

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**АНТИОКСИДАНТНАЯ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
СИНТЕТИЧЕСКИХ БИСКУМАРИНОВ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки

06.04.01 «Биология»

Биологического факультета

Щербаковой Дарьи Евгеньевны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

М. В. Каневский

Зав. кафедрой:

д.б.н., профессор

С. А. Коннова

Саратов 2026

Введение. Особый интерес представляют фенольные соединения, среди которых выделяются кумарины – природные соединения со скелетом α -бензопирона, распространённые в растениях семейств зонтичных, рутовых и бобовых. Разнообразие их структуры (простые кумарины, фурукумарины, пиранокумарины, бискумарины) обуславливает широкий спектр биологической активности: противовирусной, противовоспалительной, гипотензивной, антибактериальной и антиоксидантной.

Исследования подтвердили, что кумарины и их производные обладают антибактериальными свойствами, включая ингибирование систем «кворума» и подавление биоплёнок *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, а также эффективно нейтрализуют свободные радикалы. Уникальное сочетание этих свойств открывает перспективы создания агентов, борющихся одновременно с инфекциями и окислительным стрессом.

Исходя из вышесказанного, **целью** данного исследования является получение различных бискумариновых структур, а также всестороннее исследование потенциальной биологической активности синтезированных соединений, включая их антибактериальные, антиоксидантные и антирадикальные свойства.

Для реализации поставленной **цели** в ходе исследования были сформулированы и решались следующие **задачи**:

1. Провести синтез (арил)метиленбискумаринов на основе формальдегида и гидроксид- и метоксипроизводных бензальдегида.
2. Оценить чистоту и соответствие полученных соединений ожидаемым структурам.
3. Определить минимальные ингибирующие концентрации (МИК) синтезированных соединений в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus* 209P, *Bacillus subtilis* 26D) и грамотрицательных (*Escherichia coli* 113–13, *Azospirillum brasilense* Sp7) микроорганизмов.

4. Оценить влияние синтезированных (арил)метиленискумаринов на формирование бактериальных биоплёнок и определить степень этого влияния в отношении тестируемых штаммов *S. aureus*, *B. subtilis* и *A. brasilense*.

5. Исследовать антиоксидантные свойства синтезированных соединений с помощью DPPH– и pFRAP–методов, а также оценить их антиокислительную активность.

6. Установить величину полуэффективной концентрации продуктов синтеза, проявляющих антирадикальную активность.

Структура магистерской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 67 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о кумаринах (классификация, номенклатура, природные источники, биологическая активность); характеристика альдегидов, используемых в синтезе (ванилиновый, анисовый, салициловый, формальдегид, 2,3- и 2,4-дигидроксибензальдегиды); антимикробная активность кумаринов (механизмы ингибирования систем «кворума» и подавления биоплёнок); антирадикальная и антиокислительная активность.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе были использованы бактериальные культуры: *St. aureus* 209P, *E. coli* 113-13, *B. subtilis* 26D, *Az. brasilense* Sp7. Бактериальные культуры *St. aureus* 209P, *E. coli* 113-13, *B. subtilis* 26D были любезно предоставлены сотрудниками кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета СГУ им. Н.Г.Чернышевского. *Az. brasilense* Sp7 был любезно предоставлен Лабораторией биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук” (ИБФРМ РАН).

Для получения целевых бискумаринов проводили синтез между 4-

гидроксикумарином и замещёнными бензальдегидами (формальдегидом, анисовым альдегидом, ванилином или салициловым альдегидом). К двум эквивалентам кумарина добавляли один эквивалент альдегида и кипятили в этиловом спирте с обратным холодильником до исчезновения кумаринового пятна на хроматограмме (контроль ТСХ). После охлаждения осадок промывали горячим спиртом, сушили и перекристаллизовывали из гексана. Чистоту оценивали методом ТСХ на пластинках Silufol в системе гексан : этилацетат : ацетон (3:1:1) с проявлением в парах йода. Структуру подтверждали ИК-спектроскопией и температурой плавления. Реакции протекали по схеме, представленной на рисунке 1.

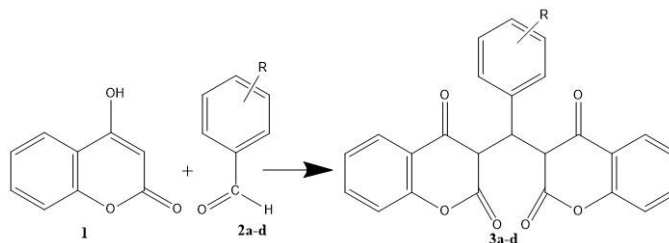


Рисунок 1 – Схема протекания реакции конденсации Кневенагеля-Михаэля

Анализ полученных соединений. Определение химической чистоты синтезированных соединений является важным шагом в их структурном анализе. В лабораторной практике для этой цели широко используется метод определения температуры плавления кристаллических веществ.

Важным критерием химической чистоты синтезированных соединений является узкий диапазон температуры плавления (не более 2°C). Экспериментальные данные (Таблица 1) подтвердили высокую степень чистоты полученных образцов, что делает их пригодными для дальнейшего структурного анализа.

Как видно из таблицы условиям чистоты соответствуют образцы веществ под номерами **1, 6, 7, 8б**.

Таблица 1 – Температура плавления полученных веществ.

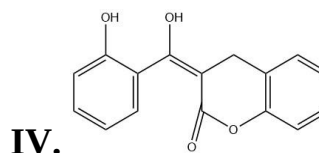
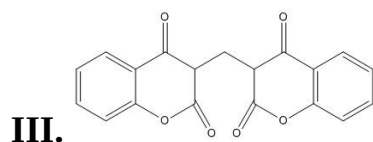
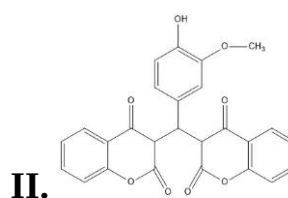
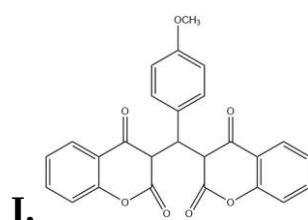
Предполагаемое вещество	Температура плавления, °С
Метиленбискумарин (1)	266–268
4–метоксифенилметиленис-кумарин (6)	240–241
4–гидрокси–3–метоксифенилметиленискумарин (7)	190–192
Хроменохроменилхромандиона (8a)	—*
2–гидроксibenзоилкумарин (8б)	164–166

* – не проводился анализ, поскольку не удалось получить вещество 8a без примеси 8б.

Исходя из этого для вышеперечисленных соединений можно рассчитать выход продуктов (Таблица 2)

Таблица 2 – Выходы полученных веществ (% от теоретического).

Предполагаемое вещество	Выход, %
Метиленбискумарин (1)	28±2
4–метоксифенилметиленискумарин (6)	79±3
4–гидрокси–3–метоксифенилметиленискумарин (7)	75±3
2–гидроксibenзоилкумарин (8б)	38±2



I – 4–метоксифенилметиленискумарин (6), II – 4–гидрокси–3–метоксифенилметиленискумарин (7), III – метиленискумарин (1),
IV – 2–гидроксibenзоилкумарин (8б)

Рисунок 2 – Предполагаемые структуры веществ, для которых был проведён ИК–анализ

Оценка антибактериальной активности. Для оценки бактериостатической активности синтезированных соединений использовали метод последовательного разбавления. Первоначально тестировали максимальную концентрацию 2 мкМ. Соединения, не проявившие активности, исключали из дальнейшего анализа. Для соединений, продемонстрировавших зоны ингибирования роста, проводили последовательные двойные разведения до полного исчезновения антимикробного эффекта, что позволило определить минимальные эффективные концентрации (МИК) для каждого активного соединения. Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Минимальные эффективные концентрации для каждого активного соединения

Соединения	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	<i>Escherichia coli</i> 113–13	<i>Bacillus subtilis</i> 26D	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7
Кумарин	–	–	–	2 мкМ
Формальдегид + кумарин	0,5 мкМ	–	0,25 мкМ	–
Салициловый альдегид + кумарин (халкон)	2 мкМ	–	0,125 мкМ	1 мкМ
Салициловый альдегид + кумарин (тетраикл)	–	–	0,25 мкМ	–
2,3–дигидроксibenзальдегид + кумарин	1 мкМ	1 мкМ	0,03125 мкМ	0,125 мкМ
2,4–дигидроксibenзальдегид + кумарин	0,25 мкМ	1 мкМ	0,015625 мкМ	0,25 мкМ
Анисовый альдегид + кумарин	1 мкМ	–	1 мкМ	1 мкМ
Ванилин + кумарин	0,125 мкМ	–	0,0078125 мкМ	0,25 мкМ
Рутин	2 мкМ	2 мкМ	2 мкМ	2 мкМ
Нарингенин	2 мкМ	–	2 мкМ	2 мкМ
Кварцетин	2 мкМ	–	2 мкМ	2 мкМ
Доксициклин	0,03125 мкМ	0,0625 мкМ	0,03125 мкМ	0,0625 мкМ

«–» – ингибирующая рост активность обнаружена не была

Среди исходных веществ активность в отношении *Staphylococcus aureus* 209P проявил только формальдегид. Флавоноиды (нарингенин, рутин, кверцетин) показали активность, сравнимую с продуктами синтеза кумарина и салициловых альдегидов. Наиболее активны продукты конденсации кумарина с ванилином, 2,3- и 2,4-дигидроксibenзальдегидами. В отношении *Escherichia coli* 113-13 из контрольных веществ активен только рутин, из синтезированных – продукты с 2,3- и 2,4-дигидроксibenзальдегидами. В отношении *Azospirillum brasilense* Sp7 наибольшую активность проявили продукты кумарина с салициловым альдегидом (халкон), дигидроксibenзальдегидами, анисовым альдегидом и ванилином. Доксициклин (выбран из-за структурного сходства тетрациклинов с бискумаринами) показал высокую активность в концентрациях 0,03125–0,0625 мкМ против всех штаммов.

Оценка влияния синтезированных соединений на формирование бактериальных биоплёнок. Методом окрашивания кристаллическим фиолетовым оценено влияние синтезированных соединений на формирование бактериальных биоплёнок *E. coli*, *B. subtilis*, *Az. brasilense* и *St. aureus*. Установлено, что ни одно из соединений не вызывает полного подавления биоплёнок, однако для ряда продуктов наблюдается достоверное снижение биомассы. Наиболее выраженный эффект отмечен для продуктов с ванилином и салициловым альдегидом в форме халкона.

Фотоиндуцирующая антибактериальная активность. Для облучения выбран лазер 365 нм. Интенсивное поглощение показали продукты кумарина с ванилином, анисовым, салициловым (бис и халкон) и формальдегидом. Наиболее эффективны продукты с салициловым альдегидом (халкон) и ванилином: через 5 минут КОЕ снижалось на два порядка, к 10-15 минутам – полная инактивация бактерий (Рисунок 3). Продукт с салициловым альдегидом (бис) активен с задержкой, производные с анисовым альдегидом и формальдегидом показали умеренный эффект.

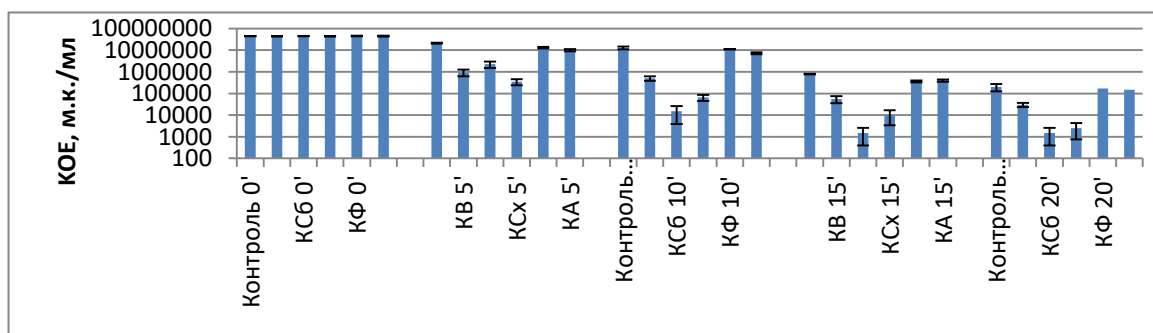
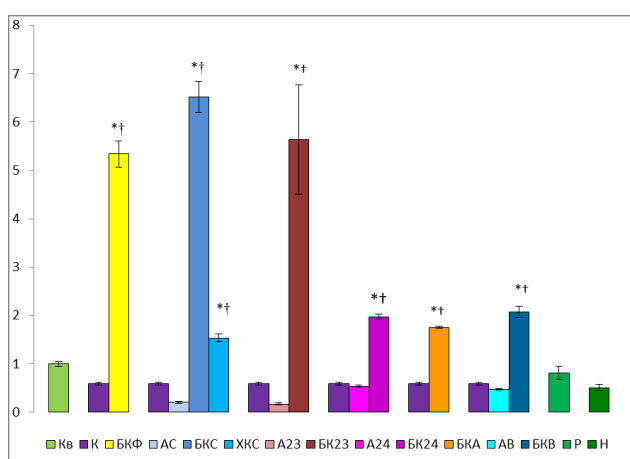


Рисунок 3 – Фотоиндуцированная антибактериальная активность конденсационных продуктов кумарина с различными альдегидами при облучении лазером 365 нм

Оценка антиоксидантных свойств. Антиокислительной активности показала, что все синтезированные бискумарины, за исключением исходного кумарина, превосходят кверцетин (Рисунок 4). Превышение составило: для продукта формальдегид + кумарин – в 5 раз, салициловый альдегид (циклическая форма) + кумарин – в 6,5 раз, 2,3-дигидроксибензальдегид + кумарин – в 5,6 раз, 2,4-дигидроксибензальдегид + кумарин – в 1,9 раз, анисовый альдегид + кумарин – в 1,7 раза, ванилин + кумарин – в 2 раза. Продукт с салициловым альдегидом в форме халкона превысил кверцетин лишь в 0,5 раза.



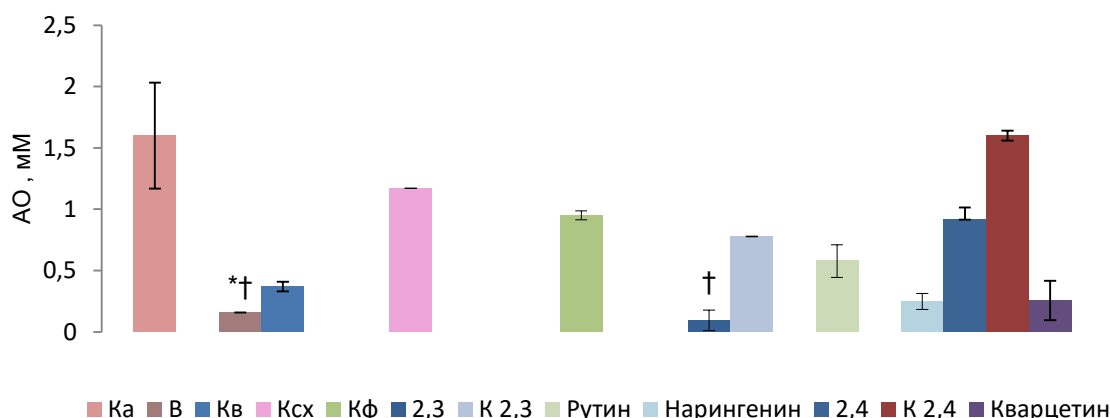
* – отличие от исходного субстрата (К) достоверны для $p \leq 0,05$; † – отличие от кверцетина достоверны для $p \leq 0,05$

Кв – кумарин + ванилин; К – кумарин; БКФ – кумарин + формальдегид (бис); АС – салициловый альдегид; БКС – кумарин + салициловый альдегид (бис); ХКС – кумарин + салициловый альдегид (халкон); А23 – 2,3-дигидроксибензальдегид; БК23 – кумарин + 2,3-дигидроксибензальдегид (бис); А24 – 2,4-

дигидроксibenзальдегид; БК24 – кумарин + 2,4-дигидроксibenзальдегид (бис); БКА – кумарин + анисовый альдегид (бис); АВ – ванилин; БКВ – кумарин + ванилин (бис); Р – рутин; Н – нарингенин

Рисунок 4 – Оценка антиокислительной активности синтезированных веществ и субстратов

CUPRAC-анализ. При оценке антирадикальной активности по восстановлению ионов меди значимую активность (EC_{50}) проявили только исходные альдегиды – ванилин и 2,4-дигидроксibenзальдегид (Рисунок 5). Для всех остальных соединений значения EC_{50} оказались слишком высокими, чтобы считать их эффективными антиоксидантами в этой модели.



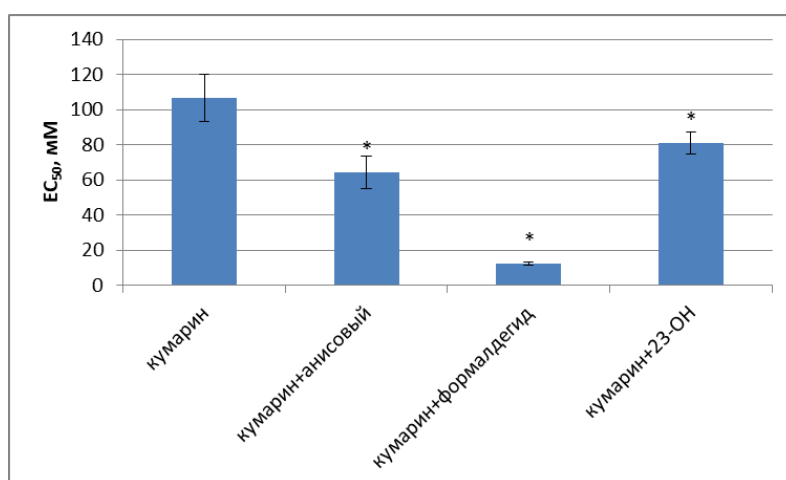
* – отличие от исходного субстрата (К) достоверны для $p \leq 0,05$; † – отличие от кверцетина достоверны для $p \leq 0,05$

Ка – кумарин + анисовый альдегид; В – ванилин; Кв – кумарин + ванилин; Ксх – кумарин + салициловый альдегид (халкон); Кф – кумарин + формальдегид; 2,3 – 2,3-дигидроксibenзальдегид; К2,3 – кумарин + 2,3-дигидроксibenзальдегид; 2,4 – 2,4-дигидроксibenзальдегид; К2,4 – кумарин + 2,4-дигидроксibenзальдегид

Рисунок 5 – Результаты антиокислительной активности исследуемых веществ

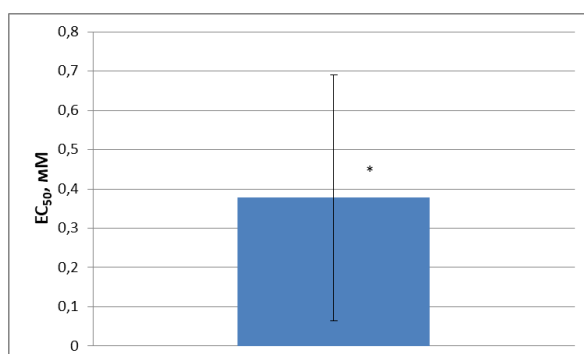
DRPH-тест. Наиболее высокую антирадикальную активность проявил продукт конденсации кумарина с ванилином: при концентрации 10 мМ активность достигла около 70%, EC_{50} составила около 0,38 мМ (Рисунок 6-7).

Умеренную активность показал метиленбискумарин (продукт с формальдегидом): при 10 мМ активность около 47%, $EC_{50} \approx 12-14$ мМ. Исходный кумарин малоэффективен ($EC_{50} \approx 107$ мМ). Продукты с анисовым альдегидом и 2,3-дигидроксибензальдегидом имеют EC_{50} в диапазоне 55-90 мМ. Для соединений на основе салицилового альдегида (бис и халкон) и продукта с 2,4-дигидроксибензальдегидом ингибирование не достигло 50% даже при 100 мМ. Таким образом, антирадикальная активность бискумаринов критически зависит от структуры альдегидного фрагмента.



* – отличие от исходного субстрата (4-гидроксикумарина) достоверны для $p \leq 0,05$

Рисунок 17 – Оценка антирадикальной активности исследуемых веществ методом DPPH



* – отличие от исходного субстрата (4-гидроксикумарина) достоверны для $p \leq 0,05$

Рисунок 18 – Оценка антирадикальной активности исследуемого вещества кумарин + ванилин методом DPPH

Заключение. Пять целевых соединений получены конденсацией 4-гидроксикумарина с формальдегидом, анисовым альдегидом, ванилином и салициловым альдегидом: метиленбискумарин, 4-метоксифенилметиленбискумарин, 4-гидрокси-3-метоксифенилметиленбискумарин, хроменохроменилхромандион и 2-гидроксибензоилкумарин. Наибольшие выходы (79-84%) получены для метокси- и гидрокси-метоксипроизводных. Структура и чистота подтверждены ТСХ, ИК-спектроскопией и температурой плавления.

По антибактериальной активности продукты конденсации с ванилином и дигидроксибензальдегидами высокоактивны в отношении грамположительных бактерий, особенно производное ванилина (МИК против *St. aureus* 0,125 мкМ). Исходные альдегиды активности не проявляли, что доказывает ключевую роль конденсации. В отношении *E. coli* активны только продукты с дигидроксибензальдегидами.

По антибиоплёточной активности соединения не вызывают полного подавления биоплёнок, однако для продуктов на основе ванилина и салицилового альдегида (халкон) зафиксировано снижение биомассы на 20-40%.

По фотоиндуцированной активности продукты с ванилином, анисовым и салициловым альдегидами интенсивно поглощают в УФ-области (365 нм), что делает их перспективными фотосенсибилизаторами.

По антиоксидантной активности все бискумарины превосходят кверцетин в 5-6,5 раз. В тесте DPPH наиболее активен продукт с ванилином ($EC_{50} = 13$ мМ), тогда как производные салицилового альдегида и 2,4-дигидроксибензальдегида не достигают 50% ингибирования даже при 100 мМ.

Выводы

1. Время полной конверсии субстратов зависит от природы альдегида: для формальдегида – 6 часов, для анисового альдегида – 48 часов, для ванилина

и салицилового альдегида – 72 часа.

2. Синтезированные бискумарины проявляют высокую антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий. Наиболее активным является продукт конденсации с ванилином: МИК против *St. aureus* 209P – 0,125 мкМ, против *B. subtilis* 26D – 0,0078 мкМ, что в 16–256 раз превосходит активность флавоноидов рутина, нарингенина и кверцетина.

3. В отношении грамотрицательной *E. coli* 113–13 активность проявляют только продукты конденсации с 2,3– и 2,4–дигидроксibenзальдегидами (МИК 1 мкМ).

4. Синтезированные соединения не вызывают полного подавления биоплёнок, однако для ряда продуктов (в частности, на основе ванилина и салицилового альдегида в форме халкона) зафиксировано достоверное снижение биомассы биоплёнки у тестируемых штаммов *S. aureus*, *B. subtilis* и *A. brasilense* в диапазоне 20–40% по сравнению с контролем.

5. Бискумарины обладают высокой антиокислительной активностью, превышающей активность кверцетина в 5–6,5 раз. Наибольшие значения отмечены для метиленбискумарина и продукта на основе салицилового альдегида (тетрациклическая форма).

6. По данным спектрального анализа, продукты конденсации кумарина с ванилином, анисовым и салициловым альдегидами имеют интенсивную полосу поглощения в ближней УФ–области (365 нм), что указывает на их потенциальную пригодность в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической инактивации бактерий.

7. По результатам DPPH–теста установлено, что наибольшую антирадикальную активность проявляет продукт конденсации кумарина с ванилином ($EC_{50} = 13$ мМ). Метиленбискумарин и соединения с анисовым, а также 2,3–дигидроксibenзальдегидом показали низкую или умеренную активность (EC_{50} 64–106 мМ), а производные салицилового альдегида и 2,4–дигидроксibenзальдегида не достигли 50% ингибирования даже при 100 мМ.