

## Токсические свойства тритерпеновых гликозидов голотурий

Д.Л. Аминин, В.И. Калинин

Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН  
(ТИБОХ ДВО РАН), Проспект 100-летия Владивостока, д. 159,  
г. Владивосток, 690022, Российская Федерация

Поступила 17.01.2019 г. Принята к публикации 01.03.2019 г.

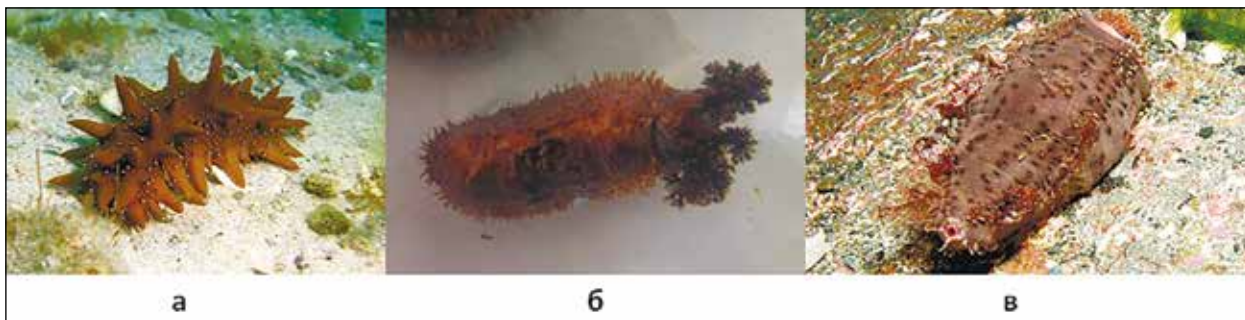
Голотурии (или морские огурцы) – распространенные во всех районах мирового океана животные, относящиеся к типу иглокожих. Они продуцируют низкомолекулярные метаболиты – тритерпеновые гликозиды, являющиеся их средством химической защиты от морских хищников. Тритерпеновые гликозиды голотурий высокотоксичны. В экспериментах на различных типах клеток и клеточных линиях они проявляют гемолитическую, иммунотоксическую, цитотоксическую, эмбриотоксическую и нейротоксическую активности в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-6}$  М. По токсичности для экспериментальных животных при внутривенном или внутрибрюшинном введении некоторые из них сопоставимы с боевыми отравляющими веществами, например, с сернистым ипритом. В основе токсических свойств гликозидов лежит способность к взаимодействию с  $\Delta^5$ -стеринами (главным образом, с холестерином) плазматических мембран и формированию ион-проводящих комплексов. В свою очередь это ведет к изменению ионной проницаемости и избирательности биомембран, нарушению барьерных свойств, ионного гомеостаза и осмолярности клеток, а далее к лизису клеток и их гибели. Содержание тритерпеновых гликозидов в тканях голотурий может достигать значительного количества – до 1 г/кг. Особенно много таких соединений локализовано в кювьеровых трубочках – специальных органах защиты, которые имеются у большинства видов тропических голотурий. Для России тритерпеновые гликозиды голотурий представляют еще не оцененную должным образом биологическую опасность, так как голотурии являются промысловыми животными и широко используются как пищевые продукты, для приготовления лечебных добавок и лекарственных препаратов. Попадание токсичных тритерпеновых гликозидов на кожу и слизистые глаз способно вызвать местные поражения, проникновение в кровоток человека, может привести к лизису эритроцитов крови, подавлению его иммунитета к инфекционным агентам. Контроль качественного и количественного содержания гликозидов в пищевых и лечебных продуктах из голотурий и определение структур этих гликозидов должен быть составной частью мер по повышению биологической безопасности граждан Российской Федерации.

**Ключевые слова:** гемолитическая активность; голотурии; иммуномодулирующие свойства; мембранотропные свойства; нейротоксические свойства; токсические свойства; тритерпеновые гликозиды; цитотоксическая активность.

**Библиографическое описание:** Аминин Д.Л., Калинин В.И. Токсические свойства тритерпеновых гликозидов голотурий // Вестник войск РХБ защиты. 2019. Т. 3. № 1. С. 23–39.

Голотурии (морские огурцы), принадлежащие к классу Holothuroidea, относятся к типу иглокожие (Echinodermata), в который, кроме них, входят еще морские ежи, морские звезды, офиуры (змеехвостки) и морские лилии.

Голотурии встречаются во всех районах мирового океана, включая моря Российской Федерации. Класс Holothuroidea по общепризнанной классификации разделяют на пять отрядов: Dendrochirotida (Древовиднощупальцевые), Aspi-



**Рисунок 1 – Фотографии промысловых голотурий, обитающих в морях Российской Федерации (а – дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus*; б – кукумария японская *Cucumaria japonica*; в – оранжевоногая голотурия *Cucumaria frondosa*)**

<sup>1</sup> Фотографии с сайтов [www.aqualogo.ru](http://www.aqualogo.ru) и [www.piboc.dvo.ru](http://www.piboc.dvo.ru) (дата обращения 19.12.2018).

dochirotida (Щитовиднощупальцевые), Elapsozoa (Боконогие), Molpadida (Боченкообразные), Synaptida (Безногие), насчитывающих около 1100 видов [1]. Некоторые из них съедобны, считаются деликатесом во многих странах мира и имеют высокую коммерческую ценность, поэтому являются объектом интенсивного пищевого промысла в странах Юго-Восточной Азии, Канаде, США и Российской Федерации. Особенно высоко пищевые продукты из голотурий ценятся в Китае и Японии, где им традиционно приписывают общеукрепляющие и тонизирующие свойства [3, 4]. В то же время упускается из виду то обстоятельство, что голотурии продуцируют токсичные низкомолекулярные метаболиты – тритерпеновые гликозиды, являющиеся их средством химической защиты от морских хищников. Цель работы – анализ токсических свойств тритерпеновых гликозидов голотурий.

**Химические свойства тритерпеновых гликозидов.** Голотурии – животные с кожистым и удлинённым мягким телом, утратившие скелет в ходе эволюции. Поэтому для любого морского хищника они представляли бы лакомую добычу, если бы эволюция не позаботилась снабдить их химическим механизмом самообороны – способностью продуцировать токсические метаболиты. У разных видов голотурий эта способность выражена в разной степени [5–8] (рисунки 1 и 2).

Тритерпеновые гликозиды голотурий – природные низкомолекулярные соединения, химическая структура которых состоит из двух частей – тритерпенового агликона и углеводной цепи, соединённой с агликоном О-гликозидной связью. В большинстве случаев тритерпеновые гликозиды голотурий имеют агликаны ланостановой природы с 18(20)-лактоном, в основе струк-

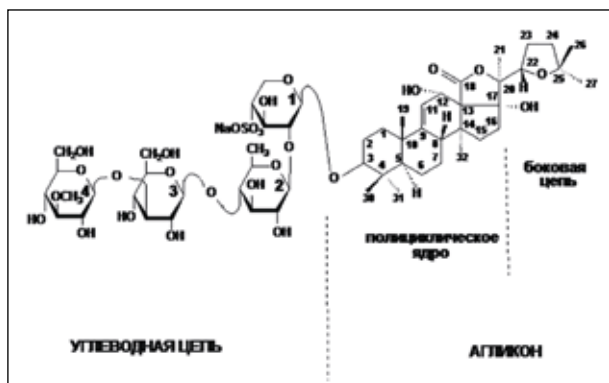
туры которых лежит голостан, поэтому они относятся к голостановому ряду соответственно [9]. Но начиная с 1980-х гг., благодаря интенсивным поисковым структурным исследованиям, в голотуриях стали обнаруживать и новые структурные типы агликонов [10–12].

Углеводная цепь тритерпеновых гликозидов голотурий может быть либо линейной, либо разветвлённой. В свою очередь в состав углеводных цепей могут быть включены до шести различных моносахаридных остатков (пентоз и гексоз) и от одной до трех сульфатных групп. Обычно моносахаридный состав включает D-ксилозу, D-хиновою, D-глюкозу, 3-О-метил-D-глюкозу и 3-О-метил-D-ксилозу. Химическая структура одного из первых изученных тритерпеновых гликозидов голотурий – голотурина А с установленной полной структурой представлена на рисунке 3. Разно-



**Рисунок 2 – Российские пищевые продукты из голотурий (трепангов)**

<sup>1</sup> Существуют и более современные классификации, основанные, например, на результатах геносистематики, включающие значительно большее количество отрядов [2]. Но таксономия голотурий не является объектом данного исследования.



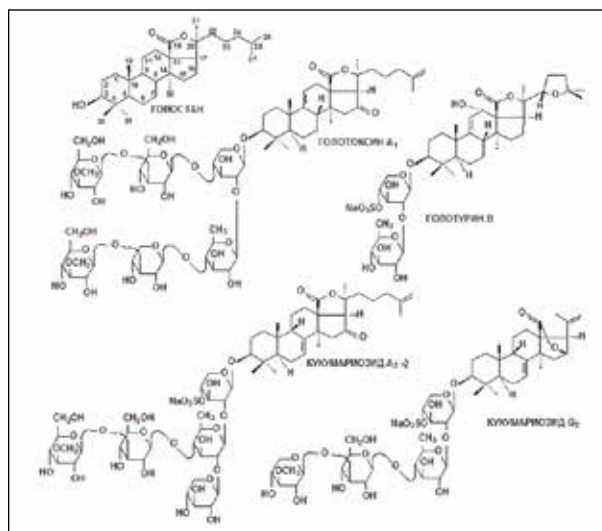
**Рисунок 3** – Структура голотурина А из голотурии *Holothuria leucospilota* [13]

(Позиционные номера в агликозе соответствуют конкретным атомам углерода. Номера в углеводной цепи, присоединенной к С-3 агликона, обозначают положения моносахаридных остатков относительно агликона (1 – остаток ксилозы, сульфатированной по положению С-4; 2 – остаток хиновозы (6-дезоксиглюкозы); 3 – остаток глюкозы; 4 – остаток 3-О-метилглюкозы. Все моносахаридные остатки относятся к D-ряду, находятся в пиранозной форме, и имеют β-конфигурации гликозидных центров)

образе структур тритерпеновых гликозидов представлено на рисунке 4.

Количественное содержание тритерпеновых гликозидов в тканях голотурий. В России только четыре вида голотурий считаются съедобными – трепанг (*Stichopus japonicus*) и два вида кукумарии (*Cucumaria japonica* и *Cucumaria okhotensis*), обитающие в дальневосточных морях, а также вид кукумарии (*Cucumaria frondosa*) из Баренцева и Белого морей. Вылов трепанга в настоящее время полностью запрещен, он доступен только как продукция марикультурных хозяйств. В то же время кукумарию официально добывают в широких масштабах и производят из нее ряд пищевых продуктов. Содержание тритерпеновых гликозидов в этих голотуриях невелико; мышечная ткань содержит порядка 2,4–3,3 мг/кг от общей массы тела, внутренности содержат несколько меньшее количество гликозидов (0,6–1,6 мг/кг) [14]. Гликозиды неравномерно распределены по различным органам и тканям голотурий в зависимости от сезона. Например, у трепанга наибольшее количество гликозидов отмечается в гонадах самок, причем оно резко, в десятки раз, возрастает в гонадах в период нереста этих животных в июле, что может быть связано с участием этих соединений в процессах репродукции [15, 16]. У тропических голотурий содержание гликозидов в тканях гораздо выше и может достигать, как, например, у голотурии *Holothuria scabra*, до 1 г/кг [17].

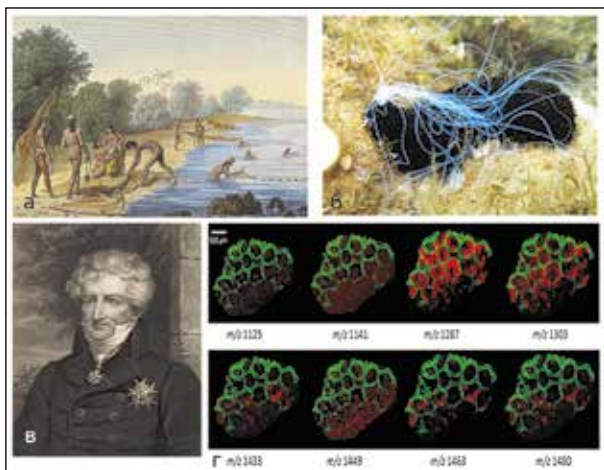
**Токсические свойства тритерпеновых гликозидов голотурий.** Одним из наиболее



**Рисунок 4** – Примеры структурного разнообразия тритерпеновых гликозидов голотурий [18, 33–35]

(Голостан – модельное ланостановое производное с 18(20)-лактоном, лежащее в основе большинства токсичных тритерпеновых гликозидов голотурий. Голотоксин А<sub>1</sub> – тритерпеновый несulfатированный гликозид, содержащий шесть моносахаридных остатков в разветвленной по первому моносахариду углеводной цепи; характерен преимущественно для голотурии *Apostichopus japonicus* (дальневосточный трепанг) и других североокеанских представителей семейства *Stidhopodidae*. Голотурин В – сульфатированный тритерпеновый гликозид с двумя моносахаридными остатками, в боковой цепи содержит 22,25-эпокси группу; характерен для голотурий родов *Holothuria*, *Actinopurga* и *Pearsonothuria*. Кукумариозид А<sub>2</sub>-2 – сульфатированный разветвленный гликозид с пятью моносахаридными остатками; характерен для голотурии *Cucumaria japonica* (кукумария японская). Кукумариозид G<sub>2</sub> – минорный малотоксичный гликозид, неголостановой природы, агликон которого содержит 18(16)-лактон вместо 18(20)-лактона и терминальную 3-О-метилксилозу вместо 3-О-метилглюкозы, характерных для большинства голотурий; обнаружен в голотуриях *Eupentacta fraudatrix* (кукумария обманщица) и *Pentamera calcigera*)

ранних задокументированных наблюдений проявления биологической активности тритерпеновых гликозидов голотурий является описание их ихтиотоксичности. Хорошо известно, что коренное население Гуама, Маршалловых островов и других регионов тропической зоны Тихого и Индийского океанов использовало некоторые виды голотурий, которых разрезали на куски и бросали в воду для «усыпления», обездвиживания и ловли рыбы в мелких морских лагунах, образующихся во время отлива. В



**Рисунок 5 – Использование ихтиотоксичности голотурий для «усыпления», обездвиживания и ловли рыбы в мелких морских лагунах [20, 22] (Ловля рыбы на Гуаме коренными жителями чаморро (а); голотурия *Holothuria forskali*, выпустившая трубки токсичных кювьеровых органов (б); знаменитый французский натуралист Жорж Кювье, по имени которого названы кювьеровы органы (в) и изображения локализации серии тритерпеновых гликозидов (г), имеющих различные значения  $m/z$  (выделены красным цветом), на гистологических поперечных срезах кювьеровых трубок голотурии *Holothuria forskali*, полученные методом MALDI-визуализации)**

качестве таких средств рыболовства использовали в основном голотурии *Bohadschia argus* и *Holothuria atra* [18, 19]. Такой способ добычи рыб представлен на рисунке 5.

Многие голотурии имеют специальные органы активной защиты, так называемые кювьеровы трубочки, содержащие высокие концентрации тритерпеновых гликозидов. Кювьеровы органы или кювьеровы трубочки – внутренний орган у некоторых голотурий (главным образом представителей отряда щитовиднощупальцевых, *Aspidochirotida*), имеющий вид длинных полых нитей. Кювьеровы органы могут выбрасываться наружу. Кювьеровы трубочки – уникальный орган, который не встречается у других животных. Название этот орган получил по имени знаменитого французского натуралиста Жоржа Кювье (Jean Léopold Nicolas Frédéric Cuvier, 1769–1832), подробно описавшего внутреннее строение иглокожих.

Кювьеровы органы прикрепляются к основанию водных легких и обычно имеют вид трубочек, стенки которых образованы

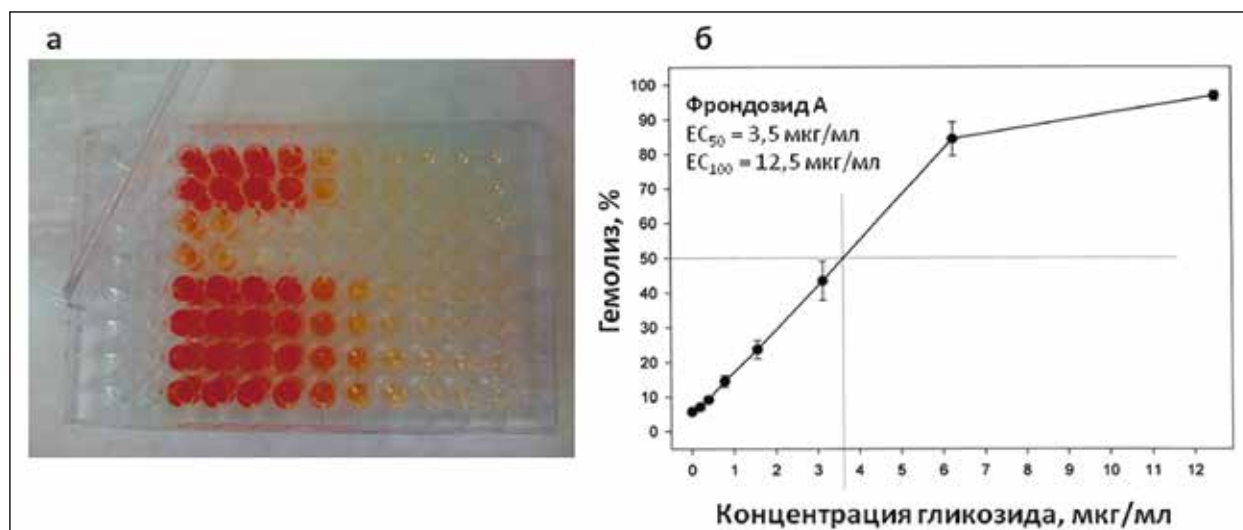
сложенными в виде сжатой пружины волокнами. Снаружи эта спираль покрыта защитным чехлом из тонкой мембраны. Многие голотурии в случае сильного внешнего раздражения выбрасывают кювьеровы органы через анальное отверстие. При раздражении голотурии вода из водных легких нагнетается в кювьеровы трубочки и они, пробивая стенку клоаки, выбрасываются наружу. Нити кювьеровых органов, соприкасаясь с водой, мгновенно набухают, удлиняясь и становясь исключительно клейкими. Выброшенные органы принимают вид длинных нитей, обычно белого цвета, которые обволакивают врага, лишая его подвижности (особенно это эффективно против крабов или хищных брюхоногих моллюсков). Кроме того, они могут оказывать отравляющее воздействие на врага, поскольку содержат высокие концентрации токсичных тритерпеновых гликозидов, поражающих дыхательную систему хищников. Например, у голотурии *Actinopyga echinites* содержание гликозидов в стенках тела колеблется в пределах 25 мг/кг, в то время как в кювьеровых органах этой голотурии оно достигает 278 мг/кг сырой ткани [20]. Они могут быть опасны даже для человека, поскольку в высоких концентрациях могут вызвать токсические поражения глаз, что иногда встречается у ныряльщиков, совершающих погружения без очков или масок в местах с высокой численностью голотурий [21].

Недавно с помощью методов MALDI-MS<sup>2</sup> и MALDI-IMS<sup>3</sup> было показано, что голотурия *H. forskali* содержит порядка 26 тритерпеновых гликозидов, идентифицируемых по их значениям  $m/z$  и локализованных, главным образом, в эпидермисе и мезотелии стенки тела и кювьеровых трубках животного. В тот момент, когда голотурии подвергались внешнему раздражению (стрессу) и выбрасывали кювьеровы органы в воду, эти соединения высвобождались в окружающую среду, оказывая токсическое и отпугивающее действие на хищников [20, 22] (см. рисунок 5).

Эти наблюдения привели к исследованию, прежде всего, ихтиотоксических свойств водных экстратов голотурий по отношению к морским обитателям [23–25]. Скринин биологической активности позволил установить наличие ихтиотоксических веществ в 30 видах морских огурцов, принадлежащих к четырем различным отрядам [24, 25], причем экстракты из голотурий *Actinopyga agassizi* [26]

<sup>2</sup> Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass-spectrometry (Матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная масс-спектрометрия).

<sup>3</sup> Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass-spectrometry (Матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная визуализационная масс-спектрометрия).



**Рисунок 6 – Определение гемолитической активности притерпеновых гликозидов [69]**  
(а – спектрофотометрическое определение концентрации гемоглобина, высвободившегося в результате гемолиза крови, с помощью ридера в 96-луночных планшетах; б – установление эффективных концентраций гемолитического действия гликозидов на примере фрондозид А из голотурии *Cucumaria frondosa*)

и *Holothuria leucospilota* (*H. vagabunda*) [24] были исследованы одними из первых. Установлено, что водные экстракты этих голотурий содержат фракции гликозидов, получивших название «голотурин».

На основании проведенного гистологического анализа было сделано заключение, что гибель рыб под воздействием фракций гликозидов наступает в результате повреждения и разрушения капилляров кровеносной системы в жабрах. У некоторых голотурий, например, *Actinopyga agassizi*, «голотурин» в кювьеровых органах достигает довольно высокой концентрации. Одна унция экстракта из кювьеровых органов этой голотурии, разведенная в 750 галлонах воды (27 г/2850 л), убивала рыбу за 23 мин [21].

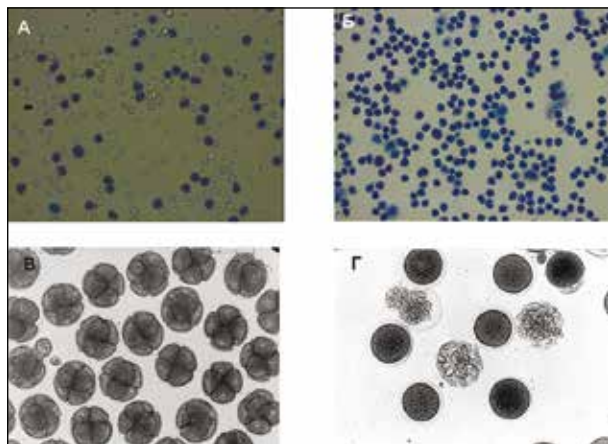
Впоследствии были определены летальные дозы «голотурина» для целого ряда различных животных, включая дождевых червей, лягушек и мышей. ЛД<sub>50</sub><sup>4</sup> для мышей через 24 ч после введения «голотурина» были 0,75; 70 и 400 мг/кг при внутривенном, подкожном и пероральном способах введения соответственно [24], что вполне сопоставимо с токсичностью сернистого иприта<sup>5</sup>. В более поздний период была определена острая токсичность фракции гликозидов экстракта кукумарии *Cucumaria japonica*, названной «кукумариозид». Для мышей ЛД<sub>50</sub> составила

10 мг/кг при внутрибрюшинном способе введения [27].

**Гемолитическая активность гликозидов голотурий.** При исследовании биологической активности гликозидов голотурий на клетках теплокровных животных R.F. Nigrelli и T. Yataouchi впервые показали, что гликозидная фракция «голотурин» вызывает гемолиз эритроцитов кролика, причем эффективность гемолитического действия «голотурина», оцениваемая по гемолитическому индексу (НИ), была почти в 7 раз больше, чем у «сапони-на», представляющего собой смесь тритерпеновых гликозидов растительного происхождения [24, 25, 28]. Гемолитический индекс (НИ) – это наименьшая концентрация вещества, которая вызывает полный гемолиз эритроцитов, который оценивается спектрофотометрически по концентрации гемоглобина. Количественное определение тритерпеновых гликозидов гемолитическим методом основано на предположении, что гемолитическое действие прямо пропорционально количеству вещества в растворе. В последнее время широкое распространение получил метод спектрофотометрического определения концентрации гемоглобина, высвободившегося в результате гемолиза эритроцитов, с помощью ридеров планшетного формата и подсчет полумаксимальной

<sup>4</sup> ЛД<sub>50</sub> (полулетальная доза, также DL<sub>50</sub> (также LD<sub>50</sub>, lethal dose) — средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы. Один из наиболее широко применяемых показателей опасности ядовитых и умеренно токсичных веществ.

<sup>5</sup> При подкожном введении летальная доза сернистого иприта 40–60 мг/кг массы (Франке Э. Химия отравляющих веществ. М., 1973. С. 166).



**Рисунок 7 – Цитотоксическая и эмбриотоксическая активность тритерпеновых гликозидов в отношении иммунных клеток мыши и развивающихся эмбрионов морского ежа под действием кукумариозида  $A_2-2$  [70]**

(На микрофотографии 50%-ная (А) и 100%-ная (Б) гибель иммунных клеток, определяемая окрашиванием красителем трипановый, и блокировка деления и лизис бластомеров эмбрионов морского ежа (Г). В – контрольные эмбрионы)

эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) гликозида<sup>6</sup> (рисунок 6).

Гемолитическое действие «голотурина» наблюдали не только в экспериментах *in vitro* при тестировании препарата в суспензии эритроцитов, но и *in vivo* после введения препарата в лимфатические сосуды лягушки *Rana ripiens*. В этом случае наблюдаемый гемолиз сопровождался интенсификацией кроветворной активности [28].

Было установлено, что гемолитическая активность различных гликозидных фракций различается в зависимости от видов голотурий, из которых эти фракции получены. Так, при исследовании гликозидных фракций из обитающих в филиппинских водах голотурий *H. fuscocinerea*, *H. pulla*, *A. lecanora* и *Opheodesota grisea* было показано, что степень гемолиза эритроцитов, вызываемого этими фракциями, не одинакова. Наименьшим гемолитическим индексом отличалась гликозидная фракция из голотурии *O. grisea* [30].

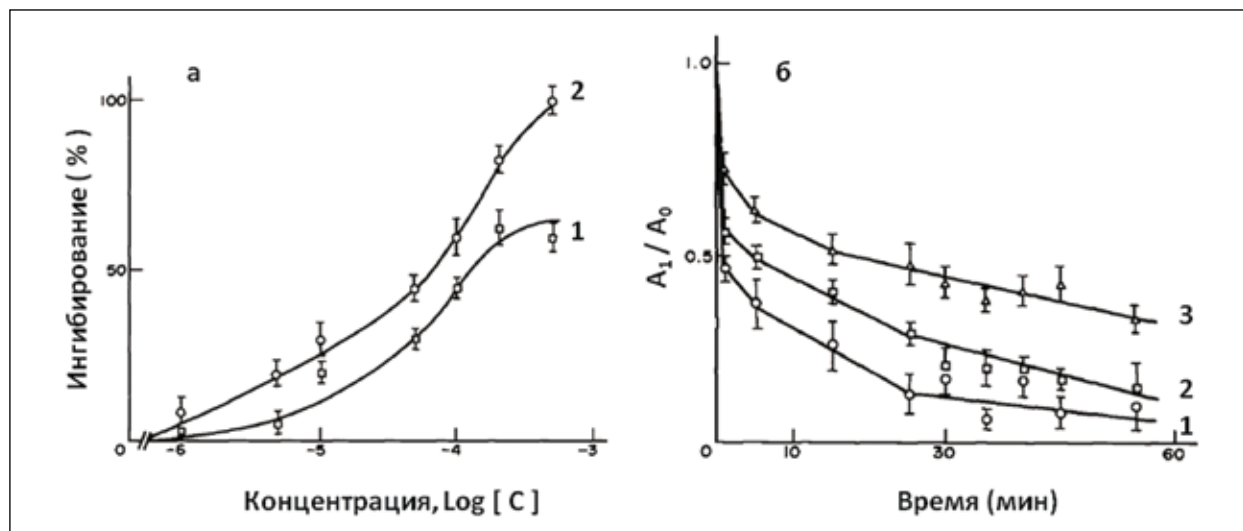
Наличие коллекции индивидуальных тритерпеновых гликозидов и их производных с установленной химической структурой позволило провести детализированное изучение взаимосвязи между структурой и гемолитической активностью этих соединений [31]. Анализ проводили на большой серии гликозидов из

голотурий отряда Dendrochirotida: кукумариозиды  $G_1$ ,  $G_2$  и  $H$  и их производные из голотурии *Eupentacta fraudatrix*, фрондозид  $A$  из *C. frondosa*, кукумариозид  $A_4-2$  и его производные из *C. japonica*. Установлено, что в зависимости от химической структуры, полумаксимальная гемолитическая активность данных соединений ( $EC_{50}$ ) варьировала от  $0,10 \times 10^{-6}$  М до  $1,12 \times 10^{-5}$  М. Обнаружено, что степень гемолиза, вызываемого гликозидами, определяется как химической структурой агликонной части молекулы, так и углеводной цепи, и имеет довольно сложную зависимость. Прежде всего, одним из ключевых требований для проявления активности является наличие 18(20)-лактона в агликоне. В структуре углеводной цепи важными показателями в проявлении высокой гемолитической активности является присутствие линейного тетрасахаридного фрагмента. Например, пентасахаридные производные (пентаозиды) с разветвлением у второго моносахаридного остатка менее активны, чем тетраозиды.

Достаточно сложное влияние на гемолитическую активность гликозидов из голотурий рода Dendrochirotida оказывают сульфатные группы. Так, присутствие сульфатной группы при С-4 первого остатка ксилозы является несущественным в проявлении активности, в то время как десульфатирование при первой ксилозе биозидов существенно снижает степень гемолиза, вызываемого такими гликозидами. Более детальное исследование роли сульфатных групп в проявлении гемолитических свойств было проведено для другой группы гликозидов, выделяемых из голотурий рода Dendrochirotida: псолюсозида  $A$  из *Psolus fabricii* и его десульфатированного производного, кукумариозидов  $A_2-2$ ,  $A_6-2$ ,  $A_3$ ,  $A_7-1$ ,  $A_4-2$ ,  $A_7-3$  и ряда их десульфатированных производных из голотурии *C. japonica* [32]. Благодаря этим исследованиям, в которых анализ кинетики гемолиза сопровождался оценкой выхода  $K^+$  из эритроцитов мыши, было выяснено, что присутствие сульфатной группы в различных моносахаридных остатках может приводить как к увеличению гемолитической активности, так и к ее снижению.

**Цитотоксическая активность тритерпеновых гликозидов.** Цитотоксическая активность гликозидов голотурий против различных типов клеток и клеточных линий, в том числе линий опухолевых клеток человека, изучалась в течение многих лет. Эти исследования показали, что тритерпеновые гликозиды могут

<sup>6</sup>  $EC_{50}$  или полумаксимальная эффективная концентрация (half maximal effective concentration,  $EC_{50}$ ), относится к концентрации лекарственного средства, антителя или токсиканта, которая вызывает ответную реакцию, равную половине максимального возможной.  $EC_{50}$  выражается в мольных единицах (М), где 1 М эквивалентен 1 моль/л.



**Рисунок 8** – Ингибирование активности  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$  микросомальной фракции мозга крыс тритерпеновыми гликозидами голотурий [46]  
 (Зависимость степени ингибирования от концентрации гликозида (а) и времени инкубирования (б).  
 1 – бохадшиозид А; 2 – стихопозид С; 3 – астихопозид С)

подавлять рост патогенных грибов, блокировать дробление яйцеклеток и развитие эмбрионов морского ежа, подавлять пролиферацию в различных типах опухолевых клеток человека *in vitro*, включая такие как: клетки лейкемии P-388, KB, клетки лимфоидной лейкемии L 1210, Schabel, A-549, HT-29, Mel-28, MCF-1, IA9, CAKI-1, U-87-MG, PC-3, SK-MEL, HCT-8, MCF-7, MKN-28, HCT-116, U87MG, HepG2, HeLa, TNP-1, KB-VIN, HCT-8, C33A и ряд других [18, 33–35] (рисунок 7).

Тритерпеновые гликозиды голотурий проявляют неселективную цитотоксическую активность. Практически для всех типов клеток  $\text{EC}_{50}$  большинства гликозидов находится в микромолярном диапазоне концентраций. Кроме того, гликозиды голотурий оказывают антиангиогенный эффект и вызывают блокировку клеточного цикла различных типов клеток. Некоторые гликозиды могут индуцировать апоптоз опухолевых клеток *in vitro*. Установлено, что применение ряда гликозидов голотурий ведет к индукции апоптоза в опухолевых клетках, подавлению миграции, адгезии, формированию цитоскелета опухолевых клеток, супрессии ангиогенеза вокруг опухолей, ингибированию пролиферации и выраженному торможению роста опухолей *in vitro* и *in vivo*, что уже нашло свое отражение в интенсивном изучении ряда гликозидов голотурий в качестве потенциальных противоопухолевых средств [35].

**Нейротоксические свойства тритерпеновых гликозидов.** Практически все научные исследования, связанные с изучением нейротоксических свойств гликозидов голотурий,

были проведены с использованием гликозидной фракции «голотурин» и ее основного компонента – «голотурин А». В работе S.L. Friess с соавт. [36, 37] было показано, что голотурин А необратимо блокирует нервно-мышечную передачу в седлищных нервных волокнах лягушки и нервах, иннервирующих диафрагму крысы и кошки. По эффективности действия эффект голотурина А оказался сопоставим с такими блокаторами, как прокаин, физостегмин и кокаин, но его действие было необратимо при концентрации  $10^{-5}$  М. Этот препарат блокировал эффект подергивания в случае прямого стимулирования мышц и непрямого стимулирования нерва. В более низких концентрациях ( $10^{-7}$  М) это влияние становилось обратимым [36]. Эти же авторы провели сравнительное исследование нейротоксического действия голотурина А и его десульфатированного производного [37–39].

При действии на различные периферические нейромускульные рецепторы оба вещества вызвали необратимую инактивацию возбуждения в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. Причем действующая концентрация голотурина А была на порядок ниже, чем у его десульфатированного производного [39].

Влияние «голотурина» на мембранный потенциал и мембранную проводимость аксона гигантского кальмара было изучено в работах R.C. De Groof и T. Narahashi [40]. Действие этого препарата на внешнюю сторону интактного аксона при концентрации  $2 \times 10^{-4}$  М вызывало необратимую деполяризацию, в то время как мембранный потенциал приближался к нулю. Был предложен вероятный механизм деполяризации мембран, основанный

на вызываемом гликозидом увеличении проницаемости мембран для  $\text{Na}^+$ .

Установлено, что «голотурин» ( $2 \times 10^{-4}$  М) необратимо блокировал ответ в стимулированных клеточных препаратах электрического угря *Electrophorus electricus* [41], а также вызывал необратимую деполяризацию клеточных мембран. Такое действие гликозида на потенциал покоя авторы объяснили влиянием на трансмембранный перенос ионов  $\text{K}^+$ . В свое время С.Д. Ruggieri и R.F. Nigrelli [42] отметили, что голотурин А увеличивает время проводимости через атриовентрикулярный узел и уменьшает скорость спонтанно сокращающихся клеток Пуркинье. В связи с этим авторы предложили применять голотурин А для воздействия на синусный узел в случае аритмии и тахикардии.

Для производного гризеогенина (вероятно, голотурин  $\text{A}_1$ ) из голотурии *Holothuria florida* была показана выраженная дозозависимая гипотермическая активность [43]. Механизм этой активности не изучали, однако существует предположение, что гипотермия может быть связана с мембранотоксическими свойствами гликозидов и их деструктивным влиянием, наблюдаемом на возбуждаемых нервах и тканях [44].

**Взаимодействие тритерпеновых гликозидов с биологическими мембранами.** На начальном этапе исследования молекулярных механизмов цитотоксического действия тритерпеновых гликозидов усилили исследователей были сосредоточены на поиске мембранных мишеней. Ряд авторов связывал высокую цитотоксическую активность тритерпеновых гликозидов голотурий с влиянием гликозидов на различные ферментные комплексы, входящие в состав клеточных мембран.

**Ингибирование  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы.** В серии работ В.А. Gorshkov с соавт. [45–49] было установлено, что ряд тритерпеновых гликозидов голотурий способен ингибировать активность некоторых мембранных ферментов, главным образом АТФаз. Например было показано, что бохадшиозид А, бивиттозиды А и В, голотурины А и  $\text{A}_2$ , кукумариозиды  $\text{A}_2$ -2 и  $\text{G}_1$ , псоллюозиды А и В, стихопозид С, апостихопозид С, теленотозид А и голотоксины  $\text{A}_1$  и  $\text{B}_1$  в концентрациях порядка  $10^{-4}$  М необратимо ингибируют  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазу микросомальной фракции мозга крыс на 40–60% (рисунок 8).

В этих же работах была обнаружена зависимость эффективности ингибирующего действия гликозидов от их химической структуры. Так, стихопозиды D и E, и теленотозид B, у которого отсутствует хиновоза в качестве второго моносахаридного остатка, обладали существенно более низкой активностью, ингибируя активность  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы только на 19–27%, а голотурин  $\text{A}_2$ , содержащий гидроксильную группу в боковой

цепочке агликона, ингибировал активность фермента только на 16%. Кроме того, эти соединения оказывали существенное влияние на липидное окружение фермента, резко меняя микровязкость биомембран. Было высказано предположение, что механизм ингибирования активности фермента связан со способностью гликозидов образовывать комплексы с холестерином в липидном окружении АТФазы, что приводит к изменению конформации соответствующих белков.

Детальное исследование ингибирующей активности некоторых тритерпеновых гликозидов голотурий в отношении активности  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы было описано группой I. Kitagawa [50]. При изучении ингибирующей активности эхинозида А (голотурин  $\text{A}_2$ ) и его производных было установлено, что отсутствие сульфатной группы и уменьшение числа моносахаридных остатков в гликозиде резко снижает его активность. Кроме того, было показано, что большой ряд изученных тритерпеновых гликозидов оказывал существенное влияние на липидное окружение фермента, резко меняя микровязкость биомембран, что также имело выраженное влияние на функционирование АТФазы. Так, было установлено, что в достаточно низких концентрациях – порядка  $10^{-7}$  М – индивидуальный голотурин  $\text{A}_1$  из голотурии *H. grisea* и серия гликозидов из кукумарины *S. japonica* ингибируют активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулула скелетной мышцы кролика без заметного изменения проницаемости мембран. Авторы этого исследования сделали заключение о том, что снижение ферментативной активности связано с взаимодействием гликозидов с белковыми компонентами мембран саркоплазматического ретикулула или с липидами ближайшего окружения  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [51].

**Взаимодействие тритерпеновых гликозидов с холестерином мембран.** Выяснению точных молекулярных механизмов мембранолитического действия тритерпеновых гликозидов посвящено значительное количество исследований, большая часть которых была выполнена сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН. При исследовании цитотоксических свойств тритерпеновых гликозидов голотурий прежде всего было отмечено, что практически все эти соединения проявляют выраженную антимикробную активность в отношении роста культур патогенных дрожжеподобных грибов, оставаясь полностью неэффективными по отношению к культивируемым бактериям [52, 53]. Оказалось, что существует прямая зависимость между количеством стероидов, содержащихся в биомембранах грибов, и эффективностью действия гликозидов. Известно, что клеточные стенки и мембраны бактерий (в отличие от биомембран дрожжеподобных

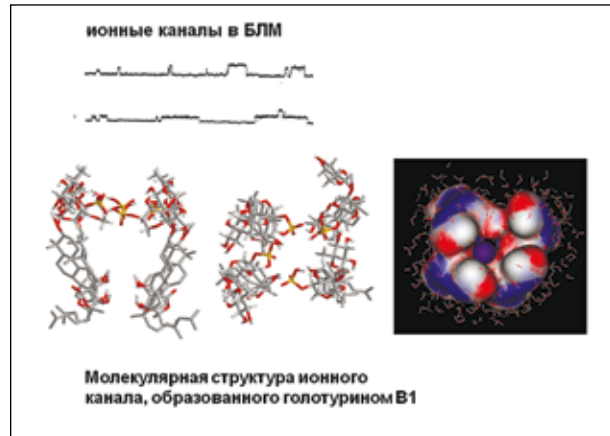


грибов) не содержат стерина. Именно этим фактом ряд авторов объясняет отсутствие антибактериального эффекта тритерпеновых гликозидов [54, 55].

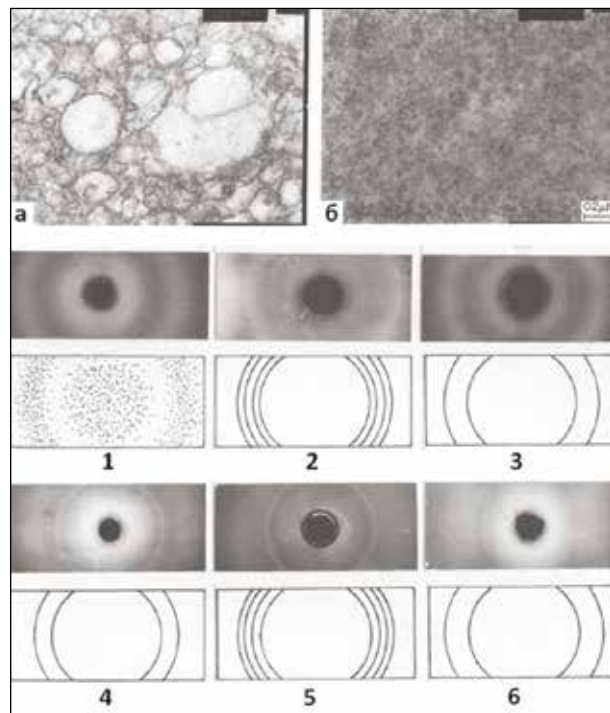
Эти выводы были успешно подкреплены экспериментальными работами по включению экзогенного холестерина в состав липосомальных мембран и «обогащению» стеринного состава мембран опухолевых клеток путем их слияния с такими липосомами. Обнаружено, что увеличение концентрации холестерина клеточных мембран за счет введенного экзогенного холестерина значительно увеличивало цитотоксический эффект тритерпеновых гликозидов [56]. Причем уменьшение мембранотропной активности гликозидов голотурий в отношении различных биологических объектов при добавлении в инкубационную среду экзогенного холестерина является еще одним подтверждением того, что мембранотропное действие этих веществ основано на их способности образовывать комплексы со 5,6-ненасыщенными стеринами мембран.

Использование техники работы с различными биологическими и модельными липидными мембранами позволило сделать однозначное заключение, что механизм действия этих веществ связан с образованием в мембранах ионопроводящих структур. Был оценен вклад различных внешних условий, таких как температура, pH, ионный состав среды, а также вид биологической модели и стеринный состав, в изменение клеточной проницаемости под действием гликозидов.

Было выдвинуто предположение, что «рецепторами» тритерпеновых гликозидов в биологических мембранах являются 5,6-ненасыщенные стерины, главным образом холестерин. Установлено, что способность природных стеринов, входящих в состав мембран животных и растительных клеток, взаимодействовать с тритерпеновыми гликозидами падает в ряду: холестерин >  $\beta$ -ситостерин > стигмастерин > эргостерин [57, 58]. Использование липосом и бислойных липидных мембран (БЛМ) с установленным стеринным составом позволило более детально изучить стерин-зависимые мембранолитические свойства гликозидов. Применение метода микрокалориметрии для регистрации фазовых переходов в липидах при действии гликозида на многослойные липосомы в отсутствие и присутствии холестерина в липосомальных мембранах позволило впервые установить, что один из самых эффективных мембранолитиков – голотурин А, как и другие гликозиды голотурий, способны образовывать комплекс со стеринами, входящими в состав мембран липосом [59] (рисунок 9).



**Рисунок 9 – Флуктуации тока через БЛМ из моноалеина, содержащего 10% холестерина, в присутствии голотурина [60]**  
(Гипотетическая структура голотуринового канала из 4 субъединиц. Показан вид сбоку и сверху)



**Рисунок 10 – Электронно-микроскопическое изображение мембранного препарата мозга крысы до (а) и после обработки раствором астихопозида С в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М в течение 15 мин [47]**  
(Рентгенограммы мембранного препарата мозга крысы, обработанного голотурином А<sub>2</sub> и астихопозидом С. 1 – контрольный препарат; 2 – препарат после обработки голотурином А<sub>2</sub>; 3 – препарат после обработки астихопозидом С; 4 – модельный комплекс голотурин А<sub>2</sub>-холестерин (1:1); 5 – модельный комплекс голотурин А<sub>2</sub>-холестерин (1:3); 6 – модельный комплекс астихопозид С-холестерин (1:5))

Формирование комплекса гликозид-холестерин было также установлено с помощью электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. Исследования мембранных препаратов мозга крыс выявило существенное уменьшение размера и объема везикул и фрагментов после обработки этих препаратов астихопозидом С благодаря формированию комплекса гликозид-холестерин. На рентгенограммах мембранного препарата клеток млекопитающих, обработанного голотурином А<sub>2</sub> и астихопозидом С, появлялись рефлексы, идентичные рефлексам модельного комплекса гликозид-холестерин и характерные для исследуемых гликозидов. Эти эксперименты явились прямым доказательством того, что тритерпеновые гликозиды голотурий взаимодействуют с мембранным холестерином и образуют с ним комплекс в мембранах клеток [47] (рисунок 10).

Было проведено систематическое изучение ион-селективных каналов и неселективных пор, образованных гликозидами различного строения в стеринсодержащих модельных и биологических мембранах. Показано, что в проявлении мембранолитической активности тритерпеновых гликозидов значительную роль играют строение агликона, степень окисленности боковой цепи и наличие различных функциональных групп в их структуре. Немаловажное значение имеют размер и строение углеводной цепи, а также наличие сульфатных, метильных и ацетатной групп в моносахаридных звеньях углеводной цепи. Установлено, что механизм изменения проницаемости клеточных и модельных мембран состоит в образовании ион-селективных каналов при действии низких концентраций гликозидов и неселективных водонаполненных пор при действии высоких концентраций, а свойства ионных каналов и пор, образованных в мембранах гликозидами, находятся в прямой зависимости как от структуры самих гликозидов, так и от структуры стерина [60, 61].

Основные принципы мембранотропного действия тритерпеновых гликозидов были сформулированы следующим образом: в основе мембранотропного и мембранолитического действия тритерпеновых гликозидов голотурий лежит их способность взаимодействовать с 5(6)-ненасыщенными стеринами биомембран или  $\Delta^5$ -стеринами, главным образом, с холестерином, и формировать с ними ион-проводящие комплексы. Формирование таких комплексов приводит к изменению ионной проницаемости и избирательности биомембран, нарушению барьерных свойств и изменению ионного гомеостаза и осмолярности клеток. В конечном

итоге, это приводит к лизису клеток и их гибели [62].

**Устойчивость клеточных мембран в организме-продуценте.** Сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН было проведено исследование резистентности клеток голотурий к мембранолитическому действию собственных тритерпеновых гликозидов. На первых этапах было проведено сравнительное изучение количественного содержания тритерпенового гликозида, голотоксина А<sub>1</sub>, в трепанге *Stichopus* (= *Apostichopus*) *japonicus*. Было обнаружено неравномерное распределение и сезонная зависимость количественного содержания гликозида в различных органах этой голотурии. В преднерестовый период в яйцеклетках со зрелыми яйцеклетками концентрация гликозида почти в 80 раз превышала содержание гликозида в остальных органах. Было установлено, что оплодотворенные яйцеклетки трепанга резистентны к действию мембранолитических концентраций как собственного голотоксина А<sub>1</sub>, так и некоторых других тритерпеновых и стероидных гликозидов животного и растительного происхождения, в то время как эти гликозиды в микромолярных концентрациях блокировали деление яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и вызывали их лизис. Авторы доказали, что причиной устойчивости клеток голотурии к голотоксину А<sub>1</sub> является очень низкое содержание в клетках свободных  $\Delta^5$ -стеринов и наличие вместо них свободных  $\Delta^7$ -стеринов и станолов, сульфатированных  $\Delta^5$ -стеринов и  $\beta$ -ксилозидов  $\Delta^7$ -стеринов. В модельных экспериментах было продемонстрировано, что другой гликозид, кукумариозид G<sub>1</sub> из голотурии *E. fraudatrix*, не нарушал ионную проводимость БЛМ, сформированных из общих липидов этой голотурии, или если в состав БЛМ из яичного фосфатидилхолина входили стеринны из голотурии [62–64]. Недавно было получено новое подтверждение того, что именно изменение в стеринном составе мембран клеток голотурии *S. frondosa* является основной причиной устойчивости клеток организма-продуцента к мембранолитическому действию собственного тритерпенового гликозида фрондозид А [65]. Авторы подтвердили сделанные ранее выводы собственными экспериментами, аналогичными выполненными ранее российскими исследователями, а также показали методами молекулярного моделирования невозможность образования комплекса фрондозид А с мембранными 7,8-ненасыщенными стеринами, являющимися основными стеринами мембран голотурий.

**Иммуномодулирующие свойства тритерпеновых гликозидов.** Недавно было установлено, что тритерпеновые гликозиды голотурий в нетоксических наномолярных концентрациях проявляют иммуномодулирующие свойства, стимулируя, главным образом, клеточное звено иммунитета [66]. Молекулярный механизм им-

муностимуляции заключается в способности тритерпеновых гликозидов (в частности моносульфатированного кукумариозида  $A_2-2$  из кукумарии японской) модулировать ионную проницаемость мембран иммунных клеток и  $Ca^{2+}$ -сигнализацию посредством взаимодействия со специфическими пуриnergическими рецепторами P2X семейства. Вследствие этого воздействия происходит запуск каскада внутриклеточных реакций, приводящих к иммуностимулирующему ответу клеток. Первым звеном в этом каскаде является активация  $Ca^{2+}$ -сигнального метаболического пути, инициирующая впоследствии увеличение экспрессии набора внутриклеточных белков-мишеней, участвующих в ключевых этапах физиологии иммунокомпетентных клеток. Это приводит к усилению адгезии клеток и их пролиферации, формированию в них активных форм кислорода, увеличению лизосомальной активности, фагоцитоза и синтеза некоторых цитокинов. В конечном итоге происходит активирование всего клеточного звена иммунитета [67]. В то же время обнаружено, что иммуномодулирующая активность тритерпеновых зависит от их химической структуры и наличия в них сульфатных групп. Так, моносульфатированный гликозид кукумариозид  $A_2-2$  и кукумарии японской был наиболее активным, в то время как применение трисульфатированного кукумариозида  $A_7-1$  приводило к выраженной иммуносупрессии и подавлению активности макрофагов [68].

### **Заключение**

Тритерпеновые гликозиды голотурий являются сильными мембранолитиками. В то же время животные-продуценты этих веществ являются объектами промысла и используются для пищевых целей, особенно в восточных странах, где голотуриям приписывают целебное общеукрепляющее действие. Современная наука во многом связывает это действие с наличием в блюдах, приготовленных из голотурий, преимущественно из их стенок тела, тритерпеновых гликозидов, содержащихся там в неопасных субтоксических дозах. В этой связи, возникает серьезная опасность в неправильном употреблении голотурий для пищевых целей. Традиционная технология приготовления голотурий включает их длительную варку, зачастую

в нескольких водах, чтобы уменьшить содержание токсических веществ до приемлемого уровня. В случае употребления сушеных продуктов, приготовленных из свежих голотурий, их обычно употребляют в минимальных дозах в виде добавок к пище. Чрезмерное употребление блюд из голотурий, то есть их передозировка, может привести к острым кишечным расстройствам, включая диарею и длительную диспепсию. Интересно, что наиболее традиционное блюдо из голотурии – скобянка – предполагает добавление к мелконарезанной отваренной голотурии в процессе ее жарки кусочков свиного сала или жирной свинины. С учетом данных современной науки, совершенно очевидно, что богатое холестерином свиное сало является своеобразным антидотом к токсическому действию тритерпеновых гликозидов, содержащихся в пище, приготовленной из голотурий.

Здесь уже отмечалась опасность ныряния в полузакрытых мелководных водоемах в местах скопления голотурий из-за возможности поражения гликозидами глаз ныряльщиков. В последнее время стало широко распространено приготовление различных пищевых и лечебных добавок из экстрактов голотурий без должного контроля за содержанием в них гликозидов и определения структур этих гликозидов. В разные сезоны в одних и тех же голотуриях содержание гликозидов может быть очень разным, что может привести к повышенному их содержанию в добавках в случае сбора голотурий в сезон максимальной выработки ими этих токсичных веществ. Помимо возможности получения кишечных расстройств от прямого токсического действия, следует также иметь в виду, что при неправильном применении экстракционных процедур возможно накопление в препаратах гликозидов, обладающих выраженным иммунодепрессантным действием, как это отмечалось, например, для трисульфатированных гликозидов из кукумарии японской. Использование препаратов, содержащих большие количества таких гликозидов, для лечения людей и животных, зараженных какими-либо инфекциями, может привести к ослаблению их иммунитета с соответствующими нежелательными последствиями вплоть до летальных исходов.

### **Информация о конфликте интересов**

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

### **Сведения о рецензировании**

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

## Список источников

1. Smirnov A.V. System of the class Holothuroidea // *Paleontol. J.* 2012. V. 46, № 8. P. 793–832.
2. Miller A.K., Kerr A.M., Paulay G., et al. Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata) // *Mol. Phylogen. Evolut.* 2017. V. 111. P. 110–131.
3. Beirne L., Fitzmier K., Miller M. Holothuroidea // *Biol. Div.* 2001. On-line. March 20, 2017. <http://www.earlham.edu/~beirnl/sea cucumber.htm>
4. Brusca R.C., Brusca G.J. *Invertebrates*. 2 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2003.
5. Kitagawa I., Kobayashi M., Okamoto Y., et al. Structures of sarasinoides A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, and C<sub>1</sub> – new norlanostane triterpenoid oligoglycosides from the Palanan marine sponge *Sateropus sarasinoides* // *Chem. Pharm. Bull.* 1987. V. 35, № 12. P. 5036–5039.
6. Kobayashi M., Hori M., Kan K., et al. Marine natural products. XXVII. Distribution of lanostane – type triterpene oligoglycosides in 10 kinds of okinawan sea cucumbers // *Chem. Pharm. Bull.* 1991. V. 39, № 9. P. 2282–2287.
7. Стоник В.А. Морские полярные стероиды // *Успехи химии*. 2001. Т. 70, № 8. С. 763–807.
8. Kalinin V.I., Ivanchina N.V., Krasokhin V.B., et al. Glycosides from marine sponges (Porifera, Demospongiae): structures, taxonomical distribution, biological activities and biological roles // *Mar. Drugs*. 2012. V. 10. P. 1671–1710.
9. Habermehl G., Volkwein G. Aglycones of the toxins from the cuvierian organs of *Holothuria forskali* and a new nomenclature for the aglycones from Holothuroidea // *Toxicon*. 1971. V. 9, № 4. P. 319–326.
10. Авилов С.А., Калинин В.И., Калиновский А.И., Стоник В.А. Кукумариозид G<sub>2</sub> – минорный тритерпеновый гликозид из голотурии *Eupentacta fraudatrix* // *Химия природ. соед.* 1991. № 3. С. 438–439.
11. Авилов С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А. Два новых тритерпеновых гликозида из голотурии *Duasmodyctyla kurilensis* // *Химия природ. соед.* 1991. № 2. С. 221–226.
12. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., et al. 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. V. 73. P. 2335–2341.
13. Калинин В.И., Левин В.С., Стоник В.А. Химическая морфология: тритерпеновые гликозиды голотурий (Holothuroidea, Echinodermata). Владивосток: Дальнаука, 1994.
14. Карлина А.Е. Безотходная технология пищевых продуктов и биологически активных добавок из кукумарий дальневосточных морей. Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Владивосток, 2009.
15. Matsuno T., Sakushika A., Takashi I. Seasonal variations of saponin and its distribution in the body of sea cucumber *Stichopus japonicus* // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisher.* 1973. V. 39, № 3. P. 307–310.
16. Аминин Д.Л., Анисимов М.М. Содержание голотоксинов в тканях голотурии *Stichopus japonicus* S. в разные сезоны года и их влияние на созревание ооцитов // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 1987. Т. 23, № 4. С. 545–547.
17. Mitu S.A., Bose U., Suwansa-ard S., et al. Evidence for a saponin biosynthesis pathway in the body wall of the commercially significant sea cucumber *Holothuria scabra* // *Marine Drugs*. 2017. V. 15, № 11. P. 349.
18. Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., et al. Triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata), biological activities and functions // *Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products)* / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 2008. V. 35. Chap. 4. P. 135–196.
19. Frey D.G. The use of sea cucumbers in poisoning fishes // *Copeia*. 1951. P. 175–176.
20. Van Dyck S., Gerbaux P., Flammang P. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean // *Marine Drugs*. 2010. V. 8. P. 173–189.
21. Жизнь животных. Т. 2. Беспозвоночные / Под ред. Зенкевича Л.А. М.: Просвещение, 1971. С. 239.
22. Van Dyck S., Caulier G., Todesco M., et al. The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish // *J. Exp. Biol.* 2011. V. 214, № 8. P. 1347–1356.
23. Nigrelli R.F. The effects of holothurin on fish and mice with sarcoma 180 // *Zoologica (New York)*. 1952. V. 37. P. 89–90.
24. Yamanouchi T. On the poisonous substance contained in holothurians // *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 1955. V. 4, № 2–3. P. 183–203.
25. Nigrelli R.F., Jakowska S. Effects of holothurin, a steroid saponin from the Bahamian Sea cucumber (*Actinopyga agassizi*), on various biological systems // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1960. V. 90. P. 884–892.
26. Friess S.L., Standaert F.G., Whitcomb E.R., et al. Some pharmacologic properties of holothurin, an active neurotoxin from the sea cucumber // *Pharmacol. Exp. Therap.* 1959. V. 126. P. 323–329.
27. Поликарпова С.И., Волкова О.Н., Седов А.М. и др. Цитогенетическое изучение мутагенности кукумариозидов // *Генетика*. 1990. Т. 26, № 9. С. 1682–1684.
28. Thron C.D. Hemolysis by holothurin A, digitonin and quiaia saponin: estimates of the required cellular lysin uptakes and free lysin concentrations // *J. Pharm. Exp. Therap.* 1964. V. 145, № 2. P. 194–202.
29. Jakowska S., Nigrelli R.F., Murray P.M., Veltry A.M. Hemopoetic effect of holothurin, steroid saponin from sea cucumber *Actinopyga agassizi* on *Rana pipiens* // *Anat. Rec.* 1958. V. 132. P. 459.
30. Poscidio G.N. The mutagenicity potential of holothurin of some *Philippine holothurians* // *Philipp. J. Sci.* 1983. V. 112. P. 1–12.
31. Kalinin V.I., Volkova O.V., Likhatskaya G.N., et al. Hemolytic activity of triterpene glucosides from the Cucumariidae family holothurians and evolution of this group of toxins // *J. Nat. Toxins*. 1992. V. 1, № 2. P. 17–30.
32. Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N., et al. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order Dendrochirotida: Some trends in the evolution of this group of toxins // *Toxicon*. 1996. V. 34, № 4. P. 475–483.
33. Aminin D.L., Pisyagin E.A., Menchinskaya E.S., et al. Immunomodulatory and anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // *Studies in Natural Product*

Chemistry (Bioactive Natural Products) / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 2014. V. 41. Chap. 3. P. 75–94.

34. Aminin D.L., Menchinskaya E.S., Pisiagin E.A., et al. Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // *Marine Drugs*. 2015. V. 13. P. 1202–1223.

35. Aminin D.L., Menchinskaya E.S., Pisiagin E.A., et al. Sea cucumber triterpene glycosides as anticancer agents // *Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products)* / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 2016. V. 49. Chap. 2. P. 55–105.

36. Friess S.L., Duran R.C., Chanley J.D., Mezzetti T. Some structural requirements underlying holothurin A interactions with synaptic chemoreceptors // *Biochem. Pharmacol.* 1965. V. 14. P. 1237–1247.

37. Friess S.L., Durant R.C., Chanley J.D., Fash F.J. Role of the sulphate charge center in irreversible interactions of holothurin A with chemoreceptors // *Biochem. Pharmacol.* 1967. V. 16. P. 1617–1625.

38. Friess S.L., Durant R.C., Chanley J.D. Further studies on biological actions of steroidal saponins produced by poisonous echinoderms // *Toxicon*. 1968. V. 6. P. 81–84.

39. Friess S.L., Chanley J.D., Hudak W.V., Weems H.B. Interaction of the Echinoderm toxin Holothurin A and its desulfated derivative with the cat superior cervical ganglion preparation // *Toxicon*. 1970. № 8. P. 211–219.

40. De Groof R.C., Narahashi T. The effects of holothurin A on the resting membrane potential and conductance of squid axon // *Europ. J. Pharmacol.* 1976. V. 36. P. 337–346.

41. Dettbarn W.D., Higman H.B., Bartels E., Podleski T. Effects of marine toxins on electrical activity and K<sup>+</sup> efflux of excitable membranes // *Biochem. Biophys. Acta*. 1965. V. 94. P. 472–478.

42. Ruggieri C.D., Nigrelli R.F. Physiologically active substances from Echinoderms // *Bioactive compounds from the sea* / Eds. Humm, H.J., Lane C.H. N.Y.: Dekker Inc., 1974. P. 183–195.

43. Kaul P.N., Daffari P. Marine pharmacology: bioactive molecules from the sea // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1986. V. 26. P. 117–142.

44. Verbist J.E. Pharmacological effects of compounds from echinoderms // *Echinoderm studies*. V. 4 / Eds. Jangoux M., Lawrence J.M. Rotterdam: A.A. Balkema, 1993. P. 111–186.

45. Gorshkov B.A., Gorshkova I.A., Stonik V.A., Elyakov G.B. Effect of marine glycosides on adenosine triphosphatase activity // *Toxicon*. 1982. V. 20, № 3. P. 655–658.

46. Gorshkova I.A., Gorshkov B.A., Stonik V.A. Inhibition of rat brain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by triterpene glycosides from holothurians // *Toxicon*. 1989. V. 27, № 8. P. 927–936.

47. Gorshkova I.A., Kalinovsky A.I., Ilyin S.G., et al. Physicochemical characteristics of interaction of toxic triterpene glycosides from holothurians with rat brain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase // *Toxicon*. 1989. V. 27, № 8. P. 937–945.

48. Gorshkova I.A., Kalinin V.I., Gorshkov B.A., Stonik V.A. Two different modes of inhibition of the rat brain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by triterpene glycosides, psolusosides A and B, from the holothurian *Psolus fabricii* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1999. V. 122, № 1. P. 101–108.

49. Gorshkova I.A., Ilyin S.G., Stonik V.A. Physicochemical characteristics of interaction of saponins from holothurians (sea cucumber) with cell membranes // *Saponin in food, feedstuffs and medicinal plants* / Eds. Oleszek W., Marston A. Springer, Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 2000. P. 219–225. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9339-7>.

50. Kitagawa I., Kobayashi M., Inamoto T., et al. Marine natural products. XIV. Structures of echinosides A and B, antifungal lanostane-oligosides from the sea cucumber *Actinopyga echinites* (Jaeger) // *Chem. Pharm. Bull.* 1985. V. 33, № 12. P. 5214–5224.

51. Рубцов Б.В., Ружницкий А.О., Клебанов Г.И., и др. Влияние некоторых тритерпеновых гликозидов морских беспозвоночных на проницаемость биологических и искусственных мембран // *Изв. АН СССР. Сер. Биол.* 1980. № 3. С. 436–445.

52. Kuznetsova T.A., Anisimov M.M., Popov A.M., et al. Comparative study in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of Echinoderm type // *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. V. 73. P. 41–43.

53. Мальцев И.И., Стехова С.И., Шенцова Е.Б. и др. Противомикробная активность гликозидов из голотурий семейства Stichopodidae // *Хим.-фарм. журн.* 1985. № 1. С. 54–56.

54. Olsen R.A. Triterpene glycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. Role of the sterol contents of some fungi // *Physiol. Plant.* 1973. V. 28. P. 507–515.

55. Olsen R.A. Triterpene glycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. The effect of aescin on fungi with reduced sterol contents // *Physiol. Plant.* 1973. V. 29. P. 145–149.

56. Попов А.М., Лоенко Ю.Н., Анисимов М.М. Изменение чувствительности опухолевых клеток к действию тритерпеновых гликозидов липосомами // *Антибиотики*. 1981. Т. 26, № 3. С. 127–129.

57. Попов А.М., Калиновская Н.И., Кузнецова Т.А. и др. Роль стероидов в мембранотропной активности тритерпеновых гликозидов // *Антибиотики*. 1983. № 9. С. 656–659.

58. Попов А.М. Изучение мембранотропной активности некоторых тритерпеновых гликозидов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1984.

59. Лихацкая Г.Н., Яровая Т.П., Руднев В.С. и др. Образование комплекса тритерпенового гликозида голотурина А с холестерином в липосомальных мембранах // *Биофизика*. 1985. Т. 30, № 2. С. 358–359.

60. Лихацкая Г.Н. Тритерпеновые и стероидные гликозиды и мембраны. Молекулярные механизмы взаимодействия гликозидов с мембранами. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publ. GmbH & Co. KG, 2011.

61. Лихацкая Г.Н. Механизмы взаимодействия тритерпеновых и стероидных гликозидов с липидными мембранами. Автореф. дис. канд. физ.-мат. наук. Владивосток, 2006.

62. Анисимов М.М. Тритерпеновые гликозиды и структурно-функциональные свойства мембран // *Биол. науки*. 1987. № 10. С. 49–63.

63. Анисимов М.М., Аминин Д.Л., Ровин Ю.Г. и др. Об устойчивости клеток голотурии *Stichopus japonicus*

к действию эндотоксина – стихопозида А // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270, № 4. С. 991–993.

64. Аминин Д.Л., Анисимов М.М., Мокрецова Н.Д. и др. Влияние тритерпеновых и стероидных гликозидов на овоциты, яйца и эмбрионы голотурии *Stichopus japonicus* и морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Биол. моря. 1986. № 3. С. 49–52.

65. Claereboudt E.J.S., Eeckhaut I., Lins L., Deleu M. How different sterols contribute to saponin tolerant plasma membranes in sea cucumbers // Scientific Reports. 2018. V. 8. 10845. P. 1–11.

66. Aminin D.L. Immunomodulatory properties of sea cucumber triterpene glycosides // Marine and Freshwater Toxins. Toxinology / Eds. Gopalakrishnakone P., Haddad Jr. V., Tubaro A., et al. Springer: Amsterdam, Netherlands, 2016. Chap. 19. P.381–401.

67. Aminin D., Pisyagin E., Astashev M., et al.

Glycosides from edible sea cucumbers stimulate macrophages via purinergic receptors // Sci. Rep. 2016. V. 6. 39683. P. 1–11.

68. Aminin D.L., Agafonova I.G., Berdyshev E.V., et al. Immunomodulatory properties of cucumariosides from the edible Far-Eastern holothurian *Cucumaria japonica* // J. Med. Food. 2001. V. 4, № 3. P. 127–135.

69. Aminin D.L., Agafonova I.G., Kalinin V.I. et al. Immunomodulatory properties of frondoside A, a major triterpene glycoside from the North Atlantic commercially harvested sea cucumber *Cucumaria frondosa* // J. Med. Food. 2008. V. 11, № 3. P. 443–453.

70. Pisyagin E.A., Gladkikh R.V., Kapustina I.I. et al. Interaction of holothurian triterpene glycoside with biomembranes of mouse immune cells // Int. Immunopharmacol. 2012. V. 14. P. 1–8.

#### Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН, Проспект 100-летия Владивостока, д. 159, г. Владивосток, 690022, Российская Федерация

Аминин Дмитрий Львович. Заведующий лабораторией, старший научный сотрудник, д-р биол. наук.

Калинин Владимир Иванович. Ведущий научный сотрудник Тихоокеанского института биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН, д-р биол. наук.

Контактная информация для всех авторов: [daminin@piboc.dvo.ru](mailto:daminin@piboc.dvo.ru)

Контактное лицо: Аминин Дмитрий Львович; [daminin@piboc.dvo.ru](mailto:daminin@piboc.dvo.ru)

## Toxic properties of holothurian's triterpene glycosides

D.L. Aminin, V.I. Kalinin

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Prospect 100-let Vladivostok, 159, Vladivostok 690022, Russian Federation

Holothurians (or sea cucumbers) are echinoderms and are found in all areas of the world oceans. These animals produce special low-molecular metabolites - triterpene glycosides, which are a means of chemical protection of holothurians from predators. The content of triterpene glycosides in the tissues of holothurians can reach a significant amount of up to 1 g/kg, and especially many of these compounds are localized in the Cuvierian tubules - special protection organ presents in a number of tropical holothurians. Triterpene glycosides of holothurians are quite toxic, they exhibit hemolytic, cytotoxic and neurotoxic activity at a concentration range of  $1 \times 10^4$ – $1 \times 10^6$  M. The toxic properties of glycosides are based on the ability of these compounds to interact with  $\Delta 5$ -sterols (mainly cholesterol) of plasma membranes and form ion-conducting complexes. In turn, this leads to a change in the ion permeability and selectivity of biomembranes, disruption of barrier properties, ion homeostasis and osmolarity of cells, and further to cell lysis and death.

Contact with holothurians when diving in shallow water, which is fraught with damage to the eyes and mucous membranes by triterpene glycosides, may be of some danger to humans. Excessive consumption of commercial edible holothurians in food, especially without prior heat treatment, as is customary in some South-East Asia countries, can lead to diarrhea and dyspepsia. Triterpene glycosides in the bloodstream can lead to blood lysis and serious consequences up to death.

The holothurians are animals commercially harvested in Russia. They are used in food and for the preparation of medicinal supplements and preparations. Excessive consumption of commercial edible holothurians for food, especially without long-term boiling, as is customary in Southeast Asia, can lead

to diarrhea and dyspepsia. Triterpene glycosides in the bloodstream can lead to blood lysis and serious consequences up to death. The use of dietary supplements with an uncontrolled glycoside content is fraught with similar consequences, and the presence of immunosuppressants among glycosides that have fallen into such additives and drugs can worsen the condition of patients or sick animals. Control of the qualitative and quantitative content of glycosides in food and medicinal products from holothurians should be an integral part of measures to improve the biological safety of citizens of the Russian Federation.

**Keywords:** hemolytic activity; holothurians; immunomodulatory properties; membranotropic properties; neurotoxic properties; cytotoxic activity.

**For citation:** Aminin D.L., Kalinin V.I. Toxic Properties of Holothurian's Triterpene Glycosides // Journal of NBC Protection Corps. 2019. V. 3. № 1. P. 23–39.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

#### References

- Smirnov A.V. System of the class Holothuroidea // Paleontological Journal. 2012. V. 46, No. 8. P. 793–832.
- Miller A.K., Kerr A.M., Paulay G. et al. Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata) // Molecular Phylogenetics Evolution. 2017. V. 111. P. 110–131.
- Beirne L., Fitzmier K., Miller M. Holothuroidea // Biological Diversity. 2001. On-line. March 20, 2017. <http://www.earlham.edu/~beirnl/seaucucumber.htm>
- Brusca R.C., Brusca G.J. Invertebrates (second edition). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2003. 936 p.
- Kitagawa I., Kobayashi M., Okamoto Y. et al. Structures of sarasinoids A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, and C<sub>1</sub> – new norlanostane triterpenoid oligoglycosides from the Palanan marine sponge *Sateropus sarasinosum* // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35, No. 12. P. 5036–5039.
- Kobayashi M., Hori M., Kan K. et al. Marine natural products. XXVII. Distribution of lanostane – type triterpene oligoglycosides in 10 kinds of okinawan sea cucumbers // Chem. Pharm. Bull. 1991. V. 39, No. 9. P. 2282–2287.
- Stonik V.A. Marine polar steroids // The Success of Chemistry 2001. V. 70, No. 8. P. 763–807 (in Russian).
- Kalinin V.I., Ivanchina N.V., Krasokhin V.B. et al. Glycosides from marine sponges (Porifera, Demospongiae): structures, taxonomical distribution, biological activities and biological roles // Mar. Drugs. 2012. V. 10. P. 1671–1710.
- Habermehl G., Volkwein G. Aglycones of the toxins from the cuvierian organs of *Holothuria forskali* and a new nomenclature for the aglycones from Holothuroidea // Toxicon. 1971. V. 9, No. 4. P. 319–326.
- Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinivsky A.I., Stonik V.A. Cucumarioside G<sub>2</sub> – minor triterpene glycoside from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* // Chemistry of Natural Compounds 1991. No. 3. P. 438–439 (in Russian).
- Avilov S.A., Kalinovsky A.I., Stonik V.A. Two new triterpene glycosides from sea cucumber *Duasmmodactyla kurilensis* // Chemistry of Natural Compounds. 1991. No. 2. P. 221–226 (in Russian).
- Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A. et al. 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. V. 73. P. 2335–2341.
- Kalinin V.I., Levin V.S., Stonik V.A. Chemical morphology: triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata). Vladivostok: Dalnauka, 1994. 284 p. (in Russian).
- Karlina A.E. Wast free technology of food and food supplements from cucumarias of the Far Eastern seas. Summary of the dissertation for obtaining of the research degree of candidate of technical sciences. Vladivostok, 2009. 24 p. (in Russian).
- Matsuno T., Sakushika A., Takashi I. Seasonal variations of saponin and its distribution in the body of sea-cucumber *Stichopus japonicus* // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisher. 1973. V. 39, № 3. P. 307–310.
- Aminin D.L., Anisimov M.M. Contents of holotoxins in tissues of the sea cucumber *Stichopus japonicus* S. in different year season and their influence on oocytes maturation // Journal of Evol. Biochem. Physiol. 1987. V. 23, No. 4. P. 545–547. (in Russian).
- Mitu S.A., Bose U., Suwansa-ard S. et al. Evidence for a saponin biosynthesis pathway in the body wall of the commercially significant sea cucumber *Holothuria scabra* // Mar. Drugs. 2017. V. 15. 349. P. 1–13.
- Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., et al. Triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata), biological activities and functions // Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products) / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 2008. V. 35. Chap. 4. P. 135–196.
- Frey D.G. The use of sea cucumbers in poisoning

fishes // Copeia. 1951. P. 175–176.

20. Van Dyck S., Gerbaux P., Flammang P. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 173–189.

21. Zenkevich L.A. (ed.) Animal life. V. 2. Invertebrates. Moscow: Education, 1971. P. 239. (in Russian).

22. Van Dyck S., Caulier G., Todesco M. et al. The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: Usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish // J. Exp. Biol. 2011. V. 214, No. 8. P. 1347–1356.

23. Nigrelli R.F. The effects of holothurin on fish and mice with sarcoma 180 // Zoologica (New York). 1952. V. 37. P. 89–90.

24. Yamanouchi T. On the poisonous substance contained in holothurians // Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 1955. V. 4, No. 2–3. P. 183–203.

25. Nigrelli R.F., Jakowska S. Effects of holothurin, a steroid saponin from the *Bahamian sea cucumber (Actinopyga agassizi)*, on various biological systems // Ann. N.Y. Acad. Sci. V. 90. P. 884–892.

26. Friess S.L., Standaert F.G., Whitcomb E.R. et al. Some pharmacologic properties of holothurin, an active neurotoxin from the sea cucumber // Pharmacol. Exp. Therap. 1959. V. 126. P. 323–329.

27. Polikarpova S.I., Volkova O.N., Sedov A.M. et al. Cytogenetic investigation of mutagenicity of cucumarioside // Genetika. 1990. V. 26, No. 9. P. 1682–1684 (in Russian).

28. Thron C.D. Hemolysis by holothurin A, digitonin and quiaia saponin: estimates of the required cellular lysin uptakes and free lysin concentrations // J. Pharm. Exp. Therap. 1964. V. 145, No. 2. P. 194–202.

29. Jakowska S., Nigrelli R.F., Murray P.M., Veltry A.M. Hemopoetic effect of holothurin, steroid saponin from sea cucumber *Actinopyga agassizi* on *Rana pipiens* // Anat. Rec. 1958. V. 132. P. 459.

30. Poscidio G.N. The mutagenicity potential of holothurin of some Philippine holothurians // Philipp. J. Sci. 1983. V. 112. P. 1–12.

31. Kalinin V.I., Volkova O.V., Likhatskaya G.N. et al. Hemolytic activity of triterpene glucosides from the Cucumariidae family holothurians and evolution of this group of toxins // J. Nat. Toxins. 1992. V. 1, No. 2. P. 17–30.

32. Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N. et al. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order Dendrochirotida: Some trends in the evolution of this group of toxins // Toxicol. 1996. V. 34. No. 4. P. 475–483.

33. Aminin D.L., Pisyagin E.A., Menchinskaya E.S. et al. Immunomodulatory and anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products) / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 2014. V. 41. Chap. 3. P. 75–94.

34. Aminin D.L., Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A. et al. Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // Marine Drugs. 2015. V. 13. P. 1202–1223.

35. Aminin D.L., Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A. et al. Sea cucumber triterpene glycosides as anticancer agents // Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural

Products) / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 2016. V. 49. Chap. 2. P. 55–105.

36. Friess S.L., Duran R.C., Chanley J.D., Mezzetti T. Some structural requirements underlying holothurin A interactions with synaptic chemoreceptors // Biochem. Pharmacol. 1965. V. 14. P. 1237–1247.

37. Friess S.L., Durant R.C., Chanley J.D., Fash F.J., Role of the sulphate charge center in irreversible interactions of holothurin A with chemoreceptors // Biochem. Pharmacol. 1967. V. 16. P. 1617–1625.

38. Friess S.L., Durant R.C., Chanley J.D. Further studies on biological actions of steroidal saponins produced by poisonous echinoderms // Toxicol. 1968. V. 6. P. 81–84.

39. Friess S.L., Chanley J.D., Hudak W.V., Weems H.B. Interaction of the Echinoderm toxin Holothurin A and its desulfated derivative with the cat superior cervical ganglion preparation // Toxicol. 1970. No. 8. P. 211–219.

40. De Groof R.C., Narahashi T. The effects of holothurin A on the resting membrane potential and conductance of squid axon // Europ. J. Pharmacol. 1976. V. 36. P. 337–346.

41. Dettbarn W.D., Higman H.B., Bartels E., Podleski T. Effects of marine toxins on electrical activity and  $K^+$  efflux of excitable membranes // Biochem. Biophys. Acta. 1965. V. 94. P. 472–478.

42. Ruggieri C.D., Nigrelli R.F. Physiologically active substances from Echinoderms // Bioactive compounds from the sea / Eds. Humm, H.J., Lane C.H. N.-Y.: Dekker Inc., 1974. P. 183–195.

43. Kaul P.N., Daffari P. Marine pharmacology: bioactive molecules from the sea // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1986. V. 26. P. 117–142.

44. Verbist J.E. Pharmacological effects of compounds from echinoderms // Echinoderm studies. V. 4 / Eds. Jangoux M., Lawrence J.M. Rotterdam: A.A. Balkema, 1993. P. 111–186.

45. Gorshkov B.A., Gorshkova I.A., Stonik V.A., Elyakov G.B. Effect of marine glycosides on adenosine triphosphatase activity // Toxicol. 1982. V. 20, No. 3. P. 655–658.

46. Gorshkova I.A., Gorshkov B.A., Stonik V.A. Inhibition of rat brain  $Na^+K^+$ -ATPase by triterpene glycosides from holothurians // Toxicol. 1989. V. 27, No. 8. P. 927–936.

47. Gorshkova I.A., Kalinovskiy A.I., Ilyin S.G. et al. Physicochemical characteristics of interaction of toxic triterpene glycosides from holothurians with rat brain  $Na^+K^+$ -ATPase // Toxicol. 1989. V. 27, No. 8. P. 937–945.

48. Gorshkova I.A., Kalinin V.I., Gorshkov B.A., Stonik V.A. Two different modes of inhibition of the rat brain  $Na^+K^+$ -ATPase by triterpene glycosides, psolusosides A and B, from the holothurian *Psolus fabricii* // Comp. Biochem. Physiol. 1999. V. 122, No. 1. P. 101–108.

49. Gorshkova I.A., Ilyin S.G., Stonik V.A. Physicochemical characteristics of interaction of saponins from holothurians (sea cucumber) with cell membranes // Saponin in food, feedstuffs and medicinal plants / Eds. Oleszek W., Marston A. Kluwer Academic Publ., 2000. P. 219–225.

50. Kitagawa I., Kobayashi M., Inamoto T. et al. Marine natural products. XIV. Structures of echinosides A and B,



antifungal lanostane-oligosides from the sea cucumber *Actinopyga echinites* (Jaeger) // Chem. Pharm. Bull. 1985. V. 33, No. 12. P. 5214–5224.

51. Rubtsov V.B., Ruzhnitsky A.O., Klebanov G.I. et al. Influence of some triterpene glycosides of marine invertebrates on permeability of biological and artificial membranes // Izv. AN SSSR. Ser. Biol. 1980. No. 3. P. 436–445.

52. Kuznetsova T.A., Anisimov M.M., Popov A.M. et al. Comparative study in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of Echinoderm type // Comp. Biochem. Physiol. 1982. V. 73. P. 41–43.

53. Maltsev I.I., Stekhova S.I., Shchentsova E.B., Anisimov M.M., Stonik V.A. Antimicrobial activity of glycosides from sea cucumbers of the family Stichopodidae // Khim. Pharm. Zhurn. 1985. No. 1. P. 54–56 (in Russian).

54. Olsen R.A. Triterpene glycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. Role of the sterol contents of some fungi // Physiol. Plant. 1973. V. 28. P. 507–515.

55. Olsen R.A. Triterpene glycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. The effect of aescin on fungi with reduced sterol contents // Physiol. Plant. 1973. V. 29. P. 145–149.

56. Popov A.M., Loenko Yu.N., Anisimov M.M. The change of sensibility of tumor cells against the action of triterpene glycosides by liposomes // Antibiotiki. 1981. V. 26, No. 3. P. 127–129 (in Russian).

57. Popov A.M., Kaliniovskaya N.I., Kuznetsova T.A. et al. Role of sterols in membranotropic activity of triterpene glycosides // Antibiotiki. 1983. No. 9. P. 656–659 (in Russian).

58. Popov A.M. The studies of membranotropic activities of some triterpene glycosides: sCand. Diss. Biol. Sci., Summary. Vladivostok, 1984. 24 p. (in Russian).

59. Likhatska G.N., Jarovaya T.P., Rudnev V.S. et al. Formation of the complex of triterpene glycoside holothurine A with cholesterol in liposomal membranes // Biofizika. 1985. V. 30, No. 2. P. 358–359 (in Russian).

60. Likhatska G.N. Triterpene and steroid glycosides and membranes. Molecular mechanisms of interaction of glycosides with membranes. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publ. KG, 2011. 115 p.

61. Likhatska G.N. Mechanisms of interaction of triterpene and steroid glycosides with lipid membranes. Cand. Diss. Phys.-Math. Sci., Summary. Vladivostok, 2006. 23 p. (in Russian).

62. Anisimov M.M. Triterpene glycosides and structural-functional properties of membranes // Biol. Nauki. 1987. No. 10. P. 49–63.

63. Anisimov M.M., Aminin D.L., Rovin Yu.G. et al. On resistibility of cells of the sea cucumber *Stichopus japonicus* against action of endotoxin – stichoposide A // Dokl. AN SSSR. 1983. V. 270, No. 4. P. 991–993 (in Russian).

64. Aminin D.L., Anisimov M.M., Mokretsova N.D. et al. Influence of triterpene and steroid glycosides on oocytes, eggs and embryos of the sea cucumber *Stichopus japonicus* and sea urchin *Strongylocentrotus nudus* // Biol. Morya. 1986. No. 3. P. 49–52 (in Russian).

65. Claereboudt E.J.S., Eeckhaut I., Lins L., Deleu M. How different sterols contribute to saponin tolerant plasma membranes in sea cucumbers // Scientific Reports. 2018. V. 8. 10845. P. 1–11.

66. Aminin D.L. Immunomodulatory properties of sea cucumber triterpene glycosides // Marine and Freshwater Toxins. Toxinology / Eds. Gopalakrishnakone P., Haddad Jr. V., Tubaro A. et al. Springer: Amsterdam, Netherlands, 2016. Chap. 19. P. 381–401.

67. Aminin D., Pisyagin E., Astashev M. et al. Glycosides from edible sea cucumbers stimulate macrophages via purinergic receptors // Sci. Rep. 2016. V. 6. 39683. P. 1–11.

68. Aminin D.L., Agafonova I.G., Berdyshev E.V. et al. Immunomodulatory properties of cucumariosides from the edible Far-Eastern holothurian *Cucumaria japonica* // J. Med. Food. 2001. V. 4, No. 3. P. 127–135.

69. Aminin D.L., Agafonova I.G., Kalinin V.I. et al. Immunomodulatory properties of frondoside A, a major triterpene glycoside from the North Atlantic commercially harvested sea cucumber *Cucumaria frondosa* // J. Med. Food. 2008. V. 11, No. 3. P. 443–453.

70. Pisyagin E.A., Gladkikh R.V., Kapustina I.I. et al. Interaction of holothurian triterpene glycoside with biomembranes of mouse immune cells // Int. Immunopharmacol. 2012. V. 14. P. 1–8.

### Authors

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Prospect 100-let Vladivostok, 159, Vladivostok 690022, Russian Federation

*Dmitry Lvovich Aminin*. Head of the laboratory, Senior Researcher, Doctor of Biological Sciences.

*Vladimir Ivanovich Kalinin*. Leading Researcher, Doctor of Biological Sciences.

**Contact information for all authors:** [daminin@piboc.dvo.ru](mailto:daminin@piboc.dvo.ru)

**Contact person:** Aminin Dmitry Lvovich; [daminin@piboc.dvo.ru](mailto:daminin@piboc.dvo.ru)