УДК 615.282:615.31'792-047.37/38 DOI:10.46847/ujmm.2024.1(5)-094

IN SILICO ДОСЛІДЖЕННЯ 4-((5-(ДЕЦИЛТІО)-4-МЕТИЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)МЕТИЛ) МОРФОЛІНУ ТА ЙОГО АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ

М.В. Оглобліна [1], І.В. Бушуєва [2], О.П. Шматенко [3], В.В. Парченко [2], Т.В. Хортецька [2], О.В. Плєшкова [3]

[1] Чорноморський національний університет імені Петра Могили, м. Миколаїв, Україна
[2] Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, Україна
[3] Українська військово-медична академія, м. Київ, Україна

Вступ. *Сучасний процес створення оригінальних ліків охоплює широкий спектр досліджень, у тому числі післяреєстраційних. У 2022 році на ветеринарному ринку лікарських препаратів України з'явився сучасний оригінальний вітчизняний ветеринарний препарат у вигляді 10% лініменту «Ветмікодерм». Діюча речовина препарату належить до похідних 1,2,4-триазолу - (4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфолін). Похідні 1,2,4-триазолу відомі як малотоксичні біологічно активні сполуки для лікування дерматологічних захворювань, активність яких залежить від фармакофорних замісників. Подальше дослідження препарату «Ветікодерм» є доцільним для розширення показань та вдосконалення препарату.*

Мета роботи – *проведення in silico дослідження 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну, а також його вплив на деякі штами мікроорганізмів, що в комплексі може розширити перелік показань до застосування препарату «Ветмікодерм 10 %».*

Матеріали та методи. *Структуру 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну намальовано і переведено у форматі SMILES за допомогою MarvinSketch. Прогноз білкових мішеней біоактивного ліганду проводився на базі веб-сервісу Galaxy. Дослідження антимікробних властивостей 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну проведені на 13 штамах мікроорганізмів за температури 37°С. Гравіметричні вимірювання виконували на лабораторних електронних аналітичних вагах моделі ESJ-200-4 (США).*

Результати. *Структура ліганду 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну перетворено у формат SDF за допомогою OpenBabel. Ліганд додатково піддавали мінімізації енергії за допомогою Chimera. Рентгенівські кристалічні структури білків з спільно кристалізованими лігандами були отримані з Protein Data Bank (PDB). Для виконання дослідження стикування білка та лігандів та їх конвертації у формат pdbqt використовувався плагін DockingPie Vina в PyMOL. Для підтвердження протоколу докінгу було проведено валідацію. Для генерації зображень комплексів рецептор-ліганд були використані програми PyMOL v.2.5 та Discovery Studio Visualizer. Докінг-дослідження 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну проводили на шести обраних ферментах та білках. Докінг показав, що сполука має потенціал для зв'язування з тимідин кіназою (PDB: 4IVR) при енергії зв'язку -7.292 kcal/mol (0.348 μM), з тіамін фосфат синтазою (PDB: 1G6C) та біотин карбоксилазою (PDB: 2W6O) з енергією зв'язку -7.221 та -6.074 kcal/mol відповідно. Було досліджено антибактеріальну активність 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну in vitro за стандартною добре відомою методикою. Усі концентрації дослідного зразку (0,1; 0,5 та 1,0%) володіють бактерицидною дією проти Staphylococcus aureus UNCSM-017 (11,5; 14,7 та 16,5 мм) у порівнянні з контролем (Стрептоміцин, 16,2 мм). Визначено бактеріостатичну дію 1,0% розчину дослідного зразка на польовий штам Pseudomonas aeruginosa (6,3 мм). Повільна зона затримки росту 0,5 та 1,0% зразка сполуки на Bacillus subtilis ATCC №6633 (4,0; 4,1 мм) проти контролю (11,9 мм).*

Висновки. *Біоактивний ліганд вірогідно може проявляти антибактеральну та противірусну дію через інгібування молекулярних і біологічних процесів патогенних організмів. Обрані цільові мішені мали прийнятні режими зв'язування з 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліном, не утворювали небажаних контактів та взаємодіяли з деякими критично важливими амінокислотними залишками, що дає підставу використовувати їх в подальшому віртуальному скринінгу, комп'ютерному моделюванні та більш поглиблених in vitro та in vivo дослідженнях. Встановено, що 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфолін може конкурувати зі стрептоміцином, бактерицидно діючи на кріогенні штами мікроорганізмів, культивованих на середовищі за температури 37 °С: Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, бактеріостатично проти Klebciella rhinoscleromatis, Escherichia coli та Pseudomonas aeruginosa. 4-((5-(Децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфолін може бути рекомендований для подальших досліджень проти мультирезистентних штамів цих мікроорганізмів.*

Ключові слова: *1,2,4-триазол, in silico дослідження, комп`ютерне моделювання, антимікробна дія, протигрибкова дія, прогноз біологічної активності.*

Вступ. Сучасні підходи щодо створення оригінальних ліків доводять тривалість цього процесу, який охоплює знання багатьох напрямів сучасної фармацевтичної науки [1]. Органічна хімія в цьому процесі займає головне місце [2, 3]. Також слід зазначити, що гетероциклічна система 1,2,4-триазолу та її похідні добре відомі як біологічно активні сполуки, антикорозійних засобів, пластифікатори пластмас, регулятори росту рослин тощо [4, 5]. Похідні 1,2,4-триазолу є малотоксичними сполуками, їх властивості залежать від наявності різних фармакофорних замісників [6, 7]. Сучасним методом дослідження на сьогодні можна вважати комп'ютерне моделювання та прогноз активності. У 2022 році на ветеринарному ринку лікарських препаратів України з'явився «Ветмікодерм» – сучасний оригінальний вітчизняний ветеринарний препарат у вигляді 10% лініменту (*РП № АВ-09522-01-21 від 14.02.2022*) [8, 9]. Діюча речовина препарату належить до похідних 1,2,4-триазолу - (4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфолін). Він застосовується для лікування дерматологічних хвороб домашніх тварин [10, 11]. Подальші поглиблені дослідження цієї сполуки з метою вдосконалення препарату є актуальними, мають теоретичну і практичну значимість.

Метою нашої роботи було проведення *in silico* дослідження 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну, а також його вплив на деякі штами мікроорганізмів, що в комплексі може розширити перелік показань до застосування препарату «Ветмікодерм 10 %».

Матеріали і методи дослідження. *Прогноз білкових мішеней.* Структуру 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну намальовано і переведено у форматі SMILES за допомогою MarvinSketch, яка є у вільному доступі. конкатеновану підмножину ePharmaLib, що представляє різні білкові мішені було отримано через базу даних Zenodo. Прогноз білкових мішеней біоактивного ліганду проводився на базі веб-сервісу Galaxy, і включав декілька етапів:

- створення файлу структури ліганду в форматі SMILES та подальша його гідратація.
- створення набору з 46 мінімізованих енергетичних конформерів для запитуваного ліганду.
- завантаження в веб-сервіс набору даних ePharmaLib в форматі phar.
- поділ ePharmaLib на окремі фармакофори, для пришвидшення аналізу шляхом виконання кількох паралельних вимірювань. Вирівнювання фармакофора, де набір даних конформера 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну перетворюється в набір даних фармакофора і одночасно вирівнюється за окремими фармакофорами набору даних ePharmaLib.
- конкатенація балів вирівнювання фармакофорів та ранжування прогнозованих білкових цілей за індексом Тверського. Чим вищий індекс Тверського, тим вища ймовірність передбачуваної взаємодії білок–ліганд.

Дослідження in vitro. Дослідження антимікробних властивостей 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну проведені на 13 штамах мікроорганізмів за температури 37°С. Звільнення оброблених бактерій від дослідного дезінфектанту проводили шляхом їхнього відмивання стерильним фізіологічним розчином з подальшим осадженням бактерій центрифугуванням за 3 тис. об/хв упродовж 5 хв. Надосадову рідину зливають, осад ресуспендують в 4,5 см^3 стерильного фізіологічного розчину з трьохразовою повторюваністю центрифугування за означеного режиму. Після останнього центрифугування осад бактерій ресуспендують в 4,5 см^3 стерильного фізіологічного розчину до початкової концентрації для подальшого проведення посівів. Для визначення результатів активності бактерицидної дії робочих концентрацій дослідного дезінфікуючого засобу у масових концентраціях 0,1; 0,5; 1% на тестові бактерії та підтвердження відсутності бактеріостатичного ефекту у останніх, ресуспендований осад відмитих бактерій кожної із тестових культур висівають на чашки Петрі з твердим селективним агаром (ТСА) у трьох повторюваностях у об'ємі по 0,1см^3 та інкубують упродовж 24 год за температурного режиму 37±1,0°С. Гравіметричні вимірювання виконували на лабораторних електронних аналітичних вагах моделі ESJ-200-4 (США).

Позитивним контролем слугував 1,0% розчин стрептоміцину (Streptomycin S ^{300},

«UKRAINIAN JOURNAL OF MILITARY MEDICINE» (1. 2024, Vol. 5) ‡‡‡

Himedia). Результати випробувань досліду суспензійним методом оцінюють через 24 год культивування в термостаті за наявністю або відсутністю росту тестових мікроорганізмів на твердих поживних середовищах, порівнюючи з типовим ростом відповідних тест-культур у контролі росту. Ефективною вважають концентрацію дослідного дезінфікуючого засобу, за якої тричі повторений дослід за відповідної експозиції часу (30 хв) забезпечував відсутність росту тестових мікроорганізмів на твердих поживних середовищах за наявності типового росту тест-культур у контролях росту (негативний контроль).

Результати та їх обговорення. *Протокол докінгу.* Структура ліганду 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну перетворено у формат SDF за допомогою OpenBabel. Ліганд додатково піддавали мінімізації енергії за допомогою Chimera. Рентгенівські кристалічні структури білків з спільно кристалізованими лігандами були отримані з Protein Data Bank (PDB). Для підготовки структури білка було видалено співкристалізовані молекули ліганду та води, а також додано полярні атоми водню та об'єднані заряди атомів Колмана. Для виконання дослідження стикування білка та лігандів та їх конвертації у формат *pdbqt* використовувався плагін DockingPie Vina в PyMOL. Для підтвердження протоколу докінгу було проведено валідацію.

З попередніх досліджень відомо, що значення середньоквадратичного відхилення позицій атомів (RMSD), яке відображає різницю між розрахованою та кристалографічною конформацією лігандного комплексу, не повинно перевищувати 2,0 Å. Після проведення ре-докінгу було досягнуто подібність у перекритті між кристалографічними (орієнтація + конформація, блакитний колір) та розрахунковими (жовтий колір) позиціями, що підтверджує низьке значення RMSD (рис. 1).

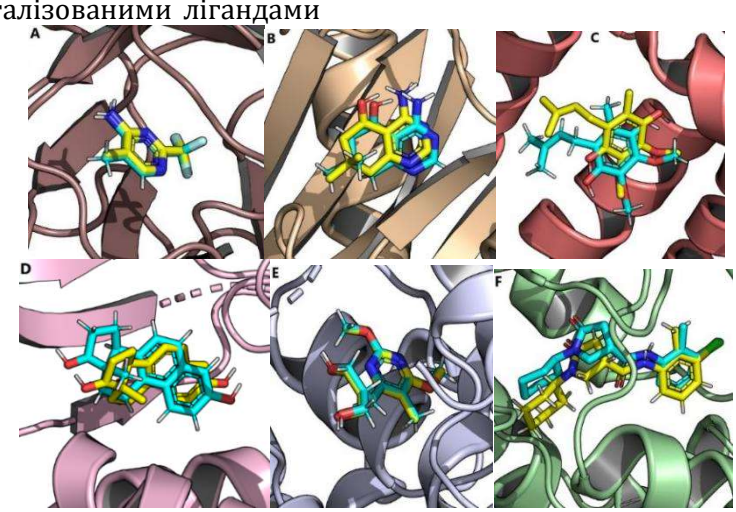

Рисунок 1. Білки в комплексах з розрахованою та експериментальною конформацією лігандів: 1G6C (A), 2W6O (B), 3G7F (C), 3OWU (D), 4IVR (E), 4TZT(F).

Для генерації зображень комплексів рецептор-ліганд були використані програми PyMOL v.2.5 та Discovery Studio Visualizer. Оцінку передбачуваної інгібіторної константи (pKi) проводили за допомогою наступного стандартизованого рівняння.

$$pKi = 10^{[\frac{\text{оцінка енергії зв'язку}}{1.336}]}$$

Поліфармакологічне профілювання біоактивної сполуки з використанням 15148 фармакофорів згенерувало колекцію у 1954 вихідних файлів, з яких було відібрано 14 найкращих моделей чий показник збігу (індекс Тверського) перевищував значення 0.900 і відповідав ймовірності >90%. Міра TANIMOTO використовується для порівняння бітових векторів і широко використовується для оцінки подібності між фармакофорами. З іншого боку, міра TVERSKY_DB використовується для ідентифікації сполук в базі даних, які мають фармакофор, що є підмножиною еталонного фармакофора.

За результатами прогнозування можна виділити 5 біомішеней, які відповідають за специфічні молекулярні функції та біологічні процеси в організмах бактерій: тіамін фосфат синтаза (PDB: 1G6C) *Bacillus subtilis* інгібування якої спричиняє порушення балансу вітаміну B1; біотин карбоксилаза (PDB: :2W6O) організму *Escherichia coli*, яка каталізує перший відповідний крок у шляху біосинтезу жирних кислот; фотосинтетичний реакційний центр (PDB: 3G7F) *Blastochloris viridis*, що здійснює світловий

транспорт електронів через фотосинтетичну мембрану; кетостероїдна ізомераза (PDB: 3OWU) *Pseudomonas putida*; еноіл редуктаза (PDB: 4TZT) бактерії *Mycobacterium Tuberculosis,* яка беруть участь у циклі елонгації мікобактеріальних жирних кислот, і є ефективною антимікробною мішенню. До того ж, була присутня одна біомішень вірусу – тимідин кіназа (PDB: 4IVR) *Human alphaherpesvirus* (штам 17), яка каталізує фосфорилювання тимідину (dT) до тимідилату (dTMP).

Подальшим етапом було проведення докінг-дослідження 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну на шести обраних ферментах та білків. Було оцінено міжмолекулярні взаємодії між лігандами порівняння / дослідним лігандом і рецептором-мішенню, для визначення і порівняння профілів стикування. Результати дослідження, включаючи афінність зв'язування та константи інгібування (pKi). За результатами докінгу було відібрано 3 кращих структурних комплексів, оцінка афінності зв'язування дослідного ліганду яких перевищувала ліганди порівняння. Докінг показав, що сполука має потенціал для зв'язування з тимідин кіназою (PDB: 4IVR) при енергії зв'язку -7.292 kcal/mol (0.348 μM), з тіамін фосфат синтазою (PDB: 1G6C) та біотин карбоксилазою (PDB: 2W6O) з енергією зв'язку -7.221 та -6.074 kcal/mol відповідно. До того ж, прогнозовані значення концентрації інгібування мішеней для досліджуваного ліганду були в два рази менші ніж для лігандів порівняння.

Створення моделі 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну з тимідин кіназою 4IVR. Розташування сполуки у активному сайті білка обумовлено взаємодією із ключовими залишками в кишені активного центру (рис. 2): AGR163, GLU83, TYR172. Для сполуки 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну профіль зв'язування з тимідин кіназою був дещо схожий на взаємодію 2-[(2,6-Dimethoxy-5-methylpyrimidin-4-yl)methylidene]propane-1,3-diol з цільовим білком, а саме π-π стекінг з TYR172, та водневі контакти з амінокислотою AGR163 (1,8-2,4 Å). Однак на відміну від референс ліганду, досліджувана сполука утворює слабкий Н-зв'язок з GLU83 (3,8 Å). π-Гідрофобні зв'язки спостерігались для багатьох інших залишків амінокислот:

- TYR172 зв'язувалась шляхом π-сульфур контакту з тіометиленовою групою.
- ароматичний 1,2,4-триазольний гетероцикл формував π-π стекінг з HIS58, та π-π Т-подібний стекінг з TPR88.
- залишок децилу біоактивної сполуки взаємодіяв з ароматичним гидроксифенилом TYR172 та TYR101 через π-алкільний зв'язок.

Амінокислотні залишки MET128, ALA168, ILE100, ILE97 утворювали міжмолекулярний алкільний зв'язок з децильним радикалом.

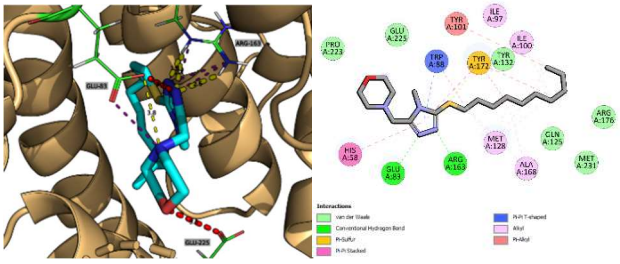

Рисунок 2. Двовимірна та трьохвимірна модель взаємодії зв'язування сполуки після розрахунків докінгу в кишені зв'язування тимідин кінази.

Створення моделі 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну з фосфат синтазою (1G6C). Наступний комплекс який використовувався для віртуального скринінгу був 1G6C. Для стабілізації конформації приймає участь традиційний водневий зв'язок між оксигеном морфоліну та GLU111 (2.4 Å), а також карбон водневі зв'язки між нітрогеном 1,2,4-триазолу та PRO152 (2.5 Å), метиленовим лінкером та ASP161 (3.4 Å) (рис. 3).

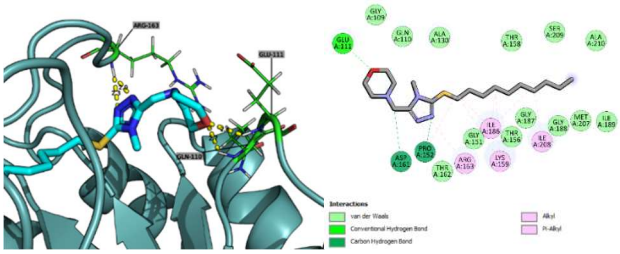

Рисунок 3. Графічне зображення пози зв'язування та взаємодії *4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну* з тіамін фосфат синтазою

Для амінокислотного залишку PRO152 був характерний π-алкільний зв'язок з ароматичною π-системою 1,2,4-триазолу та звичайний алкільний зв'язок з децильним радикалом. До того ж, децильний радикал формував велику кількість гідрофобних алкільних зв'язків з ILE186, ILE208, LYS159, AGR163.

Створення моделі 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну з біотин карбоксилазою (2W6O). Взаємодія 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну з протеазою продемонструвала високу

афінність зв'язування, оскільки при формуванні зв'язку брали участь критично важливі амінокислотні залишки: HIS209, GLN233, LEU278, LEU204, ILE157. Профіль стикування характеризується трьома карбон водневими зв'язками: метильний радикал в четвертому положенні 1,2,4-триазола формує Н-зв'язок з HIS209 та GLN233, нітроген 1,2,4-триазола має контакт з залишком GLY165. Поляризуюча π-електронна хмара ароматичного кільця 1,2,4-триазола взаємодіяла з GLU через π-аніон зв'язок та з HIS209 шляхом π-π стекінгу (рис. 4).

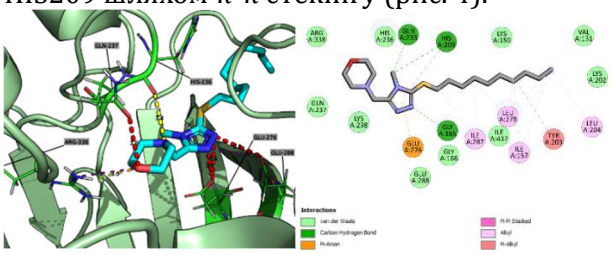

Рисунок 4. 2D та 3D поверхня взаємодії гідрофобних і Н-зв'язків для ліганду 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліну та біотин карбоксилази

У свою чергу децильний радикал утворював алкільні взаємодії з залишками LEU204, LEU278, ILE287, ILE157, а також формує π-алкільний зв'язок з ароматикою TYR203.

У подальшому нами було досліджено антибактеріальну активність 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну *in vitro* за стандартною добре відомою методикою [6]. Після 24 годин інкубації вимірювали діаметр зони пригнічення росту культури за допомогою шаблону для вимірювання розміру зон пригнічення росту мікроорганізмів (Antibiotic Zone Scale-C, модель PW297, Індія) та програми TpsDig2 (2016, F. James Rohlf). Дані в таблицях представлені у вигляді x ± 1,96 • SD. Антибактеріальну дію 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну на штами мікроорганізмів родини Enterobacteriaceae *in vitro* через 24 год культивування в термостаті узагальнено в таблиці 1.

Таблиця 1

Антибактеріальна дія 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну на штами мікроорганізмів родин Enterobacteriaceae та Enterococcaceae (24 год)

Штами мікроорганізмів	Концентрація,%			Контроль*
	0,1	0,5	1,0	1,0
Enterobacter cloacae	6,1±0,2	9,8±0,1	10,5±0,2	10,6±0,1
Enterobacter aerogenes	3,1±0,1	7,2±0,2	9,5±0,3	12,2±1,3
Enterococcus faecium	2,1±0,2	2,3±0,4	6,5±0,3	7,1±0,4
Enterococcus faecalis	2,5±0,1	4,3±0,2	7,1±0,5˙	4,2±0,3
Klebciella ozaenae	2,1±0,1	2,2±0,2	2,2±0,1	15,3±1,4
Klebciella rhinoscleromatis	6,1±0,3	7,2±0,4	7,2±0,6	10,1±0,5
Morganella morganii	2,2±0,1	4,3±0,1	6,5±0,2	14,0±2,1
Proteus vulgaris	7,5±0,5	7,9±0,9	11,3±0,3˙	6,1±0,9
Proteus vulgaris HX19№222	7,5±0,7	10,1±1,2	10,2±1,4	14,6±1,8
Escherichia coli ATCC № 25923	5,2±0,5	5,3±0,4	6,5±0,2	8,2±0,3
Salmonella typhimurium UNCSM-014	3,1±0,4	5,7±0,6	6,6±0,8	9,2±0,7

Примітка: * Стрептоміцин (300.0 μg) використовували як позитивний контроль (Valle et al., 2015). (n = 3), ˙P<0,05

Нами виявлена бактерицидна дія робочих концентрацій 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну у масових концентраціях 0,5 та 1.0% препарату на *Enterobacter cloacae* (9,8 та 10,5 мм), *Enterobacter aerogenes* (7,2 та 9,5 мм), *Klebciella rhinoscleromatis* (7,2 мм), *Proteus vulgaris* HX19№222 (10,1 та 10,2 мм), *Salmonella typhimurium* UNCSM-014 (5,7; 6,6 мм). Визначено помірну антибактеріальну ефективність при застосуванні 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну на *Escherichia coli* ATCC №25923 концентрацій 0,1; 0,5 та 1,0% (5,2; 5,3 та 6,5 мм) відповідно. Препарат 1,0% концентрації стримує ріст польових штамів *Enterococcus faecium* та *Morganella morganii* (зона затримки росту по 6,5 мм).

Визначена висока інгібуюча властивість зазначеної сполуки на *Enterococcus faecalis* Так

0,5% розчин вже перевищував контроль (4,3 проти 4,2 мм), а 1,0% має вірогідну різницю (P<0,05). Також доведено бактерицидний вплив 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну на польовий епізоотичний штам *Proteus vulgaris*: усі концентрації препарату перевищували контроль (7,5; 7,9 мм), а 1,0% навіть з вірогідністю (11,3 мм, P<0,05). Не виявлено бактеріостатичної дії 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну на *Klebciella ozaenae* (2,1-2,2 мм проти контролю 15,3 мм). Результати, наведені в табл. 2, засвідчили високу інгібуючу властивість 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну на штами мікроорганізмів родини Staphylococcaceae. Усі концентрації дослідного зразку (0,1; 0,5 та 1,0%) володіють бактерицидною дією проти *Staphylococcus aureus* UNCSM-017 (11,5; 14,7 та 16,5 мм) у порівнянні з контролем (Стрептоміцин, 16,2 мм). Визначено бактеріостатичну дію 1,0% розчину дослідного зразка на польовий штам *Pseudomonas aeruginosa* (6,3 мм). Повільна зона затримки росту 0,5 та 1,0% зразка сполуки на *Bacillus subtilis* ATCC №6633 (4,0; 4,1 мм) проти контролю (11,9 мм).

Таблиця 2

Антибактеріальна дія 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну на штами мікроорганізмів родин Staphylococcaceae, Pseudomonadaceae та Bacillaceae (24 год)

Штами мікроорганізмів	Концентрація,%			Контроль*
	0,1	0,5	1,0	1,0
Staphylococcus aureus UNCSM-017	11.5±1.3	14.7±1.0	16.5±0.9	16.2±1.8
Pseudomonas aeruginosa	4.1±0.8	4.2±0.6	6.3±0.5	12.2±1.3
Bacillus subtilis ATCC № 6633	0.0±0.0	4.0±0.5	4.1±0.7	11.9±1.2

Примітка: * Стрептоміцин використовували як позитивний контроль (Valle et al., 2015). (n = 3)

Висновки

Аналізуючи результати профілів зв'язування, які спостерігаються для вибраних комплексів з активними центрами, можна зробити висновок, що біоактивний ліганд вірогідно може проявляти антибактеріальну та противірусну дію через інгібування молекулярних і біологічних процесів патогенних організмів. Обрані цільові мішені мали прийнятні режими зв'язування з 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфоліном, не утворювали небажаних контактів та взаємодіяли з деякими критично важливими амінокислотними залишками, що дає підставу використовувати їх в подальшому віртуальному скринінгу, комп'ютерному моделюванні та більш поглиблених *in vitro* та *in vivo* дослідженнях.

Встановлено, що 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфолін може конкурувати зі стрептоміцином, бактерицидно діючи на кріогенні штами мікроорганізмів, культивованих на середовищі за температури 37 °С: *Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus*, бактеріостатично проти *Klebciella rhinoscleromatis, Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa.* 4-((5-(Децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфолін може бути рекомендований для подальших досліджень проти мультирезистентних штамів цих мікроорганізмів.

Перспективи подальших досліджень. Планується продовжити дослідження 4-((5-(децилтіо)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)-метил)морфоліну з метою створення нових вітчизняних лікарських засобів для потреб ветеринарії.

Література

1. Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. 2020. Vol. 25, №6. URL: https://doi.org/10.3390/molecules25061340.

2. Kabir A., Muth A. Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. *Pharmacological Research.* 2022. Vol. 176. URL: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106055

3. ePharmaLib: A Versatile Library of e-Pharmacophores to Address Small-Molecule (Poly-)Pharmacology / A. F. A. Moumbock, J. Li, H. T. T. Tran et al. *J Chem Inf Model*. 2021. Vol. 61, № 7. P. 3659-3666. URL: https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00135

4. sc-PDB: a 3D-database of ligandable binding sites-10 years on / Desaphy J., Bret G., Rognan D., Kellenberger E. *Nucleic Acids Research.* 2015. Vol. 43, Database issue D399–D404. URL: https://doi.org/10.1093/nar/gku928

5. Parchenko V.V. Synthesis, physico-chemical and biological properties of the 1,2,4-triazole-3-thione 5-furilderivatives: *Dis .... Dr. of Pharm. Sciences*. Zaporizhya, 2014; P. 361.

6. Antimicrobial Activity of Some Furans Containing 1,2,4-Triazoles / Zazharskyi V., Bigdan O., Parchenko V., Parchenko M. *Archives of Pharmacy Practice*. 2021. Vol. 12, Is. 2. P. 60-65. URL: https://doi.org/10.51847/RbJb3waUBB

7. Bigdan O. A., Parchenko V. V., Kyrychko B. P. Test of antimicrobial activity of morpholine 2- (5- (3-fluorophenyl) -4-amino-1,2,4-triazol-3-ilthio)acetate (BKP-115) by experimental model of pancreatitis in rats. *Ukrainian Journal of Ecology.* 2020. № 10(3). P. 201-207. URL: https://doi.org/10.15421/2020_155

8. Impact of 1,2,4-thio-triazole derivative-based liniment on morphological and immunological blood parameters of dogs suffering from dermatomycoses / Hunchak V. M. et al. *Regul. Mech. Biosyst*. 2020. Vol. 11, №2. P. 294-298. URL: https://doi.org/10.15421/022044

9. Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine / Shcherbyna R., Parchenko V., Martynyshyn V., Hunchak V. *J. Fac. Pharm. Ankara*. 2018. № 42 (1). P. 43-52. URL: https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000601

10. Advanced research for physico-chemical properties and parameters of toxicity piperazinium 2-((5-(furan-2-YL)-4-phenyl-4H-1, 2, 4-triazol-3-YL) THIO) acetate / Karpenko Y. et. al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* 2022. № 2(36), P. 18-25. URL: https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255848

11. Synthetic and biological aspects of studying the properties of 1, 2, 4-triazole derivatives / Khilkovets A. et al. *Scientific Journal of Polonia University*. 2022. Vol. 51, № 2. P. 324-331. URL: https://doi.org/10.23856/5138

References

1. Breijyeh, Z., Jubeh, B., Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6):1340. DOI: 10.3390/molecules25061340.

2. Abbas Kabir, Aaron Muth (2022). Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. *Pharmacological Research,* 176. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.106055

3. Moumbock, AFA, Li, J, Tran, HTT, Hinkelmann, R, Lamy, E, Jessen, HJ, Günther, S. (2021). ePharmaLib: A Versatile Library of e-Pharmacophores to Address Small-Molecule (Poly-)Pharmacology. *Journal of Chemical Information and Modeling* 61(7), 3659-3666. DOI:10.1021/acs.jcim.1c00135

4. Jeremy Desaphy, Guillaume Bret, Didier Rognan and Esther Kellenberger. (2015). sc-PDB: a 3D-database of ligandable binding sites––10 years on. *Nucleic Acids Research*, 43, 399-404. DOI: 10.1093/nar/gku928.

5. Parchenko, V.V. (2014). Synthesis, physico-chemical and biological properties of the 1,2,4-triazole-3-thione 5-furilderivatives: Dis .... *Dr. of Pharm. Sciences. Zaporizhya*, P. 361.

6. Zazharskyi ,V., Bigdan, O., Parchenko, V., Parchenko, M., Fotina, T., Davydenko, P., et al. (2021). Antimicrobial Activity of Some Furans Containing 1,2,4-Triazoles. *Archives of Pharmacy Practice*, 12(2), 60-65. DOI: 10.51847/RbJb3waUBB

7. Bigdan, O. A., Parchenko, V. V., Kyrychko, B. P., Zvenigorodska, T. V., Gutyj, B. V., Gunchak, A. V., Slivinska, L. G., Savchuk, L. B., Nazaruk, N. V., Kit, L. P., Dashkovskyy, O. O., & Guta, Z. A. (2020). Test of antimicrobial activity of morpholine 2-(5-(3-fluorophenyl) -4- amino-1,2,4-triazol-3-ilthio) acetate (BKP-115) by experimental model of pancreatitis in rats. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(3), 201-207. https://doi.org/10.15421/2020_155

8. Hunchak, V. M., Martynyshyn, V. P., Gutyj, B. V., Hunchak, A. V., Stefanyshyn, O. M., & Parchenko, V. V. (2020). Impact of 1,2,4-thio-triazole derivative-based liniment on morphological and immunological blood parameters of dogs suffering from dermatomycoses. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(2), 294-298. https://doi.org/10.15421/022044

9. Shcherbyna, R., Parchenko, V., Martynyshyn V., Hunchak, V. (2018) Evaluation of acute and subacute toxicity of oil liniment based on 4-((5-decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine. *J. Fac. Pharm. Ankara*., 42(1), 43-52. DOI: 10.1501/Eczfak_0000000601

10. Karpenko, Y., Hunchak, Y., Gutyj, B., Hunchak, A., Parchenko, M., Parchenko, V. (2022). Advanced research for physicochemical properties and parameters of toxicity piperazinium 2- ((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio)acetate. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 36(2), 18-25. https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255848

11. Khilkovets, A., Karpenko, Y., Bigdan, O., Parchenko, M., & Parchenko, V. (2022). Synthetic and biological aspects of studying the properties of 1, 2, 4-triazole derivatives. *Scientific Journal of Polonia University*, 51(2), 324-331. https://doi.org/10.23856/5138

IN SILICO RESEARCH OF 4-((5-(DECYLTHIO)-4-METHYL-4H-1,2,4-TRIAZOL-3-YL)METHYL)MORPHOLINE AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY

M.V. Ogloblina[1], I.V. Bushueva[2], O.P. Shmatenko[3], V.V. Parchenko[2], T.V. Khortetska[2], O.V. Plieshkova[3]

[1]Petro Mohyla Black Sea National University, Mykolaiv, Ukraine
[2]Zaporizhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhzhia, Ukraine
[3]Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv, Ukraine

Introduction. *The modern process of creating original medicines covers a wide range of research, including post-registration research. In 2022, a modern original domestic veterinary drug in the form of 10% liniment "Vetmikoderm" appeared on the veterinary drug market of Ukraine. The active substance of the drug belongs to the derivatives of 1,2,4-triazole - (4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-methyl)morpholine). Derivatives of 1,2,4-triazole are known as low-toxic biologically active compounds for the treatment of dermatological diseases, the activity of which depends on pharmacophoric substituents. Further research of the drug "Vetikoderm" is advisable to expand the indications and improve the drug.*

Purpose: *to conduct an in silico study of 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-methyl)morpholine, as well as its effect on some strains of microorganisms that in the complex can expand the list of indications for the use of the drug "Vetmikoderm 10%".*

Materials and methods. *The structure of 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine was drawn and rendered in SMILES format using MarvinSketch. The prediction of protein targets of the bioactive ligand was carried out on the basis of the Galaxy web service. Studies of the antimicrobial properties of 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine were conducted on 13 strains of microorganisms at a temperature of 37°C. Gravimetric measurements were performed on ESJ-200-4 laboratory electronic analytical balances (USA).*

The results. *The structure of the ligand 4-((5-decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine was converted to SDF format using OpenBabel. Additionally, the ligand underwent energy minimization using Chimera. X-ray crystal structures of proteins with co-crystallized ligands were obtained from the Protein Data Bank (PDB). The DockingPie Vina plugin in PyMOL was used for protein-ligand docking and conversion to pdbqt format. Docking protocol validation was conducted to confirm the docking procedure. PyMOL v.2.5 and Discovery Studio Visualizer programs were utilized for generating images of receptor-ligand complexes. Docking studies of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine were performed on six selected enzymes and proteins. Docking revealed that the compound has potential binding affinity with thymidine kinase (PDB: 4IVR) with a binding energy of -7.292 kcal/mol (0.348 μM), with thiamin phosphate synthase (PDB: 1G6C), and biotin carboxylase (PDB: 2W6O) with binding energies of -7.221 and -6.074 kcal/mol, respectively. The antibacterial activity of 4-((5-decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine was investigated in vitro using a standard methodology. All concentrations of the test sample (0.1; 0.5, and 1.0%) exhibited bactericidal activity against Staphylococcus aureus UNCSM-017 (11.5; 14.7, and 16.5 mm) compared to the control (Streptomycin, 16.2 mm). Bacteriostatic action of a 1.0% solution of the test sample was determined against the field strain of Pseudomonas aeruginosa (6.3 mm). A slow growth inhibition zone of 0.5 and 1.0% of the compound sample was observed against Bacillus subtilis ATCC No.6633 (4.0; 4.1 mm) compared to the control (11.9 mm).*

Conclusions. *A bioactive ligand is likely to exhibit antibacterial and antiviral effects through inhibition of molecular and biological processes of pathogenic organisms. The selected targets had acceptable binding modes with 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methyl)morpholine, did not form unwanted contacts, and interacted with some critically important amino acid residues, which gives reason to use them in further virtual screening, computer modeling and more in-depth in vitro and in vivo studies. It was established that 4-((5-(decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-methyl)morpholine can compete with streptomycin, having a bactericidal effect on cryogenic strains of microorganisms cultivated on the medium at a temperature of 37 °C: Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, bacteriostatically against Klebciella rhinoscleromatis, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. 4-((5-(Decylthio)-4-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)-methyl)morpholine can be recommended for further studies against multiresistant strains of these microorganisms.*

Key words: *1,2,4-triazole, in silico research, antimicrobial effect, prediction of biological activity*

Конфлікт інтересів: відсутній.
Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Оглобліна Мирослава Володимирівна [A]– кандидат фармацевтичних наук, доцент, доцент кафедри фармації, фармакології, медичної, біоорганічної та біологічної хімії Навчально-наукового медичного інституту Чорноморського національного університету імені Петра Могили, м. Миколаїв, https://orcid.org/0000-0001-5696-3621

Бушуєва Інна Володимирівна [B,C,D]– доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри управління і економіки фармації та фармацевтичної технології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, м. Запоріжжя, https://orcid.org/0000-0002-5336-3900.

Шматенко Олександр Петрович [C,E]– доктор фармацевтичних наук, професор, начальник кафедри військової фармації Української військово-медичної академії, м. Київ, https: //orcid.org/0000-0002-6145-460X

Парченко Володимир Володимирович [F]– доктор фармацевтичних наук, професор кафедри природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, м. Запоріжжя, https://orcid.org/0000-0002-2283-1695.

Хортецька Тая Володимирівна [E]– кандидат фармацевтичних наук, доцент, доцент кафедри управління і економіки фармації та фармацевтичної технології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, м. Запоріжжя, https://orcid.org/0000-0001-7344-5295

Плєшкова Ольга Володимирівна [C,E]– кандидат фармацевтичних наук, доцент, доцент кафедри військової фармації Української військово-медичної академії, м. Київ, https://orcid.org/0000-0002-9000-7358.

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті.

Information about the authors:

Ohloblina Myroslava Volodymyrivna [A,D]–candidate of pharmaceutical sciences, associate professor, Associate Professor of the Department of Pharmacy, Pharmacology, Medical, Bioorganic and Biological Chemistry of the Educational and Scientific Medical Institute of the Black Sea National University named after Peter Mohyla, Mykolaiv, https://orcid.org/0000-0001-5696-3621

Bushueva Inna Volodymyrivna [B,C]–doctor of pharmaceutical Sciences, professor, Head of the Department of Management and Economics of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Zaporizhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhia, https://orcid.org/0000-0002-5336-3900.

Shmatenko Oleksandr Petrovych [C,E]–doctor of pharmaceutical sciences, professor, head of the Department of Military Pharmacy of the Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv, https: //orcid.org/0000-0002-6145-460X

Parchenko Volodymyr Volodymyrovych [F]–doctor of pharmaceutical sciences, professor of the department of natural sciences for foreign students and toxicological chemistry of the Zaporizhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhia, https://orcid.org/0000-0002-2283-1695.

Khortetska Taja Volodymyrivna [E]–candidate of pharmaceutical sciences, associate professor, Associate Professor of the Department of Management and Economics of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Zaporizhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhia, https://orcid.org/0000-0001-7344-5295

Plieshkova Olha Volodymyrivna [C,E]- candidate of pharmaceutical sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Military Pharmacy, Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv, https://orcid.org/0000-0002-9000-7358.

A – research concept and design; B – data collection; C – data analysis and interpretation; D – writing an article; E – article editing; F – final approval of the article

Адреса для листування: проспект Маяковського, 26, м. Запоріжжя 69035