

В.И. КАЛИНИН, С.А. АВИЛОВ, А.С. СИЛЬЧЕНКО

## Исследование структуры тритерпеновых гликозидов голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

*Кратко обсуждаются основные достижения в исследовании строения тритерпеновых гликозидов голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН с 1968 г. по настоящее время.*

*Ключевые слова:* голотурии, тритерпеновые гликозиды.

**Structural studies on sea cucumber triterpene glycosides in G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the FEB RAS.** V.I. KALININ, S.A. AVILOV, A.S. SIL'CHENKO (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*The article briefly discusses main achievements in the investigation of structures of sea cucumber triterpene glycosides in G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS from 1968 till nowadays.*

*Kew words:* sea cucumbers, triterpene glycosides.

В конце 1960-х годов, когда по предложению В.Е. Васьковского в Институте биологически активных веществ ДВФ СО АН СССР (с 1972 г. Тихоокеанский институт биоорганической химии) стали развивать морскую тематику, было решено начать исследования «морских» метаболитов – представителей тех классов природных соединений, опыт изучения «растительных» аналогов которых уже имелся. Первыми в области тритерпеновых гликозидов голотурий были работы Г.Б. Елякова, Т.А. Кузнецовой и В.Е. Васьковского (1968 г.) о составе гликозидной фракции *Apostichopus japonicus* [7], а также Г.Б. Елякова и Н.В. Перетолчина (1970 г.) – о гликозидах *Eupentacta fraudatrix* [5]. Этот этап завершился публикацией данных о структуре агликона гликозида из *A. japonicus*, которая впоследствии была пересмотрена [23].

В 1973–1975 гг. вышли работы Г.Б. Елякова, В.А. Стоника и др., посвященные сравнительному изучению гликозидных фракций 43 видов голотурий, собранных в самых разных районах Тихого и Атлантического океанов, что позволило сделать выводы о таксономической специфичности основных компонентов гликозидных фракций для различных родов и групп родов голотурий, не утратившие своего значения до сих пор [24, 25].

С конца 1970-х годов началось широкое применение спектроскопии ЯМР <sup>13</sup>C и использование хромато-масс-спектрометрических подходов к анализу продуктов метилирования

---

\*КАЛИНИН Владимир Иванович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, АВИЛОВ Сергей Анатольевич – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, СИЛЬЧЕНКО Александра Сергеевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). \*E-mail: kalininv@piboc.dvo.ru

гликозидов. В результате этих исследований в лаборатории В.А. Стоника трудами В.Ф. Шарыпова, Н.И. Калиновской, Ш.Ш. Афиятуллова, А.И. Калиновского и др. было установлено строение нативных агликонов гликозидов из представителей родов *Stichopus*, *Astichopus* и *Thelenota*, а также из *Eupentacta fraudatrix* и *Cucumaria japonica*. Ряд нативных генинов удалось получить с использованием различных методов мягкой химической или ферментативной деградации углеводных цепей [6, 8, 14, 17] (рис. 1).

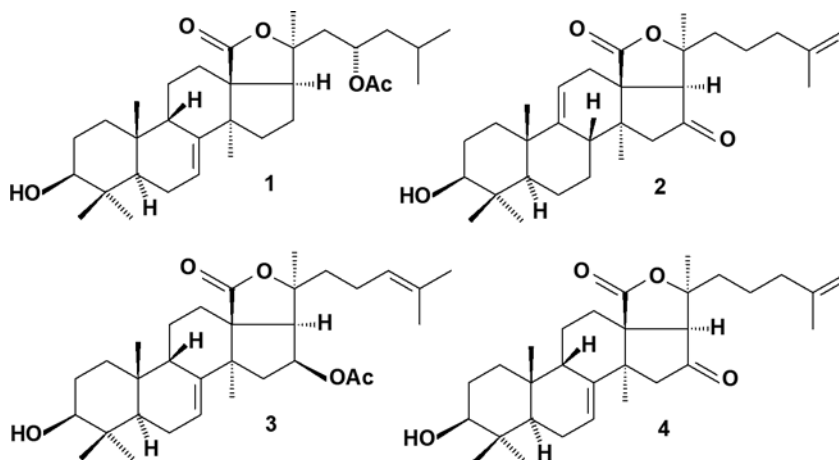


Рис. 1. Нативные агликоны гликозидов голотурий: 1 – агликон гликозидов из *Stichopus chloronotus*, 2 – голотексиногенин – агликон гликозидов из *Apostichopus japonicus*, 3 – агликон гликозидов *Eupentacta fraudatrix*, 4 – агликон гликозидов *Cucumaria japonica*

Были изучены химические трансформации нативных агликонов с 7(8)-двойной связью при кислотном гидролизе и обнаружена миграция двойной связи из положения 7(8) в положение 8(9) и далее 9(11) (рис. 2). Установлено, что в агликонах гликозидов из голотурий семейства Holothuriidae, имеющих 9(11)-двойную связь и 12 $\alpha$ -гидроксил, в условиях гидролиза происходит дегидратация с образованием 8(9), 11(12)-диена (гомоанулярный диен), который превращается в гетероанулярный 7(8), 9(11)-диен (рис. 3). К сожалению, это исследование, выполненное Л.Я. Коротких, так и осталось неопубликованным, а позже аналогичный диен был независимо обнаружен японскими химиками [29].

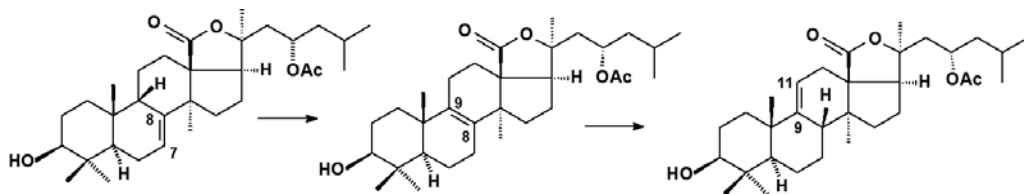


Рис. 2. Миграция 7(8)-двойной связи в положение 8(9) и далее в положение 9(11) в аглиционе гликозидов *S. chloronotus*

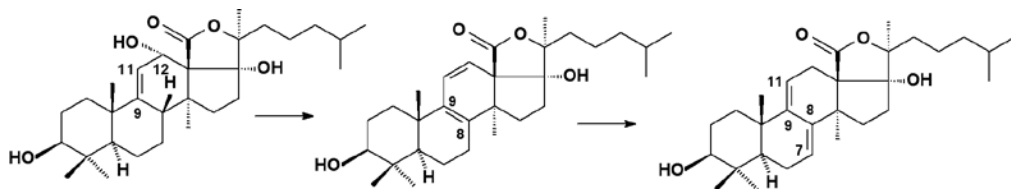


Рис. 3. Дегидратация агликона гликозидов *Holothuria mexicana* с образованием гомоаннулярного 8(9),11(12)-диена с последующей миграцией двойных связей

Для агликонов гликозидов *E. fraudatrix* в условиях щелочной обработки и при восстановлении 16-кето-группы в агликоне гликозидов *C. japonica* была обнаружена перерециклизация 18(20)-лактона в 18(16)-лактон [9, 18] (рис. 4, 5).

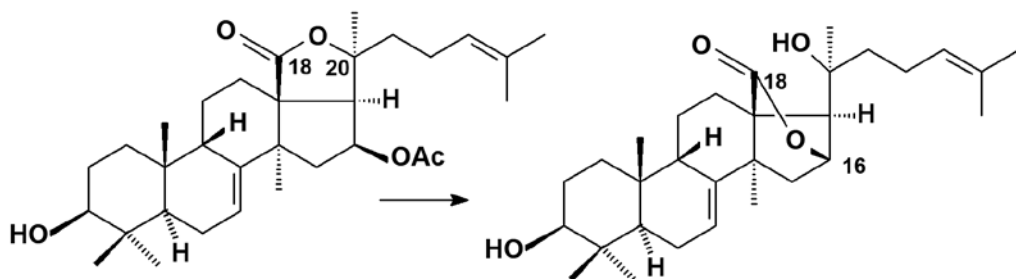


Рис. 4. Перерециклизация 18(20)-лактона в 18(16)-лактон при щелочной обработке агликона из *E. fraudatrix*

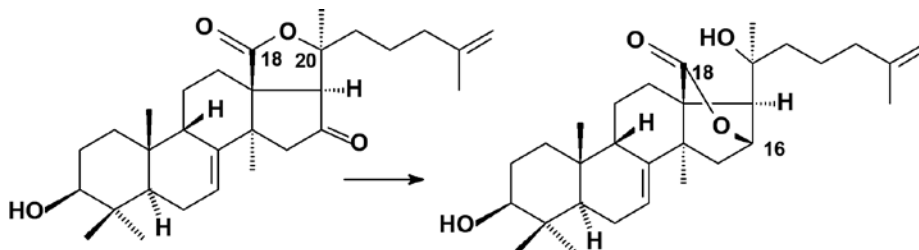


Рис. 5. Перерециклизация 18(20)-лактона в 18(16)-лактон при восстановлении 16-кетогруппы в агликоне гликозидов *C. japonica*

Применение И.И. Мальцевым, В.А. Стоником и др. различных ферментативных и химических методов деградации углеводных цепей, включая периодатное окисление (деградация по Смитсу) в сочетании со спектроскопией ЯМР  $^{13}\text{C}$ , позволило установить основные типы углеводных цепей гликозидов голотурий семейств Stichopodidae, включая разветвленные по первому остатку ксилозы гексаозиды, а также биоизиды и тетраозиды, являющиеся промежуточными продуктами биосинтеза [15, 16] (рис. 6).

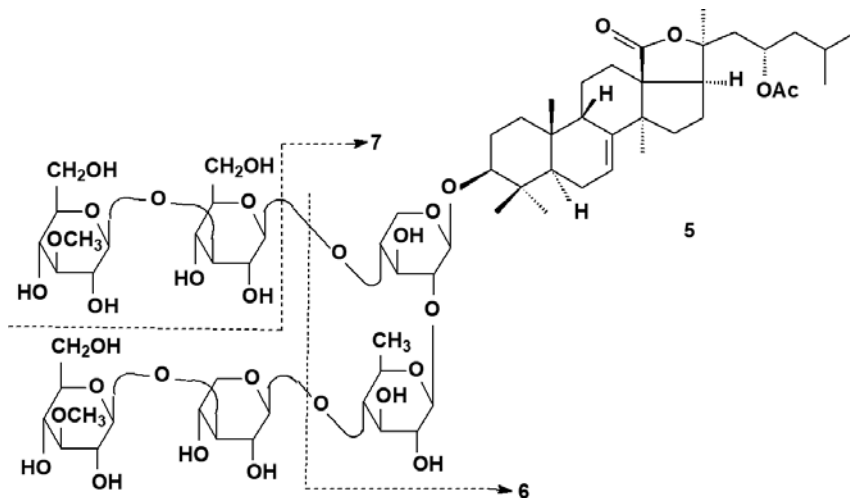


Рис. 6. Основные типы углеводных цепей гликозидов голотурий сем. Stichopodidae. 5 – стихопозид С из *S. chloronotus*, 6 – стихопозид А из *S. chloronotus*, 7 – теленотозид А из *Thelenota ananas*

Аналогичная работа была выполнена для углеводных цепей голотурий семейства Holothuriidae, где основными типами углеводных цепей оказались сульфатированные по С-4 первого ксилозного остатка биозиды и тетраозиды [10], а также гексаозиды [2] (рис. 7). Подобный сульфатированный тетраозид с терминальным остатком 3-О-метилксилозы был найден Ш.Ш. Афиятулловым и др. в *Eupentacta fraudatrix* [4]. Кроме того, С.А. Авиловым и др. в гликозидах *C. japonica* были найдены пентаозиды, разветвленные по С-2 второго моносахаридного остатка [1] (рис. 8). Аналогичные гликозиды были найдены Ш.Ш. Афиятулловым и др. в *E. fraudatrix* [3].

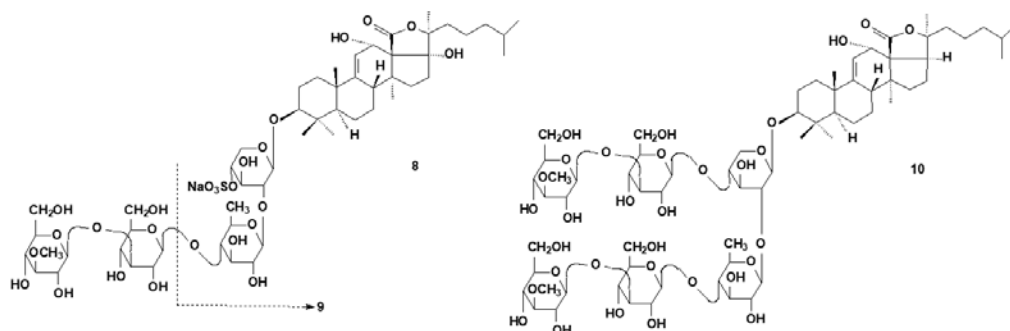


Рис. 7. Основные типы углеводных цепей гликозидов голотурий семейства Holothuriidae. 8 – голотурин А, 9 – голотурин В из *Holothuria* spp., 10 – бивиттозид D из *Bohadschia* spp.

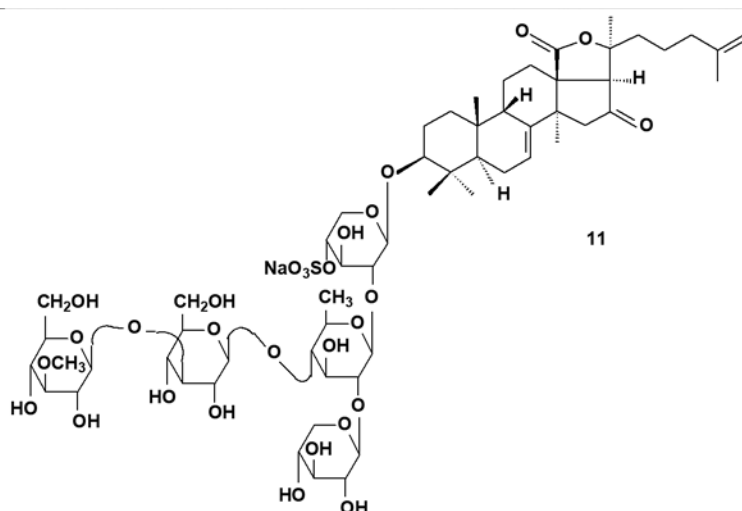


Рис. 8. Кукумариозид А<sub>2</sub>-2 (11) из голотурии *Cucumaria japonica*

С начала 1980-х годов центр тяжести в исследованиях сместился с представителей отряда Aspidochirotida на представителей отряда Dendrochirotida, который был менее изучен, а его гликозиды отличались большим структурным разнообразием. Поскольку голотурии этого отряда обитают преимущественно в холодных водах, то сбор животного материала производили главным образом в северной части Тихого океана драгированием. Кроме того, начали изучать и малодоступных тропических представителей этого отряда. Расширение круга объектов исследования привело к обнаружению новых типов агликонов, так называемых неголостановых производных, т.е. не содержащих лактона или имеющих 18(16)-лактон вместо 18(20)-лактона [27] (рис. 9).

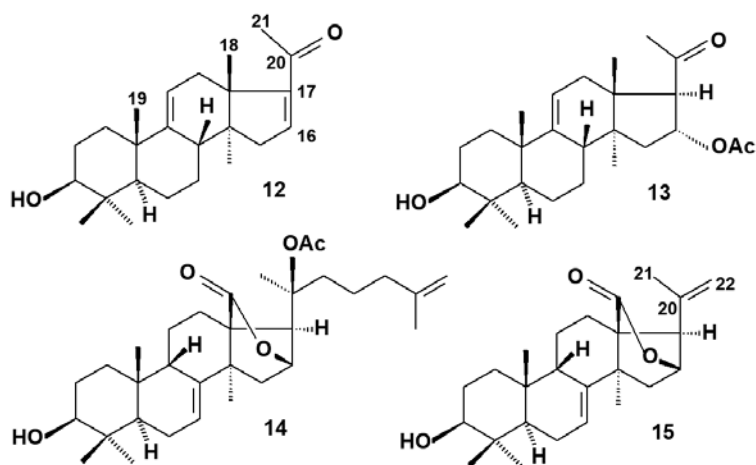


Рис. 9. Примеры негостановых агликонов. 12 – курилогенин (артефактный агликон), 13 – нативный агликон гликозидов из *Duasmodactyla kurilensis*, 14 – онекотаногенин гликозидов из *Psolus fabricii*, 15 – агликон гликозидов из *E. fraudatrix*

Удалось обнаружить углеводные цепи, сульфатированные по С-6 остатков глюкозы и 3-О-метилглюкозы (рис. 10), а также другим положениям, отличным от С-4 первого ксилозного остатка [12, 34].

К концу 1990-х годов накопленные данные о структурах, таксономическом распределении и цитотоксической активности гликозидов позволили установить, что в разных отрядах голотурий эволюция гликозидов проходит параллельно и независимо как в агликонах, так и в углеводных цепях [11], причем в ее ходе наблюдается увеличение цитотоксической активности и растворимости, а также выигрыш в метаболической цене. Это ведет к формированию мозаичного разнообразия структур, которые образуют в отдельных видах целые комбинаторные библиотеки. Был сформулирован ряд закономерностей эволюции гликозидов, аналогичных морфологическим закономерностям эволюции [26, 28].

Широкое внедрение в практику исследований высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления, методов двумерной спектрометрии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения вывело исследования тритерпеновых гликозидов

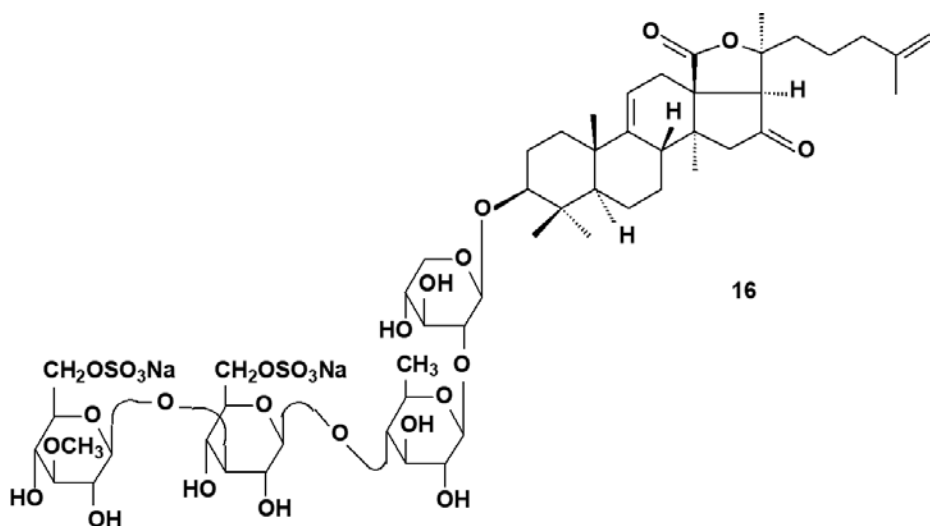


Рис. 10. Псолюлосид А (16) из *Psolus fabricii*

голотурий на новый уровень. Получение данных о многих десятках структур гликозидов позволило определить характер биосинтеза углеводных цепей как мозаичный (образующий метаболическую сеть), происходящий путем удлинения на один моносахаридный остаток с последующей независимой модификацией (сульфатирование, метилирование терминальных моносахаридных остатков и т.д.) [31]. Были обнаружены новые моносахаридные остатки – 3-О-метилглюкуроновая кислота и 3-О-метилхинозона [21, 19]. Путем анализа структур минорных неголостановых гликозидов удалось уточнить начальные стадии биосинтеза гликозидов голотурий [35]. Были обнаружены новые варианты окисления неголостановых агликонов, а также два агликона с новыми карбоциклическими системами, образовавшимися путем внутримолекулярной альдольной конденсации и перегруппировки Майнвальда [27, 32] (рис. 11).

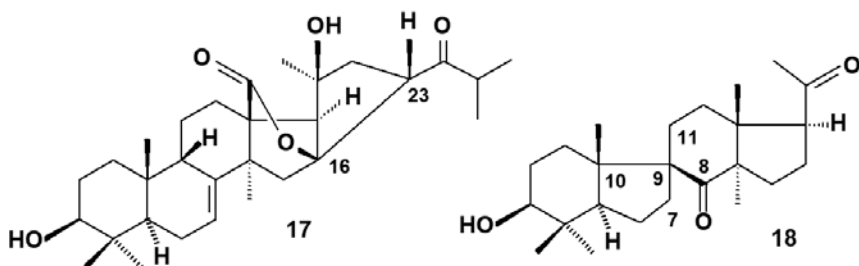


Рис. 11. Агликоны с новыми типами карбоциклических систем из гликозидов *Cucumaria fallax*. 17 – агликон с дополнительным циклом, полученным при внутримолекулярной альдольной конденсации 1,6-дикетонного предшественника; 18 – агликон с кольцом В, уменьшенным до пятичленного в результате внутримолекулярной перегруппировки Майнвальда из 8,9-эпоксидного предшественника

Тритерпеновые гликозиды использовались также в хемосистематике голотурий. Так, в продолжение классических работ [24, 25], данные которых были подтверждены на уровне полных структур основных компонентов гликозидных фракций, выделены два новых рода голотурий, а именно *Pearsonothuria* для *Bohadschia graeffei* [13] и *Australostichopus* для *Stichopus mollis* [30], а также подтверждено выделение из *Cucumaria japonica* ряда новых видов и отнесение их к роду *Cucumaria* [22]. Впервые были исследованы представители глубоководной фауны голотурий, а именно представители отряда Elapidida, собранные в Антарктике [20] и в Арктике [33], относящиеся к семейству Elpidiidae. На основе сходства их тритерпеновых гликозидов подтверждено единство происхождения семейства и пути распространения его представителей по глубоководным желобам (рис. 12).

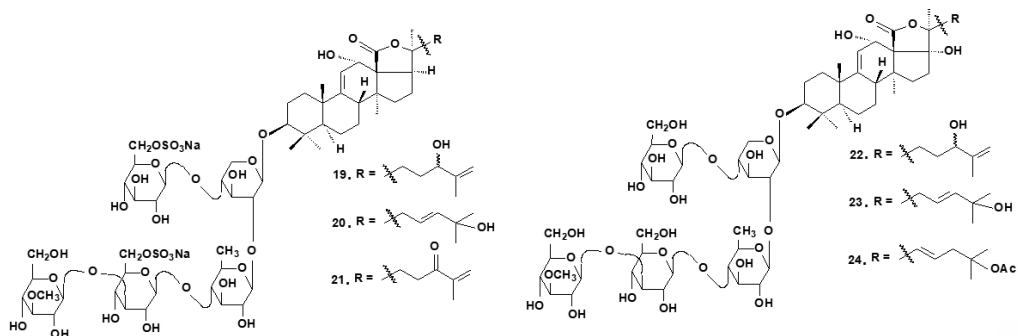


Рис. 12. Ахлионицеозиды А<sub>1</sub>–А<sub>3</sub> (19–21) из антарктической голотурии *Achlionice violaeacuspidata* (= *Rhipidothuria racowitzai*); кольгаозиды А (22) и В (23), а также голотуринозид В (24) из глубоководной арктической голотурии *Kolga hyalina*

Таким образом, за время исследования гликозидов голотурий в ТИБОХ ДВО РАН, инициированных Г.Б. Еляковым и В.Е. Васьковским и выполненных под руководством В.А. Стоника, получен огромный массив данных о структурном разнообразии, биосинтезе, таксономическом распределении и эволюции этих веществ. Всего было открыто более 250 новых природных соединений этого химического класса. Таким образом, была создана добротная структурная база для выполнения глубоких исследований по биологической активности этих веществ, весьма впечатляющие результаты и перспективы которых не затрагиваются в этой статье.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авиллов С.А., Стоник В.А., Калиновский А.И. Структура четырех новых тритерпеновых гликозидов из голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соедин. 1990. № 6. С. 787–792.
2. Антонов А.С., Стоник В.А. Гликозиды голотурий рода *Bohadschia* // Химия природ. соедин. 1986. № 3. С. 379–380.
3. Афиятуллово Ш.Ш., Калиновский А.И., Стоник В.А. Структура кукумариозидов  $C_1$  и  $C_2$  – двух новых тритерпеновых гликозидов из голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Химия природ. соедин. 1987. № 6. С. 831–837.
4. Афиятуллово Ш.Ш., Тищенко Л.Я., Стоник В.А., Калиновский А.И., Еляков Г.Б. Структура кукумариозидов  $G_1$  – нового тритерпенового гликозида из голотурии *Cucumaria fraudatrix* // Химия природ. соедин. 1985. № 2. С. 244–248.
5. Еляков Г.Б., Перетолчин Н.В. Кукумариозид С – новый тритерпеновый гликозид из голотурии *Cucumaria fraudatrix* // Химия природ. соедин. 1970. № 5. С. 637–638.
6. Еляков Г.Б., Стоник В.А., Афиятуллово Ш.Ш., Калиновский А.И., Шарыпов В.Ф., Коротких Л.Я. Нативные генины из гликозидов голотурий // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259, № 6. С. 1367–1369.
7. Еляков Г.Б., Кузнецова Т.А., Васьковский В.Е. О составе гликозидной фракции из *Stichopus japonicus* // Химия природ. соедин. 1968. № 4. С. 253–254.
8. Иванова Н.С., Сметанина О.Ф., Кузнецова Т.А. Гликозиды морских беспозвоночных. XXVI. Голотурии А из тихоокеанской голотурии *Holothuria squamifera*. Выделение нативного агликона // Химия природ. соедин. 1984. № 4. С. 448–451.
9. Ильин С.Г., Решетняк М.В., Афиятуллово Ш.Ш., Стоник В.А., Еляков Г.Б. Кристаллическая и молекулярная структура диацетата голоста-8(9)-ен-3 $\alpha$ ,16 $\beta$ -диола // Докл. АН СССР. 1985. Т. 284, № 2. С. 356–359.
10. Калинин В.И., Стоник В.А. Гликозиды морских беспозвоночных. Структура голотурина  $A_2$  из голотурии *Holothuria edulis* // Химия природ. соедин. 1982. № 2. С. 215–219.
11. Калинин В.И., Стоник В.А., Авиллов С.А. Гомологическая изменчивость и направленность в эволюции тритерпеновых гликозидов голотурий (Holothurioidea, Echinodermata) // Журн. общ. биологии. 1990. Т. 51, № 2. С. 247–260.
12. Калинин В.И., Калиновский А.И., Стоник В.А. Структура псолосозида А – основного тритерпенового гликозида из голотурии *Psolus fabricii* // Химия природ. соедин. 1985. № 2. С. 212–217.
13. Левин В.С., Калинин В.И., Стоник В.А. Опыт использования химических признаков при пересмотре таксономического статуса голотурии *Bohadschia graeffei* с выделением нового рода // Биол. моря. 1984. № 3. С. 33–38.
14. Олейникова Г.К., Кузнецова Т.А. Двухступенчатая деградация по Смитцу голотурина  $V_1$  из голотурии *Holothuria floridana* // Химия природ. соедин. 1983. № 4. С. 534–536.
15. Стоник В.А., Мальцев И.И., Калиновский А.И., Кондэ К., Еляков Г.Б. Гликозиды морских беспозвоночных. XI. Два новых тритерпеновых гликозида из голотурий семейства Stichopodidae // Химия природ. соедин. 1982. № 2. С. 194–199.
16. Стоник В.А., Мальцев И.И., Еляков Г.Б. Структура теленотозидов А и В из голотурии *Thelenota ananas* // Химия природ. соедин. 1982. № 5. С. 624–627.
17. Шарыпов В.Ф., Калиновская Н.И., Стоник В.А. Выделение голоста-9(11),25(26)-диен-3 $\beta$ -ол-16-она – нативного генина из гликозидов голотурии *Stichopus japonicus* // Химия природ. соедин. 1980. № 6. С. 845–846.
18. Шарыпов В.Ф., Калиновский А.И., Стоник В.А., Авиллов С.А., Еляков Г.Б. Выделение нативных агликонов из тритерпеновых гликозидов тихоокеанской голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соедин. 1985. № 1. С. 55–59.
19. Antonov A.S., Avilov S.A., Kalinovsky A.I., Anastuyk S.D., Dmitrenok P.S., Evtushenko E.V., Kalinin V.I., Smirnov A.V., Taboada S., Ballesteros M., Avila C., Stonik V.A. Triterpene glycosides from Antarctic sea cucumbers I. Structure of liouvillosides  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $B_1$  and  $B_2$  from the sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*, new procedure for separation of highly polar glycoside fractions and taxonomic revision // J. Nat. Prod. 2008. Vol. 71. P. 1677–1685.
20. Antonov A.S., Avilov S.A., Kalinovsky A.I., Anastuyk S.D., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Taboada S., Bosh A., Avila C., Stonik V.A. Triterpene glycoasides from Antarctic sea cucumbers. 2. Structure of achlioniceosides  $A_1$ ,  $A_2$  and  $A_3$  from the sea cucumber *Achlionice violaescupidata* (= *Rhipidothuria racowitzai*) // J. Nat. Prod. 2009. Vol. 72. P. 33–38.

21. Avilov S.A., Silchenko A.S., Antonov A.S., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Smirnov A.V., Dmitrenok P.S., Evtushenko E.V., Fedorov S.N., Savina A.S., Shubina L.K., Stonik V.A. Synaptosides A and A<sub>1</sub>, Two triterpene glycosides from the sea cucumber *Synapta maculata* containing 3-O-methylglucuronic acid and their cytotoxic activity against tumor cells // J. Nat. Prod. 2008. Vol. 71, N 4. P. 525–531.
22. Avilov S.A., Kalinin V.I., Smirnov A.V. Use of triterpene glycosides for resolving taxonomic problems in the sea cucumber genus *Cucumaria* (Holotheroidea, Echinodermata) // Biochem. System. Ecol. 2004. Vol. 32. P. 715–733.
23. Elyakov G.B., Kuznetsova T.A., Dzizenko A.K., Elkin Yu.N. A chemical investigation of the trepang (*Stichopus japonicus* Selenka): the structure of terpenoid aglycones obtained from trepang glycosides // Tetrahedron Lett. 1969. N 15. P. 1151–1154.
24. Elyakov G.B., Stonik V.A., Levina E.V., Slanke V.P., Kuznetsova T.A., Levin V.S. Glycosides of marine invertebrates-I. A Comparative study of glycoside fraction of Pacific sea cucumbers // Comp. Biochem. Physiol. 1973. Vol. 44B. P. 325–336.
25. Elyakov G.B., Kuznetsova T.A., Stonik V.A., Levin V.S., Albores R. Glycosides of marine invertebrates-IV. A Comparative study of the glycosides from Cuban sublittoral holothurians // Comp. Biochem. Physiol. 1975. Vol. 52B. P. 413–417.
26. Kalinin V.I., Stonik V.A. Application of morphological trends of evolution to phylogenetic interpretation of chemotaxonomic data // J. Theor. Biol. 1996. Vol. 180. P. 1–10.
27. Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A. Non-holostane aglycones of sea cucumber triterpene glycosides. Structure, biosynthesis, evolution // Steroids. 2019. Vol. 147. P. 43–51.
28. Kalinin V.I. System-theoretical (holistic) approach to the modelling of structural-functional relationships of Biomolecules and their evolution: an example of triterpene glycosides from sea cucumbers (Echinodermata, Holothuroidea) // J. Theor. Biol. 2000. Vol. 206. P. 151–168.
29. Kitagawa I., Kobayashi M., Hori M., Kyogoku Y. Studies of four new triterpenoidal oligoglycosides, bivittosides A, B, C, and D, from the sea cucumber *Bohadschia bivittata* Mitsukuri // Chem. Pharm. Bull. 1981. Vol. 29, N 1. P. 282–285.
30. 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 major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus* // Biochem. System. Ecol. 2004. Vol. 32. P. 637–650.
31. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Dolmatov I.Y., Kalinin V.I. Cladolosides O, P, P<sub>1</sub>–P<sub>3</sub> and R, triterpene glycosides with two novel types of carbohydrate chains from the sea cucumber *Cladolabes schmeltzii*. Inhibition of cancer cells colony formation and its synergy with radioactive irradiation // Carbohydrate Res. 2018. Vol. 468. P. 73–79.
32. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Berdyshev D.V., Chingizova E.A., Andryjaschenko P.V., Minin K.V., Stonik V.A. Fallaxosides B<sub>1</sub> and D<sub>3</sub>, triterpene glycosides with novel skeleton types of aglycones from the sea cucumber *Cucumaria fallax* // Tetrahedron. 2017. Vol. 73. P. 2335–2341.
33. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Fedorov S.N., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Kalinin V.I., Rogacheva A.V., Gebruk A.V. Kolgaosides A and B, two new triterpene glycosides from the Arctic deep water sea cucumber *Kolga hyalina* (Elasipodida: Elpidiidae) // Nat. Prod. Commun. 2014. Vol. 9, N 9. P. 1259–1264.
34. Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Stonik V.A., Smirnov A.V. Pseudostichoposide B – new triterpene glycoside with unprecedented type of sulfatation from deep-water North-Pacific seacucumber *Pseudostichopus trachus* // Nat. Prod. Res. 2004. Vol. 18, N 6. P. 565–570.
35. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Stonik V.A. 3β-O-Glycosylated 16β-acetoxy-9β-H-lanosta-7,24-diene-3β,18,20β-triol, an intermediate metabolite from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* and its biosynthetic significance // Biochem. System. Ecol. 2012. Vol. 44. P. 53–60.