

СТРУКТУРА ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ И СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ДВУХ ВИДОВ ГОЛОТУРИИ СЕМЕЙСТВА STICHOPODIDAE

В. С. ЛЕВИН, В. И. КАЛИНИН, С. Н. ФЕДОРОВ, С. СМАЙЛИ

Лаборатория хорологии Института биологии моря, Лаборатория химии морских природных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВНЦ АН СССР, Владивосток 690022; Фрайди-Харборская лаборатория Университета штата Вашингтон, Фрайди-Харбор, Вашингтон 98250, США

Основные компоненты гликозидной фракции *Stichopus californicus* идентичны гликозидам *Stichopus japonicus* (голотоксинам A₁ и B₁) и существенно отличаются от гликозидов *Stichopus chloronotus* (типовой вид рода). Комплекс химических и морфологических данных (строение спикул кожи тела, ножек щупалец, клоаки) свидетельствует о значительной таксономической обособленности *S. californicus* и *S. japonicus* и подтверждает необходимость выделения этих видов из рода *Stichopus*. Идентичность гликозидов у двух видов голотурий, один из которых обитает у американского, а другой у азиатского побережья Тихоокеана, не подтверждает точку зрения о зависимости структуры углеводных цепей голотоксинов от экологических факторов (Kitagawa et al., 1978).

The structure of triterpene glycosides and the systematic position of two holothurians of the family Stichopodidae. V. S. Levin, V. I. Kalinin, S. N. Fedorov, S. Smiley (Laboratory of Chorology, Institute of Marine Biology and Laboratory of Biosynthesis, Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok 690022; Friday Harbor Laboratories, Friday Harbor, WA 98250, USA)

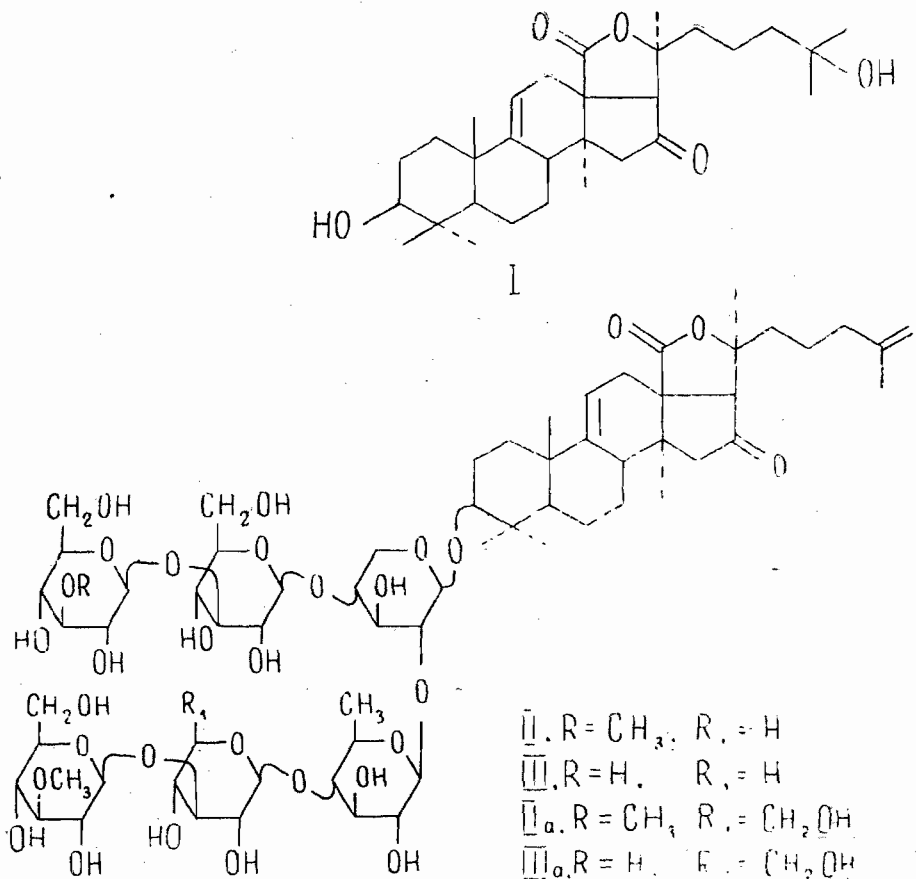
The main components of the glycoside fraction of *Stichopus californicus* are identical to the glycosides from *S. japonicus* (holotoxins A₁ and B₁) and essentially different from those of *S. chloronotus* (the type species of the genus). Chemical and morphological data suggest that *S. californicus* and *S. japonicus* are, to a large extent, taxonomically isolated and support the view that these species should be separated from the genus *Stichopus*. The identity of glycosides in the two holothurians, one of which occurs along the American and the other along the Asian coast of the Pacific, is not evidence in support of the view that the structure of holotoxin carbohydrate chains depends on ecological factors. (Mar. Biol., Vladivostok, 1986, N 4, p. 72—77)

Информация о структуре тритерпеновых гликозидов полезна при решении многих спорных вопросов систематики голотурий (Elyakov et al., 1973, 1975; Левин и др., 1983, 1984, 1985). В частности, с использованием таких данных был пересмотрен таксономический статус *Bohadschia graeffei* и установлен новый род *Pearsonothuria* (Левин и др., 1984). Было показано, что *Stichopus japonicus* отличается по биохимическим данным как от *S. chloronotus* (типовой вид рода), так и от *S. variegatus*, *Astichopus multifidus*, *Thelenota anapas*, гликозиды которых идентичны гликозидам *S. chloronotus* (Левин и др., 1983, 1985). Эти данные свидетельствовали в пользу таксономической обособленности *S. japonicus* от других химически изученных представителей *Stichopodidae*. *S. californicus* — вид, морфологически и экологически близкий к *S. japonicus*, содержал, как было известно, гликозиды, дающие при кислотном гидролизе агликон I (рис. 1), идентичный агликону из гликозидов последнего вида (Sheikh, Djerassi, 1976). Однако невозможно было сделать какие-либо заключения о таксономическом положении этих видов, поскольку не было сведений о полной структуре гликозидов *S. californicus* и морфологии ювенильных особей этого вида.

Цель настоящей работы состояла в уточнении таксономического положения двух названных видов в соответствии с информацией о полной структуре гликозидов *S. californicus*.

Материал и методика

S. californicus был собран в заливе Фрайди-Харбор, штат Вашингтон, США. Для химического анализа использовали 14 кг животных (сырая масса). Гликозиды вы-



Р и с. 1. Структура голотоксина

деляли по обычной методике (Калинин и др., 1981). Сырой голотоксин А₁ дополнительно очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Du Pont 8800, колонка 250×4,6 мм, носитель Ultrasphere-ODS, жидкая фаза: 65% этанол, 35% вода, скорость элюирования 1 мл/мин, давление 158 бар, температура 40° С. Голотоксин А₁ (II), температура плавления (т. пл.) 256–259° С, $[\alpha]^{20D} = 69$ (с 0,1; пиридин). Голотоксин В₁ (III), т. пл. 220–223° С, $[\alpha]^{20D} = 74$ (с 0,1; пиридин). Съемку ЯМР ¹³С спектров, кислотный гидролиз, моносахаридный анализ, периодатное окисление и определение физических констант проводили как описано ранее (Калинин, Стоник, 1982).

Три экземпляра были использованы для морфологического анализа: два ювенильных (возрастом до года и 2–3 года) и один взрослый. Пробы спикул кожи тела и внутренних органов получали обработкой соответствующих тканей 20% КОН с последующей отмывкой и исследовали под микроскопом.

S. japonicus собирали на различных участках зал. Петра Великого Японского моря на глубине 0,5–20 м. Результаты химических и морфологических исследований этого вида опубликованы ранее (Левин, 1982; Еляков и др., 1983; Maltsev et al., 1984).

Для сравнения было выполнено морфологическое исследование *S. chloronotus*. Просмотрено несколько десятков особей, собранных в ряде районов Индо-Восточной Африки (коллекция Института биологии моря ДВНЦ АН СССР).

Результаты

Гликозиды *S. californicus*. Из спиртового экстракта *S. californicus* были выделены два гликозида: II и III. При кислотном гидролизе гликозида II получили хиновозу, ксилозу, 3-О-метилглюкозу и глюкозу в соотношении 1:2:2:1 (идентифицировали в виде перацетатов альдононитрилов методом ГЖХ). При периодатном окислении II разрушился лишь один остаток хиновозы. Спектр ЯМР ¹³С и физические константы II были идентичны соответствующим данным голотоксина А₁ из *S. japonicus*, структура которого была установлена ранее (Еляков и др., 1983).

Гликозид III при гидролизе дал смесь хиновозы, ксилозы, 3-О-

метил-глюкозы и глюкозы в соотношении 1:2:1:2. Один остаток глюкозы и остаток хиновозы разрушился при периодатном окислении III. Спектр ЯМР ^{13}C и физические константы III были идентичны таковым голотоксина В₁ из *S. japonicus*, структура которого была установлена ранее (Maltsev et al., 1984).

Таким образом, гликозиды II и III идентифицированы как голотоксины А₁ и В₁.

Строение спикул *S. californicus* и *S. japonicus*. В стенке тела *S. californicus* залегают два типа спикул — башенки и пряжки. Широко распространено мнение, что спикулы этого вида и спикулы *S. japonicus* резко различаются, поскольку о присутствии пряжек у *S. japonicus* часто не упоминается (Clark, 1922, p. 52). Однако как литературные данные (Augustin, 1908; Choe, Ohshima, 1961), так и собственные наблюдения (Левин, 1982) показывают, что это мнение неверно. Выполненное нами исследование спикул молодых (возраст менее одного года) особей *S. californicus* и *S. japonicus* показало, что оба вида содержат как башенки, так и пряжки, практически идентичные по форме и размерам. С возрастом башенки обоих видов существенно изменяются. До возраста около двух лет эти изменения очень сходны, однако в дальнейшем направление изменений расходится: у *S. californicus* сохраняются довольно правильные башенки, тогда как у *S. japonicus* они очень сильно редуцируются. Форма пряжек у обоих видов с возрастом практически не меняется, однако у *S. japonicus* их количество быстро уменьшается. Таким образом, различия в спикулах *S. californicus* и *S. japonicus* носят возрастной характер, и у обоих видов в коже тела исходно присутствуют только два типа спикул — башенки и пряжки, тогда как у *S. chloronotus* и близких к нему видов вместо пряжек имеются С-образные тела и розетки.

В щупальцах *S. californicus* и *S. japonicus* располагаются шиповатые палочки. Хотя степень изогнутости и форма шипов в палочках у обоих видов не одинаковы, между ними наблюдается отчетливое сходство, и отдельные спикулы почти идентичны. Палочки в спикулах *S. chloronotus* резко отличны от них — они прямые и гладкие.

В стенке клоаки *S. japonicus* и *S. californicus* располагаются характерные сложные пластинки. Спикулы из клоаки *S. chloronotus* резко отличаются — это прямые или шиповатые палочки.

Опорные элементы ножек *S. japonicus* и *S. californicus* представлены довольно массивной концевой пластиной и примыкающими к ней по периферии под углом овальными перфорированными пластинками, образующими блюдцеобразную структуру. Концевая пластинка имеет отростки, переплетение которых образует объемную решетку, более сильно выраженную у *S. japonicus*. Специальные опорные спикулы в коже ножек у обоих видов отсутствуют, их функцию у *S. californicus* и молодых *S. japonicus* выполняют правильные пряжки, у взрослых особей второго вида они частично редуцируются. Ляо (Liao, 1980) неправильно называет такие редуцированные пряжки опорными палочками. Строение опорных элементов ножек *S. chloronotus* совершенно иное. Концевая пластинка составная, состоит из различного числа отдельных тонких пластинок, соединенных друг с другом краевыми отростками. Снаружи залегают спикулы, сходные с крупными розетками, а в цилиндрической части ножки — крупные опорные палочки с отростком сложной формы.

Таким образом, спикулы стенки тела, щупалец, клоаки и ножек у *S. californicus* и *S. japonicus* имеют отчетливое сходство, резко отличаясь в то же время от спикул типового вида.

Обсуждение

К настоящему времени установлена структура 8 гликозидов из *S. chloronotus*: стихопозидов А, В, С, Д, Е и 25,26-дегидроаналогов стихопозидов С, Д и Е (рис. 2). Стихопозиды А(IV) и В(V) — биозиды с одинаковыми агликонами, но разными углеводными цепями.

Таким образом, химически изученные представители *Stichopodidae* распределяются на основе состава их гликозидных фракций в две группы. Первая группа включает виды, содержащие стихопозиды и теленотозиды: *S. chloronotus*, *S. variegatus*, *A. multifidus* и *T. anapas*. Вторую группу составляют голотурии, содержащие голотоксины: *S. japonicus* и *S. californicus*. Агликон голотоксинов существенно отличается от агликонов стихопозидов и теленотозидов, но сходен с агликоном гликозидов *Cuscutaria japonica* (Шарыпов и др., 1985) и идентичен агликону из *Psolus fabricii* (Калинин и др., 1983, 1985). Эти данные свидетельствуют о значительной таксономической обособленности *S. californicus* и *S. japonicus*.

Интересно отметить, что Китагава и сотрудники (Kitagawa et al., 1978) определили структуру гликозидов из *S. japonicus* как IIa и IIIa (японские названия — голотоксин А и В соответственно). Эти структуры отличаются от II и III, установленных сотрудниками ТИБОХ ДВНЦ АН СССР (Еляков и др., 1983; Maltsev et al., 1984).

Совпадение структур основных гликозидов из *S. japonicus* и *S. californicus*, один из которых обитает у североазиатского, а второй — у североамериканского берегов Тихого океана, весьма интересно; оно показывает, что японские авторы, по-видимому, ошиблись в определении структур голотоксинов. Не подтверждается и точка зрения Китагавы и др. о влиянии экологических факторов на структуру углеводных цепей голотоксинов.

Таким образом, *S. californicus* и *S. japonicus* содержат идентичные тритерпеновые гликозиды и очень сходны морфологически, в то же время весьма существенно отличаются от *S. chloronotus*. Сравнительный анализ химических и морфологических признаков *S. californicus*, *S. japonicus* и *S. chloronotus* показывает, что оба первых вида несомненно следует исключить из рода *Stichopus*.

Однако вопрос о том, к какому роду их следует отнести, таксономически весьма непросто. В 1937 г., основываясь на отдельных морфологических признаках Дейхман (Deichmann, 1937) отнесла *S. californicus* и *S. parvimensis* (обитают у западного побережья США) к роду *Parastichopus*, установленному Кларком в 1922 г. (Clark, 1922) для двух видов — *Stichopus tremulus* (обитает в Северо-Восточной Атлантике) и *Stichopus nigripunctatus* (обитает у побережья Японии). В 1980 г. Ляо выделил *S. japonicus* во вновь установленный род *Apostichopus* (Liao, 1980).

Приведенные выше данные о значительном химическом и морфологическом сходстве *Stichopus japonicus* и *S. californicus* позволяют поднять вопрос об их конгенеричности. Как показано рядом авторов, существует определенное сходство фауны Японского моря с фауной Орегонской зоогеографической провинции (Кафанов, 1982). В этой части Тихого океана 10—14 млн. лет назад ареалы относительно теплолюбивых видов, ранее широко представленных как у азиатского, так и у американского побережий, оказались разорванными из-за похолодания. В результате последующей изоляции образовались пары видов, очень сходных друг с другом. Сходство *S. japonicus* и *S. californicus* и характер их распространения можно, по-видимому, считать примером образования такой пары.

Если признать справедливой точку зрения Дейхман, то необходимо *S. japonicus* перевести в род *Parastichopus*. Если же прав Ляо, то, наоборот, необходимо *S. californicus* перевести в род *Apostichopus*. Для окончательного решения вопроса о таксономическом статусе этих видов, по нашему мнению, необходимы данные о структуре тритерпеновых гликозидов *Parastichopus tremulus*, *P. nigripunctatus* и *Stichopus parvimensis*.

Л и т е р а т у р а

Еляков Г. Б., Мальцев И. И., Калиновский А. И., Стоник В. А. 1983. Структура голотоксина A_1 (стихопозид А), основного тритерпенового гликозида из тихоокеанской

промысловой глотурии *Stichopus japonicus* Selenka. — Биоорг. химия, т. 9, № 2, с. 280—281. **Калинин В. И., Стоник В. А., Авиллов С. А., Еляков Г. Б.** 1981. Гликозиды глотурии *Holothuria edulis*. — Химия природ. соедин., № 3, с. 403—404. **Калинин В. И., Стоник В. А.** 1982. Гликозиды морских беспозвоночных. Структура глотурина А₂ из глотурии *Holothuria edulis*. — Химия природ. соедин., № 2, с. 215—218. **Калинин В. И., Степанов В. Р., Стоник В. А.** 1983. Псолюсозид А — новый тритерпеновый гликозид из глотурии *Psolus fabricii*. — Химия природ. соедин., № 6, с. 789—790. **Калинин В. И., Калиновский А. И., Стоник В. А.** 1985. Структура псолюсозид А — основного тритерпенового гликозида из глотурии *Psolus fabricii*. — Химия природ. соедин., № 2, с. 212—218. **Кафанов А. И.** 1982. Кайнозойская история малакофаун шельфа северной Пацифики. — В кн.: Морская биогеография. М.: Наука, с. 134—176. **Левин В. С.** 1982. Дальневосточный трепанг. Владивосток: Дальневост. кн. изд-во, 192 с. **Левян В. С., Калинин В. И., Мальцев И. И., Стоник В. А.** 1983. Биохимические данные и филогения *Aspidochirota*. — В кн.: Сравн. морфология, эволюция и распространение современных и вымерших иглокожих: Тез. докл. 5-го Всесоюз. симпоз. по иглокожим. Львов: Гос. природовед. музей АН УССР, с. 35—36. **Левин В. С., Калинин В. И., Стоник В. А.** 1984. Опыт использования химических признаков при пересмотре таксономического статуса глотурии *Bohadschia graeffei* с выделением нового рода. — Биол. моря, № 3, с. 33—38. **Левин В. С., Калинин В. И., Мальцев И. И., Стоник В. А.** 1985. Структура тритерпеновых гликозидов и систематика щитовиднощупальцевых глотурий. — Биол. моря, № 2, с. 3—11. **Мальцев И. И., Стоник В. А., Калиновский А. И.** 1983. Стихопозид Е — новый тритерпеновый гликозид из глотурий семейства *Stichopodidae*. — Химия природ. соедин., № 3, с. 308—312. **Стоник В. А., Мальцев И. И., Калиновский А. И., Кондэ К., Еляков Г. Б.** 1982а. Гликозиды морских беспозвоночных. XI. Два новых тритерпеновых гликозида из глотурий семейства *Stichopodidae*. — Химия природ. соедин., № 2, с. 194—199. **Стоник В. А., Мальцев И. И., Калиновский А. И., Еляков Г. Б.** 1982б. Гликозиды морских беспозвоночных. XII. Структура нового тритерпенового олигогликозида из глотурий семейства *Stichopodidae*. — Химия природ. соедин., № 2, с. 200—204. **Стоник В. А., Мальцев И. И., Еляков Г. Б.** 1982в. Структура теленотозидов А и В из глотурии *Thelepotia anapas*. — Химия природ. соедин., № 5, с. 624—627. **Шарылов В. Ф., Чумаков А. Д., Стоник В. А., Еляков Г. Б.** 1981. Гликозиды морских беспозвоночных. X. Структура стихопозидов А и В из глотурии *Stichopus chloronotus*. — Химия природ. соедин., № 2, с. 181—184. **Шарылов В. Ф., Калиновский А. И., Стоник В. А., Авиллов С. А., Еляков Г. Б.** 1985. Выделение нативных генов из тритерпеновых гликозидов глотурии *Cucumaria japonica*. — Химия природ. соедин., № 1, с. 55—59. **Augustin E.** 1908. Über japanische Seewalzen. — Abh. Akad. Wiss. München, Suppl., Bd. 2, Abh. 1, S. 1—44. **Choe S.** 1963. Biology of the Japanese common sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. Tokyo: Kaibundo, 226 p. **Choe S., Ohshima Y.** 1961. On the morphological and ecological differences between two commercial forms, «green» and «red», of the Japanese common sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. — Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., v. 27, N 2, p. 97—106. **Clark H. L.** 1922. Holothurians of genus *Stichopus*. — Bull. Mus. Comp. Zool. Harv., v. 65, p. 39—74. **Deichmann E.** 1937. Holothurians from the Gulf of California. The Templeton Crocker Expedition, 9. — Zoologica, New York Zool. Soc., v. 22, p. 161—176. **Elyakov G. B., Stonik V. A., Levina E. V., Slanke V. P., Kuznetsova T. A., Levin V. S.** 1973. Glycosides of marine invertebrates. I. A comparative study of glycoside fraction of Pacific sea cucumber. — Comp. Biochem. and Physiol., v. 44 B, p. 325—336. **Elyakov G. B., Kuznetsova T. A., Stonik V. A., Levin V. S., Albores R.** 1975. Glycosides of marine invertebrates. IV. A comparative study of the glycosides from Cuban sublittoral holothurians. — Comp. Biochem. and Physiol., v. 52 B, p. 413—417. **Kitagawa I., Yamanaoka H., Kobayashi M., Nishino T., Yosioka I., Sugawara T.** 1978. Saponine and saponenol. XXVII. Revised structures of holotoxin A and holotoxin B, two antifungal oligoglycosides from the sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. — Chem. Pharm. Bull., v. 26, p. 3722—3731. **Kitagawa I., Kobayashi M., Inamoto T., Yasuzawa T., Kyogoku Y.** 1981. The structures of six antifungal oligoglycosides, sticholrosides A₁, A₂, B₁, B₂, C₁ and C₂ from the sea cucumber *Stichopus chloronotus* (Brandt). — Chem. Pharm. Bull., v. 29, p. 2387—2391. **Liao.** 1980. The aspidochirote holothurians of China with erection of a new genus. — In: Echinoderms: past and present. Rotterdam: A. A. Balkema, p. 115—120. **Maltsev I. I., Stonik V. A., Kalinovskiy A. I., Elyakov G. B.** 1984. Triterpene glycosides from sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. — Comp. Biochem. and Physiol., v. 78 B, p. 421—426. **Mitsukuri K.** 1897. On changes which are found with advancing age in the calcareous deposits of *Stichopus japonicus* Selenka. — Ann. Zool. Japan, v. 1, pt. 1—2, p. 31—42. **Sheikh Y. M., Djerassi C.** 1976. Bioconversion of lanosterol into holotoxygenin, triterpenoid from the sea cucumber *Stichopus californicus*. — Chem. Commun., N 24, p. 1057—1058.

Поступила 22 XI 1985