

ТУБЕРКУЛОЦИДНА ТА ТУБЕРКУЛОСТАТИЧНА АКТИВНІСТЬ 1,2,4-ТРИАЗОЛЬНИХ ПОХІДНИХ *IN VITRO* (ВИЗНАЧЕННЯ МІК (МІНІМАЛЬНОЇ ІНГІБУЮЧОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ))

П. О. Давиденко¹, канд. вет. наук, доцент,
І. В. Боровик¹, Ph. D.,
О. М. Кулішенко¹, канд. вет. наук, доцент,
В. В. Зажарський¹, канд. вет. наук, доцент,
М. Л. Радзиховський², д-р вет. наук, професор,
О. В. Дишкант², канд. вет. наук, доцент,
В. В. Парченко³, д-р фарм. наук, професор

¹Дніпровський державний аграрно-економічний університет,
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49000, Україна

²Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна
nickvet@ukr.net

³Запорізький державний медичний університет,
проспект Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69000, Україна

За останні роки в Україні різко погіршилася епізоотична та епідемічна ситуація з туберкульозу тварин та людей. Цьому сприяє постійна зміна морфології та біологічних властивостей збудника туберкульозу, низька ефективність існуючих методів лабораторної діагностики (застарілі стандарти бактеріології, які не відповідають європейським вимогам), поява мультирезистентних штамів мікобактерій, що важко піддаються лікуванню. Тому в останні десятиліття вченими світу ведеться активна робота по створенню нових хіміотерапевтичних засобів з потенційною туберкулоцидною та туберкулостатичною активністю.

За останні десятиліття все частіше фіксуються випадки виділення мультирезистентних штамів мікобактерій, спричинюють інфекцію, яка важко піддається лікуванню, що становить значну загрозу здоров'ю тварин та людей. Всесвітня організація охорони здоров'я постійно стежить за ситуацією за епідемічними та соціально значущим захворюванням у світі. Особливо пильна увага приділяється туберкульозу. В останнє десятиліття ВОЗ була розроблена та з успіхом застосовується в світі так звана стратегія DOTS. Суть DOTS (Directly Observed Treatment Shortcourse) - суворо контрольоване лікування коротким курсом хіміотерапії. Тому пошук нових хіміотерапевтичних препаратів для лікування туберкульозної інфекції є пріоритетним напрямком фармацевтичної хімії.

Одними із перспективних подібних препаратів є триазольні похідні активна розробка яких триває на кафедрі природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету. Тому перспективним є напрямок впливу цих похідних на епізоотичні штами мікобактерій збудників туберкульозу тварин.

Ключові слова: ТУБЕРКУЛЬОЗ ТВАРИН, ЕПІЗООТИЧНА СИТУАЦІЯ З ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТВАРИН, ТРИАЗОЛЬНІ СПОЛУКИ, ТУБЕРКУЛОЦИДНА АКТИВНІСТЬ, БАКТЕРІОЛОГІЯ, МІК (МІНІМАЛЬНО ІНГІБУЮЧА КОНЦЕНТРАЦІЯ).

TUBERCULOCIDAL AND TUBERCULOSTATIC ACTIVITY OF 1,2,4-TRIAZOLE DERIVATIVES IN VITRO (DETERMINATION OF MIC (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION))

*P. Davydenko¹, I. Borovik¹, O. Kulishenko¹, V. Zazharskyi¹,
M. Radzykhovskiy², O. Dyshkant², V. Parchenko³*

¹Dnipro State Agrarian and Economic University,
Sergiy Efremov st., 25, Dnipro, 49000, Ukraine

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Kyiv, Heroes of Defense street, 15, Ukraine
nickvet@ukr.net

³Zaporizhzhia State Medical University,
26, Mayakovsky Avenue, Zaporizhzhia, 69035, Ukraine

In recent years, the epizootic and epidemic situation of tuberculosis in animals and humans has worsened sharply in Ukraine. This is facilitated by the constant change in the morphology and biological properties of the causative agent of tuberculosis, the low efficiency of existing laboratory diagnostic methods (outdated bacteriology standards that do not meet European requirements), the emergence of multi-resistant strains of mycobacteria that are difficult to treat. Therefore, in recent decades, scientists of the world have been actively working on the creation of new chemotherapeutic agents with potential tuberculocidal and tuberculostatic activity.

In recent decades, cases of isolation of multi-resistant strains of mycobacteria have been increasingly recorded, causing infection that is difficult to treat, which poses a significant threat to the health of animals and people. The World Health Organization constantly monitors the situation of epidemic and socially significant diseases in the world. Particular attention is paid to tuberculosis. In the last decade, the WHO has developed and successfully applied the so-called DOTS strategy in the world. The essence of DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) is strictly controlled treatment with a short course of chemotherapy. Therefore, the search for new chemotherapeutic drugs for the treatment of tuberculosis infection is a priority area of pharmaceutical chemistry.

One of the promising similar drugs are triazole derivatives, the active development of which continues at the department of natural sciences for foreign students and toxicological chemistry of the Zaporizhzhia State Medical University. Therefore, the direction of influence of these derivatives on epizootic strains of mycobacteria, the causative agents of animal tuberculosis, is promising.

Keywords: ANIMAL TUBERCULOSIS, AN ANIMAL TUBERCULOSIS EPIDEMIC SITUATION, TRIAZOLE COMPOUNDS, TUBERCULOCIDAL ACTIVITY, BACTERIOLOGY, MIC (MINIMUM INHIBITING CONCENTRATION).

Проблема туберкульозної інфекції, спричиненої мультирезистентними штамми, стає все більш актуальною у світі (Ellis et al., 2006; Palchykov et al., 2019; Zazharskyi et al., 2019). Туберкульоз являє собою глобальний ризик для здоров'я з рівнем захворюваності 8,8 млн. випадків і летальним наслідком в 1,4 млн. Тому пошук речовин з потенційною протитуберкульозною активністю є перспективним напрямком вирішення цієї проблеми. Одним із цікавих класів протитуберкульозних сполук є 1,2,4-триазольні похідні. Перспективним було вивчення їх туберкулоцидних, туберкулостатичних властивостей, а також МІК (мінімально інгібуючої концентрації) до мікобактерій різних видів (Cousins et al., 1991; Zazharskyi et al., 2019; Palchykov et al., 2020).

Дослідженнями Zazharskyi et al. (2019) встановлено, що нафтохінони та інші сполуки, що мають антимикобактеріальну активність проти мікобактерій туберкульозу, раніше були виділені з видів евклеї. У цьому дослідженні кілька компонентів *Euclea natalensis* та *E.*

Undulata, а також органічні екстракти листя оцінювали на ефективність проти збудника зоонозу *Mycobacterium bovis*. До складу досліджуваних організмів також входили *M. bovis* BCG та швидкозростаючі види *M. Smegmatis* та *M. Fortuitum*. Екстракт ацетону *E. Natalensis* мав потужну активність проти *M. Bovis* (МІК = 26 мкг / мл).

Дослідженнями закордонних вчених було показано, що кілька 5-алкіл (або галоген)-3'-азидо (аміно або галоген) аналогів піримідинових нуклеозидів були синтезовані і оцінені щодо *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* і *Mycobacterium avium*. Серед цих сполук було виявлено, що 3'-азидо-5-етил-2', 3'-дідезоксіурідін (3) володіють значною антимікобактеріальною активністю щодо *M. bovis* (МІК 50 = 1 мкг / мл), *M. tuberculosis* (МІК 50 = 10 мкг / мл) і *M. avium* (МІК 50 = 10 мкг / мл) (Srivastav et al., 2012; Engelmann et al., 2014; Higgitt et al., 2019).

Під час досліджень виявлено, що вакцина *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) є єдиною вакциною проти туберкульозу (ТБ) завдяки своїм цінним захисним ефектам і низькій вірулентності. Проте, ТБ може іноді викликати системну інфекцію у господарів з ослабленим імунітетом. Відомо, що ізоніазид (INH), рифампіцин (RMP), стрептоміцин (SM) і етамбутол (EMB) є ефективними протитуберкульозними препаратами і використовуються для лікування інфекцій БЦЖ. На жаль, існує мало досліджень чутливості вакцинних штамів БЦЖ до цих препаратів. Результати МІС для INH були 0,06 і 0,125 мг / мл для продукту і партій насіння, відповідно. Результати МІС для RMP, SM і EMB склали 0,25-0,5, 0,25 і 2-4 мкг / мл відповідно (Shishido et al., 2007; Wilkins et al., 2008).

Johar et al. (2005) встановили, що інфекції, викликані *Mycobacterium tuberculosis* і *Mycobacterium avium*, викликають два найбільш важливих мікобактеріозу, що призводить до збільшення смертності у пацієнтів зі СНІДом. Різні 5-заміщені 2'-дезоксіурідина, уридин, 2'-О-метилурідін, 2'-рібофтор-2'-дезоксіурідина, 3'-заміщені-2', 3'-дідезоксіурідини, 2', 3'-дідезоксіурідини, і 2', 3'-дідегідро-2', 3'-дідезоксіурідини були синтезовані і оцінені за їх інгібуючої активності *in vitro* проти *M. bovis* і *M. avium*. Похідні 5- (С-1-заміщеного) -2'-дезоксіурідина з'явилися в якості потужних інгібіторів *M. avium* (МІК 90 = 1-5 діапазон мкг / мл). Природа заступників С-5 в ряду 2'-дезоксіурідина, мабуть, є визначальним фактором протимікобактеріальної активності. Цей новий клас інгібіторів може служити корисним класом сполук для розробки і дослідження нових протитуберкульозних засобів.

Arai et al. (2015) встановили, що в ході пошуку антибактеріальних мікобактеріальних речовин нібоміцин був знову виявлений в культуральному бульйоні морського походження *Streptomyces* sp. на біоаналіза поділу. З'єднання 1 показало антимікробну активність відносно *Mycobacterium smegmatis* і *Mycobacterium bovis* BCG з МІК 1,0 мкг / мл як в активно зростаючих аеробних умовах, так і в умовах гіпоксії, що викликають спокій. З'єднання 1 також ефективно відносно мікобактерій туберкульозу, включаючи клінічно виділені штами. Механістичний аналіз показав, що 1 пов'язана з ДНК і викликає унікальне морфологічна зміна мікобактеріальних бактерій, що веде до загибелі бактеріальних клітин.

Fujiwara et al. (2018) встановили, що деламанід, біциклічний нітроімідазооксазол, ефективний проти *M. tuberculosis*. Попередні дослідження показали, що стійкість до Біциклічного нітроімідазооксазину, RA-824, викликана мутаціями в F 420 - залежному шляху біоактивації. Автори досліджували, чи відповідальні ті ж механізми за стійкість до деламаніду. Частоти спонтанного опору визначали з використанням *M. bovis* BCG Tokyo (BCG) і *M. tuberculosis* H37Rv.

Dhumal et al. (2016) стверджують, що новий 2-піридин, заміщений тіазоліл-5-арил-1,3,4-оксадіазол (6a - O), були розроблені і синтезовані з використанням thionicotinamide в якості вихідного, наступного нового багатостадійного синтетичного маршруту. Проміжний продукт, піридиніл, заміщений тіазоліл кислоти гідратида (4), коли конденсований з бензойною кислотою / ніотинової кислоти (5a - O) в присутності діоксиду кремнію за підтримки POCl₃ отримували кращі відмінні виходи цільових сполук.

Ameen & Drancourt (2013) у своїх дослідженнях показали, що протестували додатковий набір з 13 ізолятів комплексу *M. tuberculosis* з Франції, оскільки європейський ізолят не був включений в попереднє дослідження. Ця колекція складалася з 10 клінічних ізолятів *M. tuberculosis* і трьох контрольних штамів (*M. tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium canettii* CIP 140010059 і *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2).

У дослідженнях Horita et al. (2009) показано, що серія похідних цукру (1-13) були синтезовані і оцінені на антибактеріальну активність відносно мікобактерій tuberculosis (МТБ), особливо МТБ з множинною лікарською стійкістю (МЛС), і досліджували взаємозв'язок структура-активність цих сполук. Результати показали, що сполука ОСТ313 (2-ацетамідо-2-деокси-β- d- глюкопіраноз N, N- диметилдітіокарбамат) виявила значну бактерицидну активність in vitro і те, що дітіокарбаматная група в положенні С-1 глюкопіранозидного кільця була необхідною для антибактеріальної активності. Повідомляється про антимікобактеріальних властивості похідних цукру, синтезованих і оцінених на антибактеріальну активність відносно мікобактерій туберкульозу (МТБ), особливо МТБ 4 з множинною лікарською стійкістю (МЛС) (МІК = 1,56-25 мкг / мл).

Johar et al. (2007) стверджують, що відродження туберкульозу і поява штамів мікобактерій з множинною лікарською стійкістю вимагають пошуку нових класів антимікобактеріальних агентів. Синтезували ряд 1-β- d -2'-арабінофуранозильних і 1- (2'-дезоксі-2'-фтор-β- d- рібофуранозил) піримідинових нуклеозидів, що володіють різними наборами алкінільних, алкенільних, алкільних і галогенних заступників в положенні С -5 урацила і досліджували їх вплив на активність щодо *M. tuberculosis*, *M. bovis* і *M. avium*. Серед цих молекул 5-алкінілзамещенние похідні виявилися сильнодіючими інгібіторами *M. bovis*, *M. tuberculosis* і *M. мікозе*. Нуклеозиди 1-β- d -2'-арабінофуранозил-5-додецінілураціл, 1- (2'-дезоксі-2'-фтор-β- d- рібофуранозил) -5-додецінілураціл і 1- (2 '-дезоксі-2'-фтор-β- d- рібофуранозил)-5-тетрадецінілураціл продемонстрував найбільшу антимікобактеріальна активність щодо *M. bovis* і *M. tuberculosis*. Також було виявлено, що вони зберігають чутливість до рифампіцин-резистентних штамів *M. tuberculosis* H37Rv при подібних концентраціях. Деякі з цих аналогів також виявили in vitro антимікробний ефект проти ряду інших грампозитивних патогенів.

Mamolo et al. (2001) встановили, що похідні 5-арил-1-ізонікотіноіл-3- (піридин-2-іл) -4,5-дигідро-1Н- піразолу синтезовані і випробувані на їх антимікобактеріальну активність in vitro. Сполуки показали цікаву активність щодо штаму *Mycobacterium tuberculosis* і людського штаму *M. tuberculosis* H4.

Djermal et al. (2018) встановили, що тенденція до підвищення ізолюваності лікарсько-стійкого *M. bovis* від клінічних випадків у людини документована в літературі. Тут ми оцінили ізоляти комплексу *Mycobacterium tuberculosis* від великої рогатої худоби на сприйнятливості до ліків за допомогою методу пропорції агару з золотим стандартом і спрощеного аналізу мікротитрування ресазуріна (d-REMA). В цілому 38 штамів *M. tuberculosis*, включаючи ізоляти *M. bovis* (n = 36) і *M. caprae* (n = 2), від великої рогатої худоби в Тунісі були протестовані на ізоніазид, рифампін, стрептоміцин, етамбутол, канаміцин і піразинамід. Встановлено, що ізоляти *M. caprae* сприйнятливі до всіх досліджуваних ліків. Як і очікувалося, всі штами *M. bovis* були стійкі до піразинаміду. Крім того, один ізолят *M. bovis* показав високий рівень стійкості до стрептоміцину (MIC > 500,0 мкг / мл).

Було встановлено, що в протитуберкульозних аналізах сполука-прототипи були активні (MIC = 4-8 мкг / мл) проти *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv і *M. bovis*. Комбінований тест на антимікробну сприйнятливості показав, що ціадокс, мекіндокс і хіноцетон в поєднанні з рифампіцином надавали адитивна дія на комплекс *M. tuberculosis* з індексом фракційної інгібуючої концентрації (FIC) 0,75. Результати противогрибкового аналізу показали, що хіноцетон був активний проти *Microsporium canis* з MIC 8 мкг / мл. Скринінг на антимікоплазму показав в цілому гарну активність хіноцетона щодо *Mycoplasma gallisepticum*

і *Mycoplasma hyopneumoniae* МІК від 8 до 16 мкг / мл. Як показано в комбінованому тесті на сприйнятливість до протимікробних препаратів, ціадокс, мекіндокс і хіноцетон в поєднанні з тетрацикліном надавали адитивну дію проти *Mycoplasma gallisepticum* з FIC 0,75. Ці сполуки були також піддані противірусному аналізу проти вірусу інфекційної бурсальної хвороби, вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свині, парвовірусу свиней і вірусу класичної чуми свиней. Отримані результати показали, що ці QdNO і їх метаболіти не мають інгібуючої активності щодо цих вірусів *in vitro* (Erwin et al., 2004; Zhao et al., 2016).

Shinde et al. (2018) синтезували 2-арил-4 - ((4-арил-1 Н -1,2,3-триазол-1-іл) метил) тиазола (8a - p). Будова знову синтезованих сполук визначали спектральним аналізом. Зазначені сполуки були піддані скринінгу на їх попередню протитуберкульозну активність щодо *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (MTB, ATCC 25177) і *Mycobacterium bovis* BCG (BCG, ATCC 35743). Далі синтезовані сполуки піддавали скринінгу на антимікробну активність проти стандартних грамнегативних бактерій *Escherichia coli* (NCIM 2576) і *Pseudomonas fluorescense* (NCIM 2059), грампозитивних бактерій *Staphylococcus aureus* (NCIM 2602), *Bacillus subtilis* (NCIM 2162). Серед всіх синтезованих сполук показали хорошу активність щодо недіючого *M. bovis* БЦЖА штаму. Сполуки показали хорошу активність проти всіх протестованих бактеріальних штамів. Всі активні сполуки були перевірені на цитотоксичність і виявлені неактивними. Їх висока активність і багатообіцяюча антимікобактеріальна активність дозволяють припустити, що ці сполуки можуть послужити хорошим приводом для подальшої оптимізації та розвитку.

Desai et al. (2016) показали в своїх дослідженнях, що серія похідних 1,3,4-оксадіазол на основі індолу і піридину 5a- т синтезував і оцінював їх в пробірці протитуберкульозної активності проти *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (MTB) і *Mycobacterium bovis* БЦЖ як в активному, так і в сплячому стані. Сполуки мають дуже хорошу протитуберкульозну активність. Активність, низька цитотоксичність і селективність цих сполук роблять їх перспективними для подальшої оптимізації.

Матеріали і методи. Роботу проводили протягом 2022-2023 рр. на базі навчально-дослідної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАЕУ. У якості досліджуваних видів мікобактерій було обрано *M. bovis*. Для посіву на рідкі поживні середовища готували завись з розрахунку 1 мг бактеріальної культури на 1 мл фізіологічного розчину. Завись готували в асептичних умовах боксу, за допомогою стерильної фарфорової ступки та товкачика і засівали на рідкі поживні середовища для культивування мікобактерій (середовище Моделя та Сотона) і відповідно модифікації цих двох середовищ у комбінації з 0,125 % розчином гідрогумату та розчином фульвокислот. Середовище Моделя готували за наступним прописом: на 40 пробірок 200 мл середовища (1 штатив) відважували за допомогою аналітичних електронних ваг AXIS AN 200 (виробництво Польща) калій фосфорнокислий двозаміщений – 1,0 г; амоній цавелевокислий – 1,0 г; залізо сірчанокисле – 0,01 г; магній сірчанокислий – 0,1 г; гліцерин х/ч – 10 см³ та вода дистильована до 200 см³. Середовища Сотона готували за наступним прописом: L-аспарагін – 0,8 г; кислота лимонна х/ч – 0,4 г; калій фосфорнокислий двозаміщений – 0,1 г; магній сірчанокислий – 0,1 г; цитрат аміачного заліза – 0,01 г та вода дистильована до 200 мл. Середовища поміщені у 250 мл колби автоклавували (автоклав лабораторний ВК-75) протягом 30 хв тиск 1,5 атм. Модифікацію середовищ Моделя та Сотона готували за допомогою додавання до колб з середовищами відповідно 0,125 % розчин гідрогумату та 0,125 % розчином фульвокислот в об'ємі 20 см³. Визначання МІК (мінімально інгібуючої концентрації) здійснювали методом серійних розведень. Визначали МІК для ізоніазиду, ГКП-305, БКП-100 у якості контролю використовували середовища без додавання досліджуваних 1,2,4-триазольних похідних. Розчини 1,2,4-триазольних похідних (ізоніазид, ГКП-305, БКП-100) виготовляли наступним чином: готували розчин препарату у об'ємі 5 мл у концентрації 100 мкг/ мл. Далі у асептичних умовах боксу за допомогою автоматичної одноканальної піпетки-дозатора зі зйомними насадками Ленпіпет Блек (0,5-5

мл) вносили 2,5 мл розчину похідних 1,2,4-триазолу до 5 мл живильного розчину декілька разів барботували, потім відбирали 2,5 мл вносили у іншу пробірку і так до 9 пробірки у кожному ряду штатива і останні 2,5 мл зливали у сторону. Остання десята пробірка була контрольна без додавання туберкулоцидних речовин. Утворювалися відповідно пробірки з середовищами Моделя та Сотона та Моделя і Сотона у комбінації з 0,125 % розчинами гідрогумату та фульвокислот і відповідно у кожному ряду концентрація ізоніазиду, ГКП-305, БКП-100 50 мкг/мл; 25 мкг/мл; 12,5 мкг/мл; 6,25 мкг/мл; 3,12 мкг/мл; 1,56 мкг/мл; 0,78 мкг/мл; 0,39 мкг/мл; 0,19 мкг/мл. Остання пробірка контрольна без додавання туберкулостатику. Після посіву пробірки поміщали у термостат ТСО-80/1 (виробництво РФ) та культивували за температури 37 °С протягом 90 діб з фіксацією початку терміну росту культур, їх кольору та консистенції. Посіви з культурами оглядали кожної доби перші 10 діб та через 5 діб у наступні 80.

Результати й обговорення. У результаті досліджень МІК для ізоніазиду, ГКП-305, БКП-100 було встановлено, що ріст культури *M. bovis* почався відповідно на 12 та 14 добу на середовищах Сотона та Моделя у комбінації з 0,125 % розчином гідрогумату, а на середовищах Сотона та Моделя – відповідно на 25 та 28 добу. Можна зробити висновок, що модифікація середовищ Сотона та Моделя 0,125 % розчином гідрогумату дозволяє у 2 рази пришвидшити ріст колоній *M. bovis*. Для ізоніазиду, на середовищі Сотона, МІК до *M. bovis* було визначено, як 50 мкг/мл (рис. 1). У наступних концентраціях 25 та 12,5 мкг/мл спостерігався ріст колоній.

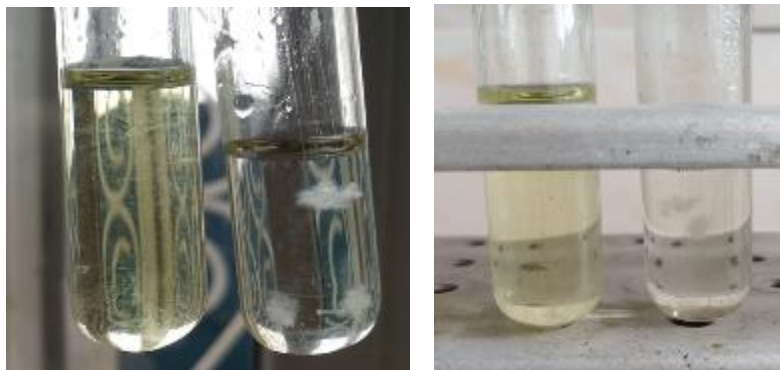


Рис. 1. Ріст *M. bovis* на середовищі Сотона ізоніазид (1 фото ліворуч дослід препарат ізоніазид у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

Для ГКП-305, на середовищі Сотона, МІК до *M. bovis* було визначено, як відсутній тому, що ріст спостерігався навіть у пробірці з концентрацією 50 мкг/мл (рис. 2). Ріст на пробірках характеризувався утворенням від поодиноких пластівців матового кольору до інтенсивного росту з косами та джгутами матового кольору, які добре видно при струшуванні.

МІК для БКП-100 на середовищі Сотона по відношенню до *M. bovis* був встановлений, як 12,5 мкг/мл (рис. 3). У наступних концентраціях ріст був присутній.

На середовищі Моделя, МІК для ізоніазиду по відношенню до *M. bovis* був визначений, як відсутній тому, що у пробірці навіть з концентрацією 50 мкг/см³ був присутній ріст у вигляді поодиноких пластівців (рис. 4).



Рис. 2. Ріст *M. bovis* на середовищі Сотона ГКП-305 (1 фото ліворуч дослід препарат ізоніазид у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

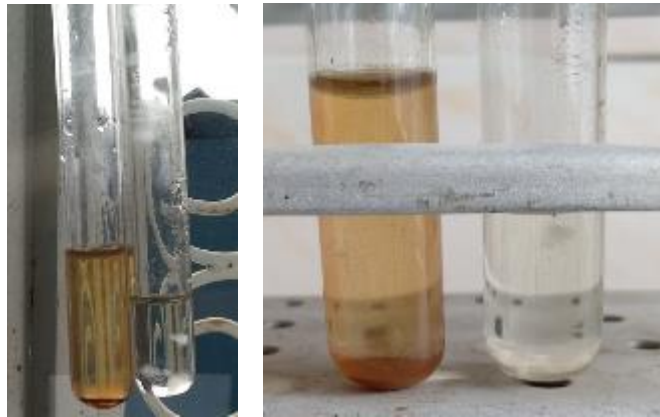


Рис. 3. Ріст *M. bovis* на середовищі Сотона БКП-100 (1 фото ліворуч дослід препарат БКП-100 у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

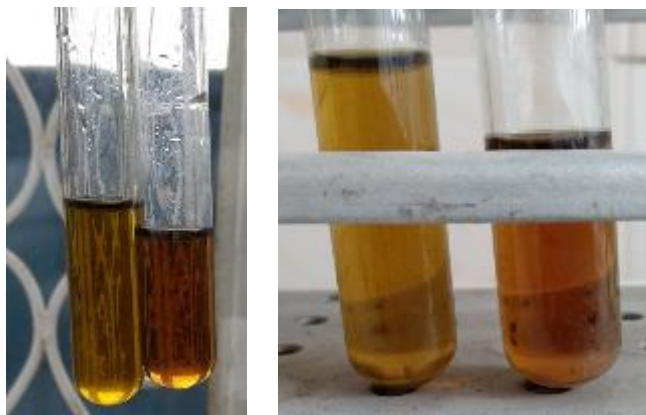


Рис. 4. Ріст *M. bovis* на середовищі Моделя ізоніазид (1 фото ліворуч дослід препарат ізоніазид у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

Для ГКП-305, на середовищі Моделя, МІК по відношенню до *M. bovis*, була встановлена як відсутня або перевищуюча 50 мкг/мл тому, що навіть у пробірці з концентрацією 50 мкг/мл був відмічений ріст культури (рис. 5).

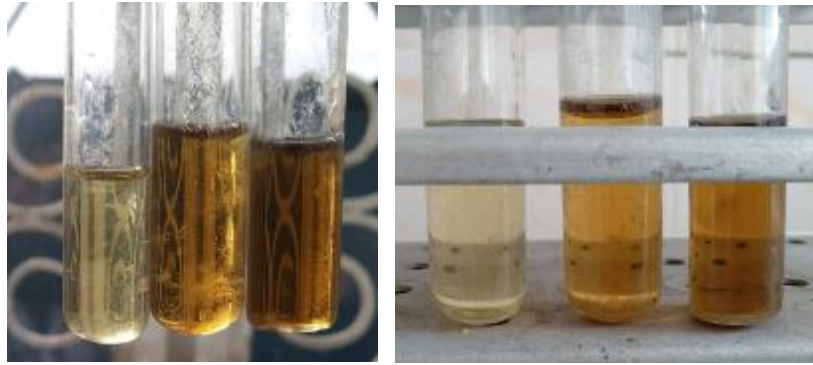


Рис. 5. Ріст *M. bovis* на середовищі Моделя ГКП-305 (1 фото ліворуч дослід препарат ГКП-305 у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та з препаратом ГКП-305 у концентрації 6,25 мкг/мл ріст у вигляді дрібних поодиноких пластівців)

Для БКП-100, МІК на середовищі Моделя для *M. bovis* була визначена, як 50 мкг/мл у наступній пробірці 25 мкг/мл були відмічені поодинокі колонії, у контролі – інтенсивний ріст (рис. 6).

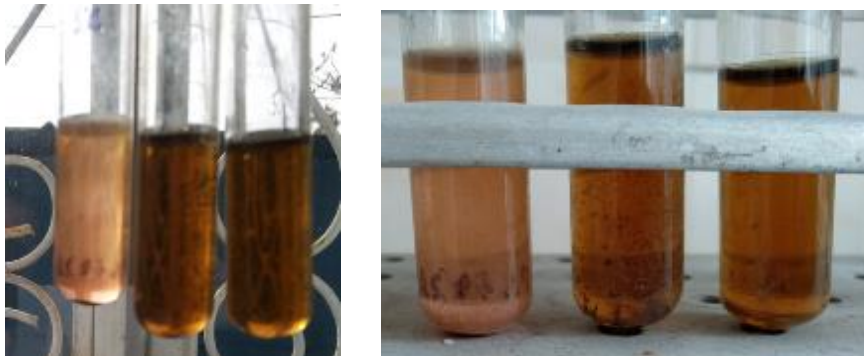


Рис. 6. Ріст *M. bovis* на середовищі Моделя БКП-100 (1 фото ліворуч дослід препарат БКП-100 у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та з препаратом БКП-100 у концентрації 3,1 мкг/см³ ріст у вигляді дрібних поодиноких пластівців)

На середовищі Сотона у комбінації з 0,125 % розчином гідрогумату, МІК для ізоніазиду по відношенню до *M. bovis* був встановлений, як відсутній або перевищуючий 50 мкг/мл (рис. 7).

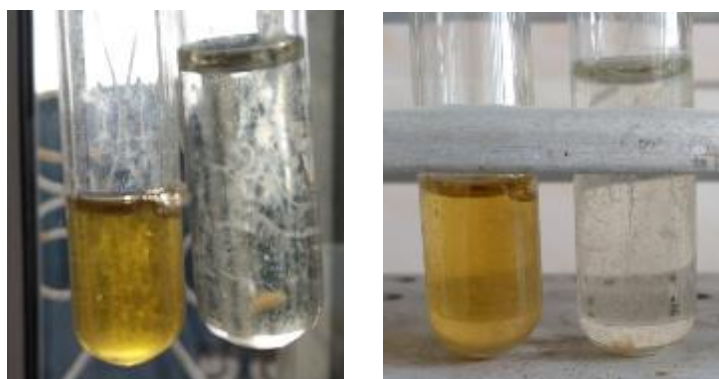


Рис.7. Ріст *M. bovis* на середовищі Сотона+гідрогумат ізоніазид (1 фото ліворуч дослід препарат ізоніазид у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

МІК для препарату ГКП-305 на середовищі Сотона у комбінації з 0,125 % розчином фульвокислот по відношенню до *M. bovis* був встановлений, як відсутній або перевищуючий 50 мкг/мл (рис. 8).

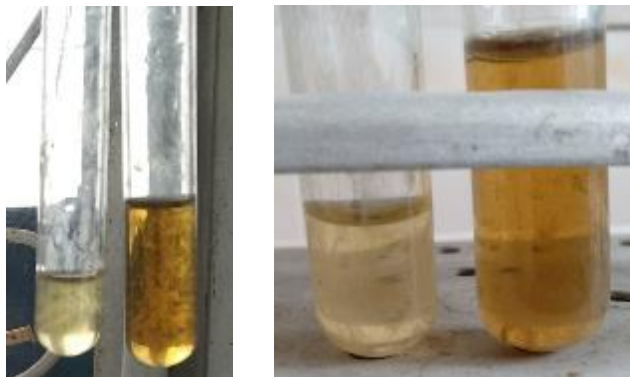


Рис. 8. Ріст *M. bovis* на середовищі Сотона+фульвокислоти ГКП-305 (1 фото ліворуч дослід препарат ГКП-305 у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

На середовищі Моделя у комбінації з 0,125 % розчином гідрогумату, МІК для ізоніазиду по відношенню до *M. bovis* був встановлений, як відсутній або перевищуючий 50 мкг/см³ (рис. 9).

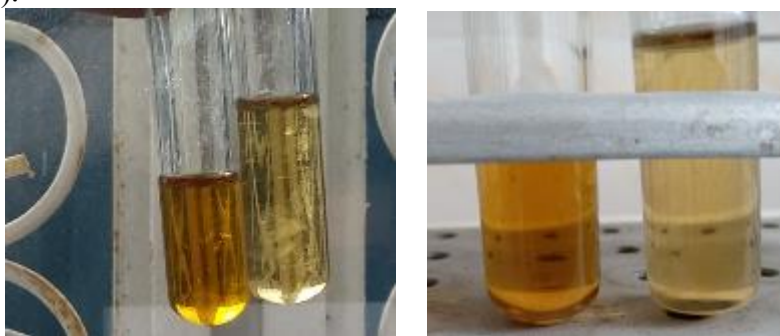


Рис. 9. Ріст *M. bovis* на середовищі Моделя+гідрогумат ізоніазид (1 фото ліворуч дослід препарат ізоніазид у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

На середовищі Моделя у комбінації з 0,125 % розчином гідрогумату, МІК для ГКП-305 по відношенню до *M. bovis* був встановлений, як відсутній або перевищуючий 50 мкг/мл (рис. 10).

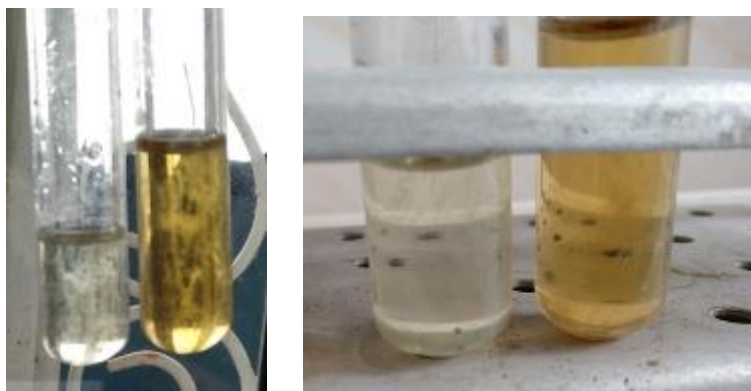


Рис. 10. Ріст *M. bovis* на середовищі Моделя+гідрогумат ГКП-305 (1 фото ліворуч дослід препарат ГКП-305 у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів); (2 фото ліворуч ГКП-305 50 мкг/мл відсутній ріст праворуч - контроль ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів).

На середовищі Сотона у комбінації з 0,125 % розчином гідрогумату, МІК для ГКП-305 по відношенню до *M. bovis* був встановлений, як відсутній або перевищуючий 50 мкг/мл. (рис. 11).

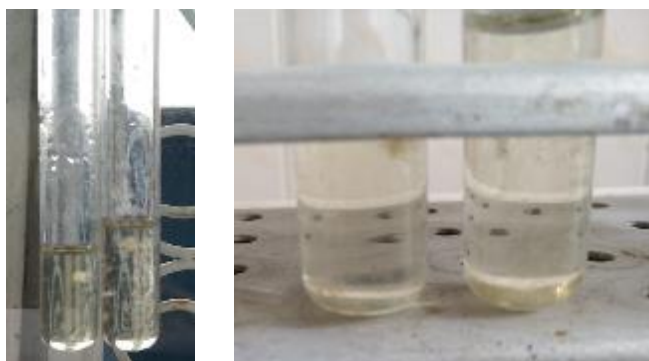


Рис. 11. Ріст *M. bovis* на середовищі Сотона+гідрогумат ГКП-305 (1 фото ліворуч дослід препарат ГКП-305 у концентрації 50 мкг/мл МІК поодинокі колонії, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та джгутів)

МІК для препарату ГКП-305 на середовищі Моделя у комбінації з 0,125 % розчином фульвокислот по відношенню до *M. bovis* був встановлений, як відсутній або перевищуючий 50 мкг/мл (рис. 12).

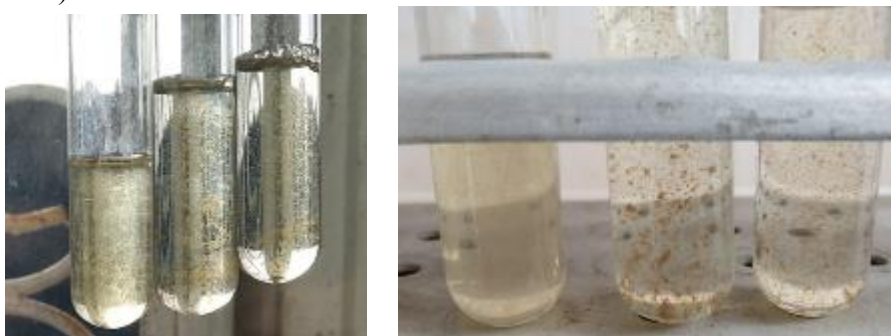


Рис. 12. Ріст *M. bovis* на середовищі Моделя+фульвокислоти ГКП-305 (1 фото ліворуч дослід препарат ГКП-305 у концентрації 50 мкг/мл МІК відсутній ріст, праворуч пробірки з контролем (відсутній препарат) ріст у вигляді інтенсивних пластівців та з препаратом ГКП-305 у концентрації 25 мкг/мл ріст у вигляді дрібних пластівців)

Якщо порівнювати інтенсивність росту колоній *M. bovis* на середовищах Сотона та Моделя у модифікації з розчинами гідрогумату та фульвокислот 0,125 %, нами відзначено, що ріст мікобактерій з фульвокислотами у 2 рази інтенсивніший, ніж з гідрогуматом (табл.).

Виявлена туберкулоцидна дія БКП-100 на *M. bovis* на середовищі Сотона (МІК 12,5 – 50,0 мкг/ мл), Моделя (25,0– 50,0 мкг/ мл), Сотона+ гідрогумат (МІК 12,5 – 50,0 мкг/ мл); Сотона+ фульвокислоти (МІК 12,5 – 50,0 мкг/ мл); Моделя+ гідрогумат (МІК 12,5 – 50,0 мкг/ мл); Моделя+ фульвокислоти (25 – 50,0 мкг/ мл).

Препарат ГКП-305 володіє туберкулостатичною дією по відношенню до *M. bovis* стримуючі ріст на середовищі Сотона (МІК 1,56 – 50,0 мкг/ мл), Моделя (1,56 – 50,0 мкг/ мл), Сотона з гідрогуматом (1,56 – 50,0 мкг/ мл), Сотона з фульвокислотами (3,12 – 50,0 мкг/ мл), Моделя з додаванням гідрогумату (0,39 – 50,0 мкг/ мл) і Моделя з фульвокислотами (0,78 – 50,0 мкг/ мл).

Визначення МІК (мінімальної інгібуючої концентрації) для *M. bovis* 1,2,4-триазольних похідних з потенційною туберкулоостатичною та туберкулоцидною здатністю *in vitro*

| Назва середовища | Вид туберкулоциду | Концентрація, мкг/мл | | | | | | | | | Контроль |
|----------------------|-------------------|----------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| | | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,12 | 1,56 | 0,78 | 0,39 | 0,19 | |
| Сотона | Ізоніазид | - | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ |
| | ГКП-305 | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ |
| | БКП-100 | - | - | - | +/- | + | + | + | + | ++ | +++ |
| Моделя | Ізоніазид | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| | ГКП-305 | +/- | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ |
| | БКП-100 | - | - | + | + | + | + | + | + | ++ | +++ |
| Сотона+гідрогумат | Ізоніазид | +/- | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | ГКП-305 | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ |
| | БКП-100 | - | - | - | + | + | + | + | + | ++ | +++ |
| Сотона+фульвокислоти | Ізоніазид | +/- | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| | ГКП-305 | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| | БКП-100 | - | - | - | + | + | + | + | + | ++ | +++ |
| Моделя+гідрогумат | Ізоніазид | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| | ГКП-305 | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | +++ |
| | БКП-100 | - | - | - | + | + | + | + | + | ++ | +++ |
| Моделя+фульвокислоти | Ізоніазид | + | + | + | + | + | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | ГКП-305 | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | +++ |
| | БКП-100 | - | - | + | + | + | + | + | + | ++ | +++ |

Примітка: «-» відсутній ріст; «+» - поодинокі колонії; «++» - середньої інтенсивності ріст з утворенням кіс та джгутів; «+++» - висока інтенсивність росту з утворенням великої кількості пластівців та кіс.

В И С Н О В К И

1. Провівши серію досліджень з визначення МІК (мінімально інгібуючої концентрації) для *M. bovis* на різних поживних середовищах, було встановлено, що МІК ізоніазиду, ГКП-305, БКП-100. МІК ізоніазиду, для *M. bovis* на середовищі Сотона була визначена як 50 мкг/см³. МІК БКП-100 для *M. bovis* на середовищі Сотона був визначений як 12,5 мкг/см³ у препарату ГКП-305 МІК для *M. bovis* був визначений як перевищуючий 50 мкг/см³ і тому не визначений; на середовища Моделя МІК у 25 мкг/см³ був визначений для *M. bovis* тільки у БКП-100; для середовищ Сотона+гідрогумат та Моделя+гідрогумат Сотона+фульвокислоти та Моделя+фульвокислоти МІК було визначено для ізоніазиду, ГКП-305, БКП-100, як перевищуючий 50 мкг/см³.

2. Підсумовуючи результати досліджень, можна зробити висновок, що найвищу ефективність при визначенні МІК по відношенню *M. bovis* виявлено у БКП-100, відповідно 50 мкг/см³ та 12,5 мкг/см³.

Перспективи досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення впливу триазольних сполук на інші епізоотичні штами. Важливим питанням є вивчення та удосконалення туберкулоцидних властивостей триазольних сполук.

References

- Ameen, S.M., & Drancourt M. (2013). Ivermectin lacks antituberculous activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(8). 1936–1937, <https://doi.org/10.1093/jac/dkt089>.
- Arai, M., Kamiya, K., Pruksakorn, P., Sumii, Y., ..., Kobayashi, M. (2015). Anti-dormant mycobacterial activity and target analysis of nybomycin produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 23(13). 3534-3541, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.033>.

Cousins, D.V., Wilton, S.D., & Francis, B.R. (1991). Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary microbiology*. 27(2). 187–195. [doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90010-d](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90010-d)

Desai, N.C., Somani, H., Trivedi, A., Bhatt, K., Nawale, L., Khedkar, V.M., Jha, P.C., & Sarkar, D. (2016). Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of some novel indole and pyridine based 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(7), 16, 1776-1783, doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.043.

Dhumal, S.T., Deshmukh, A.R., Bhosle, M.R., Khedkar, V.M., Nawale, L.U., Sarkar, D., & Mane, R.A., (2016). Synthesis and antitubercular activity of new 1,3,4-oxadiazoles bearing pyridyl and thiazolyl scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26(15). 3646-3651, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.093>.

Djemal, S.E., Camperio, C., & Armas, F. (2018). Detection of a streptomycin-resistant *Mycobacterium bovis* strain through antitubercular drug susceptibility testing of Tunisian *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from cattle. *BMC Vet Res* Vol. 14. P. 296. doi.org/10.1186/s12917-018-1623-9

Ellis, M.D., Davies, S., McCandlish, I.A., Monies, R., Jahans, K., & Rua-Domenech, R. (2006). *Mycobacterium bovis* infection in a dog. *The Veterinary record*. 159(2). 46–48. doi.org/10.1136/vr.159.2.46

Engelmann, N., Ondreka, N., Michalik, J., & Neiger, R. (2014). Intra-abdominal *Mycobacterium tuberculosis* infection in a dog. *Journal of veterinary internal medicine*. 28(3). 934–938. doi.org/10.1111/jvim.12347

Erwin, P.C., Bemis, D.A., Mawby, D.I., McCombs, S.B., & Sheeler, L.L., Himelright, I.M., Thomsen, B.V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* Transmission from Human to Canine. *Emerging Infectious Diseases*. 10(12). 2258–2260. doi.org/10.3201/eid1012.040094.

Fujiwara, M., Kawasaki, M., Hariguchi, N., Liu, Y., & Matsumoto, M. (2018). Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis*. 108. 186-194, <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.006>.

Haburjak, J.J., & Spangler, W.L. (2002). Isoniazid-induced seizures with secondary rhabdomyolysis and associated acute renal failure in a dog. *The Journal of small animal practice*. Vol. 43(4). P. 182–186. doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00055.x

Hawthorne, V.M., & Lauder, I.M. (1962). Tuberculosis in man, dog, and cat. *The American review of respiratory disease*. 85. 858–869. doi.org/10.1164/arrd.1962.85.6.858

Higgitt, R.L., Schalkwyk, L., Klerk-Lorist, O., Buss, L.M., ... Miller, M.A. (2019). *Mycobacterium bovis* Infection in African Wild Dogs, Kruger National Park, South Africa. *Emerging infectious diseases*. 25(7). 1425–1427. doi.org/10.3201/eid2507.181653

Horita, Y., Takii, T., Chiba, T., Kuroishi, R., Maeda, Y., Kurono, Y., Inagaki, E., ... Onozaki, K. (2009). Synthesis of new sugar derivatives and evaluation of their antibacterial activities against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19(22). 6313-6316, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.095>.

Johar M., Manning T., Kunimoto D.Y., & Kumar R. (2005). Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of 5-substituted pyrimidine nucleosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13(24). 6663-6671, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.046>.

Johar, M., Manning, T., Tse, C., Desroches, N., Agrawal, B., Kunimoto, D., & Kumar, R. (2007). Growth Inhibition of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* In Vitro: Effect of 1-β-d-2'-Arabinofuranosyl and 1-(2'-Deoxy-2'-fluoro-β-d-2'-ribofuranosyl) Pyrimidine Nucleoside Analogs *J. Med. Chem.* 50(15). 3696–3705 doi.org/10.1021/jm0703901

Kolibab, K., Steven, D.C., & Sheldon, M.L. (2011). Sensitivity to Isoniazid of *Mycobacterium bovis* BCG Strains and BCG Disseminated Disease Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(6). 2380--2381 <https://jcm.asm.org/content/49/6/2380>

Mamolo, M., Zampieri, D., Falagiani, V., Vio, L., & Banfi, E. (2001). Synthesis and antimycobacterial activity of 5-aryl-1-isonicotinoyl-3-(pyridin-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives. *Il Farmaco*. 56(8). 593-599, [doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01098-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01098-9).

Palchykov, V.A., Zazharskyi, V.V., Brygadyrenko, V.V., Davydenko, P.O., Kulishenko, O.M., Borovik, I.V., & Boyko, O.O. (2019). Bactericidal, protistocidal, nematocidal properties and chemical composition of ethanol extract of Punica granatum peel. *Biosystems Diversity*, 27(3), 300–306. doi:10.15421/011939

Palchykov, V.A., Zazharskyi, V.V., Brygadyrenko, V.V., Davydenko, P.O., Kulishenko, O. M., & Borovik, I.V. (2020). Chemical composition and antibacterial effect of ethanolic extract of Buxus sempervirens on cryogenic strains of microorganisms in vitro. *Chemical Data Collections*. 25. 100323. doi:10.1016/j.cdc.2019.100323

Pan, J., Chen, Y., & Huang, Y. (2011). Antimycobacterial activity of fusaric acid from a mangrove endophyte and its metal complexes. *Arch. Pharm. Res.* 34. 1177. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0716-9>.

Shinde, V., Mahulikar, P., & Mhaske, P.C. (2018). Synthesis and biological evaluation of new 2-aryl-4-((4-aryl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)thiazole derivatives. *Res Chem Intermed*. 44. 1247–1260. doi.org/10.1007/s11164-017-3164-4

Shishido, Y., Mitarai, S., Otomo, K., Seki, M., Sato, A., Yano, I., Koyama, A., & Hattori, T. (2007). Antituberculosis drug susceptibility testing of Mycobacterium bovis BCG Tokyo strain *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 11(12) 1334-1338.

Sohaskey, C.D. (2007). Enzymatic inactivation and reactivation of chloramphenicol by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis, *FEMS Microbiology Letters*. 240(2). 187–192, doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.028.

Srivastav, N.C., Shakya, N., Bhavanam, S., Agrawal, A., Desroches C.N., Kunimoto D.Y., & Kumar, R. (2012). Antimycobacterial activities of 5-alkyl (or halo)-3'-substituted pyrimidine nucleoside analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(2). 1091-1094. doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.114.

Wilkins M.J., Bartlett P.C., Berry D.E., Perry R.L., Fitzgerald S.D., Bernardo T.M., Thoen C.O., & Kaneene J.B. (2008). Absence of Mycobacterium bovis infection in dogs and cats residing on infected cattle farms: Michigan, *Epidemiology and Infection*. 136(12). 1617–1623. doi.org/10.1017/S0950268808000447

Zazharskyi, V., Parchenko M., Fotina T., Davydenko, P., Kulishenko, Zazharskaya N., & Borovik I. (2019). Synthesis, structure, physicochemical properties and antibacterial activity of 1,2,4-triazoles-3-thiols and furan derivatives. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*. 6. 74–82. doi:10.32434/0321-4095-2019-127-6-74-82.

Zazharskyi, V.V., Davydenko, P.O., Kulishenko, O.M., Borovik, I.V., & Brygadyrenko, V.V. (2019). Antimicrobial activity of 50 plant extracts. *Biosystems Diversity*. 27(2). 163–169. doi:10.15421/011922.

Zhao, Y., Cheng, G., & Hao, H. (2016). In vitro antimicrobial activities of animal-used quinoxaline 1,4-di-N-oxides against mycobacteria, mycoplasma and fungi. *BMC Vet Res*. Vol. 12. P. 186 doi.org/10.1186/s12917-016-0812-7.