

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-118>

Определение возможной мишени действия 4,4а-дигидроксантонов в бактериальных клетках

Фролова В.В.^{1✉}, Чернов Н.М.¹, Ивкин Д.Ю.¹, Румянцев А.М.², Гурина С.В.¹¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия;²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. В настоящее время интенсивно изучаются частично гидрированные производные ксантона — дигидроксантоны (ДК). Они представляют интерес в связи с тем, что обладают антимикробным, противоопухолевым, антиоксидантным действием. Много работ посвящено исследованию цитотоксичности ДК и совсем немного сведений об их антимикробной активности.

В связи с этим актуальным является исследование антимикробной активности и механизма действия новых синтетических производных 4,4а-ДК. В предварительных исследованиях установлено, что 4,4а-ДК активны в отношении грамположительных бактерий и обладают выраженным противостафилококковым действием. Выявлено наиболее активное производное — 5-бром-4,4-диметил-7-хлор-4,4а-ДК (БДХ-ДК).

Цель исследования — определить возможную мишень действия активного производного БДХ-ДК в бактериальных клетках, а также его острую токсичность.

Материалы и методы. Для доказательства воздействия БДХ-ДК на проницаемость цитоплазматической мембраны в бактериальных клетках был использован метод измерения интенсивности поглощения клетками бактерий красителя кристаллического фиолетового. С целью определения влияния БДХ-ДК на процесс синтеза белка было проведено исследование плазмокоагулазной активности *Staphylococcus aureus* под действием ДК. Для изучения действия БДХ-ДК на бактериальную ДНК использовали метод расщепления плазмидной ДНК. Острую токсичность БДХ-ДК определяли по экспресс-методу В.Б. Прозоровского.

Результаты. БДХ-ДК вызывал повышение проницаемости цитоплазматической мембраны *S. aureus*, не влиял непосредственно на плазмокоагулазную активность *S. aureus* и проявлял слабое повреждающее действие на бактериальную ДНК. Соединение индуцировало разрывы в плазмидной ДНК в очень высокой концентрации — 1 мМ, или 384 мкг/мл и выше. БДХ-ДК относится к малотоксичным соединениям (средняя летальная доза при пероральном введении соединения составила 1710 ± 170 мг/кг, при внутривенном — $116,9 \pm 13,3$ мг/кг).

Заключение. Впервые были проведены углублённые исследования возможного механизма действия нового синтетического биологически активного соединения из группы 4,4а-ДК — БДХ-ДК. Установлено, что вероятной мишенью действия БДХ-ДК в клетках *S. aureus* является цитоплазматическая мембрана. БДХ-ДК не влиял на процесс синтеза белка, а именно на активность фермента плазмокоагулазы. Соединение не оказывало выраженного повреждающего действия на бактериальную ДНК. Установлено, что 4,4а-ДК относится к малотоксичным соединениям.

Ключевые слова: 4,4а-дигидроксантоны, острая токсичность, мишень действия, бактериальные клетки, проницаемость цитоплазматической мембраны, плазмокоагулирующая способность стафилококка, действие на плазмидную ДНК

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Фролова В.В., Чернов Н.М., Ивкин Д.Ю., Румянцев А.М., Гурина С.В. Определение возможной мишени действия 4,4а-дигидроксантонов в бактериальных клетках. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(5):558–566.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-118>

Identifying possible target of action of 4,4a-dihydroxanthones in bacterial cells

Valeriya V. Frolova¹✉, Nikita M. Chernov¹, Dmitry Yu. Ivkin¹,
Andrey M. Rumyantsev², Svetlana V. Gurina¹

¹Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia;

²Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Partially hydrogenated derivatives of xanthone, dihydroxanthones, are being intensively studied. They are of interest due to their antimicrobial, antitumor, and antioxidant effects. Many researches are focused on the study of the cytotoxicity of dihydroxanthones and very little information is available on their antimicrobial activity. Therefore, the study of the antimicrobial activity and mechanism of action of new synthetic derivatives of 4,4a-dihydroxanthone is relevant. Preliminary studies have demonstrated that 4,4a-dihydroxanthones are active against gram-positive bacteria and have a pronounced anti-staphylococcal effect. Namely, 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone (BDC-DX) was shown to be the most active derivative.

Aim of the study was to determine the possible target of action of the active derivative of BDC-DX in bacterial cells and its acute toxicity.

Materials and methods. The method of measuring the intensity of absorption of the crystal violet dye by bacteria cells was used to prove the effect of BDC-DX on the permeability of the cytoplasmic membrane in bacterial cells. The plasma coagulase activity of *Staphylococcus aureus* was tested under the action of dihydroxanthone to determine the effect of dihydroxanthone on the process of protein synthesis. Plasmid DNA digestion method was used to study the effect of the compound on bacterial DNA. The acute toxicity of BDC-DX was determined by the express method of V.B. Prozorovsky.

Results and discussion. BDC-DX increased the permeability of the cytoplasmic membrane of *S. aureus*. Dihydroxanthone did not directly affect the plasma coagulase activity of *Staphylococcus* and showed a weak damaging effect on bacterial DNA. The compound induced breaks in plasmid DNA at a very high concentration — 1 mM or 384 µg/ml and higher. BDC-DX is a low-toxic compound (the average lethal dose for oral administration of the compound is 1710 ± 170 mg/kg, the average lethal dose for intraperitoneal administration of the compound is 116.9 ± 13.3 mg/kg).

Conclusion. For the first time, in-depth study of the possible mechanism of action of a new synthetic biologically active compound from the group of 4,4a-dihydroxanthones, BDC-DX, was conducted. A likely target of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone in *S. aureus* cells is the cytoplasmic membrane. BDC-DX did not affect the process of protein synthesis, namely the activity of the plasma coagulase enzyme. The compound had no pronounced damaging effect on bacterial DNA. It was found that 4,4a-dihydroxanthone refers to low-toxic compounds.

Keywords: 4,4a-dihydroxanthones, acute toxicity, target of action, bacterial cells, permeability of the cytoplasmic membrane, plasma coagulating ability of *Staphylococcus*, action on plasmid DNA

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Frolova V.V., Chernov N.M., Ivkin D.Yu., Rumyantsev A.M., Gurina S.V. Identifying possible target of action of 4,4a-dihydroxanthones in bacterial cells. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):558–566.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-118>

Введение

Ксантоны представляют собой многочисленную группу биологически активных веществ природного происхождения (встречаются у грибов, растений, лишайников) и обладают различными биологическими эффектами (антибактериальным, противогрибковым, противомаларийным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиоксидантным, антигистаминным) [1–3].

В настоящее время интенсивно изучаются частично гидрированные производные ксантона —

дигидроксантоны (ДК), которые, как и ксантоны, являются вторичными метаболитами растений, грибов и бактерий. Многие производные ДК получают путём химического синтеза. Химически синтезированные производные ДК представляют интерес в связи с тем, что они, как и природные, обладают антимикробным, противоопухолевым, антиоксидантным действием [4–6]. Кроме того, устойчивость бактерий к антимикробным препаратам, получаемым химическим синтезом, развивается, как правило, медленнее, чем к препаратам природного происхождения.

Интерес, вызванный биологическими свойствами ДК, привёл к росту числа работ по выделению и синтезу их производных [1–3]. Много работ посвящено исследованию цитотоксичности ДК и совсем немного сведений об их антимикробной активности.

В связи с этим актуальным является исследование антимикробной активности и механизма действия новых производных 4,4а-ДК.

В предварительных исследованиях установлено, что 4,4а-ДК с разными заместителями в ароматическом кольце, синтезированные на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, активны в отношении грамположительных бактерий и обладают выраженным противостафилококковым действием. Выявлено наиболее активное производное — 5-бром-4,4-диметил-7-хлор-4,4а-ДК (БДХ-ДК) (рис. 1) [6].

Цель данного исследования — определить возможную мишень действия активного производного БДХ-ДК в бактериальных клетках, а также его острую токсичность.

Для многих антибактериальных агентов мишенями действия могут быть клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, нуклеиновые кислоты, процессы синтеза белка [7–9].

Для выяснения возможного механизма действия БДХ-ДК исследовали его влияние на проницаемость цитоплазматической мембраны бактериальных клеток, процесс синтеза белка (по изменению активности фермента плазмокоагулазы) и на бактериальную ДНК.

Материалы и методы

Определение интенсивности поглощения красителя кристаллического фиолетового бактериальными клетками

Изменение в поглощении клетками *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922 красителя кристаллического фиолетового (КФ) после взаимодействия с ДК определяли по методике S. Halder и соавт. [10].

Культуры *S. aureus* и *E. coli* выращивали на мясо-пептонном агаре 24 ч. Клетки суспендировали в изотоническом растворе NaCl до 10^9 КОЕ/мл. Полученный инокулят добавляли к раствору исследуемого соединения в соотношении 1 : 1 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Концентрации ДК в пробах составляли 2; 4; 8; 16; 32; 62,5; 125 и 250 мкг/мл. В качестве контроля использовали суспензию клеток *S. aureus* и *E. coli*, не подвергшуюся действию соединения. Затем к исследуемым образцам добавляли КФ, его концентрация в смеси составляла 0,01 мг/мл. Инкубировали 10 мин, затем центрифугировали 8 мин при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость

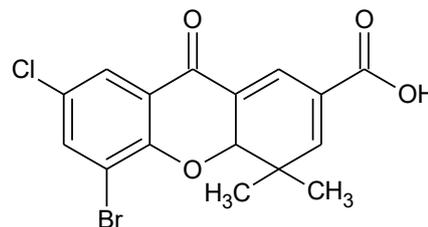


Рис. 1. Строение БДХ-ДК.

Fig. 1. 5-Bromine-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone.

отделяли и определяли оптическую плотность при длине волны 590 нм на спектрофотометре.

Для получения достоверных результатов эксперименты проводили в 3 повторностях. Значение оптической плотности исходного раствора КФ принимали за 100%. Содержание красителя в клетках бактерий вычисляли по формуле:

$$\frac{A_{\text{оп}}}{A_{100}} \times 100,$$

где $A_{\text{оп}}$ — оптическая плотность опытной пробы; A_{100} — оптическая плотность пробы с красителем в отсутствие клеток.

Определение плазмокоагулазной активности *S. aureus* под действием БДХ-ДК

Для определения действия БДХ-ДК на активность образования фермента плазмокоагулазы *S. aureus* ATCC 6538 использовали метод, основанный на образовании фибрина в цитратной плазме кролика под воздействием фермента [11]. Цитратную плазму разводили 0,9% раствором NaCl в соотношении 1 : 5, к 0,5 мл полученного раствора добавляли исследуемое соединение в соотношении 1 : 1 в субстатической (1 мкг/мл) и статической (2 мкг/мл) концентрациях и инокулят стафилококка (10^5 КОЕ/мл), инкубировали 3 ч при 37°C, затем определяли оптическую плотность образовавшегося сгустка фибрина на фотометре «Эксперт-003». Отсутствие свертывания плазмы на протяжении 24 ч оценивали как отрицательный результат реакции. Положительным результатом реакции считали образование сгустков фибрина. Контролем служила плазма с инокулятом без ДК. Для подсчета выживших клеток при действии разных концентраций исследуемого соединения делали высевы на мясо-пептонный агар. Определяли удельную активность образования фермента ($A_{\text{уд}}$) по формуле:

$$A_{\text{уд}} = \frac{A_i}{K_i},$$

где A_i — значение оптической плотности образовавшегося сгустка; K_i — количество выживших клеток, которое выражали в виде десятичного логарифма (lg).

Выделение плазмиды pBR322

Выделение плазмидной ДНК pBR322 осуществляли из клеток *E. coli*, которые ранее подвергались трансформации¹.

Бактериальные клетки ресуспензировали в трис-ацетатном буфере, содержащем РНКазу А (250 мкл). К полученной суспензии добавляли 250 мкл буферного раствора NaOH/SDS (додецилсульфат натрия), в котором разрушались при активном перемешивании компоненты клеточной стенки, приводя к лизису клетки и высвобождению клеточных компонентов. Смесь клеток и реагентов перемешивали до тех пор, пока она не становилась прозрачной. К полученному раствору добавляли 250 мкл кислого ацетата калия для нейтрализации, перемешивали до образования творожистой взвеси. Для отделения осадка смесь центрифугировали в течение 10 мин на максимальной скорости. Осуществляли сорбцию ДНК в специальных спин-колонках. После фильтрации раствора промывали колонку, а затем элюировали очищенную ДНК. Концентрацию полученной ДНК определяли на спектрофотометре при 260 нм.

Анализ расщепления плазмидной ДНК

Способность БДХ-ДК индуцировать повреждение ДНК была проанализирована с помощью анализа расщепления плазмиды pBR322 [12].

1 мкг плазмидной ДНК разводили в 6 мкл воды. К пробам добавляли 14 мкл раствора вещества в диметилсульфоксиде таким образом, чтобы его итоговые концентрации составляли 0,125; 0,25; 0,5; 1 и 2 мМ. Суммарный объем пробы составлял 20 мкл, а концентрация ДМСО — 70%. Пробы инкубировали при 37°C в термостате в течение 16 ч [12].

Анализировали состояние плазмидной ДНК с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Снимки были сделаны с помощью системы ChemiDoc MP system («BioRad»). Эксперименты проводили в 3 повторностях.

В качестве сравнения было взято вещество, вызывающее разрывы в ДНК — эндиин, синтезированный в Институте химии СПбГУ [12].

Определение острой токсичности БДХ-ДК

Острую токсичность исследуемого соединения определяли в опытах на белых нелинейных мышцах-самцах массой 20–25 г. БДХ-ДК вводили однократно, перорально и внутривенно в интервале доз 50–2000 мг/кг в виде водной суспензии с использованием в качестве солюбилизатора Твина-80. Выживаемость животных определяли, наблюдая за ними в течение 14 дней от момента введения исследуемых соединений. Регистрировали развитие

основных симптомов и время гибели животных в течение 24 ч. Расчет средней летальной дозы (LD_{50}) ДК проводили по экспресс-методу В.Б. Прозоровского [13]. Степень токсичности соединения определяли по классификации Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова [14–16].

Результаты и обсуждение

Влияние БДХ-ДК на проницаемость бактериальной мембраны

Из данных литературы известно, что производные ксантона, проявляющие антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий, нарушают проницаемость их цитоплазматической мембраны [17–21].

Данный механизм был доказан в исследованиях, которые проводили с использованием флюоресцентного метода с пропидием йодидом и с помощью реагента SYTOX Green. Реагент SYTOX Green и пропидий йодид не способны проникать в живые клетки с неповрежденными цитоплазматическими мембранами, но легко проникают в клетки с поврежденными мембранами. В экспериментах с пропидием йодидом было доказано, что природный ксантон — α -мангостин, выделенный из *Garcinia mangostana*, и его полусинтетические производные повреждают мембраны клеток *S. aureus*, приводя к потере внутриклеточных компонентов [17, 19, 20]. При действии ксантонов, полученных химическим синтезом, на *S. aureus* реагент SYTOX Green проникал в бактериальные клетки, что свидетельствовало о повреждении клеточной мембраны *S. aureus* [18, 21].

Для обнаружения повреждения бактериальной мембраны химическими соединениями используют также КФ [10], который относится к ионным основным красителям и используется в методах простого и дифференциального окрашивания прокариотических клеток [22]. КФ плохо проникает через неповрежденную мембрану бактериальных клеток, но лучше проникает в клетки, если их мембрана повреждена [8, 10].

Изменения проницаемости мембраны *S. aureus* оценивали по степени поглощения клетками красителя КФ после обработки БДХ-ДК. Чем больше красителя поглощается клетками, тем выше их проницаемость. В качестве препарата сравнения использовали катионное поверхностно-активное вещество — хлоргексидина биглюконат (ХГБ) в цидных для *S. aureus* концентрациях 2–250 мкг/мл, действующий на проницаемость мембран микробных клеток [23].

При воздействии ДК в концентрациях, ингибирующих размножение *S. aureus* (2–250 мкг/мл), процентное содержание КФ в бактериальных клетках достоверно увеличивалось по сравнению с контролем (рис. 2).

¹ Lysis of bacterial cell for plasmid purification.
URL: <https://www.csun.edu/~11656883/labs/instruction2.pdf>

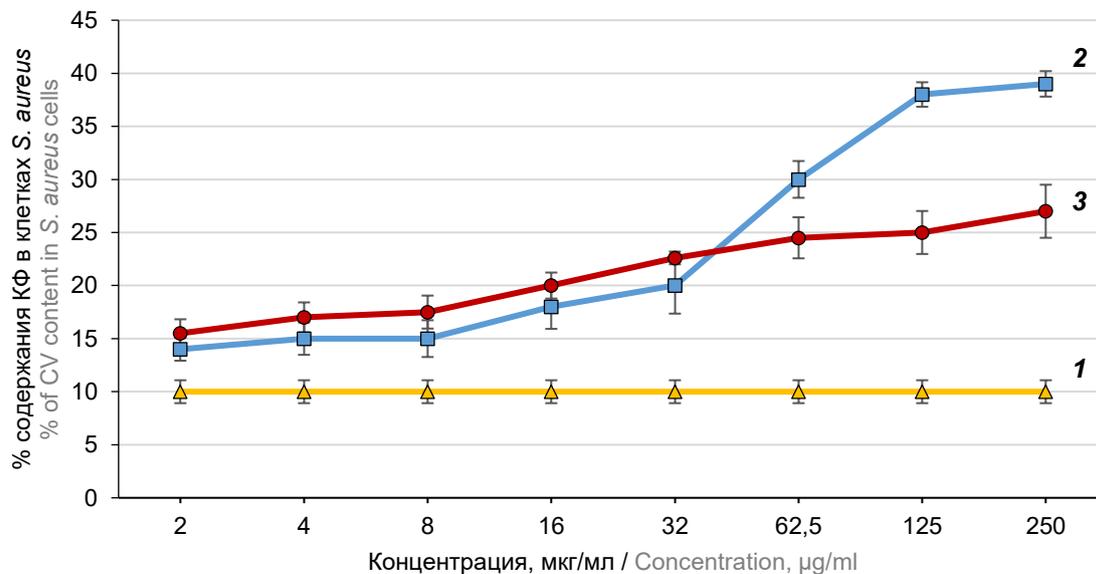


Рис. 2. Сравнительная характеристика интенсивности поглощения КФ клетками *S. aureus* при действии БДХ-ДК.

1 — контроль; 2 — хлоргексидина биглюконат; 3 — ДК.

Fig. 2. Comparative characteristics of the intensity of absorption of crystal violet (CV) by *S. aureus* cells under the action of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone.

1 — control; 2 — chlorhexidine bigluconate; 3 — dihydroxanthone.

При сравнении действия БДХ-ДК и ХГБ показано, что интенсивность поглощения КФ клетками *S. aureus* при ингибирующих концентрациях ДК (2–32 мкг/мл) была сопоставима с эффектом ХГБ (рис. 2).

Таким образом, при действии БДХ-ДК на клетки *S. aureus* достоверно увеличивалась интенсивность поглощения красителя КФ. Процент поглощения зависел от концентрации соединения: чем выше действующая концентрация ДК, тем выше процент поглощения красителя (рис. 2).

При исследовании антибактериальной активности 4,4a-ДК установлено, что данные соединения эффективны в отношении грамположительных бактерий и малоактивны в отношении грамотрицательных [6].

Для сравнения результатов интенсивности поглощения красителя клетками грамположительной культуры *S. aureus* и грамотрицательной *E. coli* культуру *E. coli* также подвергали действию разных концентраций БДХ-ДК. В качестве контроля использовали клетки *E. coli*, не подвергшиеся действию исследуемых веществ.

ДК в цидной для *E. coli* концентрации (250 мкг/мл) практически не вызывал повышения поглощения красителя клетками по сравнению с контролем. При воздействии ХГБ на клетки *E. coli* в цидных концентрациях 32; 62,5; 125 и 250 мкг/мл процентное содержание КФ в клетках достоверно увеличилось с 6% (контроль) до 10, 11, 15 и 17% соответственно, что свидетельствовало о повышении проницаемости бактериальных клеток под действием ХГБ (рис. 3).

Полученные данные свидетельствует о том, что мембрана *E. coli* не подвергается действию ДК.

Увеличение интенсивности поглощения красителя КФ клетками *S. aureus* при воздействии БДХ-ДК может быть свидетельством повышения проницаемости его цитоплазматической мембраны. На основании этих результатов можно считать, что вероятной мишенью действия БДХ-ДК является цитоплазматическая мембрана стафилококка.

Определение влияния БДХ-ДК на плазмокоагулазную активность *S. aureus*

Плазмокоагулаза — фермент, вызывающий свёртывание плазмы крови, является фактором патогенности стафилококков [24]. Для определения действия БДХ-ДК на активность образования фермента плазмокоагулазы *S. aureus* в плазму крови добавляли суспензию бактериальных клеток (10^5 КОЕ/мл) и ДК в концентрациях 1 мкг/мл (субстатической) и 2 мкг/мл (статической), инкубировали 3 ч при 37°C. Образование сгустков наблюдали во всех образцах, но интенсивность их была разной.

Интенсивность образования сгустков белков плазмы зависела от концентрации ДК и количества выживших клеток *S. aureus*. Чем больше оставалось живых клеток после действия ДК, тем выше была оптическая плотность (A_{λ}) сгустков белков плазмы. При концентрациях ДК 2 и 1 мкг/мл количество выживших клеток (K_1) составляло 10^3 и 10^5 КОЕ/мл соответственно (таблица).

Удельная активность образования фермента ($A_{уд}$) в присутствии исследуемых концентраций

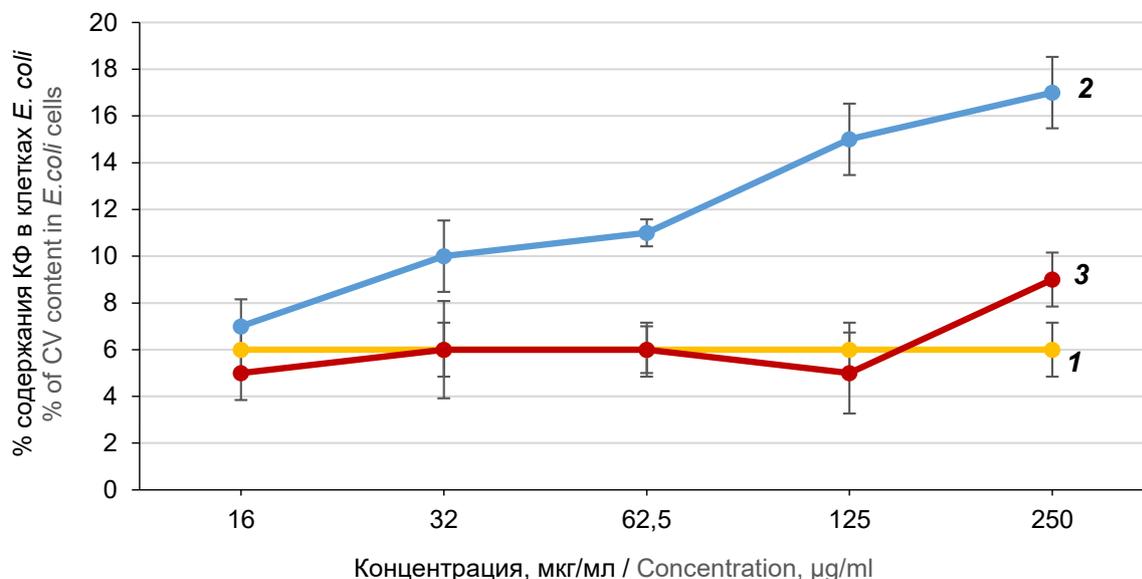


Рис. 3. Сравнительная характеристика интенсивности поглощения КФ клетками *E. coli* при действии БДХ-ДК.
1 — контроль; 2 — хлоргексидина биглюконат; 3 — ДК.

Fig. 3. Comparative characteristics of the intensity of absorption of crystal violet (CV) by *E. coli* cells under the action of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone.
1 — control; 2 — chlorhexidine bigluconate; 3 — dihydroxanthone.

ДК и в контроле оказалась на одном уровне — 0,04 (таблица).

Установлено, что ДК не влияет непосредственно на плазмокоагулазную активность стафилококка, которая зависела от концентрации выживших клеток.

Исследование действия БДХ-ДК на бактериальную ДНК

Способность БДХ-ДК вызывать разрывы в молекулах ДНК была проанализирована с помощью анализа расщепления плазмиды pBR322 [12].

При действии БДХ-ДК в концентрации 1 мМ (384 мкг/мл) на плазмидную ДНК pBR322 происходило уменьшение фракции сверхспирализованной ДНК и увеличение фракции плазмидной ДНК в ослабленной конформации, что свидетельствовало о появлении однопочечных разрывов в молекулах плазмидной ДНК. Препарат сравнения эндин вызывал разрывы в плазмидной ДНК в значительно более низкой концентрации — 0,125 мМ (рис. 4).

Таким образом, БДХ-ДК вызывает разрывы в плазмидной ДНК в очень высокой концентрации: 1 мМ или 384 мкг/мл и выше, что свидетельствует о слабом повреждающем действии соединения на бактериальную ДНК.

Определение острой токсичности БДХ-ДК

БДХ-ДК вводили мышам перорально и внутрибрюшинно [13]. При пероральном введении соединения LD_{50} составила 1710 ± 170 мг/кг, при внутрибрюшинном — $116,9 \pm 13,3$ мг/кг. Таким образом, установлено, что БДХ-ДК по классификации Hodge и Sterner [14, 16] и классификации К.К. Сидорова [15, 16] относится к малотоксичным соединениям.

Заключение

Впервые были проведены углублённые исследования возможного механизма действия нового синтетического биологически активного соединения из группы 4,4а-ДК — БДХ-ДК. Установлено, что вероятной мишенью действия БДХ-ДК в клет-

Удельная активность образования фермента ($A_{уд}$) при разных концентрациях БДХ-ДК

Specific activity of enzyme formation (A_s) at different concentrations of 5-bromo-4,4-dimethyl-7-chloro-4,4a-dihydroxanthone

Вариант опыта / Experiment design	A_i	K_i	$A_{уд} / A_s$
Плазма крови + суспензия <i>S. aureus</i> (10^5 КОЕ/мл) + ДК (2 мкг/мл) Blood plasma + <i>S. aureus</i> suspension (10^5 CFU/ml) + dihydroxanthone (2 µg/ml)	0,114	10^3	0,038
Плазма крови + суспензия <i>S. aureus</i> (10^5 КОЕ/мл) + ДК (1 мкг/мл) Blood plasma + <i>S. aureus</i> suspension (10^5 CFU/ml) + dihydroxanthone (1 µg/ml)	0,2	10^5	0,04
Контроль / Control	0,21	10^5	0,042

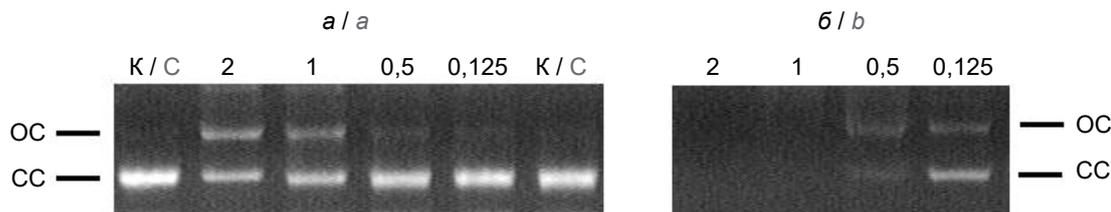


Рис. 4. Электрофореграммы плазмидной ДНК pBR322 после инкубирования в присутствии различных концентраций (мМ) ДХ (а) и ендиина (б).

CC — фракция сверхспирализованной ДНК; OC — фракция плазмидной ДНК в расслабленной конформации; К — контроль.

Fig. 4. Electrophoregrams of pBR322 plasmid DNA after incubation in the presence of various concentrations (mM) of dihydroxanthone (a) and enediine (b).

CC — fraction of supercoiled DNA; OC — fraction of plasmid DNA in a relaxed conformation; C — control.

ках *S. aureus* является цитоплазматическая мембрана. БДХ-ДК не влиял на процесс синтеза белка, а именно на активность фермента плазмокоагулазы. Соединение не оказывало выраженного повреждающего действия на бактериальную ДНК. Установлено, что БДХ-ДК относится к малотоксичным соединениям. Данных о механизмах антимикробной активности соединений группы 4,4а-ДК в доступной литературе мы не обнаружили.

Таким образом, определён возможный механизм антибактериального действия синтетического производного 4,4а-ДК — БДХ-ДК. Данное соединение можно рекомендовать для дальнейших исследований в целях использования в качестве активной фармацевтической субстанции в составе антимикробного лекарственного препарата.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Pinto M.M.M., Sousa M.E., Nascimento M.S.J. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12(21): 2517–38. <https://doi.org/10.2174/092986705774370691>
- Masters K. S., Bräse S. Xanthenes from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis. *Chem. Rev.* 2012; 112(7): 3717–76. <https://doi.org/10.1021/cr100446h>
- Chernov N.M., Shutov R.V., Sharoyko V.V., Kuz'mich N.N., Belyakov A.V., Yakovlev I.P. Synthetic route to 4,4а- and 3,4-dihydroxanthone through [4+2] cycloaddition and base-assisted sigmatropic rearrangement. *Eur. J. Org. Chem.* 2017; (19): 2836–41. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700310>
- Фролова В.В., Гурина С.В., Чернов Н.М., Яковлев И.П. Перспективы создания новых производных ксантона в качестве противомикробных средств. В кн.: *Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации»*. СПб.; 2018: 420–3.
- Фролова В.В., Гурина С.В., Чернов Н.М., Яковлев И.П. Взаимосвязь между строением новых производных дигидроксантона и их противомикробной активностью. В кн.: Щастной А.Т., ред. *Материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»*. Витебск; 2019: 30–3.
- Фролова В.В., Гурина С.В., Чернов Н.М., Яковлев И.П. 4,4а-Дигидроксантоны как перспективные соединения для создания новых антимикробных препаратов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; 64(11-12): 3–7. <https://doi.org/10.1016/0235-2990-2019-64-11-12-3-7>
- Maillard J.Y. Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92(Suppl.): 16–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
- Li N., Tan S., Cui J., Guo N., Wang W., Zu Y.G., et al. PA-1, a novel synthesized pyrrolizidine alkaloid, inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2014; 67(10): 689–96. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.49>
- Ko S.J., Kim M.K., Bang J.K., Seo C.H., Luchian T., Park Y. Macropis fulvipes venom component macropin exerts its antibacterial and anti-biofilm properties by damaging the plasma membranes of drug resistant bacteria. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16580. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16784-6>
- Halder S., Yadav K. K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Halder S., et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus*. 2015; 4: 672. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>
- МЗ РФ. *Государственная фармакопея Российской Федерации: Том I*. М.; 2018: 1167–8.
- Lyapunova A.G., Danilkina N.A., Rumyantsev A.M., Khlebnikov A.F., Chislov M.V., Starova G.L., et al. Relative reactivity of benzothioephene-fused enediyne in the Bergman cyclization. *J. Org. Chem.* 2018; 83(5): 2788–801. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b03258>
- Прозоровский В.Б., Прозоровский М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. *Фармакология и токсикология*. 1978; 41(4): 407–509.
- Hodge H.C., Sterner J.H. Tabulation of toxicity classes. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1949; 10(4): 93–6. <https://doi.org/10.1080/00968204909344159>
- Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. В кн.: Саночки И.В., ред. *Токсикология новых промышленных химических веществ: сборник статей. Выпуск 13*. М.: Медицина; 1973: 47–51.
- Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37(3): 32–4.
- Koh J.J., Qiu S., Zou H., Lakshminarayanan R., Li J., Zhou X., et al. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828(2): 834–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.09.004>
- Zou H., Koh J.J., Li J., Qiu S., Aung T.T., Lin H., et al. Design and synthesis of amphiphilic xanthone-based, membrane-targeting antimicrobials with improved membrane selectivity.

- J. Med. Chem.* 2013; 56(6): 2359–73.
<https://doi.org/10.1021/jm301683j>
19. Koh J.J., Zou H., Mukherjee D., Lin S., Lim F., Tan J.K., et al. Amphiphilic xanthenes as a potent chemical entity of antimycobacterial agents with membrane-targeting properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2016; 123: 684–703.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.068>
20. Koh J.J., Zou H., Lin S., Lin H., Soh R.T., Lim F.H., et al. Nonpeptidic amphiphilic xanthone derivatives: structure–activity relationship and membrane-targeting properties. *J. Med. Chem.* 2016; 59(1): 171–93.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01500>
21. Lin S., Koh J.J., Aung T.T., Lim F., Li J., Zou H., et al. Symmetrically substituted xanthone amphiphiles combat gram-positive bacterial resistance with enhanced membrane selectivity. *J. Med. Chem.* 2017; 60(4): 1362–78.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01403>
22. Зелди М.И. *Характеристика новых четвертичных соединений пиридинового ряда как перспективных антибактериальных агентов*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Казань; 2019.
23. Зверьков А.В., Зузова А.П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15(4): 279–85.
24. Литусов Н.В. *Грамположительные аэробные кокки. Иллюстрированное учебное пособие*. Екатеринбург; 2016.
7. Maillard J.Y. Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92(Suppl.): 16–27.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
8. Li N., Tan S., Cui J., Guo N., Wang W., Zu Y.G., et al. PA-1, a novel synthesized pyrrolizidine alkaloid, inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2014; 67(10): 689–96.
<https://doi.org/10.1038/ja.2014.49>
9. Ko S.J., Kim M.K., Bang J.K., Seo C.H., Luchian T., Park Y. Macropis fulvipes venom component macropin exerts its antibacterial and anti-biofilm properties by damaging the plasma membranes of drug resistant bacteria. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16580.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16784-6>
10. Halder S., Yadav K. K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Halder S., et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus*. 2015; 4: 672.
<https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>
11. Ministry of Health of the Russian Federation. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation: Volume 1 [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii: Tom 1]*. Moscow; 2018: 1167–8. (in Russian)
12. Lyapunova A.G., Danilina N.A., Rummyantsev A.M., Khlebnikov A.F., Chislov M.V., Starova G.L., et al. Relative reactivity of benzothiophene-fused enediyne in the Bergman cyclization. *J. Org. Chem.* 2018; 83(5): 2788–801.
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b03258>
13. Prozorovskiy V.B., Prozorovskiy M.P., Demchenko V.M. Express method for determining the average effective dose and its error. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1978; 41(4): 407–509. (in Russian)
14. Hodge H.C., Sterner J.H. Tabulation of toxicity classes. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1949; 10(4): 93–6.
<https://doi.org/10.1080/00968204909344159>
15. Sidorov K.K. Classification of toxicity of poisons in parenteral administration methods. In: Sanotskiy I.V., ed. *Toxicology of New Industrial Chemicals: A Collection of Articles. Issue 13 [Toksikologiya novykh promyshlennykh khimicheskikh veshchestv: sbornik statey. Vypusk 13]*. Moscow: Meditsina; 1973: 47–51. (in Russian)
16. Berezovskaya I.V. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2003; 37(3): 139–41.
17. Koh J.J., Qiu S., Zou H., Lakshminarayanan R., Li J., Zhou X., et al. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828(2): 834–44.
<https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.09.004>
18. Zou H., Koh J.J., Li J., Qiu S., Aung T.T., Lin H., et al. Design and synthesis of amphiphilic xanthone-based, membrane-targeting antimicrobials with improved membrane selectivity. *J. Med. Chem.* 2013; 56(6): 2359–73.
<https://doi.org/10.1021/jm301683j>
19. Koh J.J., Zou H., Mukherjee D., Lin S., Lim F., Tan J.K., et al. Amphiphilic xanthenes as a potent chemical entity of antimycobacterial agents with membrane-targeting properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2016; 123: 684–703.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.068>
20. Koh J.J., Zou H., Lin S., Lin H., Soh R.T., Lim F.H., et al. Nonpeptidic amphiphilic xanthone derivatives: structure–activity relationship and membrane-targeting properties. *J. Med. Chem.* 2016; 59(1): 171–93.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01500>
21. Lin S., Koh J.J., Aung T.T., Lim F., Li J., Zou H., et al. Symmetrically substituted xanthone amphiphiles combat gram-positive bacterial resistance with enhanced membrane selectivity. *J. Med. Chem.* 2017; 60(4): 1362–78.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01403>

REFERENCES

22. Zeldi M.I. *Characteristics of new Quaternary pyridine compounds as promising antibacterial agents*: Diss. Kazan'; 2019. (in Russian)
23. Zver'kov A.V., Zuzova A.P. Chlorhexidine: past, present, and future of the famous antiseptic agent. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2013; 15(4): 279–85. (in Russian)

24. Litusov N.V. *Gram-Positive Aerobic Cocci. Illustrated Tutorial [Grampolozhitel'nye aerobnye kokki. Illyustrirovannoe uchebnoe posobie]*. Ekaterinburg; 2016. (in Russian)

Информация об авторах

Фролова Валерия Владимировна[✉] — ассистент каф. фармацевтической химии СПбХФУ, Санкт-Петербург, Россия, zhilyaeva.valeriya@pharminnotech.com, <https://orcid.org/0000-0003-0463-883X>

Чернов Никита Максимович — к.х.н., с.н.с. каф. органической химии СПбХФУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1278-8109>

Ивкин Дмитрий Юрьевич — к.б.н., доцент каф. фармакологии и клинической фармакологии, директор Центра экспериментальной фармакологии СПбХФУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>

Румянцев Андрей Михайлович — к.б.н., м.н.с. каф. генетики и биотехнологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>

Гурина Светлана Владимировна — к.б.н., доцент каф. микробиологии СПбХФУ, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4072-405X>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 03.04.2021;
принята к публикации 12.06.2021;
опубликована 30.10.2021

Information about the authors

Valeriya V. Frolova[✉] — assistant, Department of pharmaceutical chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, zhilyaeva.valeriya@pharminnotech.com, <https://orcid.org/0000-0003-0463-883X>

Nikita M. Chernov — Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, Department of organic chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1278-8109>

Dmitry Yu. Ivkin — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of pharmacology and clinical pharmacology, Director, Center for experimental pharmacology, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>

Andrey M. Rumyantsev — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Department of genetics and biotechnology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>

Svetlana V. Gurina — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of microbiology, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4072-405X>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 03.04.2021;
accepted for publication 12.06.2021;
published 30.10.2021