

## ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С РОСТОМ ГОЛОТУРИИ CUCUMARIA FRAUDATRIX

В. С. ЛЕВИН и В. А. СТОНИК

Тихоокеанский институт биорганической химии ДВНЦ АН СССР,  
Владивосток 690022

Содержание тритерпеновых гликозидов в тканях голотурий *Cucumaria fraudatrix* определяли по степени гемолиза эритроцитов и с помощью специфической цветной реакции. Количество гликозидов в начальный период роста голотурий до достижения половозрелости увеличивается, при дальнейшем росте животных остается почти постоянным. Содержание гликозидов в стенках тела голотурий соответствующих размерных групп оставалось в период с декабря по май на одном уровне, тогда как в годах значительно уменьшилось.

Голотурии — единственная в животном царстве группа, вырабатывающая тритерпеновые гликозиды — сильнейшие гемолитики, обладающие также цитотоксическим действием и высокой антигрибковой активностью (Baslow, 1969). Показано, что количество гликозидов в организме голотурий варьирует в зависимости от систематического положения животных, их экологических особенностей и времени года (Yamaouchi, 1955; Elyakov et al., 1973; Matsuno et al., 1973).

Настоящее исследование ставило целью выяснить, меняется ли содержание гликозидов в процессе роста и индивидуального развития голотурий.

Удобным объектом для проведения такой работы оказалась *Cucumaria fraudatrix* Djakovov et Vaganova. Эта небольшая (длиной до 7 см) голотурия на отдельных участках побережья достигает очень высокой численности — до 300 экз./м<sup>2</sup>, что дает возможность получить с небольшой площади необходимое количество животных разных размеров. Этим в значительной степени устранивается трудно учитываемое влияние факторов окружающей среды, неизбежное при сборе материала с разных мест обитания.

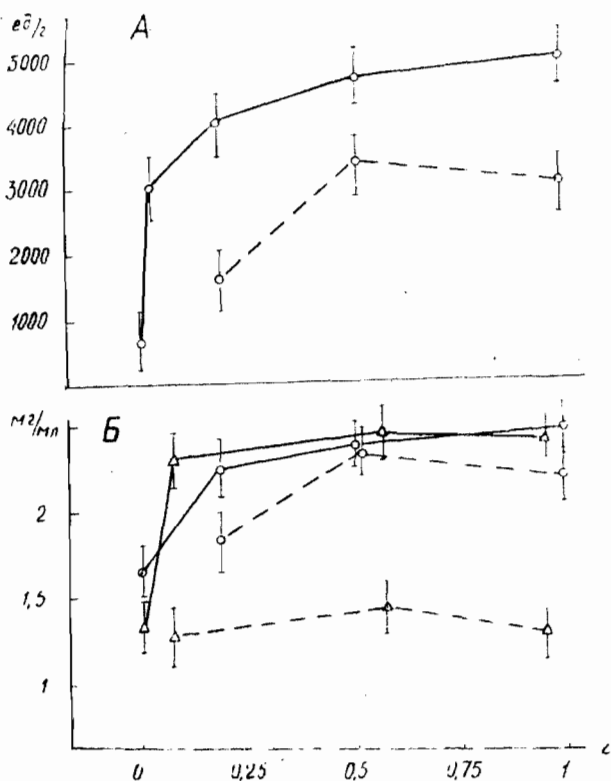
Голотурий собирали в бухте Троицы Японского моря на глубине 0,5—1 м с декабря 1974 по май 1975 г. ежемесячно. Животных разделяли на 4—6 размерных групп, препарировали, стенки тела и внутренние органы особой из каждой группы раздельно экстрагировали метанолом и высушивали в термостате при 55°. Затем пробы измельчали, добавляли метанол до соотношения 1 : 10 (к сухому весу) и экстрагировали при энергичном встряхивании 2 часа. Исследование метанольных экстрактов методом тонкослойной хроматографии (силикагель КСК, система хлороформ : метанол : вода = 60 : 30 : 2, обнаружение пятен — 90%-ной трихлоруксусной кислотой при 110°) показало, что состав гликозидных фракций у животных разных размерных групп остается приблизительно постоянным.

Содержание гликозидов оценивали двумя параллельными методами — по степени гемолиза эритроцитов (гемолитическому индексу) и с помощью цветной реакции на агликонную часть молекулы гликозида.

1. Гемолитический индекс на 1 г сухого веса животных определяли по методике, сходной с описанной (Thron, 1964). Использовали 3%-ную суспензию эритроцитов человека (из крови донора, полученной на стачил переливания крови), предварительно отмытую смесью (3:1) 1,2%-ного NaCl и 0,02 М фосфатного буфера (pH=7). Порцию исследуемого экстракта упаривали, сухой остаток трижды обрабатывали эфиром, центрифугировали, осадок растворяли в воде и экстрагировали бутанолом, бутанольный экстракт упаривали досуха и растворяли в фосфатном буфере.

Гемолиз проводили в пробирках (9 мл суспензии эритроцитов + 1 мл экстракта) при комнатной температуре. Степень гемолиза определяли по оптической плотности через 2 часа на спектрофотометре Specond UV VIS при  $\lambda_{\max}$  = 540 нм. В качестве эталона использовали стандартный салонин Merck (гемолитический индекс = 33 000).

2. Для количественного определения гликозидов использовали цветную реакцию Розенгейма (Rosenheim, 1929, по Вайсбергер, 1967). В порцию исследуемого метаноль-



Изменение содержания гликозидов по результатам измерения гемолитического индекса (А) и цветной реакции (Б). Сплошные линии — содержание гликозидов в стенках тела, штриховые — в гонадах; линии с кружками — декабрь, с треугольниками — май. На абсциссе — вес тела, г; на ординате — гемолитический индекс, ед./г (А) и концентрация гликозида, мг/мл (Б). Каждая точка — среднее значение из 5–10 повторностей опытов

шем росте животных остается почти постоянным или даже несколько снижается (см. рисунок). Исследование гонад голотурий разных размеров показало, что прекращение увеличения содержания гликозидов совпадает с моментом вступления животных в фертильную стадию.

Содержание гликозидов в стенках тела голотурий соответствующих размерных групп оставалось в период с декабря по май на одном уровне, тогда как в гонадах значительно уменьшилось.

В последние годы появились сообщения о том, что, помимо традиционно приписываемого гликозидам иглокожих защитного действия, они могут принимать участие в физиологических процессах, протекающих в организме этих животных (Ikegami and Tamura, 1972, 1973). Полученные нами данные свидетельствуют об изменении в процессе роста голотурии *S. fraudatrix* содержания триггереновых гликозидов, связанном со зрелостью гонад, что подтверждает возможность участия гликозидов в процессе размножения.

#### Литература

- Вайсбергер А. (Ред.). 1967. Установление структуры органических соединений химическими методами. I, М., «Химия»: 1–532.
- Baslow M. H. 1969. Marine pharmacology. Baltimore. William and Wilkins: 1–286.
- Elyakov G. B., Stonik V. A., Levina E. V., Slanke V. P., Kuznetsova T. A. and Levin V. S. 1973. Glycosides of marine invertebrates. I. A comparative study of the glycoside fractions of the pacific sea cucumbers. Comp. biochem. physiol., 44 B: 325–336.
- Ikegami S. and Tamura S. 1972. Spawning inhibitor in gonads of the starfish *Asterina pectinifera*. Agr. biol. chem., 36, 11: 1899–1902.
- Ikegami S. and Tamura S. 1973. Spawning control in starfish. Experientia, 29, 3: 325.

ного экстракта животного добавляли 3-кратное по объему количество трихлоруксусной кислоты и выдерживали смесь 1 час при 50°. Оптическую плотность измеряли на Specord UV VIS при  $\lambda_{\max} = 640$  нм. Для получения калибровочной кривой использовали стандартную сумму гликозидов *S. fraudatrix*, полученную из бутанольного экстракта высаждением холестерина и последующей гель-фильтрацией, как это описано ранее (Elyakov et al., 1973).

Степень половозрелости животных определяли исследованием препаратов гонад под микроскопом. Гонады фиксировали жидкостью Карнуа. Парафиновые срезы толщиной 6–7 мк окрашивали гематоксилин-эозином.

Установлено, что гликозиды содержатся в голотурьях *S. fraudatrix* всех размерных групп. Количество гликозидов у молодых неполовозрелых особей (длина тела около 3 мм, сухой вес 0,0015 г) относительно невелико. В период роста голотурий до достижения ими веса около 0,2 г содержание гликозидов резко увеличивается, а при дальней-

- Matsuno T. and Ishida T. 1969. Distribution and seasonal variation of toxic principles of sea-cucumber (*Holothuria leucospilota*). *Experientia*, 25, 12: 1261.
- Matsuno T., Sakushima A. and Ishida T. 1973. Seasonal variations of saponin and its distribution in the body of sea-cucumber, *Stichopus japonicus*. *Bull. Jap. soc. sci. fish.*, 39, 3: 307—310.
- Thron C. D. 1964. Hemolysis of holothurin A, digitonin, and quillaia saponin. *J. pharm. experim. therap.*, 145, 2: 194—203.

Поступила 10 VII 1975

## GROWTH-DEPENDENT VARIATION OF TRITERPENE GLYCOSIDES CONTENT IN HOLOTHURIAN CUCUMARIA FRAUDATRIX

V. S. Levin and V. A. Stonik

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok 690022*

### SUMMARY

Triterpene glycoside content in the tissue of holothurian *Cucumaria fraudatrix* was determined according to hemolytic potency and by specific colour reaction. Glycoside content at the initial stage of holothurian growth increases till sexual maturity, and then remains almost constant.