

На правах рукописи

Сильченко Александра Сергеевна

**ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ГОЛОТУРИЙ СЕМЕЙСТВ
HOLOTHURIIDAE, STICHOPODIDAE, SYNALLACTIDAE И
CUCUMARIIDAE**

02.00.10. – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Владивосток

2005

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН.

Научный руководитель: доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник
Авилов С. А.

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Высоцкий В. И.
доктор химических наук,
профессор Усов А. И.

Ведущая организация: Институт органической химии УНЦ РАН

Защита состоится «17» октября 2005 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета П 005.005.01 в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (4232)31-40-50; e-mail: science@piboc.dvo.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО РАН (Владивосток-22, пр. 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН).

Автореферат разослан «15 » сентября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук
старший научный сотрудник Прокопенко Г. И.

2006-4
12990

2169932

3

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

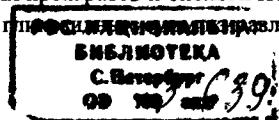
Актуальность проблемы. Голотурии и некоторые виды губок уникальны тем, что содержат нехарактерные для других групп животных вторичные метаболиты – тритерпеновые гликозиды. До их обнаружения в голотуриях соединения этого класса считались метаболитами исключительно высших наземных растений. Первоначально интерес к вторичным метаболитам голотурий определялся высокой ихтиотоксичностью экстрактов из этих животных, что и послужило стимулом к развитию структурных исследований тритерпеновых гликозидов. В дальнейшем был также выявлен и широкий спектр их биологической активности: гемолитические, цитостатические, антигрибковые, противоопухолевые, иммуномодулирующие свойства. Сейчас гликозиды голотурий являются действующими началами лекарственных препаратов и биологически активных пищевых добавок, используемых как в медицине, так и в ветеринарии.

По мере накопления данных о химическом строении тритерпеновых гликозидов голотурий различных систематических групп, стала очевидной специфичность этих соединений для таксонов разного уровня. Появилась возможность использовать тритерпеновые гликозиды в качестве хемотаксономических маркеров. Кроме того, анализ особенностей строения основных и минорных гликозидов, выделенных из голотурии-продуцента, может быть использован для построения гипотетических схем биосинтеза тритерпеновых гликозидов.

Голотурии семейства Holothuriidae (отряд Aspidochirotida), обитающие на мелководье в тропической зоне мирового океана, изучены достаточно полно. Однако, представители этого семейства, населяющие зоны умеренного и субтропического климата, например, средиземноморье, практически не изучались. В то же время известно, что гликозиды атлантической *Holothuria forskalii*, отличаются от гликозидов голотурий – обитателей тропиков. Поэтому изучение гликозидов средиземноморских представителей рода *Holothuria* было интересно не только с химической точки зрения, но и в плане хемосистематики.

Представлял интерес и состав гликозидных фракций голотурий семейства Synallactidae (отряд Aspidochirotida), включающего в основном глубоководных обитателей. Так, к началу наших исследований была известна структура только одного гликозида из голотурии *Pseudostichopus trachus*, однако, принадлежность данного вида к семейству Synallactidae оспаривалась рядом систематиков.

В состав семейства Cucumariidae (отряд Dendrochirotida) входят массовые промысловые виды голотурий рода *Cucumaria*, которые, как правило, содержат сложные гликозидные суммы. Изучение гликозидов различных видов *Cucumaria* представляет не только научный, но и прикладной интерес, так как они являются сырьем для изготовления ряда лекарственных препаратов и биологически активных пищевых добавок. Поэтому знание состава гликозидов различных видов



кукумарий, точных структур гликозидов и проявляемой ими биологической активности необходимо для расширения практического применения этих препаратов. В связи с этим изучались гликозиды из двух видов голотурий рода *Cucumaria*: атлантической *C. frondosa* и камчатской *C. okhotensis*.

Целью данной работы является:

- 1) выделение и установление структур тритерпеновых гликозидов из 6 видов голотурий семейств Holothuriidae, Stichopodidae и Synallactidae (отряд Aspidochirotida), а также из 2 видов голотурий рода *Cucumaria* (семейство Cucumariidae, отряд Dendrochirotida);
- 2) анализ особенностей химического строения гликозидов в целях разрешения некоторых спорных вопросов систематики класса Holothuroidea;
- 3) выяснение возможности и перспективности использования гликозидов промысловой голотурии *C. frondosa* в составе иммуномодулирующих препаратов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Из 8 видов голотурий было выделено 36 тритерпеновых гликозидов: для 25 новых соединений установлены полные химические структуры, а 11 – идентифицированы с известными. Впервые из голотурий выделены гликозиды, содержащие: сульфатную группу при С-3 остатка хиновозы, два остатка 3-О-метилксилозы, α,β-ненасыщенный кето-фрагмент в боковой цепи агликона. Впервые из одного вида голотурий выделено 3 пары гликозидов, являющихся изомерами только по положению двойной связи в ядре агликонов. Кроме того, выделены новые гликозиды, содержащие глюкозу во втором положении углеводной цепи, вместо типичной для большинства гликозидов хиновозы. Показано, что для средиземноморских представителей рода *Holothuria* специфичны голотурины групп А и В, как и для видов *Holothuria*, обитающих в тропиках. Изучен гликозидный состав голотурии *Australostichopus mollis*, учитывая полученные данные, а также данные сравнительной морфологии произведен пересмотр её таксономического статуса. На основе анализа структур 7 гликозидов, выделенных из голотурий *Synallactes nozawai* и *Pseudostichopus trachus* предложено считать последнюю принадлежащей к семейству Synallactidae. Установлено отличие фракции моносульфатированных гликозидов нового вида голотурии – *Cucumaria okhotensis*, от гликозидов аналогичных групп других изученных представителей рода *Cucumaria*. Изучен гликозидный состав промысловой голотурии *Cucumaria frondosa*. Показана перспективность применения в медицине и ветеринарии гликозидных препаратов из *C. frondosa* в качестве иммуностимуляторов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 3-й Европейской Конференции по «Морским Природным Соединениям», Мюнхен, 2002;

международной конференции по сапонинам «*Phytochemistry & Application of Plant Saponins*», Пулавы (Польша), 2004.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 6 статей в научных журналах: *Journal of Natural Products*, *Canadian Journal of Chemistry*, *Biochemical Systematics and Ecology*, *Natural Products Research* и 2 тезисов.

Структура диссертации. Диссертация состоит из Введения, Литературного обзора, посвященного структурам тритерпеновых гликозидов голотурий, Обсуждения результатов, где описаны и проанализированы полученные результаты, Экспериментальной части, а также Выводов и Списка литературы, включающего 150 цитируемых работ. Работа изложена на 171 странице, содержит 43 таблицы, 6 схем и 6 рисунков.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.х.н. Авилову С.А., академику Стонику В.А., д.б.н. Калинину В. И., к.х.н. Антонову А.С. за консультации и помошь в работе. Автор благодарит д.х.н. Калиновского А.И. за съемку и интерпретацию ЯМР-спектров, Дмитренка П.С. за результаты масс-спектрометрии, д.б.н. Левина В. С., к.б.н. Смирнова А. В. и д.б.н. Гудимову Е. Н. – за определение голотурий, а также к.б.н. Аминина Д. Л. и к.б.н. Агафонову И.Г. – за проведение биоиспытаний.

Часто используемые сокращения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; (HR)FABMS – масс-спектрометрия (высокого разрешения) с ионизацией быстрыми атомами; (HR)MALDI-TOF – масс-спектрометрия (высокого разрешения) с лазерной десорбией/ионизацией усиленной матрицей; COSY – корреляционная спектроскопия; DEPT – неискаженное усиление переносом поляризации; HMBC – гетероядерная многополосная корреляция; HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция; NOESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) и обмена.

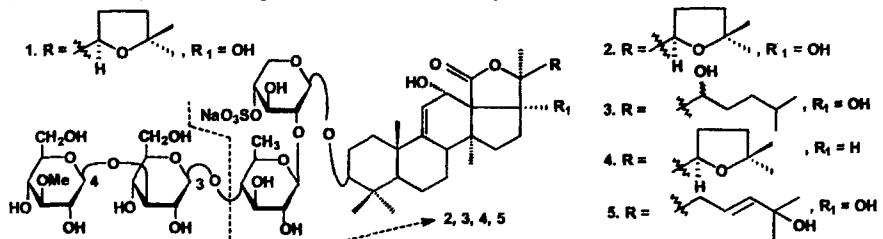
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Тритерпеновые гликозиды выделялись из упаренных спиртовых экстрактов голотурий с помощью гидрофобной хроматографии на тефлоновом порошке «Полихром-1», колоночной хроматографии на силикагеле и ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой C-8 или C-18. В некоторых случаях применялась ионообменная хроматография на DEAE-Sephadex, гель-фильтрация на сепадексе LH-20. Строение новых гликозидов устанавливали с помощью ЯМР спектроскопии (^{13}C , ^1H , DEPT, HSQC, HMBC, COSY, NOESY, TOCSY) и масс-спектрометрии ((HR)MALDI-TOF и (HR)FAB). В ряде случаев проводили сольволитическое десульфатирование гликозидов, моносахаридный анализ и периодатное окисление.

**1. Гликозиды средиземноморских голотурий рода *Holothuria*
(сем. Holothuriidae, отр. Aspidochirotida)**

Представители рода *Holothuria* – обитатели тропической зоны мирового океана – содержат голотурины групп А и В. В то же время атлантическая *Holothuria forskalii*, обитающая у берегов Испании и Португалии, характеризовалась наличием необычных для других *Holothuria* гликозидов – голотуринозидов. Поэтому изучение гликозидов представителей рода *Holothuria*, обитающих в Средиземном море, представляло интерес в плане хемосистематики. Был изучен гликозидный состав 3 видов голотурий: *Holothuria polii*, *Holothuria tubulosa* и *Holothuria* sp., собранных недалеко от г. Неаполя (Италия). Из гликозидной фракции *H. tubulosa* были выделены и идентифицированы (по данным ЯМР и физическим константам) голотурины А (1) и В (2), в то время как в организме *Holothuria* sp. накапливался только голотурин А (1). Из экстракта голотурии *H. polii*, наряду с 1 и 2, были выделены три новых гликозида – голотурины B₂ (3), B₃ (4) и B₄ (5).

Сравнение углеводных частей спектров ЯМР голотуринов 3 – 5 и изученного ранее голотурина В говорило об идентичности углеводных цепей этих соединений.



Голотурин B₂ (3) (по данным ЯМР) имел в качестве агликона голост-9(11)-ен-3β,12α,17α,22-тетраол, обнаруженный ранее в составе голотурина A₁, выделенного из *H. floridana*. В HR MALDI-TOF (+) масс-спектре 3 наблюдался пик с *m/z* 907.3689 [M + Na]⁺ (брутто-формула C₄₁H₆₅O₁₇SnA), фрагментарный ион с *m/z* 715 в MALDI-TOF (-) масс-спектре демонстрировал отрыв остатка хиновозы. Эти данные подтверждали соответствие структуры голотурина B₂ формуле 3.

Голотурин B₃ (4) (брутто-формула – C₄₁H₆₃O₁₆SnA (пик с *m/z* 889.3569 [M + Na]⁺ в HR MALDI-TOF (+) масс-спектре) представлял собой 17-дезоксиголотурин В и имел агликон, идентичный агликону голотуринозидов С и D, выделенных ранее из голотурии *H. forskalii*. Асимметрическому центру при С-22 была присдана S-конфигурация по аналогии с ацетатом 17-дезокси-22,25-оксидоголотурингенина, артефактным генином, полученным после кислотного гидролиза голотурина А (1), в котором конфигурация С-22 была определена на основе рентгено-структурного анализа.

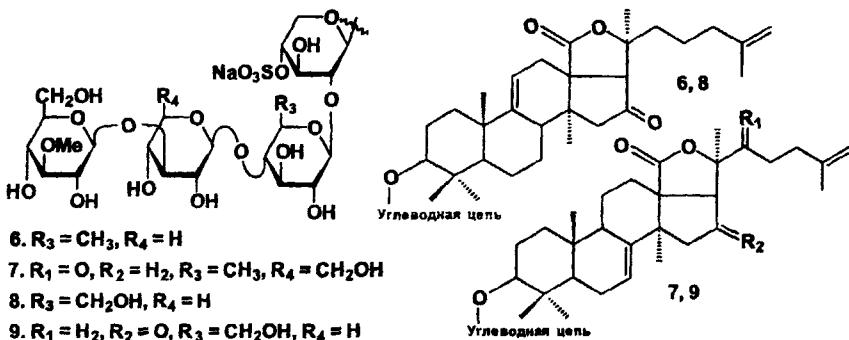
Голотурин B₄ (5). Сигналы полициклической системы в ЯМР спектрах соединений 3 и 5 совпадали, а сигналы боковой цепи в ЯМР ¹³C спектре 5 (120.64,

143.56 и 69.53 м.д.), указывали на наличие 23(24)-двойной связи и гидроксильной группы при С-25. Это подтверждалось присутствием кросс пиков в НМВС спектре 5 между: Н-23 (6.13 м.д.) и С-22, С-24, С-25; Н-24 (6.03 м.д.) и С-22, С-23, С-25; Н₃-26 (1.54 м.д.) и С-24; Н₃-27 (1.55 м.д.) и С-24. Молекулярная формула голотурина В₄ – C₄₁H₆₃O₁₇SNa (пик с m/z 905.3632 [M + Na]⁺ в HR MALDI-TOF (+) масс-спектре) – соответствовала структуре 5.

Результаты исследований показали, что для изученных средиземноморских представителей рода *Holothuria* специфичны голотурины групп А и В, как и для видов *Holothuria*, обитающих в тропиках. В этой связи становится тем более актуальным пересмотр таксономического статуса *H. forskalii*, характеризующейся наличием необычных голотуринозидов.

2. Гликозиды голотурии *Australostichopus (=Stichopus) mollis* (сем. Stichopodidae, отр. Aspidochirotida)

Тriterpenовые гликозиды новозеландской голотурии *Stichopus mollis* ранее не изучались, и интерес к их структурам усиливался еще и неоднозначностью таксономического статуса данного вида, так как по данным сравнительной морфологии и анатомии *S. mollis* отличался от других представителей семейства Stichopodidae. Из гликозидной фракции *S. mollis* было выделено 4 тритерпеновых гликозида: описанный ранее неотионидиозид (6) и новые моллисозиды А (7), В₁ (8) и В₂ (9).



Неотионидиозид (6). По данным моносахаридного анализа, ЯМР и масс-спектров, а также физическим константам основной компонент гликозидной фракции был идентифицирован как описанный ранее неотионидиозид (6).

Моллисозид А (7) содержал голоста-7,25-диен-3β-ол-22-он в качестве агликона, что следовало из анализа ЯМР спектров. Присутствие в боковой цепи 7 кетогруппы при С-22 и 25(26)-двойной связи подтверждалось наличием в COSY и ЯМР ¹Н спектрах сигналов Н₂-23 (2.96 и 2.86 м.д., J = 18.5, 7.5 Гц) и Н₂-24 (2.40 м.д. т., J = 7.5 Гц), образующих изолированную спиновую систему типа A₂XY. По данным

ЯМР и MALDI-TOF (-) масс-спектра, в котором наблюдались фрагментарные ионы с *m/z*: 987.5, 825.5 и 679.3, образовавшиеся при последовательном отщеплении моносахаридов от **7**, углеводная цепь моллисозида А была идентична линейной тетрасахаридной моносульфатированной цепи голотурина А (**1**). Брутто-формула моллисозида А – $C_{54}H_{83}O_{25}SNa$ (пик с *m/z* 1209.4825 [$M + Na^+$] в HR MALDI-TOF (+) масс-спектре) – соответствовала формуле **7**.

Моллисозид B₁ (**8**), как и неотионидиозид (**6**), содержал в качестве агликона голотоксингенин – голоста-9(11),25(26)-диен-3β-ол-16-он (по данным ЯМР). ЯМР ¹³C спектр углеводной цепи моллисозида B₁ свидетельствовал о наличии тетрасахаридной линейной сульфатированной по C¹-4 (α- и β-эффекты сульфатной группы) углеводной цепи с остатком глюкозы во втором положении (отсутствие сигнала C-6 хиновозы в области 17 м.д., но наличие сигнала C²-6 при 60.9 м.д. в ЯМР ¹³C спектре и сигналов соответствующих протонов: H²-6' при 4.41 (dd, *J* = 2.1, 10.9 Гц) м.д. и H²-6" при 4.59 (шд, *J* = 11.1 Гц) м.д. в ЯМР ¹H спектре). Молекулярная формула **8** ($C_{53}H_{81}O_{25}SNa$) определена по наличию в HR MALDI-TOF (+) масс-спектре пика [$M + Na^+$] с *m/z* 1195.4516. В MALDI-TOF (-) масс-спектре моллисозида B₁ наблюдалась фрагментация, аналогичная наблюдавшейся для моллисозида А, что наряду с наличием соответствующих корреляций в HMBC и NOESY спектрах подтверждало структуру **8**.

Моллисозид B₂ (**9**). Анализ ЯМР спектров показал, что агликоном **9** является голоста-7,25-диен-3β-ол-16-он, обнаруженный ранее в составе гликозидов голотурии *C. japonica*, а углеводная цепь **9** была идентична цепи моллисозида B₁, о чем свидетельствовало совпадение соответствующих частей ЯМР спектров. В HR MALDI-TOF (+) масс-спектре наблюдался пик с *m/z* 1195.4502 [$M + Na^+$] (брутто-формула $C_{53}H_{81}O_{25}SNa$), а пики фрагментарных ионов с *m/z*: 973.4, 841.4 и 679.3 в MALDI-TOF (-) масс-спектре характеризовали последовательность моносахаридов в углеводной цепи моллисозида B₂ (**9**).

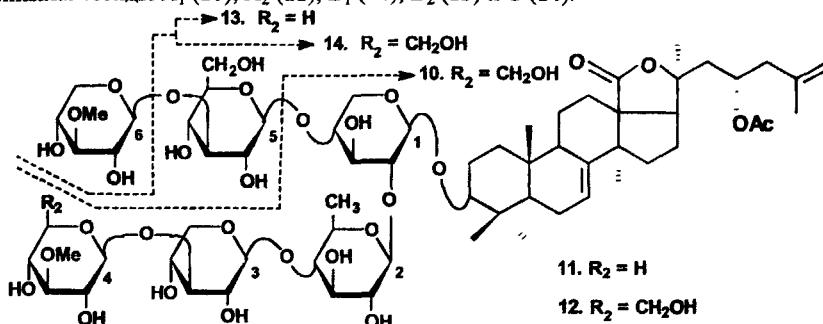
Полученные результаты, наряду с морфологическими признаками, свидетельствовали о существенном отличии голотурии *S. mollis* от остальных представителей семейства Stichopodidae. Так, все выделенные из *S. mollis* гликозиды были сульфатированными тетраозидами и значительно отличались по строению от несульфатированных стихопозидов и теленотозидов, являющихся хемотаксономическими маркерами рода *Stichopus*. На основе полученных результатов систематическое положение голотурии *Stichopus mollis* было изменено, и она была выведена в новый род *Australostichopus* Levin.

3. Гликозиды голотурий семейства Synallactidae (отр. Aspidochirotidia)

3.1 Гликозиды голотурии *Synallactes nozawai*

Большинство представителей семейства Synallactidae обитает на больших глубинах и, следовательно, труднодоступны и слабо изучены. В связи с этим

точный видовой состав семейства неизвестен, а принадлежность ряда видов к семейству *Synallactidae* – неоднозначна. Голотурия *Synallactes nozawai*, собранная в южной части Японского моря, – первый (и пока единственный) представитель рода *Synallactes*, из которого были выделены тритерпеновые гликозиды – синаллактозиды A₁ (10), A₂ (11), B₁ (12), B₂ (13) и C (14).



Агликонные части спектров ЯМР синаллактозидов 10 – 14 совпадали друг с другом и с соответствующей частью спектра ЯМР ¹³C астихопозида С, выделенного ранее из карибской голотурии *Astichopus multifidus*. Это позволило сделать вывод, что агликоном синаллактозидов являлся 23(S)-ацетоксиголоста-7,25-диен-3β-ол.

Синаллактозид A₁ (10) по данным моносахаридного анализа, ЯМР спектров и физическим константам был идентифицирован с 25(26)-дегидропроизводным теленотозида А из голотурии *Thelephora ananas*. Брутто-формула C₅₅H₈₆O₂₂, соответствующая структуре 10, подтверждалась данными HR FAB (+) масс-спектра.

Синаллактозид С (14). Данные моносахаридного анализа (3-O-метилглюкоза, глюкоза, ксилоза и хиновоза, 1:1:2:1) и анализ ЯМР спектров указывали на появление дополнительного остатка глюкозы в углеводной цепи синаллактозида С, по сравнению с синаллактозидом A₁. Присоединение остатка глюкозы к C-4 остатка первой ксилозы было установлено исходя из сдвигов в ЯМР ¹³C спектре 14 (по сравнению со спектром 10) сигнала C¹-4 на 6.49 м.д. в слабое поле, а сигналов C¹-3 и C¹-5 – на 2.36 и 2.54 м.д., соответственно, в сильное поле. Положение пятого остатка – глюкозы – подтверждалось и наличием кросс-пика H⁵-1/H¹-4 в NOESY спектре. Структура 14, предложенная для синаллактозида С, соответствовала брутто-формуле C₆₁H₉₆O₂₇ и подтверждалась данными HR FAB (+) масс-спектра (пик [M + Na]⁺ с m/z 1283.6054).

Синаллактозид B₂ (13) отличался от синаллактозида С строением четвертого моносахаридного остатка, которым была 3-O-метилксилоза. Об этом свидетельствовало отсутствие сигнала C-6 3-O-метилглюкозы (при 62.02 м.д.) и сдвиг сигнала C⁴-5 в сильное поле на 11.18 м.д. в ЯМР ¹³C и DEPT спектрах 13, по сравнению со спектрами 14. В протонном спектре 13 отсутствовали сигналы H⁴-5,

$\text{H}^4\text{-}6'$ и $\text{H}^4\text{-}6''$, но при этом наблюдались сигналы $\text{H}^4\text{-}5'$ (4.20 м.д.) и $\text{H}^4\text{-}5''$ (3.63 м.д.), характерные для терминального остатка 3-О-метилксилозы. Брутто-формула синаллактозида $\text{B}_2 - \text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$ (пик $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 1253.5932 в HR FAB (+) масс-спектре).

Синаллактозид A₂ (11) имел гексасахаридную углеводную цепь, о чем свидетельствовало появление в его ЯМР ^{13}C спектре сигналов дополнительного моносахаридного остатка 3-О-метилксилозы, по сравнению со спектром синаллактозида B_2 . Положение второго (терминального) остатка 3-О-метилксилозы при С-3 глюкозы следовало из сдвига в спектре 11 (по сравнению со спектром 13) сигнала $\text{C}^5\text{-}3$ в слабое поле на 8.33 м.д., а сигналов $\text{C}^5\text{-}2$ и $\text{C}^5\text{-}4$ – в сильное поле на 0.92 и 2.20 м.д., соответственно. Это подтверждалось наличием корреляции $\text{H}^6\text{-}1/\text{C}^5\text{-}3$ в HMBC спектре 11. Данные HR FAB (+) масс-спектра подтвердили структуру 11 для синаллактозида A_2 (пик $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 1399.6568, брутто-формула $\text{C}_{66}\text{H}_{104}\text{O}_{30}$).

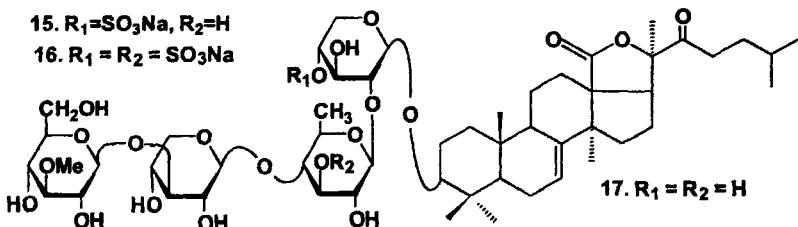
Синаллактозид B₁ (12) имел гексасахаридную углеводную цепь, как и синаллактозид A_2 и отличался от последнего строением одного из терминальных моносахаридных остатков. В ЯМР ^{13}C и ^1H спектрах синаллактозида B_1 наблюдались дополнительные (по сравнению со спектрами 11) сигналы при 62.02 м.д. ($\text{C}^4\text{-}6$), 4.46 (дд, $\text{H}^4\text{-}6'$) м.д. и 4.27 (м, $\text{H}^4\text{-}6''$) м.д., соответственно, что указывало на замену одного из терминальных остатков 3-О-метилксилозы (в 11) на остаток 3-О-метилглюкозы (в 12). Кросс-пики между $\text{H}^4\text{-}1$ и $\text{C}^3\text{-}3$ ($\text{H}^3\text{-}3$) в HMBC (NOESY) спектрах 12, указывали на присоединение остатка 3-О-метилглюкозы к С-3 третьего моносахаридного остатка – ксилозы. Это подтверждалось и сравнительным анализом ЯМР спектров синаллактозидов B_1 и С, который показывал наличие сигналов дополнительного остатка 3-О-метилксилозы в 12, присоединенного к С-3 глюкозы (сдвиг сигнала $\text{C}^5\text{-}3$ в слабое поле на 8.33 м.д., а сигналов $\text{C}^5\text{-}2$ и $\text{C}^5\text{-}4$ – в сильное поле на 0.84 и 2.19 м.д., соответственно). Данные HR FAB (+) масс-спектра подтвердили структуру 12 для синаллактозида B_1 (пик $[\text{M} + \text{Na}]^+$ с m/z 1429.6592, брутто-формула $\text{C}_{67}\text{H}_{106}\text{O}_{31}$).

Таким образом, в результате изучения тритерпеновых гликозидов голотурии *S. pogawai* были установлены структуры пяти компонентов гликозидной фракции, среди которых были обнаружены тетраозид, пентаозиды и гексаозиды, не содержащие сульфатной группы. Характерными чертами трех синаллактозидов являлось наличие необычного остатка 3-О-метилксилозы, найденного ранее только в гликозидах представителей отряда *Dendrochirotida*.

3.2. Гликозиды голотурии *Pseudostichopus trachus*

Из голотурии *P. trachus* (о. Уруп, 1986 г.) ранее был выделен основной компонент гликозидной фракции – псевдостихопозид А (15). В ходе данной работы, с целью выделения минорных компонентов из гликозидной фракции *P. trachus*, был исследован другой сбор этой голотурии (о. Онекотан, 1988 г.), из которого,

наряду с псевдостихопозидом А, был выделен новый гликозид – псевдостихопозид В (16).



Псевдостихопозид А (15) по ЯМР спектрам и физическим константам был идентифицирован с псевдостихопозидом А, выделенным ранее из голотурии *P. trachus*.

Псевдостихопозид В (16) имел голост-7-ен-3 β -ол-22-он в качестве агликона, о чем свидетельствовало совпадение агликонных частей ЯМР спектров 15 и 16. Данные ЯМР, моносахаридного анализа (3-О-метилглюкоза, ксилоза и хиновоза, 1:2:1) и сольволитического десульфатирования (производное 17) позволили заключить, что псевдостихопозид В (16) имел такую же моносахаридную последовательность, как псевдостихопозид А и отличался от него характером сульфатирования углеводной цепи. Положение двух сульфатных групп в 16 определяли по ЯМР спектрам (α - и β -эффекты сульфатных групп) и по данным периодического окисления, которые указывали на присоединение одной из них к С-4 ксилозы, а второй – к С-3 хиновозы. Данные HR MALDI-TOF (+) (брутто-формула $C_{53}H_{82}O_{27}S_2Na_2$, пик $[M + Na]^+$ с m/z 1283.4149) подтвердили структуру псевдостихопозида В (16). Гликозид с сульфатной группой, расположенной при С-3 остатка хиновозы выделен из голотурий впервые.

3.3. Тriterпеновые гликозиды голотурий и филогения отряда Aspidochirotidida

Тriterпеновые гликозиды голотурий являются хемотаксономическими маркерами и используются для разрешения спорных вопросов таксономии. Хотя голотурии отряда Aspidochirotidida считаются наиболее полно изученной группой, существует ряд вопросов, касающихся систематической принадлежности некоторых видов, в частности – *P. trachus*. Проанализировав строение агликонов и углеводных цепей псевдостихопозидов, мы посчитали более обоснованным мнение систематиков, относящих голотурию *P. trachus* к сем. Synallactidae (отр. Aspidochirotidida), а не к сем. Gephyrothuriidae (отр. Gephyrothuriida).

Кроме того, полученная нами новая информация о структурах тритерпеновых гликозидов 3 видов голотурий семейств Synallactidae и Stichopodidae, наряду с накопленными ранее сведениями, позволяет сделать вывод, о том, что семейства Stichopodidae и Synallactidae – это две близкородственные группы голотурий,

которые, однако, эволюционировали параллельно и независимо друг от друга. Действительно, о близости семейств Synallactidae и Stichopodidae свидетельствует ряд морфологических признаков, а также сходство структур их гликозидов, например:

- Агликон синаллактозидов (*S. nozawai*) типичен также для теленотозидов и стихопозидов – маркеров группы родов *Astichopus*, *Thelenota*, *Stichopus*, сем. *Stichopodidae*;
- Агликон моллисозида A (*A. mollis*) отличается от агликона псевдостихопозидов A и B (*P. trachus*) только наличием терминальной двойной связи, а агликон неотионидозида (*A. mollis*) идентичен агликонам голотоксинов A₁ и B₁ (*A. japonicus*, *P. californicus*);
- Наблюдается одинаковая последовательность моносахаридных остатков в линейных тетрасахаридных углеводных цепях синаллактозида A₁ (=25-дегидроизвестному теленотозиду A), теленотозида A, псевдостихопозидов и неотионидозида (при этом сульфатированные цепи неотионидозида и псевдостихопозида A идентичны);
- «Архитектура» построения гексасахаридных разветвленных углеводных цепей синаллактозидов A₂ и B₁ и стихопозидов C, D и E аналогична.

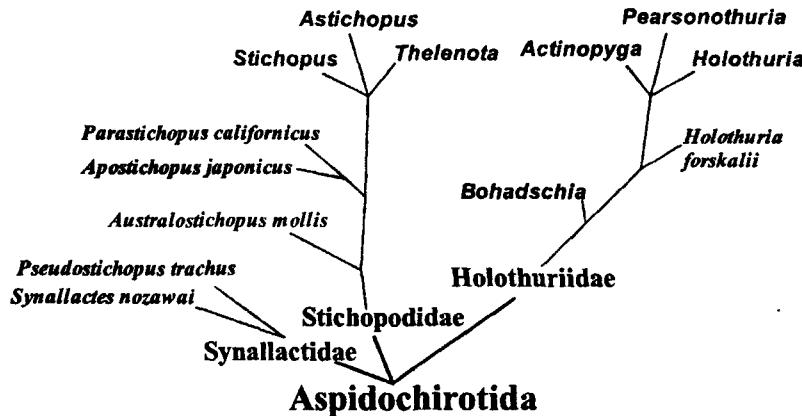


Схема 1. Филогенетические отношения голотурий отряда Aspidochirota.

С другой стороны, нетипичные для стихоподид структурные особенности синаллактозидов и псевдостихопозидов указывали на некоторую обособленность семейства Synallactidae в отряде Aspidochirota. Например: редкий среди гликозидов голотурий остаток 3-O-метилксилозы синаллактозидов A₂, B₁ и B₂; нечетное количество моносахаридных остатков в углеводных цепях синаллактозидов B₂ и C; и, наконец, необычное положение сульфатной группы при C-3 хиновозы в псевдостихопозиде B.

Некоторые морфологические характеристики голотурий семейств Synallactidae и Stichopodidae свидетельствуют о наибольшей примитивности этих семейств в

отряде Aspidochirotida, по сравнению с семейством Holothuriidae. Наличие 3-О-метилксилозных остатков в синаллактозидах и выделение неотионидозида из *A. mollis*, обнаруженных ранее у представителей отряда Dendrochirotida, сближали голотурий семейств Synallactidae и Stichopodidae с голотуриями отряда Dendrochirotida, филогенетически более древнего, чем Aspidochirotida, что подтверждало большую филогенетическую примитивность семейств Synallactidae и Stichopodidae в отряде Aspidochirotida. На основе анализа структур гликозидов изученных представителей семейств Synallactidae и Stichopodidae предложена схема филогенетических отношений голотурий отряда Aspidochirotida (схема 1).

4. Гликозиды голотурий семейства Cucumariidae (отр. Dendrochirotida)

В настоящее время на основе гликозидов промысловых голотурий рода *Cucumaria* – *C. japonica* и *C. frondosa* – разрабатываются лекарственные препараты, предназначенные для применения в ветеринарии и медицине. Поэтому стало необходимо детальное изучение гликозидного состава *C. frondosa* (гликозиды *C. japonica* изучены ранее), а также биологической активности индивидуальных соединений из этой голотурии и композиций на их основе.

4.1. Гликозиды голотурии *Cucumaria frondosa*

Гликозидная фракция голотурии *C. frondosa* представляет собой сложную смесь, дающую на ТСХ целый ряд пятен, соответствующих различным группам гликозидов, различающихся строением углеводных цепей и количеством и положением сульфатных групп. В пределах одной группы вещества отличаются строением агликонов.

Из гликозидной фракции *C. frondosa* (штат Мэн, США), были выделены в индивидуальном виде гликозиды 18 и 19, идентифицированные как ранее известные фрондозиды A и A₁, а также подфракции, соответствующие группам: моносульфатированных фрондозидов A₂, дисульфатированных – A₂/A₆ и трисульфатированных – A₇, которые подвергались дальнейшему разделению.

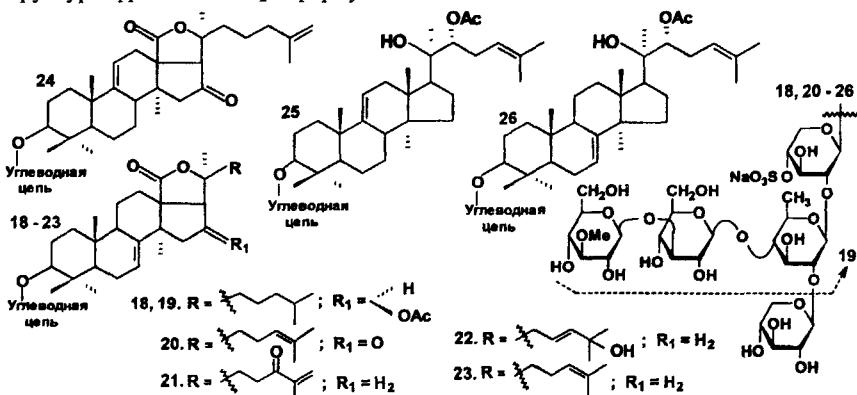
Моносульфатированные фрондозиды

С помощью ВЭЖХ из подфракции фрондозидов группы A₂, было выделено 7 индивидуальных соединений: фрондозиды A₂-1 (20), A₂-2 (21), A₂-3 (22), A₂-4 (23), A₂-6 (24), A₂-7 (25), A₂-8 (26).

Анализ углеводных частей ЯМР спектров фрондозидов 20 – 26 и кукумариозида A₂-2, основного компонента группы A₂ из голотурии *C. japonica*, показал идентичность их разветвленных пентасахаридных углеводных цепей.

Фрондозид A₂-1 (20). Данные ЯМР спектров указывали на то, что агликоном 20 являлся голоста-7,24-диен-3β-ол-16-он. Данные HR MALDI-TOF (+) масс-спектрометрии (брутто-формула C₅₉H₉₁O₂₉SNa, пик [M + Na]⁺ с m/z 1341.5098) и фрагментация молекулы в MALDI-TOF (-) спектре, характеризующая

последовательность моносахаридов в углеводной цепи, подтверждали соответствие структуры фрондозида A₂-1 формуле 20.



Фрондозид A₂-2 (21) имел голостановый агликон без заместителей в ядре. При этом в ЯМР ¹³C и DEPT спектрах **21** присутствовали сигналы четвертичных атомов углерода при 144.50 (C-25) и 200.32 (C-24) м.д. и сигналы метиленовой (C-26, 124.80 м.д.) и метильной групп (C-27, 17.58 м.д.). Наличие кросс-пиков в HMBC спектре фрондозида A₂-2 между протонами метиленовой и метильной групп и сигналом при 200.32 м.д., характерным для кето-группы, указывало на наличие в боковой цепи **21** кето-группы при C-24, сопряженной с терминальной двойной связью – уникального структурного фрагмента, ранее не встречавшегося в гликозидах голотурий. Присутствие α,β -ненасыщенного кетона в боковой цепи **21** подтверждалось его УФ-спектром ($\lambda_{\text{max}}=249.6 \text{ нм}, \epsilon=2127$). Анализ HR MALDI-TOF (+) масс-спектра (брutto-формула C₅₉H₉₁O₂₉Na, пик [M + Na]⁺ с *m/z* 1341.5148) и наличие характеристических фрагментарных ионов в MALDI-TOF (-) масс-спектре подтвердили структуру фрондозида A₂-2 (21).

Фрондозид A₂-3 (22) содержал в качестве агликона гостост-7,23-диен-3β,25-диол (по данным ЯМР). Брутто формула C₅₉H₉₂O₂₉SNa, определенная на основе HR MALDI-TOF (+) масс-спектра (пик [M + Na]⁺ с m/z 1343.5387) и фрагментация углеводной цепи в MALDI-TOF (-) масс-спектре подтверждала соответствие структуры фрондозида A₂-3 формуле 22.

Фрондозид A₂-4 (23) имел гостановый агликон с 7(8)-двойной связью без заместителей в ядре и 24(25)-двойной связью в боковой цепи (по данным ЯМР). Анализ HR MALDI-TOF (+) и MALDI-TOF (+) масс-спектров подтвердил структуру фрондозида A₂-4 (23) (брутто-формула C₅₉H₉₃O₂₈SNa, пик [M + Na]⁺ с m/z 1327.5271).

Фрондозид А-6 (24) (по данным ЯМР) содержал голотоксингенин (голоста-9(11),25-диен-3 β -ол-16-он) в качестве агликона. Наличие типичных фрагментарных

ионов в MALDI-TOF (-) масс-спектре и данные HR MALDI-TOF (+) масс-спектра (пик $[M + Na]^+$ с m/z 1341 5145, брутто-формула $C_{59}H_{90}O_{29}SNa$) показывали соответствие структуры фрондозида A_2 -6 формуле **24**.

Фрондозид A_2 -7 (25) (брутто-формула $C_6H_{99}O_{29}SNa$, пик $[M + Na]^+$ с m/z 1373.5874 в HR MALDI-TOF (+) масс-спектре). ЯМР ^{13}C спектр **25** характеризовался сигналами, указывающими на наличие ланостанового (без лактона) агликона: отсутствовал сигнал 18(20)-лактона в области 180 м.д., но наблюдался сигнал метильной группы (С-18) при 16.40 м.д. Дальнейший анализ ЯМР спектров показал, что агликоном **25** является 22(R)-ацетоксиланоста-9(11),24-диен-20(R),3 β -диол, идентифицированный ранее во фрондозиде С (**27**) (*C. frondosa*). В масс-спектрах **25** наблюдались не только ионы, отвечающие фрагментации углеводной цепи, но и пик с m/z 1231, указывающий на отрыв боковой цепи по связи С-20 – С-22.

Фрондозид A_2 -8 (26) являлся изомером фрондозида A_2 -7 только по положению двойной связи в ядре агликона (7(8)-, а не 9(11)-), на что указывали данные ЯМР и одинаковые брутто-формулы этих соединений $C_6H_{99}O_{29}SNa$. Кроме того, в MALDI-TOF (+) масс-спектрах **25** и **26** наблюдались аналогичные фрагментарные ионы, что подтверждало структуру фрондозида A_2 -8 как **26**.

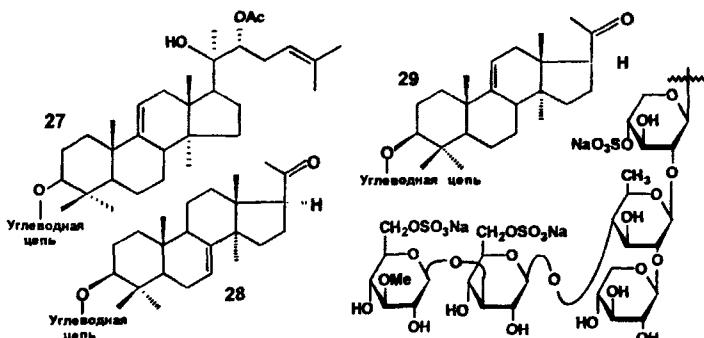
В ходе данной работы обнаружено, что в состав подфракции моносульфатированных гликозидов *C. frondosa*, наряду с обычными голостановыми гликозидами, входят и гликозиды с агликонами ланостанового типа (без лактона) с неукороченной боковой цепью.

Трисульфатированные фрондозиды

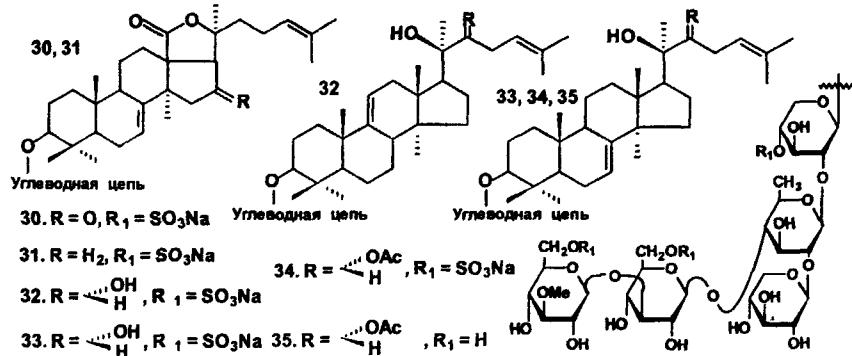
Из подфракции фрондозидов группы A_7 с помощью ВЭЖХ было выделено 8 индивидуальных соединений, среди которых было 5 новых гликозидов: фрондозиды A_7 -1 (**30**), A_7 -2 (**31**), A_7 -3 (**32**), A_7 -4 (**33**) и изофрондозид С (**34**), а 3 гликозида идентифицированы с известными соединениями: фрондозидом С (**27**) из голотурии *C. frondosa*, кореозидом А (**28**) из *C. koraiensis* и изокореозидом А (**29**) из *C. conicospermum*. Причём, фрондозид С и изокореозид А были впервые выделены в нативном виде.

Анализ ЯМР спектров показал, что фрондозиды **30** – **34** имеют одинаковые углеводные цепи, совпадающие по строению с углеводными цепями кукуумариозидов группы A_7 , выделенных ранее из голотурии *C. japonica*.

Фрондозид A_7 -1 (30) имел голостановый агликон, идентичный агликону фрондозида A_2 -1 (**20**), описанного выше. Брутто-формула ($C_{59}H_{89}O_{35}S_3Na_3$ – пик $[M + Na]^+$ с m/z 1545) и фрагментация молекулы в MALDI-TOF (+) масс-спектре (пики с m/z : 1443, 1341), характеризующая строение углеводной цепи, подтверждали структуру фрондозида A_7 -1 (**30**).



Фрондозид A₇-2 (31) отличался от 30 только отсутствием кето-группы при C-16 и, соответственно, имел агликон, идентичный агликону фрондозида A₂-4 (23), описанного выше. Брутто формула C₅₉H₉₀O₃₄S₃Na₃, определенная на основе MALDI-TOF (+) масс-спектра (пик [M + Na]⁺ с *m/z* 1531) и фрагментация углеводной цепи соответствовали формуле 31 для фрондозида A₇-2.



Фрондозид A₇-3 (32) характеризовался наличием такой же ланостановой полилициклической системы, как и фрондозид С (27). В боковой цепи 32 также имелась 24(25)-двойная связь (сигналы при 123.1 и 132.1 м.д. в ЯМР ¹³C спектре). Однако, в спектрах ЯМР 32, по сравнению со спектрами 27, сигналы C-22 и H-22 находились в более сильном поле (76.96 и 3.88 м.д., соответственно), а сигналы, соответствующие О-ацетатной группе, отсутствовали. Это указывало на наличие атома углерода (C-22), связанного с гидроксильной группой. Конфигурация асимметрического центра при C-20 была определена как R, по аналогии с фрондозидом С, и подтверждалась наличием в NOESY спектре фрондозида A₇-3 кросс-пиков H₂₁/H₁₂ и H₂₂/H₁₆. Конфигурация асимметрического центра при C-22 также была определена как R, что следовало из одинаковых значений химических сдвигов C-20 и C-22 в ЯМР ¹³C спектре 32, которые совпадают в случае

R,R-конфигураций этих асимметрических центров в модельных соединениях такого типа, а в случае R,S-конфигураций отличаются на 2 м.д. Таким образом, агликон **32** – ланоста-9(11),24-диен-3 β ,20(R),22(R)-триол. Данные MALDI-TOF (брутто-формула $C_{59}H_{95}O_{34}S_3Na_3$, пик $[M + Na]^+$ с m/z 1535) подтвердили соответствие структуры фрондозида A₇-3 формуле **32**.

Фрондозид A₇-4 (**33**) являлся изомером фрондозида A₇-3 по положению двойной связи в ядре агликона (ланоста-7,24-диен-3 β ,20(R),22(R)-триол) и, следовательно, отличался от последнего только некоторыми сигналами полициклической системы в ЯМР ^{13}C и 1H спектрах. Наличие в NOESY спектре **33** кросс-пиков между H-9 и H-18, H-9 и H-19, а также между H-18 и H-19, свидетельствовало о конформации ванны для кольца С в неголостановом агликоне фрондозида A₇-4.

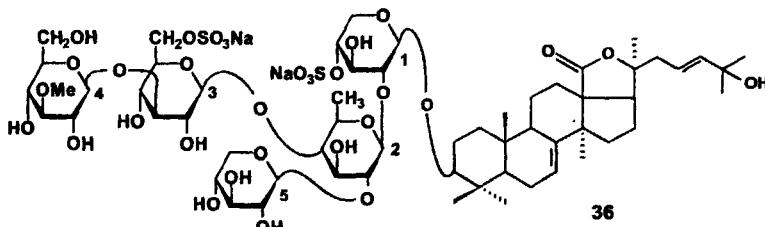
Изофрондозид С (**34**) был выделен в нативном виде из подфракции трисульфатированных гликозидов. **34** представлял собой изомер фрондозида С (**27**) только по положению двойной связи в полициклической системе (7(8)-, а не 9(11)-двойная связь). Агликон изофрондозида С – 22(R)-ацетоксиланоста-7,24-диен-3 β ,20(R)-диол – был идентичен агликону фрондозида A₂-8 (**26**), описанного выше. Структура агликона изофрондозида С устанавливалась на основе ЯМР спектров его десульфатированного производного (**35**). Таким образом, фрондозид С и изофрондозид С представляли собой пару изомеров, аналогичную фрондозидам A₇-3 и A₇-4, кореозиду А и изокореозиду А.

Обычно в гликозидных фракциях голотурий содержатся гликозиды, имеющие в агликонах либо 7(8)-, либо 9(11)-двойную связь, и лишь в четырех видах голотурий (*C. conicospermum*, *P. australis*, *N. magnit*, *P. fabricii*) были одновременно обнаружены гликозиды и с 7(8)-, и с 9(11)-двойной связью. Причем, только в случае *C. conicospermum* – это были изомеры по положению двойной связи в ядре агликонов.

В то же время, из подфракции трисульфатированных гликозидов голотурии *C. frondosa* впервые были выделены три пары изомеров, различающихся только по положению двойной связи в агликонах (7(8)- или 9(11)-). Еще одной характерной чертой фракции трисульфатированных фрондозидов было то, что из 8 выделенных гликозидов – 6 содержали неголостановые агликоны и только два соединения – фрондозиды A₇-1 и A₇-2 – типичные для большинства голотурий голостановые агликоны.

Дисульфатированные фрондозиды

Из подфракции дисульфатированных фрондозидов группы A₃/A₆, содержащей, как и две предыдущие подфракции, сложную сумму гликозидов, удалось выделить только один компонент – новый гликозид – фрондозид A₃-1 (**36**).



Фрондозид A₃-1 (36). Положение двух сульфатных групп в углеводной цепи 36 при C'-4 и C'-6 было определено по наличию α - и β -сдвигающих эффектов сульфатных групп в ЯМР ¹³C спектре и подтверждено двумерными ЯМР спектрами, которые говорили об идентичности углеводных цепей 36 и кукумариозида A₃ из *C. japonica*.

Данные ЯМР свидетельствовали о том, что агликоном фрондозида A₃-1 являлся голоста-7,23-диен-3 β ,25-диол, как и в случае фрондозида A₂-3 (22).

4.2. Количество содержание гликозидов в некоторых частях тела голотурии *Cucumaria frondosa*

Сравнительное изучение количественного содержания компонентов гликозидной фракции в различных частях тела голотурии *C. frondosa* (стенка тела с покровным эпителием, покровный эпителий, щупальца и глоточное кольцо) показало, что суммарное содержание гликозидов в покровном эпителии (1.4 % от массы сухого остатка) примерно в 2,5 раза превышает этот показатель в стенках тела (0.6 % от массы сухого остатка) и почти в 4 раза – в щупальцах и глоточном кольце (0.4 % от массы сухого остатка). Таким образом, максимальное количество гликозидов накапливается в кожных покровах голотурий, что вполне согласуется с теорией о внешней защитной функции тритерпеновых гликозидов. Отражением этой функции тритерпеновых гликозидов служит их гемолитическая активность, напрямую связанная с мембранотропным действием. Установлено, что фрондозид А, проявляющий достаточно высокую гемолитическую активность, является одним из основных компонентов гликозидной фракции и максимальное его количество обнаруживается именно в покровном эпителии (17 % от суммы гликозидов). В то же время, суммарная фракция трисульфатированных фрондозидов доминирует по процентному содержанию во всех частях тела голотурий (от 46 до 58 % от суммы гликозидов), хотя известно, что гемолитическая активность гликозидов с тремя сульфатными группами в три раза ниже, чем активность моносульфатов. Такое высокое содержание фрондозидов группы A₇, очевидно, свидетельствует о выполнении этими веществами каких-то других биологических функций, помимо защиты организма-продуцента от хищников и обрастателей. Резкое различие между типами накапливаемых гликозидов во фракциях «моносульфатов»

(2 неголостановых из 9 выделенных) и «трисульфатов» (6 неголостановых из 8 выделенных), вероятно, также подтверждает разделение их биологических функций. Неголостановые трисульфатированные гликозиды могут выполнять некую «гормональную функцию», аналогичную функциям стероидных гормонов. Подобие некоторых агликонов гликозидов *C. frondosa* структурам стероидных гормонов и их предшественников может служить подтверждением высказанного предположения.

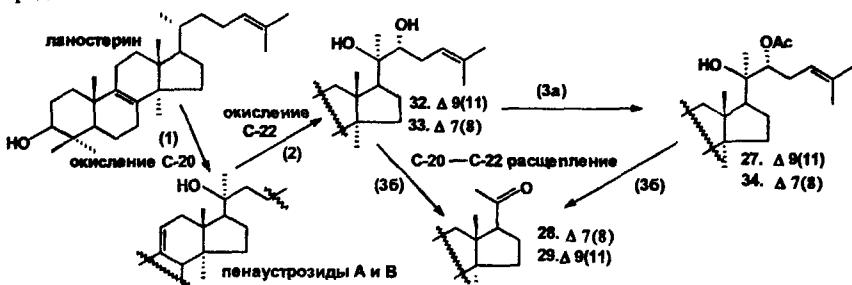


Схема 2. Возможные пути биосинтетических трансформаций гликозидов.

В процессе биосинтеза стероидных гормонов из холестерина происходит укорочение его боковой цепи через стадию окисления 20-го и 22-го положений. Биосинтетическим предшественником тритерпеновых гликозидов голотурий является ланостерин, который, вероятно, претерпевает аналогичные холестерину (у животных) трансформации в организме голотурий (вопросы миграции двойной связи в ядре агликонов не рассматривались). Так, при сопоставлении структур фрондозидов A₇-3 (32) и A₇-4 (33); фрондозида C (27) и изофрондозида C (34), и, наконец, кореозида A (28) и изокореозида A (29) можно проследить реализацию данных трансформаций. Схема биосинтеза норланостановых (с укороченной боковой цепью) агликонов была предложена ранее, однако вновь полученные данные позволяют дополнить недостающие промежуточные стадии и проследить её реализацию непосредственно на гликозидах одного вида голотурии.

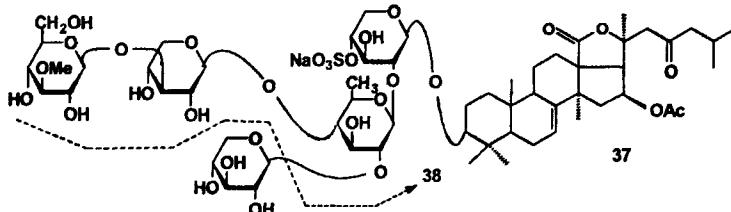
На схеме 2 в качестве начальной, после ланостерина, стадии биосинтеза гликозидов приведены фрагменты структуры пенаустрозидов А и В, выделенных японскими учеными из голотурии *Peniactis australis*, т.к. фрондозидов с такой степенью окисленности агликонов выделить пока не удалось. Пенаустрозиды наиболее близки к ланостерину, по сравнению с остальными гликозидами голотурий, т.к. содержат только одну гидроксильную группу – при С-20. В голотурии *C. frondosa* обнаружены гликозиды, находящиеся на следующей ступени биосинтетических превращений: фрондозиды A₇-3 (32) и A₇-4 (33), у которых появляется вторая гидроксильная группа – при С-22. Далее превращения могут идти по двум путям: (3а) – ацетилирование гидроксила при С-22

{фрондозид С (27), изофрондозид С (34)} и/или (36) – расщепление боковой цепи по связи C-20 – C-22 с образованием агликонов кореозида А (28) и изокореозида А (29), обнаруженных в гликозидной фракции *C. frondosa*, которые, возможно, выполняют гормональную функцию в организме голотурий, что оправдывает возникновение такой биосинтетической схемы.

4.3. Гликозиды голотурии *Cucumaria okhotensis*

Голотурия *Cucumaria okhotensis* является массовым промысловым видом, обитающим в Охотском море у берегов Камчатки. Этот вид был описан совсем недавно и его гликозидный состав еще не изучался. Выделение гликозидов голотурии *C. okhotensis* было важно не только с научной, но и с прикладной точки зрения.

Гликозидная фракция голотурии *C. okhotensis*, как и других видов рода *Cucumaria*, состоит из нескольких групп гликозидов различной полярности, которая зависит от строения углеводных цепей и числа сульфатных групп. В ходе данной работы была изучена подфракция моносульфатированных гликозидов, из которой было выделено два соединения: основной компонент данной подфракции – кукумариозид A₀-1 (37) и минорный компонент – охотозид A₁-1 (38).



Кукумариозид A₀-1 (37). По данным ЯМР спектров и физическим константам гликозид 37 был полностью идентичен кукумариозиду A₀-1, выделенному ранее из *C. japonica*.

Охотозид A₁-1 (38) имел линейную тетрасахаридную углеводную цепь, такую же как фрондозид A₁ (19) из *C. frondosa* (по данным ЯМР). Агликоном 38 был 16 β -ацетоксиголост-7-ен-3 β -ол-23-он, как и в кукумариозиде A₀-1 (37), о чем свидетельствовало совпадение соответствующих частей ЯМР спектров 37 и 38. Таким образом, отличие охотозида A₁-1 от кукумариозида A₀-1 состоит в отсутствии терминального остатка ксилозы, как и в случае фрондозидов A₁ и A из *C. frondosa*.

Начатые исследования гликозидов голотурии *C. okhotensis* показали отличие ее фракции моносульфатированных гликозидов от аналогичных групп гликозидов других видов рода *Cucumaria* и подтвердили обоснованность выделения нового вида в составе рода *Cucumaria*. Необходимо отметить, что при использовании гликозидных фракций разных видов дальневосточных кукумарий в качестве сырья

для изготовления каких-либо лекарственных препаратов, требуется их тщательный анализ, т.к. свойства препаратов могут изменяться из-за вариаций гликозидного состава.

5. Физиологическая активность гликозидов *Cicutaria frondosa*

В связи с разработкой иммуномодулирующего препарата на основе гликозидов *C. frondosa*, были изучены некоторые аспекты биологического действия как основного компонента гликозидной фракции – фрондозида А, так и нескольких подфракций. Работа проводилась совместно с фирмой «Coastside Bioresources» (США) и была поддержана грантом американского фонда CRDF.

5.1. Биологическое действие фрондозида А (18)

Было обнаружено, что фрондозид А в низких, субтоксических концентрациях (0,002 – 2,0 мкг/мышь) проявляет значительный иммуностимулирующий эффект, а именно: вызывает повышение лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мышей при внутрибрюшинном введении (максимальное – более, чем в 2 раза – в концентрации 0,2 мкг/мышь). При этом эффект фрондозида А нарастает очень быстро, и значительная стимуляция наблюдается уже на следующий день после введения и достигает максимума на 4 – 5-й день. Кроме того, фрондозид А оказывает двойственное влияние на образование активных форм кислорода (АФК – синглетный кислород, перекись водорода, пероксинитрит и продукты их взаимодействия друг с другом – так называемый окислительный взрыв), необходимых макрофагам для обезвреживания инфекционных патогенных микроорганизмов. В диапазоне концентраций 0,0001 – 0,01 мг/мл фрондозид А стимулирует образование АФК (на 3 – 45 % от уровня контроля), причем максимальный эффект (45 %) наблюдается при концентрации гликозида 0,001 мг/мл. В цитотоксической концентрации 1,0 мкг/мл фрондозид А значительно ингибирует образование АФК (на ~9 % от уровня контроля). Аналогичные результаты были получены при оценке уровня фагоцитоза в макрофагах под влиянием фрондозида А (максимальная стимуляция – на 20 % от уровня контроля – наблюдалась при концентрации гликозида 0,001 мг/мл). Таким образом, фрондозид А является прямым иммуномодулятором клеточного иммунитета.

Кроме того, были изучены некоторые аспекты действия фрондозида А на систему гуморального иммунитета, в частности его влияние на образование антителообразующих клеток селезенки (АОК) и на антительный ответ на антиген. Установлено, что фрондозид А в низких субтоксических концентрациях от 0,02 до 2,0 мкг/мышь вызывал слабый иммуностимулирующий эффект: увеличение числа антителообразующих клеток, максимальное – при концентрации 0,2 мкг/мышь (индекс стимуляции 1,86) и незначительное повышение титра антител (на 40 – 60 %) по сравнению с контролем в дозах 0,02 – 0,2 мкг/мышь. Таким образом,

фрондозид А вызывает слабое повышение активности системы гуморального иммунитета. Такое сочетание иммуномодулирующих свойств: повышение активности макрофагов без значительного повышения уровня антител (губительного в случае ряда заболеваний, например, алеутской болезни норок) является весьма перспективным для создания лекарственных препаратов.

Важно отметить и значительную разницу между токсическими дозами фрондозида А и дозами, в которых он проявляет полезные для применения свойства. Так, для проявления гемолитической и эмбриотоксической активности, необходимы достаточно высокие концентрации фрондозида А: $EC_{100} = 12,5 \text{ мкг/мл}$ для гемолитического действия (по отношению к эритроцитам мышей) и $EC_{100} = 3,12 \text{ мкг/мл}$ для эмбриотоксического действия (по отношению к развивающимся эмбрионам морских ежей).

5.2. Влияние фрондозидов различных групп на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов

Фрондозиды проявляли следующие иммуномодулирующие свойства: моносульфатированные (фрондозид А, фрондозиды группы А₂, композиция фрондозид А/фрондозиды группы А₂ (13%)) стимулировали лизосомальную активность перитонеальных макрофагов, а дисульфатированные (фрондозиды группы А₃/А₆) и трисульфатированные (фрондозиды группы А₇) – угнетали

Таблица 1. Синергизм действия композиции фрондозидов А/А₂ (13 %) на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов

| Вещество | Стимуляция, % от контроля | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|------|------|------|------|
| | Концентрация, мкг/мл | | | | |
| | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.19 | 0.38 |
| Фрондозид А | 0 | 0 | 32.7 | 18.9 | 15.7 |
| Фрондозиды А ₂ | 62.7 | 42.9 | 0 | 0 | 0 |
| Фрондозиды А/А ₂ (13%) | 10.9 | 55.5 | 48.8 | 44.4 | 0 |

При этом, моносульфатированные гликозиды в разной степени стимулировали макрофаги, например: фрондозид А вызывал повышение активности на 16 – 33 % по сравнению с уровнем контроля (в диапазоне концентраций 0.38 – 0,1 мкг/мл); фрондозиды группы А₂ оказывали больший эффект (43 – 63 %) в меньших концентрациях (0,05 – 0,025 мкг/мл); композиция фрондозидов А/А₂ проявляла усредненные эффекты (стимуляция на 44 – 55 % при концентрациях 0.19 – 0.05 мкг/мл). Но при этом чрезвычайно интересен был наблюдаемый синергизм действия этой композиции (табл. 1, стр. 20).

Результаты тестирования биологической активности гликозидов голотурии *C. frondosa* весьма интересны и важны для дальнейшего прикладного использования этих соединений. В настоящее время подана заявка на патент США

«S.A. Avilov, V. I. Kalinin, A.S. Silchenko, D.L. Aminin, I.G. Agafonova, V.A. Stonik, P.D. Collin and C. Woodward “Process for Isolating Sea Cucumber Saponin Frondoside A, and Immunomodulatory Methods of Use” Attorney Docket: 2898/102, USPTO Application Number: 60/579,335». В дальнейшем планируется оформление данной заявки в форме международного патента в соответствии с РСТ протоколом.

5. ВЫВОДЫ

1. Изучен гликозидный состав 8 видов голотурий семейств Holothuriidae, Stichopodidae и Synallactidae отряда Aspidochirotida и семейства Cucumariidae отряда Dendrochirotida. Выделено 36 тритерпеновых гликозидов, структуры 25 из них установлены впервые, 11 гликозидов идентифицированы с известными.
2. Впервые в голотуриях найдены тритерпеновые гликозиды, содержащие: два остатка 3-О-метилксилозы, α,β -ненасыщенный кето-фрагмент в боковой цепи агликона, сульфатную группу при С-3 остатка хиновозы. Впервые из одного вида голотурий выделены 3 пары гликозидов, являющихся изомерами только по положению двойной связи в ядре агликонов.
3. Изучен гликозидный состав трех видов рода *Holothuria*, собранных в Средиземном море, выделено 5 гликозидов (из них 3 – новых). Показано, что для средиземноморских представителей рода *Holothuria* специфичны голотурины групп А и В, как и для видов *Holothuria*, обитающих в тропиках.
4. Проведен сравнительный анализ структур 5 выделенных гликозидов голотурии *Synallactes norzawai* и 2 гликозидов *Pseudostichopus trachus*, предложено считать голотурию *Pseudostichopus trachus* принадлежащей к семейству Synallactidae.
5. Найдено, что гликозиды голотурии *Stichopus mollis* значительно отличаются от гликозидов других видов рода *Stichopus*. Учитывая особенности структур тритерпеновых гликозидов, а также морфологические признаки *S. mollis*, выполнена ревизия таксономического статуса этого вида, который выведен в новый род – *Australostichopus*.
6. Изучена фракция моносульфатированных гликозидов голотурии *Cucumaria okhotensis*, показано её отличие от гликозидов других изученных представителей рода *Cucumaria*, что подтверждает правомерность описания *Cucumaria okhotensis* как нового вида.
7. Изучен гликозидный состав промысловой голотурии *Cucumaria frondosa*, выделено 18 нативных гликозидов (из них 13 – новых). Проведен анализ количественного распределения гликозидов в некоторых частях тела *C. frondosa* и изучена биологическая активность фрондозидов. Показана перспективность применения в качестве иммуностимуляторов гликозидных препаратов из *C. frondosa*.

Основные публикации по теме диссертации

1. Silchenko A.S., Avilov S.A., Antonov A.S., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Stonik V.A., Smirnov A.V., Riguera R., Jimenez C. Triterpene glycosides from the deep-water North-Pacific sea cucumber *Synallactes nozawai* Mitsukuri // J. Nat. Prod. 2002. Vol. 65, № 12. P. 1802 – 1808.
2. Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Antonov A.S., Stonik V.A., Kalinovsky A.I., Riguera R., Jimenez C. Triterpene glycosides from the sea cucumber *Synallactes nozawai* Mitsukuri (Synallactidae, Aspidochirotida) // Abstr. of 3-rd European Conference on Marine Natural Products, September 15 – 20, 2002, Munich. Munich, 2002. P. 83.
3. Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Stonik V.A., Smirnov A.V. Pseudostichoposide B – new triterpene glycoside with unprecedent type of sulfatation from the deep-water North-Pacific sea cucumber *Pseudostichopus trachus* // Nat. Prod. Res. 2004. Vol. 18, № 6. P. 565 – 570.
4. Moraes G., Northcote P.T., Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Dmitrenok P.S., Stonik V.A., Levin V.S. Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus* // Biochem. Syst. Ecol. 2004. Vol. 32. P. 637 – 650.
5. Silchenko A.S., Avilov S.A., Antonov A.S., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Woodward C., Collin P. Structure of eight new monosulfated triterpene oligoglycosides from the Northern Atlantic sea cucumber *Cucumaria frondosa* // Abstr. of the International Conference on Saponins “Phytochemistry & Application of Plant Saponins”, September 8 – 10, 2004, Pulawy (Poland). Pulawy: Institute of Soil Science and Plant Cultivation, 2004. P. 113.
6. Silchenko A.S., Avilov S.A., Antonov A.S., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Stonik V.A., Woodward C., Collin P. Glycosides from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* III. Structures of frondosides A₂-1, A₂-2, A₂-3 and A₂-6, four new minor monosulfated triterpene glycosides // Can. J. Chem. 2005. Vol. 83, № 1. P. 21 – 27.
7. Silchenko A.S., Stonik V.A., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Zaharenko A.M., Smirnov A.V., Mollo E., Cimino G. Holothurins B₂, B₃ and B₄, New Triterpene Glycosides from the Mediterranean Sea Cucumbers of the genus *Holothuria* // J. Nat. Prod. 2005. Vol. 68. P. 564 – 567.
8. Moraes G., Northcote P.T., Silchenko A.S., Antonov A.S., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Stonik V.A. Mollisosides A, B₁ and B₂ – three new minor triterpene glycosides from the New Zealand and South Australian sea cucumber *Australostichopus mollis* (Hutton) // J. Nat. Prod. 2005. Vol. 68, № 6. P. 842 – 847.

Соискатель

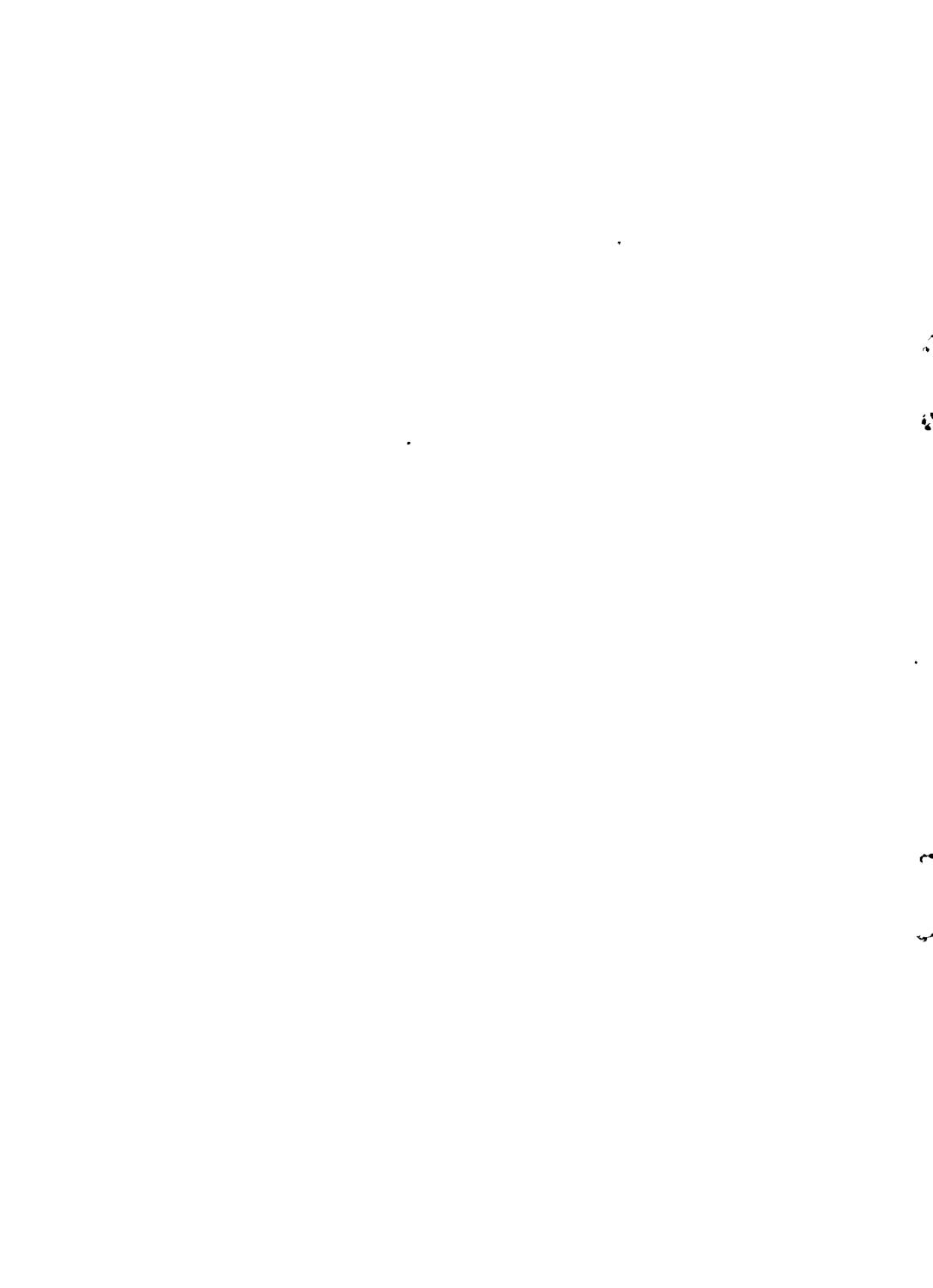
Сильченко А. С.

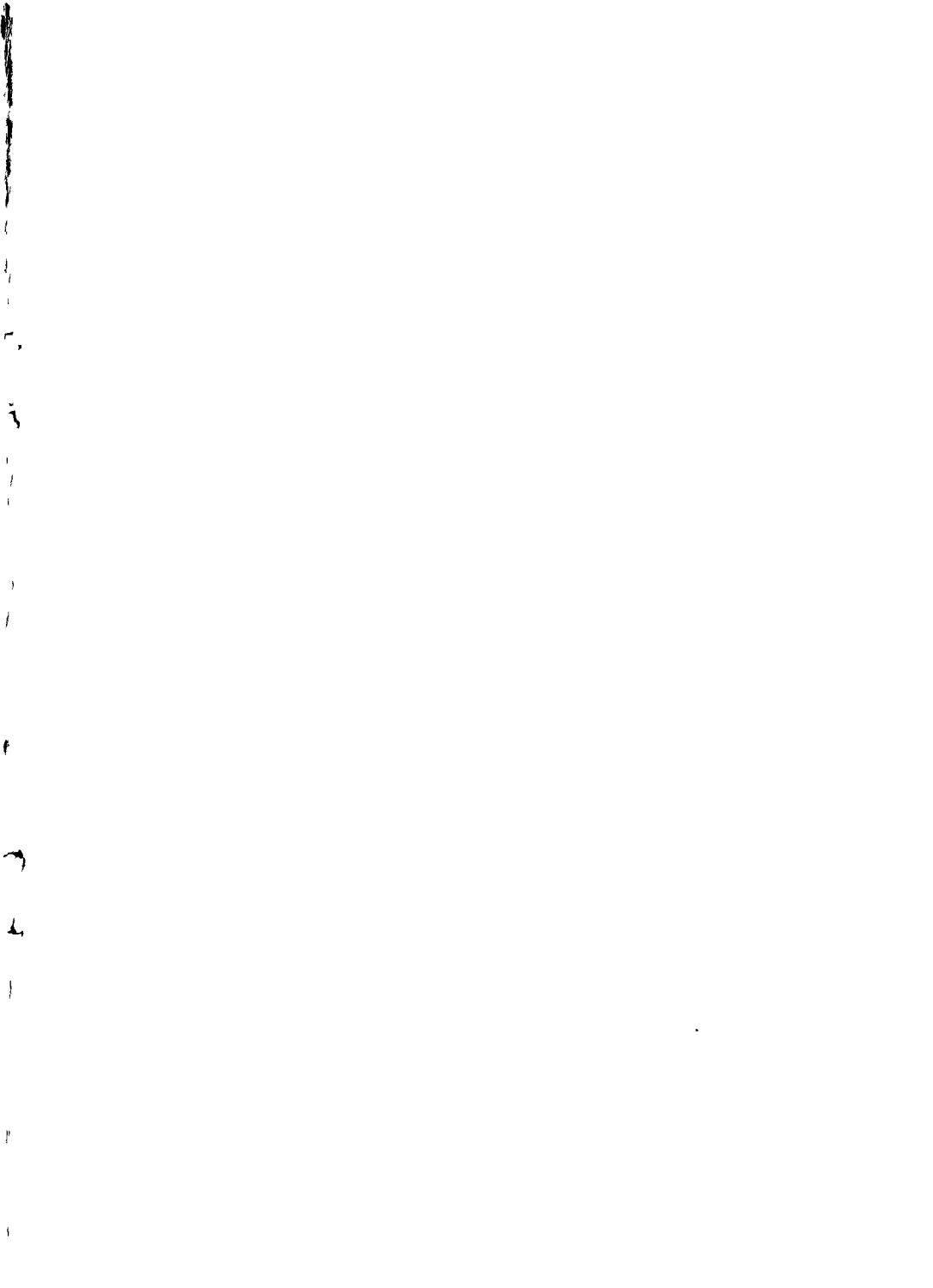
Сильченко Александра Сергеевна

**НОВЫЕ ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ИЗ 8 ВИДОВ
ГОЛОТУРИЙ СЕМЕЙСТВ HOLOTHURIIDAE, STICHOPODIDAE,
SYNALLACTIDAE И CUCUMARIIDAE**

Автореферат

Отпечатано 19.08.2005 г.
в типографии ООО «Былина Ко., ЛТД»
г. Владивосток, ул. Комсомольская, 1, тел. 45-77-40
Заказ № 3038. Тираж 100 экз.





■ 15969

РНБ Русский фонд

2006-4
12990