

Морские токсины: химические и биологические аспекты изучения

В.А.Стоник, И.В.Стоник

Тихоокеанский институт биоорганической химии

Дальневосточного отделения Российской академии наук

690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159, факс (4232)314–050

Институт биологии моря им. А.В.Жирмунского

Дальневосточного отделения Российской академии наук

690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17, факс (4232)310–900

Представлены структуры и механизмы биологического действия наиболее известных представителей основных групп морских токсинов. Показано, что многие соединения имеют сложное химическое строение и экстремально высокую токсичность. Обсуждены особенности выделения, установления строения и синтезов этих веществ с применением современных достижений органической химии. Дан краткий обзор методов идентификации и количественного анализа морских токсинов.

Библиография — 147 ссылок.

Оглавление

I. Введение	442
II. Краткий обзор морских токсинов	443
III. Выделение и установление строения морских токсинов	451
IV. О синтезах морских токсинов	454
V. Обнаружение морских токсинов и определение их содержания	459
VI. Заключение	462

I. Введение

Изучение низкомолекулярных морских природных соединений, выполняющих роль биорегуляторов, — быстро развивающаяся область биоорганической химии, находящаяся на стыке химии и биологии. Вначале такие исследования составляли прерогативу органической химии. Затем, с появлением работ по биологической роли этих веществ и с развитием

молекулярно-биологических направлений, связанных с изучением биосинтеза и механизмов физиологического действия морских метаболитов, они все в большей мере становились частью биологических наук. В настоящее время данная область исследований не утратила связи с химией и оказывает заметное влияние на развитие органической и аналитической химии.

Хорошей иллюстрацией такого утверждения являются достижения в области изучения морских токсинов (т.е. токсинов, выделенных из морских организмов). В настоящей работе сделана попытка обсудить эти достижения с акцентом на те из них, которые стимулировали как работы химиков-синтетиков, так и исследования на стыке химии и биологии с привлечением самых современных методов идентификации веществ. Примеры взяты, главным образом, из практики последних 10–15 лет, хотя цитируются также основополагающие работы более раннего периода. Приведенные нами литературные ссылки в основном представляют собой обзорные статьи, касающиеся отдельных групп морских токсинов или отдельных направлений их изучения.

Задача нашей работы, которая не претендует на исчерпывающий обзор в любом из затронутых аспектов, — привлечь внимание отечественных химиков к морским токсинам и проанализировать основные достижения в этой области науки.

В.А.Стоник. Академик, директор ТИБОХ ДВО РАН.

Телефон: (4232)311–168; e-mail: stonik@piboc.dvo.ru

Область научных интересов: морские природные соединения (низкомолекулярные биорегуляторы) — поиск, выделение, установление строения, синтез, изучение биологических функций и химических превращений.

И.В.Стоник. Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ИБМ ДВО РАН. Телефон: (4232)317–107; e-mail: stonik@imb.dvo.ru.

Область научных интересов: изучение морского фитопланктона, включая систематику, морфологию и биологию потенциально токсичных видов микроводорослей и видов, вызывающих цветение воды.

Дата поступления 3 сентября 2009 г.

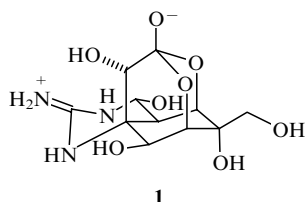
II. Краткий обзор морских токсинов

Главными биологическими источниками токсинов долгое время считались исключительно наземные организмы, включая некоторые высшие растения и болезнетворные бактерии. После изобретения легководолазной техники, увеличения добычи морепродуктов и прогресса в их культивировании определенную известность приобрели и многие токсичные морские организмы. Изучение морских организмов существенно расширило круг известных природных соединений и, в частности, токсинов. В настоящее время общее число природных соединений с установленной структурой не превышает 150–200 тыс., причем в морских организмах было обнаружено около 20 тыс. таких веществ. Среди сотни токсичных вторичных метаболитов немало экстремально активных соединений. Ниже приведены некоторые сведения о низкомолекулярных (молекулярные массы < 3500 Да) токсинах морских микроорганизмов и беспозвоночных, причем многие группы таких веществ представлены только примерами наиболее токсичных соединений. За рамками данного обзора остались белковые токсины кишечнополостных, некоторых рыб, морских змей и других морских организмов.

1. Токсины, продуцируемые морскими микроорганизмами

Имеется несколько аспектов, которые привлекают особое внимание к разнообразным токсинам микробного происхождения. Во-первых, токсины, продуцируемые морскими микроорганизмами, передаются по пищевой цепи в различные макроорганизмы, в том числе съедобные. Последние, накапливая токсины, могут стать опасными для человека. Этим определяются важность разработок высокочувствительных методов идентификации и количественного анализа морских токсинов и необходимость постоянного мониторинга появления и развития токсичных видов микроорганизмов в различных акваториях Мирового океана. Во-вторых, именно вещества данной группы являются самыми активными из всех известных небелковых токсинов. В-третьих, с химической точки зрения многие из них имеют необычную и сложную структуру,¹ и, в соответствии с терминологией англоязычных коллег, бросают «вызов» (challenge — англ.) современной науке как на этапе установления их строения, включая стереохимию, так и при разработке подходов к их синтезам.

Первым из морских токсинов, изученных химиками, был тетродотоксин (ТТХ, **1**), выделенный в 1909 году. Он накапливается в половых продуктах и печени так называемых пуфферовых рыб (семейство Tetraodontidae).



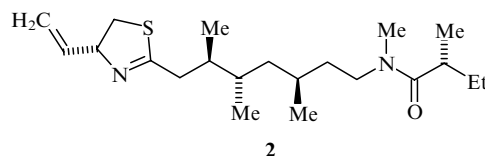
Впоследствии это соединение было обнаружено в пресноводных тритонах рода *Taricha*, жабах *Atelopus*, морских червях-немертинах, отдельных группах крабов, осьминогах и в других биологических объектах.^{2,3} Известно, что некоторые из токсичных рыб, в частности фугу (*Takifugu* или *Spherooides rubripes*), являются в Японии деликатесным продуктом, несмотря на нередкие случаи смертельных отрав-

лений. Доза тетродотоксина, вызывающая гибель 50% животных (LD_{50}), составляет $\sim 8 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ при внутривенном и $\sim 330 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ при пероральном введении, т.е. тетродотоксин почти в 100 раз токсичнее цианистого калия. Основная причина гибели людей — паралич диафрагмы и прекращение дыхания.

Тетродотоксин (**1**) — специфический блокатор воротного механизма некоторых натриевых каналов (так называемых ТТХ-чувствительных каналов), нарушающий нервную проводимость.⁴ Установление его структуры было описано в классических работах Вудворда (США), Тсуды (Япония) и группы Гото — Хираты (Япония).

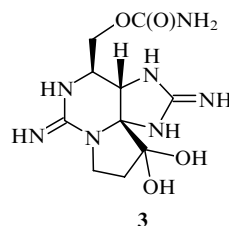
Установлено, что тетродотоксин синтезируется некоторыми видами бактерий (*Pseudoalteromonas tetraodonis*, *Vibrio alginolyticus*). Именно этим объясняют выделение его из ряда биологических объектов, не связанных друг с другом филогенетически.⁵ Предполагают, что токсинпродуцирующие бактерии защищают половые продукты рыб от поедания хищниками после их выметывания в морскую воду во время нереста. В ряде работ для идентификации этого токсина в различных морских бактериях использовали в основном хроматографию продуктов щелочной деградации тетродотоксина с последующим силилированием. Данный подход не является достаточно надежным, а положительные результаты можно получить даже при анализе питательных сред, на которых выращивались бактерии.⁶

Морские цианобактерии продуцируют и другие, менее активные токсины. Многие из них являются нейротоксинами, опухолевыми промоторами и токсинами для печени. В качестве примера недавних исследований в этой области следует упомянуть калцитоксин (**2**) — соединение, выделенное из Карибского сбора колоний цианобактерии *Lyngbya majuscula*.⁷



Абсолютные конфигурации его пяти асимметрических центров и полное строение были определены после того, как удалось синтезировать четыре стереоизомера калцитоксина, один из которых оказался идентичным природному продукту. Ихтиотоксичность соединения **2** очень высока (летальной является концентрация приблизительно 600 пг в 1 мл морской воды). Это соединение не уступало тетродотоксину по способности блокировать натриевые каналы мышинных нейронов.

Хорошо известен и другой морской токсин — сакситоксин (**3**).



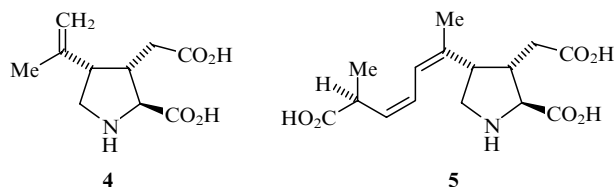
Это соединение и около 20 открытых к настоящему времени его природных аналогов и производных (например, неосакситоксин, декарбамоилсакситоксин, гониаутоксины) вызывают паралитические отравления съедобными моллюсками

(PSP-токсичность, от англ. Paralytic Shellfish Poisoning).⁸ Свое название главный токсин этой серии получил от названия моллюска *Saxidomus giganteus*, из которого был впервые выделен.⁹ В СССР в начале 1980-х гг. несколько смертельных отравлений такого типа были зафиксированы в Камчатской области при употреблении в пищу собранных у берегов Авачинской бухты мидий. Выделенный тогда основной токсин был идентифицирован как 11-сульфооксисакситоксин.¹⁰

PSP-Токсины попадают в моллюски-планктонофаги вместе с микроводорослями-динофлагеллятами в периоды массового развития последних и аккумулируются в некоторых органах и тканях этих моллюсков. Их обнаружили также в ряде видов рыб, в особенности в пuffers. В многих странах проводится мониторинг развития потенциально токсичных микроводорослей, а также содержания токсинов в тканях моллюсков, и осуществляется запрет на добычу моллюсков в опасные периоды. Известно немало видов микроводорослей, которые могут иметь PSP-токсичные штаммы. В их числе представители родов *Alexandrium*, *Gymnodinium* и *Pyrodinium*. Кроме того, токсины этой группы обнаружены в цианобактериях *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis* и др. Предполагают, что паралитические токсины моллюсков, подобно тетродоксину, имеют бактериальное происхождение. Например, сакситоксин был найден в культуре бактерии *Moraxella* sp., выделенной из *Alexandrium tamarense* (или *Protogonyaulax tamarensis*).¹¹

По механизму действия и токсичности сакситоксин (3) близок к тетродоксину и, подобно последнему, ингибирует натриевую проводимость мембран нервных клеток. Симптомы отравления у человека включают онемение губ, желудочно-кишечные нарушения, в тяжелых случаях — паралич дыхательной системы.

Два содержащих пирролидиновый цикл токсина — каиновая (4) и домоевая (5) кислоты — были сначала обнаружены в макроводорослях (многоклеточных водорослях).

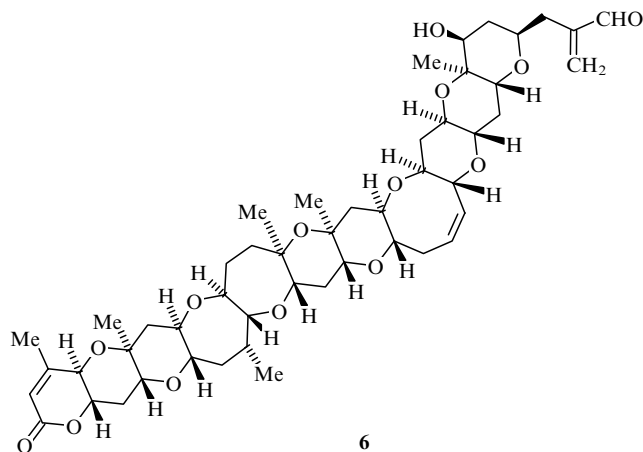


Каиновая кислота (4) была выделена из красной водоросли *Digenia simplex*, которая с давних пор используется в Японии в качестве глистогонного средства, а родственная ей кислота 5 была получена из красной водоросли *Chondria armata*.¹² Название соединения 5 происходит от японского названия *Chondria armata* — «domoi». Позднее было найдено, что соединение 5 является причиной так называемых амнезических отравлений моллюсками (ASP-токсичность, от англ. Amnesic Shellfish Poisoning, или DAP-токсичность, от англ. Domoic Acid Poisoning). Обнаружено, что продуцентами этого токсина могут быть диатомовые водоросли рода *Pseudo-nitzschia*, а также *Nitzschia navis-varingica* и *Amphora coffeaeformis*.¹³ Однако для большинства водорослей *Pseudo-nitzschia* характерно существование и токсичных, и нетоксичных клеточных линий. Различия в способности этих штаммов продуцировать кислоту 5 могут быть вызваны как генетической изменчивостью, так и влиянием природных факторов. Все штаммы должны содержать гены, ответственные за продуцирование токсина. Однако такие гены пока не идентифицированы.¹⁴

При отравлении моллюсками нарушаются функции центральной нервной системы и страдает память.^{15,16} Первый случай такого отравления мидией *Mytilus edulis* был описан в 1987 г. Токсический эффект связан с взаимодействием соединения 5 с глутаматными рецепторами клеток мозга.¹⁷ Домоевая кислота вызывает почти непрерывную стимуляцию нейронов гипоталамуса и в конечном итоге приводит к их разрушению.¹³ Установлено, что кислота 5 в субтоксичных дозах и соли аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые обычно присутствуют в тканях мидий, усиливают действие друг друга, приводя к росту токсичности. У отравленных наблюдаются симптомы, характерные для пациентов с болезнью Альцгеймера, причем наиболее тяжелые случаи отравления, вплоть до летальных, отмечены у людей пожилого возраста.

Домоевая кислота (5) представляет опасность не только для людей, но и для птиц и морских млекопитающих, которые употребляют в пищу морепродукты. Например, у побережья Калифорнии отмечены случаи гибели пеликанов, бакланов и морских львов, связанные с массовым развитием токсичных диатомовых водорослей.¹³

Нейротоксическое отравление моллюсками (или NSP-токсичность, от англ. Neurotoxic Shellfish Poisoning) также обусловлено накоплением токсинов микроводорослевого происхождения.¹⁸ С действием этих токсинов связывают гибель различных животных (от бутылконосых дельфинов до птиц) в результате массового развития микроводорослей-динофлагеллят *Karenia brevis* у побережья Флориды (США) и рафиофитовой микроводоросли *Chattonella* cf. *verruculosa* — в водах Атлантического океана у северного побережья США. Токсины NSP-типа получили название бреветоксинов, всего их известно около дюжины — бревенол А, бревенол В, бревенал и др. Бреветоксины (например, бреветоксин-В (6)) относятся к типу полиэфирных производных. Подобно другим метаболитам этого класса, они содержат систему конденсированных кислородсодержащих циклов.¹⁹



Бреветоксины активируют натриевые каналы и вызывают деполяризацию мембран возбудимых нервных клеток и клеток гладкой мускулатуры. При отравлении такими токсинами люди, как правило, не гибнут, но у них наблюдается целая серия желудочно-кишечных и неврологических симптомов, включая тошноту, рвоту, мышечную боль, потерю координации, парез мышц лица и частичные параличи. Образующиеся во время штормов и ураганов при цветении *K. brevis* аэрозоли раздражают дыхательные пути людей, провоцируют аллергические проявления и приступы астмы у жителей штата Флорида.²⁰ Одним из последствий

воздействия бреветоксинов может быть ослабление иммунной системы у животных, которые в дальнейшем гибнут от инфекций и других вторичных заболеваний.

Так называемые диаретические отравления моллюсками (DSP-токсичность, от англ. Diarrhetic Shellfish Poisoning) вызывают сразу несколько микроводорослевых токсинов, среди которых — оокадаевая кислота (**7**), динофизистоксины (**8, 9**), пектенотоксины (например, соединения **10, 11**) и йезотоксин (**12**). Они также имеют полиэфирную структуру и, как и другие упомянутые выше токсины, могут накапливаться в съедобных моллюсках.

Окадаевая кислота (7) впервые была выделена из губок *Halichondria okadai* и *H. melanodoca*.²¹ Однако позже было установлено,²² что в губки она попадает с микроводорослями-динофлагеллятами родов *Prorocentrum* и *Dinophysis*. Микроводоросли *Prorocentrum* spp. нередко вступают в симбиотические отношения с целым рядом донных организмов, включая водоросли-макрофиты. По пищевым цепям соединения 7 попадает не только в моллюски-планктонофаги, но и в другие морские организмы вплоть до рыб.

В основе механизма физиологического действия соединения 7, ответственного за часть диаретических отравлений, лежит способность ингибировать протеинфосфатазы за счет взаимодействия с так называемыми PP1- и PP2A-каталитическими доменами. Этот токсин одинаково успешно ингибирует ферменты человека и животных, а также дрожжевые и растительные протеинфосфатазы. Концентрация, соответствующая 50%-ному ингибированию (IC_{50}) протеинфосфатаз PP-2A и PP-1 типов, составляет приблизительно 0.2–1.0 и 60–500 нмоль $\cdot$ л⁻¹ соответственно.²³ Кроме того, оокадаевая кислота (7) — мощный опухолевый промотор.²⁴

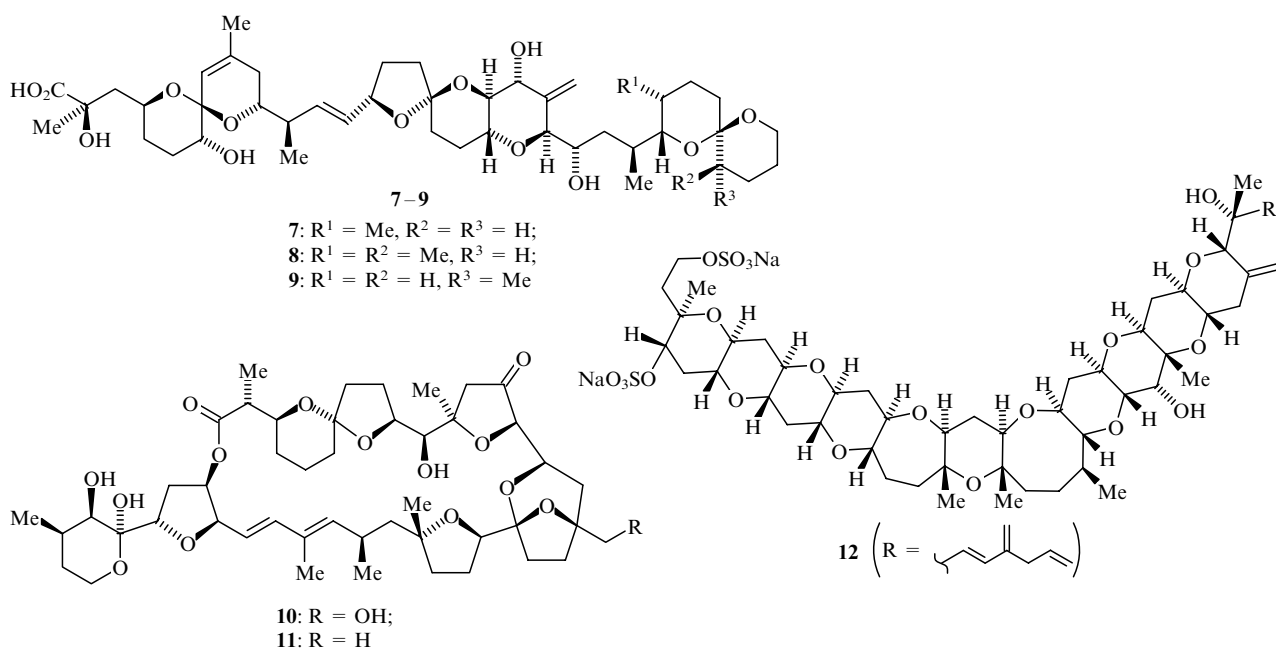
Динофизистоксины **8, 9** близки по строению и свойствам к окадаевой кислоте — один из них является изомером окадаевой кислоты, а другой — ее метильным гомологом. Недавно была уточнена стереохимия соединений **8, 9**, выделенных из динофлагеллят *Dynophysis* spp.²⁵ В европейских моллюсках чаще находят окадаевую кислоту, а в собранных у берегов Японии и Канады — динофизистоксины. Стереохимические особенности соединения **8** обуславливают его относительно слабое ингибирующее действие на протеинфосфатазу PP2A.

Пектенотоксины, в частности пектенотоксины-1 (РТХ-1, **10**) и -2 (РТХ-2, **11**),²⁶ традиционно относят к диаретическим токсинам, поскольку они обычно сопутствуют окадаевой кислоте. Они были выделены из микроводоросли *D. acuminata*. К настоящему времени известно около 15 соединений этого типа. Все они, а также целый ряд мощных цитотоксинов (амфидинолиды и др.), являются макроциклическими лактонами (макролидами). Пектенотоксины часто обнаруживают (вслед за цветением *Dinophysis* и родственных динофлагеллят) в съедобных и культивируемых моллюсках, например в средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*. При введении мышам эти соединения не вызывают диареи, но они высокотоксичны для печени. На клеточном уровне пектенотоксины инициируют разрушение актиновых филаментов клеточного микроскелета. Интересно, что они являются более сильными апоптическими агентами по отношению к опухолевым клеткам, чем к нормальным клеткам из одной и той же ткани.²⁷

Йезотоксин (12) и первые его аналоги были выделены из пищеварительных желез токсичных образцов моллюска-гребешка *Patinopecten yessoensis*, собранного в 1986 и 1993 гг. в Японии.²⁸ Токсичность этих веществ находится в пределах от 20 до 500 мкг·кг⁻¹ (для мышей при внутрибрюшинном введении).^{28,29} К настоящему времени известно около 40 соединений этого класса.

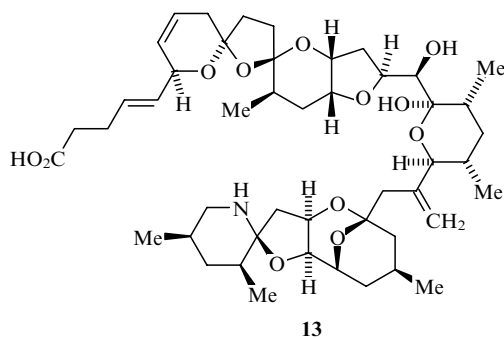
Продуцируются йезотоксины динофлагеллятами *Prorocentrum reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* и *Gonyaulax spinifera*. Подобно динофизистоксинам, они не вызывают диареи и, кроме того, не являются ингибиторами протеинфосфатаз. Механизм их физиологического действия остается не вполне ясным. Высказывалось мнение,³⁰ что отношение этих соединений к диаретическим токсинам ошибочно.

Азаспирацидное отравление моллюсками известно с 1995 г. Первоначально токсины этой группы (спиролиды) были найдены в мидиях *M. edulis*, культивируемых в Ирландии,³¹ а затем в моллюсках из Марокко и ряда стран западной и северной Европы (Франции, Великобритании, Норвегии и др.). Полагают, что эти вещества продуцируются микроводорослями-динофлагеллятами *Protoperdinium crassipes*.³² Недавно новый вид микроводорослей, *Azadinium spi-*



nosus gen. et sp. nov., был идентифицирован как первичный продуцент азаспирацидов.³³

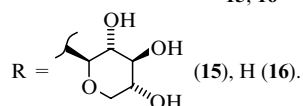
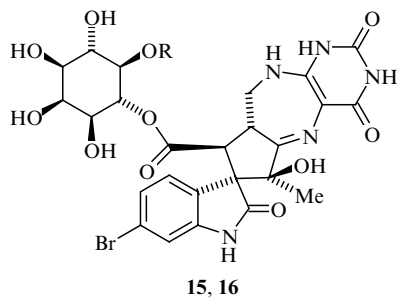
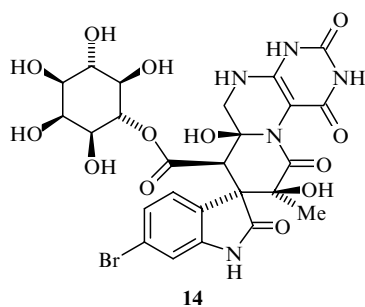
По своему строению азаспирациды также относятся к полициклическим полиэфирным производным, но один из спироциклов содержит атом азота. Стереохимию этих веществ установили только в 2006 г., после того как Николау с соавт.³⁴ осуществил полный синтез азаспирацида-1 (**13**) и получил несколько продуктов его деградации.



Азаспирациды высокотоксичны для человека и животных, их LD_{50} составляет $\sim 110\text{--}200\text{ мкг}\cdot\text{кг}^{-1}$ (для мышей при внутривенном введении),³⁵ а при попадании в организм человека они вызывают повреждения внутренних органов (кишечника, печени) и лимфоидной системы.³⁶

В сентябре 1965 г. в Японии наблюдалось массовое отравление людей, живущих на берегу залива Сурага. Причиной отравления было употребление в пищу съедобных моллюсков *Babionia japonica*. Выделенные токсины были названы сурагатоксином (**14**) и неосурагатоксином (**15**).³⁷

В 1985 г. было сообщено о выделении еще одного вещества этой серии. Оно получило название просурагатоксин (**16**), поскольку под действием разбавленной уксусной кислоты легко образовывалось из неосурагатоксина (**15**) в результате отщепления концевой ксилопиранозы.³⁸ Особенно опасны неосурагатоксин и просурагатоксин, которые



вызывают у людей нарушения зрения и речи, паралич лицевых мышц и ряд других симптомов. Подобно атропину оба этих соединения являются мидактиками, вызывают расширение зрачка в результате связывания с никотиновыми рецепторами нейронов.

Неосурагатоксин приблизительно в 10 раз активнее, чем атропин. По способности взаимодействовать с никотиновыми рецепторами он более чем в 1000 раз превосходит фармацевтический препарат мекамилламин. Этот вид токсичности съедобных моллюсков связан с накоплением токсинов из микроорганизмов, а именно из коринеформных бактерий.

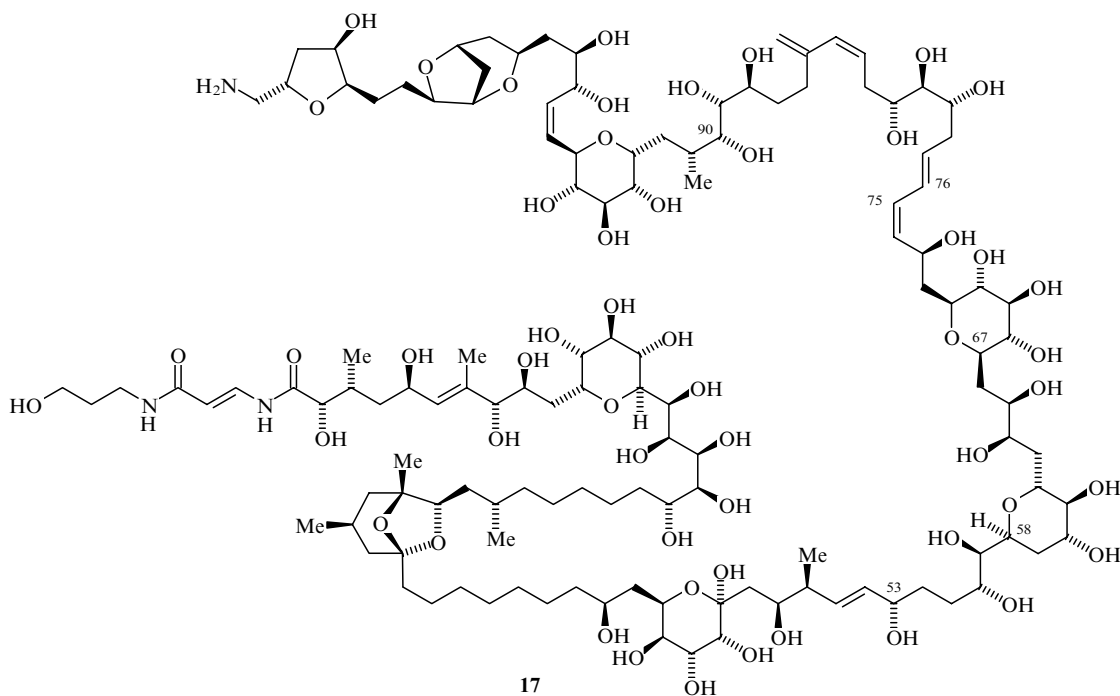
Высокую токсичность проявляют и некоторые другие сложные по строению морские метаболиты (полиэфирные или трудно относимые к определенному типу структур). Так, палитоксин (**17**) был впервые выделен Муром и Шоером³⁹ из гавайской зоантарии† *Palythoa toxica*. Его токсичность почти в 10 000 раз превышает токсичность цианистого калия, а LD_{50} составляет $\sim 0.15\text{ мкг}\cdot\text{кг}^{-1}$. Этот токсин включает 129 атомов углерода, не имеет повторяющихся фрагментов и содержит более 60 асимметрических центров. Установление строения палитоксина, выполненное двумя американскими и японской группами ученых в начале 1980-х гг.,^{40–42} стало одним из самых крупных достижений биоорганической химии, а последующий синтез палитоксиновой кислоты — одной из самых впечатляющих работ в области органического синтеза за последние годы.^{43, 44}

Исследование механизма действия палитоксина, как и другие аспекты его изучения, привело к целому ряду выдающихся научных достижений. Было установлено, что он взаимодействует с Na^+ , K^+ -АТФазой различных клеток, включая кардиоциты. Это взаимодействие осуществляется приблизительно по тому же сайту, что и с известными растительными токсинами, так называемыми «сердечными гликозидами», например с оубаином. Под действием палитоксина важнейшая насосная система клеток (АТФаза), поддерживающая градиент ионных концентраций по обе стороны биологических мембран, превращается в ионный канал, при этом происходит увеличение натриевой проводимости и появляется возможность входа ионов кальция в клетки.^{45, 46} Недавнее изучение конформационных особенностей палитоксина показало, что в водных растворах он представляет собой димерную супрамолекулу, которая способна взаимодействовать с Na^+ , K^+ -АТФазой.⁴⁷

В природе палитоксин, по-видимому, синтезируется микроводорослями-динофлагеллятами рода *Ostreopsis*, симбионтными зоантариям. Для доказательства этого предположения из культивируемых микроводорослей (динофлагелляты *Ostreopsis siamensis*) были выделены его аналоги — остреотоксины.⁴⁸ Согласно данным других исследований,⁴⁹ нельзя с уверенностью утверждать, что этот вид является первичным продуцентом палитоксина, поскольку уровень токсичности в зоантариях не связан с присутствием симбиотических водорослей. Данный токсин находили и в других морских животных, например в крабах, актиниях.⁵⁰ Известны многочисленные случаи отравлений людей, вызванных соединением **17** и родственными ему токсинами.

Так называемая сигуатеротоксичность тропических рыб — еще один вид токсичности, проявляемой морскими организмами. Это явление заключается в том, что съедобные виды рыб иногда становятся токсичными и даже высоко-

† Зоантарии — шестилучевые кораллы — обитают во многих тропических районах Мирового океана.



17

токсичными, а употребление их в пищу вызывает тяжелые, вплоть до смертельных, отравления. Сигуатеротоксичность известна около 200 лет, но только во второй половине XX века она стала проявляться в самых разных уголках мира, что связано с быстрым ростом добычи рыбы в тропических морях. До 10–20 тыс. человек ежегодно получают такие отравления.⁵¹ Токсины попадают в ткани рыб по пищевой цепи: от токсических микроводорослей-динофлагеллят, обитающих на поверхности некоторых водорослей, в водорослеядные рыбы, а затем и в хищные виды рыб. Сигуатеротоксичность характерна и для ряда промысловых видов рыб, например барракуд, каменного окуня, угрей. По растворимости в воде различают два типа токсинов: нерастворимые (сигуатоксины) и растворимый (маитотоксин).

Маитотоксин (**18**) — самый токсичный и самый сложный по химическому строению из всех известных небелковых токсинов. В его молекуле содержится 142 атома углерода и 68 атомов кислорода (не считая тех, которые входят в состав сульфатных групп), а также 32 кислородсодержащих цикла. Его строение установлено японскими и американскими химиками с использованием современных методов ЯМР, масс-спектрометрии и синтеза модельных соединений.^{52, 53} Это соединение в несколько раз токсичнее палитоксина ($LD_{50} \approx 50 \text{ нг} \cdot \text{кг}^{-1}$, на мышах). Свое название токсин получил от слова «маито» — так жители Таити называют рыба-хирурга *Ctenochaetus striatus*, в тканях которой он был найден. Считается, что продуцентом соединения **18** является динофлагеллята *Gambierdiscus toxicus*, которая эпифитно поселяется на водорослях коралловых рифов. При культивировании этой микроводоросли токсин **18** был получен в достаточных для его структурного изучения количествах.

Высокая токсичность соединения **18** объясняется его способностью увеличивать вход ионов кальция и выход ионов натрия из клеток. Маитотоксин действует на кальций-проводящие неселективные ионные каналы (CaNSC) возбудимых и невозбудимых клеток. Это ведет к активации кальций-чувствительных протеиназ — кальпаина-1 и -2, — образова-

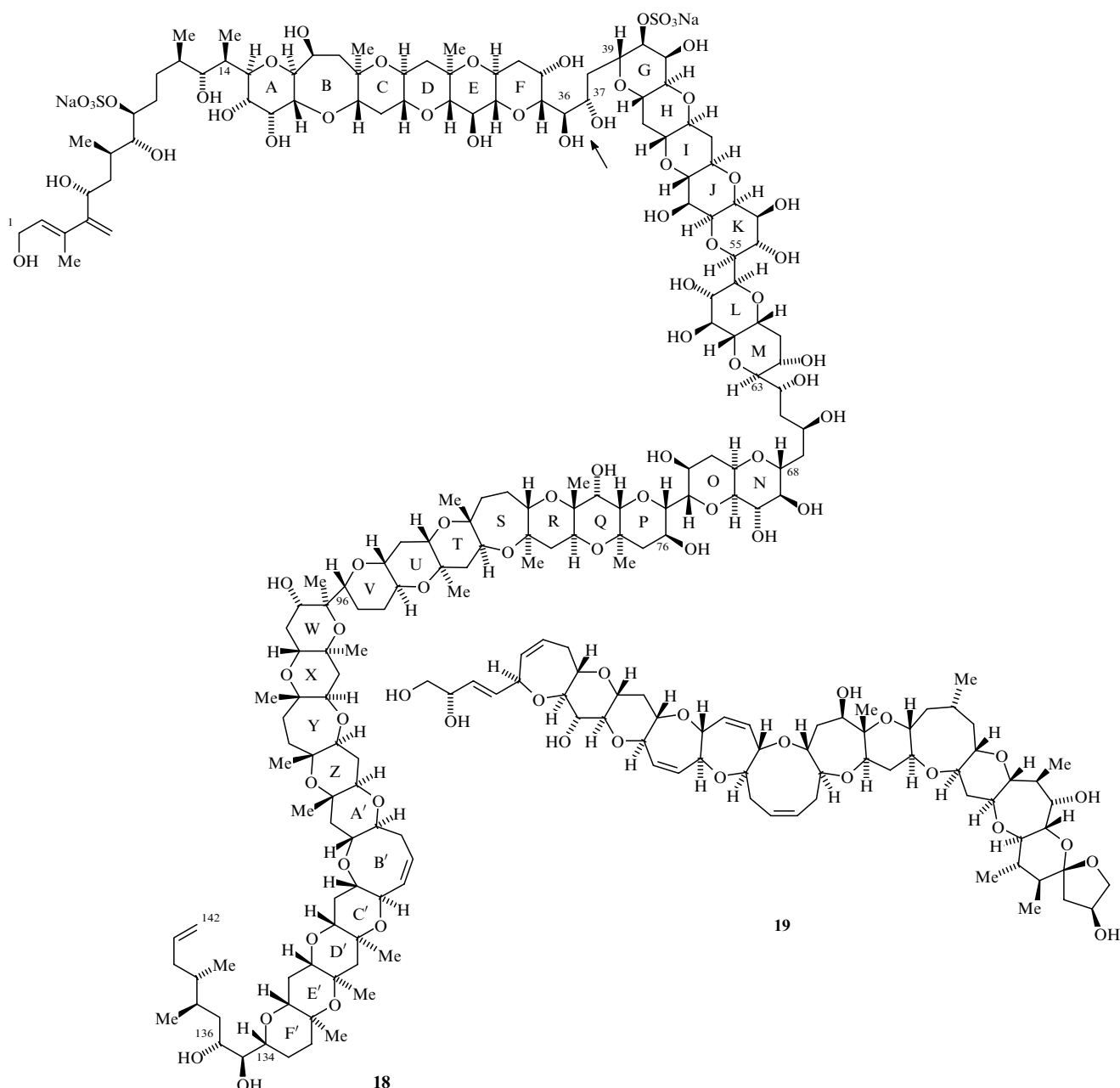
нию в клетках больших пор и к так называемой онкотической гибели клеток из-за перегрузки их кальцием.^{54, 55}

Сигуатоксин (**19**) был выделен из токсичного вида рыб (из угря *Gymnothorax javanicus*), а близкий аналог этого соединения — из культивируемой динофлагелляты *Gambierdiscus toxicus*.⁵⁶

Известно несколько групп токсинов, близких к сигуатоксину (сигуатоксин-3С, гамбиерол, гамбиетоксины, гимноцин А и др.). Циклическая система сигуатоксина состоит из 12 сочлененных кислородсодержащих циклов и одного спиросоочлененного тетрагидрофуранового кольца. Его аналоги могут содержать и меньшее число циклов. Вещества, близкие по структуре к сигуатоксину, более гидрофобны, чем маитотоксин, поскольку обычно содержат не более пяти гидроксильных групп.

Сигуатоксины найдены в динофлагеллятах *Gambierdiscus toxicus*, *Coolia monotis*, *Amphidinium carterae*, а также микроводорослях родов *Prorocentrum*, *Ostreopsis* и *Thecadinium*. Они высокотоксичны, при внутрибрюшинном введении мышам значения LD_{50} для них лежат в интервале $0.25\text{--}2.3 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$. Токсический эффект самого сигуатоксина (**19**) является следствием его способности активировать электровозимые натриевые каналы, а в больших дозах — блокировать работу калиевых каналов, нарушая проведение нервного импульса.⁵⁷ Симптомы отравления этим веществом у человека включают желудочно-кишечные расстройства, нарушения работы нервной и сердечно-сосудистой систем. Наиболее часто наблюдаются тошнота, головная боль, головокружение, онемение конечностей, а в тяжелых случаях — паралич дыхательной системы и смерть.⁵⁸

Таким образом, разнообразные и весьма сложные по химическому строению токсины продуцируются как микроорганизмами-прокариотами (морскими бактериями), так и эукариотами (микроводорослями). Многие из них относятся к экстремально токсичным природным соединениям. Например, маитотоксин настолько активен, что всего несколько килограммов этого вещества составляют суммарную летальную дозу для всех людей на Земле. Большинство



морских микробиальных токсинов, являясь высокоспецифичными лигандами, взаимодействуют с теми или иными фрагментами ион-проводящих каналов и насосных систем биомембран.

2. Токсины морских беспозвоночных

Некоторые морские беспозвоночные также известны своей токсичностью. Одни из них имеют железы или клетки, в которых накапливаются токсины, используемые для охоты и для защиты организмов-продуцентов. Другие таких органов не имеют и содержат токсичные метаболиты в тканях. Не только моллюски, но и некоторые беспозвоночные могут накапливать в своих тканях мощные токсины микробиального происхождения (тетродотоксин, палитоксин и др.), рассмотренные в предыдущем разделе. Такие токсины были обнаружены, например, в зоантариях, ракообразных, морских червях и других беспозвоночных.

В ядовитых железах и токсин-продуцирующих клетках морских беспозвоночных обычно содержатся белковые или пептидные токсичные соединения. Они характерны для нескольких групп беспозвоночных, в частности для многих таксонов кишечноротовых (тип Cnidaria), некоторых таксонов моллюсков (тип Mollusca), морских ежей (класс Echinoidea, тип Echinodermata), морских червей (тип Nemertea). Большинство токсинов, обнаруженных у этих беспозвоночных, имеют большие молекулярные массы и поэтому в настоящей обзорной статье не рассматриваются.

Низкомолекулярные пептидные токсины найдены в моллюсках, принадлежащих к роду *Conus*. Эти моллюски являются хищными животными, питающимися рыбами, морскими червями или другими моллюсками. Некоторые виды, специализирующиеся на охоте на рыб, например *C. geographus*, представляют смертельную угрозу и для людей, собирающих моллюсков на коралловых рифах.

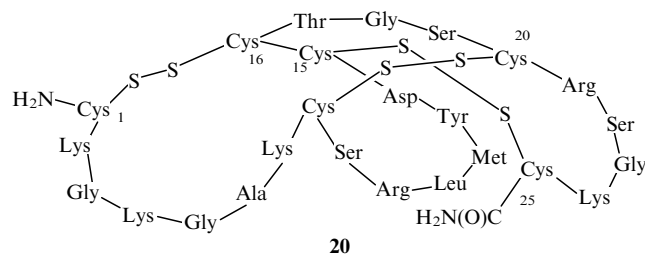
Все моллюски-конусы имеют ядовитые железы, соединенные протокой с гарпуном, с помощью которого они охотятся за своими жертвами. В настоящее время известно около 500 видов этих моллюсков. Считается, что всего в Мировом океане их не менее 700 видов. В ядовитой железе каждого вида моллюсков-конусов содержится характерный набор токсичных пептидов (так называемых конопептидов), состоящий приблизительно из ста соединений, причем одни и те же вещества в разных видах находят редко. Таким образом, разнообразие конопептидов в этих животных очень велико.

Богатые дисульфидными связями конопептиды принято называть конотоксинами. Они содержат от четырех до десяти цистеиновых остатков и от двух до пяти дисульфидных связей, имеют небольшую молекулярную массу и состоят обычно из 12–25 аминокислотных остатков. Этим конотоксины отличаются от полипептидных токсинов других животных, которые обычно состоят из 40–80 аминокислотных остатков. Характерными структурными признаками конотоксинов являются также высокая распространенность в них цистеиновых остатков и присутствие большого набора посттрансляционно модифицированных аминокислот. В них найдены как широко распространенные модифицированные аминокислоты (гидроксипролины, гликозилированные серин и треонин), так и сравнительно редкие — 6-бромтриптофан, D-аминокислоты, γ -карбоксиглутаминовая кислота, сульфатированный тирозин.⁵⁹

По количеству цистеиновых остатков и их распределению вдоль пептидной цепи конотоксины делятся на суперсемейства. Например, к суперсемейству М относятся токсины, в которых цистеиновые остатки (С) распределены как $CC-C-C-CC$ (знак «—» означает, что между остатками цистеина имеются другие аминокислотные остатки), а к суперсемейству О — токсины с мотивом $C-C-CC-C-C$. Известны следующие суперсемейства: О, М, А, S, Т, Р, I. Внутри каждого суперсемейства конотоксины подразделяются на группы (семейства), которые принято обозначать греческими буквами. Например, суперсемейство О делится на семейства δ , μ O, κ и ω .⁵⁹ Друг от друга эти семейства отличаются тем, что их представители способны связываться с разными молекулярными мишенями. Так, конотоксины семейств δ и μ O взаимодействуют с натриевыми каналами, представители семейства κ — с калиевыми каналами, а представители семейства ω — с кальциевыми каналами.

Все конотоксины специфически взаимодействуют с ионными каналами или мембранными рецепторами. Причем различные конотоксины способны не просто «узнавать» те или иные типы ионных каналов, но и «выбирать» из них только определенные подтипы и изоформы. Это делает конотоксины ценными инструментами для изучения тонких механизмов ионной проводимости и связанных с ней явлений — проведения нервного импульса, возникновения и блокирования болевых ощущений и др. Кроме того, такие соединения, как сами по себе, так и в качестве модельных, играют важную роль при поиске новых «кандидатов» в лекарственные препараты.^{60, 61}

Фармакологические исследования различных конотоксинов и их синтетических аналогов показали, что многие из них представляют интерес в качестве потенциальных лекарственных средств. Один из конотоксинов, а именно ω -конотоксин MVIIA (20), показал хорошие результаты на всех стадиях клинических испытаний.



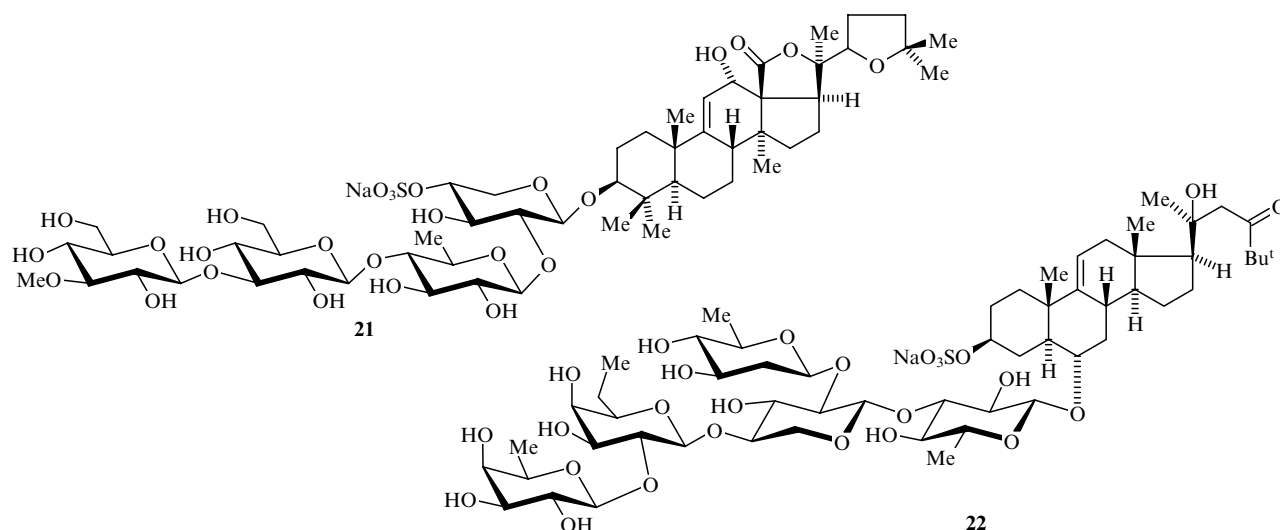
Соединение 20 было впервые получено из тихоокеанского моллюска *Conus magnus*.^{62, 63} Оно является линейным пептидом, состоящим из 25 аминокислотных остатков. Шесть остатков цистеина в этом соединении образуют три дисульфидных связи. Дисульфидные связи придают ω -конотоксину пространственную структуру, которая способна специфично блокировать работу NVSCC-кальциевых каналов (электронно-зависимые каналы N-типа). В результате токсин ингибирует передачу болевого сигнала, действуя при этом очень эффективно ($K_d = 9$ нМ). Синтетический ω -конотоксин был назван зиконотидом, причем он оказался приблизительно в 1000 раз более мощным обезболивающим средством, чем морфин. Клинические исследования показали его высокую эффективность при тяжелых хронических болях. Зиконотид, в отличие от морфина, не обладает галлюциногенным эффектом и не вызывает привыкания, он разрешен к применению, производится и используется в США в качестве мощного анальгетика под коммерческим названием «приалт».⁶⁴

Голотурии (Holothurioidea) — один из классов иглокожих (тип Echinodermata), представленный, в своем большинстве, мягкотелыми и лишенными механических средств защиты малоподвижными животными. Однако они успешно выживают, а на больших глубинах являются одними из самых массовых донных (бентосных) животных. Некоторые представители отряда Aspidochirotrida (семейство Holothuridae) из этого класса иглокожих снабжены специализированными железами (так называемыми «кьюьеровыми органами»). Последние представляют собой клейкие трубочки, содержащие большие количества высокотоксичных для рыб тритерпеновых гликозидов. При приближении хищной рыбы или механическом раздражении эти животные выбрасывают через анальное отверстие такие трубочки. В морских аквариумах это приводит к немедленной гибели рыбы из-за гемолиза в жаберных капиллярах, а в естественных условиях — к отпугиванию хищника. Жители некоторых коралловых островов издавна использовали голотурий для «глушения» рыбы в небольших лагунах выдавливанием в воду внутренностей, содержащих гликозиды.

Некоторые виды голотурий не имеют «кьюьеровых органов», однако в мышечных стенках их тела в достаточных количествах содержатся гликозиды с высокой гемолитической активностью. Некоторые голотурии (так называемые «трепанги») являются съедобными и даже промысловыми видами, причем после соответствующей кулинарной обработки они считаются деликатесной и полезной пищей.

Одним из первых изученных⁶⁵ ихтиотоксинов голотурий был голотурин А (21), выделенный из голотурий родов *Holothuria* и *Actinopyga*.

Голотурин из *Holothuria vagabunda* при разбавлении 1 : 100 000 убивает различные виды рыб в течение нескольких минут. Его LD_{50} для мышей составляет 0.75, 70 и 400 мг · кг⁻¹ при внутривенном, внутрибрюшинном и пероральном вве-



дениях соответственно. Таким образом, высокотоксичные при внутривенном введении, эти вещества малотоксичны, если их использовать в пищу (в составе съедобных голотурий). Гемолитические свойства голотурина и других гликозидов голотурий (известно более 200 соединений, причем большая часть открыта российскими учеными^{65,66}) связаны с их способностью взаимодействовать с холестерином плазматических мембран эритроцитов с последующим образованием ион-проводящих пор. Аналогично эти вещества действуют и на другие клетки, содержащие стерин в мембранах, например на клетки опухолей, болезнетворных грибов, развивающиеся эмбрионы морского ежа.⁶⁷

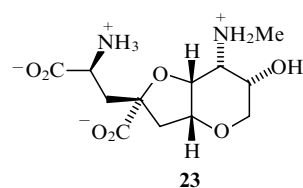
Представители другого класса иглокожих — морские звезды (Asteroidea) — используют похожую стратегию химической защиты от хищников. Они содержат (в основном в своих наружных тканях⁶⁸) вещества, называемые астеросапонинами. Астеросапонины также имеют гликозидную природу, но являются не тритерпеновыми, а стероидными олигогликозидами.⁶⁹ Астеросапонины, например торностерозид А (22) из морской звезды *Acanthaster planci* (известна под названием «терновый венец»), — более слабые гемолитики, чем гликозиды голотурий. Тем не менее они достаточно высокотоксичны для многих морских обитателей.⁷⁰ Эти вещества в концентрации 1–10 мкг·мл⁻¹ обычно токсичны для рыб. Их гемолитические свойства связаны как со строением стероидного агликона, так и с составом и длиной углеводной цепи.⁷¹

Многие виды морских звезд сами являются хищниками и питаются морскими беспозвоночными, в первую очередь моллюсками. Некоторые животные-жертвы способны определять приближение морской звезды, выделяющей астеросапонины в окружающую воду, благодаря наличию специализированных рецепторов, передающих сигнал нервной системе при взаимодействии с этими токсинами.⁷²

Разнообразные мало- и среднетоксичные низкомолекулярные природные соединения были обнаружены в большом числе видов губок, асцидий и мшанок. В большинстве случаев их острая токсичность на животных не изучалась, а исследовались только их цитотоксические свойства. Было найдено несколько десятков цитотоксичных вторичных метаболитов морских беспозвоночных. Некоторые из них были подвергнуты доклиническому, а затем и клиническому тестированию в качестве потенциальных активных субстанций новых противоопухолевых средств. К ним относятся,

например, алкалоиды из асцидий, нуклеозидные производные и макролиды из губок, макролиды из мшанок и многие другие. В результате этих исследований в конце 2007 г. был найден препарат трабектидин (джонделис), который был разрешен к применению в странах Европейского союза для лечения сарком мягких тканей. Его активной субстанцией является алкалоид эктейнаскидин-743 (ЕТ-743), выделенный из асцидии *Ecteinascidia turbinata*, токсичная концентрация которого для опухолевых клеток L-1210 была очень низкой ($IC_{50} = 0.5 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Обсуждение обширного материала, полученного при изучении суперцитотоксинов морских беспозвоночных, выходит за рамки настоящей работы, а интересующиеся могут найти соответствующие сведения в недавнем обзоре⁶⁴ и в цитируемой в нем литературе.

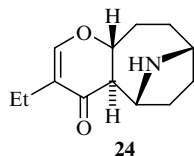
Для некоторых губочных метаболитов изучены токсические и нейротоксические свойства. Например, дизигербаин (23) из микронезийской губки *Dysidea herbacea* представляет собой новую аминокислоту, способную взаимодействовать с глутаматными рецепторами не *N*-метиласпаратного типа (non-NMDA) в центральной нервной системе (ЦНС).



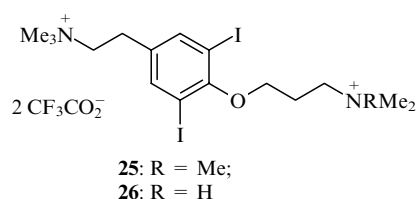
По своему действию на животных дизигербаин напоминает домоевую кислоту, поскольку ингибирует связывание каиноновой кислоты с названными выше рецепторами.⁷³ Недавно описан⁷⁴ полный синтез этого токсина.

Для нескольких токсинов, выделенных в последнее время из съедобных моллюсков, не определено, синтезируются ли они микроводорослями или бактериями и накапливаются моллюсками-фильтраторами, либо эти вещества являются эндогенными метаболитами. Так, отравления при употреблении в пищу моллюска *Atrina muricata* (*Pinna pectinata*) время от времени регистрируются в Китае и Японии. В Японии с 1975 по 1991 гг. от таких отравлений пострадали 2766 человек. В качестве токсических агентов были идентифицированы макроциклические полиэфирные соединения, названные пиннатоксинами.⁷⁵ По своему строению они напоминают азаспирациды и пектенотоксины, активируют

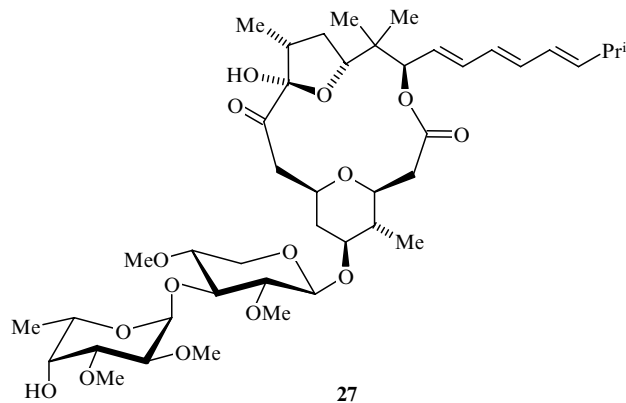
кальциевые каналы и имеют, очевидно, микроводорослевое происхождение. Сопутствующий им алкалоид пиннамин (24) также вызывает токсические симптомы, а его LD_{50} составляет $\sim 500 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ (см. ⁷⁶).



Другой съедобный моллюск — гастроподы *Turbo marmorata* — перед употреблением обычно освобождают от токсичных внутренностей. Из последних были выделены два диодтираминовых производных — турботоксины А (25) и В (26). Эти соединения ингибируют ацетилхолинэстеразу и обладают острой токсичностью с LD_{50} , равной 1 и 4 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно.⁷⁷



Известны случаи тяжелых отравлений красными водорослями рода *Gracilaria* и родственными им видами. Так, в 1991 г. некоторые жители острова Гуам получили тяжелое отравление при употреблении в пищу водорослей *Polycavernosa tsudai*, причем несколько человек — со смертельным исходом. Токсическим метаболитом оказался гликозилированный макролид, названный поликавернозидом А (27).



Соединение 27 представляет собой 13-членный лактон с триеновой боковой цепью, гликозилированный по гидроксильной группе дисахаридным фрагментом, состоящим из метилированных D-ксилозы и L-фукозы.⁷⁸ Абсолютная стереохимия поликавернозида А была установлена после его синтеза в 1998 г. японскими учеными из университетов Хоккайдо и Тохоку.⁷⁹ В других случаях за отравления водорослями рода *Gracilaria* были ответственны токсические вещества — простагландин Е2 и типичные для цианобактерий макролиды аплизиатоксины.⁸⁰

III. Выделение и установление строения морских токсинов

Многие морские токсины содержатся в биосинтезирующих или накапливающих их организмах в очень малых коли-

чествах.⁸¹ Для того чтобы продемонстрировать сложности получения таких соединений в индивидуальном виде, приведем некоторые сведения о последовательности процедур выделения мaitотоксина (18), необходимого для структурных исследований. Данный токсин был получен при культивировании динофлагелляты *Gambierdiscus toxicus* (исходная микроводоросль была собрана с макроводорослей, растущих у берегов островов Гамбии, Французская Полинезия). В течение года в трехлитровых сосудах Фернбаха нарастили 4000 л культуры, которая содержала приблизительно 2 млрд клеток микроводоросли на 1000 л культуры. Само выделение включало следующие операции:

- 1) отделение клеток от культуральной среды фильтрацией,
- 2) экстракцию клеточной массы метанолом,
- 3) концентрирование экстрактов в вакууме,
- 4) удаление липидов хлористым метиленом,
- 5) экстракцию полярной фракции бутиловым спиртом,
- 6) концентрирование бутанольного экстракта в вакууме,
- 7) прямофазную хроматографию на колонке с силикагелем,
- 8) обращенно-фазную хроматографию на колонке с ODS-фазой,
- 9) обращенно-фазную хроматографию на колонке Develosil C8,
- 10) окончательную очистку полученной высокотоксичной фракции многократной ВЭЖХ на колонке Develosil TMS-5.

В результате из 1000 литров культуры получили 4–5 мг чистого токсина.⁵³

Необычные и сложные структуры многих морских токсинов, а также обилие в них асимметрических центров делают установление строения этих веществ сложной проблемой. Они требуют не только применения самых современных химических и физико-химических методов исследования, но и разработки целого ряда новых подходов к структурному анализу.¹

Так, при установлении химического строения палитоксина (17), изобилующего гидроксильными группами (в основном в составе вичинальных триолов и диолов) и содержащего четыре *транс*- и три *цис*-двойные связи и много асимметрических атомов углерода, следовало решить целую серию трудоемких задач, включая определение абсолютной конфигурации всех стереоцентров. Строение палитоксина устанавливали три группы первоклассных ученых: американскую группу из Гавайского университета возглавлял профессор Мур, японские (из нескольких японских университетов) — профессора Хирата и Уемура. Кроме того, в работе самое активное участие принимали американские химики-синтики школы Вудворда из Гарвардского университета во главе с профессором Киши.

Ни само соединение 17, ни его производные, несмотря на многолетние попытки, так и не удалось получить в кристаллическом виде, чтобы применить для установления их строения рентгеноструктурный анализ. Поэтому необходимо было найти стратегию его деградации до сравнительно небольшого числа крупных фрагментов. Установив строение этих фрагментов, а затем проанализировав и просуммировав полученную информацию, можно воспроизвести структуру исходного соединения.

Один из применяемых для деградации нестандартных подходов заключался в неполном периодатном окислении токсина, нанесенного на гидрофобный сорбент. При этом расщеплению подвергались не все диольные, триольные и

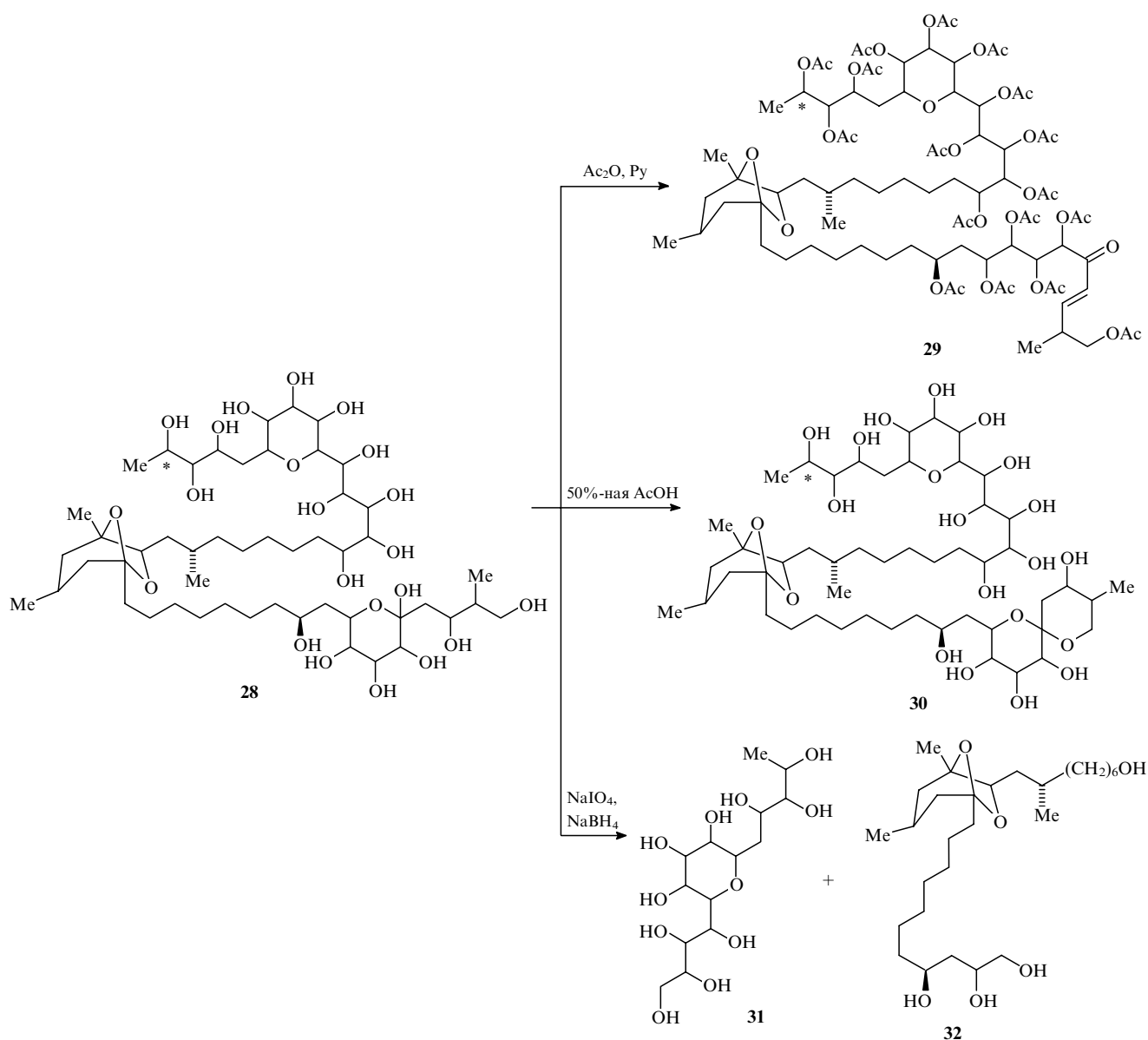
полиольные фрагменты (это дало бы слишком много низкомолекулярных продуктов), а только те из них, которые не были экранированы в результате сорбции.

Другой подход состоял в озонлизе палитоксина или его производных. Около десяти основных продуктов деградации соединения **17** после их выделения подверглись самому тщательному структурному анализу. Их изучали с помощью спектроскопии ЯМР с применением экспериментов со спиновой развязкой (spin-decoupling), а также самых последних на то время разработок в области масс-спектрометрии. Однако использования только физико-химических методов было недостаточно, и исследователям приходилось решать немало возникающих проблем с помощью химических превращений полученных продуктов.

Например, японская группа, сообщившая в 1981 г. о полной расшифровке структуры палитоксина, не включила, однако, данных о стереохимии большинства асимметрических центров. На заключительной стадии работы эта группа устанавливала строение его фрагмента **28** (схема 1).⁴¹

Соединение **28** было получено из *N*-*n*-бромбензоильного производного палитоксина озонлизом с последующим боргидридным восстановлением. Оно представляло собой смесь двух эпимерных полиолов с молекулярной массой 1046 Да (пик с m/z 1069 ($M + Na$)⁺ в масс-спектре с ионизацией десорбции электрическим полем (FDMS)). В спектре ЯМР ¹³C соединения **28** имелся сигнал полуацетального атома углерода при 101.9 м.д. Однако после ацетилирования этот сигнал исчезал, а в спектре появлялись сигналы, характерные для ненасыщенного кетона. Продукту ацетилирования отвечала формула **29**. При обработке 50%-ной уксусной кислотой из соединения **28** образуется спирокеталь **30**. Проанализировать все сигналы в спектрах ЯМР этих соединений было невозможно из-за сложности их строения и того обстоятельства, что и они являлись смесями эпимеров. Наконец, периодатное окисление соединения **28** с последующим восстановлением боргидридом натрия дало более простые по строению фрагменты — соединение **31** и уже изученное к тому времени соединение **32**. Анализ их спектров ЯМР и

Схема 1



спектров всех других соединений этой серии и привел к установлению структуры полиола **28**.

Решение стереохимических проблем при установлении полной структуры палитоксина (**17**) и других сложных морских токсинов было особенно трудоемким. Профессор Киши так писал по этому поводу в своей недавней статье «Палитоксин: неисчерпаемый источник вдохновения — персональный взгляд»⁸² (с англ.): «...наш исследовательский план состоял в следующем:

- 1) синтезировать все возможные изомеры продукта деградации палитоксина из хирального исходного материала с известной абсолютной конфигурацией;
- 2) подтвердить, что все они могут быть различимы спектроскопическими и/или хроматографическими методами;
- 3) найти, который из них соответствует продукту деградации;
- 4) повторить эту процедуру для других продуктов деградации, полученных из токсина;
- 5) установить полную структуру палитоксина, объединив всю эту информацию».

Этот план был осуществлен, и полная структура палитоксина была установлена с участием химиков-синтетиков, в особенности на этапе определения абсолютной конфигурации.

Установление строения маитотоксина (**18**), одного из самых сложных по строению низкомолекулярных вторичных метаболитов, стало не менее значимым событием, чем установление строения палитоксина. Брутто-формулу токсина ($C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$) определили по данным элементного анализа, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР и анализа спектральной информации для полученных фрагментных соединений. Наличие двух сульфатных групп в маитотоксине следовало из сравнения величин m/z для пиков молекулярных ионов в масс-спектрах с ионизацией бомбардировкой быстрыми атомами (FAB MS) самого токсина и его десульфатированного производного.

Как и в случае палитоксина, для установления химического строения маитотоксина выполняли окислительную деградацию. Применяли периодатное окисление с последующим боргидридным восстановлением. Всего расщеплению подвергалось 6 фрагментов, содержащих вицинальные OH-группы: C(16)–C(17), C(36)–C(37), C(53)–C(54), C(57)–C(58), C(69)–C(70) и C(135)–C(136). При этом один из расщепляемых диольных фрагментов (C(36)–C(37), показан на формуле **18** стрелкой) располагался между блоками GHIJK и ABCDEF, что позволило получить два больших фрагмента исходной молекулы с молекулярными массами

964 (фрагмент **A**) и 2328 Да (фрагмент **B**). Кроме того, расщепление полиола по связи C(135)–C(136) давало фрагмент **C**, который, однако, не был выделен из-за его небольшой молекулярной массы.⁵³

Фрагменты **A** и **B** были очищены и подвергнуты тщательному изучению с помощью новейших на тот момент методик ЯМР-экспериментов, таких как COSY (корреляционная спектроскопия), DQF-COSY (корреляционная спектроскопия с использованием двухквантового фильтра), TOCSY (тотальная корреляционная спектроскопия), NOESY (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) и обмена), HSQC (гетероядерная одноквантовая корреляция) и HMBC (гетероядерная многополосная корреляция). На основании полученных данных были установлены структуры обоих фрагментов. На рис. 1 показаны основные результаты, полученные при применении спектроскопии ЯМР для установления структуры фрагмента **A** маитотоксина (**18**), который оказался плоским.

Структуры обоих фрагментов получили подтверждение при изучении их масс-спектров с активированной столкновением диссоциацией ((–)-FAB CAD MS/MS). Этот метод позволяет проследить фрагментацию псевдомолекулярных ионов в условиях бомбардировки быстрыми атомами в камере столкновений. Метод оказался весьма информативным. В спектрах присутствовали пики ионов, образующихся при разрывах каждого из многочисленных циклов в продуктах периодатного окисления, полученных из маитотоксина. В качестве примера показана фрагментация одного из концов соединения **B** (рис. 2).⁵³

Таким образом, в результате изучения маитотоксина с помощью двумерной спектроскопии ЯМР и метода CAD MS/MS, а также в результате анализа строения продуктов его окислительной деградации была установлена структура и частично стереохимия этого токсина.⁵³ Относительные и абсолютные конфигурации всех асимметрических центров в маитотоксине были определены в середине 90-х годов прошлого века исследовательскими группами, возглавляемыми Ясумото,⁸³ Тачибаной^{84,85} и Киши.⁸⁶ Недавние сомнения относительно стереохимии сочленения циклов J и K в маитотоксине, высказанные на основе гипотезы о биосинтезе этого токсина,⁸⁷ не были поддержаны последними работами Николау.⁸⁸

Наиболее широко использовались следующие методы стереохимического анализа сложных морских токсинов:

- 1) определение констант спин-спинового взаимодействия и ядерных эффектов Оверхаузера для протонов, находящихся в местах сочленения циклов;

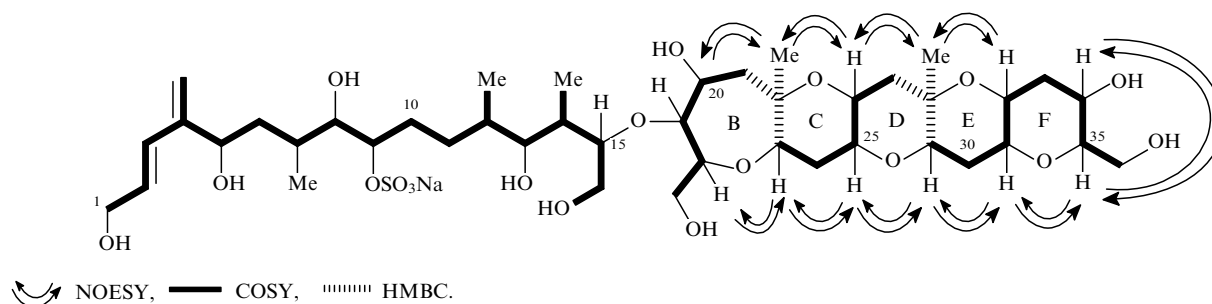


Рис. 1. Некоторые ключевые ЯМР-корреляции фрагмента **A**, полученного из маитотоксина.

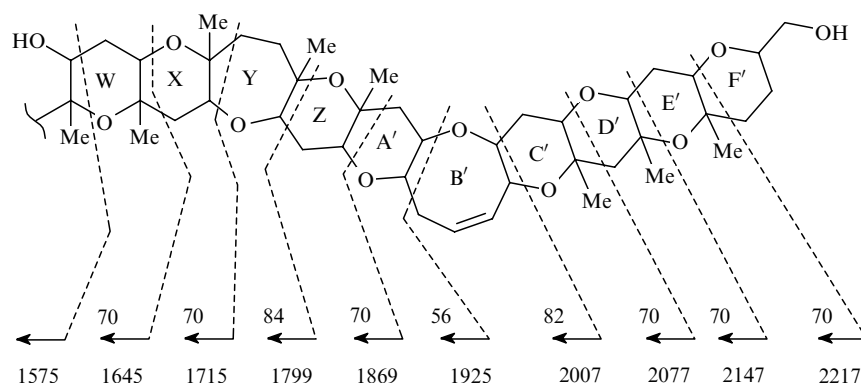


Рис. 2. Фрагментация соединения В, полученного из маитотоксина, в методе (–)-FAB CAD MS/MS.

2) расчет этих и других спектральных параметров методами молекулярной механики и сравнение с экспериментальными данными;

3) синтез хиральных модельных соединений, включающих те или иные циклы, либо фрагментов токсина и сравнение их спектров ЯМР ^1H и ^{13}C со спектрами нативного токсина;

4) определение абсолютной конфигурации отдельных асимметрических центров путем получения их производных с хиральными агентами (хлоридами метоксифенилуксусной или 2-метокси-2-трифторметил-2-фенилуксусной кислоты и др.) с последующим анализом их спектров ЯМР.⁸⁹

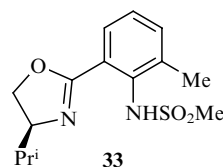
IV. О синтезах морских токсинов

Обширный материал, касающийся полных синтезов морских токсинов, подробно обсуждался в обзорных статьях^{44, 90–94}, поэтому в настоящей работе рассмотрим лишь несколько современных синтетических подходов и реакций, которые многократно применялись в процессе подготовки и осуществления этих синтезов. Такие реакции проводят обычно в мягких условиях, они отличаются высокой эффективностью и, безусловно, будут иметь более широкое применение в будущем.

Мягкие способы сочетания двух соединений с образованием новой ковалентной связи сыграли большую роль в осуществлении синтезов морских токсинов, имеющих различные функциональные группы и многочисленные асимметрические центры. Кроме давно известной реакции Виттига, для этой цели в настоящее время часто применяют ряд других подходов.

Так, Киши^{44, 82} в синтезе палитоксинкарбоновой кислоты использовал реакцию сочетания, катализируемую солями Ni(II) и Cr(II) , которая ведет к образованию связи $\text{C}–\text{C}$ в результате взаимодействия алкенилгалогенида с альдегидом. Реакция протекает в диметилсульфоксиде в присутствии CrCl_2 и следовых количеств NiCl_2 и является усовершенствованным вариантом известной ранее реакции сочетания алкенилгалогенидов с альдегидами, протекающей в присутствии CrCl_2 . Использование следовых количеств NiCl_2 немного увеличивает эффективность процесса. Хотя образование связи $\text{C}–\text{C}$ при взаимодействии указанных выше соединений можно осуществить и с помощью реактивов Гриньяра, литий- или медьорганических соединений, разработанный Киши и сотр.^{44, 82} вариант сочетания имеет целый ряд преимуществ. Во-первых, он пригоден и

для полифункциональных субстратов, в которых химически активные группы защищены различными способами, и, следовательно, может быть использован на последних стадиях многостадийных превращений. Во-вторых, стереоселективность реакции можно повысить введением хирального лиганда **33**.



Такой усовершенствованный способ сочетания называют реакцией Иозаки–Хиямы–Киши. В качестве примера ее применения ниже показан синтез фрагмента $\text{C}(8)–\text{C}(22)$ палитоксина (соединения **34**) из альдегида **35** и алкенил-иодида **36**. Продукт **37** был превращен в бензоат **38**, а потом стереоселективно окислен оксидом осмия(IV) до соединения **34** (схема 2).⁸²

Синтез самой палитоксинкарбоновой кислоты был осуществлен с использованием восьми фрагментов, полученных в препаративных количествах. Они были наработаны синтетиками из Гарвардского университета, а для соединения этих фрагментов друг с другом были использованы реакции сочетания с образованием связей $\text{C}(1)–\text{C}(7)$ и $\text{C}(8)–\text{C}(51)$, а также двойной связи $\text{C}(98)=\text{C}(99)$.^{43, 44, 82}

В синтезах морских токсинов широко применялись различные варианты конденсации, катализируемой палладиевыми комплексами. Общая схема реакций этого типа следующая:



R^1M — металлоорганический реагент, X — галоген или трифлат.

Иногда в качестве заместителя X могут выступать и другие функциональные группы, а в качестве катализаторов можно использовать комплексы палладия с фосфинами (например, $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ или $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$), с дибензилиденацетоном и др.

Реакцию сочетания с участием оловоорганических соединений называют реакцией Стилле. Она часто применяется в синтезе морских токсинов. Например, в полном синтезе родственного сигуатоксину гамбиерола (**39**)⁹⁵ — высокотоксичного производного из *Gambierdiscus toxicus*, —

Схема 2

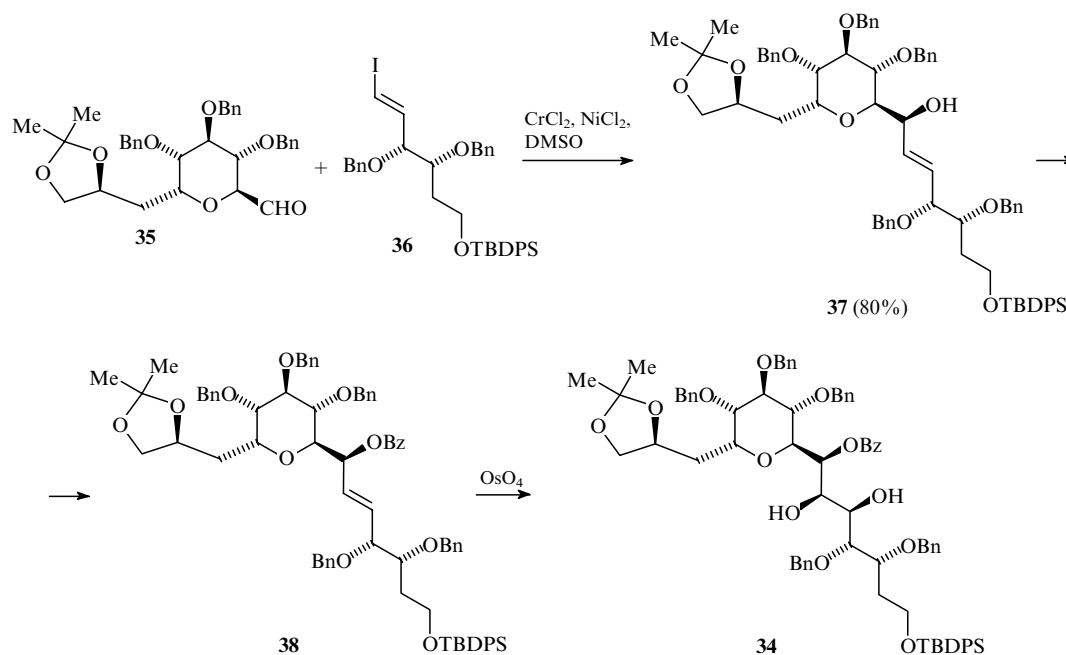
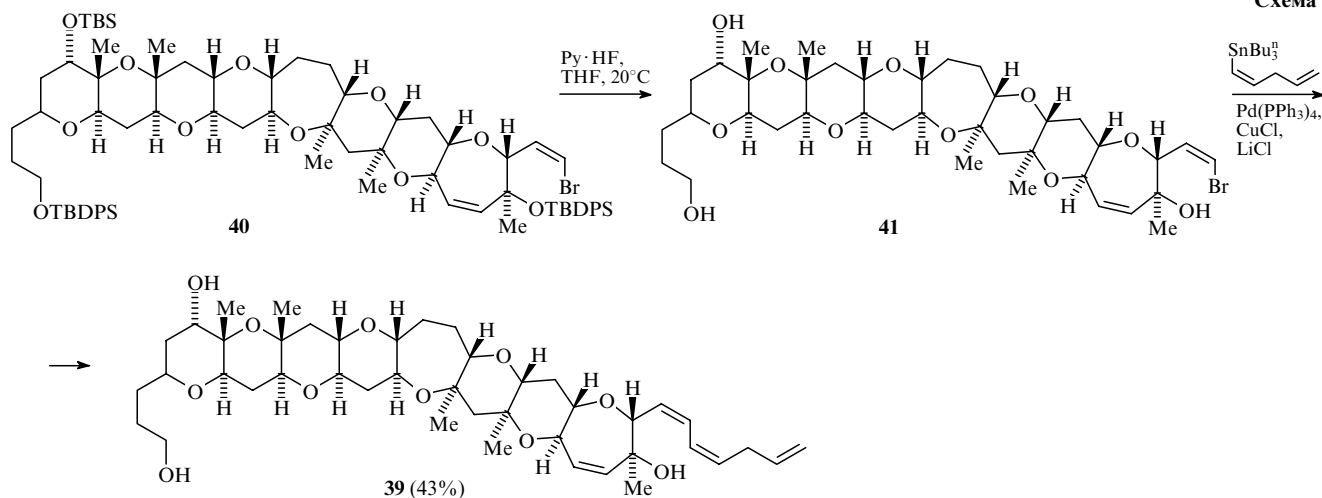
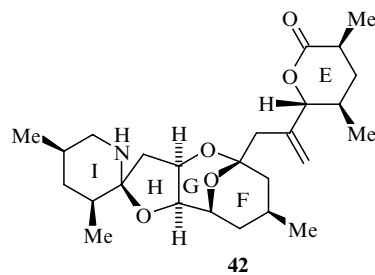
TBDPS = SiPh_2Bu^t .

Схема 3

TBS = SiBu^tMe_2 .

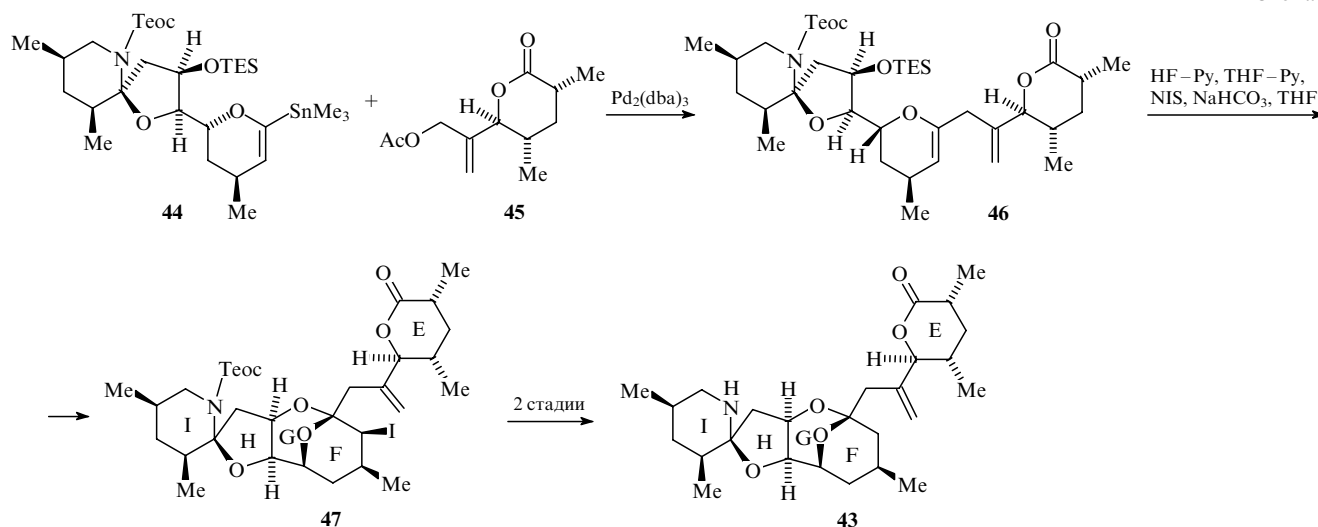
данный метод использовали для построения боковой цепи токсина, содержащей *цис,цис*-диен. На схеме 3 приведен пример использования реакции Стилле в синтезе гамбиерола. Сначала соединение **40** десилилировали, а затем бромид **41** вводили в реакцию с оловоорганическим соединением. Для увеличения эффективности превращения к палладиевому катализатору добавляли CuCl и LiCl (модификация, предложенная Кори).

Николау с соавт.^{96,97} недавно применили близкий вариант сочетания в синтезе азаспирацида-1 (**13**). Так, фрагмент **42** азаспирацида-1, полученный после метилирования карбоксильной группы этого токсина и последующего периодатного окисления, содержал циклы I, H, G, F и E.



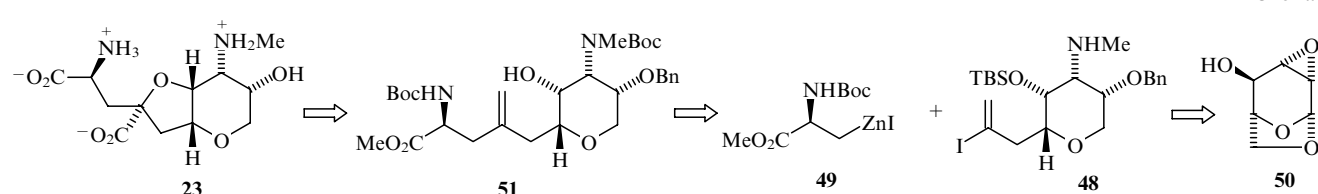
Абсолютную стереохимию фрагмента **42** установили после того, как синтезировали эпимерное по асимметриче-

Схема 4



TES = SiEt₃, Teoc = C(O)O(CH₂)₂SiMe₃, dba — дибензилиденацетон, NIS — *N*-иодсукцинимид.

Схема 5



Boc = CO₂Bu^t.

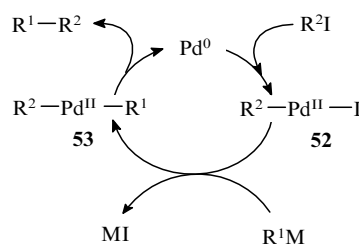
ским центрам в цикле Е соединение **43** (схема 4). В результате ранее предложенная структура азаспирацида-1 была пересмотрена. Ключевой реакцией в синтезе полицикла **43** было соединение друг с другом двух синтезированных веществ — **44**, содержащего циклы I, H, F, и **45**, содержащего цикл Е. В результате образовалось соединение **46**, дальнейшие превращения которого привели к построению цикла G и продукту **47**. Из последнего был далее получен целевой продукт **43**.

Подобная реакция, но основанная на применении цинк-органического производного (реакция Нигиши и ее модификации), была использована недавно в синтезе дизигербаина (**23**).⁷³ Как показал ретросинтетический анализ структуры **23**, представленный на схеме 5, ключевой стадией могла быть реакция галогенида **48** и производного **49** с образованием интермедиата **51**. Галогенид **48** планировалось получить из диангидрогексозы **50**. Удалось полностью осуществить план синтеза, причем реакция **48** + **49** $\rightarrow$ **51** протекала с высоким выходом продукта при использовании в качестве катализатора PdCl₂(PPh₃)₂.

Киши⁴⁴ при синтезе палитоксина (**17**) использовал усовершенствованную конденсацию борорганического производного и алкенилиодида (реакцию Сузуки–Мияуры⁹⁸). Одной из основных проблем было соединение двух фрагментов с образованием связи C(75)–C(76). Сам палитоксин нерастворим в органических растворителях, поэтому на заключительных стадиях его синтеза применяли смеси растворителя и воды. Данный способ сочетания имеет важное преимущество перед другими методами, поскольку его можно осуществлять в присутствии воды. Соединение двух

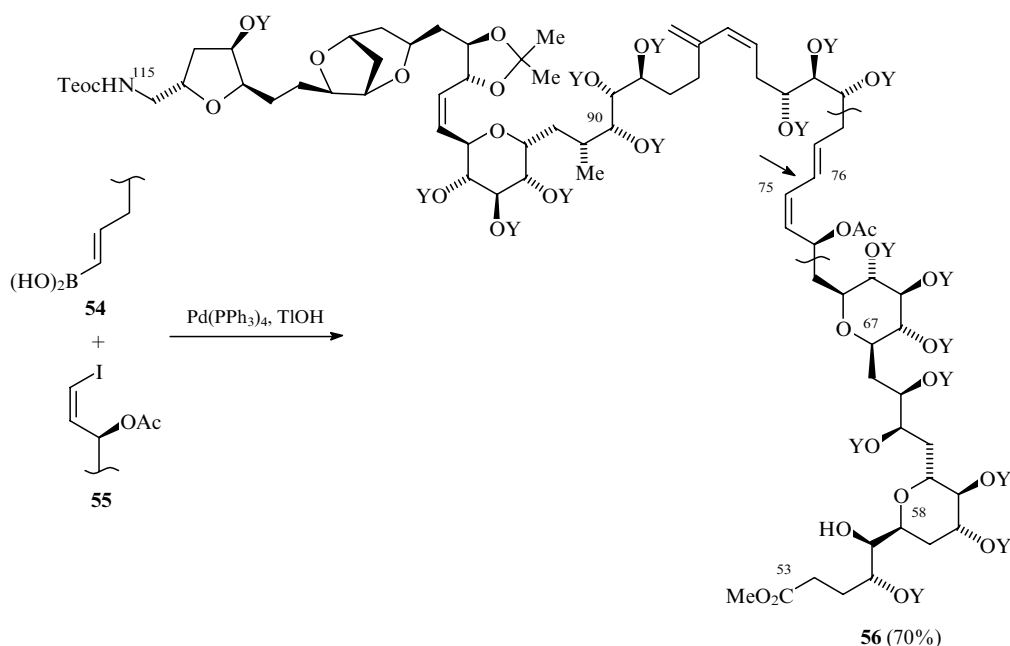
исходных веществ, целью которого было построение *транс*–*цис*-диеновой системы в образующемся продукте, хорошо протекало для сравнительно небольших модельных субстратов, но с увеличением размеров молекул выход целевых продуктов резко уменьшался. Для решения этой проблемы был проанализирован механизм данной реакции в присутствии Pd(0)-катализаторов (схема 6). Установлено, что на первой ее стадии происходит окислительное присоединение винилиодида к палладию с образованием комплекса двухвалентного палладия **52**. Затем этот комплекс реагирует с алкенилборатом и происходит замещение атома галогена на фрагмент борорганического реагента. В результате образуется новый комплекс **53**. Восстановительное отщепление продукта реакции от комплекса **53** приводит к регенерации палладиевого катализатора.

Схема 6



Киши⁴⁴ установил, что прибавление TlOH к реакционной смеси резко увеличивает эффективность взаимодействия, поскольку замена аниона в комплексе **52** дает нерастворимый в реакционной смеси TlI. Это усовершенствование позволило

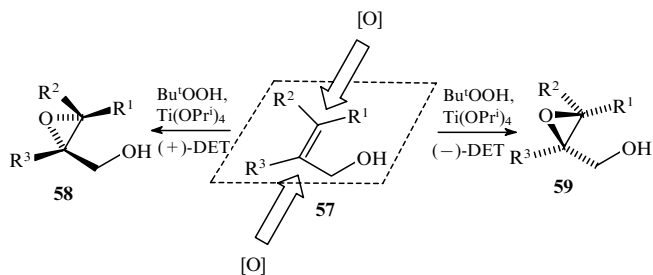
Схема 7



провести требуемую реакцию сочетания субстратов **54** и **55** с образованием с высоким выходом фрагмента C(53)–C(115) (левой половины) палитоксина (**56**) (схема 7).

Важную роль при осуществлении синтезов морских токсинов сыграла разработка эффективных способов получения тетрагидропиранов и других кислородсодержащих циклов, которыми богаты многие полиэфирные морские токсины. Для синтеза циклических эфиров было разработано несколько подходов. Один из них заключается в циклизации гидроксвинилэпоксидов. Асимметрическое эпоксидование непредельных спиртов, пригодное для получения таких эпоксидов, было незадолго до этого разработано в Стэнфордском университете, и сейчас известно как эпоксидование по Шарплессу.⁹⁹ Эпоксидование протекает при обработке соответствующего аллильного спирта **57** (+)- или (–)-диэтилтарtratом, тетраизопропилатом титана и *tert*-бутилгидропероксидом в хлористом метиле при низкой температуре. Использование энантиомерных тарtratов приводит к атаке атомом кислорода плоскости двойной связи с разных сторон и, следовательно, дает разные стереоизомерные эпоксиды (**58** или **59**) (схема 8).

Схема 8

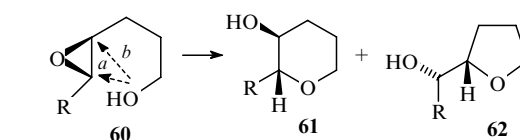


DET — диэтилтарtrat.

6-Эндо-циклизация гидроксвинилэпоксидов, разработанная Николау,¹⁰⁰ изучалась на примере циклизаций модельных соединений при катализе 10-камфорсульфоновой

кислотой (CSA) в хлористом метиле. Было установлено, что направление циклизации (преимущественное образование 6-эндо- или 5-экзо-продуктов) для соединений с общей формулой **60** зависит от заместителя R. Если R содержит винильную группу, то образуется только 6-эндо-продукт **61**, а при отсутствии кратной связи в этом заместителе — 5-экзо-продукт **62** (схема 9).

Схема 9



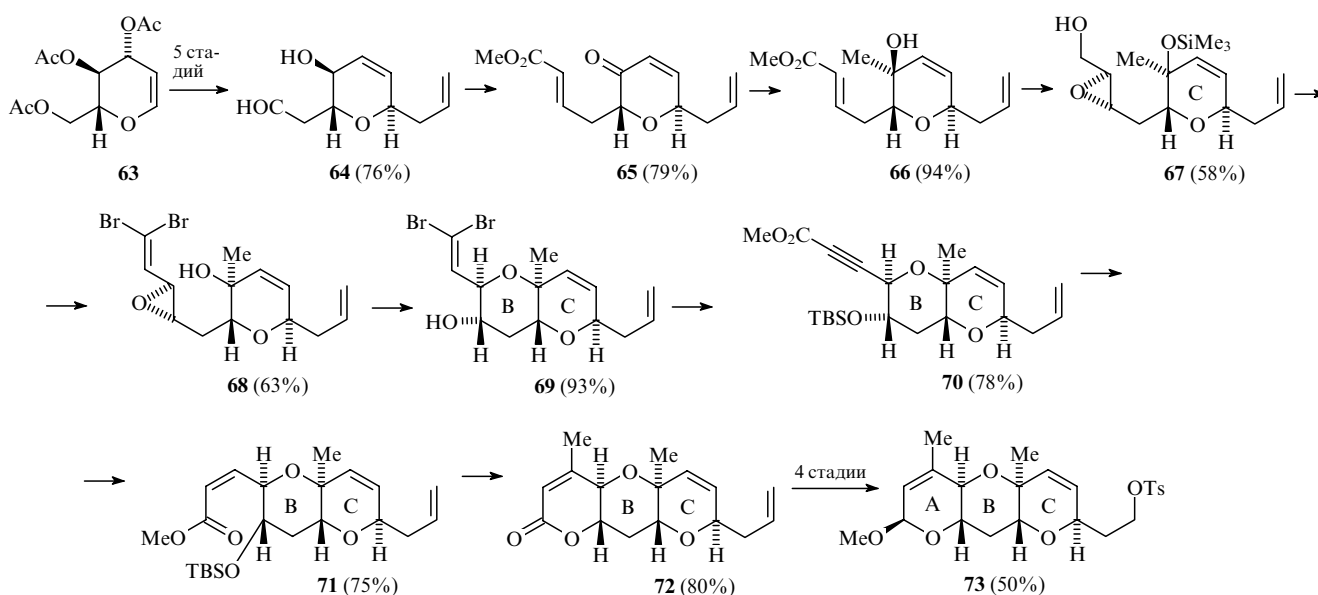
a — 6-эндо-циклизация; b — 5-экзо-циклизация.

R	61 : 62
CH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	0 : 100
CH=CH ₂	100 : 0
CH=CHCO ₂ Me	60 : 40
CH=CBr ₂	100 : 0

Винильный заместитель относительно легко может быть введен в исходное соединение, а его дальнейшие модификации открывают путь к подготовке следующей 6-эндо-циклизации при синтезе полициклических фрагментов полиэфирных токсинов. Таким образом, был найден общий подход к решению проблемы получения фрагментов морских токсинов, содержащих несколько тетрагидропирановых циклов.

Данный подход был применен для асимметрического синтеза фрагмента бреветоксина В (**6**), содержащего циклы А, В и С (схема 10).¹⁰⁰ Исходным соединением служил триацетил-D-глюкаль (**63**), из которого в 5 стадий — обработкой аллилтриметилсианом и TiCl₄, затем карбонатом калия в метаноле с последующим превращением гидроксиметильной группы в альдегидную — было получено производное **64**.

Схема 10

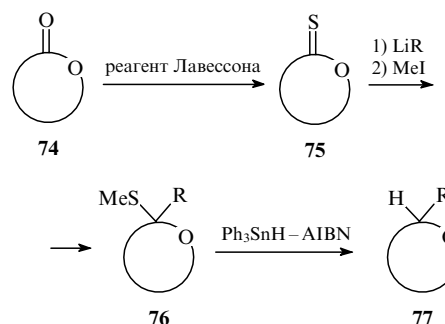


Конденсация соединения **64** с $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Me}$ по Виттигу с последующим мягким окислением по Сверну (окисление спиртов до карбонильных соединений под действием системы $\text{Me}_2\text{SO}-(\text{COCl})_2$ (см.¹⁰¹)) и взаимодействие промежуточного непердельного кетона **65** с AlMe_3 привели (преимущественно) к необходимому для дальнейших превращений спирту **66**. Последний после силилирования, восстановления сложноэфирной группы и асимметрического эпексидирования по Шарплессу был превращен в производное **67**, содержащее цикл С целевого фрагмента. Далее новое окисление по Сверну и реакция Виттига с последующим десилированием привели к соединению **68**, пригодному для 6-*эндо*-циклизации с образованием цикла В. Полученное в результате такой циклизации производное **69** содержало уже два из трех необходимых циклов. Его силилирование *трет*-бутилдиметилхлорсиланом и реакция с избытком бутиллития и MeOCOCl дали ацетиленовый эфир **70**. Обработка эфира **70** метилмагнийхлоридом и CuI при низкой температуре привела к ненасыщенному эфиру **71**, при последующей обработке которого с тетрабутиламмонийфторидом происходит циклизация с образованием соединения **72**, содержащего циклы А, В и С бреветоксина. После ряда превращений в цикле А и боковой цепи из соединения **72** получили целевое производное **73**, которое использовали в полном синтезе бреветоксина **6**.¹⁰²

Другой предложенный Николау с соавт.¹⁰³ метод синтеза циклических эфиров заключается в нуклеофильном присоединении литийорганических соединений к тиолактонам с последующим восстановлением полученных аддуктов. Исходными веществами в этом случае являются доступные лактоны общей формулы **74**, в том числе макроциклические. Следует отметить, что лактоны нельзя напрямую использовать в реакциях нуклеофильного присоединения из-за неустойчивости продуктов (их склонности к разрыву цикла), поэтому их сначала превращали в тиолактоны под действием реагента Лавессона (2,4-бис(4-метоксифенил)-1,3,2,4-дитиадифосфетан-2,4-дисульфида, полученного из анизолы при нагревании его в P_2S_5 ¹⁰⁴). Николау с соавт.¹⁰³ показал, что тиолактоны с семи–семнадцатичленными циклами общей формулы **75** при реакции с различными литийоргани-

ческими соединениями в ТГФ (-78°C) и последующей обработке реакционной смеси метилиодидом дают аддукты **76** с выходами, близкими к количественным. Восстановление аддуктов **76** проводят действием Ph_3SnH (катализатор — AIBN) при нагревании в толуоле. Суммарный выход продуктов — замещенных циклических эфиров **77** — составляет 70–80% (схема 11).

Схема 11



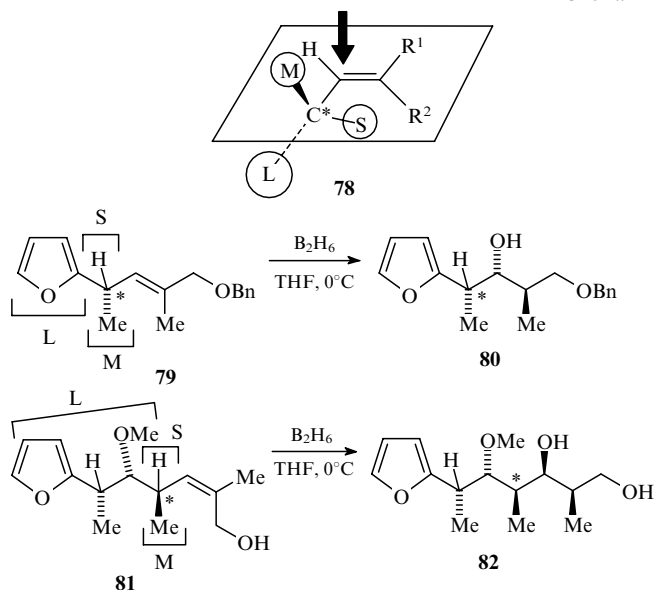
$\text{R} = \text{Alk}, \text{CH}_2=\text{CH}$ и т.д.; AIBN — 2,2'-азобис(изобутиронитрил).

Этот метод формирования кислородсодержащих циклов был использован при получении многих полиэфирных морских токсинов.

Важное значение при синтезе морских токсинов, имеющих в своих структурах большое число стереогенных центров, имела разработка направленных стереоспецифических методов введения гидроксильных групп в субстрат, уже содержащий такие центры. К таким методам относится, например, гидроборирование. Стереохимические особенности гидроборирования хиральных субстратов были изучены Киши с соавт.⁴⁴ еще до использования им этого метода для установления строения палитоксина. Они основывались на том, что преимущественной конформацией непердельных соединений, имеющих асимметрический центр рядом с двойной связью, является в большинстве случаев конформация **78** (схема 12).

Другими словами, наибольшей устойчивостью обладает такой ротамер, у которого наименьший заместитель (S) при

Схема 12



асимметрическом атоме углерода располагается в плоскости двойной связи (из-за стерического взаимодействия с заместителем R^2 это выгоднее, чем расположение в этом месте более крупных заместителей). Следовательно, подход реагента к двойной связи будет менее затруднен со стороны среднего по размеру заместителя (М), чем со стороны большего заместителя (L). Это обстоятельство определяет результаты гидроборирования и позволяет стереонаправленно вводить гидроксильную группу в соседнее с асимметрическим центром положение. Например, соединение **79** дает при гидроборировании преимущественно изомер **80**, а соединение **81** — изомер **82** с противоположной конфигурацией образующегося в результате реакции асимметрического атома углерода.

Многие из упомянутых здесь реакций были использованы при осуществлении синтезов гемибреветоксина В (**83**), одного из самых простых полиэфирных токсинов, и сыграли важную роль в разработке синтезов более сложных по строению морских токсинов. Первый синтез гемибреветоксина В был осуществлен Николау с соавт.^{105, 106} через 3 года после его выделения.¹⁰⁷ В обзорной статье Накаты⁹⁰ суммированы данные о многочисленных подходах к получению этого соединения, выполненных до 2005 г. Каждый подход описан как последовательность синтетических методов, примененных для формирования четырех циклов и боковой цепи этого токсина.

Синтез Николау был осуществлен по линейной, а не по конвергентной стратегии. В данном подходе цикл А формировали из пентаацетата D-маннозы (**84**) при аллилировании, катализируемом кислотами Льюиса (последовательность превращений **84** → **87**). Цикл В конструировали *эндо*-циклизацией соответствующего винилэпоксида (**88** → **89**). Цикл С был построен последовательным применением тиолактонизации, алкилирования и гидроборирования (**89** → **91**). Цикл D формировали аналогично — тиолактонизацией, алкилированием и метилированием с помощью реагента Гриньяра (**91** → **94**). Наконец, боковая цепь была синтезирована с помощью реакции Виттига и последующего метилирования (**94** → **95** → **83**). Последовательность реакций, используемых для полного синтеза гемибреветоксина В (**83**), в сокращенном виде представлена на схеме 13.

Таблица 1. Применение некоторых реакций в синтезах морских токсинов.

Реакция	Токсины	Ссылки
Реакция Иозаки – Хиямы – Киши	Палитоксин Пиннатоксин А Бреветоксин В	43, 44, 82 110 90
Реакция Стилле	Азаспирацид-1 (–)-Бревенал ^a Амфидинолиды Гамбиерол 16-Эпигамбиерол	96, 97 111 112 95, 113 114
Реакция Сузуки – Мияуры	Палитоксин Бревеналь Гимноцин А Гамбиерол	44 110 90 109, 113
Реакция Нигиши и ее модификации	Дизигербаин Гемибреветоксин Амфидинолид	73 90 112
Эпоксидирование по Шарплессу	Бреветоксин В Гемибреветоксин Гамбиерол	93 90 90
6-эндо- и 7-эндо-Циклизации гидроксвинилэпоксидов	Гемибреветоксин Бреветоксин В Бреветоксин А Гамбиерол	90, 105, 106 90, 93 90, 93 90, 93
Синтез кислородсодержащих гетероциклов через тиолактоны	Гемибреветоксин Бреветоксин А	90, 105, 106 90
Гидроборирование	Палитоксин Гимноцин А Бреветоксин А Гамбиерол	43, 44 90, 93 90 113

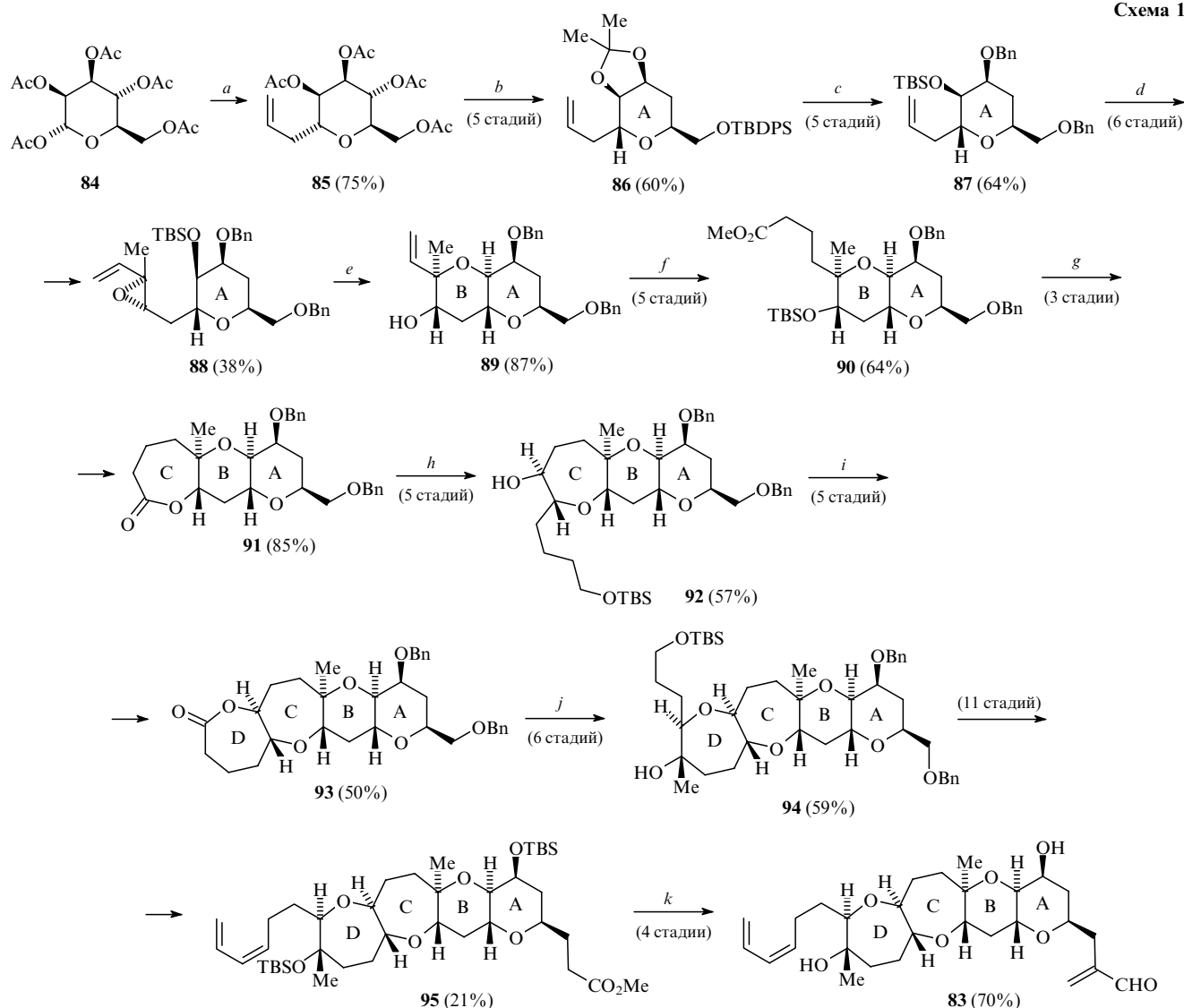
^a Cu(I)-тиофен-2-карбоксилатная модификация реакции.

Применение этих и других подходов в синтезах различных морских токсинов обсуждено в недавних обзорных статьях японских химиков.^{108, 109} Большинство синтезов осуществлено по конвергентным стратегиям через сочетание полученных заранее структурных блоков. В табл. 1 даны примеры применения некоторых упомянутых в настоящей статье реакций в синтезах морских токсинов, в основном выполненных уже в XXI веке.

V. Обнаружение морских токсинов и определение их содержания

Интоксикации, связанные с употреблением в пищу некоторых видов морских организмов, в особенности моллюсков и рыбы, наносят ущерб здоровью жителей многих стран. С токсичностью морепродуктов связаны также экономические потери из-за отбраковки части морских урожаев. Бурное развитие марикультурных хозяйств по всему миру и рост добычи рыбы и других морепродуктов на тропических акваториях делают проблему морских токсинов с каждым годом все более актуальной. Решение этой проблемы невозможно без разработки высокочувствительных и специфич-

Схема 13



a — $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{TMS}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, TMSOTf; *b* — 1) MeONa , 2) TBPSCl, Im, 3) CSA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{OMe})\text{Me}$, 4) $\text{Im}_2\text{C}=\text{S}$, 5) Bu_3SnH , AIBN; *c* — 1) TBAF, 2) NaH, BnBr, 3) TFA, 4) Bu_3SnO , BnBr, CsF, 5) TBSOTf, 2,6-лутидин; *d* — 1) O_3 , CH_2Cl_2 , Ph_3P , 2) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{C}(\text{Me})\text{CO}_2\text{Me}$, 3) DIBALH, 4) Sharpless AE, 5) $\text{SO}_3\text{-Py}$, 6) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$; *e* — 1) TBAF, 2) CSA; *f* — 1) TBSOTf, 2) $\text{BF}_3\text{-THF}$, H_2O_2 , 3) Swern ox, 4) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Me}$, 5) H_2 , Pd/C; *g* — 1) LiOH, THF, 2) TBAF, 3) 2,4,6- $\text{Cl}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COCl}$, Et_3N , DMAP, PhH; *h* — реагент Лавессона, 2) $\text{TBSO}(\text{CH}_2)_4(2\text{-Th})\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2$, 3) LiHMDS, PhNTf_2 , HMPA, 4) $\text{BH}_3\text{-THF}$, 5) H_2O_2 , NaOH; *i* — 1) Ac_2O , 2) CSA, $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 3) PDC, DMF, 4) K_2CO_3 , MeOH, 5) 2,4,6- $\text{Cl}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COCl}$, Et_3N , DMAP, PhH; *j* — 1) реагент Лавессона, 2) $\text{TBSO}(\text{CH}_2)_3(2\text{-Th})\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2$, 3) $\text{BH}_3\text{-THF}$, 4) Swern ox, 5) DBU, PhMe, 6) MeMgBr ; *k* — 1) DIBALH, 2) Swern ox, 3) $\text{CH}_2=\text{NMe}_2$, Et_3N , 4) SiF₄, MeCN- CH_2Cl_2 ; TMS — триметилсил, Tf — трифторметаносульфил, Im — имидазол-1-ил, TBAF — тетрабутиламмоний фторид, TFA — трифторуксусная кислота, DIBALH — диизобутилалюминийгидрид, Sharpless AE — асимметрическое эпексидирование по Шарплессу, Swern ox — окисление спиртов по Сверну, DMAP — 4-диметиламинопиридин, Th — тиенил, HMDS — гексаметилдисилазид, HMPA — гексаметилфосфорамид, DBU — 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундекан.

ных методов анализа морских токсинов. Эти методы непрерывно совершенствуются на протяжении многих лет, причем их развитие оказало существенное влияние на развитие целого ряда аналитических методов химии.

1. Методы анализа, основанные на использовании биологических тест-систем

Наличие токсинов часто определяют тестированием биоматериала на острую токсичность на мышах (так называемый MBA-Test). Преимуществом метода является его

исключительная простота и получение быстрого ответа на вопрос, представляет ли анализируемый биологический материал опасность для человека и животных. Метод используется во многих странах. Однако, несмотря на его простоту, он относительно дорог, связан с серьезными этическими проблемами и не дает информации о природе токсинов. Хотя тестирование на мышах и является одним из стандартных методов морской токсикологии по правилам официальных организаций, таких как Объединенный экспертный комитет по пищевым добавкам Всемирной Органи-

зации Здравоохранения, оно все же не имеет всеобщего применения.

Другие биологические методы, основанные, например, на использовании рецепторов и каналов в мембранах клеток, применяются относительно редко.¹¹⁵ С помощью таких тестов можно обнаружить и количественно определить только те токсины, для которых известны молекулярные механизмы действия и доступны соответствующие молекулярные мишени. Чаще всего проводят тестирование с определением действия пробы на натриевую проводимость электровозбудимых каналов или измерением концентраций некоторых ионов (selected ion monitoring, SIM).^{116–118} Эти методики используют в основном для определения содержания тетродотоксина или PSP-токсинов.

Наконец, для некоторых групп токсинов пригодны биотесты, основанные на измерении активности ферментов. Так, существуют тест-системы для измерения действия образца на протеинфосфатазы, например коммерческий колориметрический протеинфосфатазный тест (VDM-Test). С его помощью определяют содержание окадаевой кислоты и некоторых других DSP-токсинов.^{119, 120}

2. Физико-химические методы анализа

Методы, основанные на применении хроматографии, позволяют количественно оценивать содержание токсинов и дают информацию о составе фракций токсинов.¹²¹ В то же время разные группы токсинов существенно отличаются друг от друга по своей химической природе и хроматографическим свойствам, и, следовательно, для каждой из них требуются специфические условия хроматографирования и детектирования.

Например, нейротоксины, включая PSP-токсины, обычно анализируют жидкостной хроматографией с последующим флуоресцентным детектированием (LC-FD). Для этого токсины подвергают окислительной или щелочной обработке с превращением их во флуоресцирующие производные.

В современных вариантах анализа применяют как доколониальную, так и постколониальную модификацию токсинов.¹²² Этот метод был недавно использован для определения так называемого «профиля токсинов», т.е. состава фракции токсинов микроводоросли *Alexandrium catanella*, собранной у берегов Чили.¹²³ Морфогенетические различия и токсичность большой серии образцов микроводоросли *A. tamarense*, собранных у восточного побережья России, были изучены в работе Орловой с соавт.¹²⁴ Используя ВЭЖХ, авторы показали, что все образцы, независимо от морфогенетических особенностей микроводорослей, содержали PSP-токсины.

Многие токсины не дают флуоресцирующих продуктов после окисления или других химических обработок. В этих случаях в их молекулы сначала вводят флуоресцирующие метки, а затем уже выполняют анализы с помощью ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Например, полиэфирные токсины можно превратить в анализируемой пробе во флуоресцирующие производные при обработке 9-антраценил-диазометаном. Дальнейшее применение ВЭЖХ позволяет обнаруживать в анализируемых окадаевую кислоту и другие DSP-токсины.¹²⁵

Следует отметить, что LC-FD и другие хроматографические методы иногда дают ложные результаты.⁶ Поэтому ВЭЖХ часто применяют вместе с масс-спектрометрией. Такой комбинированный метод анализа (LC-MS) токсичных фракций является в настоящее время одним из основных, в

особенности в исследовательских проектах, которые касаются морских токсинов. Определение в процессе анализа не только времен удерживания соответствующих токсинов, но и их масс-спектрометрических характеристик многократно увеличивает надежность полученных данных.

Применение LC-MS с каждым годом расширяет географию исследования морских токсинов. Например, этим методом и при изучении активации натриевых каналов на клетках нейробластомы N2a было показано, что синуатеротоксины присутствуют в хищных рабах, обитающих у берегов Камеруна (западное побережье Африки).¹²⁶ Азаспирациды были обнаружены в мидиях, собранных у берегов Марокко в Средиземном море.¹²⁷ Пектенотоксин-1 был найден в фитопланктоне Северного моря.¹²⁸

Приборы для LC-MS-анализа непрерывно совершенствуются. Так, недавно было выполнено сравнение четырех типов масс-спектрометров — трехквадрупольного (TQ), времяпролетного (TOF), квадрупольного времяпролетного (q-TOF) и масс-спектрометра с ионной ловушкой (IT) — в анализе окадаевой кислоты и пектенотоксина-2. Обнаружено, что все четыре масс-спектрометрических детектора показывают линейную зависимость интенсивности пиков молекулярных ионов от концентрации этих токсинов и хорошую воспроизводимость результатов, однако чувствительность определения была самой лучшей при применении TQ-прибора. С его помощью можно обнаружить такие малые количества, как 12.2 пг окадаевой кислоты и 2.9 пг пектенотоксина-2, при их нанесении на колонку для LC-MS-анализа.¹²⁹

Недавно появились сообщения об успешном применении MALDI трехквадрупольной масс-спектрометрии для детектирования и количественного определения спиролидов¹³⁰ и масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI MS) для анализа DSP-токсинов и йезотоксинов.^{131, 132}

Совершенствуются и способы пробоподготовки образцов. Было предложено использовать предварительную твердофазную сорбцию растворимых в морской воде соединений на специальном синтетическом пористом полимерном материале (SPATT bags). Выделяющиеся при массовом развитии токсичных микроводорослей липофильные токсины могут быть экстрагированы с них и подвергнуты LC-MS-анализу для обнаружения азаспирацидов, аналогов окадаевой кислоты и других токсинов.¹³³ Аналогичный подход с использованием C18-твердофазной сорбции был применен для определения домоевой кислоты в морской воде и фитопланктоне.¹³⁴ Кроме того, такая сорбция может уменьшить так называемые «матричные эффекты» — влияние посторонних веществ на интенсивность пиков в масс-спектрах. Наилучшие результаты давали предварительная сорбция образцов на полимерные сорбенты и хроматографирование с использованием систем растворителей, содержащих основания.¹³⁵

Для очистки экстрактов, полученных из моллюсков и содержащих DSP-токсины, было предложено перед LC-MS-анализом удалять посторонние примеси с помощью гелепроникающей хроматографии.¹³⁶

Однако самым значительным усовершенствованием стало применение для обнаружения токсинов LC-MS-MS-анализа. Приборы с tandemным масс-спектрометрическим детектором позволяют не только идентифицировать характеристические пики в масс-спектрах изучаемых веществ, но и устанавливать последовательности масс-спектрометрических распадов, т.е. происхождение любого фрагментного

иона. В результате идентификация большинства токсинов этим методом становится достоверной.

Данным методом, например, удалось определить диаретические токсины в экстрактах, для получения которых использовалось только по одной клетке каждого из нескольких видов *Dinophysis*, собранных у острова Хоккайдо.¹³⁷ Сообщалось об установке приборов такого типа на научно-исследовательских судах, что позволяет осуществлять анализ непосредственно при сборе биологического материала, а не из доставленных в специализированную лабораторию проб. Например, с помощью LC-MS-MS с борта судна анализировались образцы фитопланктона, собранные у побережья Норвегии, Шотландии и Дании, причем в микроводорослях Северного моря чаще всего находили домовую кислоту и 20-метилспиролид G.¹³⁸

Из еще более чувствительных, чем LC-MS, физико-химических методов следует упомянуть капиллярный электрофорез. Он применим, прежде всего, для анализа токсинов, содержащих легкоионизирующиеся группы, например домоевой кислоты,¹³⁹ а в комбинации с ESI MS был использован недавно для определения содержания йезо- и пектено-токсинов в моллюсках.¹⁴⁰

3. Иммунологические методы

Иммунологические методы, включая иммуноферментный и иммуносорбентный анализы, также широко применяются для обнаружения и определения концентрации морских токсинов. Существуют хорошо разработанные протоколы таких анализов и продаются необходимые наборы реагентов. Как известно, иммуноферментный анализ основан на использовании антител к соответствующим токсинам. Для выработки антител необходимо получить синтетический антиген, состоящий из белковой молекулы (например, альбумина) и связанных с ним ковалентными связями молекул токсина (гаптена). Иммунизация животных таким антигеном и приводит к выработке антител.

Однако многие морские токсины малодоступны, а для иммунизации животных с целью получения антител требуются их относительно большие количества. Недавно было показано, что вместо нативного токсина можно использовать его фрагменты, полученные органическим синтезом. Огури¹⁴¹ для обнаружения и количественного определения сигуатоксина ЗС использовал два синтетических соединения — содержащие циклы А, В, С, D, Е и циклы I, J, K, L, М сигуатоксина (19) соответственно. Оба гаптена присоединяли к белку, а после иммунизации мышей полученными антигенами нарабатывали моноклональные антитела к «левой» и «правой» половинам токсина, а затем «правые» антитела конъюгировали с пероксидазой. Разработанный на основе этих антител фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA) (рис. 3) был высокочувствительным к сигуатоксину и не давал перекрестных реакций с близкими по строению токсинами, в том числе бреветоксинами и окадаевой кислотой.

Разработка иммунобиосенсоров — другое направление в современном анализе морских токсинов. В последние годы для разработки биосенсоров широко используется поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Оптический сенсор на основе SPR был применен для обнаружения окадаевой кислоты в моллюсках. Моноклональные антитела к окадаевой кислоте были получены после иммунизации мышей синтетическим антигеном на основе тироглобулина с присоединенной к его молекулам окадаевой кислоты. Антитела

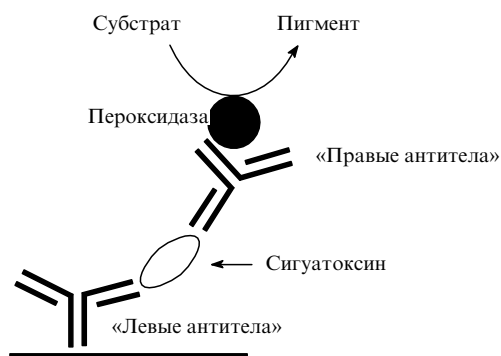


Рис. 3. Схема иммуноферментного анализа сигуатоксина.¹⁴¹

были иммобилизованы на поверхности чипа и позволяли на одном чипе выполнять до 50 анализов. По чувствительности метод не уступал LC-MS.¹⁴²

VI. Заключение

Среди морских токсинов были найдены уникальные по химическому строению и по биологическому действию вещества. Это обстоятельство стимулировало возникновение ряда плодотворных химических идей в области органического синтеза, способствовало развитию и совершенствованию физико-химических методов исследования органических соединений, в равной мере используемых как в органической, так и в биоорганической химии. В самом деле, многие морские токсины стали целевыми соединениями многостадийных синтезов, при осуществлении которых были применены новые стратегии, реагенты и стереоспецифические реакции. При структурном изучении этих веществ были впервые опробованы новые методики спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии, развиты подходы к определению абсолютной конфигурации стереоцентров в органических соединениях, сочетающие синтез модельных соединений и физико-химический анализ. Кроме того, эти работы привели к созданию нескольких лекарственных препаратов, повлияли на современные представления о природных химических средствах защиты и нападения, используемых в живых системах.

Изучение биологических эффектов токсинов и молекулярных механизмов их действия сыграли важную роль в изучении молекулярных механизмов распространения нервных импульсов и функционирования транспортных систем в биомембранах. Эти исследования оказали существенное влияние на развитие таких биологических наук, как физиология и медицина, биохимия и химическая экология.

Вместе с тем существуют и нерешенные проблемы, связанные с изучением морских токсинов. Например, не вполне очевидным остается биогенез некоторых из них, в частности вопрос об истинном продуценте ряда высокоактивных полиэфирных токсинов. В самом ли деле они биосинтезируются микроводорослями или все же симбиотными им морскими бактериями? На бактериальное происхождение могут указывать сходство таких веществ с полиэфирными антибиотиками бактерий и наличие токсичных и нетоксичных линий у микроводорослевых продуцентов этих веществ. Недавно при изучении генома неаксенического штамма динофлагеллаты *Karenia brevis* были найдены и амплифицированы три гена, кодирующих поликетидсинтазы — ферменты, которые катализируют биосинтез бреветоксинов. Было показано их сход-

ство с генами, найденными в одном из представителей простейших *Cryptosporidium parvum*. Локализация этих генов была определена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), проточной цитометрии и флуоресцентной гибридизации *in situ*. Установлено, что два из трех этих генов локализованы исключительно в клетках микроводоросли, однако третий был найден как в этих клетках, так и в бактерии, ассоциированной с микроводорослью.¹⁴³

Актуальным остается и вопрос быстрой и надежной идентификации токсичных видов микроводорослей в пробах фитопланктона. Для решения этой проблемы было предложено использовать флуоресцентную гибридизацию *in situ* и технологию ДНК-чипов,^{144, 145} но пока они не нашли широкого применения.

В большинстве случаев неясно, каковы молекулярные механизмы защиты продуцентов и накапливающих токсины макроорганизмов от действия этих токсинов. Большинство морских животных чувствительны к морским токсинам. Например, в конце 80-х годов прошлого столетия были отмечены многочисленные случаи гибели китов у северо-восточного побережья США, которые были вызваны отравлением сакситоксином.¹⁴⁶ Кровь морских млекопитающих поступает преимущественно к мозгу и сердцу, в результате чего эти органы в первую очередь подвергаются действию токсинов. С сакситоксином и его производными нередко связывают и случаи массовой гибели рыбы. Так, массовая гибель сельди летом 1976 г. в заливе Фанди была обусловлена PSP-токсинами.¹⁴⁶ Гибель сельди происходила до того, как содержание сакситоксина в ее тканях достигало уровня, опасного для человека. В то же время моллюски и другие беспозвоночные, накапливающие в тканях морские токсины, обычно не страдают от их действия.

Продуцирование токсинов морскими организмами определяется, по-видимому, влиянием многих факторов. В случае микроводорослей к ним относятся дефицит некоторых питательных элементов (в особенности кремния и фосфора), физические (температура, освещенность) и биологические (влияние бактерий) воздействия.¹⁴⁷ Так, способность диатомей к синтезу домоевой кислоты, как правило, обратно пропорциональна их первичной метаболической активности. Экспериментальные данные подтверждают точку зрения, согласно которой продуцирование домоевой кислоты является реакцией на физиологический стресс, испытываемый диатомеями.¹⁴⁷ Результатом стресса, очевидно, является индукция экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза домоевой кислоты. Однако молекулярные механизмы, которые опосредуют влияние различных факторов на продуцирование этого и других токсинов, пока не известны.

Обзор был написан при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Клеточная и молекулярная биология», Федеральной целевой программы «Мировой океан» (проект № 01.420.1.2.003) и Дальневосточного отделения РАН (проекты 09-ИПА06-213, 06-207, 09-1-П23-01, П23-012, 09-1-П15-03).

Литература

1. T.Yasumoto, M.Murata. *Chem. Rev.*, **93**, 1897 (1993)
2. K.Miyazawa, T.Noguchi. *J. Toxicol. – Toxin Rev.*, **20**, 11 (2001)
3. T.Noguchi, O.Arakawa. *Mar. Drugs*, **6**, 220 (2008)
4. T.Narahashi. *J. Toxicol. – Toxin Rev.*, **20**, 67 (2001)
5. T.Yasumoto, A.Endo, D.Yasumura, H.Nagai, M.Murata, M.Yotsu. *Toxicon*, **26**, 50 (1988)
6. J.Piel. *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 519 (2004)
7. M.Wu, T.Okino, L.M.Nogle, B.L.Marquez, R.T.Williamson, N.Sitachitta, F.W.Berman, T.F.Murray, K.McGough, R.Jacobs, K.Colsen, T.Asano, F.Yokokawa, T.Shioiri, W.H.Gerwick. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12041 (2000)
8. R.E.Levin. *J. Food Biochem.*, **15**, 405 (1992)
9. Y.Shimizu. *Ann. Rev. Microbiol.*, **50**, 431 (1996)
10. А.Е.Валеев, Т.Н.Высоцкая, Г.К.Олейникова, Г.Б.Еляков. *Докл. АН СССР*, **309**, 977 (1989)
11. M.Kodama, T.Ogata, S.Sakamoto, S.Sato, T.Honda, T.Miwatani. *Toxicon*, **28**, 707 (1990)
12. Г.Б.Еляков, В.А.Стоник. *Терпеноиды морских организмов*. Наука, Москва, 1986
13. J.Skov, N.Lundholm, Ø.Moestrup, J.Larsen. *ICES Identification Leaflets for Plankton. Leaflet No 185*. (Ed. J.A.Lindley). ICES, Copenhagen, 1999; <http://www.ices.dk/products/fiche/Plankton/SHEET185.PDF>
14. G.R.Hasle, N.Lundholm. *Phycologia*, **44**, 608 (2005)
15. E.C.D.Todd. *J. Food Protect.*, **56**, 69 (1993)
16. L.Mos. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **9**, 79 (2001)
17. O.M.Pulido. *Mar. Drugs*, **6**, 180 (2008)
18. D.Z.Wang. *Mar. Drugs*, **6**, 349 (2008)
19. K.Nakanishi. *Toxicon*, **23**, 473 (1985)
20. S.M.Watkins, A.Reich, L.E.Fleming, R.Hammond. *Mar. Drugs*, **6**, 431 (2008)
21. K.Tachibana, P.J.Scheuer, Y.Tsukitani, H.Kikuchi, D.Van Engen, J.Clardy, Y.Gopichand, F.J.Schmitz. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2469 (1981)
22. T.Yasumoto, N.Seino, Y.Murakami, M.Murata. *Biol. Bull.*, **172**, 128 (1987)
23. A.B.Dounay, C.J.Forsyth. *J. Curr. Med. Chem.*, **9**, 1939 (2002)
24. H.Fujiki. *Mol. Carcinogen.*, **5**, 91 (1992)
25. K.Larsen, D.Petersen, A.L.Wilkins, I.A.Samdal, M.Sandvik, T.Rundberget, D.Goldstone, V.Arcus, P.Hovgaard, F.Rise, N.Rehmann, P.Hess, C.O.Miles. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 868 (2007)
26. T.Yasumoto, M.Murata, Y.Oshima, M.Sano, G.K.Matsumoto, J.Clardy. *Tetrahedron*, **41**, 1019 (1985)
27. B.Espina, J.A.Rubiolo. *FEBS J.*, **275**, 6082 (2008)
28. M.Satake, K.Terasawa, Y.Kadowaki, T.Yasumoto. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5955 (1996)
29. T.Aune, J.A.B.Aasen, C.O.Miles, S.Larsen. *Toxicon*, **52**, 535 (2008)
30. B.Paz, A.H.Daranas, M.Norte, P.Riobo, J.M.Franco, J.J.Fernandez. *Mar. Drugs*, **6**, 73 (2008)
31. M.Satake, K.Ofuji, H.Naoki, K.J.James, A.Furey, T.McMahon, J.Silke, T.Yasumoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9967 (1998)
32. K.J.James, C.Moroney, C.Roden, M.Satake, T.Yasumoto, M.Lehane, A.Furey. *Toxicon*, **41**, 145 (2003)
33. U.Tillmann, M.Elbrachter, B.Krock, U.John, A.Cembella. *Eur. J. Phycol.*, **44**, 63 (2009)
34. K.C.Nicolaou, T.V.Koftis, S.Vyskocil, G.Petrovic, W.J.Tang, M.O.Frederick, D.Y.-K.Chen, Y.W.Li, T.T.Ling, Y.M.A.Yamada. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2859 (2006)
35. E.Ito, M.Satake, K.Ofui, M.Higachi, K.Harigaya, T.McMahon, T.Yasumoto. *Toxicon*, **40**, 199 (2002)
36. M.J.Twinn, N.Rehmann, P.Hess, G.J.Doucette. *Mar. Drugs*, **6**, 39 (2008)
37. T.Kosuge, K.Tsui, K.Hirai, K.Yamaguchi, T.Okamoto, Y.Iitaka. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 3417 (1981)
38. T.Kosuge, K.Tsui, K.Hirai, T.Fukayama, H.Nukaya, H.Ishida. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2890 (1985)
39. R.E.Moore, P.Scheuer. *Science*, **172**, 495 (1971)
40. R.E.Moore, G.Bartolini. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2491 (1981)
41. D.Uemura, K.Ueda, Y.Hirata, H.Naoki, T.Iwashita. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2781 (1981)

42. J.K.Cha, W.J.Christ, J.M.Finan, H.Fujioka, Y.Kishi, L.L.Klein, S.S.Ko, J.Leder, W.W.McWhorter, K.-P.Pfaff, M.Yonaga, D.Uemura, Y.Hirata. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7369 (1982)
43. R.W.Armstrong, J.M.Beau, S.H.Cheon, W.J.Christ, H.Fujioka, W.H.Ham, L.D.Hawkins, H.Jin, S.H.Kang, Y.Kishi, M.J.Martinelli, W.W.McWhorter, M.Mizuno, M.Nakata, A.E.Stutz, F.X.Talamas, M.Taniguchi, J.A.Tino, K.Ueda, J.Uenishi, J.B.White, M.Yonaga. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7530 (1989)
44. Y.Kishi. *Pure Appl. Chem.*, **70**, 339 (1998)
45. D.W.Hilgemann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 386 (2003)
46. A.Takeuchi, N.Reyes, P.Artigas, D.C.Gadsby. *Nature (London)*, **456**, 413 (2008)
47. T.Inuzuka, D.Uemura, H.Arimoto. *Tetrahedron*, **64**, 7718 (2008)
48. M.Usami, M.Satake, S.Ishida, A.Inoue, Y.Kan, T.Yasumoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5389 (1995)
49. S.Gleibs, D.Mebs, B.Werding. *Toxicon*, **33**, 1531 (1995)
50. V.M.Mahnir, E.P.Kozlovskaya, A.I.Kalinovsky. *Toxicon*, **30**, 1449 (1992)
51. F.E.Russell, N.B.Egen. *J. Toxicol. – Toxin Rev.*, **10**, 37 (1991)
52. T.Nonomura, M.Sasaki, N.Matsumori, M.Murata, K.Tachibana, T.Yasumoto. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 1675 (1996)
53. M.Murata, H.Naoki, S.Matsunaga, M.Satake, T.Yasumoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7098 (1994)
54. K.Wang, R.Nath, K.J.Raser, I.Hajimohammadreza. *Arch. Biochem. Biophys.*, **331**, 208 (1996)
55. R.Frew, Y.S.Wang, T.M.Weiss, P.Nelson, T.W.Sawyer. *Toxicon*, **51**, 1400 (2008)
56. R.J.Lewis, M.Sellin, M.A.Poli, R.S.Norton, J.K.McLeod, M.M.Sheil. *Toxicon*, **29**, 1115 (1991)
57. G.M.Nicholson, R.J.Lewis. *Mar. Drugs*, **4**, 82 (2006)
58. A.H.Daranas, M.Norte, J.J.Fernandez. *Toxicon*, **39**, 1101 (2001)
59. H.Terlau, B.M.Olivera. *Physiol. Rev.*, **84**, 41 (2003)
60. R.Halai, D.J.Craik. *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 526 (2009)
61. T.S.Han, R.W.Teichert, B.M.Olivera, G.Bulaj. *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 2462 (2008)
62. C.A.Ramilo, G.C.Zafaralla, L.Nadasdi, L.G.Hammerland, D.Yoshikami, W.R.Gray, R.Cristipati, J.Ramachandran, G.Miljanich, B.M.Olivera, L.J.Cruz. *Biochemistry*, **31**, 9919 (1992)
63. D.Chung, S.Guar, J.R.Bell, J.Ramachandran, L.Nadasdi. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **46**, 320 (1995)
64. T.F.Molinski, D.S.Dalisay, S.L.Lievens, J.P.Saludes. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 69 (2009)
65. V.A.Stonik, V.I.Kalinin, S.A.Avilov. *J. Nat. Toxins*, **8**, 235 (1999)
66. V.I.Kalinin, A.S.Silchenko, S.A.Avilov, V.A.Stonik, A.V.Smirnov. *Phytochem. Rev.*, **4**, 221 (2005)
67. V.I.Kalinin, D.L.Aminin, S.A.Avilov, A.S.Silchenko, V.A.Stonik. In *Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 35.* (Ed. Atta-ur-Rahman). Elsevier, Amsterdam, 2008. P. 135
68. A.A.Kicha, N.V.Ivanchina, I.A.Gorshkova, L.P.Ponomarenko, G.N.Likhatskaya, V.A.Stonik. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*, **128**, 43 (2001)
69. В.А.Стоник. *Успехи химии*, **70**, 774 (2001)
70. G.G.Habermehl, H.C.Krebs. In *Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 7.* (Ed. Atta-ur-Rahman). Elsevier, Amsterdam, 1990. P. 265
71. N.Fusetani, Y.Kato, K.Hashimoto, T.Komori, Y.Itakura, T.Kawasaki. *J. Nat. Prod.*, **47**, 997 (1984)
72. A.M.Mackie. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **5**, 63 (1970)
73. R.Sakai, H.Kamiya, M.Murata, K.Shimamoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 4112 (1997)
74. M.Sasaki, T.Koike, R.Sakai, K.Tachibana. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3923 (2000)
75. T.Chou, O.Kamo, D.Uemura. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 4023 (1996)
76. N.Takada, M.Iwatsuki, K.Suenaga, D.Uemura. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 6425 (2000)
77. H.Kigoshi, K.Kanematsu, K.Yokota, D.Uemura. *Tetrahedron*, **56**, 9063 (2000)
78. M.Yotsu-Yamashita, R.L.Haddock, T.Yasumoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1147 (1993)
79. K.Fujiwara, A.Murai, M.Yotsu-Yamashita, T.Yasumoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10770 (1998)
80. T.Higa, M.Kuniyoshi. *J. Toxicol. – Toxin Rev.*, **19**, 119 (2000)
81. T.F.Molinski. *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.*, **12**, 197 (2009)
82. Y.Kishi. *Tetrahedron*, **58**, 6239 (2002)
83. M.Satake, S.Ishida, T.Yasumoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7019 (1995)
84. M.Sasaki, N.Matsumori, M.Murata, K.Tachibana, T.Yasumoto. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 9011 (1995)
85. M.Sasaki, T.Nomura, M.Murata, K.Tachibana. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 9007 (1995)
86. L.R.Cook, H.Oinuma, M.A.Semones, Y.Kishi. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7928 (1997)
87. A.R.Gallimore, J.B.Spencer. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 4406 (2006)
88. K.C.Nicolaou, M.O.Frederick. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 5278 (2007)
89. J.M.Seco, E.Quinoa, R.Riguera. *Chem. Rev.*, **104**, 17 (2004)
90. T.Nakata. *Chem. Rev.*, **105**, 4314 (2005)
91. J.C.Morris, A.J.Phillips. *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 245 (2009)
92. H.Takamura. *J. Synth. Org. Chem.*, **64**, 418 (2006)
93. P.D.O'Conner, M.A.Brimble. *Nat. Prod. Rep.*, **24**, 869 (2007)
94. R.Halim, M.A.Brimble. *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 4048 (2006)
95. H.Fuwa, M.Sasaki, M.Satake, K.Tachibana. *Org. Lett.*, **4**, 2981 (2002)
96. K.C.Nicolaou, Y.Li, N.Uesaka, T.V.Koftis, S.Vyscicol, T.Ling, M.Govindasamy, W.Quin, F.Bernal, D.Y.K.Chen. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**, 3643 (2003)
97. K.C.Nicolaou, D.Y.K.Chen, Y.Li, W.Quin, T.Ling, S.Vyscicol, T.V.Koftis, M.Govindasamy, N.Uesaka. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**, 3649 (2003)
98. N.Miyaura, A.Suzuki. *Chem. Rev.*, **95**, 2457 (1995)
99. T.Katsuki, K.B.Sharpless. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5974 (1980)
100. K.C.Nicolaou, M.E.Duggan, C.-K.Hwang, P.K.Somers. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1359 (1985)
101. A.J.Mancuso, S.-L.Huang, D.Swern. *J. Org. Chem.*, **43**, 2480 (1978)
102. K.C.Nicolaou, Z.Yang, G.-Q.Shi, J.L.Gunzner, K.A.Agrios, P.Gartner. *Nature (London)*, **392**, 264 (1998)
103. K.C.Nicolaou, D.G.McGarry, P.K.Somers, C.A.Veale, G.T.Furst. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2504 (1987)
104. M.P.Cava, M.I.Levinson. *Tetrahedron*, **41**, 5061 (1985)
105. K.C.Nicolaou, K.R.Reddy, G.Skokotas, F.Sato, K.-Y.Xiao. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7935 (1992)
106. K.C.Nicolaou, K.R.Reddy, G.Skokotas, F.Sato, K.-Y.Xiao, C.-K.Hwang. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3558 (1993)
107. A.V.K.Prasad, Y.Shimizu. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6476 (1989)
108. M.Sasaki, H.Fuwa. *Nat. Prod. Rep.*, **25**, 401 (2008)
109. M.Inoue. *Chem. Rev.*, **105**, 4379 (2005)
110. J.A.McCauley, K.Nagasawa, P.A.Lander, S.G.Mischke, M.A.Semones, Y.Kishi. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 7647 (1998)
111. H.Fuwa, M.Ebine, A.J.Bourdelaes, D.G.Baden, M.Sasaki. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16989 (2009)
112. C.Aissa, R.Rivieros, J.Ragot, A.Furstner. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15512 (2003)
113. H.Fuwa, N.Kainuma, K.Tachibana, M.Sasaki. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14983 (2002)
114. I.Kadota, H.Takamura, K.Sato, A.Ohno, K.Matsuda, M.Satake, Y.Yamamoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11893 (2003)
115. H.P.Van Egmond. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1152 (2004)
116. H.N.Huang, J.Lin, H.L.Lin. *Toxicon*, **51**, 774 (2008)
117. F.M.Van Dolah, J.S.Ramsdell. *J. AOCS Int.*, **84**, 1617 (2001)

118. K.Sasaki, Y.Takayama, T.Tahara, K.Anraku, Y.Ito, N.Akaike. *Toxicon*, **51**, 606 (2008)
119. C.Albano, G.Ronzitti, A.M.Rossini, F.Callegari, G.P.Rossini. *Toxicon*, **53**, 631 (2009)
120. J.M.Fremy, L.Puech, S.Krys, S.Dragacci. *J. Appl. Phycol.*, **11**, 374 (1999)
121. M.A.Quilliam. *J. Chromatogr., A*, **1000**, 527 (2003)
122. W.A.Rourke, C.J.Murphy, G.Pitcher, J.M.van der Riet, B.G.Burns, K.M.Thomas, M.A.Quilliam. *J. AOAC Int.*, **91**, 589 (2008)
123. B.Krock, C.G.Seguel, A.D.Cembella. *Harmful Algae*, **6**, 734 (2007)
124. T.Y.Orlova, M.S.Selina, E.L.Lilly, D.M.Kulis, D.M.Anderson. *Phycologia*, **46**, 534 (2007)
125. M.J.Noguerias, A.Gago-Martinez, A.I.Paniello, M.Twohig, K.L.James, J.F.Lawrence. *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 1202 (2003)
126. P.Bienfang, B.Oben, S.De Felice, P.Moeller, K.Huncik, P.Oben, R.Toonen, T.Daly-Engel, B.Bowen. *Afr. J. Mar. Sci.*, **30**, 533 (2008)
127. H.Taleb, P.Vale, R.Amanhir, A.Benhadouch, R.Sagou, A.Chafik. *J. Shellfish Res.*, **25**, 1067 (2006)
128. B.Krock, U.Tillmann, A.I.Selwood, A.D.Cembella. *Toxicon*, **52**, 927 (2008)
129. A.Gerssen, P.Mulder, H.van Rhijn, J.de Boer. *J. Mass Spectrom.*, **43**, 1140 (2008)
130. L.Sleno, D.A.Volmer. *Anal. Chem.*, **77**, 1509 (2005)
131. T.Suzuki, T.Yasumoto. *J. Chromatogr. A*, **874**, 199 (2000)
132. M.F.Amandi, A.Furey, M.Lehane, H.Ramstad, K.L.James. *J. Chromatogr., A*, **976**, 329 (2002)
133. L.MacKenzie, V.Beuzenberg, P.Holland, P.McNabb, A.Selwood. *Toxicon*, **44**, 901 (2004)
134. Z.H.Wang, K.L.King, J.S.Ramsdell, G.J.Doucette. *J. Chromatogr., A*, **1163**, 169 (2007)
135. A.Gerssen, M.A.McElhinney, P.P.J.Mulder, R.Bire, P.Hess, J.de Boyer. *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 1213 (2009)
136. C.Hummert, S.Kastrup, K.Reinhardt, M.Reichelt, B.Lucas. *Chromatographia*, **51**, 397 (2000)
137. T.Suzuki, A.Miyazono, K.Baba, R.Sugawara, T.Kamiyama. *Harmful Algae*, **8**, 233 (2009)
138. B.Krock, U.Tillmann, U.John, A.Cembella. *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**, 79 (2008)
139. W.M.Wu, X.P.Wu, X.C.Lin, Z.G.Xie, J.P.Giesy. *J. Sep. Sci.*, **32**, 2117 (2009)
140. P.de la Iglesia, A.Gago-Martinez. *Food Addit. Contam., Part A*, **26**, 221 (2009)
141. H.Oguri. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 1870 (2007)
142. N.M.Llamas, L.Stewart, T.Fodey, H.C.Higgins, M.L.R.Velasco, L.M.Botana, C.T.Elliot. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 581 (2007)
143. R.V.Snyder, M.A.Guerrero, C.D.Sinigalliano, J.Winshell, R.Perez, J.V.Lopez, K.S.Rein. *Phytochemistry*, **66**, 1767 (2005)
144. S.Hosoi-Tanabe, Y.Sako. *Harmful Algae*, **4**, 319 (2005)
145. C.Gescher, K.Metfies, L.K.Medlin. *Harmful Algae*, **7**, 485 (2008)
146. D.M.Anderson, A.W.White. *Oceanus*, **35**, 55 (1992)
147. Y.Pan, S.S.Bates, A.D.Cembella. *Nat. Toxins*, **6**, 127 (1998)

MARINE TOXINS: CHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATION ASPECTS

V.A.Stonik, I.V.Stonik

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences
159, Prosp. 100-letiya Vladivostoka, 690022 Vladivostok, Russian Federation, Fax +7(4232)314-050
A.V.Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences
17, Ul. Palchevskogo, 690041 Vladivostok, Russian Federation, Fax +7(4232)310-900*

The structures and mechanisms of biological action of the best known representatives of the main groups of marine toxins are presented. It is shown that many compounds have a complex chemical structure and extremely high toxicity. Characteristic features of isolation, structure determination and syntheses of these compounds using the achievement of modern organic chemistry are discussed. Brief review of identification methods and quantitative analysis of marine toxins is given.

Bibliography — 147 references.

Received 3rd September 2009