

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

БАХНІВСЬКА ТЕТЯНА ПАВЛІВНА

Допускається до захисту:
в.о. завідувача кафедри
біофізичної хімії, фізики і
педагогіки,
канд. хім. наук, доцент
Юлія ЛЕСИШИНА
«__» _____ 2024 р.

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ 4-МЕТИЛКУМАРИНІВ

Спеціальність 102 Хімія

Кваліфікаційна робота магістра

Науковий керівник:

Юлія ЛЕСИШИНА, в.о. завідувача кафедри

біофізичної хімії, фізики і педагогіки,

канд. хім. наук, доцент

Оцінка: _____ / _____ /

(бали/за шкалою ЄКТС/за
національною шкалою)

Голова ЕК: _____

Вінниця 2024

АНОТАЦІЯ

Бахнівська Т.П. Антиоксидантна активність 4-метилкумаринів. Спеціальність 102 Хімія, освітня програма «Хімія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2024.

У кваліфікаційній роботі досліджені антиоксидантні властивості трьох синтетичних *ortho*-дигідрокси-4-метилкумарину: 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину, 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину, 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину. Визначення антиоксидантної активності кумаринів проводили *in vitro* за методиками, що базуються на реакціях відновлення стабільного вільного радикала 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразилу і катіон-радикала 2,2-азино-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти) фенольними антиоксидантами. Встановлено, що досліджувані сполуки є ефективними антиоксидантами.

Ключові слова: 4-метилкумарини, антиоксидантна активність, DPPH, ABTS⁺.

Табл. 3, Рис. 13, Бібліограф.: 46 найм.

Bakhnivska Tetiana Antioxidant activity of 4-methylcoumarins. Specialty 102 Chemistry, Educational program «Chemistry». Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2024.

The qualification work investigated the antioxidant properties of three synthetic *ortho*-dihydroxy derivatives of 4-methylcoumarin: 6,7-dihydroxy-4-hydroxymethylcoumarin, 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin, 7,8-dihydroxy-4-hydroxymethylcoumarin. The determination of the antioxidant activity of coumarins was carried out *in vitro* using methods based on the reduction reactions of the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and the radical cation of 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) with phenol antioxidants. It was established that the investigated compounds are effective antioxidants.

Key words: 4-methylcoumarins, antioxidant activity, DPPH, ABTS⁺.

Table 3, Fig. 13, Bibliographer: 46 names.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1. Біологічна дія кумаринів	8
1.1. Фармакологічна активність кумаринів	8
1.2 Токсичність кумаринів.....	17
1.3. Антиоксидантна активність кумаринів.....	21
1.3.1. Механізми антиоксидантної активності фенольних сполук у біологічних системах і методики її дослідження.....	21
1.3.2. Антиоксидантна активність 4-метилкумаринів і її кількісна оцінка <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>.....	25
РОЗДІЛ 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	30
2.1 Об'єкти та матеріали дослідження.....	30
2.2 Підготовка реактивів	30
2.3 Визначення антиоксидантної/антирадикальної активності	31
РОЗДІЛ 3 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	34
3.1 Антирадикальна активність <i>орто</i>-дигідроксипохідних 4-метилкумарину в реакції з дифенілпікрилгідразилом.....	34
3.2 Антирадикальна активність <i>орто</i>-дигідроксипохідних 4-метилкумарину в реакції з катіон-радикалом <i>ABTS</i>^{•+}.....	38
3.3 Визначення хелатуючої здатності кумаринів по відношенню	44
до іонів <i>Fe</i>²⁺.....	44
ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

BSEP – біліарний каналікулярний експортер жовчі;

CYP2A6 – фермент, який належить до сімейства цитохромів P450;

DCF – 2',7'-Дихлорофлуоресцеїн;

ED₅₀ – доза, яка є ефективною для 50% випробуваних організмів у відповідному дослідженні;

EC₅₀ – концентрація речовини, яка викликає зменшення кількості радикала на 50%;

IL-4 – інтерлейкін 4;

INF – інтерферон;

INR – міжнародне нормалізоване відношення;

LC₅₀ – концентрація речовини, яка є смертельною для 50% експериментальних організмів протягом певного періоду часу;

LD₅₀ – летальна доза, яка призводить до смерті у 50% випробуваних організмів;

MRP2 – білок 2, пов'язаний із множинною резистентністю

NOS – синтаза оксиду азоту;

SULT2A1 – ген, який кодує фермент сульфотрансферазу 2A1;

TNBS – тринітробензолсульфонат;

AAPH – 2,2-азобіс-(2-амідинопропан) дихлорид;

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини;

ДФПГ – 2,2-дифеніл-1-пікріл-гідразил;

ЗЗК – запальні захворювання кишечника;

ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності;

ОС – оксидативний стрес;

ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2;

ВСТУП

Актуальність теми: Кумарини складають великий клас природних низькомолекулярних поліфенольних сполук, які розповсюджені у рослинному світі і характеризуються численними фармакологічними ефектами: спазмолітичним, коронаророзширювальним, фотосенсибілізуючим; протизапальним; протиалергічним та ін. Ці властивості кумаринів широко досліджені як *in vitro*, так *in vivo*, а деякі природні або синтетичні похідні кумаринів знайшли застосування у фармацевтичній промисловості.

У багатьох біологічних системах була виявлена антиоксидантна активність кумаринів і їх похідних; доведено, що антиоксидантні властивості кумаринів в значному ступені залежать від їх хімічної структури.

Встановлено, що незаміщені кумарини в процесі метаболізму в організмі людини можуть утворювати епоксиди 3,4-метилкумарину, які вважаються мутагенними. В той же час синтетичні 4-метилкумарини не є субстратами монооксигенази печінки P450, яка каталізує реакцію утворення епоксидів, і, відповідно, можуть бути кращими кандидатами для застосування на практиці як компоненти фармацевтичних препаратів або антиоксиданти.

Об'єкт дослідження: *Орто*-дигідроксипохідні 4-метилкумарину: 6,7-дигідрокси-4-метилкумарин, 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин, 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметил-кумарин.

Предмет дослідження: Антиоксидантна активність *орто*-дигідроксипохідних 4-метилкумарину: 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину, 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину, 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

Мета дослідження: *in vitro* оцінити антиоксидантні властивості синтетичних похідних 4-метилкумарину в реакціях їх взаємодії з вільними радикалами (антирадикальна дія) і зв'язування металів зі змінною валентністю (хелатуюча дія).

Завдання дослідження:

- вивчити антирадикальну активність 4-метилкумаринів в реакції з вільним стабільним радикалом дифенілпікрилгідрозилом (*DPPH*[•]) і попередньо генерованим катіон-радикалом 2,2-азино-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти) (*ABTS*^{•+});
- дослідити антирадикальну активність кумаринів способом радикал-відновлювального інгібування катіон-радикалу *ABTS*^{•+} і визначити кінетичні параметри цієї реакції – період індукції і швидкість зародження радикалів *ABTS*^{•+}.
- визначити хелатуючу здатність кумаринів по відношенню до іонів *Fe*²⁺.

Методи дослідження: кінетичні методи вивчення радикальних і радикально-ланцюгових процесів. УФ-видима спектроскопія.

Наукова новизна дослідження. Вперше проведені систематичні дослідження оцінки антиоксидантних властивостей синтетичних *орто*-дигідроксипохідних 4-метилкумарину: 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину, 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину, 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

Практичне значення отриманих результатів.

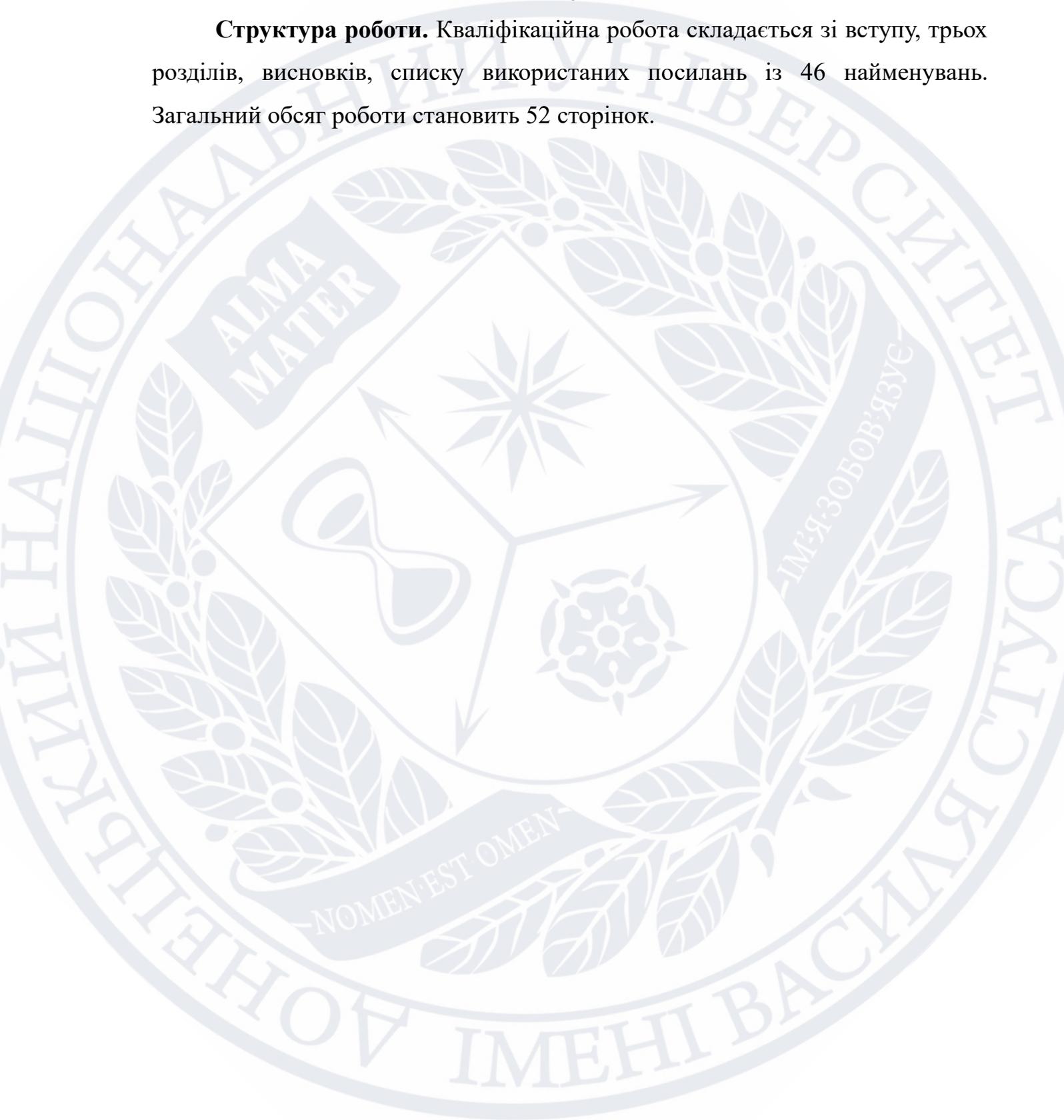
Орто-дигідроксипохідні 4-метилкумарину на відміну від незаміщених кумаринів не утворюють токсичних метаболітів в процесі деградації в організмі людини. За своєю антиоксидантною активністю досліджувані сполуки не поступаються типовим фенольним сполукам природного походження (феноловим кислотам, флавоноїдам та ін.).

Апробація результатів дослідження.

1. Бахнівська Т.П., Лесишина Ю.О., Цяпало О.С. Визначення антиоксидантної ефективності дигідроксипохідних 4-метилкумарину // Current chemical problems (CCP-2024): book of abstracts of the VII International (XVII Ukrainian) scientific conference for students and young scientists, March 19–

21, 2024, Vinnytsia / Vasyl' Stus Donetsk National University; editorial board: O. M. Shendrik (editor-in-chief) [et al.]. Vinnytsia, 2024. P. 28

Структура роботи. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних посилань із 46 найменувань. Загальний обсяг роботи становить 52 сторінок.

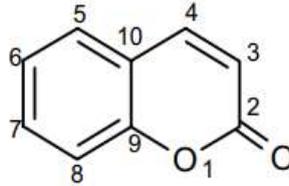


РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

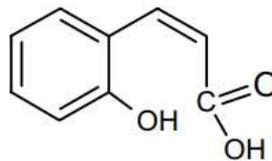
1. Біологічна дія кумаринів

1.1. Фармакологічна активність кумаринів

Кумарини – це природні сполуки, в основі будови яких лежить скелет бензо- α -пірону (лактон *цис-о*-гідроксикоричної кислоти).



9,10-Бензо- α -пірон (кумарин)



Цис-о-гідроксикорична кислота (*о*-кумарова кислота)

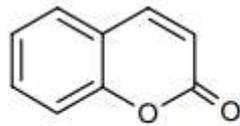
Кумарин – родоначальник цієї групи сполук – вперше було виділено Фогелем у 1820 р. із плодів південноамериканського дерева тонко (*Dipterix odorata*, род. *Fabaceae*). Свою назву кумарин отримав від місцевої назви цього дерева – «*coumarouna*» [1].

Будова і класифікація природних кумаринів

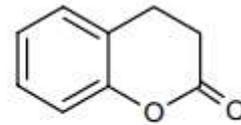
Структуру кумарину як лактону *о*-кумарової кислоти була визначено не одразу, але проведений синтез кумарину із саліцилового альдегіду з малоновою кислотою вказав на його зв'язок з *о*-гідроксикоричною кислотою.

Природні кумарини в залежності від їх хімічної будови поділяють на такі групи:

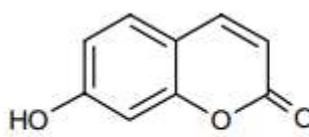
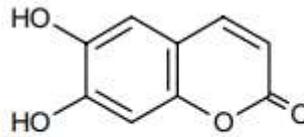
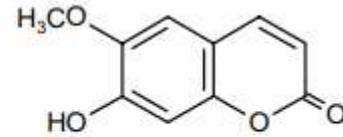
1. Прості кумарини. Ці сполуки виявлені у траві буркуну лікарського (*Melilotus officinalis*, *Fabaceae*).



Кумарин

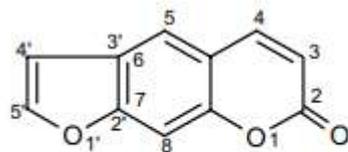
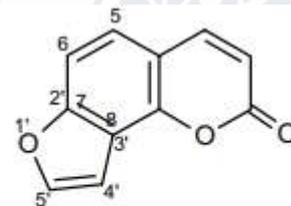
Дигідрокумарин
(мелілотин)

2. Гідрокси-, метокси (алкокси-) та метилендигідроксикумарини. Замісники можуть бути як у бензольному, так і в піроновому кільці та водночас в обох кільцях.

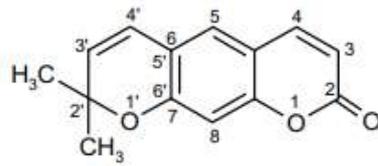
Умбеліферон
(7-гідроксикумарин)Ескулетин
(6,7-дигідроксикумарин)Фраксетин
(6-метокси-7,8-дигідроксикумарин)

Найбільш поширені ці сполуки в рослинах родин *Apiaceae* та *Rutaceae*

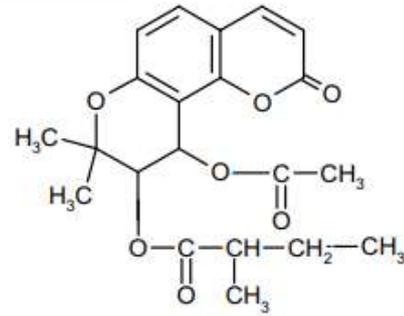
3. Фурокумарини, або кумарон- α -пірони. Це сполуки, які утворюються в результаті конденсації фуранового кільця з кумариновим ядром в 6,7-положенні (похідні псоралену) або в 7,8-положеннях (похідні ангеліцину). Щодо замісників, то вони можуть знаходитися в усіх трьох кільцях.

Псорален
(фуру-2',3': 6,7-кумарин)Ангеліцин (ізопсорален)
(фуру-2',3': 7,8-кумарин)

4. Піранокумарини, або хромено- α -пірони. Утворюються в результаті конденсації кумарину з 2г,2г-диметилпіраном у положеннях 5,6; 6,7 або 7,8 і можуть мати замісники в усіх кільцях.

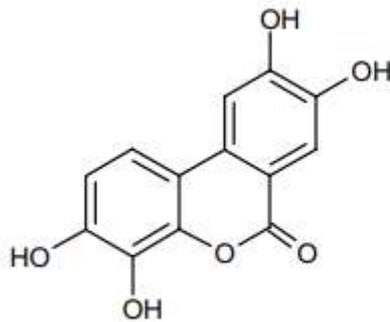


2',2'-Диметилксантилетин

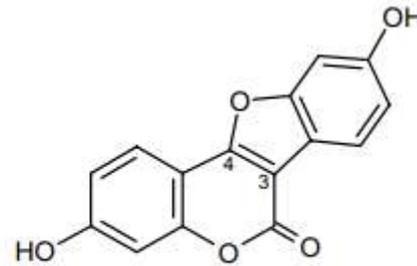


Віснадін

5. Бензокумарини, які містять бензольне кільце, сконденсоване з кумарином у 3,4-положенні, зустрічаються в рослинах родин *Anacardiaceae*, *Rosaceae*. Гідроксильне похідне 3,4-бензокумарину є структурним фрагментом елагової кислоти.



Гідроксильне похідне 3,4-бензокумарину



Куместрол

6. Кумаринові сполуки, які містять систему бензофурану, сконденсовану з кумарином в 3,4-положенні (куместроли). Виділені з різних видів конюшини *Trifolium spp.*, *Fabaceae*. У природі зустрічаються також інші сполуки, які містять кумаринове угруповання і мають більш складну будову. Кумарини різних класів виявляють різноманітну біологічну активність, що як правило обумовлено їх хімічною будовою і впливає на їхні фізико-хімічні властивості та фармакологічне застосування [2].

Основні фармакологічні ефекти кумаринів наведені нижче.

Терапевтичне застосування кумаринів при запальних захворюваннях.

Фурукумарини продемонстрували терапевтичний ефект проти набряку, видаляючи білки та рідину з ушкоджених тканин шляхом активації таких механізмів, як фагоцитоз, вивільнення ферментів і протеоліз. Показано, що імператорин має протизапальну дію на стимульовані ліпополісахаридом

макрофаги миші (RAW264.7) у моделі набряку *in vitro*, оскільки він пригнічує експресію білка синтази оксиду азоту (NOS) і циклооксигенази-2 (ЦОГ-2). Виявлено протизапальну та імуномодулюючу дію терпеноїдних кумаринів (умбеліпреніну та метилгальбанату) *in vivo* та *in vitro*, демонструючи проліферативні ефекти та вивільнення інтерлейкіну 4 (IL-4) та інтерферону (INF)- γ при інгібування ЦОГ-2 [3].

Кумарини при запальних захворюваннях кишечника.

Нові підходи були спрямовані на використання кумаринів та їх похідних у фармацевтичній практиці через їх антиоксидантну та протизапальну дію. Ці сполуки використовують для додаткової терапії при запальних захворюваннях кишечника (ЗЗК), оскільки вони модулюють сигнальні шляхи, що створюють захисні ефекти проти запалення кишечника та окисного стресу (ОС), характерних аспектів захворювання.

Паепалантин (рис. 1А) є похідним кумарину, що виділили з бразильської ендемічної рослини *Paepalanthus bromelioides* ботанічної родини *Eriocalulaceae*.

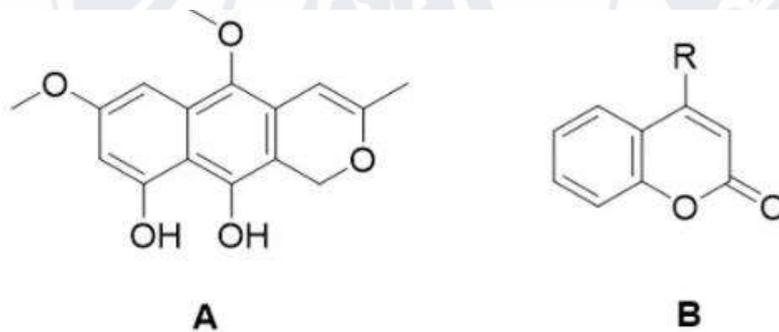


Рис 1. Хімічна структура паепалантину (А) (9,10-дигідрокси-5,7-диметокси-1Н-напто(2,3с)піран-1-он) і кумарину (R=H) і 4-гідроксикумарину, R=ОН (В).

Це був перший ізокумарин, випробуваний на експериментальній мишачій моделі запалення кишечника, і він продемонстрував захисну дію на гостру фазу та фазу рецидиву запалення кишечника, спричиненого 2,4,6-тринітробензолсульфою (TNBS) у щурів. В іншому дослідженні оцінювали активність 4-гідроксикумарину (рис. 1В) у гострій та субхронічній

фазах індукованого TNBS кишкового запалення у щурів із значним пригніченням пошкодження тканин і пошкоджень [4].

Кумарини при ревматоїдному артриті та остеоартриті

Похідні кумарини, виявились ефективними протизапальними засобами, з результатами взаємозв'язку структура-активність (SAR), які показують, що якщо ароматична група прямо зв'язана в позиції 3 основного ядра кумарину, то молекула виявляє протизапальну активність. Прикладом є дослідження, проведене у 2014 році, в якому синтезували та оцінювали дві серії похідних кумарину-бензімідазолу щодо їх протизапальної активності. Результати показали, що сполука 3-(1H-бензо[d]імідазол-2-іл)-6-хлор-2H-хромен-2-он була ідеальним кандидатом для розробки нових протизапальних препаратів для захисту слизової оболонки шлунка, корисних у лікуванні ревматоїдного артрити та остеоартрити [5].

Кумарини при серцево-судинних захворюваннях

Кумарини з різними гетероциклами, що базуються на циклізації 2-етокси-3-фенілпропанової кислоти та 2-бензилмалонової кислоти, досліджувалися як засоби зниження рівня ліпідів для інгібування утворення атероми, викликаного накопиченням тригліцеридів та холестерину в стінках артерій чи судин, тим самим зменшуючи ризик серцево-судинних захворювань. Кумарин 7,8-дигідрокси-3-(4-метилфеніл) кумарин був оцінений за його здатність знижувати рівень ліпідів у мишиній моделі гіперхолестеринемії і призвів до значущого зниження рівнів холестерину в сироватці крові [6].

Кумарини з антигіпертензивною дією

Деякі похідні кумарину, такі як дигідроммамея, новий кумарин, синтезований із насіння західноафриканського дерева *Mammea africana* (*Sabine*), проявили антигіпертензивні ефекти у ході серії експериментів, використовуючи метанольні та дихлорметанольні екстракти кори стовбура, випробувані на моделі гіпертензії у щурів Вістар, де був продемонстрований терапевтичний ефект. Інший кумарин, скополетин, ізольований з плодів

Tetrapleura tetraptera (Mimosaceae), виявив гіпотензивний ефект в мишиних моделях *in vivo* та *in vitro* через свою дію як міотропний релаксант гладкої мускулатури. Візнадин, кумарин, виявлений у плодах *Ammi visnaga*, має вазодилататорні та коронаротерапевтичні ефекти і є ефективним у лікуванні стенокардії [7].

Кумарини з судинорозширювальною дією

В роботі досліджено вазодилататорні механізми скопарону (6,7-диметоксикумарин), похідної кумарину, яка виявила здатність розширювати аортальні кільця щурів, попередньо скорочені фенілефрином, дозозалежно; ця сполука також призвела до значущого зниження рівнів ліпопротеїнів у плазмі гіперліпідемічних кролів. Висновок був зроблений, що скопарон інгібує механізм дії агоністів, діючи на кальційзалежні канали та пригнічуючи конструктивну відповідь в аортальних кільцях. Результати вказували на те, що скопарон може бути перспективним засобом для розробки та синтезу нових імунодепресантів із вазодилатаційною дією [8].

Кумарини при серцевій недостатності

Показано, що серцева недостатність є фактором ризику при прийомі антикоагулянтів на основі кумарину. Було проведено дослідження з метою визначення того, чи мають пацієнти з серцевою недостатністю перетоксикацію з аценокумаролом та фенпрокумоном (рис.2) у когортному дослідженні. До аналізу включили 1077 пацієнтів, які приймали антикоагулянти на основі кумарину. В результаті було виявлено, що серцева недостатність є незалежним фактором ризику для надмірної антикоагуляції, оскільки у 396 пацієнтів міжнародний нормалізований відносний показник (INR) був більший або рівний 60, тому пацієнтів із серцевою недостатністю слід стежити та оцінювати їх можливі реакції на внутрішнє кровотеча [9].

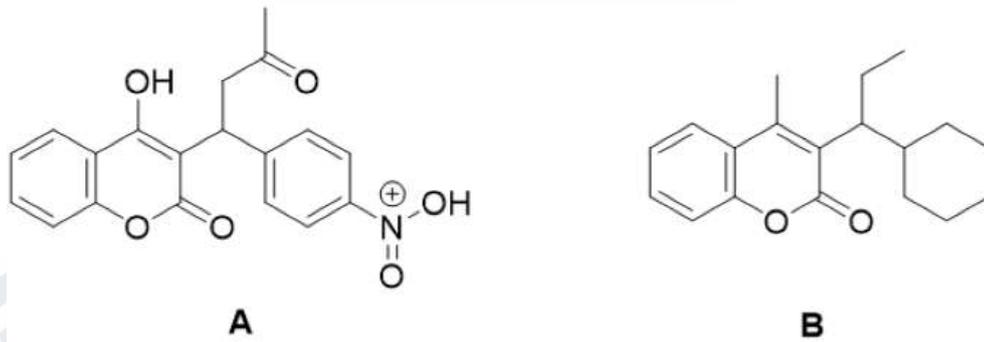


Рис.2 Хімічні структури антикоагулянтів, аценокумарол (А), фенпрокумон (В).

Кумарини для лікування тромбоемболічних станів

Один із кумаринів, що виявив антикоагулянтну активність, – це дикумарол, який відноситься до класифікації бікумаринів. Встановлено, що це селективний антагоніст вітаміну К, який бере участь у процесах коагуляції та утворенні крововиливів. Фактори коагуляції II, VII, IX та X потребують карбоксилювання для активації за участі кофактора вітаміну К – це відповідає за терапевтичний ефект дикумаролу як антикоагулянта [10].

Антибактеріальна активність кумаринів.

Прості кумарини продемонстрували антибактеріальну активність, яка виникає з гідрокарбонних заміщень у основному ядрі кумарину. Амморезінол (рис.3А) та острутин (рис.3В) виявили терапевтичну активність проти великої кількості грамозитивних бактерій, таких як *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* та *Staphylococcus aureus*. Ще одна синтетичне похідне кумарину, 2,2-диметилпіранокумарин, виявився антибактеріальним агентом проти широкого спектру бактерій, інгібуючи їх обмін речовин, механізми репродукції та синтез білків [11].

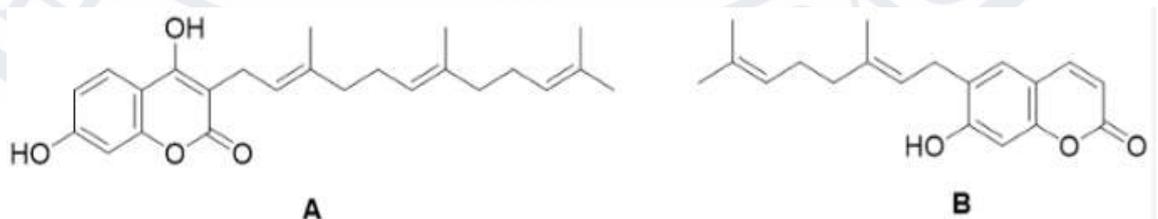


Рис.3 Хімічні структури амморезінолу (А) та острутину (В).

Кумарини з антигрибковою активністю

Один із похідних кумарину, який виявив антигрибковий ефект, – це остгол, який був вилучений із рослини *Angelica pubescens*. Встановлено, що ця сполука має антигрибковий ефект проти кількох патогенів, що зустрічаються у рослинах, таких як *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* та *Botrytis cinera*, інгібуючи ріст бактерій через їх сигнальні шляхи на рівнях обміну речовин та молекулярного рівня. Проведено тести для визначення кумаринів, які мають антигрибкові ефекти, при цьому імператорин, острутін та псорален виявили найбільш перспективні ефекти [12].

Кумарини з антивірусною активністю

Нові похідні кумарину, такі як інофілум і каланоліди, виділені з гігантського африканського равлика *Achatina fulica*, показали протівірусну дію. Інофілум В і Р інгібували зворотну транскриптазу у ВІЛ у клітинній культурі, селективно проти ВІЛ-1 (рис. 4) [13].

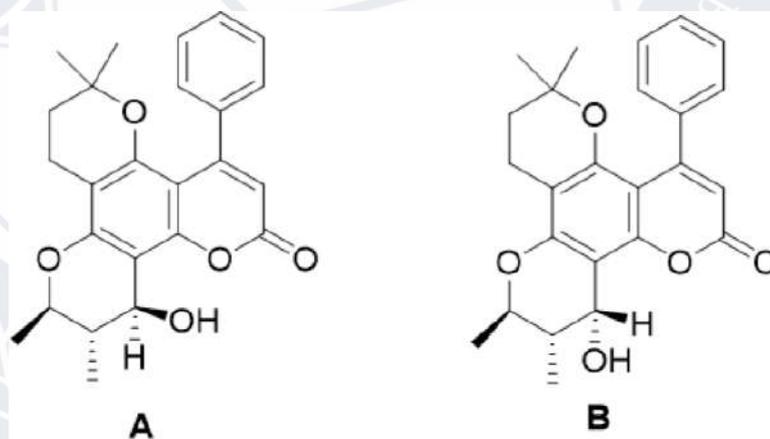


Рис.4 Хімічна структура інофілумів В (А) та інофілумів Р (В).

Кумарини з нейропротективною активністю

Дослідження в галузі фармакології показали, що ескулетин має нейропротективні ефекти, а також протизапальну активність в ішемічних ураженнях і церебральній перфузії, що продемонстровано на мишиній моделі зупинення кровопостачання до мозку, при введенні ескулетину інтрацеребровентрикулярно у дозі 20 мг/мл за 30 хвилин до виникнення ішемії [14].

Застосування кумаринів при терапії епілепсії

Епілепсія – це хронічне неврологічне захворювання, яке характеризується повторюваними епілептичними нападами. Ці напади можуть мати різний характер, включаючи мимовільні м'язові судоми, втрату свідомості, зміни у свідомості, а також впливати на різні аспекти ведення особистого та соціального життя

Один із кумаринів, що виявив антиконвульсантну активність для лікування епілептичних випадків, – це імператорин, який був протестований на мишиній моделі з медіанними ефективними дозами (ED_{50}) від 167 до 290 мг/кг. Ще одна похідна кумарину, яка також виявляє антиконвульсантні ефекти, – це остгол, показуючи значення ED_{50} в діапазоні від 253 до 639 мг/кг, де нейротоксичні ефекти були помітнішими [15].

Кумарини при хронічних дегенеративних захворюваннях

Дегенеративне захворювання – це захворювання, при якому функція або структура уражених тканин або органів з часом погіршується. Фармакологічні властивості кумаринів також були перевірені з метою зменшення ознак і симптомів дегенеративних захворювань, включаючи ускладнення ожиріння, метаболічний синдром і цукровий діабет 2 типу [16].

Кумарини з протипухлинною активністю

Кумарини були протестовані на різних лініях ракових клітин, демонструючи вплив на різні сигнальні шляхи з впливом на інгібування клітинної проліферації або безпосередньо впливаючи на фази клітинного циклу та процеси апоптозу. Похідні кумарину імператорину і остхолу у серії експериментів продемонстрували протипухлинну дію шляхом пригнічення міграції та інвазії ракових клітин. Інші похідні, такі як ескулетин, також продемонстрували протипухлинну дію, захищаючи культивовані первинні нейрони від токсичності N-метил-d-аспартату, протипухлинної сполуки, яку вводили протягом тривалого періоду часу для визначення наявності морфологічних зміни в нейронах. Похідні кумарину грандівіттин, агасілін, егелінолу бензоат і остхол, отримані з рослини *Ferulago campestris*, продемонстрували в серії експериментів цитотоксичну дію проти лінії клітин

раку легенів A54. Було показано, що протиракові властивості, продемонстровані остхолом, пригнічують проліферацію, рухливість і метастазування, а також індукують апоптоз і пригнічення клітинного циклу в різних лініях ракових клітин, таких як остеобластома на моделях мишей [17].

Отже, кумарини та різні похідні з їх моделями заміщення були дуже корисними в галузі медицини та продемонстрували важливі ефекти при багатьох захворюваннях. Вони можуть пом'якшити клінічні прояви захворювання та показали вплив на якість життя пацієнтів.

1.2 Токсичність кумаринів

З точки зору токсикології наявність суміші природних кумаринів у прянощах, таких як кора кориці, яка широко використовується для приготування випічки, тортів або солодкого печива, а також у косметичі (парфумах чи засобах для сонця) може супроводжуватись пероральним, легневим або шкірним всмоктуванням цих сполук і викликати наступний розвиток токсичних ефектів [18].

Загальна токсичність природних кумаринів

Загальна токсичність природних кумаринів була оцінена в преклінічних дослідках за допомогою різних тестів на мишах, щурах та свинях. Визначено активу пероральну LD_{50} для кумарину у мишей (196–780 мг/кг), щурів (290–680 мг/кг), та свиней (202 мг/кг). У підхронічному дослідженні мишей B6C3F1, яким перорально вносили кумарин у дозі 19–300 мг/кг маси тіла протягом 13 тижнів, виявлено зменшення приросту маси тіла та гіпертрофію гепатоцитів для найвищої дози. Щурам Спрег-Доулі, які вживали кумарин у дозі 50–500 мг/кг маси тіла протягом 13 тижнів, виявлено ознаки токсичності печінки. У хронічному дослідженні мишей CD-1, які отримували їжу з вмістом 300–3,000 ppm кумарину, не виявлено клінічної токсичності, з NOAEL 3,000 ppm або 280 мг/кг маси тіла/день для самців. Однак щури Спрег-Доулі, лікувані кумарином протягом 2 років, показали анемію та підвищення ферментів печінки.

Остгол (7-метокси-8-(3-метил-2-бутенил)-2H-1-бензопіран-2-он) – інший природний кумарин, було протестовано на актову пероральну токсичність у мишей (LD_{50} 710 мг/кг) та підхронічну токсичність у щурів і виявлено кровотечу та запальні процеси в нирках і печінці при вищих дозах [19].

Актуальна токсичність ескулетину (6,7-дигідроксикумарину) оцінювалася у мишей з пероральним LD_{50} понад 2000 мг/кг та інтранеперитональним LD_{50} 1,450 мг/кг. Підхронічна чи хронічна токсичність ескулетину не були оцінені.

Аураптен, кумарин із видів *Citrus*, тестувався на актову пероральну токсичність у щурів (125–2000 мг/кг), не призводячи до смерті чи клінічних ознак токсичності. У підактовому тесті аураптен, який надавався щурам у дозах 125–250 мг/кг протягом 28 днів, не викликав гематологічних, гістопатологічних або біохімічних змін [20].

Гепатотоксичність кумаринів

Попередні дослідження вказують на те, що незаміщені у 4-положенні кумарини і, особливо їх проміжні продукти 3,4-епоксиду, можуть викликати ушкодження печінки у щурів, яким протягом 4 тижнів вводили дієту із 0,75% кумарину. Це супроводжувалося збільшенням білірубіну та активності аланінамінотрансферази в сироватці крові.

Нещодавнє дослідження псоралену, фуранокумарину з плодів *Fructus Psoraleae*, проведене на щурах та мишах, показало, що ці сполуки можуть викликати холестатичні ушкодження печінки у щурів при пероральному введенні. У печінці зменшилася виразність BSEP та MRP2, а також зменшилася виразність SULT2A1, що вказує на інгібування виділення жовчних кислот [21].

У людини, основний метаболічний шлях кумаринів – це 7-гідроксилювання, каталізоване ферментом CYP2A6. Проте у людей із генетичним поліморфізмом CYP2A6, може виникнути дефіцит 7-гідроксилювання, призводячи до накопичення токсичного 3,4-епоксиду

кумарину. Цей генетичний поліморфізм поширений серед азіатського населення, але його точний зв'язок із випадками токсичності печінки, викликані кумаринами, не були ретельно досліджені.

Клінічні дослідження щодо корисних властивостей кумарину в лікуванні лімфедими мали суперечливі результати. Спочатку, велике дослідження показало низьку частоту гепатотоксичності (менше 1%) серед пацієнтів, які приймали кумарин. Проте менше масштабне дослідження виявило частоту виникнення гепатотоксичності на рівні 9%. Різноманіття результатів може бути пов'язане з різницею у дизайнах та протоколах досліджень. На додаток, лише кілька випадків гепатотоксичності були пов'язані з харчовими джерелами або добавками, багатими на кумарини. Наприклад, прийом кориці протягом тижня викликав синдром, схожий на гепатит, у пацієнта з підвищенням ферментів печінки, і цей ефект був підтверджений каузальним зв'язком за допомогою алгоритму Наранхо. Однак інші компоненти кориці також можуть внести свій внесок у гепатотоксичний ефект [22].

Ефект антикоагуляції та ризик кровотечі

Вперше антикоагулянтний ефект природних кумаринів виявили, коли худоба, яка їла плісняву на солодкому клевері, помирала від кровотечі. Дослідження показало, що гриби перетворюють природний кумарин в солодкому клевері в потужний антикоагулянт – дикумарол, що блокує синтез факторів згортання в печінці. Проте дикумарол рідко зустрічається в інших рослинах, окрім солодкого клеверу. Тому ризик випадкового антикоагулянтного ефекту від кумаринів у рослинній їжі ймовірно невеликий. Структурні відмінності між дикумаролом і кумарином роблять його менш ефективним. Клінічне дослідження із кумарином не показало впливу на згортання. Хоча інші кумарини можуть мати антикоагулянтний ефект, наукових даних для чіткого висновку недостатньо [23].

Дерматологічна токсичність

Декілька природних кумаринів, таких як псорален, бергаптен і зантотоксин, з фуранокумаринового класу, що містяться в селері та лаймах,

спричиняють обмежену кількість фототоксичних реакцій на шкірі. Існують випадки фотоалергічних реакцій від фуранокумаринів у смоквах, підтверджених гістопатологічними дослідженнями. Однак ризик фототоксичних ефектів при споживанні їжі з високим вмістом кумаринів ймовірно невеликий, але може зростати при неналежному зберіганні чи обробці їжі. Також згадано випадок загострення розацеї від дії дієтичних добавок з корицею, але причину не можна було пов'язати із конкретним кумарином. Кілька випадків дерматиту було зафіксовано внаслідок використання зубної пасти, жувальної гумки та розчину для полоскання рота із корицею. Додаткові дослідження необхідні для підтвердження гіпотези про можливий вплив фуранокумаринів на розвиток меланоми шкіри [24].

Репродуктивна та розвиткова токсичність

Декілька *in vitro* та *in vivo* моделей досліджували репродуктивну та розвиткову токсичність кумаринів. Дослідження на ембріонах зебрафіша (*Danio rerio*) показало, що кумарин спричинює вади розвитку голови та хвоста, але розрахована LC_{50} склала 855 мкмоль/л, що свідчить про те, що в людей за умов нормальних терапевтичних доз тератогенність кумарину може бути досить низькою порівняно із варфаріном. Крім того, останнє дослідження вивчало вплив серії похідних кумарину на ембріони зебрафіша, виявивши відсутність змін у розвиваючихся личинках та відсутність зазначених пошкоджень їхніх внутрішніх структур. Крім того, *in vivo* дослідження показало, що пероральне введення великих доз кумарину самцям та самкам щурів породи Вістар під час фази спарювання не викликало негативних ефектів щодо репродуктивної здатності батьків чи розвитку щенят. У людей даних щодо репродуктивної та розвиткової токсичності природних кумаринів поки не опубліковано [25].

Взаємодії між ліками

Похідні кумарину – це різноманітні речовини, які можуть взаємодіяти з обміном та ефектами інших ліків. Наприклад, деякі складові соку грейпфрута можуть зменшувати обмін деяких ліків, таких як блокатори кальцієвих каналів

або статини, що може призвести до збільшення їхніх побічних ефектів. Інші речовини у грейпфруті також відповідають за цю взаємодію. Дослідження показало, що кора кориці може впливати на фермент CYP3A4, збільшуючи концентрацію піоглітазону, антидіабетичного засобу. Крім того, інший кумарин, остгол, виявився сильним інгібітором ферменту CYP2C9. Його вплив може залежати від генетичних особливостей організму [26].

Регуляторні аспекти

Регуляторні органи світу прийняли заходи для обмеження концентрації природних кумаринів у харчових продуктах та травах, щоб уникнути можливих токсичних наслідків для населення. В Європейському союзі встановлено максимальний рівень 0,5 мг/кг кумарину в їжі, а в США взагалі заборонено його додавання. Австралія суспільно контролює вміст кумарину в топічних косметичних засобах, обмежуючи його до 0,001% [27].

Отже, природні кумарини, які містяться в різних харчових продуктах та травах, є класом хімічно різноманітних сполук з важливими біологічними ефектами, корисними для підтримки здоров'я та профілактики різних захворювань. Найважливішими негативними ефектами кумаринів є гепатотоксичність, сприяння якій може викликати вживання великих доз, а також можлива генетична поліморфія CYP2A6 та фототоксичні реакції на шкірі. Для безпечнішого використання цих цінних природних сполук у нутрицевтиках необхідно краще розуміти профіль безпеки кумаринів.

1.3. Антиоксидантна активність кумаринів

1.3.1. Механізми антиоксидантної активності фенольних сполук у біологічних системах і методики її дослідження.

В наш час загальновідомими є три основні молекулярні механізми антиоксидантної дії фенольних сполук у біологічних системах:

- реакції з біорадикалами (антирадикальна дія);
- зв'язування металів зі змінною валентністю (хелатуюча дія);
- інгібування прооксидантних ферментів [28].

За допомогою методів визначення антиоксидантної дії природних і синтетичних сполук вимірюють в основному три показники:

- антиоксидантна здатність – загальна кількість електронів, відданих або перенесених молекулами-мішенями на 1 моль антиоксиданту в ході реакції за певних умов;

- антиоксидантна активність – концентрація антиоксиданту, необхідна для забезпечення заданої швидкості реакції;

- антиоксидантний потенціал – загальний термін, який використовується для позначення очікуваної здатності антиоксиданту гасити радикали за певних умов.

Найбільш застосовуваними методиками *in vitro* визначення антиоксидантних властивостей рослинної сировини, рослинних екстрактів, індивідуальних природних і синтетичних хімічних сполук є методики, які позначаються абревіатурами: DPPH, TEAC, ORAC, FRAP та ін. [29].

DPPH – стабільний радикал, забарвлений у фіолетовий колір. Реакція з іншими радикалами, електронами або атомами Гідрогену приводить до знебарвлення радикалу при довжині хвилі 515-520 нм і втрати сигналу ЕПР вільних радикалів, що реєструють за допомогою відповідних методів аналізу. DPPH є гідрофобним радикалом, тому реакції з ним проводять, як правило, у неполярних розчинниках. Для інтерпретації результатів реакції антиоксиданту з DPPH досить часто використовують параметр EC_{50} , який визначається, як концентрація антиоксиданту, що необхідна для зменшення концентрації радикала на 50 %.

TEAC/ *ABTS*^{•+} (*Trolox Equivalent Antyoxidant Capacity*) – аналіз тролокс-еквівалентної здатності 2,2-азино-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти). За допомогою цієї методики вимірюється здатність досліджуваних антиоксидантів зменшувати забарвлення *ABTS*^{•+} шляхом перехоплення початкового окислення і запобігання утворенню катіон-радикала (I) або прямої (II) реакції з *ABTS*^{•+}(II).

ТЕАС I використовує додаткові реагенти для окислення *ABTS* до його забарвленої вільнорадикальної форми $ABTS^{\bullet+}$; додавання антиоксиданту до реакційної суміші приводить до знебарвлення радикала, що реєструється за допомогою спектрофотометричного методу аналізу. У присутності антиоксиданту відбувається миттєве відновлення катіон-радикала з утворенням вихідної молекули *ABTS*. На кінетичних кривих накопичення $ABTS^{\bullet+}$, в цьому випадку, з'являються періоди індукції, тривалість яких пропорційна початковій концентрації доданого антиоксиданту [30].

Оригінальний тест $ABTS^{\bullet+}$ ґрунтувався на активації метгемоглобіну пероксидом водню у присутності *ABTS* з утворенням катіон-радикала, в присутності або за відсутності антиоксидантів. Цей метод був підданий критиці через те, що антиоксиданти, які швидше реагують, можуть також сприяти відновленню ферильного радикалу міоглобіну. Удосконалена методика генерації $ABTS^{\bullet+}$, передбачає безпосереднє отримання синьо-зеленого хромофору $ABTS^{\bullet+}$ шляхом реакції між *ABTS* і персульфатом калію згідно з [31]. За цією методикою (ТЕАС II) ступінь знебарвлення катіон-радикалу $ABTS^{\bullet+}$ визначається як функція концентрації та часу і розраховується відносно реакційної здатності тролоксу (Trolox) як стандарту за тих самих умов.

Тест ORAC (oxygen radical absorbance capacity) є найбільш поширеним серед способів оцінки антиоксидантної активності фенольних антиоксидантів. У цій методиці використовується здатність ААРН [2,2'-азобіс(2-амідинопропан)дигідрохлориду] утворювати пероксильні радикали при нагріванні у присутності достатньої кількості кисню. Ці радикали гасять флуоресценцію зонду, відновлюючи її. Рівень гасіння флуоресценції залежить від природи і концентрації антиоксиданту, який інгібує утворення радикалів. Вдосконалена методика дозволяє виявляти ROO^{\bullet} , $^{\bullet}OH$ та інші радикали шляхом використання різних азоініціаторів. Так само як і у попередньому випадку, реакційна здатність досліджуваних антиоксидантів порівнюється із тролоксом [32].

Метод FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) ґрунтується на реакції відновлення антиоксидантом Fe(III)-трипіридинтриазину до Fe(II)-трипіридилтриазину (залізовідновлююча/антиоксидантна здатність FRAP). Комплекс йонів Fe(II) з трипіридилтриазином, що при цьому утворюється, забарвлений у синій колір і має поглинання при 593 нм [33].

Для визначення хелатуючої здатності екстрактів з харчових продуктів, рослинних екстрактів, індивідуальних поліфенольних сполук та/або їх сумішей також широко застосовується залізо-феррозинова методика. Наявність у складі поліфенолів карбонільних і гідроксильних груп дозволяє їм координувати йони металів та утворювати забарвлені комплекси. Інтенсивність забарвлення цих комплексів зменшується за наявності інших (конкуруючих) комплексоутворюючих агентів. Комплекс поглинає при 562 нм [34]. Як джерела йонів Fe(II) зазвичай використовують $FeCl_2$ або $FeSO_4$. Хелатуюча здатність поліфенолів є надзвичайно важливою оскільки в результаті зменшується концентрація йону металу, який виконує роль каталізатора процесів перекисного окислення ліпідів. Крім того металхелатуючі агенти розглядаються як вторинні антиоксиданти, оскільки знижують окислювально-відновний потенціал і, таким чином, стабілізують окислені іони металів [35].

Не зважаючи на широке використання описаних вище методик для визначення антиоксидантної активності поліфенольних сполук *in vitro* всі вони мають певні концептуальні обмеження. Ці обмеження, насамперед, полягають у тому, що в природних умовах зазначені реакції між антиоксидантами та відповідними реагентами не відбуваються. Більшість антиоксидантів взагалі погано всмоктуються або швидко кон'югуються і виводяться із сечею, тому концентрація фенолів в організмі в кращому випадку може досягати слідових рівнів. Часто хімізм і молекулярні мішені більшості методик *in vitro* не відповідають умовам *in vivo*, адже для оцінки АОА використовують стерично утруднені радикали ($DPPH^{\cdot}$, $ABTS^{\cdot+}$), а не малі і легкодоступні, але короткоживучі радикали HO^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$ або окисильні радикали ліпідів. Також

загальноприйняті методики нажаль не враховують радикальні реакції в ліпідах і т.д. Проте простота вимірювань, доступність матеріалів, реагентів і обладнання, наявність стандартизованих методів оцінки антиоксидантів різної хімічної природи є важливими перевагами для застосування зазначених методів на практиці [29].

1.3.2. Антиоксидантна активність 4-метилкумаринів і її кількісна оцінка *in vitro* та *in vivo*.

Природні і синтетичні кумарини, які містять в своєму складі дві ОН-групи, розміщені в *орто*-положенні по відношенню одна до одної в бензеновому кільці, демонструють високі антиоксидантні і поглинаючі вільні радикали властивості в різних експериментальних моделях. Взагалі, гідроксикумарини поведуть себе як класичні антиоксиданти на основі фенолу або хінолу, в яких гідроксигрупа на ароматичному кільці може здійснювати одноелектронне відновлення вільного радикала. Також відома здатність гідроксикумаринів утворювати стійкі хелатні комплекси з іонами металів змінної валентності і виступати в ролі інгібуючих агентів прооксидантних ферментів (ліпооксигенази, циклооксигенази тощо). В огляді [36] узагальнені експериментальні дані щодо антиоксидантної активності природних і синтетичних кумаринів різної будови; систематично оцінений взаємозв'язок між структурою кумаринів і їх реакційною здатністю; детально розглянуті хімічні і молекулярні механізми антиоксидантної дії кумаринів; запропоновані нові підходи до вивчення антиоксидантної активності цих сполук у біологічних системах. Особливу увагу приділено 7-гідроксикумаринам та їх *орто*- і *мета*-дигідроксипохідним; С-3 і С-4 гідроксизаміщеним кумаринам тощо. Показано, що С7-ОН-група є необхідною для прояву антиоксидантної активності і будь-які заміщення С6–С8, включаючи глікозидні або метоксигрупи, можуть приводити до зменшення здатності кумаринів поглинати вільні радикали.

Як вже було показано у попередніх розділах, незважаючи на широкий спектр фармакологічних властивостей природних і синтетичних кумаринів є

певні обмеження для їх застосування. Особливо це стосується незаміщених у 4-положенні похідних кумарину, які в процесі метаболізму в організмі людини і тварин можуть утворювати токсичні епоксиди 3,4-кумарину [37].

В цей же час в ряді робіт показано, що синтетичні 4-метилкумарини проявляють багатообіцяючі антиоксидантні ефекти досліджені за допомогою різних методів визначення антиоксидантної активності, а саме: різних фізико-хімічних і біохімічних тест-систем, а також експериментальних моделей на рівні клітин, тканин і цілісного організму.

Так, авторами [38] представлені результати досліджень антиоксидантних властивостей 22 структурно споріднених природних і синтетичних 4-метилкумаринів *in vitro*. Визначення антиоксидантних властивостей проводили за допомогою спектроскопії електронного магнітного резонансу, вимірюючи кінетику їх взаємодії зі стандартними радикалами гальвіноксидом і 2,2-дифеніл-1-пікрил-гідразилом (DPPH). Для вимірювань використовували дуже низькі концентрації кумаринів (10 мкмоль і менше), що відповідає рівням, які можна розглядати в терапевтичних цілях. Ефективну антиоксидантну активність 4-метилкумаринів у клітинах підтверджували за допомогою флуоресцентного зондового аналізу DCF для визначення внутрішньоклітинних рівнів активних форм кисню. Було встановлено, що *орто*-дигідроксизаміщені 4-метилкумарини є більш ефективними поглиначами радикалів, ніж *мета*-дигідроксизаміщені або моногідроксизаміщені аналоги; відповідні *орто*-діацетокси-похідні виявились менш ефективними; але є помірними поглиначами радикалів навіть за відсутності естерази. Показано, що антиоксидантну активність 4-метилкумаринів також можна модулювати введенням етоксикарбонілетилового замісника у положення С-3.

Пізніше представниками тієї ж наукової групи [39] в контексті взаємозв'язку між структурою і антиоксидантною активністю були досліджені 8 найбільш ефективних з представлених у синтетичних похідних кумарину дигідрокси-4-метилкумарину: 6,7-*о*-дигідрокси-, 7,8-*о*-дигідрокси-, 7,8-*о*-

діацетокси-, 5,7-м-дигідрокси- та їх складні ефіри. Сполуки були протестовані за допомогою трьох тестів, що включають одну окисно-відновну реакцію з окисником (DPPH[•]-тест, ABTS^{•+}-тест та FRAP). Також були дослідженні антиоксидантні властивості кумаринів по відношенню до NO, O₂^{•-} та HClO[•] і виміряна захисна здатність цих кумаринів проти окислювального пошкодження у простій біоміметичній моделі фосфоліпідних мембран. Проведені дослідження підтвердили високу антиоксидантну активність 7,8-дигідрокси-4-метилкумаринів і показали, що уведення етоксикарбонілметильного або етоксикарбонілетилового замісника у положення С-3, суттєво не впливає на АОО кумаринів за умов експерименту. Також показано, що в тесті на токсичність для креветок у розсолі жодна з досліджуваних сполук у концентраціях до 500 мкмоль/л не впливала на ріст і життєздатність личинок. 7,8-дигідрокси-4-метилкумарин і 7,8-дигідрокси-3-етоксикарбонілетил-4-метилкумарин продемонстрували високу поглинаючу активність по відношенню до супероксид-аніон-радикала і були дуже ефективними в захисті ліпідного бішару від перекисного окислення.

Водночас у [40] представлені результати досліджень антиоксидантної здатності описаних вище дигідрокси-4-метилкумаринів у моделі ініційованого окиснення ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ). Антиоксидантну активність вивчали за допомогою двох методів: 1) конкурентного кінетичного тесту для вимірювання відносної здатності гасити пероксильний радикал; 2) окислювальної модифікації ЛПНЩ людини *in vitro*, ініційованої 2,2-азобіс-(2-амідинопропан) дихлоридом (AAPH) або каталізованої міддю. Показано, що здатність дигідрокси-4-метилкумаринів поглинати пероксильний радикал має наступний порядок: 7,8-дигідрокси-4-метилкумарин > 6,7-дигідрокси-4-метилкумарин > 5,7-дигідрокси-4-метилкумарин. В цей же час 7,8-дигідрокси-4-метилкумарин і 6,7-дигідрокси-4-метилкумарин виявляють здатність до поглинання пероксильних радикалів у 6 і 4 рази вище, ніж тролокс, відповідно; а 5,7-дигідрокси-4-метилкумарин – у 5 разів нижчу активність поглинання гідроксильних

радикалів, ніж тролокс. Уведення до С-3 положення бензо- α -піронового остову молекули кумаринів етоксикарбонілетилової групи приводить до збільшення антиоксидантної активності цих сполук.

У [41] наведені результати визначення хелатуючої здатності синтетичних 7,8-дигідрокси-4-метилкумарину; 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину; 7,8-діацетокси-4-метилкумарину; 7,8-диметокси-4-метилкумарину; 5,7-дигідрокси-4-метилкумарину; 5,7-діацетокси-4-метилкумарину та ін. і природних 4-гідроксикумарину, умбеліферону (7-гідроксикумарин), скополетину і його глікозиду скополіну. Для оцінки концентрації йонів Fe (II) застосовували феррозиновий метод. Для порівняння хелатуючої здатності використовували дефіероксамін як стандартний хелатор заліза. Найбільш ефективними хелаторами серед кумаринів були: 7,8-дигідрокси-4-метилкумарину (ступінь хелатування до 80%); 6,7-дигідрокси-4-метилкумарин (до 40%); 7,8-диметокси-4-метилкумарину (більше 80%). Виявлено, що для хелатування йонів Fe (II) дві гідроксильні групи в сусідніх орто-положеннях відповідають найвищій ефективності хелатування заліза, яка наближається або навіть досягає ефективності дефероксаміну при рН 6,5 і 7,5. Кумарини, що містили лише метоксигрупу, одну гідроксильну групу або дві гідрокси/ацетоксигрупи в мета-положенні не зв'язували Fe²⁺ суттєво.

Авторами [42] проаналізовано терапевтичний потенціал інших 4-заміщених кумаринів. В огляді представлено, що каркаси молекул кумаринів, що містять такі лінкери, як азот, кисень, сірку та метилен з 1,2,3-триазолом, піперидином, пурином, імідазолом, фенільне кільце, бензотіазол, арилакрилову кислоти в положенні С-4 також демонструють високу біологічну активність і мають високий потенціал як протипухлинні, антибактеріальні і противірусні агенти.

Таким чином, аналізуючи літературні дані, можна побачити зацікавленість науковців у дослідженнях біологічної активності саме 4-метилпохідних кумарину як сполук, що проявляють різноманітні фармакологічні, в тому числі антиоксидантні та антирадикальні властивості і

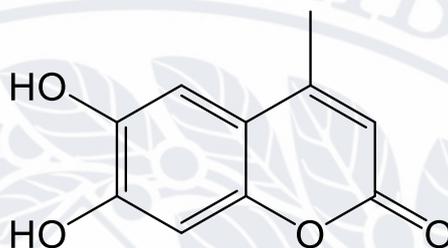
не утворюють токсичних метаболітів при деградації в організмі людини і тварин. Мета цих досліджень, як правило, полягає у розробці нових підходів для синтезу біологічно активних сполук на основі 4-метилкумаринів шляхом уведення та заміни функціональних груп у їх молекулах. Результати встановлення АОА новосинтезованих і природних сполук показують, що наявність двох гідроксильних груп, положення і тип замісників суттєво впливають на здатність 4-метилкумаринів «поглинати» вільні радикали.



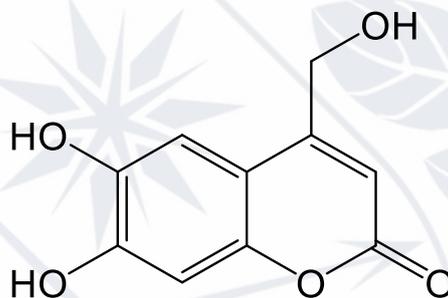
РОЗДІЛ 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Об'єкти та матеріали дослідження

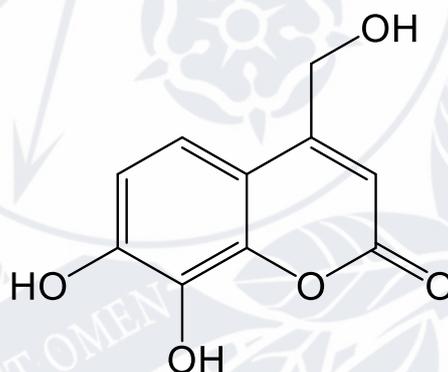
Синтетичні похідні 4-метилкумарину:



6,7-дигідрокси-4-метилкумарин (Coum1);



6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин (Coum2);



7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин (Coum3);

2.2 Підготовка реактивів

O-дигідроксипохідні 4-метилкумарину були синтезовані науковою групою Михайла Фрасинюка (Інститут органічної хімії НАН України, м. Київ). Як розчинник кумаринів використовували 96%-вий етанол; погано розчинні в етанолі похідні 4-гідроксиметилкумаринів попередньо розчиняли у невеликій кількості диметилсульфоксиду.

Стабільний вільний радикал DPPH[•] і ABTS, K₂S₂O₈, FeSO₄, феррозин (Sigma-Aldrich) використовували без додаткового очищення.

2.3 Визначення антиоксидантної/антирадикальної активності

DPPH[•]-метод. Здатність досліджуваних кумаринів поглинати вільні радикали тестували за знебарвленням розчину стабільного радикалу DPPH[•]. Вихідний розчин концентрованого DPPH[•] в етанолі розводили таким чином, щоб значення оптичної густини за 518 нм становило 1,00±0,05, що відповідає концентрації 8,7·10⁻⁵ моль/л з урахуванням коефіцієнта екстинкції DPPH[•] (1.15±0.05)×10⁴ л/(моль·см). У кювету з товщиною поглинаючого шару 1 см додавали 2,8 мл етанольного розчину DPPH[•] і 0,2 мл етанольного розчину відповідного кумарину в діапазоні концентрацій 10⁻⁵ – 10⁻⁶ моль/л. Реакційну суміш ретельно перемішували і залишали на 30 хв у темному місці. По закінченню часу змінення концентрації DPPH[•] визначали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 518 нм.

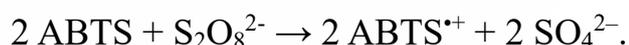
Антирадикальну активність (АРА%) розраховували за формулою:

$$\text{АРА \%} = \frac{A_0 - A_{\text{coum}}}{A_0} \times 100\%,$$

де A_0 – оптична густина вихідного розчину DPPH[•]; A_{coum} – оптична густина суміші розчинів кумарину і DPPH[•] через 30 хв.

ABTS-метод.

Визначення антирадикальної здатності кумаринів з попередньо генерованим ABTS^{•+}. Здатність досліджуваних кумаринів відновлювати радикал ABTS^{•+} оцінювали згідно з методикою, описаною в [43]. Катіон-радикал ABTS^{•+} генерували окисненням ABTS персульфатом калію K₂S₂O₈ у воді за схемою:



Перед використанням суміш витримували в темряві за кімнатної температури протягом 12-16 год. Для одержання робочого розчину вихідний розчин катіон-радикалу $ABTS^{*+}$ розводили таким чином, щоб значення оптичної густини за 734 нм становило $0,70 \pm 0,05$, що відповідає концентрації $4,7 \cdot 10^{-5}$ моль/л·см, з урахуванням коефіцієнта екстинкції $ABTS^{*+}$ $(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^4$ л/(моль·см). У кювету з товщиною поглинаючого шару 1 см додавали 2,0 мл водного розчину $ABTS^{*+}$ і 0,1 мл етанольного розчину відповідного кумарину в діапазоні концентрацій 10^{-5} – 10^{-6} моль/л. Реакційну суміш ретельно перемішували і залишали на 7 хв у темному місці. По закінченню часу змінення концентрації $ABTS^{*+}$ визначали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 734 нм.

Антирадикальну активність (АРА%) розраховували за формулою:

$$ARA \% = \frac{A_0 - A_{coulm}}{A_0} \times 100\%,$$

де A_0 – оптична густина вихідного розчину $ABTS^{*+}$; A_{coulm} – оптична густина суміші розчинів кумарину і $ABTS^{*+}$ через 7 хв.

Антиоксидантну активність кумаринів виражали в еквівалентах Trolox (TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity), що відповідає концентрації кумарину, яка дає такий самий відсоток інгібування, як і 1 ммоль/л Trolox.

Стехіометричний коефіцієнт $f(ABTS^{*+})$ визначали з графіка залежності кількості $ABTS^{*+}$, що прореагувало, від початкової концентрації доданого кумарину.

Визначення антирадикальної здатності способом радикал-відновлювального інгібування проводили згідно з [30].

В кюветі змішували розчин антиоксиданту в діапазоні концентрацій (10^{-5} – 10^{-6} моль/л); розчин персульфату калію $K_2S_2O_8$ (C – 0,0025 моль/л) і розчин $ABTS$ (C_0 – 0,0002 моль/л). Накопичення катіон-радикала $ABTS^{*+}$ реєстрували за довжини хвилі 734 нм.

Швидкість зародження радикалів $ABTS^{\bullet+}$ (V_i/f^{red}) розраховували як тангенс кута нахилу залежності початкової концентрації кумарину в кюветі і періоду індукції накопичення катіон-радикала. Стехіометричний коефіцієнт інгібування розраховували зі співвідношення швидкостей зародження катіона-радикала $ABTS^{\bullet+}$ у відсутності та присутності інгібітора.

Fe (II)-феррозиновий метод

Хелатуючу здатність кумаринів визначали за класичною методикою [44], що базується на реакції інгібування утворення ферозин- Fe^{2+} комплексу. До 0,7 мл розчину кумарину в діапазоні концентрацій $4 \cdot 10^{-4}$ - $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л додавали 2,1 мл дистильованої води і 0,07 мл 2 мМ розчину $FeSO_4$. Співвідношення кумарин: Fe^{2+} у реакційній суміші становило 1:1 і 1:10.

Через 5 хв додавали 0,14 мл 1мМ розчину ферозину. Суміш ретельно перемішували, інкубували за температури $35^{\circ}C$ протягом 10 хв і вимірювали оптичну густину (A) за довжини хвилі 562 нм. Такі ж самі реакції проводили з натрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтвої кислоти, яку використовували як стандарт.

Всі вимірювання проводили на однопроменевому спектрофотометрі Analytic Jena SPECORD 50, обладнаному термостатом ($20.0 \pm 0.1^{\circ}C$).

РОЗДІЛ 3 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1 Антирадикальна активність *орто*-дигідроксипохідних 4-метилкумарину в реакції з дифенілпікрілгідрозилом

DPPH•-аналіз найбільш часто застосовується як непрямий метод визначення антиоксидантної активності кумаринів, оскільки ці сполуки не розчинні у водному середовищі.

При взаємодії фенольних антиоксидантів з DPPH• перенесення атома Гідрогену на радикал може перебігати за двома незалежними конкуруючими механізмами: радикальному (*HAT*) та йонному (*SPLET*).

Радикальний механізм *HAT* (*hydrogen atom transfer*) базується на безпосередньому відриві атома Гідрогену від молекули фенольного антиоксиданту і перенесенні його на радикал. З найбільшою швидкістю реакція за цим механізмом перебігає, як правило, у неполярних розчинниках за схемою:



Інший механізм базується на перенесенні електрона молекулою йонізованого фенольного антиоксиданту на DPPH•; вважається, що саме цей механізм переважає у полярних розчинниках і перебігає за наведеними нижче схемами під назвами *SPLET* (*sequential proton loss – electron transfer*) (3.2) або *ET-PT* (*electron transfer – proton transfer*) (3.3):



При взаємодії спостерігається знебарвлення розчину DPPH•, пов'язаного з перетворенням радикала у молекулярну форму, що легко контролюється за зменшенням інтенсивності абсорбції за 518 нм.

Кінетичні криві витрачання DPPH• в реакції з досліджуваними похідними 4-метилкумарину наведені на рис. 3.1.

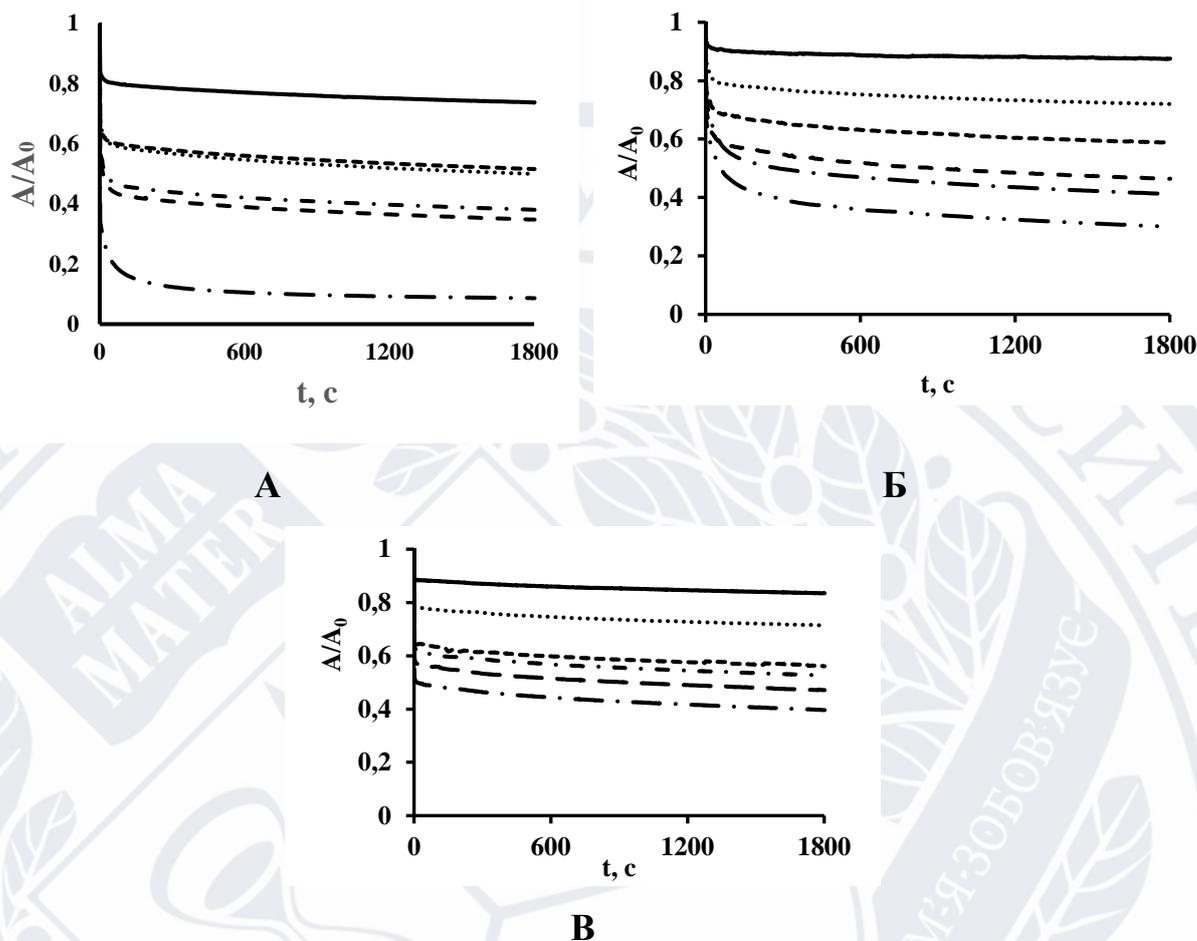


Рис. 3.1. Кінетичні криві витрачання DPPH[•] в реакції з похідними 4-метилкумарину, де **А** – 6,7-дигідрокси-4-метилкумарин, **Б** – 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин, **В** – 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин

$$C_{\text{сум}} = 5.5 \times 10^{-6} \div 2.8 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T = 293\text{К; } \lambda = 518 \text{ нм}$$

Згідно з [29] на швидкість і форму кінетичних кривих реакції впливають два фактори: механізми НАТ або SPLET (ET-PT) та стеричний доступ до радикала. Антиоксиданти, що діють шляхом SPLET (ET-PT) і мають повний доступ до радикального сайту, реагують протягом мілісекунд. Реакції сповільнюються наявністю у молекулі фенолу декількох НО-груп і кілець, об'ємних циклічних аддуктів, високими концентраціями антиоксидантів і перенесенням атомів Гідрогену. Вид кінетичних кривих для 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину і 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину: швидкий

початковий спад з подальшим продовженням реакції, особливо при збільшенні концентрації кумарину, може свідчити про механізм перенесення електрона та наявності стеричних перешкод, які заважають дифузії та орієнтації кумарину до радикала, також ці сполуки можуть також частково діяти шляхом повільного перенесення атомів Гідрогену. Миттєва початкова реакція, як у випадку з 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарином, виникає внаслідок перенесення електронів.

Залежність глибини перетворення DPPH \cdot (АРА) у перші 30 хв від початкової концентрації кумаринів наведена на рис. 3.2-3.4.

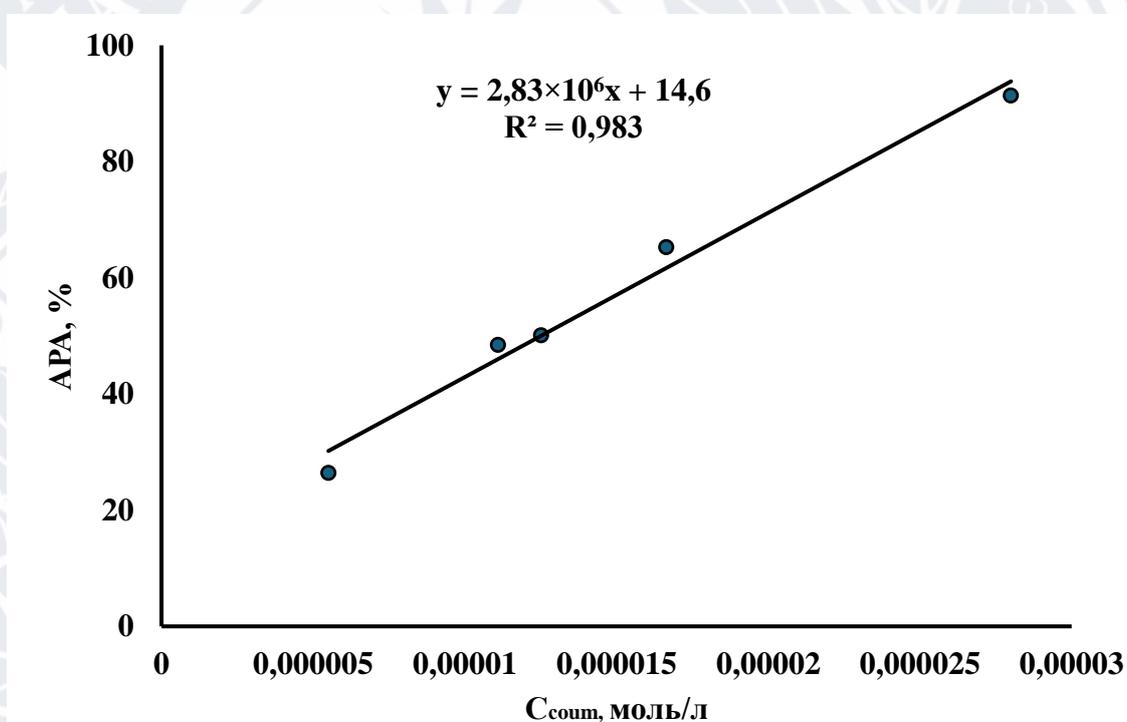


Рис. 3.2. Залежність глибини перетворення DPPH \cdot (АРА) у перші 30 хв від початкової концентрації 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину.

$$C_{скуп} = 5,5 \times 10^{-6} \div 2,8 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T - 293K; \lambda = 518 \text{ нм}$$

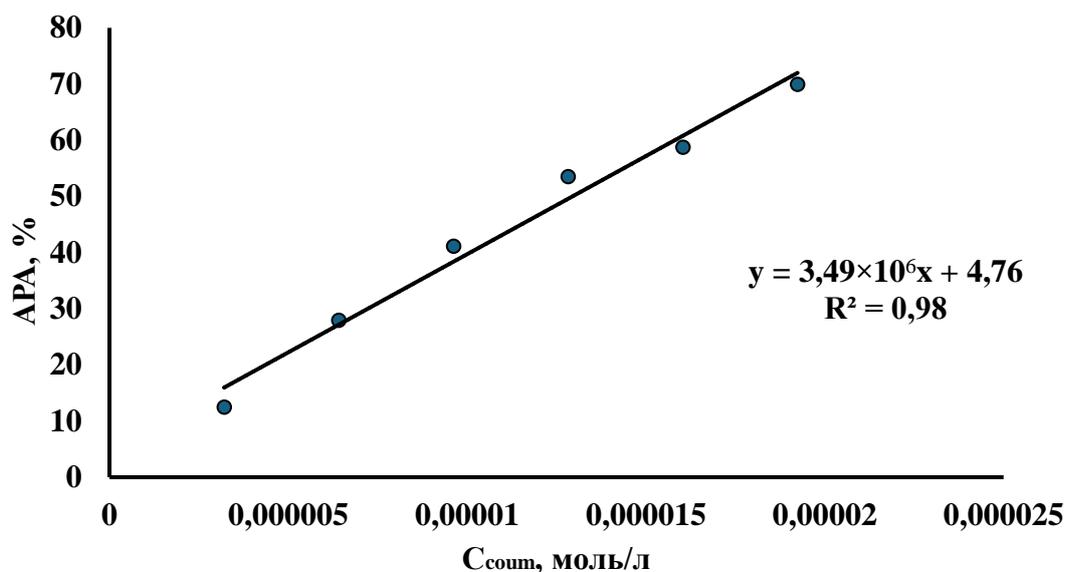


Рис. 3.3. Залежність глибини перетворення DPPH (APA) у перші 30 хв від початкової концентрації 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

$$C_{sout} = 3.2 \times 10^{-6} \div 2.0 \times 10^{-5} \text{ моль/л}; T - 293K; \lambda = 518 \text{ нм}$$

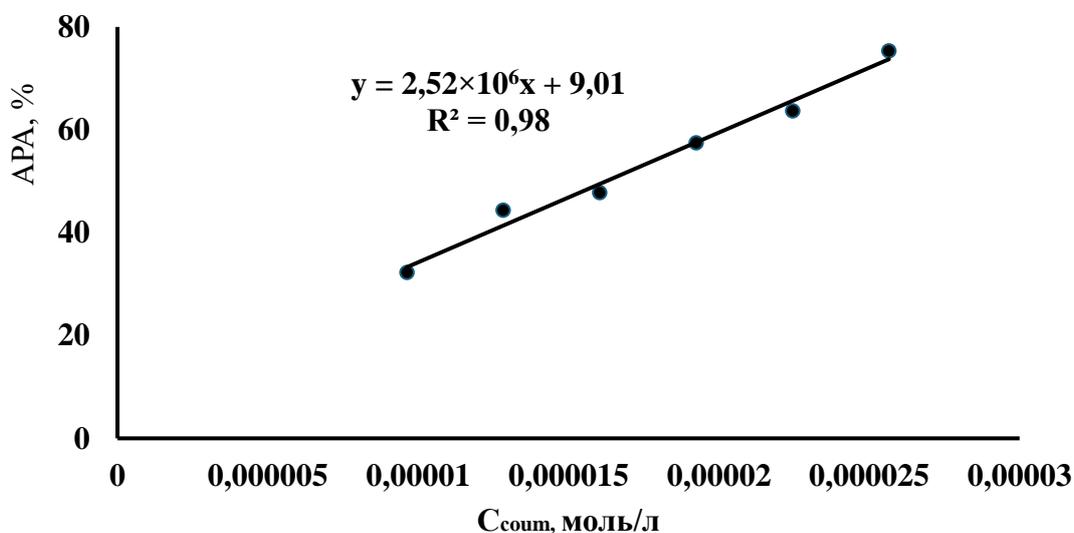


Рис. 3.4. Залежність глибини перетворення DPPH (APA) у перші 30 хв від початкової концентрації 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

$$C_{sout} = 9.6 \times 10^{-6} \div 1.3 \times 10^{-5} \text{ моль/л}; T - 293K; \lambda = 518 \text{ нм}$$

Результати визначення параметру EC_{50} для досліджуваних кумаринів наведені у таблиці 3.1.

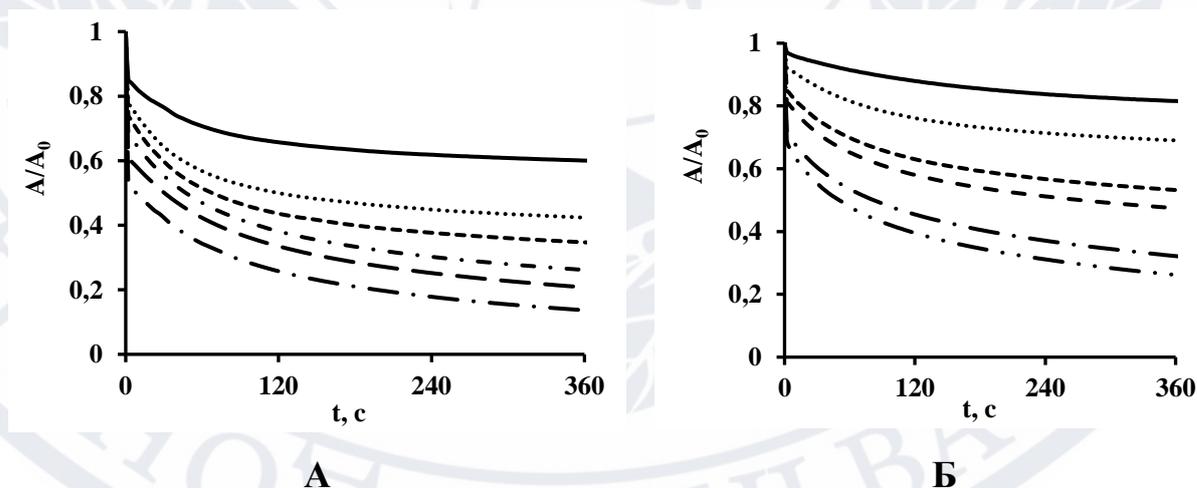
Таблиця 3.1 – Значення EC_{50} досліджуваних кумаринів, визначених за допомогою DPPH*-аналізу

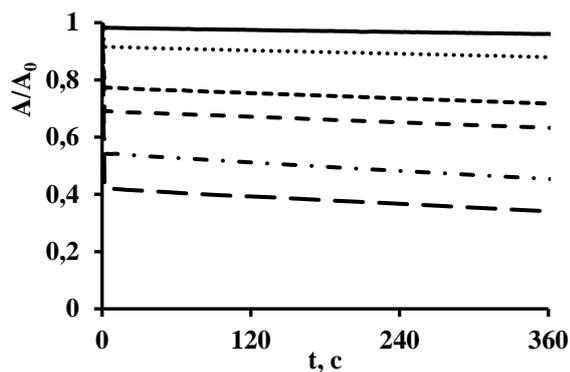
Сполука	EC_{50} , мкмоль/л	EC_{50} , мкг/мл
6,7-дигідрокси-4-метилкумарин	12.51	2.4
6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин	12.95	2.7
7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин	16.2	3.3
Кверцетин [45]	19.7	6.0

Результати оцінки АОА свідчать, що похідні 4-метилкумарину мають співрозмірні значення EC_{50} і перевищують цей показник для флавоноїду кверцетину.

3.2 Антирадикальна активність *орто*-дигідроксипохідних 4-метилкумарину в реакції з катіон-радикалом $ABTS^{•+}$

Визначення антирадикальної здатності кумаринів з попередньогенерованим $ABTS^{•+}$. Типові кінетичні криві витрачання $ABTS^{•+}$ в реакції з похідними 4-метилкумарину наведені на рис. 3.5.





В

Рис. 3.5. Кінетичні криві витрачання АБТС^{•+} в реакції з похідними 4-метилкумарину, де **А** – 6,7-дигідрокси-4-метилкумарин, **Б** – 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин, **В** – 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин

$$C_{\text{count}} = 1.9 \times 10^{-6} \div 1.9 \times 10^{-5} \text{ моль/л.}$$

Залежність глибини перетворення АБТС^{•+} (АРА) від початкової концентрації кумаринів наведена на рис. 3.6-3.8.

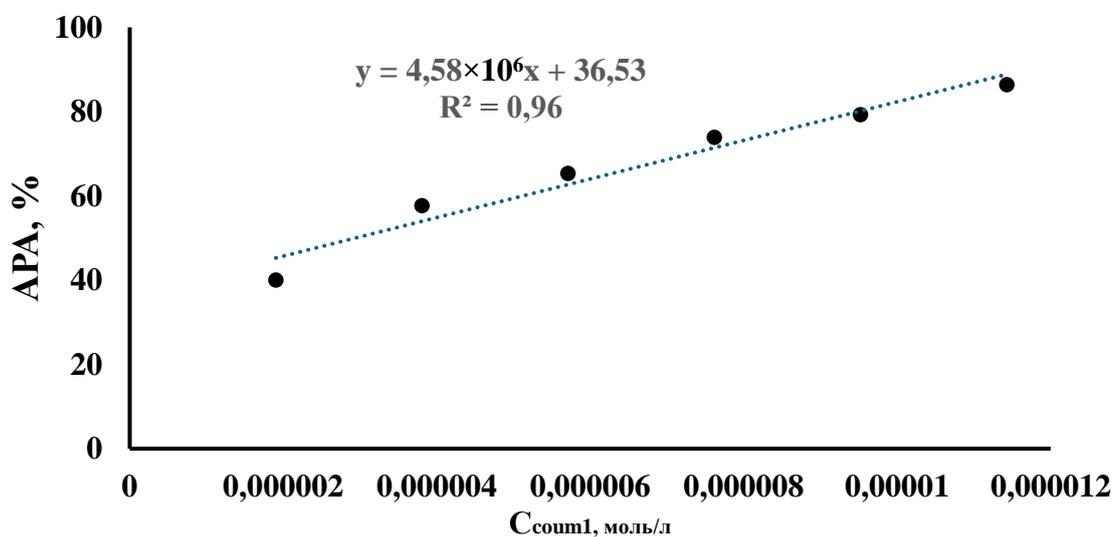


Рис. 3.6. Залежність глибини перетворення АБТС^{•+} (АРА) у перші 7 хв від початкової концентрації 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину.

$$C_{\text{count}} = 1.9 \times 10^{-6} \div 1.4 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T = 293\text{K; } \lambda = 734 \text{ нм}$$

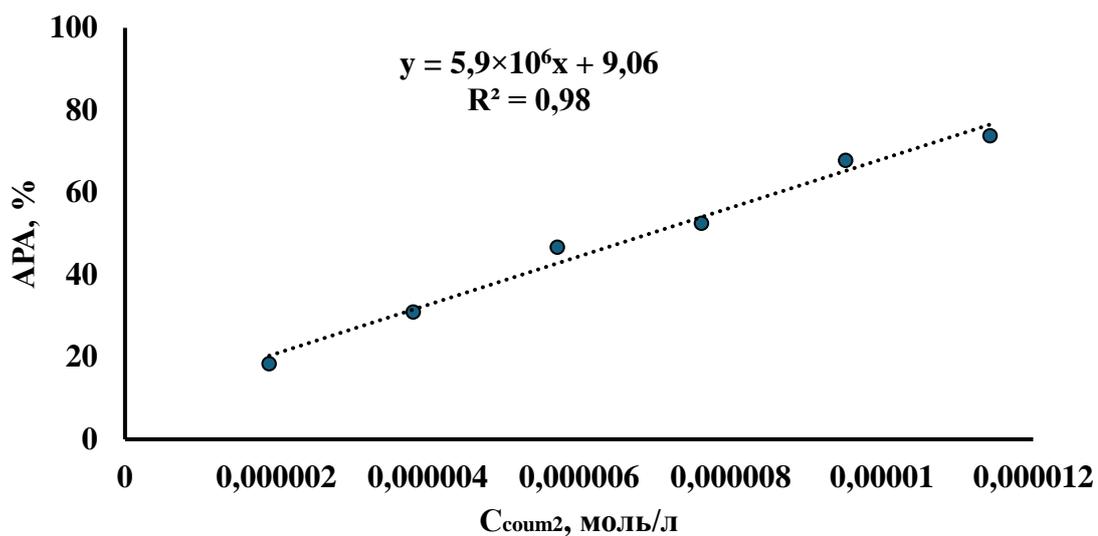


Рис. 3.7. Залежність глибини перетворення \cdot ABTS^{•+} (ARA) у перші 7 хв від початкової концентрації 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

$$C_{soum} = 1,9 \times 10^{-6} \div 1,4 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T = 293\text{K; } \lambda = 734 \text{ нм}$$

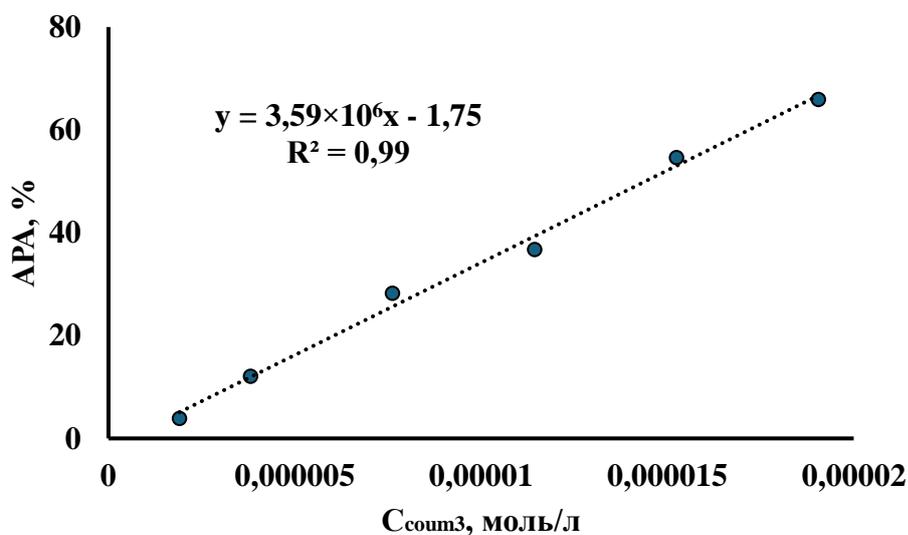


Рис. 3.8. Залежність глибини перетворення \cdot ABTS^{•+} (ARA) у перші 7 хв від початкової концентрації 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

$$C_{soum} = 1,9 \times 10^{-6} \div 1,4 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T = 293\text{K; } \lambda = 734 \text{ нм}$$

Характеристики антирадикальної активності 4-метилкумаринів наведені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Характеристики антирадикальної активності 4-метилкумаринів, визначені за допомогою аналізу ABTS^{•+}

Сполука	EC ₅₀ , мкмоль/л	EC ₅₀ , мкг/мл	TEAC	<i>f</i>
6,7-дигідрокси-4-метилкумарин	2.94	0.56	0.235	1.98
6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин	6.9	1.43	0.187	1.81
7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин	14.4	2.99	0.310	1.95
Trolox	43.8	10.8	1.0	-
Кверцетин [46]	-	-	4.43	-

Значення EC₅₀ і TEAC свідчать, що в реакції відновлення катіон-радикала ABTS^{•+} орто-дигідроксипохідні 4-метилкумарину є більш ефективними антиоксидантами, ніж Trolox і флавоноїд кверцетин. Значення стехіометричного коефіцієнту реакції становить ~ 2 одинці для всіх кумаринів і свідчить, що для знешкодження 2 молекул катіон-радикалу ABTS^{•+} витрачається 1 молекула кумарину.

Визначення антирадикальної здатності способом радикал-відновлювального інгібування

За відсутності інгібітора молекула ABTS швидко окислюється персульфатом калію з утворенням катіон-радикала ABTS^{•+}, що фіксується зростанням поглинання у характерних для ABTS^{•+} областях спектра. У присутності інгібітора відбувається миттєве відновлення катіон-радикала з утворенням вихідної молекули ABTS. На кривих накопичення ABTS^{•+} в такому випадку з'являються періоди індукції, тривалість яких пропорційна початковій концентрації відповідного інгібітора. Існує певна залежність: чим більша концентрація інгібітора, тим більше період індукції.

На рис. 3.9-3.11 наведені криві накопичення ABTS^{•+} в реакції з K₂S₂O₈ у присутності досліджуваного кумарину.

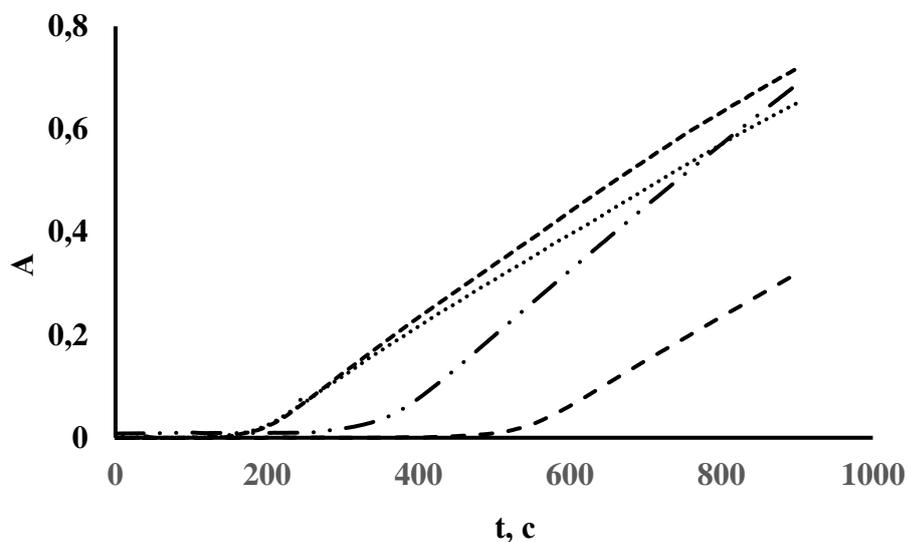


Рис. 3.9 Криві накопичення $ABTS^{*+}$ в реакції з $K_2S_2O_8$ у присутності 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину.

$$C_{\text{count}} = 3,3 \times 10^{-6} \div 1,7 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T - 293K; \lambda = 734 \text{ нм}$$

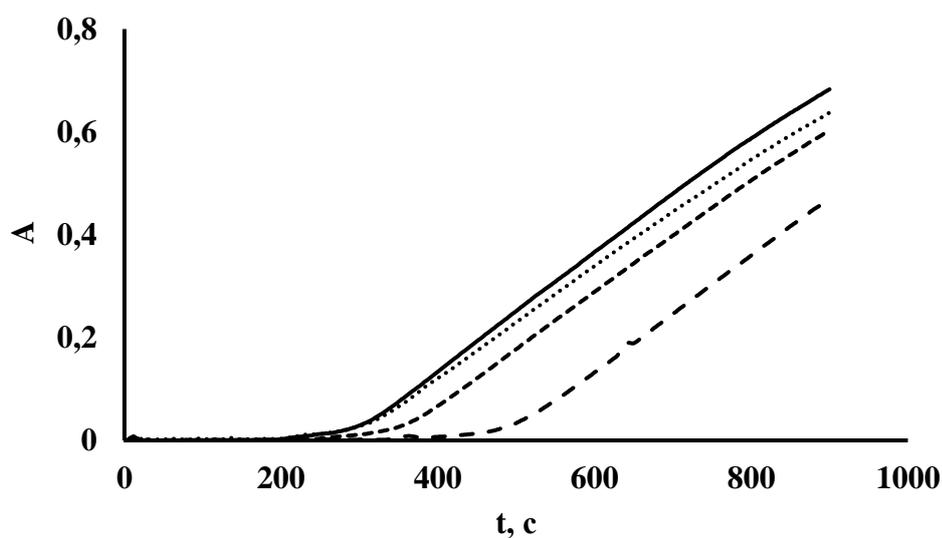


Рис. 3.10 Криві накопичення $ABTS^{*+}$ в реакції з $K_2S_2O_8$ у присутності 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

$$C_{\text{count}} = 2,6 \times 10^{-6} \div 1,0 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T - 293K; \lambda = 734 \text{ нм}$$

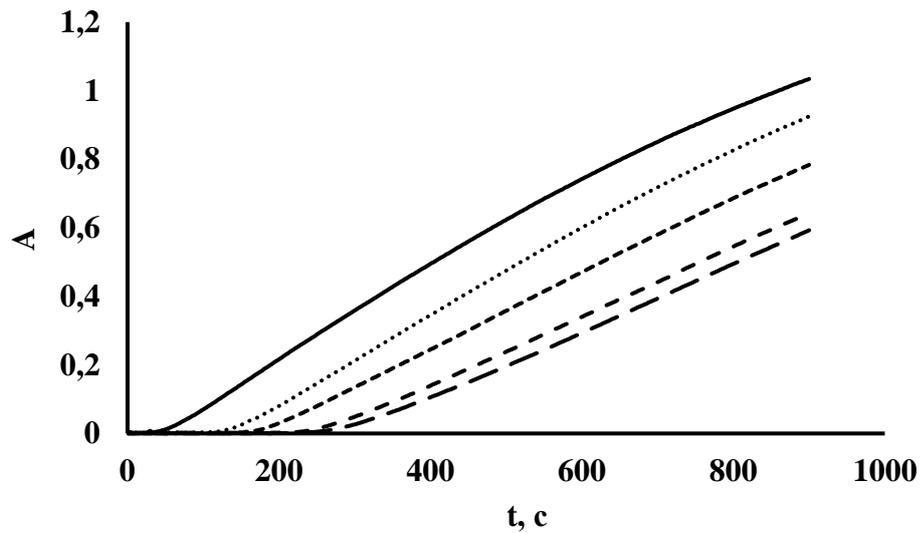


Рис. 3.11 Криві накопичення $ABTS^{\bullet+}$ в реакції з $K_2S_2O_8$ у присутності 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.

$$C_{сout} = 6.7 \times 10^{-6} \div 3.3 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } T - 293K; \lambda = 734 \text{ нм}$$

На рис. 3.12 наведена залежність між початковою концентрацією кумаринів і періодом індукції накопичення $ABTS^{\bullet+}$.

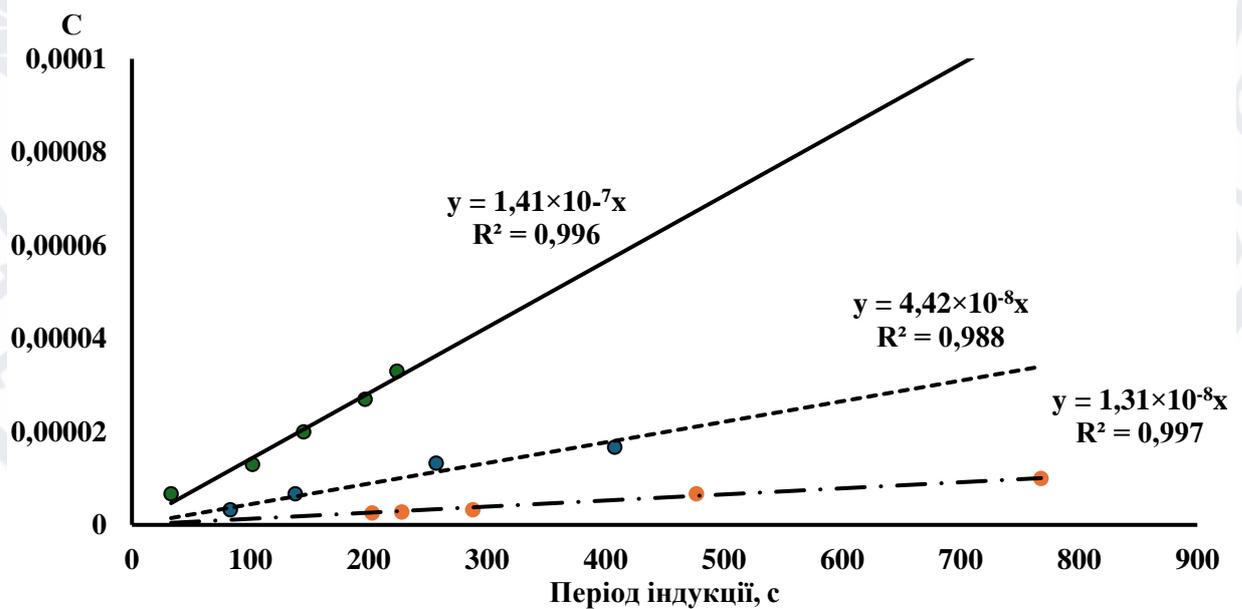


Рис. 3.12. Співвідношення між початковою концентрацією кумаринів і періодом індукції накопичення $ABTS^{\bullet+}$.

Як показано на рис. 3.12 між тривалістю періоду індукції і початковою концентрацією кумарину (в усіх трьох випадках) існує лінійна залежність, яка свідчить про те, що кумарин в періоді індукції витрачається з постійною швидкістю. Швидкість витрачання дорівнює швидкості генерування радикалів ABTS^{•+} в реакції з K₂S₂O₈. Сталість швидкості реакції обумовлена тим, що концентрація інгібітора на порядок менша концентрацій ABTS^{•+} і K₂S₂O₈ у реакційній суміші і протягом періоду індукції витрачається тільки інгібітор. Величини швидкості зародження радикалів ABTS^{•+} (V_i/f) та f^{red} в реакціях радикал-відновлювального інгібування наведені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Кінетичні параметри реакції інгібованого похідними 4-метилкумарину утворення катіон-радика ABTS^{•+}

Сполука	V_i/f , моль/л·с	f^{red}
6,7-дигідрокси-4-метилкумарин	$4.42 \cdot 10^{-8}$	1.13
6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин	$1.31 \cdot 10^{-8}$	3.8
7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин	$1.47 \cdot 10^{-7}$	0.35

Вважається, що значення f^{red} характеризує антирадикальну здатність вихідного антиоксиданту на відміну від величини f , значення якого виражає суму антирадикальної здатності вихідного антиоксиданту і продуктів його перетворення.

3.3 Визначення хелатуючої здатності кумаринів по відношенню до іонів Fe²⁺.

Як було показано вище ряд природних і синтетичних орто-дигідрокси-похідних 4-метилкумаринів проявляють потужні Fe²⁺-хелатуючі властивості [41], але в той же час можуть брати небажану участь у реакціях відновлення заліза до Fe²⁺, викликаючи при цьому продукцію гідроксильних радикалів та/або безпосереднє перекисне окислення ліпідів. Для визначення концентрації Fe²⁺ у реакційній суміші у присутності кумаринів часто застосовують так званий феррозиновий метод, який ґрунтується на

конкурентному зв'язуванні Fe^{2+} досліджуваною речовиною і стандартним хелатором Fe^{2+} – феррозином. Феррозин (3-(2-піридил)-5,6-дифеніл-1,2,4-триазин-4'-4''-дисульфокислоти натрієва сіль) – специфічний реагент, який утворює з іонами Fe^{2+} комплекс пурпурного кольору, який має максимум поглинання при 562 нм. Для порівняння хелатуючої здатності і підтвердження достовірності феррозинової методики ту ж реакцію проводили з ЕДТА. Як джерело Fe^{2+} використовували розчин FeSO_4 у свіжовиготовленій бідистильованій воді. Для запобігання швидкого відновлення Fe^{2+} у водному розчині киснем, розчиненим у воді, розчин сульфату заліза готували безпосередньо перед проведенням дослідів.

На рис. 3.13 наведена залежність хелатуючої здатності ЕДТА від концентрації ЕДТА у розчині.

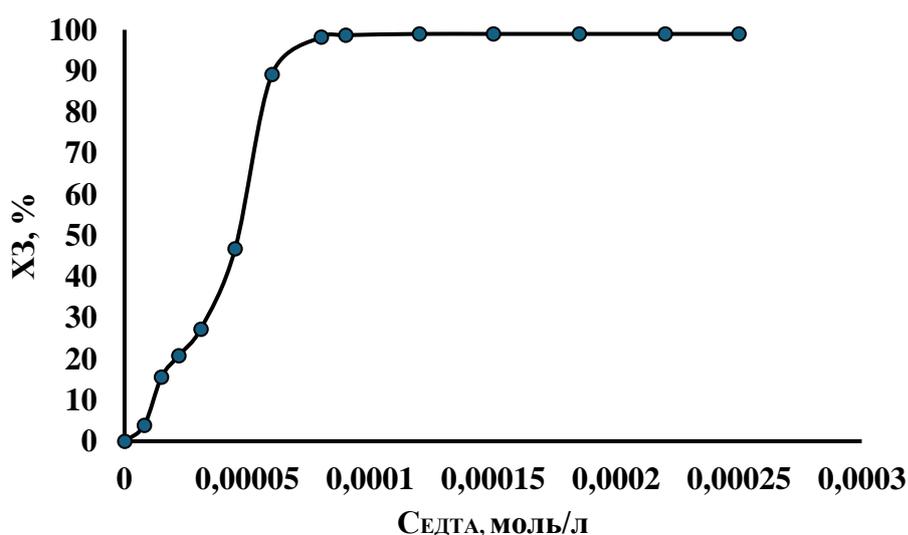


Рис. 3.13. Залежність хелатуючої здатності ЕДТА від концентрації ЕДТА у розчині.

Як видно з рис. 3.13 збільшення концентрації ЕДТА приводить до повного зв'язування іонів Fe^{2+} ЕДТА в реакції конкурентного зв'язування Fe^{2+} між ЕДТА і феррозином.

Проте за умов проведення експерименту жоден з досліджуваних кумаринів не виявив помітної (не більше 25%) хелатуючої Fe^{2+} здатності.

ВИСНОВКИ

In vitro досліджені антиоксидантні властивості трьох синтетичних дигідроксипохідних похідних 4-метилкумарину в реакціях їх взаємодії з вільними радикалами; оцінено їх здатність хелатувати іони Fe^{2+} . Визначені різні кількісні характеристики реакційної здатності кумаринів в реакції з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом і катіон-радикалом 2,2-азино-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти) ($ABTS^{*+}$). Показано, що 6,7-дигідрокси-4-метилкумарин, 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин і 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину є ефективними антиоксидантами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. UHPLC-MS/MS-GNPS based phytochemical investigation of *Dryopteris ramosa* (Hope) C. Chr. and evaluation of cytotoxicity against liver and prostate cancer cell lines / Zia-ur-Rehman et al. *Heliyon*. 2022. P. e11286. URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11286>
2. Ковальов, В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин : підручник для студ. вищих фармац. установ освіти та фармац. факультетів вищих мед. установ освіти III-IV рівнів акредитації / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова; за ред. : В. М. Ковальова. - Х.: Прапор; НФаУ, 2000.
3. Zamani Taghizadeh Rabe S., Iranshahi M., Mahmoudi M. In vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties of umbelliprenin and methyl galbanate. *Journal of Immunotoxicology*. 2015. Vol. 13, no. 2. P. 209–216. URL: <https://doi.org/10.3109/1547691x.2015.1043606>
4. Intestinal Anti-inflammatory Activity of Coumarin and 4-Hydroxycoumarin in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis / A. C. Luchini et al. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2008. Vol. 31, no. 7. P. 1343–1350. URL: <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1343>
5. Design, synthesis and pharmacological evaluation of omeprazole-like agents with anti-inflammatory activity / A. O. H. El-Nezhawy et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 21, no. 7. P. 1661–1670. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.070>
6. Antioxidative and Lipid Lowering Effects of 7,8-Dihydroxy-3-(4-methylphenyl) Coumarin in Hyperlipidemic Rats / B. Yuce et al. *Arzneimittelforschung*. 2011. Vol. 59, no. 03. P. 129–134. URL: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296375>
7. Effects of Visnadine on Rat Isolated Vascular Smooth Muscles / J. Duarte et al. *Planta Medica*. 1997. Vol. 63, no. 03. P. 233–236. URL: <https://doi.org/10.1055/s-2006-957660>

8. Huang, H.-C.; Lee, C.-R.; Weng, Y.-I.; Lee, M.-C.; Lee, Y.-T. Vasodilator effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) from a Chinese herb. *Eur. J. Pharmacol.* 1992, 218, 123–128.

9. The risk of overanticoagulation in patients with heart failure on coumarin anticoagulants / L. E. Visser et al. *British Journal of Haematology.* 2004. Vol. 127, no. 1. P. 85–89. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05162.x>

10. A pharmacological review of dicoumarol: An old natural anticoagulant agent / C. Sun et al. *Pharmacological Research.* 2020. Vol. 160. P. 105193. URL: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105193>

11. Natural and Synthetic 2,2-Dimethylpyranocoumarins with Antibacterial Activity / E. Melliou et al. *Journal of Natural Products.* 2005. Vol. 68, no. 1. P. 78–82. URL: <https://doi.org/10.1021/np0497447>

12. Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea* / C.-M. Wang et al. *Journal of Asian Natural Products Research.* 2009. Vol. 11, no. 9. P. 783–791. URL: <https://doi.org/10.1080/10286020903158964>

13. HIV inhibitory natural products. Part 7. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum* / Y. Kashman et al. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1992. Vol. 35, no. 15. P. 2735–2743. URL: <https://doi.org/10.1021/jm00093a004>

14. Evaluation of anti-Alzheimer activity of synthetic coumarins by combination of in vitro and in silico approaches / I. E. Orhan et al. *Chemistry & Biodiversity.* 2022. URL: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200315>

15. Anticonvulsant and acute neurotoxic effects of imperatorin, osthole and valproate in the maximal electroshock seizure and chimney tests in mice: A comparative study / J. J. Luszczycki et al. *Epilepsy Research.* 2009. Vol. 85, no. 2-3. P. 293–299. URL: <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.03.027>

16. Inhibitory Effects of Coumarins from the Stem Barks of *Fraxinus rhynchophylla* on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells / E. Shin et

al. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2010. Vol. 33, no. 9. P. 1610–1614.
URL: <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1610>

17. Anticancer effects of isofraxidin against A549 human lung cancer cells via the EGFR signaling pathway / H. Zhang et al. *Molecular Medicine Reports*. 2018.
URL: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8950>

18. Coumarins in Food and Methods of Their Determination / M. Lončar et al. *Foods*. 2020. Vol. 9, no. 5. P. 645. URL: <https://doi.org/10.3390/foods9050645>

19. Safety Assessment of Osthole Isolated from *Prangos ferulacea*: Acute and Subchronic Toxicities and Modulation of Cytochrome P450 / Y. Shokoohinia et al. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2017. Vol. 12, no. 3.
URL: <https://doi.org/10.5812/jjnpp.63764>

20. Safety evaluation of auraptene in rats in acute and subacute toxicity studies / T. Vakili et al. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017. Vol. 91. P. 159–164. URL: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.025>

21. Hepatotoxicity induced by psoralen and isopsoralen from *Fructus Psoraleae*: Wistar rats are more vulnerable than ICR mice / Y. Wang et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2019. Vol. 125. P. 133–140.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.047>

22. Brancheau, D., Patel, B., and Zughaib, M. (2015). Do Cinnamon Supplements Cause Acute Hepatitis? *Am. J. Case Rep.* 16, 250–254.
doi:10.12659/AJCR.892804

23. Yarnell E., Abascal K. *Plant Coumarins: Myths and Realities*. *Alternative and Complementary Therapies*. 2009. Vol. 15, no. 1. P. 24–30.
URL: <https://doi.org/10.1089/act.2009.15104>

24. Oral adverse reactions due to cinnamon-flavoured chewing gums consumption / G. Calapai et al. *Oral Diseases*. 2013. Vol. 20, no. 7. P. 637–643.
URL: <https://doi.org/10.1111/odi.12170>

25. Toxicity evaluation of sulfamides and coumarins that efficiently inhibit human carbonic anhydrases / A. Aspatwar et al. *Journal of Enzyme Inhibition and*

Medicinal Chemistry. 2020. Vol. 35, no. 1. P. 1765–1772.

URL: <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1822829>

26. Osthole inhibited the activity of CYP2C9 in human liver microsomes and influenced indomethacin pharmacokinetics in rats / H. He et al. *Xenobiotica*. 2020. Vol. 50, no. 8. P. 939–946. URL: <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1734882>

27. Therapeutic Goods Administration (2019). Australian Government, Department of Health, Therapeutic Goods Administration. Coumarin for Use in Topical Listed Medicines. Available at: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/safety-review-coumarin-listed-medicines.pdf>

28. Костюк В.А., Потапович А.І. Біорадикали і біоантиоксиданти. Мн: БГУ, 2004. С. 106.

29. Schaich K. M., Tian X., Xie J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*. 2015. Vol. 18. P. 782–796. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>

30. Новий підхід до визначення антирадикальної ємності поліфенолів в реакції з катіон-радикалом 2,2'-азинобіс-(3-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) / В. В. Одарюк, Г. К. Сігаєва, Л. В. Каніболоцька, О. О. Зосенко, О. М. Шендрик // Вісник Донецького національного університету імені Василя Стуса. Серія хімічні науки. 2017. № 1. С. 25–31

31. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 26, no. 9-10. P. 1231–1237. URL: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

32. Mikami-Konishide I. Oxygen Radical Absorbance Capacity. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 2011. Vol. 58, no. 9. P. 470. URL: <https://doi.org/10.3136/nskkk.58.470>

33. Pohanka M. Assays of Antioxidant Capacity: Optics and Voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*. 2023. P. 100276. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100276>

34. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) / R. Apak et al. *Pure and Applied Chemistry*. 2013. Vol. 85, no. 5. P. 957–998. URL: <https://doi.org/10.1351/pac-rep-12-07-15>
35. Gulcin İ., Alwasel S. H. Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method. *Processes*. 2022. Vol. 10, no. 1. P. 132. URL: <https://doi.org/10.3390/pr10010132>
36. Coumarins as Antioxidants / I. Kostova et al. *Current Medicinal Chemistry*. 2011. Vol. 18, no. 25. P. 3929–3951. URL: <https://doi.org/10.2174/092986711803414395>
37. Evidence on the Carcinogenicity of Coumarin. OFFICE OF ENVIRONMENTAL HEALTH HAZARD ASSESSMENT, 2017. P. 39–42.
38. Antioxidant activity of 4-methylcoumarins / J. Z. Pedersen et al. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007. Vol. 59, no. 12. P. 1721–1728. URL: <https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0015>
39. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in in vitro cell-free systems / G. Morabito et al. *Biochimie*. 2010. Vol. 92, no. 9. P. 1101–1107. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.017> (date of access: 23.05.2024).
40. 4-Methylcoumarins as antioxidants: Scavenging of peroxy radicals and inhibition of human low-density lipoprotein oxidation / F. Natella et al. *Biochimie*. 2010. Vol. 92, no. 9. P. 1147–1152. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.019>
41. In vitro interactions of coumarins with iron / P. Mladěnka et al. *Biochimie*. 2010. Vol. 92, no. 9. P. 1108–1114. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.025>.
42. Therapeutic potential of 4-substituted coumarins: A conspectus / M. Sharma et al. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2022. P. 100086. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100086>
43. Amir Moazzen, Nesrin Oztinen, Ezgi Ak-Sakalli, Müberra Kos Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from

different classes // Heliyon 8 (2022) e10467

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10467>

44. Ayat B. Al-Ghafari, Ayat M. Shrbaji, Lanya A. Al-Sarori. Phenolic contents and antioxidant activities of green tea with and without lemon. Natural Science. 2016. 8. P. 247-255.

45 Srividhya V*, Sengottuvel Thangavel, Gopala Satheeskumar K, Kanupriya J, Arihara Sivakumar G. Antioxidant potential and Phytochemical analysis of fruit extract of *Cucurbita pepo* Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci. (2019). 6(3): 22-32 DOI: <http://dx.doi.org/10.22192/ijcrps.2019.06.03.003>

46 Dietary quercetin glycosides: Antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells // Gary Williamson et al/ Carcinogenesis vol.17 no. 11 pp.2385-2387 DOI: 10.1093/carcin/17.11.2385 Source: PubMed