

УДК 547.792.1 + 547.792.3 + 547.792.9

Король Н.І., к.х.н., доц.; Головка-Камошенкова О.М., к.х.н., ст.н.с.;
Сливка М.В., д.х.н., доц.; Тимошук С.А., асп.; Бойко Н.В., д.б.н., проф.

ПОРІВНЯННЯ ФУНГІЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТУ ФЛУКОНАЗОЛ ТА СИНТЕЗОВАНИХ ФЛЮОРОВМІСНИХ 1,2,4- ТРИАЗОЛІВ *IN VITRO* ТА *IN SILICO* МЕТОДАМИ

ДВНЗ «Ужгородський національний університет», 88000, м. Ужгород,
вул. Підгірна, 46; e-mail: nataliya.korol@uzhnu.edu.ua

Хвороби, що викликані грибовими інфекціями щороку вражають мільйони людей та рослин. *Candida albicans* – один з найпоширеніших грибків, що є збудником різноманітних фунгемій, які є смертельно небезпечними, особливо для онкохворих та ВІЛ-позитивних людей [1-5]. Водночас, медикаментозна терапія спрямована на лікування даних захворювань обмежена невеликою кількістю використовуваних препаратів [6, 7]. Серед них одним з препаратів першого вибору як у лікуванні людей, так і у складі активних компонентів фунгіцидів сільського господарства є флуконазол [8-10] – засіб, який поєднує у своєму складі ядро 1,2,4-триазолу та атоми флюору.

Раніше нами було досліджено протигрибкову активність конденсованих солей тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]триазолію, одержаних методом електрофільної внутрішньо-молекулярної циклізації [11]; *bis*-триазолів і їх алкілованих похідних [12], а також доведено доцільність їхнього застосування в якості бактерицидів та фунгіцидів [13].

Метою даної роботи є дослідити взаємодії флуконазолу та синтезованих нами флюоромісних сполук класу 1,2,4-триазолу з ферментом «ЕС 2.2.1.6 Acetolactate synthase» у кристалічній структурі *Candida albicans* та оцінити можливе застосування одержаних речовин як фунгіцидів. Методики синтезу та характеристики сполук **1-12** описані в джерелі [14].

На рис. 1 представлені структурна формула флуконазолу та загальна формула тестованих речовин **1-12**.

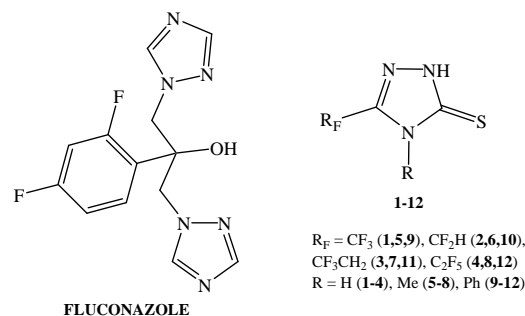


Рис 1. Структурні формули досліджуваних сполук.

Якісне дослідження фунгіцидної активності щодо *Candida albicans* сполук **1-12** проведено шляхом сумісного культивування. Для цього з 24-годинних бактеріальних культур готували суспензії з оптичною густиною 0,5 за МакФарландом, що відповідає концентрації $1,5 \cdot 10^8$ КУО/мл. Чистоту культури, а саме морфологічні та тинкторіальні властивості тест-мікроорганізмів, визначали за допомогою бактеріоскопії (метод Грама) з використанням імерсійної мікроскопії за допомогою світлового мікроскопа (PrimoStariLED, CarlZeiss). У стерильні мікропробірки типу Ependorf вносили по 100 мкл готових бактеріальних суспензій та по 100 мкл кожної органічної сполуки по черзі. Контролем слугували суспензії мікроорганізмів оптичною густиною 0,5 за МакФарландом без препаратів, а також самі препарати без бактеріальних суспензій. Суміш інкубували протягом 2 год в термостаті при 37°C. Далі проводили якісний висів усіх тестованих штамів мікроорганізмів на чашки Петрі з відповідним типом поживного середовища (Ендо, манітоловий тощо).

Стерильність органічних сполук визначали бактеріологічно, шляхом висіву 10 мкл на універсальне поживне середовище для культивування мікроорганізмів – м'ясо - пептонний агар.

Таблиця 1. Результати якісного дослідження на фунгіцидну активність сполук **1-12** та флуконазолу

Тестовані розчини органічних сполук	<i>Candida albicans</i>
1	+++
2	++
3	++
4	+++
5	+
6	+++
7	+
8	+++
9	+
10	+
11	+
12	+++
Флуконазол	+++

У табл. 1 значення «+++» вказує на те, що зразок повністю інгібує ріст бактерії, «++» - помірно інгібує, «+» - бактерія є стійкою до зразку.

Результати якісного визначення фунгіцидної дії тестованих речовин показали, що протигрибкова активність є на одному рівні для протигрибкового засобу флуконазол та сполук **1, 4, 6, 12**.

Ці речовини було відібрано для подальшого скринінгу на кристалографічну структуру ферменту «EC 2.2.1.6 Acetolactate synthase» бактерії *Candida albicans* (PDBID: 6DEQ). Молекулярний докінг було здійснено за допомогою програми AutoDockVina 1.5.6 [15], а попередню оптимізацію кристалографічної структури ферменту та тестованих речовин у програмах BIOVIADiscoveryStudio 2021 [16] та HyperChem 7 [17] відповідно. Всі використані програми є у вільному доступі. Одержані результати зведені у табл. 2.

Таблиця 2. Результати молекулярного докінгу

Сполука	Афінність ккал/моль	Водневі зв'язки	π -аніон	Аліпільні взаємодії	Галоген	π -сірка	π -сімка	Несприятливі акцептор-акцепторні взаємодії
флуконазол	-6.9	ARG372	ASP374	MET347, LEU331, ARG376	ASP374, GLY516	MET498		ASP374, GLY516
1	-5.6	ARG372, ARG374, THR330, ALA304; ALA371, GLY303						
4	-6.4	ARG237, ARG372, THR330; ALA371, GLY303	ASP374		GLY370			
6	-5.4	ARG372, GLY516	ASP374	ARG376				
12	-7.4	GLY516, ARG374, LEU331, HIS351, MET350		MET347	LEU348, GLY349, ARG376		MET498	

Результати показують високу афінність до ферменту ацетолактатсинтази флуконазолу та сполуки **12**, причому спорідненість останньої є вищою зі значенням -7.4 ккал/моль проти -6.9 ккал/моль для флуконазолу.

Афінитет флуконазолу в активному сайті ацетолактатсинтази забезпечується

доволі складними взаємодіями, найважливішими є: водневий зв'язок, утворений між атомом флюору та гідрогеном гуанідинової групи ARG372, атоми флюору беруть участь в утворенні двох зв'язків з ASP374 та одного з GLY516, взаємодія π -сірка спостерігається між атомом сульфуру у залишку амінокислоти MET498 та 1,2,4-

триазольним ядром, електростатична взаємодія π -аніон – між ASP374 та фенільним кільцем, а гідрофобні π -алкіл взаємодії – між MET347, LEU331, ARG376 та триазольними циклами. Водночас, помічено і дві несприятливі акцептор-акцептор взаємодії між GLY516 та атомом Нітрогену триазольного ядра, а також між атомом кисню гідроксильної групи флуконазолу та ASP374 (рис 2).

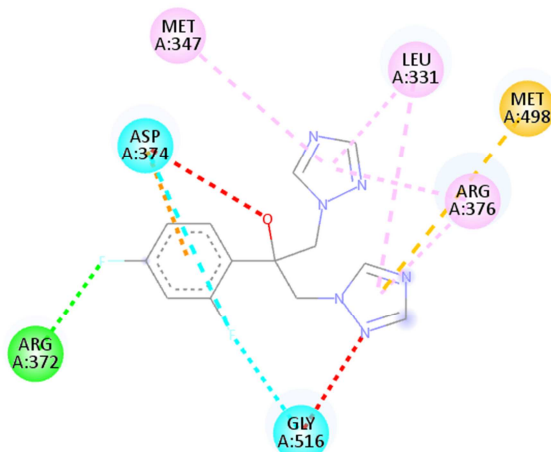


Рис 2. Мережа взаємодій між ферментом «EC 2.2.1.6 Acetolactate synthase» та флуконазолом.

Взаємодія сполуки **12** із ферментом характеризується більшою кількістю водневих зв'язків, що, ймовірно, і обумовлює вище значення афінності. Так, LEU331, HIS351 і MET350 утворюють водневі зв'язки із атомами флюору у пентафлюоретильному заміснику, GLY516 – водневий зв'язок між Гідрогеном карбоксильної групи амінокислоти та атомом сульфуру у третьому положенні триазольного циклу, а ASP374 – водневі зв'язки з гідрогеном у другому положенні 1,2,4-триазолу та сульфуром сполуки **12**. LEU348, GLY349 та ARG376 формують галоген-акцепторні взаємодії із атомами флюору, MET498 – гідрофобні π -сігма взаємодії з фенільним замісником у четвертому положенні ядра триазолу. Також гідрофобні алкільні взаємодії спостерігаються між MET347 та ARG376 з пентафлюороетильним замісником та гідрофобні π -алкіл взаємодії LEU331 та ARG376 з циклом 1,2,4-триазолу і LEU331 з фенільним замісником (рис 3).

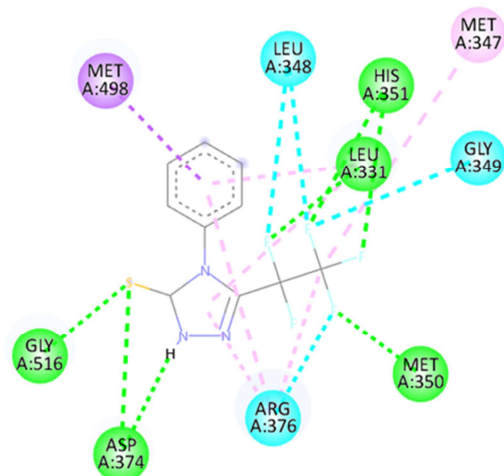


Рис 3. Мережа взаємодій між ферментом «EC 2.2.1.6 Acetolactatesynthase» та сполукою **12**.

Проаналізувавши наявні взаємодії флуконазолу та сполуки **12** з ферментом ацетолактатсинтази *C. Albicans*, можна зробити висновок, що збільшення кількості атомів флюору, а також наявність атомів сульфуру та незаміщеного гідрогену у положенні 2 триазольного ядра сприяють утворенню важливих взаємодій, що, як наслідок, підвищило значення афінності синтезованої нами сполуки у порівнянні з флуконазолом на 0.5 ккал/моль. З метою підвищення потенційних біологічних якостей даних речовин доречною може бути подальша модифікація по згаданих атомах.

Висновки

Таким чином, нами якісно досліджено протигрибкову дію флюоровмісних похідних 1,2,4-триазол-3-тіону. Виконано молекулярний докінг для сполук, що виявили найвищу фунгіцидну активність та препарату флуконазолу до ферменту «EC 2.2.1.6 Acetolactate synthase» *Candida albicans*. Результати показали, що одна із тестованих речовин показала вищу спорідненість до зв'язування в активному центрі ферменту, ніж флуконазол. Отже, досліджувані речовини є перспективними для детального вивчення їх фунгіцидної дії.

Список використаних джерел

1. Stamatiades G.A., Ioannou P., Petrikkos G., Tsioutis C. Fungal infections in patients with

- inflammatory bowel disease: A systematic review. *Mycoses*. 2018, 61(6), 366–376. Doi: 10.1111/myc.12753.
2. Scotto R., Reia A., Buonomo A.R., Moccia M., Viceconte G., Pisano E., Zappulo E., Brescia V., Gentile M.I. Risk of invasive fungal infections among patients treated with disease modifying treatments for multiple sclerosis: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Saf.* 2021, 20(8), 925–936. Doi: 10.1080/14740338.2021.1918673.
3. Lockhart S.R., Guarner J. Emerging and reemerging fungal infections. *Semin Diagn Pathol.* 2019, 36(3), 177–181. Doi: 10.1053/j.semdp.2019.04.010.
4. Almeida F., Rodrigues M.L., Coelho C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 214. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00214.
5. Casadevall A. Fungal diseases in the 21st century: the near and far horizons. *Pathog Immun.* 2018, 3(2), 183–196. Doi: 10.20411/pai.v3i2.249.
6. Moudgal V., Sobel J. Antifungals to treat *Candida albicans*. *Expert Opin Pharmacother.* 2010, 11(12), 2037–2048. Doi: 10.1517/14656566.2010.493875.
7. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.* 2021, 121(6), 3390–3411. Doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199.
8. Berkow E.L., Lockhart S.R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist.* 2017, 10, 237–245. Doi: 10.2147/IDR.S118892.
9. Duke S. Herbicide and pharmaceutical relationships. *Weed Science.* 2010, 58(3), 334–339. Doi: 10.1614/WS-09-102.1.
10. Brilhante R.S.N., de Alencar L.P., Bandeira S.P., Sales J.A., de Jesus Evangelista A.J., Serpa R., de AguiarCordeiro R., de Aquino Pereira-Neto W., Castelo-Branco D.S.C.M., Rocha M.F.G. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. *Sci. Total Environ.* 2019, 650(1), 1231–1238. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.096.
11. Slivka M., Korol N., Pantyo V., Baumer V., Lendel V. Regio and stereoselective synthesis of [1,3]thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazol-7-ium salts via electrophilic heterocyclization of 3-S-propargylthio-4H-1,2,4-triazoles and their antimicrobial activity. *Heterocycl. Commun.* 2017, 23(2), 109–113. Doi: 10.1515/hc-2016-0233.
12. Korol N., Holovko-Kamoshenkova O., Slivka M., Pallah O., Boyko N., Lendel V. Synthesis and bioactivity of 5,5'-butane-bis-4-substituted-4h-1,2,4-triazole-3-thiols. *Sci. Bull. Uzhh. Univ. Ser. Chem.* 2020, 1(43), 32–39. Doi: 10.24144/2414-0260.2020.1.32-39.
13. Патент на винахід № 122991. Застосування йодовмісних солей 1,2,4-триазолію як бактерицидів та фунгіцидів. Король Н.І., Пантьо В.В., Сливка М.В., Кривов'яз А.О., Коваль Г.М., Лендел В.Г. Опубліковано бюлетень № 4 від 27.01.2021 р.
14. Заявка на корисну модель № и 2021 05868. Застосування флуоровмісних похідних 1,2,4-триазолу як бактерицидів. Головка-Камошенкова О.М., Король Н.І., Сливка М.В., Тимощук С.А., Бойко Н.В. Опубліковано від 20.10.2021 р.
15. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 2010, 31, 455–461. Doi: 10.1002/jcc.21334.
16. <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
17. Hyperchem, Inc., Gainesville, FL, USA.

Стаття надійшла до редакції: 26.10.2021 р.

COMPARISON OF FUNGICIDAL ACTIVITY OF FLUCONAZOLE AND FLUORINE-CONTAINING 1,2,4-TRIAZOLES VIA *IN VITRO* AND *IN SILICO* METHODS

Korol N., Holovko-Kamoshenkova O., Slivka M., Tymoshchuk S., Boyko N.

*Uzhhorod National University, Pidhirna St., 46, 88000 Uzhhorod, Ukraine
e-mail: nataliya.korol@uzhnu.edu.ua*

Diseases caused by fungal infections affect millions of people and plants every year. *Candida albicans* is one of the most common fungi, causing a variety of fungal diseases that are life-

threatening, especially for cancer patients and HIV-positive people. At the same time, drug therapy aimed at treating these diseases is limited by the small number of drugs used. Among them, one of the most commonly used both in human treatment and as part of the active components of agricultural fungicides is fluconazole - a drug that combines the nucleus of 1,2,4-triazole and fluorine atoms.

Previously, we have investigated the antifungal activity of condensed salts of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole obtained by electrophilic intramolecular cyclization, bis-triazoles and their alkylated derivatives, and proved the feasibility of their use as bactericides and fungicides.

The aim of this work is to investigate the interaction of fluconazole and synthesized fluorine-containing compounds of class 1,2,4-triazole with the enzyme "EC 2.2.1.6 Acetolactate synthase" in the crystal structure of *Candida albicans* and to evaluate the possible use of the obtained substances as fungicides.

In the current study, we investigated the antifungal action of fluorine-containing derivatives of 1,2,4-triazole-3-thione. Molecular docking was performed for the compounds with the highest fungicidal activity and the preparation of fluconazole for the enzyme "EC 2.2.1.6 Acetolactate synthase" *Candida albicans*. The results showed that one of the tested substances showed a higher affinity for binding in the active site of the enzyme than fluconazole. Therefore, the test substances are promising antifungal agents.

Keywords: 1,2,4-triazole-3-thione; fungicidal activity; molecular docking; *Candida albicans*.

Referenses

1. Stamatiades G.A., Ioannou P., Petrikkos G., Tsioutis C. Fungal infections in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review. *Mycoses*. 2018, 61(6), 366–376. Doi: 10.1111/myc.12753.
2. Scotto R., Reia A., Buonomo A.R., Moccia M., Viceconte G., Pisano E., Zappulo E., Brescia V., Gentile M.I. Risk of invasive fungal infections among patients treated with disease modifying treatments for multiple sclerosis: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Saf.* 2021, 20(8), 925–936. Doi: 10.1080/14740338.2021.1918673.
3. Lockhart S.R., Guarner J. Emerging and reemerging fungal infections. *Semin Diagn Pathol.* 2019, 36(3), 177–181. Doi: 10.1053/j.semmp.2019.04.010.
4. Almeida F., Rodrigues M.L., Coelho C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 214. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00214.
5. Casadevall A. Fungal diseases in the 21st century: the near and far horizons. *Pathog Immun.* 2018, 3(2), 183–196. Doi: 10.20411/pai.v3i2.249.
6. Moudgal V., Sobel J. Antifungals to treat *Candida albicans*. *Expert Opin Pharmacother.* 2010, 11(12), 2037–2048. Doi: 10.1517/14656566.2010.493875.
7. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.* 2021, 121(6), 3390–3411. Doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199.
8. Berkow E.L., Lockhart S.R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist.* 2017, 10, 237–245. Doi: 10.2147/IDR.S118892.
9. Duke S. Herbicide and pharmaceutical relationships. *Weed Science.* 2010, 58(3), 334–339. Doi: 10.1614/WS-09-102.1.
10. Brilhante R.S.N., de Alencar L.P., Bandeira S.P., Sales J.A., de Jesus Evangelista A.J., Serpa R., de AguiarCordeiro R., de Aquino Pereira-Neto W., Castelo-Branco D.S.C.M., Rocha M.F.G. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. *Sci. Total Environ.* 2019, 650(1), 1231–1238. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.096.
11. Slivka M., Korol N., Pantyo V., Baumer V., Lendel V. Regio and stereoselective synthesis of [1,3]thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazol-7-ium salts via electrophilic heterocyclization of 3-*S*-propargylthio-4H-1,2,4-triazoles and their antimicrobial activity. *Heterocycl. Commun.* 2017, 23(2), 109–113. Doi: 10.1515/hc-2016-0233.
12. Korol N., Holovko-Kamoshenkova O., Slivka M., Pallah O., Boyko N., Lendel V. Synthesis and bioactivity of 5,5'-butane-bis-4-substituted-4h-1,2,4-triazole-3-thiols. *Sci. Bull. Uzhh. Univ. Ser. Chem.* 2020, 1(43), 32–39. Doi: 10.24144/2414-0260.2020.1.32-39.
13. *Patent na vynakhid № 122991*. Zastosuvanniaiodovmisnykh solei 1,2,4-tryazoliuu yak bakterytsydiv ta funhitsydiv. Korol N.I., Panto V.V., Slyvka M.V., Kryvoviaz A.O., Koval H.M., Lendiel V.H. Opublikovano biuleten № 4 vid 27.01.2021 r. (in Ukr.).

14. *Zaiavka na korysnu model № u 2021 05868*. Zastosuvannia fluorovmisnykh pokhidnykh 1,2,4-tryazolu yak bakterytydiv. Holovko-Kamoshenkova O.M., Korol N.I., Slyvka M.V., Tymoshchuk S.A., Boiko N.V. Opublikovano vid 20.10.2021 r. (in Ukr.).
15. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 2010, 31, 455–461. Doi: 10.1002/jcc.21334.
16. <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
17. Hyperchem, Inc., Gainesville, FL, USA.