

УДК 577.182.99

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ХИНОЛИНОНОВЫЙ АЛКАЛОИД ИЗ МОРСКОГО ГРИБА *Penicillium polonicum* КММ 4719

© 2025 г. С. С. Старновская^{1,*}, Н. Н. Киричук¹, В. Е. Чаусова¹, Ю. В. Худякова¹,
Е. А. Чингизова¹, А. Р. Чингизов¹, А. Н. Юрченко¹, Е. А. Юрченко¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: starnovskaya_ss@piboc.dvo.ru

Поступила в редакцию 08.07.2024 г.

После доработки 21.08.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Штамм морского гриба КММ 4719 был выделен из трепанга *Apostichopus japonicus* и идентифицирован как *Penicillium polonicum* на основе трех молекулярно-генетических маркеров: ITS, *BenA* и *CaM*. Из этилацетатного экстракта культуры этого штамма был выделен 3-О-метилвиридикатин. Для 3-О-метилвиридикатина впервые показано кардиопротекторное действие, а также ингибирующая активность в отношении уреазы (ИК₅₀ 97.3 мкМ). Кроме того, 3-О-метилвиридикатин в концентрации 100 мкМ (25.1 мкг/мл) на 23.2% ингибировал рост дрожжеподобных грибов *Candida albicans*.

Ключевые слова: морские грибы, *Penicillium polonicum*, ITS, β-тубулин, кальмодулин, вторичные метаболиты, биологическая активность

DOI: 10.31857/S0555109925010065 **EDN:** CZQSYF

Вторичные метаболиты морских микроскопических грибов, ассоциированных с голотуриями, в настоящее время изучены слабо. Так, Чен с соавт. [1] показали, что к настоящему времени из различных голотурий были выделены микроскопические грибы 29 родов, относящихся к 24 семействам, большинство из которых принадлежат к семейству Ascomycota, доминирующими родами являются *Aspergillus* и *Penicillium*. Всего из этих грибов было выделено 122 низкомолекулярных соединения. Исследования грибов, связанных с голотуриями, сосредоточены в Юго-Восточной Азии и на Дальнем Востоке России [2]. Так, более 30 дитерпеновых гликозидов группы виресценозидов было выделено из культуры гриба *Paragliomastix luzulae* (ранее определенного как *Acremonium striatisporum*) КММ 4401, ассоциированного с голотурией *Eupentacta fraudatrix*, собранной в Японском море [3]. В настоящей работе из гонад голотурии *Apostichopus japonicus* (дальневосточного трепанга) был выделен гриб, идентифицированный как *Penicillium polonicum* КММ 4719 на основе молекулярно-генетического анализа. Грибы этого вида являются известными эндофитами, встречающимися повсеместно

и вызывающими поражение сельскохозяйственных растений [4]. Из наземных изолятов *P. polonicum* выделялись пеницилловая кислота, анацин, асптерровая кислота, циклопенины и нефротоксичные гликопептиды [5], нейротоксин веррукозидин [6], β-лактоны и нафтохиноны [7], индолные алкалоиды [8–9] с цитотоксической, антипролиферативной и антифунгальной активностью. Различные изоляты *P. polonicum* также были выделены из морских местообитаний, в том числе морских донных осадков [10], водорослей *Chaetomorpha antennina* [11], образца губки *Phorbasp.* [12] и даже акульих жабр [12]. Тем не менее, это первое выделение гриба *P. polonicum* из дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*.

Цель настоящей работы – выделение и установление структуры вторичных метаболитов гриба *P. polonicum* КММ 4719 и исследование их биологической активности.

МЕТОДИКА

Штамм гриба. Штамм гриба *P. polonicum* КММ 4719 был выделен из гонад дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*, собранного в бухте

Троица (залив Петра Великого, Японское море, Россия). Для получения грибных изолятов образец голотурии промывали три раза в стерильной морской воде, после чего стерильными инструментами препарировали гонады. Кусочки гонад помещали на поверхность агаризованной среды Чапека в стерильные чашки Петри [13]. Чашки инкубировали при комнатной температуре. Колонии грибов по мере появления выделяли в чистую культуру на скошенную агаризованную среду Чапека, где в дальнейшем и поддерживали. Для подавления бактериального роста при выделении грибов из образца голотурии в среду добавляли антибиотики пенициллин (500 тыс. ед./л) и стрептомицин (0.5 г/л).

Штамм хранится в Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (Россия) под номером КММ 4719.

Выделение геномной ДНК и амплификация. Геномную ДНК выделяли из мицелия, выращенного на среде MEA (агар с солодовым экстрактом) [13] при 25°C в течение 7 сут. Для выделения использовали набор MagJET Plant Genomic DNA Kit ("Thermo Fisher Scientific", США) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию проводили с использованием фермента GoTaq™ Flexi DNA Polymerase ("Promega", США). Для амплификации *ITS* региона использовали праймеры 1400-F (5'-CTGCCSTTTGTACACACCGCCCGTC-3') [14] и D2CR (5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA-3') [15], комплементарные участкам 18S рДНК и 28S рДНК соответственно. Температурно-временной режим ПЦР включал предварительную денатурацию при 95°C в течение 300 с, за которой следовали 35 циклов: 94°C — 20 с; 55°C (отжиг праймеров) — 20 с и 72°C — 90 с. Завершающая элонгация проводилась при 72°C в течение 300 с. Для амплификации частичной последовательности *BenA* гена использовали стандартные праймеры Vt-2a и Vt-2b [16] и параметры ПЦР, описанные выше, с отжигом праймеров при 60°C. Для амплификации частичной последовательности *CaM* гена, использовали вырожденные праймеры cal_P/A_F (5'-TCYGAGTACAAGGAGGCSTT-3') и cal_P/A_R (5'-CCRATGGAGGTCATRACGTG-3') [17] и параметры ПЦР, описанные с отжигом праймеров при 65°C. Ампликоны *ITS*, *BenA* и *CaM* очищали набором ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent ("Thermo Fisher Scientific", США) в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование ампликонов проводили в обоих направлениях с использованием вышеуказанных праймеров на генетическом анализаторе SeqStudio™ Genetic Analyzer ("Thermo Fisher Scientific", США) с использованием набора реагентов BigDye™ Terminator ver. 3.1 ("Thermo Fisher Scientific", США). Последовательности генов были депонированы в базу данных NCBI GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) под регистрационными

номерами: OQ344775 для *ITS*, OQ466620 для *BenA* и PP616716 для *CaM* (табл. 1).

Филогенетический анализ. Поиск последовательностей *ITS*, *BenA* и *CaM* типовых (ex-type) штаммов проводили в базе данных GenBank с помощью алгоритма BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Множественное выравнивание последовательностей *ITS* (*ITS1*, 5.8S рДНК, *ITS2*) *BenA* и *CaM* и их филогенетический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения MEGA X (версия 11.0.9) [18]. Филогенетическое дерево строили на основе выравненных объединенных последовательностей с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) и подобранной оптимальной эволюционной модели Kimura 2-parameter + G + I [19]. Для статистической поддержки использовали бутстреп-тест (1000 реплик). В качестве внешней группы для филогенетического анализа использовали последовательности штамма *Talaromyces marneffei* CBS 388.87^T (табл. 1).

Культивирование гриба. Гриб культивировали на агаризованной среде Чапека [13] в колбах Ру объемом 1000 мл (250 мл среды × 5 колб) в течение 3 недель при комнатной температуре. В качестве посевного материала использовали суспензию грибных пропагул в концентрации 8×10^4 КОЕ/мл. Для приготовления суспензии использовали стерильную морскую воду. В каждую колбу вносили по 2 мл суспензии стерильной пипеткой и равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды.

Экстракция и выделение. По окончании инкубационного периода мицелий гриба *P. polonicum* КММ 4719 вместе со средой гомогенизировали и экстрагировали EtOAc (5 л). Полученный экстракт упаривали досуха. Сухой остаток (2.2 г) растворяли в 200 мл смеси H₂O—EtOH (4 : 1) и последовательно экстрагировали н-гексаном (3 × 0.2 л) и затем EtOAc (3 × 0.2 л). Этилацетатный экстракт упаривали досуха (1002.9 мг) и разделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (3 × 14 см), элюируя сначала н-гексаном (200 мл), а затем ступенчатым градиентом от 5 до 50% EtOAc в н-гексане. Полученная при этом фракция А, элюированная системой н-гексан—EtOAc (90 : 10, 19.3 мг), была рехроматографирована на колонке с силикагелем (1.5 × 10 см) в системе гексан—EtOAc (90 : 10). В результате было выделено индивидуальное соединение **1**.

Условия эксперимента. Спектры ЯМР записывали в CDCl₃ на приборе Bruker Avance III-700 ("Bruker BioSpin GmbH", Германия). Калибровку спектров ЯМР проводили по остаточным сигналам растворителя. Спектры HRESIMS регистрировали на масс-спектрометре MaXis impact II ("Bruker Daltonics" GmbH, Германия).

Таблица 1. Штаммы рода *Penicillium*, использованные в филогенетическом анализе, и регистрационные номера их генов

| Вид | Номер штамма | Регистрационный номер в GenBank | | |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | ITS | <i>BenA</i> | <i>CaM</i> |
| <i>P. aurantiogriseum</i> | CBS 324.89 ^T | AF033476 | MN969372 | KU896822 |
| <i>P. cyclopium</i> | CBS 144.45 ^T | JN097811 | MN969380 | KU896832 |
| <i>P. freii</i> | CBS 476.84 ^T | MN431389 | KU896813 | KU896836 |
| <i>P. melanoconidium</i> | CBS 115506 ^T | MN431393 | MN969387 | KU896843 |
| <i>P. neoechinulatum</i> | CBS 169.87 ^T | JN942722 | MN969388 | KU896844 |
| <i>P. polonicum</i> | CBS 222.28 ^T | AF033475 | MN969392 | KU896848 |
| <i>P. polonicum</i> | KMM 4719 | OQ344775 | OQ466620 | PP616716 |
| <i>P. tricolor</i> | CBS 635.93 ^T | JN942704 | MN969403 | KU896852 |
| <i>P. viridicatum</i> | CBS 390.48 ^T | AY373939 | MN969406 | KU896856 |
| <i>Talaromyces marneffei</i> | CBS 388.87 ^T | JN899344 | JX091389 | KF741958 |

Жидкостную колоночную хроматографию низкого давления проводили с использованием силикагеля (50–100 мкм, ООО “Имид”, Россия). Для тонкослойной хроматографии использовали пластины с предварительно нанесенным силикагелем (5–17 мкм, 4.5 см × 6.0 см, ООО “Имид”, Россия) и силикагелем 60 RP-18 F254S (20 см × 20 см, “Merck” KGaA, Германия).

Спектральные данные. 3-О-метилвиридикатин (**1**) — белый аморфный порошок, C₁₆H₁₃NO₂, *m/z*: 250.088 [M–H][–] (расч. значение 250.0874 для C₁₆H₁₂NO₂), 274.0839 [M + Na][–] (расч. значение 274.0838 для C₁₆H₁₃NO₂Na). Спектр ЯМР ¹H (700 МГц, CDCl₃, δ, м.д., *J*, Гц): 3.80 (3H, с, OMe), 7.12 (1H, т, *J* = 7.5, H-7), 7.22 (1H, д, *J* = 8.1, H-6), 7.32 (1H, д, *J* = 8.1, H-9), 7.36 (2H, д, *J* = 7.3, H-12, H-16), 7.43 (1H, т, *J* = 7.5, H-8), 7.48 (1H, т, *J* = 7.3, H-14), 7.53 (2H, т, *J* = 7.4, H-13, H-15), 10.54 (1H, с, NH). Спектр ЯМР ¹³C (176 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 160.2 (C-2), 145.4 (C-3), 139.6 (C-4), 135.2 (C-10), 133.5 (C-11), 129.5 (HC-12, HC-16), 129.1 (HC-8), 128.6 (HC-13, HC-15), 128.5 (HC-14), 126.9 (HC-6), 123.0 (HC-7), 121.2 (C-5), 115.5 (HC-9), 60.5 (OMe).

Радикал-связывающая активность. 3-О-метилвиридикатин растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 1 мг/мл. Для определения активности в 96-луночные планшеты добавляли по 120 мкл соединения и 30 мкл раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) в этаноле (750 мкМ) [20]. Планшеты оставляли на 30 мин в темноте, по истечении времени измеряли оптическое поглощение растворов с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan FC (“Thermo Scientific”, США) при λ = 520 нм. В каче-

стве контроля был использован 100%-ный раствор ДМСО. Активность представлена как процент от значения в контроле.

Антимикробная активность. Дрожжеподобные грибы *Candida albicans* KMM 455 и бактериальные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 21027 и *Escherichia coli* VKPM (B-7935) (Коллекция морских микроорганизмов, ТИБОХ ДВО РАН) культивировали на агаризованной (16.0 г/л) среде Мюллера-Хинтона в чашках Петри при температуре 37°C в течение 24 ч. Эксперименты проводили на 96-луночных микропланшетах в бульоне Мюллера-Хинтона. В каждую лунку вносили по 90 мкл суспензии бактерий или дрожжеподобных грибов (10⁶ КОЕ/мл). Затем добавляли по 10 мкл соединения, разведенного в концентрациях от 1.5 мкМ (0.4 мкг/мл) до 100.0 мкМ (25.1 мкг/мл) с использованием двукратного разведения (концентрация ДМСО <1%) и инкубировали в течение 18 ч при 37°C. Антимикробную активность оценивали с помощью спектрофотометра Multiskan FS (“Thermo Scientific”, США). В качестве положительного контроля использовали антибиотик гентамицин и противогрибковое средство нитрофунагин в дозе 100 мкМ (17.4 мкг/мл), 1%-ный ДМСО в фосфатно-солевой буфере (PBS) служил отрицательным контролем.

Анализ ингибирования активности уреазы. Ингибирующую активность в отношении уреазы (из *Canavalia ensiformis*, конечная концентрация 1 ед.) оценивали по выделению аммиака с помощью индофенольного метода. Реакционную смесь, состоящую из 25 мкл раствора фермента и 5 мкл вещества (конечная концентрация 1.5–100.0 мкМ),

предварительно инкубировали при 37°C в течение 60 мин в 96-луночных планшетах. Затем в каждую лунку добавляли 55 мкл фосфатного буферного раствора с 100 мкМ мочевины и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Затем в каждую лунку добавляли 45 мкл фенольного реагента (1% фенола и 0.005% нитропруссид натрия) и 70 мкл щелочного реагента (0.5% NaOH и 0.1% активного хлорида NaClO), инкубировали в течение 50 мин при комнатной температуре. Затем измеряли оптическую плотность с помощью микропланшетного ридера MultiskanFS ("Thermo Scientific") при $\lambda = 630$ нм. В качестве положительного контроля использовали ДМСО (5%). В течении эксперимента уровень pH был 7.3–7.5.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг был проведен с помощью онлайн сервера для молекулярного докинга SwissDock (<http://old.swissdock.ch/docking>) на основе программного обеспечения EADock DSS [21]. Алгоритм докинга включает в себя "слепой" докинг и оценку рассчитанных вариантов связывания с использованием алгоритма CHARMM [22], оценки скоринговой функции с помощью модели сольватации FACTS (Fast Analytical Continuum Treatment of Solvation) [23] и последующей кластеризации [24].

Для проведения докинга использовали структуру уреазы *Canavalia ensiformis* [25] (PDB ID 4H9M) из базы данных RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Подготовку структуры к докингу проводили с помощью пакета DockPrep программы UCSF Chimera 1.16. Структуры лигандов готовили к докингу с помощью программ ChemDraw и Chem3D пакета программ ChemOffice 20.0. Визуализацию и анализ данных молекулярного докинга проводили с помощью UCSF Chimera 1.16.

Клеточные линии и условия культивирования. В работе использовали линии клеток нормальных кардиомиоцитов крысы H9c2 (CRL-1446, ATCC, США) и клеток гепатокарциномы человека HepG2 (HB-8065, ATCC, США). Все клетки инкубировали в увлажненной среде CO₂ (5%) при температуре 37°C в среде DMEM ("BioloT", Россия), содержащей 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина ("BioloT", Россия).

Клетки рассевали в 96-луночные планшеты в концентрациях 5×10^3 кл./лунка для линии HepG2 и 3×10^3 кл./лунка для линии H9c2 в соответствии с их особенностями в среде объемом 180 мкл. Через 24 ч добавляли вещество **1** в необходимых концентрациях (20 мкл), и инкубировали в течение 24 или 48 ч. Растворитель использовали в качестве контроля. После этого культуральную среду отбирали (180 мкл), добавляли свежую культуральную среду (100 мкл) и раствор 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (10 мкл) в концентрации 12 мкМ. Через 4 ч добавляли 10%-ный раствор додецилсульфата

натрия (ДДС/HCl, 100 мкл) и через 4–18 ч оценивали оптическую плотность раствора с помощью планшетного спектрофотометра MultiscanFC ("Thermo Scientific") при длине волны 570 нм. Результаты представляли как долю жизнеспособных клеток (%) по сравнению с контролем.

Инкубирование клеток HepG2 с этиловым спиртом (5% по объему) проводили в течение 1 ч, после чего добавляли 3-О-метилвиридикатин (**1**). Через 24 ч оценивали жизнеспособность клеток, как описано выше.

Инкубирование клеток H9c2 с хлоридом кобальта (II) в концентрации 500 мкМ проводили в течение 1 ч, после чего добавляли соединение **1**. Жизнеспособность клеток оценивали через 48 ч, как описано выше.

Статистическая оценка данных. Все данные были получены в трех независимых повторах, а рассчитанные значения выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка (SEM). Статистическая достоверность различий оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента с использованием SigmaPlot 14.0 ("Systat Software Inc.", США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетическая идентификация штамма морского гриба *P. polonicum* KMM 4719. Для идентификации и установления таксономического положения штамма KMM 4719 были амплифицированы и секвенированы молекулярные филогенетические маркеры, такие как внутренняя транскрибируемая спейсерная область (ITS), частичные последовательности генов β -тубулина (*BenA*) и кальмодулина (*CaM*). Размер амплифицированных фрагментов составил ~1500 п.о. для ITS региона, ~500 п.о. для *BenA* и ~600 п.о. для *CaM*. По результатам BLAST-анализа последовательность ITS региона была на 100% идентична последовательности типового (ex-type) штамма *P. polonicum* CBS 222.28^T, в то время как последовательности генов *BenA* и *CaM* были идентичны более чем на 99%. Филогенетическое дерево, построенное на основе объединенных ITS–*BenA*–*CaM* последовательностей, показало, что штамм KMM 4719 группируется с *P. polonicum* CBS 222.28^T (рис. 1).

Таким образом, на основе молекулярно-генетического анализа штамм KMM 4719, выделенный из трепанга *Apostichopus japonicus*, был идентифицирован как *P. polonicum*.

Мицелиальные грибы рода *Penicillium* являются постоянными компонентами грибных комплексов морских экосистем, включая глубоководные места обитания. Присутствие видов *Penicillium* в море было неоднократно показано культуральными методами на агаризованных средах, а также с помо-

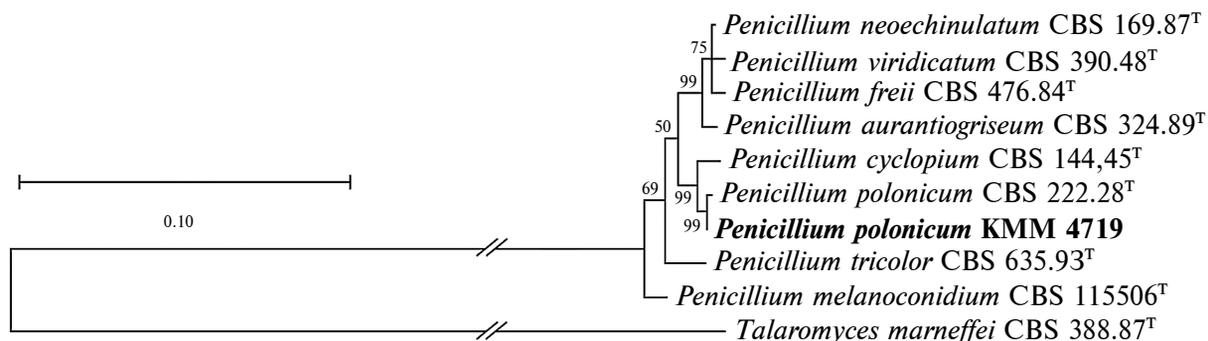


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом ML на основе объединенных последовательностей ITS-*BenA-CaM*, показывающее филогенетическое положение штамма KMM 4719 среди представителей рода *Penicillium* секции *Fasciculata* серии *Viridicata*. Достоверность дерева оценивали бутстреп-тестом в 1000 реплик, значения (%) которого указаны во внутренних узлах. Шкала показывает количество нуклеотидных замен на сайт.

щью методов метагеномного анализа [10, 26–28]. Они выделяются из разнообразных субстратов растительного и животного происхождения, а также морских грунтов. Более 60 видов *Penicillium*, в том числе секции *Fasciculata*, были включены в список морских грибов ввиду их частой встречаемости в море на разнообразных субстратах [29]. Как и многие виды *Penicillium*, представители секции *Fasciculata* характеризуются высокой метаболической активностью и адаптационными возможностями, позволяющие им использовать широкий спектр органических субстратов, встречающихся в море.

Согласно современному представлению о структуре рода *Penicillium* вид *P. polonicum* относится к серии *Viridicata* секции *Fasciculata* подрода *Penicillium*. Секция *Fasciculata* объединяет психротолерантные виды, которые способны развиваться в условиях с низкими показателями активности воды. Серия *Viridicata* является типичным примером политетической серии, поскольку ни один из метаболитов, продуцируемых грибами из этой серии, не является для них общим.

В настоящее время серия *Viridicata* включает 8 видов — *P. polonicum*, *P. freii*, *P. neoehinulatum*, *P. viridicatum*, *P. aurantiogriseum*, *P. cyclopium*, *P. tricolor* и *P. melanoconidium*, которые в наземной среде чаще всего ассоциированы с хранящимися зерновыми культурами [30]. В морской среде обитания представители серии *Viridicata* встречаются в грунтах, ассоциированных с растительными и животными гидробионтами [31–33]. В частности, вид *P. polonicum* был обнаружен в образцах глубоководного грунта, а также доминировал в пробах грунта, воды и различных макроорганизмов, собранных вдоль побережья Корейского полуострова [10, 34].

Выделение и установление строения вторичного метаболита. В результате хроматографического разделения этилацетатного экстракта культуры гриба *P. polonicum* было выделено индивидуальное

соединение **1**. Структура выделенного соединения **1** (рис. 2) была установлена с помощью данных ЯМР и МС, как 3-О-метилвиридикатин (**1**). Спектральные характеристики полностью соответствовали литературным данным для 3-О-метилвиридикатина, выделенного из экстракта гриба OS-F67406 [35].

Исследование антимикробной активности. 3-О-Метилвиридикатин в концентрации 100 мкМ (25.1 мкг/мл) не влиял на рост грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, но подавлял рост дрожжеподобных грибов *Candida albicans* на 23.2%. Ранее 3-О-метилвиридикатин показал антимикробную активность в отношении *S. aureus* ATCC 6538 с МИК 17.9 мкМ (4.5 мкг/мл), измеренной с помощью реактива МТТ [36]. К таким значительным расхождениям в результатах могло привести использование разных методов оценки актив-

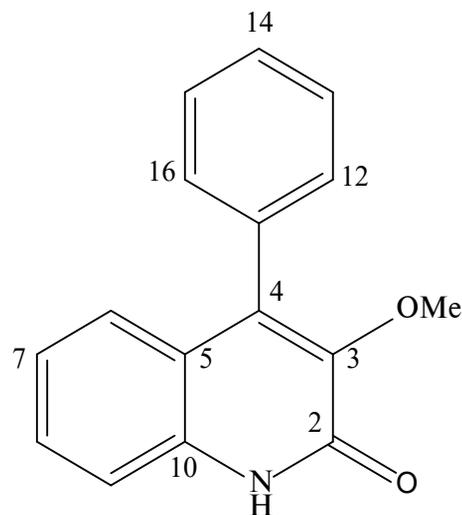


Рис. 2. Структурная формула 3-О-метилвиридикатина (**1**).

ности, так и разная чувствительность использованных штаммов *S. aureus*.

Одним из факторов вирулентности микроорганизмов является фермент уреазы (EC 3.5.1.5, urea amidohydrolase) — никель (Ni²⁺)-зависимая гидролаза, обеспечивающая гидролиз мочевины, до NH₃ и CO₂. В связи с ее ролью в жизнедеятельности микробных патогенов было изучено влияние 3-О-метилвиридикатина на уреазную активность.

3-О-Метилвиридикатин в бесклеточном тесте ингибировал активность фермента уреазы на 50% (ИК₅₀) в концентрации 97.3 мкМ. Для детализации взаимодействия 3-О-метилвиридикатина с уреазой был проведен молекулярный докинг. В базе данных PDB имеет ограниченное количество структур уреазы, которая является довольно консервативной для растений, грибов и бактерий, поэтому для докинга была выбрана структура уреазы *Canavalia ensiformis* (PDB ID 4N9M). Для сравнения также был проведен докинг уреазы с тиомочевинной.

Активный центр уреазы *C. ensiformis* расположен в С-концевом (αβ)8 ТИМ бочкообразном домене (402–701 и 762–840), соединенном с β-доменом (286–401 и 702–761), который, в свою очередь, соединен с αβ-доменом (135–285) и N-концевым αβ-доменом (1–134), вместе образующими две “ручки”. Каталитический двуникелевый центр содержит два иона никеля, один из которых связан с His519, His545, и Lys490, а другой с His407, His409, Asp633 и также Lys490. Также в формировании активного центра принимают участие His492, Asp494, Cys592, His593, Arg609, Asp633 и Ala636 [25].

Согласно проведенным расчетам (табл. 2), тиомочевина в активном центре образует шесть водородных связей с His492, Ala440, Asp633, Asp633 и Gly550, а также гидрофобные взаимодействия

с Gly550, Ala440 и Ala636, что соответствует известным литературным данным [37]. Визуализация комплекса приведена на рис. 3.

Уреазы является одним из вирулентных факторов для бактерий *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica* и *Staphylococcus aureus* [38], а также для грибов [39], в том числе грибных патогенов *Cryptococcus neoformans* [40] и *Aspergillus fumigatus* [41]. В то же время гемиасковые грибы, такие как *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*, утилизируют мочевины с помощью биотин-зависимой амидолиазы Dur1,2 [42], в связи с чем нет оснований считать, что подавление роста *Candida albicans* под действием 3-О-метилвиридикатина (1) связано с его влиянием на активность уреазы. При этом, вероятно, ингибирование активности уреазы может, в том числе, обуславливать влияние 3-О-метилвиридикатина на фитопатогенные грибы *Alternaria alternata* и *A. brassicae*, описанное ранее [43].

Способность ингибировать активность уреазы была показана для природных и синтетических соединений, относящихся к 20 различным классам [44], однако только ацетогидроксамовая кислота нашла практическое применение в качестве лекарственного средства “Lithostat” при инфекции *Helicobacter pylori* [45]. В связи с этим обнаруженная способность 3-О-метилвиридикатина ингибировать активность этого фермента открывает перспективы для его дальнейшего исследования.

Цитотоксическая и цитопротекторная активность. Также было оценено влияние 3-О-метилвиридикатина на клетки млекопитающих. Это соединение в концентрации 100 мкМ уменьшало жизнеспособность клеток гепатокарциномы человека линии HepG2 на 48.9% по сравнению

Таблица 2. Расчетные данные комплексов 3-О-метилвиридикатина и тиомочевины с уреазой

| Лиганд | ΔG, ккал/моль | FF score, ккал/моль | Водородные связи, длина Å | Гидрофобные взаимодействия |
|---------------------------|---------------|---------------------|--|--|
| Тиомочевина | -6.419 | -3873.224 | His492...S, 2.715 Ala440...H, 2.976 H...Asp633, 2.506 Ala636...N, 3.514 H...Asp633, 2.151 H...Gly550, 1.903 | Gly550, Ala440, Ala636 |
| 3-О-Метил- виридикатин | -6.924 | -3753.446 | Lys709...O, 2.449 | Leu77, Lys709, Gly396 |
| | -7.008 | -3754.145 | нет | Leu77, Ile133, Lys709, Gly135, Gly396, Ile137 |
| | -6.559 | -3748.669 | H...Asp295, 2.308 Asn836...O, 2.388 Arg132...O, 2.436 Asn131...O, 2.573 | Thr830, Val831 |

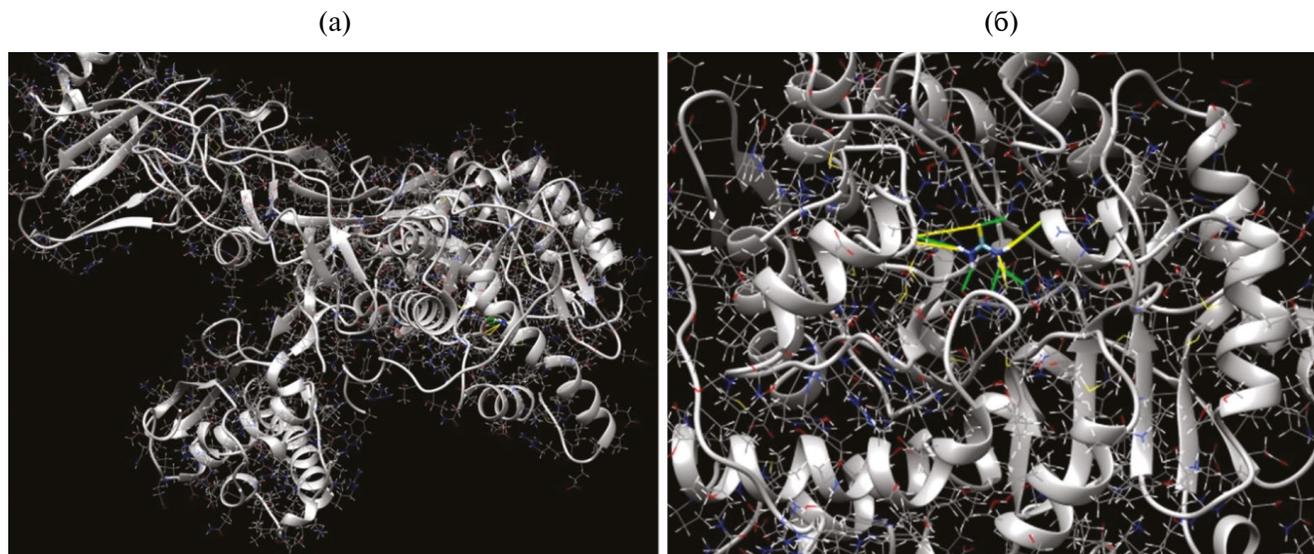


Рис. 3. Рассчитанный комплекс уреазы (PDB ID 4H9M) и тиомочевины. Зелеными линиями показаны водородные связи, желтыми гидрофобные взаимодействия между лигандом и мишенью: (а) общий вид, (б) увеличенное изображение.

с необработанными клетками и жизнеспособность нормальных кардиомиоцитов крысы линии Н9с2 — на 56.3% по сравнению с контролем. Рассчитанная ИК₅₀ для кардиомиоцитов составила 89.1 мкМ. Для исследования гепатопротекторного и кардиопротекторного действия 3-О-метилвиридикатин использовался в концентрации 10 мкМ, при которой он не оказывал токсического действия на жизнеспособность клеток.

Для моделирования *in vitro* алкогольного поражения печени клетки гепатокарциномы линии НерG2 подвергали действию 5%-ного этанола в течение 1 ч, после чего добавляли 3-О-метилви-

ридикатин, и жизнеспособность клеток оценивали через 24 ч. Под действием этанола жизнеспособность клеток НерG2 снижалась на $46.9 \pm 5.3\%$, и соединение **1** не оказало на них какого-либо заметного влияния.

Для моделирования *in vitro* хронической гипоксии кардиомиоциты Н9с2 подвергали действию хлорида кобальта (II) в концентрации 500 мкМ, и через 1 ч к ним добавляли 3-О-метилвиридикатин. Жизнеспособность клеток оценивали через 48 ч. Инкубирование кардиомиоцитов Н9с2 с CoCl_2 приводило к уменьшению их жизнеспособности на 45.9%. Под действием соединения **1** наблюда-

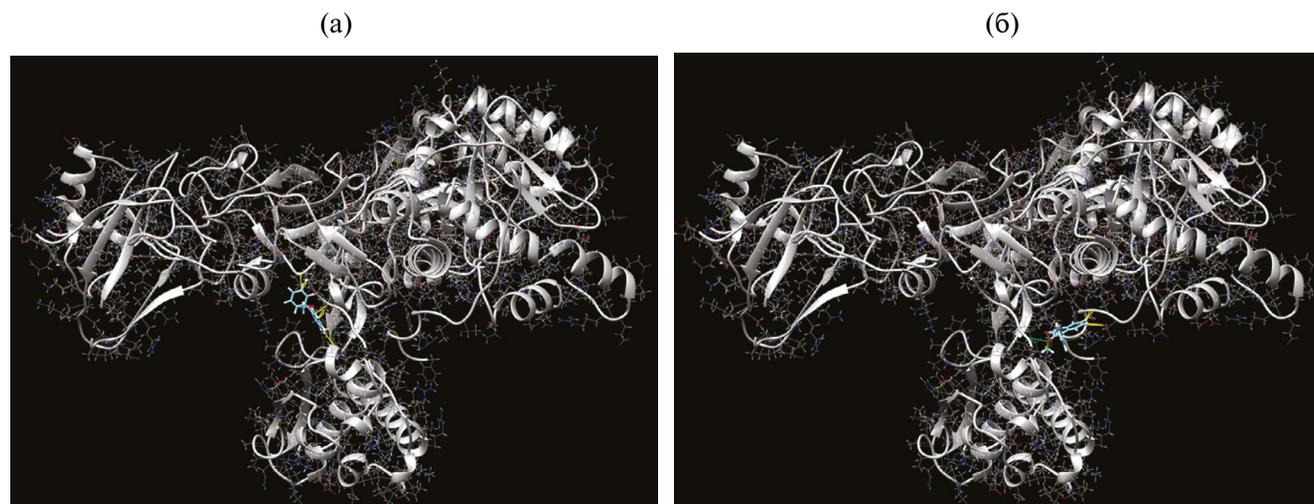


Рис. 4. Рассчитанный комплекс уреазы (PDB ID 4H9M) и 3-О-метилвиридикатина (**1**). Зелеными обозначены водородные связи: (а) комплекс 3-О-метилвиридикатина с аминокислотными остатками β домена уреазы ($\Delta G = -6.924$ ккал/моль), (б) комплекс 3-О-метилвиридикатина, расположенный между N-концевым $\alpha\beta$ и C-концевым $(\alpha\beta)8$ ТИМ доменами ($\Delta G = -6.559$ ккал/моль).

лось увеличение жизнеспособности обработанных клеток на 20.1% (рис. 4). При этом ДФПГ радикал-связывающая активность в бесклеточном тесте для соединения **1** была незначительной.

Ранее 3-О-метилвиридикатин, выделенный из морского штамма *Aspergillus versicolor* Y31-2, не проявлял активности в отношении клеток линии MCF-7, SMMC-7721, НЕК293, А549 и Т-47D [46]. При этом он ингибировал продукцию фактора некроза опухоли α (TNF- α) [35], в том числе ЛПС-индуцированную, в клетках линии ТНР-1 и РВМС в концентрации 10 мкМ [47]. Однако механизм ингибирования не был изучен и остается неясным.

При моделировании хронической гипоксии с помощью CoCl_2 в нейрональных клетках и кардиомиоцитах обнаруживаются эффекты, схожие с наблюдаемыми при низком содержании кислорода: окислительный стресс, активация NF- κ B зависимого пути воспаления, что приводит к увеличению продукции TNF- α и других цитокинов, апоптоз и, в результате, гибель клеток [47]. Обнаруженное кардиопротекторное действие 3-О-метилвиридикатина в *in vitro* модели может быть обусловлено его противовоспалительной активностью.

Таким образом, впервые было показано, что метаболит гриба *P. polonicum* КММ 4719 3-О-метилвиридикатин способен ингибировать активность фермента уреазы, а также проявлять кардиопротективное действие в модели хронической гипоксии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075–15-2021-1052).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования с участием человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen L., Wang X.-Y., Liu R.-Z., Wang G.-Y. // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19. № 8. Art. 461. <https://doi.org/10.3390/md19080461>
2. Pivkin M.V. // *Biol. Bull.* 2000. V. 198. № 1. P. 101–109. <https://doi.org/10.2307/1542808>
3. Starnovskaya S.S., Nesterenko L.E., Popov R.S., Kirichuk N.N., Chausova V.E., Chingizova E.A. et al. // *Nat. Prod. Bioprospect.* 2024. V. 14. № 1. Art. 38. <https://doi.org/10.1007/s13659-024-00459-7>
4. Duduk N., Vasić M., Vico I. // *Plant Dis.* 2014. V. 98. № 10. P. 1440–1440. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0550-PDN>
5. Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A. // *Stud. Mycol.* 2004. V. 49. № 201. P. 201–241.
6. Núñez F., Díaz M.C., Rodríguez M., Aranda E., Martín A., Asensio M.A. // *J. Food Protect.* 2000. V. 63. № 2. P. 231–236. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.2.231>
7. Wen Y., Lv Y., Hao J., Chen H., Huang Y., Liu C. et al. // *Nat. Prod. Res.* 2020. V. 34. № 13. P. 1879–1883. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1569003>
8. Cai X.-Y., Wang J.-P., Shu Y., Hu J.-T., Sun C.-T., Cai L. et al. // *Nat. Prod. Res.* 2022. V. 36. № 9. P. 2270–2276. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1828406>
9. Bai J., Zhang P., Bao G., Gu J.-G., Han L., Zhang L.-W. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 19. P. 8493–8500. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9218-8>
10. Park M.S., Fong J.J., Oh S.-Y., Kwon K.K., Sohn J.H., Lim Y.W. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014. V. 106. № 2. P. 331–345. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0205-5>
11. Neethu S., Midhun S.J., Radhakrishnan E.K., Jyothis M. // *Microb. Pathog.* 2018. V. 116. P. 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.033>
12. Kalkan S.O., Bozcal E., Hames Tuna E.E., Uzel A. // *Biocatal. Biotransform.* 2020. V. 38. № 6. P. 469–479. <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1785434>
13. Visagie C., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.-B., Klaassen C., Perrone G. et al. // *Stud. Mycol.* 2014. V. 78. № 1. P. 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
14. Scholin C.A., Herzog M., Sogin M., Anderson D.M. // *J. Phycol.* 1994. V. 30. № 6. P. 999–1011. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00999.x>
15. Elwood H., Olsen G., Sogin M. // *Mol. Biol. Evol.* 1985. V. 2. № 5. P. 399–410. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040362>
16. Glass N.L., Donaldson G.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. № 4. P. 1323–1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
17. Yurchenko A.N., Zhuravleva O.I., Khmel O.O., Oleynikova G.K., Antonov A.S., Kirichuk N.N. et al. // *Mar. Drugs*. 2023. V. 21. № 11. Art. 584. <https://doi.org/10.3390/md21110584>
18. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. № 6. P. 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
19. Kimura M. // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. P. 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

20. *Nesterenko L.E., Popov R.S., Zhuravleva O.I., Kirichuk N.N., Chausova V.E., Krasnov K.S. et al.* // *Fermentation*. 2023. V. 9. № 4. Art. 337. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040337>
21. *Grosdidier A., Zoete V., Michielin O.* // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007. V. 67. № 4. P. 1010–1025. <https://doi.org/10.1002/prot.21367>
22. *Brooks B.R., Brooks Iii C.L., Mackerell Jr A.D., Nilsson L., Petrella R.J., Roux B. et al.* // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. № 10. P. 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
23. *Haberthür U., Caflisch A.* // *J. Comput. Chem.* 2008. V. 29. № 5. P. 701–715. <https://doi.org/10.1002/jcc.20832>
24. *Grosdidier A., Zoete V., Michielin O.* // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № S2. P. W270–W277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>
25. *Balasubramanian A., Ponnuraj K.* // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 400. № 3. P. 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.009>
26. *Kirichuk N., Pivkin M., Hudyakova Y.* // *Eurasian Union Scientists*. 2020. V. 3. № 9(78). P. 12–18. <https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2020.3.78.1011>
27. *Kirichuk N.N., Chausova V.Y., Pivkin M.V.* // *Bot. Pac.* 2022. V. 11. № 2. P. 175–181. <https://doi.org/10.17581/bp.2022.11213>
28. *Sobol M.S., Hoshino T., Delgado V., Futagami T., Kadooka C., Inagaki F. et al.* // *BMC Genomics*. 2023. V. 24. № 1. P. 249. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09320-6>
29. *Jones E.B.G., Pang K.-L., Abdel-Wahab M.A., Scholz B., Hyde K.D., Boekhout T. et al.* // *Fungal Diversity*. 2019. V. 96. № 1. P. 347–433. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00426-5>
30. *Houbraken J., Wang L., Lee H.B., Frisvad J.C.* // *Persoonia: Mol. Phylogeny Evol. Fungi*. 2016. V. 36. № 1. P. 299–314. <https://doi.org/10.3767/003158516x692040>
31. *Bubnova E.N.* // 2010. V. 53. № 6. P. 595–600. <https://doi.org/10.1515/bot.2010.063>
32. *Li Y.-H., Li X.-M., Li X., Yang S.-Q., Shi X.-S., Li H.-L. et al.* // *Mar. Drugs*. 2020. V. 18. № 11. Art. 553. <https://doi.org/10.3390/md18110553>
33. *Зверева Л.В., Высоцкая М.А.* // *Биология моря*. 2005. № 6. С. 595–600.
34. *Li Y.-H., Yang S.-Q., Li X.-M., Li X., Wang B.-G., Li H.* // *Fitoterapia*. 2023. V. 165. P. 105387. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105387>
35. *Heguy A., Cai P., Meyn P., Houck D., Russo S., Michitsch R. et al.* // *Antivir. Chem. Chemother.* 1998. V. 9. № 2. P. 149–155. <https://doi.org/10.1177/095632029800900206>
36. *El Euch I.Z., Frese M., Sewald N., Smaoui S., Shaaban M., Mellouli L.* // *Med. Chem. Res.* 2018. V. 27. № 4. P. 1085–1092. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2130-4>
37. *Saeed A., Rehman S.-U., Channar P.A., Larik F.A., Abbas Q., Hassan M. et al.* // *J. Taiwan. Inst. Chem. Eng.* 2017. V. 77. P. 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.04.044>
38. *Rego Y.F., Queiroz M.P., Brito T.O., Carvalho P.G., de Queiroz V.T., de Fátima Á. et al.* // *J. Adv. Res.* 2018. V. 13. P. 69–100. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.003>
39. *Navarathna D.H.M.L.P., Harris S.D., Roberts D.D., Nickerson K.W.* // *FEMS Yeast. Res.* 2010. V. 10. № 2. P. 209–213. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00602.x>
40. *Osterholzer J.J., Surana R., Milam J.E., Montano G.T., Chen G.-H., Sonstein J. et al.* // *Am. J. Pathol.* 2009. V. 174. № 3. P. 932–943. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080673>
41. *Xiong Z., Zhang N., Xu L., Deng Z., Limwachiranon J., Guo Y. et al.* // *Microbiol. Spectr.* 2023. V. 11. № 2. P. e03508–03522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03508-22>
42. *Navarathna D.H.M.L.P., Das A., Morschhäuser J., Nickerson K.W., Roberts D.D.* // *Microbiology*. 2011. V. 157. № 1. P. 270–279. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045005-0>
43. *Ma Y.M., Qiao K., Kong Y., Li M.Y., Guo L.X., Miao Z. et al.* // *Nat. Prod. Res.* 2017. V. 31. № 8. P. 951–958. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1258556>
44. *Song W.Q., Liu M.L., Li S.Y., Xiao Z.P.* // *Curr. Top. Med. Chem.* 2022. V. 22. № 2. P. 95–107. <https://doi.org/10.2174/1568026621666211129095441>
45. *Hameed A., Al-Rashida M., Uroos M., Qazi S.U., Naz S., Ishtiaq M., et al.* // *Expert Opin. Ther. Patents*. 2019. V. 29. № 3. P. 181–189. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1584612>
46. *Li P., Fan Y., Chen H., Chao Y., Du N., Chen J.* // *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2016. V. 34. № 5. P. 1072–1075. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-5097-y>
47. *Muñoz-Sánchez J., Cháñez-Cárdenas M.E.* // *J. Appl. Toxicol.* 2019. V. 39. № 4. P. 556–570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>

**Biologically Active Quinolinone Alkaloid from Marine Fungus
Penicillium polonicum KMM 4719**

**S. S. Starnovskaya^{a,*}, N. N. Kirichuk^a, V. E. Chausova^a, U. V. Khudyakova^a,
E. A. Chingizova^a, A. R. Chingizov^a, A. N. Yurchenko^a, and E. A. Yurchenko^a**

^a*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, 690022 Russia*

**e-mail: starnovskaya_ss@piboc.dvo.ru*

The marine fungal strain KMM 4719 was isolated from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* and identified as *Penicillium polonicum* based on three molecular genetic markers: ITS, *BenA*, and *CaM*. 3-O-methylviridicatin was isolated from the ethyl acetate extract of the strain culture. 3-O-methylviridicatin demonstrated cardioprotective activity for the first time, as well as urease inhibitory activity (IC₅₀ 97.3 μM). In addition, 3-O-methylviridicatin at a concentration of 100 μM (25.1 μg/ml) inhibited the growth of the yeast-like fungus *Candida albicans* at 23.2%.

Keywords: marine fungi, *Penicillium polonicum*, ITS, β-tubulin, calmodulin, secondary metabolites, biological activity