Strongylocentrotidae <i>Mesocentrotus nudus</i>	18.0±3.7	8.5±2.2	1.1±0.3	3.5±2.2	3.1±0.6	54.2±13.1	17 (8.4±7.5), 18 (3.2±2.8)	89.9±13.3
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> Охотское море; о. Уруп	41.7±7.4				15.3±3.9	1.1±0.2	9 (0.5±0.1), 10 (0.3±0.1), 12 (34.1±6.9), 15 (3.2±1.8), 21 (4.2±1.7)	331.2±5.1
Охотское море; о. Онекотан	44.1±6.6				12.7±5.2	4.2±0.7	9 (0.5±0.1), 10 (0.3±0.1), 12 (28.3±5.6), 15 (2.6±1.9), 21 (3.8±0.8)	226.5±9.6
Охотское море; о. Симушир	2.7±0.9		5.1±1.2		9.8±3.3	3.3±0.5	11 (2.7±0.2), 12 (60.5±13.2), 15 (8.1±2.7), 17 (2.0±0.6)	88.4±2.3
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>		1.3±0.3		9.8±1.5	18.7±0.7	10.1±2.8	11 (7.5±2.6), 12 (39.9±7.7), 15 (5.9±0.6), 17 (6.8±5.2)	175.7±11.3
<i>Strongylocentrotus pallidus</i> Охотское море; о. Матуа						86.3±7.1	18 (13.7±3.2)	31.7±0.1
Охотское море; о. Чирпой						84.7±3.4	18 (15.3±2.8)	28.9±0.3
<i>Strongylocentrotus polyacanthus</i> Охотское море; о. Уруп	35.8±6.9	9.6±3.1			3.1±0.5	38.3±4.8	18 (5.3±1.1)	11.9±0.7
Охотское море; о. Онекотан	8.3±2.7	26.8±6.5	5.1±2.2	3.1±0.4		38.6±9.7	18 (13.9±4.1), 20 (7.5±0.8)	13.2±0.3
Toxopneustidae <i>Toxopneustes pileolus</i>	79.5±5.3		3.7±0.2	4.8±1.7	6.4±2.1		12 (5.6±2.2)	90.2±7.3
<i>Tripneustes gratilla</i>		26.1±4.3				67.2±11.8	7 (2.0±1.8), 18 (4.7±2.1)	93.3±6.8
Отряд Cidaroida								
Cidaridae <i>Phyllacanthus imperialis</i>		76.7±5.7		23.1±3.8			24 (0.2±0.2)	87.3±5.5
Отряд Diadematoidea								
Diademataidae <i>Astropyga radiata</i>	84.5±4.2				5.5±1.6	6.0±0.8	11 (2.3±1.1), 12 (1.7±0.4)	1628.5±77.9

<i>Diadema savignyi</i>	83.2±6.9				1.8±0.7	4.5±2.2	9 (1.4±0.1), 10 (1.6±0.2), 12 (3.0±2.5), 25 (3.3±0.3), 26 (1.0±0.9)	1129.9±63.8
<i>Diadema setosum</i>	92.1±4.2					3.8±2.2	9 (4.1±0.3)	1267.1±88.1
<i>Echinothrix calamaris</i>	52.3±9.6				8.2±1.2	15.9±3.7	8 (8.2±3.3), 12 (15.4±4.9)	138.8±7.3
<i>Echinothrix diadema</i>	39.9±11.3				9.7±2.9	7.4±1.5	12 (36.9±8.8), 25 (1.7±1.5), 26 (1.4±0.3), 28 (3.0±1.4)	116.6±5.9
Отряд Stomopneustoida								
Stomopneustidae <i>Stomopneustes variolaris</i>	81.4±9.1					17.3±6.8	25 (1.3±0.8)	66.7±5.1
НЕПРАВИЛЬНЫЕ МОРСКИЕ ЕЖИ								
ПЛОСКИЕ МОРСКИЕ ЕЖИ								
Отряд Clypeasteroida								
Echinarachniidae <i>Echinarachnius parma</i> Охотское море	23.3±3.9				14.7±5.2	3.1±1.1	11 (2.0±0.4), 12 (47.5±9.8), 13 (1.2±0.3), 14 (1.9±0.2), 15 (8.8±3.5)	31.6±0.6
Японское море	24.8±5.2				13.3±1.9	5.3±1.7	11 (2.3±0.4), 12 (51.7±10.0), 15 (8.0±2.3), 17 (4.1±0.6)	116.6±7.4
Scutellidae <i>Scaphechinus mirabilis</i>	89.1±8.7				1.8±0.9		11 (1.8±0.4), 12 (2.3±1.1), 13 (1.1±0.1), 14 (1.9±0.1), 15 (2.0±0.2)	1525.9±93.4
<i>Scaphechinus griseus</i>	28.6±12.1				18.3±6.2	4.3±0.4	11 (3.3±0.3), 12 (45.5±13.4)	87.3±5.5
СЕРДЦЕВИДНЫЕ МОРСКИЕ ЕЖИ								
Отряд Spatangoida								
Loveniidae <i>Echinocardium cordatum</i>	88.1±6.7				3.7±0.2	8.2±1.9		37.8±6.8
Maretiidae <i>Marettia planulata</i>	94.3±5.4					5.7±0.9		42.6±3.7
Schizasteridae <i>Brisaster latifrons</i>	75.4±5.5				2.9±0.1	19.6±3.1	12 (2.1±0.4)	35.5±0.8

1.1 Выделение и установление структуры бинафтохинонов *Scaphechinus mirabilis*

При помощи обратнoфазной гeль-хроматографии на Toyopearl HW-50F была разделена этилацетатная фракция экстракта плоских морских ежей *Scaphechinus mirabilis*, в результате были выделены бинафтохиноны **11**, **12** и **15** с $t_{уд}$ 8.86, 9.83 и 10.42 мин соответственно. На основании анализа данных НМВC-спектров структура соединения **11** была определена как этилиден-3,3'-бис(2,6,7-тригидроксинафтазарин), соединения **12** – как 7,7'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксинафтазарин) (рис. 1). Полное отнесение сигналов 1H и ^{13}C в спектрах ЯМР для этих бинафтохинонов было выполнено впервые.

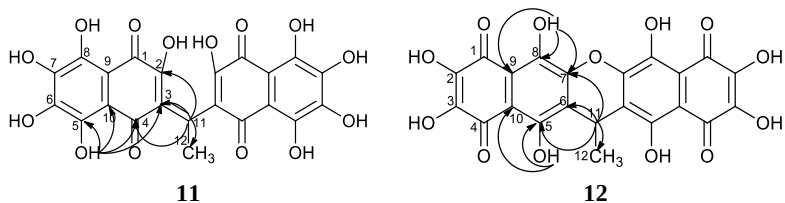


Рисунок 1 – НМВC корреляции в спектрах бинафтохинонов **11** и **12**

Соединение **15** имеет M 484, такую же, как и у соединения **12**, что соответствует молекулярной формуле $C_{22}H_{12}O_{13}$. В 1H ЯМР-спектре этого соединения присутствуют сигналы протонов трех α -ОН групп (δ_H 12.92, 12.69 и 13.06 м.д.), пяти β -ОН групп (δ_H 11.19 (1H), 10.45 (3H), 9.71 (1H) м.д.) и этилиденового мостика (δ_H 1.37 и 4.42 м.д., $J=6.8$ Гц). В ^{13}C ЯМР-спектре соединения **15** насчитывается 22 сигнала углеродных атомов, в то время как у его изомера **12**, имеющего симметричную структуру – только 12. Четыре сигнала соответствуют карбонильным углеродным атомам (δ_C 177.2, 181.3, 182.1, 186.0 м.д.), 10 сигналов принадлежат углеродным атомам, связанным с кислородом (δ_C 137.4–155.8 м.д.), 4 сигнала принадлежат узловым углеродным атомам (δ_C 104.9, 106.2, 108.6, 110.9 м.д.), 2 сигнала соответствуют углеродным атомам, связанным с этилиденовым фрагментом (δ_C 118.8 и 121.6 м.д.), и 2 – углеродным атомам этилиденового мостика (δ_C 21.2, 23.2 м.д.). На основании данных НМВC-спектров было установлено, что соединение **15** является ангидропроизводным соединения **11** по положениям 7 и 5' (рис. 2), и согласно принятой для спинохромов полутривиальной номенклатуре оно было названо 7,5'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксинафтазарин) или мирабихинон (**15**). Структура мирабихинона была также подтверждена данными масс-спектра высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии продукта его метилирования **16**.

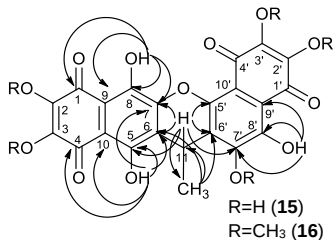


Рисунок 2 – НМВC-корреляции в спектрах мирабихинона (**15**) и его пентаметилового эфира **16**

Таким образом, нами впервые был выделен несимметричный бинафтохинон 2,3,5,6,8,10,11,13-октагидрокси-7-метил-1*H*-добензо[*b,h*]ксантен-1,4,9,12(7*H*)-тетраон (15), который является первым примером природных соединений, имеющих подобный скелет.

1.2 Установление структуры спинамина Е

В морском еже *Mesocentrotus nudus* был обнаружен неизвестный пигмент **18**, выделенный колоночной хроматографией этилацетатного экстракта на сорбентах Тоуорепарл HW-40 и YMC-Pack ODS-A C18. В масс-спектре высокого разрешения соединения **18** присутствует пик $[M-H]^-$ с m/z 252.0154, соответствующий брутто-формуле $C_{10}H_7NO_7$ (рассчитанное значение 252.0150 для $[C_{10}H_6NO_7]^-$). Положение аминогруппы в молекуле **18** установлено на основании данных НМВС-спектров (рис. 3) и сравнительного анализа ^{13}C ЯМР-спектров соединения **18** и эхинаминов А и В. Было выполнено отнесение сигналов в 1H и ^{13}C ЯМР-спектрах соединения **18**, и его структура была установлена как 2-амино-3,5,6,7,8-пентагидрокси-1,4-нафтохинон. По аналогии с эхинаминами А и В соединение **18** было названо спинамином Е.

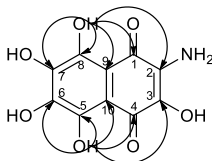


Рисунок 3 – НМВС-корреляции в спектре спинамина Е (**18**)

В *Strongylocentrotus polyacanthus*, собранном около о. Онекотан, был обнаружен неизвестный пигмент **20** с m/z $[M-H]^-$ 281. Исходя из величины M и абсорбционного спектра неизвестного пигмента **20** (табл. 1) предположено, что он может быть диметилowym эфиром спинохрома Е. ВЭЖХ-МС характеристики одного из продуктов метилирования спинохрома Е диазометаном точно совпали с данными неизвестного пигмента. Ранее два диметилowych эфира спинохрома Е были выделены из морской звезды *Acanthaster planci*, однако в морских ежах эти соединения обнаружены впервые.

Хлороформные фракции экстрактов двух образцов *S. droebachiensis*, собранных около островов Онекотан и Уруп, содержат хиноидный пигмент **21** с m/z $[M-H]^-$ 267 (табл. 1). Этот пигмент был идентифицирован как монометилowym эфир спинохрома Е, так как его ВЭЖХ-МС параметры совпали с таковыми одного из продуктов метилирования спинохрома Е диазометаном. Ранее монометилowym эфир спинохрома Е был выделен из голотурии *Polycheira rufescens* и получил название намакохром, но в морских ежах это соединение обнаружено нами впервые. Среди минорных компонентов хлороформных фракций *S. droebachiensis* были обнаружены два монометилowych эфира эхинохрома А **9** и **10**, что подтверждено сравнением их ВЭЖХ-МС параметров с характеристиками соединений, полученных метилированием эхинохрома А диазометаном, и синтезированного 2,5,6,8-тетрагидрокси-3-метокси-7-этил-1,4-нафтохинона (**10**). Для продуктов метилирования эхинохрома А **9**, **10**, **22**, **23** нами впервые выполнено отнесение сигналов в спектрах ЯМР. Ранее монометилowych эфиры эхинохрома А были обнаружены только в тропических морских ежах рода *Diadema*.

В экстракте *Phyllacanthus imperialis* обнаружены следовые количества соединения **24** (табл. 1 и 2), ВЭЖХ-МС параметры которого совпали с данными, опубликованными для аминоацетилтригидросинафтохинона, обнаруженного ранее в морских ежах *S. nudus*.

В экстрактах *D. savignyi* и *E. diadema* обнаружено соединение **26** с типичным нафтазариновым абсорбционным спектром и M 500 – возможно, спинохромовый димер

(табл. 1 и 2). В *E. diadema* также присутствует хиноидный пигмент **28** с М 766. В морских ежах *M. nudus*, *S. droebachiensis*, *S. intermedius*, *E. parma* обнаружен неизвестный пигмент **17** с такой же М, как у бинафтохинонов **12** и **15**, но его абсорбционный спектр отличается наличием дополнительной полосы поглощения при 542 нм (табл. 1 и 2). Из-за малого количества доступного нам сырья и низкого содержания пигментов **17**, **26** и **28** в экстрактах выделить их не удалось.

Из проведенного нами сравнительного исследования состава хиноидных пигментов 21-го вида морских ежей разных отрядов видно, что он сильно варьируется. Даже у представителей одного рода пигментный состав может сильно различаться, как, например, в случае морских ежей рода *Strongylocentrotus* (табл. 2). Тем не менее, можно проследить и определенные закономерности. Из таблицы 2 видно, что все плоские морские ежи (отряд Clupeasteroidea) содержат эхинохром А (**1**) и бинафтохиноны **11**, **12** и **15**. Сердцевидные морские ежи (отряд Spatangoida) имеют практически идентичный состав хиноидных пигментов – эхинохром А в качестве основного пигмента и небольшие количества спинохромов D (**5**) и E (**6**). Многие тропические виды морских ежей (отряды Diadematoida, Stomopneustoida) характеризуются высоким содержанием эхинохрома А.

Интересно, что составы хиноидных пигментов морских ежей, определенные нами, отличаются от описанных в литературе. Например, ранее Андерсон с соавторами описал для *D. setosum*, *E. calamaris* и *E. diadema* присутствие спинохрома А, однако нами в этих видах ежей он обнаружен не был. Из десяти минорных соединений, описанных для *E. calamaris* и *E. diadema*, мы идентифицировали только пигмент **8**. Для *E. parma*, *E. cordatum* и *S. variolaris* ранее был описан только эхинохром А, нами помимо эхинохрома А был обнаружен целый ряд пигментов. Вероятно, это можно объяснить двумя причинами. Во-первых, применение таких современных методов, как хроматомасс-спектрометрия и масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет точно идентифицировать хиноидные соединения в многокомпонентных экстрактах. Во-вторых, известно, что состав вторичных метаболитов морских организмов может сильно отличаться в зависимости от географического расположения, экологической обстановки, сезона, пола и других факторов. Например, образцы *E. parma*, собранные в Японском и Охотском морях, имели разный набор минорных пигментов. *S. droebachiensis* из Берингова и Баренцева морей и изученные нами *S. droebachiensis*, собранные в Охотском море, биосинтезировали различные наборы пигментов. Даже *S. droebachiensis*, собранные в Охотском море с разных глубин, имели разные состав и содержание хиноидных пигментов.

1.3 Содержание хиноидных пигментов в панцирях морских ежей

В настоящей работе общее количественное содержание хиноидных пигментов в морских ежах определялось спектрофотометрически и было выражено как эквивалент эхинохрома А (мкг/г сухих панцирей) (табл. 2). Из 21-го изученного нами вида морских ежей тихоокеанского региона наиболее перспективными источниками хиноидных пигментов помимо *S. mirabilis*, уже используемого для получения субстанции для препарата гистохром, являются морские ежи *A. radiata*, *D. savignyi*, *D. setosum* и *S. droebachiensis*.

2. Хиноидные пигменты целомической жидкости морских ежей

Во многих работах, посвященных изучению функций ЦЖ морских ежей, авторы указывали, что одна из популяций целомоцитов – красные сферулоциты – содержит эхинохром А (**1**), однако химических исследований состава пигментных гранул не проводили.

Нами впервые проведено исследование состава хиноидных пигментов ЦЖ 11-ти видов следующих морских ежей: *S. intermedius*, *S. pallidus*, *S. droebachiensis*, *S. polyacanthus*, *M. nudus*, *E. cordatum*, *S. mirabilis*, *Echinarachnius parma*, *A. radiata*, *D. setosum*, *E. calamaris*.

По данным ВЭЖХ-МС анализа основным пигментом ЦЖ морских ежей *S. mirabilis*, *E. parma*, *E. cordatum*, *A. radiata*, *D. setosum* и *E. calamaris* является эхинохром А (1), а также присутствует продукт его окисления дегидроэхинохром (25). В *D. setosum* и *E. calamaris* помимо соединений 1 и 25 присутствует спинохром Е (6). В ЦЖ *S. intermedius* в основном содержится бинафтохинон 11, а также присутствуют спинохромы Е (6) и D (5), пигмент 17 и два неидентифицированных пигмента 27 и 28 с m/z [M–H][–] 535 и 765 соответственно (табл. 1). Состав хиноидных пигментов ЦЖ *S. droebachiensis* был близок к таковому *S. intermedius*, однако в ЦЖ *S. droebachiensis* содержится больше спинохрома Е (6), присутствует эхинохром А (1) и не обнаружено пигментов 17 и 28.

Таким образом, нами установлено, что состав хиноидных пигментов ЦЖ морских ежей разных видов может отличаться и не ограничивается, как ранее считалось, эхинохромом А, а также коррелирует с набором пигментов, присутствующих в панцире соответствующего вида морских ежей.

3. Продукты окислительной деструкции эхинохрома А

ВЭЖХ-МС анализ водных растворов эхинохрома А показал, что первым продуктом его окисления является соединение 25 (табл. 1). В абсорбционном спектре соединения 25 отсутствует полоса поглощения при 468 нм, характерная для эхинохрома А, что указывает на изменения в структуре хиноидного кольца эхинохрома А. В масс-спектре высокого разрешения соединения 25 наблюдается пик с m/z [M–H][–] 299.0399 (вычисленное значение для [C₁₂H₁₁O₉][–] 299.0409). Таким образом, М соединения 25 на 34 единицы больше М эхинохрома А, следовательно, это соединение содержит в молекуле две дополнительные ОН-группы. Как и в молекуле эхинохрома А, в соединении 25 присутствует этильный заместитель (δ_n 1.16 и 2.78 м.д. при δ_c 12.7 и 17.0 м.д. соответственно). Сигнал при δ_c 127.0 м.д. в ¹³C ЯМР-спектре принадлежит углеродному атому ароматического кольца, к которому присоединен этильный заместитель. Синглетный сигнал при δ_n 9.50 м.д. соответствует протону β-ОН группы бензоидного кольца при углеродном атоме δ_c 152.8 м.д. В молекуле присутствуют две хелатированные α-ОН группы (δ_n 11.28 при δ_c 145.4 и δ_n 11.88 при δ_c 157.6 м.д.). Полученные данные свидетельствуют о том, что бензоидное кольцо и его заместители в молекуле эхинохрома А не затрагиваются в ходе окислительных процессов.

В ¹³C ЯМР-спектре соединения 25 присутствуют сигналы алифатических углеродных атомов при δ_c 94.6 и 94.7 м.д., которым в ¹H ЯМР-спектре соответствуют сигналы при δ_n 5.91 и 5.96 м.д. интегральной интенсивностью 2H каждый, принадлежащие протонам геминальных ОН-групп при C-2 и C-3. Сигналы при δ_c 105.4 и 111.4 м.д. соответствуют узловым углеродным атомам между двумя циклическими фрагментами. Следует отметить, что сигналы карбонильных углеродных атомов соединения 25 находятся при δ_c 197.0 и 198.9 м.д, что характерно для сигналов карбонильных углеродных атомов в арил-алкильной системе. В ИК-спектре наличие полосы ν_{CO} при 1700 см^{–1} подтверждает, что карбонильные группы находятся в дигидрохиноидной системе.

Таким образом, на основании полученных данных было показано, что при недеструктивном окислении эхинохрома А трансформация происходит только в хиноидном кольце с образованием соединения 25 – 2,2,3,3,5,6,8-гептагидрокси-7-этил-2,3-дигидро-1,4-нафтохинона.

В водных растворах эхинохром А легко гидролизуется и окисляется значительно быстрее, чем в органических растворителях, поэтому для изучения продуктов

деструктивного окисления эхинохрома А было проведено окисление его натриевой соли в воде (400 мг/л) на свету с доступом воздуха. Спустя 20 ч от начала реакции примерно 50% эхинохрома А окислилось, непрореагировавший эхинохром А удалили из водного раствора экстракцией хлороформом, а продукты окисления извлекли этилацетатом. Хроматографированием этилацетатного извлечения на Toyopearl HW-40 были выделены 4 продукта окисления эхинохрома А со временами удерживания 5.76 (29), 7.27 (30), 8.37 (31) и 8.56 (32) мин (табл. 3). В абсорбционных спектрах соединений 29-32 присутствуют полосы поглощения, обусловленные $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в бензоидном ядре в области 310–370 нм, но отсутствуют полосы поглощения, связанные с $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в хиноидном ядре в области 460–540 нм, что свидетельствует о разрыве хиноидного кольца (табл. 3).

Соединение 29 оказалось нестабильным в условиях повторного хроматографического разделения, поэтому для установления его структуры при метилировании диазометаном было получено его устойчивое производное. В масс-спектре продукта метилирования присутствует пик $[M-H]^-$ с m/z 297, что соответствует диметиловому эфиру соединения 29.

Таблица 3 – ВЭЖХ-МС параметры продуктов окисления эхинохрома А 29-32

Соединение	$\tau_{уд}$, мин	Формула	Измерено m/z $[M-H]^-$	Вычислено m/z $[M-H]^-$	$\lambda_{\text{макс}}$, нм
29	5.76	$C_{11}H_{10}O_8$	269.0304	269.0297	222, 337
30	7.27	$C_{10}H_{10}O_6$	225.0405	225.0399	270, 320
31	8.37	$C_9H_{10}O_5$	197.0452	197.0450	228, 251, 274, 333
32	8.56	$C_8H_8O_4$	167.0343	167.0344	287

Исходя из данных 1H и ^{13}C ЯМР-спектров диметилового эфира соединения 29 и соединений 30, 31 можно заключить, что дальнейшее окисление бис-гем-диола 25 не затрагивает бензоидный фрагмент, а проходит с разрушением дигидрохиноидного кольца (табл. 4). Соединения 29–31 содержат этильный заместитель при С-6, свободную ОН-группу при С-5, хелатированные ОН-группы при С-1 и С-4 (у соединений 29–30 и только при С-4 – у соединения 31) и карбоксильную группу при С-3. На основании анализа спектров ЯМР структуры основных продуктов окисления эхинохрома А были установлены как 3,5,6-тригидрокси-2-оксало-4-этилбензойная кислота (29), 3,5,6-тригидрокси-2-формил-4-этилбензойная кислота (30), 2,3,5-тригидрокси-4-этилбензойная кислота (31) и 2,5-дигидрокси-3-этил-бензохинон (32). Ранее соединение 32 было описано Муром с соавторами как природный пигмент морских ежей рода *Echinothrix*.

Строение соединений 25, 29–31 было установлено впервые. Структуры идентифицированных и выделенных основных продуктов окисления эхинохрома А представлены на рисунке 4.

Структурное исследование и полученные ВЭЖХ-МС параметры основных продуктов окисления эхинохрома А представляют большой интерес с точки зрения изучения химических свойств спинохромов и для разработки методов контроля качества препаратов и пищевых добавок на основе спинохромов морских ежей, их стабильности, а также исследования продуктов трансформации эхинохрома А в организме и его фармакокинетики.

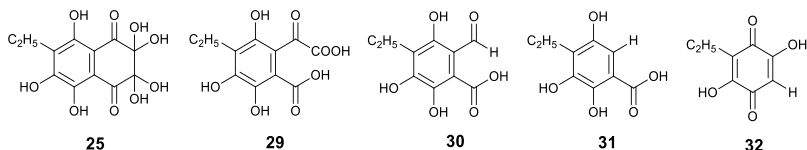
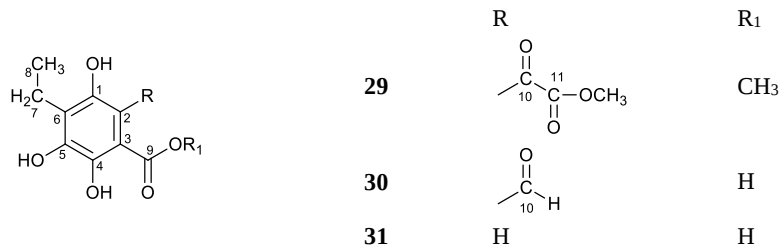


Рисунок 4 – Структуры основных продуктов окисления эхинохрома А в водной среде

Таблица 4 – Данные спектров ЯМР диметилового эфира соединения **29**, соединения **30** (500 МГц для ядер ^1H и 126 МГц для ядер ^{13}C , δ , м.д., J/Гц) и соединения **31** (700 МГц для ядер ^1H и 126 МГц для ядер ^{13}C , δ , м.д., J/Гц)



Атом*	29 (CDCl ₃)			30 (ацетон- <i>d</i> ₆)			31 (ацетон- <i>d</i> ₆)		
	δ_{C}	δ_{H}	HMBC	δ_{C}	δ_{H}	HMBC	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
1	158.45	11.30 (1H, c, α -OH)	1, 2, 5, 6	159.2	13.36 (1H, c, OH)	1, 2, 6	148.2	7.54 (1H, c, OH)	
2	106.26			109.9			104.8	6.88 (1H, c, H)	1, 3, 5, 6, 9
3	107.73			108.8			109.4		
4	143.26	10.49 (1H, c, α -OH)	3, 4, 5	146.2	11.35 (1H, c, OH)	3, 4, 5	144.4	10.70 (1H, c, OH)	3, 4
5	150.68	6.53 (1H, c, β -OH)	1, 4, 5, 6	152.3	6.59 (1H, c, OH)	1, 4, 5, 6	144.5	8.01 (1H, c, OH)	
6	124.04			123.6			126.3		
7	16.23	2.76 (2H, к, $J=7.5$, CH ₂)	1, 5, 6, 8	16.7	2.73 (2H, к, $J=7.5$, CH ₂)	1, 5, 6, 8	17.7	2.73 (2H, к, $J=7.5$, CH ₂)	1, 5, 6, 8
8	12.56	1.16 (3H, т, $J=7.5$, CH ₃)	6, 7	12.7	1.12 (3H, т, $J=7.5$, CH ₃)	6, 7	13.2	1.12 (3H, т, $J=7.5$, CH ₃)	
9	169.12			171.8			172.7		
10	186.80			196.7	10.55 (1H, c, COH)	1, 2, 6			
11	162.93								
9-OCH ₃	53.01	3.88 (3H, c, OCH ₃)	3, 9						
11-OCH ₃	52.23	3.82 (3H, c, OCH ₃)	10, 11						

*Для удобства сопоставления значений химических сдвигов ядер ^1H и ^{13}C в спектрах метилового эфира соединения **29** и соединений **30**, **31** использована нумерация атомов углерода, отличающаяся от нумерации этих атомов в систематических названиях в соответствии с правилами ИЮПАК

4. Антиоксидантная активность хиноидных пигментов морских ежей

4.1 Восстанавливающая способность спинохромов

Восстанавливающую способность индивидуальных спинохромов определяли на моделях взаимодействия со свободным радикалом 1,1'-дифенил-2-пикрилгидразилом (ДФПГ) и восстановления ионов железа (II) (FRAP).

Наиболее активным соединением на модели взаимодействия с ДФПГ оказался эхинамин В (14) – в концентрации 16 мкМ он улавливал 89% радикалов, в то время как стандарт α -токоферол (α -Ток) – только 50% (табл. 5). Его изомер эхинохром А (13) проявил более низкую активность, сопоставимую с таковой эхинохрома А (1) (EC_{50} 8.9 и 8.1 мкМ соответственно). Спиномин Е (18) также проявил высокую восстанавливающую активность (EC_{50} 8.2 мкМ), значительно выше, чем спинохром Е (6) (EC_{50} 12.3 мкМ). Значение EC_{50} спинохрома С (4) (17.5 мкМ), было близким к таковому стандарта α -Ток, спинохромы А (2), В (3) и D (5) проявили умеренную восстанавливающую активность (EC_{50} 23–48 мкМ) в отношении свободного радикала ДФПГ.

Таблица 5 – Антирадикальная активность (АРА) спинохромов (16 мкМ) на модели взаимодействия с ДФПГ

Соединение	1	2	3	4	5
EC_{50} , мкМ	8.1 $\pm$ 0.3	37.4 $\pm$ 2.1	22.8 $\pm$ 1.1	17.5 $\pm$ 0.6	48.1 $\pm$ 2.8
АРА, %	78 $\pm$ 4	31 $\pm$ 3	37 $\pm$ 2	50 $\pm$ 1	25 $\pm$ 2
Соединение	6	13	14	18	α -Ток
EC_{50} , мкМ	12.3 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.3	8.2 $\pm$ 0.3	16.0 $\pm$ 0.4
АРА, %	62 $\pm$ 3	79 $\pm$ 5	89 $\pm$ 5	85 $\pm$ 6	51 $\pm$ 2

На основании результатов эксперимента по взаимодействию с ДФПГ можно заключить, что наличие аминогруппы в положении 2 хиноидного кольца полигидроксидно-1,4-нафтохинонов обуславливает их более высокую антирадикальную активность, чем наличие гидроксильной группы в том же положении. В то же время 1,4-нафтохиноны с аминогруппой в положении 3 проявляют такие же свойства, что и их гидроксильные аналоги.

Наиболее активными восстановителями ионов железа (II) на модели FRAP оказались спинохром Е (6) (9.5 ЭАК) и эхинохром А (1) (9 ЭАК). Спинохром D (5) (6.5 ЭАК), эхинамины А (13) и В (14) (6 ЭАК) и бинафтохинон 12 (5 ЭАК) показали высокую железовосстанавливающую активность. Спинохромы В (3) и С (4) проявили умеренную способность восстанавливать ионы железа (II) (ЭАК 2 и 3.6 соответственно), а спинохром А (2) был в данной модели неактивен (0.4 ЭАК). Таким образом, наибольшей железовосстанавливающей активностью обладают наиболее гидроксильные спинохромы.

4.2 Антиоксидантная активность спинохромов на модели автоокисления линетолла

Одним из методов оценки антиоксидантной активности исследуемых соединений была выбрана липопероксидная модель автоокисления линетолла – смеси этиловых эфиров олеиновой, линолевой и линоленовой кислот из льняного масла. Эхинохром А (1) и эхинамин А (13) проявили умеренную антиоксидантную активность; ее значения при всех исследованных концентрациях были в два раза ниже, чем у стандарта – известного синтетического антиоксиданта БГТ (рис. 5). Эхинамин В (14) показал самую высокую среди спинохромов ингибирующую активность, в концентрациях 0.2–0.4 мМ (АОА=8.1 и 20.4

соответственно) его эффект был аналогичным эффекту БГТ, а в концентрации 0.8 мМ даже превышал его (АОА=31.3). Спинохромы А (2), В (3), С (4), D (5) и Е (6) были практически неактивны в данной модели при всех концентрациях, так же, как и АСК. В то же время аминированный аналог спинохрома Е – спинамин Е (18) – в концентрации 0.2 мМ проявил такую же высокую активность (АОА=8.2), как и эхинамин В, но в концентрациях 0.4-0.8 мМ его эффект оставался почти постоянным (АОА=16.3 и 17.5 соответственно).

Результаты теста автоокисления линетола показывают, что спинохромы **1**, **14** и **18**, проявившие высокую восстанавливающую активность, обладают также высокой антиоксидантной активностью по отношению к липидным субстратам.

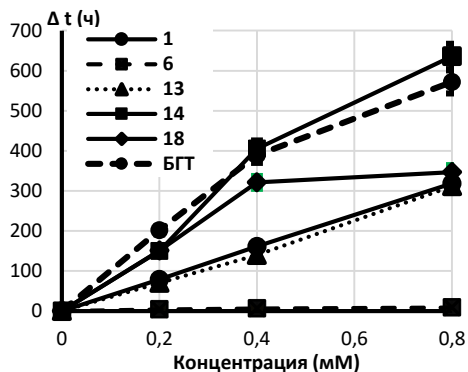


Рисунок 5 – Зависимость антиоксидантной активности спинохромов от концентрации на модели автоокисления линетола

4.3 Антиоксидантная активность спинохромов на модели окисления глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Изучены влияние хиноидных пигментов морских ежей на ферментативную активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) и их способность защищать фермент от окисления пероксидом водорода. В результате показано, что спинохромы В (3) и С (4) не влияют на активность ГАФД и сохраняют 16.9 и 42.6% активности ГАФД соответственно в присутствии пероксида водорода. Эхинохром А (1) незначительно ингибирует активность ГАФД и сохраняет 28% активности фермента при окислении. Эхинамин В (14) и спинохром Е (6) значительно ингибируют активность ГАФД (на 85–95%). Эхинохром А (1) и эхинамин В (14) не оказывают эффект на процесс термоагрегации ГАФД, спинохром С (4) предотвращает формирование агрегатов на 50%. Наиболее выраженное антиагрегатное действие проявил спинохром Е (6), полностью подавивший термическую агрегацию ГАФД.

5. Цитотоксическая активность спинохромов

Определена цитостатическая активность эхинохрома А (1), эхинаминов А (13) и В (14), спинохромов В (3) и Е (6) по отношению к эмбрионам морского ежа *Mesocentrotus nudus*. Установлено, что исследованные соединения практически не оказывают влияние на первое деление оплодотворенных яйцеклеток *M. nudus* (МИК > 100 мкг/мл). На стадии гастролы эхинохром А и эхинамины А и В проявили умеренную цитостатическую активность с МИК 10, 25 и 25 мкг/мл соответственно. Спинохромы В и Е не оказывали эффекта на процесс деления гаструл *M. nudus* (МИК > 100 мкг/мл).

Цитотоксическая активность хиноидных пигментов морских ежей по отношению к опухолевым клеткам человека HT-29 (колоректальная аденокарцинома), T-47D (карцинома молочной железы) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) была определена MTS-методом. Все исследованные соединения в диапазоне концентраций 3–100 мкМ проявили слабую цитотоксичность по отношению к указанным клеточным линиям, так как их цитотоксический эффект проявился лишь через 48 ч от начала эксперимента. Установлено, что хиноидные пигменты с аминогруппой более токсичны, чем их гидроксильированные аналоги (табл. 6).

Таблица 6 – Цитотоксичность спинохромов по отношению к опухолевым клеткам человека

Соединение (100 мкМ)	Количество живых клеток через 48 ч, % от контроля		
	HT-29	T-47D	MCF-7
1	66.6±3.5	93.0±3.0	97.0±1.8
3	58.4±4.2	87.6±1.7	60.0±2.1
5	88.0±0.9	84.8±2.7	92.8±0.5
6	85.2±2.0	95.7±2.3	97.0±1.9
12	87.4±2.5	90.6±1.7	79.7±2.0
13	51.8±4.3	62.9±2.5	95.0±2.9
14	54.7±1.8	44.8±1.9	40.7±2.0
18	65.2±1.4	35.4±1.9	44.5±1.5

6. Кардиопротекторная активность спинохромов *in vitro*

Так как одним из механизмов негативного воздействия противоопухолевого препарата доксорубидина на сердечную ткань является повышенная продукция свободных радикалов, происходящая одновременно различными путями, мы исследовали защитный эффект спинохромов при кардиотоксичности, индуцированной Dox, на кардиомиоцитах человека AC16. Эхинохром А (**1**) и его натриевую форму гистохром использовали в качестве положительного контроля.

В первую очередь было исследовано влияние спинохромов В (**3**), D (**5**), Е (**6**), эхинамина А (**13**), смеси эхинаминов А (**13**) и В (**14**) (1:1), триметилового эфира эхинохрома А (**23**) и бинафтохинона (**12**) на выживаемость клеток AC16. Кроме **23** все исследованные соединения не проявили цитотоксического эффекта по отношению к кардиомиоцитам AC16.

Было исследовано антиоксидантное действие спинохромов по отношению к клеткам AC16 в присутствии пероксида водорода – инициатора образования АФК. При добавлении пероксида водорода к клеткам AC16, предварительно обработанным 1 и 10 мкМ растворами спинохромов, наблюдалось дозозависимое уменьшение интенсивности флуоресценции DCF-DA по сравнению с клетками, обработанными только пероксидом водорода, что свидетельствует о снижении продукции внутриклеточных АФК. Наиболее эффективными антиоксидантами, снижающими продукцию АФК до 1.5 раз, оказались бинафтохинон **12**, эхинамины А (**13**) и В (**14**), спинохромы D (**5**) и Е (**6**) в концентрации 10 мкМ.

Бинафтохинон **12** и спинохромы D (**5**) и Е (**6**) сохраняли выживаемость клеток AC16 при воздействии доксорубидина на уровне контроля, тем самым проявляя потенциальную кардиопротекторную активность (рис. 6).

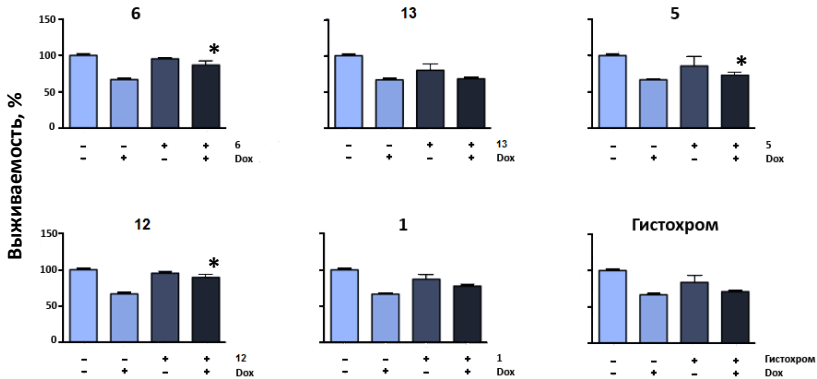


Рисунок 6 – Выживаемость кардиомиоцитов человека AC16 в присутствии спинохромов (10 мкМ) при окислительном стрессе, индуцированном Dox (0.1 мкМ). * $P < 0.05$ по сравнению Dox

7. Антиоксидантные свойства спинохромов при цисплатин-индуцированной нефротоксичности у мышей

Исходя из результатов проведенных исследований *in vitro* антиоксидантной активности хиноидных пигментов морских ежей были определены соединения, наиболее перспективные для дальнейших исследований взаимосвязи структура-активность – эхинохром А (1), эхинамин В (14) и спинохром Е (6). Для оценки их антиоксидантного действия *in vivo* была выбрана модель цисплатин-индуцированной нефротоксичности. В качестве биомаркеров повреждений клеток почек вследствие окислительного стресса кроме p53 были выбраны еще четыре белка: каспаза 12 (Cas12) – «посредник» в процессе апоптоза, вызванного нарушением работы эндоплазматического ретикулума, глутатион-S-трансфераза (GST) – фермент, ответственный за конъюгацию глутатиона с молекулами ксенобиотиков для их детоксикации, супероксиддисмутаза (SOD1) – антиоксидантный фермент, защищающий организм от высокотоксичных кислородных радикалов, и NADPH-оксидаза 4 (RENOS) – источник АФК в клетках почек при воспалительных процессах.

Внутрибрюшинное введение мышам ЦП в дозе 12 мг/кг вызывало увеличение экспрессии GST и SOD1 по отношению к контролю в 2.5 и 1.5 раза соответственно (рис. 7). Экспрессия p53 в группе «ЦП» возрастала в 2 раза, Cas12 – в 1.5 раза и RENOS – в 3 раза по отношению к контролю. Эхинохром А в дозе 1 мг/кг не снижал экспрессию p53, GST и Cas12. Эхинамин В в дозе 1 мг/кг снижал экспрессию p53 в 1.5 раза по сравнению к группе «ЦП» и снижал до нормального уровня экспрессию SOD1, GST и RENOS. Спинохром Е снижал экспрессию p53, SOD1 и Cas12 в 3–4 раза, что даже ниже контрольного уровня, и нормализовал экспрессию GST и RENOS.

Гистологические исследования срезов почек показали, что почки групп «ЦП+14» и «ЦП+6» имели практически нормальную ренальную архитектуру, близкую к таковой почек интактной группы, в то время как на срезах почек групп «ЦП» наблюдались очаги некроза, дилатации и вакуолярной дегенерации. Таким образом, установлено, что на выбранной модели окислительного стресса наиболее активными антиоксидантами *in vivo* являются спинохром Е и эхинамин В.

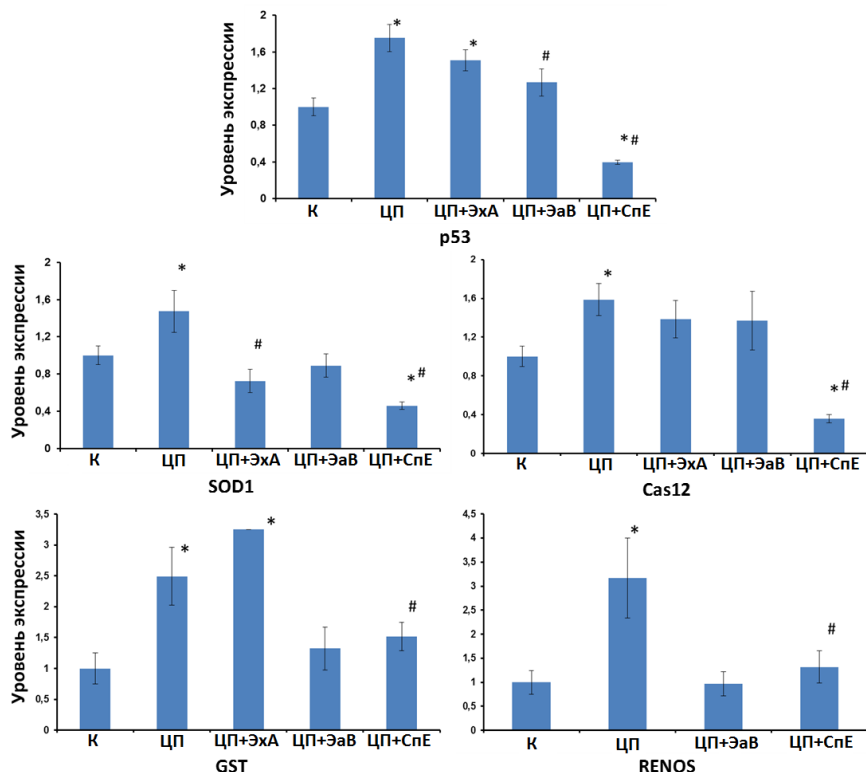


Рисунок 7 – Эффект эхинохрома А, эхинамина В и спинохрома Е на цисплатин-индуцированные изменения (доза цисплатина 12 мг/кг) экспрессии p53, супероксиддисмутазы (SOD1), каспазы 12 (Cas12), глутатион-S-трансферазы (GST), и NADPH-оксидазы 4 (RENOS) в гомогенатах почек мышей. * $P < 0.05$ по сравнению с контролем, # $P < 0.05$ по сравнению с группой «цисплатин»

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод ВЭЖХ-МС для качественного и полуколичественного определения хиноидных пигментов морских ежей. Модифицирован спектрофотометрический метод определения эхинохрома А для оценки суммарного содержания хиноидных пигментов в морских ежах.
2. Исследованы состав и содержание хиноидных пигментов в панцирях 21-го вида морских ежей тихоокеанского региона. Хиноидные пигменты морских ежей видов *A. radiata*, *S. pallidus*, *S. polyacanthus*, *P. imperialis*, *E. cordatum*, *E. chloroticus*, *M. planulata*, *B. latifrons*, изучены впервые. Установлено, что состав и содержание пигментов некоторых видов морских ежей зависит от места и глубины сбора морских ежей. Наибольшее содержание хиноидных пигментов обнаружено в морских ежах *A. radiata*, *S. mirabilis*, *D. savignyi*, *D. setosum*.
3. Впервые исследован состав пигментов целомической жидкости 11-ти видов морских ежей: *S. intermedius*, *S. pallidus*, *S. droebachiensis*, *S. polyacanthus*, *M. nudus*, *E. cordatum*,

S. mirabilis, *E. parma*, *A. radiata*, *D. setosum*, *E. calamaris*. Установлено, что в целомической жидкости помимо эхинохрома А содержатся все основные спинохромы, и что состав пигментов целомической жидкости коррелирует с составом основных пигментов панцирей морских ежей.

4. Из морских ежей *M. nudus* и *S. pallidus* впервые выделено аминокислотное производное спинохрома Е – спинамин Е, его структура установлена как 2-амино-3,5,6,7,8-пентагидрокси-1,4-нафтохинон. Из морского ежа *S. mirabilis* впервые выделен несимметричный бинафтохинон мирабахинон, его структура установлена как 7,5'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксинафтазарин).
5. В морских ежах *S. droebachiensis* и *S. polyacanthus* впервые обнаружены моно- и диметилловые эфиры спинохрома Е, ранее встречавшиеся только в голотуриях и морских звездах. В *S. droebachiensis* впервые идентифицированы 2-О- и 3-О-монометилловые эфиры эхинохрома А, ранее обнаруженные только в морских ежах рода *Diadema*.
6. Методами ЯМР-спектроскопии уточнены структуры двух природных бинафтохинонов морских ежей как этилиден-3,3'-бис(2,6,7-тригидроксинафтазарин) и 7,7'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксинафтазарин).
7. Выделены 5 основных продуктов окисления эхинохрома А и с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения их структуры были установлены как 2,2,3,3,5,6,8-гептагидрокси-7-этил-2,3-дигидро-1,4-нафтохинон, 3,5,6-тригидрокси-2-оксало-4-этилбензойная кислота, 3,5,6-тригидрокси-2-формил-4-этилбензойная кислота, 2,3,5-тригидрокси-4-этилбензойная кислота и 2,5-дигидрокси-3-этилбензохинон.
8. Изучены восстанавливающая способность хиноидных пигментов на моделях взаимодействия со свободным радикалом ДФПГ и восстановления ионов железа (II), и антиоксидантная активность на модели ингибирования автоокисления линетол. Наиболее высокую восстанавливающую и антиоксидантную активности проявили эхинамин В, спинамин Е, эхинохром А, спинохром Е. Установлено, что спинохромы с аминогруппой во втором положении 1,4-нафтохиноидной молекулы проявляют более высокую антиоксидантную активность *in vitro*, чем их гидроксильные аналоги.
9. Изучено влияние хиноидных пигментов на окисление и термоагрегацию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Спинохром С и эхинохром А наиболее эффективно ингибируют окисление ГАФД пероксидом водорода. Спинохром С предотвращает термоагрегацию ГАФД.
10. Определена цитотоксичность спинохромов по отношению к эмбрионам морского ежа *M. nudus* и к опухолевым клеткам человека линий HT-29, T-47D, MCF-7. Все исследованные соединения проявляют слабую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам человека. Эхинохром А, эхинамины А и В показали умеренную токсичность по отношению к эмбрионам морского ежа.
11. Установлено, что 7,7'-ангидроэтилиден-6,6'-бис(2,3,7-тригидроксинафтазарин) и спинохромы D и E на модели доксорубин-индуцированной кардиотоксичности на клетках кардиомиоцитов человека AC16 проявляют потенциальную кардиопротекторную активность, дозозависимо снижая продукцию АФК в кардиомиоцитах до 1.5 раз и сохраняя уровень выживаемости клеток AC16 в присутствии доксорубина на уровне контроля.
12. Установлено, что на модели цисплатин-индуцированной нефротоксичности у мышей эхинохром А при внутрибрюшинном введении не влияет на экспрессию p53, глутатион-S-трансферазы (GST) и каспазы 12 (Cas12), достоверно снижая экспрессию лишь супероксиддисмутазы (SOD1). Эхинамин В и спинохром Е нормализуют

экспрессию p53, GST, Cas12, супероксиддисмутазы (SOD1) и NADPH-оксидазы 4 (RENOS) и сохраняют нормальную архитектуру тканей почек мышей.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Fedoreyev S.A. Mirabiquinone, a new unsymmetrical binaphthoquinone from the sea urchin *Scaphechinus mirabilis* // Tetrahedron Letters. – 2014. – Vol. 55, N 43. – P. 5967–5969.
2. Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Zadorozhny P.A., Fedoreyev S.A. New aminonaphthoquinone from the sea urchins *Strongylocentrotus pallidus* and *Mesocentrotus nudus* // Natural Product Communications. – 2016. – Vol. 11, N 6. – P. 821–824.
3. Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A. Diversity of polyhydroxynaphthoquinone pigments in North Pacific sea urchins // Chemistry & Biodiversity. – 2017. – Vol. 14, N 9. – P. e1700182[1–9].
4. Muronetz V.I., Asryants R.A., Semenyuk P.I., Mishchenko N.P., Vasilieva E.A., Fedoreyev S.A., Schmalhausen E.V. Natural quinones: antioxidant and antiaggregant action towards glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Current Organic Chemistry. – 2017. – Vol. 21, N 20. – P. 2125–2133.
5. Hou Y., Vasileva E.A., Carne A., McConnell M., Bekhit A.E.A., Mishchenko N.P. Naphthoquinones of the spinochrome class: occurrence, isolation, biosynthesis and biomedical applications // RSC Advances. – 2018. – Vol. 8. – P. 32637– 32650.
6. Hou Y., Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Carne A., McConnell M., Bekhit A.E.A. Extraction, structural characterization and stability of polyhydroxylated naphthoquinones from shell and spine of New Zealand sea urchin (*Evechinus chloroticus*) // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 272. – P. 379–387.
7. Васильева Е.А., Мищенко Н.П., Tran V.T.T., Vo H.M.N., Bui L.M., Денисенко В.А., Федореев С.А. Хиноидные пигменты морского ежа *Astropyga radiata* // Химия природных соединений. – 2017. – № 2. – С. 299–300.
8. Новиков В.Л., Шестак О.П., Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Федореев С.А., Глазунов В.П., Артюков А.А. Окисление 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона (эхинохрома А) атмосферным кислородом. Сообщение 1. Структура дегидроэхинохрома // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2018. – № 2. – С. 282–290.
9. Васильева Е.А., Мищенко Н.П. Хроматомасс-спектрометрический метод анализа хиноидных пигментов морских ежей : материалы всероссийской научно-практической конференции «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине» // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – № 3 (57). – С. 18–19.
10. Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Федореев С.А. Пентагидроксизтилнафтохинон из морских ежей: структура и свойства : материалы всероссийской научно-практической конференции «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине» // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – № 3 (57). – С. 41–43.
11. Васильева Е.А., Мищенко Н.П., Во Х.М.Н. Хиноидные пигменты морских ежей Южно-Китайского моря [Электронный ресурс] // XV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток, 5–15 сентября 2014 г. : сб. тез. докл. – Владивосток : ДВО РАН, 2014. – С. 7. – 1 CD-ROM. Регистр. свид-во № 37524.

12. Васильева Е.А., Мищенко Н.П. Исследование состава хиноидных пигментов морских ежей Японского, Охотского и Южно-Китайского морей методами ЖХ-МС // Химия и химическое образование : 6-й международный симпозиум, 28 сентября – 03 октября 2014 г., Владивосток, Россия : сб. науч. тр. – Владивосток : Дальневост. федер. ун-т, 2014. – С. 15–16. – ISBN 978-5-7444-3384-0.
13. Vasilieva E.A., Mishchenko N.P. Antioxidant properties of polyhydroxynaphthoquinones from sea urchin // Future of Biomedicine Conference 2015, Russky Island, Vladivostok, Russia, 2–7 September 2015 : abstr. book. – Vladivostok : Far Eastern Federal Univ., 2015. – P. 82. – ISBN 978-5-7444-3604-9.
14. Vasilieva E.A., Mishchenko N.P., Vo H.M.N. Polyhydroxynaphthoquinones from sea urchins as potential antioxidants // Korea-Russia seminar on Science and Technology, Khabarovsk, 16–17 July, 2015 : proceedings. – Khabarovsk, 2015. – P. 15–16.
15. Vasileva E.A., Mishchenko N.P. Antioxidant quinonoid pigments from celomic fluid of Far Eastern sea urchins [Электронный ресурс] : International conference and exhibition on Marine Drugs and Natural Products, Australia, Melbourne, 25–27 July, 2016 : posters // Journal of Pharmacognosy & Natural Products. – 2016 – Vol. 2, N 3(suppl.). – P. 93.
16. Vasileva E.A., Makhazen D.S., Shkryl Y.N., Mishchenko N.P. Protective effect of echinochrome A and its related compounds against cisplatin-induced nephrotoxicity // KORUS– 2016. “TEAM” Together to Effectively Acting Medicines, Vladivostok, Russia, 26–31 August, 2016 : [proceeding]. – Vladivostok, 2016. – P. 26. – ISBN 978-5-7442-1581-1.
17. Vasileva E.A., Mishchenko N.P. Cytotoxicity of quinonoid pigments from sea urchins : proceedings 2nd International conference and exhibition on Marine Drugs and Natural Products, London, UK, 15–17 June, 2017 : abstrs // Natural Products Chemistry and Research. – 2017. – Vol. 5, suppl. 3. – P. 68.
18. Vasileva E., Makhazen D., Gorpenchenko T., Mishchenko N. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of quinonoid pigments from sea urchins // 10th European conference on Marine Products, Kolymbari – Crete, Greece, 3–7 September, 2017 : book of abstrs. – Kolymbari – Crete, 2017. – P. 101–102.
19. Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A. Main products of echinochrome A oxidative degradation : proceedings 5th Global Chemistry Congress, London, UK, 4–6 September, 2017 : abstrs // Modern Chemistry and Applications. – 2017. – Vol. 5, suppl. 3. – P. 72.
20. Vasileva E.A., Yoon C.S., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Han J. Echinochrome A analogues as potential cardioprotectors : The 22th International congress Phytopharm 2018, Horgen, Switzerland, 25–27 June, 2018 : abstrs // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т. 16, S1. – С. 103–104.
21. Мищенко Н.П., Стоник В.А., Федореев С.А., Васильева Е.А. Способ получения пентагидроксиэтилнафтохинона (эхинохрома А): пат. 2581055 Рос. Федерация. № 2015121442/04; заявл. 04.06.2015; опубл. 10.04.2016, Бюл. № 10. 9с.