УДК 57:51-76;57.02.001.57, 004.942, 57.052; 57.085.23
УКПП
№ Держреєстрації 0120U104882
Інв №

Національна академія наук України
Державна установа "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України" (ДУ ІХБГ НАН України)
04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, тел./факс (044) 463-05-32

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Державної установи
«Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»
академік НАН України

_____ Ярослав БЛЮМ
«15» грудня 2021 р.

ЗАКЛЮЧНИЙ НАУКОВИЙ ЗВІТ ПРО РЕЗУЛЬТАТИ РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОЄКТУ 2020.01/0357

за договором № 20/01.2020 від 21 жовтня 2020 р. та
договором № 97/01/0357 від 30 квітня 2021 р.

СТВОРЕННЯ НОВИХ ЕФЕКТИВНИХ ІНГІБІТОРІВ ФОРМУВАННЯ Z-КІЛЬЦЯ З МЕТОЮ ОТРИМАННЯ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ АНТИМІТОТИЧНОЇ ДІЇ / CREATION OF NEW EFFECTIVE INHIBITORS OF Z-RING FORMATION IN ORDER TO OBTAIN ANTI-TUBERCULOSIS DRUGS WITH ANTIMITOTIC ACTION

Науковий керівник проєкту:
д.б.н., с.н.с. _____ Павло КАРПОВ
«15» грудня 2021 р.

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ДУ ІХБГ НАН України
протокол від «14» грудня 2021 р. № 21

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник проєкту
Завідувач лабораторії
біоінформатики та структурної
біології ДУ ІХБГ НАНУ,
д.б.н., старш. наук. спів. _____ П.А. Карпов
15.12.2021 р. (вступ; розділи 1, 2, 11, 25; висновки)

Відповідальні виконавці:

Наук. спів., к.б.н. лабораторії
біоінформатики та структурної
біології ДУ ІХБГ НАНУ _____ Д.О. Самофалова
15.12.2021 р. (вступ; розділи 1-6, 11, 26; висновки)

Мол. наук. спів., к.б.н. лабораторії
біоінформатики та структурної
біології ДУ ІХБГ НАНУ _____ О.В. Расвський
15.12.2021 р. (вступ; розділи 1-6, 22; висновки)

Виконавці:
Старш. наук. спів., к.б.н.
лабораторії біоінформатики та
структурної біології ДУ ІХБГ
НАНУ _____ С.П. Ожерєдов
15.12.2021 р. (розділи 1, 2, 4, 11)

Старш. наук. спів., к.б.н. лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ

С.І. Співак
15.12.2021 р. (розділи 1, 2, 6, 11)

Завідувач наково- дослідного відділу мікробіологічних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК, Національного університету біоресурсів та природокористування України, старш. наук. спів., д.в.н.

Л.М. Виговська
15.12.2021 р. (розділи 1, 8, 10, 13, 17, 20, 23, висновки)

Завідувач відділу молекулярно-біологічних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК, Національного університету біоресурсів та природокористування України, старш. наук. спів., к.в.н.

Л.М. Іщенко
15.12.2021 р. (розділи 1, 8-10, 13, 17, 18, 20, 23 висновки)

Доцент кафедри акушерства факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів та природокористування України, наук. спів., к.в.н.

В.М. Мазур
15.12.2021 р. (розділи 1, 9, 13, 18, 23, 24, висновки)

Наук. спів., к.б.н. відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії НАН України

15.12.2021 р.

Д.О.Лабудзинський (розділи 1, 7, 12, 14, 18, висновки)

Завідувач відділу комп'ютерного забезпечення наукових досліджень і науково-технічної інформації Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова, к.т.н.

15.12.2021 р.

С.Я. Свістунов (розділ 1, 5)

Старш. наук. спів., к.х.н. відділу № 6 хімії біологічно активних речовин Інституту органічної хімії

15.12.2021 р.

О.В. Борисов (розділи 1, 6, 14, 16, 21, 22, висновки)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 180 стр., 51 рис., 26 таб., 77 джерело.

ТУБЕРКУЛЬОЗ, СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ IN SILICO, ХІМІЧНИЙ СИНТЕЗ, БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ, ПРЕПАРАТИ ПРОТИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Об'єкт дослідження: *Mycobacterium bovis,* FtsZ-білки, ферменти, хімічні сполуки.

Мета роботи: пошук нових інгібіторів механізму клітинного поділу збудників туберкульозу, орієнтованих на унікальні молекулярні мішені мітотичного апарату мікобактерій, що здатні викликати летальні конформаційні зміни цільових білків.

Методи: Протокол ВО CSLabGrid, високопропускний віртуальний та хімічний скринінг, молекулярне моделювання та докінг, фармакофорний пошук, 3D-QSAR, методи аналітичної та органічної хімії, йонобмінна хроматографія та спектрофотометрія, молекулярно-генетичні, що ґрунтуються на проведенні полімеразної ланцюгової реакції, тестування *in vitro* являтиме собою визначення чутливості вакцинного штаму *M.bovis* до відібраних хімічних речовин.

Аналіз епізоотичної ситуації в Україні з туберкульозу великої рогатої худоби визначив зниження кількості випадків спричинених *Mycobacterium bovis*, при цьому захворюваність людини на *M. tuberculosis* залишається на значному рівні. Видова приналежність і штами мікобактерії підтверджувались ПЛР із застосуванням специфічних праймерів. Визначено пріоритетні молекулярні мішені медикаментозного лікування туберкульозу, а саме, FtsZ і 15 унікальних ферментів, а також, цільові сайти їх ліганд-білкової взаємодії. Створено бібліотеки цільових білків, референсних сполук (23734 сполук з PubChem, ZINC, ChEMBL, Google Patents, і eMolecules) і відповідні похідні бібліотеки (26167 сполук), що було сформовано за результатами скринінгу

репозиторіїв компаній: Єнамін, ІФЛАБ і Укрооргсинтез. Визначено ключові напрями синтезу інгібіторів FtsZ і цільових ферментів мікобактерії. Речовини KS13344, Z5027530097, Z1454498428 і Z112683954 показані як перспективні інгібітори FtsZ-білку. При цьому, Z1126833954 було відібрано як опорну сполуку-лідера, що у дозозалежній манері здатна знижувати ГТФазну активність рекомбінантного FtsZ. За результатами скринінгу визначено оптимальні опорні сполуки для синтезу нових речовин і лід оптимізації, а саме: Z1574680729 і Z65190667, що мають найбільший вплив на штам BCG; KS13384, що пригнічує культуру BCG і інгібує дискретний FtsZ *S. aureus*. Зроблено висновок стосовно перспективності подальшої лід оптимізації скаффолдів SK1-7 та синтезовано вихідні бібліотеки для створення комбінаторних сполук. Згенеровані відповідні віртуальні бібліотеки лігандів, що пройшли необхідну оптимізацію і адаптовані для докінгу. Зроблено висновки, що до замісників у комбінаторних реакціях, які мають забезпечити успішну оптимізацію біологічної активності на основі опорних речовин і сформовано відповідні бібліотеки. За повним протоколом скринінгу було доведено інгібуючі властивості 13-ті речовин, біологічна активність яких пригнічує патогенний штам *M. bovis*. Відібрано 11 сполук, що є інгібіторами FtsZ, 1 сполука здатна інгібувати мікобактеріальну O-ацетилсеринсульфгідрилазу (CysK1), а також, одна речовина, що водночас є інгібітором як CysK1, так і FtsZ.

ABSTRACT

Report of the Research: 180 p., 51 fig., 26 tab., 77 ref.

TUBERCULOSIS, STRUCTURAL BIOINFORMATICS, CHEMICAL SYNTHESIS, BIOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS, DRUGS AGAINST TB

Objects of Study: *Mycobacterium bovis*, FtsZ-proteins, enzymes, chemical compounds.

Objective. Screening for new anti-tuberculosis agents acting on *Mycobacterium* cell-division, based on unique molecular targets of bacterial cell division machinery, caused by the lethal impact of ligand-based conformational changes in target proteins.

Methods. VO CSLabGrid protocol, high-throughput virtual and chemical screening, molecular modeling and docking, pharmacophore search, 3D-QSAR, methods of analytical and organic chemistry, ion exchange chromatography and spectrophotometric determination, PCR, *in vitro* testing on vaccine strain of *M. bovis*.

Results.

A study of the epizootic situation in Ukraine with bovine tuberculosis has identified a decrease in the number of cases caused by *Mycobacterium bovis*, while the incidence of human tuberculosis (*M. tuberculosis*) remains significant. Species and strains of mycobacteria were confirmed by PCR using specific primers. The prior molecular targets for drug treatment of tuberculosis, namely, FtsZ and 15 unique mycobacterial enzymes, as well as the target sites of the ligand-protein interaction, have been specified. Libraries of target proteins, reference compounds (23,734 compounds from PubChem, ZINC, ChEMBL, Google Patents, and eMolecules) and corresponding derivative libraries (26,167 compounds) were created based results of selective screening of Enamine, IF Lab and UOSLAB UKRORGSYNTEZ Ltd. databases. The key directions of synthesis of mycobacterial

FtsZ and target enzymes inhibitors were clarified. Substances KS13344, Z5027530097, Z1454498428 and Z112683954 are shown as promising inhibitors of FtsZ. Z1126833954 was selected as a reference leader compound that in a dose-dependent manner able to reduce GTPase activity of recombinant FtsZ. Based on the results of curent screening, the optimal lead compounds for the synthesis of new substances and structure optimization were determined, namely: Z1574680729 and Z65190667, which have the strong impact on the BCG strain; KS13384, which inhibits BCG culture and directly interact with FtsZ from *S. aureus*. We make the conclusion concerning the prospects of further lead-optimization of SC1-7 scaffolds and the source libraries for combinatorial compounds production are synthesized. Relevant virtual libraries of ligands have been generated, which have undergone all necessary optimizations and have been adopted for docking manipulations. It is concluded that substituents radicals in combinatorial reactions are to ensure successful optimization for biological activity, based on core leaders and appropriate libraries were producted. According to the complete screening protocol, the activity of 13 compounds inhibiting pathogenic strain of *M. bovis* were proved. Eleven compounds selected to inhibit FtsZ, 1 compound capable to inhibit mycobacterial O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1), and one compound demonstrateng dual activity inhibiting CysK1 and FtsZ.

ЗМІСТ

Скорочення та умовні позначки 13

Вступ 14

1 Матеріали та методи 17

Етап 1 та 2 - 2020 року

2. Проведення вирівнювань амінокислотних послідовностей білків-мішеней із різних організмів, акцентуючи увагу на ряді залишків у послідовностях *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*, що забезпечують видоспецифічну селективність 23

3. Визначення найбільш ефективні хімічні сполуки за показниками Ki та IC50 для проведення молекулярного докінгу. Відбір та сортування сполук, подібних за хімічною будовою до відомих лікарських засобів. Реконструкція моделей білків мішеней за гомологією та докінг референтних сполук для ідентифікації важливих амінокислотних сайтів зв'язування 26

4. Підготовка відомих баз даних компаній (ІФЛАБ, Єнамін та Укрооргсинтез) з метою отримання ймовірних тривимірних конформацій із коректним ступенем протонування 28

5. Проведення віртуального скринінгу хімічних молекул у сайти зв'язування білків мішеней. Створення алгоритму відбору молекул та оцінки якості молекулярного докінгу та високо-пропускного скринінгу на основі показників міжмолекулярних взаємодій 29

6. Відбір перших 30-100 речовин аналогів відомих препаратів із передбаченою вище активністю. Оцінка ADMET параметрів за допомогою фізико-хімічних дескрипторів 38

7. Аналіз фізико-хімічних параметрів речовин цільових протеїнів *M. tuberculosis*, обраних для біохімічного скринінгу in vitro. Закладка алгоритму експерименту *in vitro* з інтегруванням

біоінформативних даних докінгу із даними сучасних світових досліджень проблематики 40

8. Проведення аналізу наукових даних щодо сучасних підходів до визначення протимікробної активності протитуберкульозних препаратів та порівняння їх із затвердженими нормативними документами в Україні. Підготовка внутрішньо-лабораторного алгоритму визначення протимікробної дії відібраних хімічних речовин до вакцинного штаму *M. bovis* 49
9. Аналіз літературних даних щодо існуючих праймерів для молекулярно-генетичної ідентифікації *M. bovis*, зокрема, щодо можливості диференційної діагностики вакцинного та польових штамів, замовлення праймерів та їх апробація. Проведення роботи по виділенню польового штаму *M. bovis* за допомого мікробіологічного та молекулярно-генетичного методу 55
10. Дослідження протимікробної дії 3-5 хімічних сполук на вакцинний штам *M. bovis.* Вивчення в епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби в Україні у 2001-2010 році 62

Етап 1 - 2021 року

11. Проведення молекулярного докінгу запропонованих віртуальних речовин у сайти зв’язування білків-мішеней з метою виявлення можливих лідерних сполук; Проведення симуляції молекулярної динаміки для оцінки ймовірності дисоціації обраних лідерних сполук у комплексі з білками-мішенями 69
12. Налаштування біохімічної методики скринінгу інгібувальних властивостей перспективних сполук *in vitro* згідно обраних протоколів 88
13. Дослідження протимікробної дії 3-х хімічних сполук щодо вакцинного штаму *M. bovis*; Проведення роботи по виділенню польового штаму *M. bovis* в зовнішньому середовищі (грунт, вода) за допомого мікробіологічного та молекулярно-генетичного

методу. Вивчення епідемічної ситуації з туберкульозу за період 2001-2010 р.р. 97

14. Синтез віртуальних сполук з найбільш ефективними коефіцієнтами зв'язування 101
15. Проведення біохімічного скринінгу інгібувальних властивостей 1-ї панелі перспективних сполук *in vitro* згідно обраних протоколів 105
16. ADMET експериментальні дослідження. Дослідження токсикологічної дії сполук- кандидатів. На основі токсикологічних даних, у разі високої токсичності, синтез-оптимізація структури лідерів. Віртуальний високо-пропускний скринінг 107
17. Дослідження протимікробної дії 30-100 відібраних хімічних сполук до вакцинного штаму *M. bovis* 121
18. Проведення роботи по виділенню *M. bovis* в господарстві за допомого мікробіологічного та молекулярно-генетичного методу. Вивчення епізоотичної ситуації з поширення туберкульозу великої рогатої худоби за період 2011- 2019 роки 129

Етап 2 - 2021 року

19. Проведення біохімічної перевірки інгібувальних властивостей 2-ї панелі перспективних сполук *in vitro* згідно обраних протоколів. 131
20. Дослідження протимікробної дії хімічних сполук на вакцинний штам *M. bovis*; Дослідження протимікробної дії хімічних речовин із вираженою протимікробною дією на вакцинний штам *M.bovis* на патогенному та польовому штамах. Вивчення епідемічної ситуації з туберкульозу у 2011-2019 р.р. 132
21. Створення та валідація QSAR моделі на основі відомих та отриманих даних за ефективності хімічних сполук 135
22. Порівняння точності та селективності новостворених інструментів відбору хітів. Підготовка протоколу синтезу речовин на основі результатів QSAR 138

23. Дослідити протимікробну дію хімічних речовин із вираженою протимікробною дією до вакцинного штаму *M. bovis* на патогенному та польовому штамах (НУБіП України). Провести узагальнення результатів протимікробної дії досліджених хімічних сполук по відношенні до вакцинного та патогенного штамів *M. bovis* (НУБіП) 140

24. Вивчити взаємозв'язок розповсюдження туберкульозу людей та великої рогатої худоби за період 2001-2019 р.р. 142

25. Підготувати матеріал для написання оглядової публікації із оцінкою різних підходів для вирішення задачі із пошуку інгібіторів на конкретних прикладах; Підготувати опис досліджених класів хімічних сполук із проти-туберкулезною активністю 143

26. Підготовити звіти та наукові публікації (всі організації). 163

Висновки 167

Список використаних джерел 171

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАЧКИ

ADMET - Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, Toxicity (ранжування речовин за властивостями)

HAC – важкі атоми

HBA – акцептори H^+

HBD – донори H^+

IC50 – концентрація речовини, що інгібує ріст або викликає загибель 50 % клітин *in vitro*

MW – молекулярна вага

PAINS – назва фільтру речовин з небажаними властивостями

SA - *Staphylococcus aureus*

QSAR - кількісне співвідношеня структура-властивість

А – ангстрем

АТФ – 2'-дезоксиаденозин-5'-трифосфорної кислоти тетранатрієва сіль

ВТ – FtsZ з організмів туберкульозу бика

ГЕБ - гемато-енцефалічний бар’єр

ГТФ – 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфорної кислот тетранатрієва сіль

КУО – колонієутворюючі одиниці

МД – молекулярна динаміка

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

МТ – FtsZ туберкульозу людини

НКВ – негативний контроль виділення

нс - наносекунда (ns) = 10−9 с

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПС – пептидні синтази

пс - пикосекунда (ps) = 10−12 с

фс - фемтосекунда (fs) = 10−15 с

ШКТ - шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

Розробка нових ефективних ліків проти туберкульозу є нагальною потребою міжнародного рівня. З молекулярно-біологічної точки зору найбільш доцільною є стратегія ідентифікації і використання у клінічній практиці нових лікарських засобів, які спрямовані на унікальні білки представників *Mycobacterium*. Головна увага під час виконання проєкту була надана сполукам, спрямованим на білкові мішені, які через участь у найбільш фундаментальних процесах життєдіяльності мікобактерії зберігають максимальну консервативність і водночас не мають очевидних гомологів у протеомах людини і тварин. Останнє є не менш важливим фактором, оскільки побічний токсичний вплив на організм пацієнта є характерною рисою майже усіх існуючих препаратів, що зараз застосовуються у клінічному лікуванні туберкульозу.

Виконаний проєкт без жодного сумніву є унікальним, як за масштабом віртуального і лабораторного скринінгу, так і з позиції повноти протоколу дослідження. Визначив перспективні інгібітори FtsZ, бактеріальних ферментів, класи сполук-інгібіторів, протоколи їх синтезу, сайти ліганд-білкової взаємодії і докази біологічної дії на живих культурах вакцинного і патогенного штамів мікобактерії. Тобто, вплив сполук-лідерів був підтверджений на рівні інтактної клітини мікобактерії. На підставі аналізу літератури, біоінформатичних і лабораторних досліджень колективу було визначено перспективні молекулярні мішені протитуберкульозної терапії: 1) ключовий білок апарату клітинного поділу мікобактерії і сфери Z-кільця - FtsZ, а також 2) групу унікальних ферментів мікобактерії, що пов’язані з регуляцією цитоскелету, клітинного поділу мікобактерії і потенційно не мають явних гомологів у протеомах ссавців: Shikimate kinase (aroK), Pantothenate synthetase, Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase, O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1), PLP-dependent transaminase (BioA), Fatty acyl-AMP ligases (FAAL), Serine/treonine protein kinases (STPKs), Alanine racemase, dTDP-

4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (rmlC), Beta-lactamase (blaC), Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, Decaprenylphosph-beta-D-ribose oxidase, Isocitrate lyase, dTDP-glucose 4,6-dehydratase (rmlB), N-acetylglucos-1-phosph uridyltransferase (WecA).

Слід зазначити, що запропонована комбінація обчислювальних і лабораторних досліджень дозволила скоротити матеріальні і часові витрати, що зазвичай потрібні для розробки і пошуку нових препаратів. Застосований підхід дозволив скоротити вартість пошуку окремого препарату, і/ а також, охопити безпрецедентну за об'ємом бібліотеку речовин. Слід зауважити, що сильною стороною проєкту є орієнтація на високотехнологічні напрацювання у галузі раціонального драгдизайну орієнтованого на реалії вітчизняного ринку. Всі сполуки, що були залучені у дослідженнях проєкту, а також похідні віртуальні бібліотеки, які використовувались під час скринінгу було створено на основі первинних репозиторіїв українських компаній: Єнамін, ІФЛАБ і Укрооргсинтез. Таким чином можна сміливо стверджувати, що за масштабністю задачі і мультидисциплінарностю підходу подібні дослідження в наукових установах України ще не виконувались.

Загалом, результатом проєкту стала не лише стратегія розробки нових препаратів проти збудника туберкульозу, але і верифікована бібліотека реально існуючих сполук, готових до предклінічних випробувань. Окрім практичної сторони, слід враховувати соціальний аспект проєкту, зв'язаний з популяризацією високотехнологічних досліджень і акцентуванні увагу на існуючих проблемах епідемії туберкульозу в Україні. На сьогодні методи, що застосовувались у проєкті, а також, протоколи виконаних досліджень використовуються у курсах лекцій і практичних тренінгах студентів і аспірантів денної форми навчання ДУ "ІХБГ НАН України" і Київському національному університеті імені Тараса Шевченка.

На сьогодні ми вправі констатувати, що задачі, поставлені на початку проєкту виконані у повної мірі. Ми вважаємо, що визначені в результатами виконання проєкту сполуки, відкривають можливості для розробки

мультикомпанентних протитуберкульозних препаратів, які здатні долати проблеми мультирезистентності. А також, ми сподіваємось на зниження токсичного впливу на пацієнта, що обумовлюється властивостями визначених інгібіторів унікальних молекулярних мішеней мікобактерії, та речовинами, що на нашу думку, здатні подолати проблему захисного бар'єру клітинної стінки мікобактерії.

1 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Біоінформатичний аналіз. Структури із найбільшою подібністю до заданих амінокислотних послідовностей було знайдено за допомогою он-лайн інструменту https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Визначення амінокислотного складу сайтів зв'язування лігандів було виконано на підставі літератури [1] і комплексів з RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org) [2, 3] та PiSITE (https://pisite.sb.ecei.tohoku.ac.jp) [4]. Вихідні амінокислотні послідовності було отримано з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org) [5]. Структури сайтів, а також з'ясування ролі молекул води у ліганд-білковій взаємодії було виконано за допомогою on-line сервісів PoseView (poseview.zbh.uni-hamburg.de) [6] і CCDC Relibase (relibase.ccdc.cam.ac.uk) [7]. А також бази даних sc-PDB (http://bioinfo-pharma.u-strasbg.fr/scPDB/) [8]. Для прогнозування сайтів зв'язування було застосовано множинні та профільні вирівнювання амінокислотних послідовностей і профілів сайтів зв'язування лігандів, виконували он-лайн (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) [9] із застосуванням методу зв'язування найближчих сусідів (http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/embassy/phylipnew/) [10]. Існування і ступень консервативності сайтів зв'язування інгібіторів оцінювали за допомогою інструментів програм EMBOSS (bioinformatics.nl/emboss-explorer/).

Відтворення нативного протонованного стану і молекулярних зв'язків структура ліганду оброблялась за протоколом програми AnteChamber (AmberTools 19) і зберігалась у форматі *.mol2, що підтримує модуль LEaP [11]. Точкові заряди атомів розраховувались відповідно до AM1-BCC моделі розподілу зарядів [12]. Типи атомів та геометричні параметри призначалися за правилами GAFF (General AMBER Force Field) [13]. Корекція параметрів ліганду здійснювалась за допомогою модуля parmchk. На наступному етапі, внутрішній формат топології Amber - *.prmtop, конвертувався в файли *.gro і *.itp програми Gromacs [14, 15]. Молекулярна динаміка розраховувалась із

використанням обчислювальних ресурсів ВО CSLabGrid (http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid) [16].

Як базу для високопропускного віртуального та хімічного скринінгу було використано відкриті бібліотеки – ChEMBL, Zinc та корпоративні бібліотеки сполук Науково-виробничих підприємств “І.Ф.ЛАБ”, “Єнамін” та “УКРОРГСИНТЕЗ”.

Для отримання стабільних комплексів із найбільш якісним відображенням взаємодії між відносно селективними інгібіторами, ми використовували метод Induced Fit Docking (IFD) з пакету ICM-Molsoft [17]. Молекули білкових структур були додатково релаксовані протягом 10-50 нс в силовому полі Charmm36, іноді разом із лігандами, що були параметризовані для розпізнавання в середовищі програмного пакету Gromacs 2019 [18, 19]. Після цього траєкторію кластеризували за допомогою інформації про зсуви показників RMSD (Root mean square deviation). Було проіндексовано атоми, що формують саме сайт зв’язування, і рухливість яких мала оцінюватись. Таким чином, за результатами аналізу ми вибирали найбільш стабільну конформацію, що зустрічалась під час молекулярної динаміки, для кожного із досліджуваних білків. Нашим потребам відповідала структура, яка мала відкритий досліджуваний сайт зв’язування та знаходилась в такому стані або досить довго, або з’являлась на зрізах траєкторії з певною частотою.

Спираючись на положення кофактору або ліганду ми створювали докінгову модель. Молекулярний докінг проводився в програмі CCDC Gold 5.1 із використанням генетичного алгоритму для генерації конформацій ліганду (www.ccdc.cam.ac.uk). Було використано наступні параметри докінгу: розмір популяції 100, вибірка 1.1, островів 10, генетичних операцій 100.000. Результати докінгу оцінювались з точки зору участі ключових амінокислотних залишків, здатних формувати водневі зв’язки, у зв’язуванні лігандів, порівняні значень енергій одних і тих же молекул в сайтах різних білків. Було враховано три оціночні функції – ChemScore, ASP та GoldScore, кожна з яких вичерпно характеризує ймовірність отриманої позиції в сайті зв’язування.

Моделі 3D-QSAR базувалися на формі та параметрах силових полів кожної із досліджуваних молекул, що генеруються програмою Cresset. Первинна група лігандів була поділена випадковим чином на навчальну та тестову субгрупи, що містили 30 та 70% всієї групи, відповідно. Значення активності використовувалися як властивість для генерації прогнозованих значень активності та оцінки якості моделі QSAR [20].

De novo конструювання, аналіз та верифікацію необхідних хімічних молекул буде проведено за допомогою хемоінформатичних методів, органічного синтезу та методів аналітичної хімії, зокрема йонобмінної хроматографії. Комбінаторні бібліотеки будуть перевірені за фізико-хімічними показниками та біоактивінстю речовин. Вихідні сполуки, що використані для синтезу білдінг-блоків, отримані зі складу Інституту органічної хімії НАН України, скринінгові сполуки для первинного біологічного скринінгу (НВП “УКРОРГСИНТЕЗ”). Також у роботі використані сполуки, що були напрацьовані у наших попередніх науково-дослідницьких роботах.

Скринінг потенційних інгібіторів in vitro. GTPазну активність рекомбінантного *S. aureus* FtsZ (FTZ02-A, Cytoskeleton Inc., США) вимірювали на 96-лунковій мікропланшеті за допомогою CytoPhos Endpoint Phosphate Kit (BK054, Cytoskeleton Inc., США) згідно до оптимізованого протоколу і рекомендацій. *S. aureus* FtsZ (7,5 мкМ) попередньо інкубували з серійними розведеннями кожної досліджуваної сполуки (1, 10 та 100 мкг/мл) у буфері, який містив 50 мМ 4-морфолінпропансульфону кислоту (MOPS, pH 6,5) протягом 10 хв при 25°C. Контрольні проби проводили з 1% ДМСО чи абсолютизованим етанолом замість розчину сполуки. Після інкубації додавали 5 мМ MgAc та 250 мМ KAc. Реакцію полімеризації FtsZ із подальшим гідролізом GTP розпочинали з додавання 500 мкМ GTP (10106399001, Roche, Німеччина) та інкубували при 37°C протягом 30 хв. Реакції зупиняли додаванням 140 мкл реагенту CytoPhos. Через 10 хвилин інкубації неорганічний фосфат кількісно визначали шляхом вимірювання поглинання

при 650 нм на планшетному рідері. Було проведено три незалежні аналізи у трьох паралелях. Репрезентативні графіки представлені відсотком інгібування GTPазної активності FtsZ у залежності від концентрації досліджуваних сполук.

Розведення хімічних речовин та приготування поживного середовища із різними концентраціями хімічних сполук. Для дослідження використовували основу поживного середовища *Lowenstein Jensen Medium Base* w/o M. Green (Condalab, Іспанія). У процесі приготування поживного середовища вносили яєчну масу та розчин малахітового зеленого приготовленого на дистильованій воді у кількостях згідно пропису до поживного середовища. Із наданої хімічної речовини готовили основний розчин із концентрацією 1000 мкг/мл. Спочатку речовину розчиняли у співвідношенні 1:200 у диметилсульфоксиді після чого додавали дистильовану води до отримання необхідної концентрації. З отриманого розчину готовили серійні розведення діючої речовини у поживному середовищі (концентрації для кожної речовини зазначені у таблицях із результатами дослідження).

Приготування інокулюму та посів культури вакцинного штаму BCG. Готували гомогенну бактеріальну суспензію культури вакцинного штаму *M.bovis* в ізотонічному розчині NaCl. Для цього культуру, що виросла на щільному поживному середовищі Левенштейна-Єнсена, знімали тампоном, попередньо змоченим у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду. Потім тампон занурювали у пробірку, що містить 2,0 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, культуру змивали в рідину, попередньо розтираючи по внутрішніх стінках пробірки. Пробірку залишали на 30 хв за кімнатної температури для осадження часточок культури.

Суспензію культури стандартизували за бактеріальним стандартом мутності з використанням денситометру до робочого розведення $1x10^7$ КУО. Інокулюм робочого розведення культури вакцинного штаму *M. bovis* вносили у пробірки з середовищем, закривали щільно корками та заливали парафіном.

Пробірки складали у горизонтальні штативи і поміщали для інкубації в термостат за температури 37°С. При цьому поверхня скосу поживного середовища знаходилася у горизонтальній площині, а нахил штативу виключав торкання пробки з матеріалом посіву. Суспензія, що засівалася, рівномірно покривала всю поверхню скосу поживного середовища.

Облік та інтерпретація отриманих результатів. Оцінку мікробної чутливості вакцинного штаму *M. bovis* до досліджуваної речовини здійснювали через три тижні інкубації в термостаті. У випадку поганого росту культури мікобактерій на контрольному поживному середовищі інкубували дослідні й контрольні пробірки ще 1-2 тижні до отримання вираженого росту в контролі, після чого робили остаточний висновок. Під час використання методу абсолютних концентрацій культура *M. bovis* вважається стійкою, якщо на поживному середовищі з певним препаратом виростає 20 і більше колоній мікроорганізмів у разі рясного росту в контрольній пробірці (без препарату).

Перевірка культури вакцинного штаму BCG методом класичної ПЛР перед посівом на поживне середовище. Екстракцію ДНК здійснювали із використанням комерційного набору «ДНК-сорб-Б» згідно інструкції виробника. Ампліфікацію проводили за допомогою праймерів для диференційної діагностики *Bacilius Calmette-Guerin (BCG)* та *M. tuberculosis complex* (ET1-5’-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3’, ET2-5’CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3’і ET3, 5’-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3’). Для ампліфікації використовували комерційну ПЛР-суміш Tag 2x PCR-Mix M0207L (NewEngland Biolabs). Екстраговану ДНК із зразків вносили в кількості 5 мкл. За ампліфікації пари праймерів *ET2* and *ET3* штами M. *tuberculosis complex* утворють ПЛР-продукт розміром 150 п.н. тоді як ампліфікація вакцинного штаму із даною парою праймерів не дає специфічного ПЛР-продукту. При використанні пари праймерів *ET1* and ET3 вірулентні штами не дають специфічного продукту тоді як ампліфікація BCG дає специфічний продукт розміром 200 п.н. Дослідження проводили у термоциклері 2720 (Applied Biosystems). Продукти

ампліфікації розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі.

Виділення польового штаму Mycobacterium bovis за допомого мікробіологічного та молекулярно-генетичного методів. Виділення польового штаму здійснювали з об'єктів навколишнього середовища (грунт, вода) у господарствах Київської області. Одне господарство було неблагополучне щодо туберкульозу великої рогатої худоби у 2011 інше у 2005 році. Відбір зразків здійснювали у одноразові пластикові контейнери у кількості 30 – 50 гр. Проведено відбір 19 зразків ґрунту, перегною, гноївки, води (12 зразків з одного господарства та 7 з другого). Підготовку зразків здійснювали відповідно стандартних методів грунтової мікробіології і біохімії. Посів відібраних зразків проводили на середовище Левенштейна-Єнсена. Інкубація зразків проводили за температури + 37 °С. Ревізія посівів здійснювалась кожних 7 днів на протязі всього періоду інкубування (90 діб).

2 ПРОВЕДЕННЯ ВИРІВНЮВАНЬ АМІНОКИСЛОТНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ БІЛКІВ-МІШЕНЕЙ ІЗ РІЗНИХ ОРГАНІЗМІВ, АКЦЕНТУЮЧИ УВАГУ НА РЯДІ ЗАЛИШКІВ У ПОСЛІДОВНОСТЯХ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ТА *MYCOBACTERIUM BOVIS*, ЩО ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ ВИДОСПЕЦИФІЧНУ СЕЛЕКТИВНІСТЬ

За останніми даними МОЗ туберкульоз залишається однією з 10 найбільших причин смертності у всьому світі, тоді як лікування його є тривалим процесом, що має багато побічних ефектів. Саме відкриття та розробка нових ефективних препаратів проти туберкульозу, які спрямовані на нові біохімічні шляхи та лікують лікарсько-стійкі форми захворювання, є нагальною потребою.

Так *FtsZ* є складовою бактеріального цитоскелету та близьким аналогом тубуліну, проте на даний момент просторова структура FtsZ туберкульозу бика (BT) не представлена в жодній базі даних. Нарівні з білками сфери Z-кільця, значна увага надається ферментам, що асоційовані з регуляцією апарату поділу бактеріальної клітини та основними процесами синтезу. На підставі аналізу літератури і баз даних, було визначено, що потенційними молекулярними мішенями протитуберкульозних сполук можуть бути рецепторна протеїнкіназа PknB і ключова протеїнкіназа шикіматного шляху – AroK, ацил-АМФ-лагаза жирового шляху (FAAL), О-ацетилсерин сульфодрилази CysK1, фруктозо1,6-біфосфат альдолаза другого класу FBA, пантотенат синтаза, тощо. На підставі аналізу літератури і геномних/протеомних баз даних були відібрані мішені, які впливають на фундаментальні процеси в клітинах представників *Mycobacterium,* зокрема формування Z-кільця чи опосередковано через асоційовані молекулярні мішені та не мають явних гомологів у людини. У дослідження первинною вибіркою увійшли наступні класи перспективних мішеней *Mycobacterium* :

- АМФ лігази (PMID: 22283817),

- Сульфодрилази (PMID: 17567578),
- Серин-треонін та тирозин протеїнкінази (PMID: 25429354),
- Фруктоза-бісфосфат альдолази (PMID: 24325645),
- Пантотонат-синтези (PMID: 18821554), а
- Мінотрансферази (PMID: 26068403),
- Редуктази (PMID: 25383419)
- Ftsz-білки.

За даними літератури та проведеного патентного пошуку відібраний список мішеней представляє основу головними чинниками нових стратегій щодо розробки лікарських препаратів проти туберкульозу [21]. Попередньо вважалось, що саме пошук нових альтернативних мішеней блокування мітотичного циклу може бути перспективним підґрунтям до розробки нових лікарських препаратів проти туберкульозу, проте додатковий аналіз дозволив сформувати ряд мішеней які також перспективні для даного дослідження: alanine racemase, dtdp-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase, decaprenylphosph-beta-d-ribose oxidase, n-acetylglucos-1-phosph uridyltransferase, beta-lactamase, isocitrate lyase (Рис. 2.1).

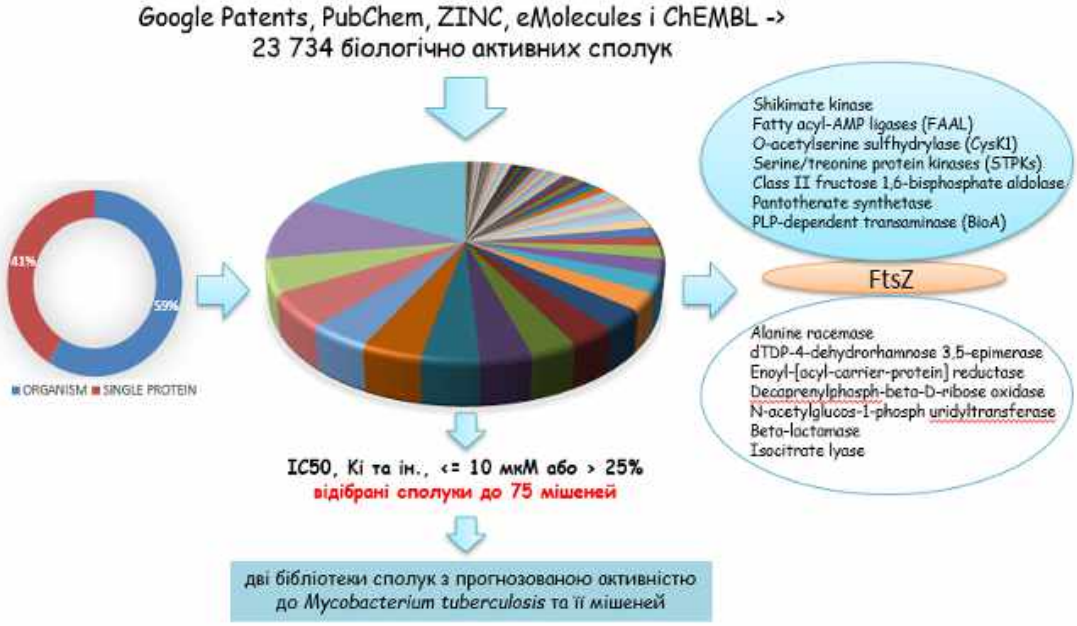


Рисунок 2.1 - Алгоритм визначення пріоритетних молекулярних мішеней.

Для пріоритетних мішеней було проведено аналіз амінокислотних послідовностей та структур цільових білків з *M.tuberculosis ma M.bovis* за наведеним алгоритмом дослідження на Рис. 2.2.

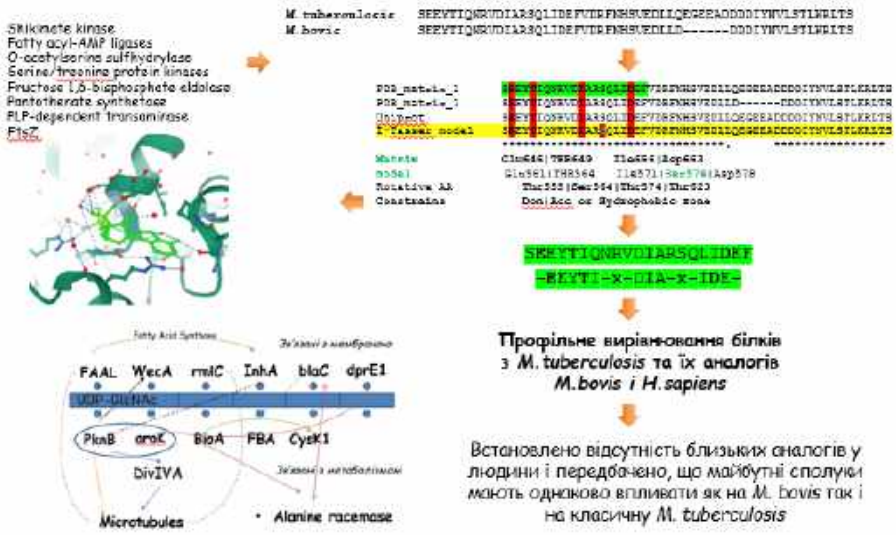


Рисунок 2.2 - Алгоритм аналізу пріоритетних молекулярних мішеней.

Результати проведеного множинного вирівнювання та кладистичного аналізу амінокислотних послідовностей білків-інтересу цільових видів мікобактерій проти інших видів даного роду бактерій свідчать про консеватившчть мешеней з *M. tuberculosis* та *M. bovis*. На основі пошуку за гомологією встановлено ідентичні положенні амінокислот, сайти зв'язування з кофакторами, місця зв'язування з нуклеїновими кислотами, сайту мутагенезу, тощо (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1 - Фрагмент аналізу амінокислотних послідовностей цільових білків

Назва	**Ідентичність *M.tuberculosis* та *M.bovis***	**Структури для реконструкції ортологів**	**Ідентичність структури шаблону**
FAAL	99,8%	5hm3.1.A,5ey9.1.A, 5icr.2.A, 5icr.1.A	89 до 92%
CysK1	100%	2q3dA, 1d6sA, 4aecA, isqA	99%
DprE1	100%	2P8C	100%
STPKs	100%	4X3F, 4OW8	100%
FBA	100%	3ekzA, 1dosA, 3qm3A	96 - 99%
PanC	100%	4G5F, 3IVC, 3IUE	95 – 96%
BioA	100%	3LV2, 4W1W	99.77 – 100%
BlaC	99,82%	3ZHH, 6N14	100%
InhA	100%	7KXA	100%

3 ВИЗНАЧЕННЯ НАЙБІЛЬШ ЕФЕКТИВНИХ ХІМІЧНИХ СПОЛУК ЗА ПОКАЗНИКАМИ KI ТА IC50 ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ. ВІДБІР ТА СОРТУВАННЯ СПОЛУК, ПОДІБНИХ ЗА ХІМІЧНОЮ БУДОВОЮ ДО ВІДОМИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ. РЕКОНСТРУКЦІЯ МОДЕЛЕЙ БІЛКІВ МІШЕНЕЙ ЗА ГОМОЛОГІЄЮ ТА ДОКІНГ РЕФЕРЕНТНИХ СПОЛУК ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВАЖЛИВИХ АМІНОКИСЛОТНИХ САЙТІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ

Аналіз ефективних хімічних сполук. З молекулярно-біологічної точки зору, найбільш підходящою стратегією конструювання лікарських засобів на основі структури (SBDD) є виявлення та розробка нових лікарських засобів, націлених на унікальні білки мікобактерій туберкульозу, які беруть участь у найважливіших процесах мікобактерій, зберігаючи максимум консерватизм, не маючи прямих гомологів у людини та тварин. Цей підхід покращує шанси подолання побічних ефектів, пов'язаних з інгібуванням подібних білкових мішеней господаря.

За результатами проведеного пошуку в базах даних Google Patents, PubChem, ZINC, eMolecules і ChEMBL було відібрано 23 734 біологічно активних сполук (IC50, Ki та ін., менше ніж 10 мкМ, інгібування> 25%) депоновану біологічно-активну речовину з селективною дією по відношенню до мікобактерій як організму та їх цільових білків . Зведену групу потенційних інгібіторів було перевірено згідно з правилами конструювання лікарських засобів (drug design rules), а також на наявність певних фрагментів – характерних фармакофорів.

Застосовуючи метод пошуку за гомологією (2Д-фінгерпринти, алгоритм Танімото і Тверські з порогом подібності до 85%) до отриманого набору сполук з баз даних нами було розроблено дві бібліотеки низькомолекулярних сполук з прогнозованою активністю до відповідних як для бактерії

Mycobacterium tuberculosis, так і для відібраних раніше білкових мішеней та родин білків у співвідношенні 41:59 [22 - 24].

Реконструкція просторової структури мішеней. За результатами першого етапу аналізу цільових білків з бази даних RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) було взято частину білків- матриць або з метою їх подальшого використання для реконструкції просторової структури гомологів бичого туберкульозу. У зв'язку з тим, що для частини досліджуваних білків були відсутні експериментально підтверджені моделі, перед реконструкцією був використаний метод передбачення вторинної структури SOPMA. З вірогідністю до 73% встановлено основні елементи первинної компактизації поліпептидного ланцюга білкової молекули: α-спіралі, β- складки, β-поворот і ділянки з нерегулярною структурою.

Подальше моделювання 8-ми досліджуваних ферментів та 1 структурного білку було виконано за допомогою сервера I-TASSER з виключенням матриць іншого типу і низької роздільної здатності. Ідентичність амінокислотного сиквенсу *M. bovis* становила 95-100%, схожість 90-99%, а відсоток гепів при порівнянні каталітичних гомологів та матриць з експериментально отриманої просторовою структурою не перевищував 0,4%.

Результати аналізу в програмі BIOVIA DS Visualizer підтвердили цілісність обраних шаблонних PDB-структур, а також їх конформаційну достовірність (на основі аналізу кутів φ и ψ із застосуванням конформаційних карт Рамачандрана). Результати оптимізації геометрії з використанням силового поля Amber3 і алгоритму Полака-Рібера (Polak-Ribiere) у вигляді кінцевих показників енергії.

Таким чином, було створено локальну базу мішеней у повноатомних форматах для нормального прочитання програмами для молекулярного моделювання та докінгу.

4 ПІДГОТОВКА ВІДОМИХ БАЗ ДАНИХ КОМПАНІЙ (ІФЛАБ, ЄНАМІН ТА УКРООРГСИНТЕЗ) З МЕТОЮ ОТРИМАННЯ ЙМОВІРНИХ ТРИВИМІРНИХ КОНФОРМАЦІЙ ІЗ КОРЕКТНИМ СТУПЕНЕМ ПРОТОНУВАННЯ

Для виконання даного проєкту найбільшими хімічними компаніями, що мають представництво в Україні було надано доступ до вихідних даних усіх синтезованих сполук загальною кількістю близьку 5ти мільйонів унікальних сполук. Подальша обробка бази, що після аналізу можливих конформацій налічувала близько 15 мільйонів речовин зводилась до фільтрації за медико-хімічними та PAINS фільтрами, що видаляють небажані з біологічної точки зору структури. Вся ця процедура була проведена за допомогою програми DataWarrior та набору скриптів RDKit, встановлених на кластері інституту (Рис. 4.1). Подальша протонація всіх сполук, щоб мінімізувати невигідний розподіл зарядів дозволила скоротити один з етапів молекулярного докінгу. Згенеровано тривимірні структури, що додатково були оброблені більш складним алгоритмом опису поверхні кожного конформеру за допомогою програми Omega з пакету OpenEye. В результаті виконаного етапу роботу, запис кожної з 15-ти мільйонів молекул (2,5 млн унікальних сполук) включав набір фізико-хімічних показників, а також, як вихідну геометрію, так і ряд сгенерованих конформерів. Варто зауважити, що для кожної конформації було додано електростатичну мапу поверхні, що збільшує якість докінгу.

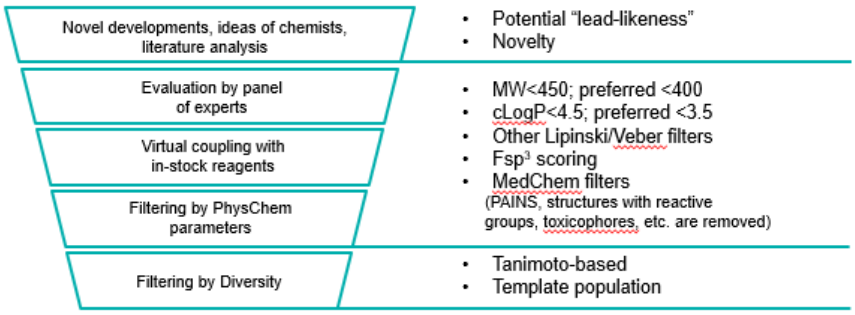


Рисунок 4.1 – Етапи підготовки похідної бібліотеки сполук з врахуванням їх конформаційної мінливості.

5 ПРОВЕДЕННЯ ВІРТУАЛЬНОГО СКРИНІНГУ ХІМІЧНИХ МОЛЕКУЛ У САЙТИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ БІЛКІВ МІШЕНЕЙ. СТВОРЕННЯ АЛГОРИТМУ ВІДБОРУ МОЛЕКУЛ ТА ОЦІНКИ ЯКОСТІ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ТА ВИСОКО-ПРОПУСКНОГО СКРИНІНГУ НА ОСНОВІ ПОКАЗНИКІВ МІЖМОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ

На основі отриманих результатів аналізу послідовностей та структури мішеней було створено алгоритм оцінки якості ферментів мікобактерій з метою визначення пріоритетних мішеней і цільових сайтів молекулярного докінгу та високо- пропускного скринінгу на основі показників міжмолекулярних взаємодій. Наразі відомо декілька молекулярних мішеней медикаментозного лікування туберкульозу. В межах проєкту було визначено критерії їх ранжування, і розроблена шкала (від 0 до 100, крок=20), що враховувала 5 ключових критеріїв. Максимальний кумулятивний бал складав «500»:

I. Публікації, що підтверджують факт цільового пригнічення мішені і її асоціації з протибактеріальною дією.

1) Публікації, депоновані в наукометричних базах даних - відсутні.

2) Публікації, що ґрунтуються виключно на методах *in silico*;

3) Публікації не супроводжуються структурними даними;

4) В літературі існують достовірні дані, підтверджені експериментом, депонуваннями RCSB Protein Data Bank, ChEMBL і аналогічними авторитетними ресурсами, але також, можливі і альтернативні взаємодії;

5) Існують достовірні дані селективної взаємодії підтверджені експериментом. Публікація супроводжується, або підтверджується депонуваннями RCSB Protein Data Bank, ChEMBL і аналогічними авторитетними ресурсами.

II. Структурні дані RCSB Protein Data Bank, або можливість біоінформатичної реконструкції просторової структури цільового білку.

1) Обґрунтована реконструкція структури - неможлива;

2) Моделювання проблематичне і неможливо із використанням виключно шаблонних методів - можливо лише з залученням методів *ab initio* (на підставі прогнозування);

3) Реконструкція можлива за гомологією до шаблонних білків з інших родин. Методи моделювання аналогічні I-Tasser;

4) Відсутність PDB-структур цільового білку, але існують гомологічні комплекси бактеріального походження, або модель AlphaFold;

5) Наявність в RCSB Protein Data Bank структур цільового білку в комплексі із лігандами.

III. Інформація стосовно цільового сайту ліганд-білкової взаємодії.

1) Діні відсутні. Існує лише гіпотеза стосовно цільового білка;

2) Прогноз сайту можливо зробити лише біоінформатичними методами;

3) Прогнозування можливо на підставі топології лігандів шаблонних структур іншого походження - теоретичні комплекси I-Tasser та ін.;

4) Сайт визначено на підставі гомології, але існує біохімічне підтвердження цільової взаємодії з зазначеною мішенню;

5) Наявність в PDB-комплексів з опорними речовинами, відповідна якість структур, наявність підтвердження сайту в літературі, дані ChEMBL.

IV. Наявність ефективних синтетичних інгібіторів небілкової природи.

1) Дані відсутні;

2) Існує теоретична можливість хімічного синтезу аналогів нативних агентів;

3) Наявність синтетичних лігандів, що мають біологічний ефект але мішень теоретична і ще не підтверджена прямим експериментом - дані PDB, ChEMBL, біохімічні дослідження, та ін.;

4) Наявність синтетичних інгібіторів небілкової природи для яких існує біохімічне і структурно-експериментальне підтвердження взаємодії з

мішенню, але опорні речовини ще не пройшли сертифікацію FDA. Складнощі синтезу;

5) Відомі синтетичні інгібітори для яких існує біохімічне і структурно-експериментальне підтвердження взаємодії з мішенню, знаходяться на стадії впровадження FDA. Мають реалістичні протоколи синтезу.

V. Відсутність альтернативних молекулярних мішеней у людини.

1) Наявність підтверджених структурно-функціональних гомологів;

2) Існування хітів ділянок цільових доменів і сайтів;

3) Відсутність хітів при blastp-скануванні анотованих послідовностей UniProtKB з використанням ваговій матриці Blossum62;

4) Відсутність явних гомологів в протеомах ссавців підчас blastp-сканування анотованої частини бази даних UniProtKB;

5) Відсутність хітів під час будь-якого пошуку засобами сервісів родини blast в повних базах даних UniProtKB (www.uniprot.org) і Protein (NCBI\GeneBank). Відсутність даних літератури.

В межах проєкту, оцінювання виконувалось для основної (1) і додаткової (2) груп ферментів мікобактерії (Табл. 5.1).

Таблиця 5.1 - Підсумки ранжування перспективних молекулярних мішеней серед двох груп ферментів *Mycobacterium tuberculosis*

Молекулярна мішень	1	2	3	4	5	Σ
Shikimate kinase P9WPY3 (AROK_MYCTU, aroK Rv2539c, MTCY159.17)	80	80	80	80	100	**420**
Pantothenate synthetase	80	80	80	80	100	**420**
Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA)	80	80	80	80	80	**400**
O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1)	80	80	80	80	60	**360**
PLP-dependent transaminase (BioA)	80	80	80	80	40	**360**
Fatty acyl-AMP ligases (FAAL)	60	60	60	80	80	**340**
Serine/treonine protein kinases (STPKs)	80	60	80	40	80	**340**
Додаткові мішені	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	
Alanine racemase	80	80	80	80	80	**400**
dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (rmlC)	80	80	60	80	80	**380**
Beta-lactamase (**blaC**)	80	80	80	60	80	**380**
Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	80	100	80	80	40	**380**
Decaprenylphosph-beta-D-ribose oxidase	80	80	80	80	40	**360**
Isocitrate lyase	80	80	60	60	60	**340**
dTDP-glucose 4,6-dehydratase (rmlB)	60	40	40	80	40	**260**
N-acetylglucos-1-phosph uridyltransferase (**WecA**)	60	40	40	60	40	**240**

Згідно ранжуванню, у основному списку найбільш перспективними було визначено шикімат кіназу aroK і пантотенат сінтетазу. Також, заслуговують на увагу фермент альдолаза FBA. З додаткового списку, найбільш перспективною мішенню було визначено аланін-рацемазу (alr).

Згодом розроблену методику створення таргетних бібліотек розроблену в лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ ІХБГ НАН України було відпрацьовано на одній з цільових мішеней проєкту. Враховуючи досвід фахівців проєкту, пріоритетним завданням якої є вивчення цитоскелету для тестування методики було обрано FTsZ-білки (Рис. 5.1).

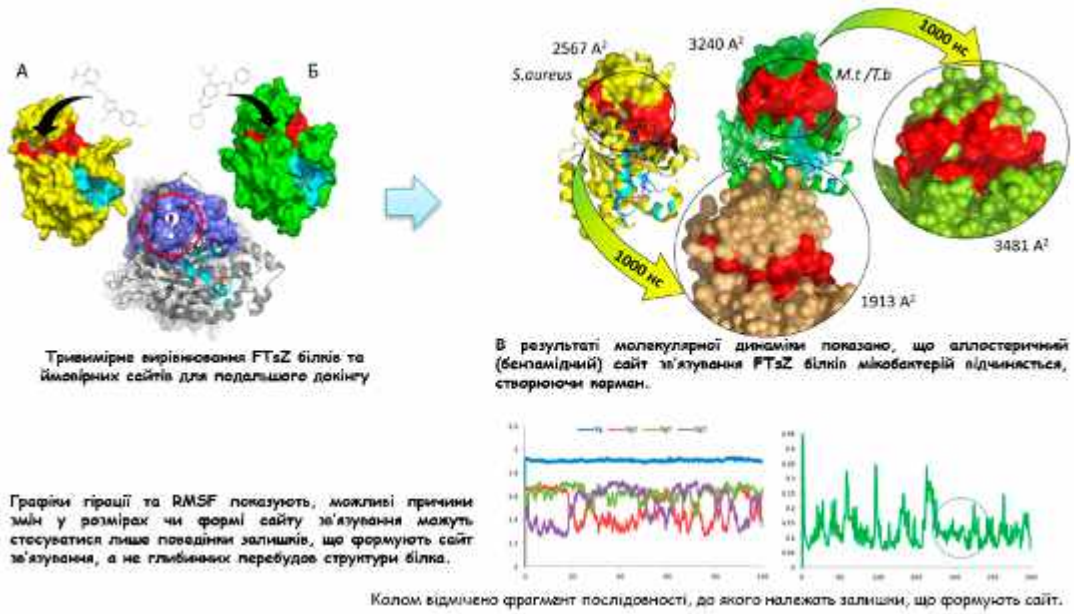


Рисунок 5.1 - Приклад розробленого протоколу для бактеріального FTsZ-білку.

Виходячи із подібності між бактеріальними FTsZ та еукаріотичними тубулінами, досліджували і структури тубулінів, щоб знизити ймовірність небажаних ефектів при використанні потенційних інгібіторів. Зважаючи на незначну кількість та значну відмінність в будові лігандів проти FtsZ *M.tuberculosis* (MT) та *S.aureus* (SA). Тому на Рисунку 5.2 приведені структури молекул FTsZ не тільки з організму MT, але й FtsZ із *S.aureus* і тубуліни людини. Особливо було сфокусовано нашу увагу на поверхнях карманів, що

відповідають ГТФ-зв’язуючому та бензамідному сайту. Нам необхідно було показати можливість використання подібних білкових структур (MT, SA) для біохімічних дослідження, тому ми мали визначити ступінь специфічності референесних сполук. Отже, наступний етап дослідження FtsZ білка стосувався проведення молекулярної динаміки та аналізу траєкторій для визначення найбільш стабільних та дещо відмінних між собою конформацій сайту та визначення залишків, що потенційно можуть бути найбільш значущими для зв’язування лігандів та координування їх функціональних груп (Рис. 5.2). Моделі FtsZ з мікроорганізмів туберкульозу та стафілокока були оптимізовані із молекулою ГТФ у зв’язуючому сайті.

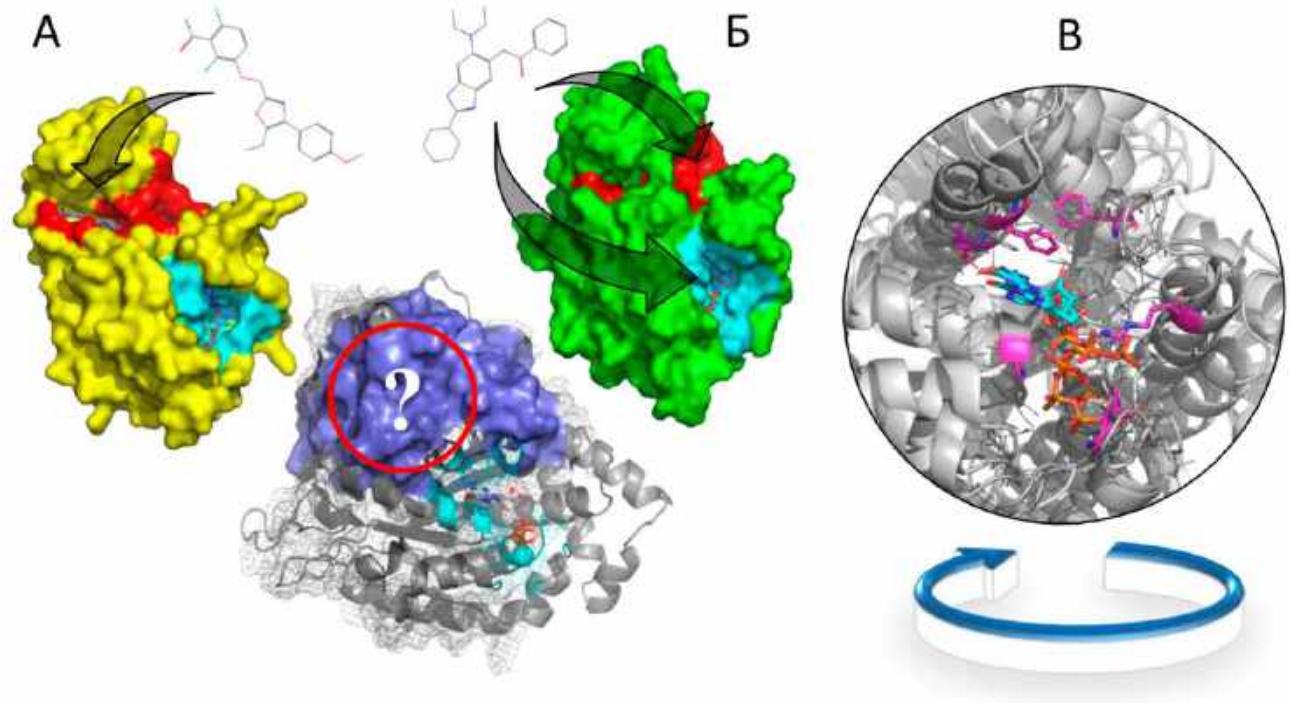


Рисунок 5.2 - Тривимірне вирівнювання FTsZ білків *S.aureus* (А) та Мт (Б). На поверхні червоним кольором виділено алостеричний сайт зв’язування та показано найбільш активні молекули, що не є ГТФ конкурентними, але, можливо, видоспецифічні. На поверхні молекули тубуліну показано потенційне місце розташування (червоне коло), проте поверхня не відповідає критеріям сайту. ГТФ-зв‘язуючий сайт є досить канонічним, рожевим кольором показані ідентичні залишки в різних білках, що взаємодіють із субстратом (В).

Для молекулярного моделювання використовували пакет GROMACS 2018 та вбудовані інструменти для аналізу даних [19]. Спираючись на досвід роботи з білками цитоскелету, для розрахунків динаміки білкової молекули було обрано силове поле CHARMM36, а молекула ГТФ була опрацьована сервером SwissParam.ch для створення файлу тології молекули та забезпечення відповідності між параметрами ліганду та білка [25]. Вільна молекулярна динаміки триває, в середньому, 100 нс для молекул білка у присутності та відсутності субстрату в водному оточенні (модель молекул води TIP3P).

Вхідні параметри математичних алгоритмів (термо- та баростат) для підтримки температури, тиску у системі відповідали значенням 310 К та 1 бар. Для підтримання балансу між швидкістю та якістю розрахунків ми обрали радіус кулонівських та ван дер Ваальсових взаємодії, в які потрапляють оточуючі атоми, довжиною в 1.2 нм. Для розрахунків довгих електростатичних взаємодій між атомами і утримання рівноваги в системі після кожної ітерації застосовувався PME (Particle mesh Ewald) алгоритм [15]. Це, в свою чергу, дозволило уникнути колапсу системи при збільшенні кроку ітерації обчислень швидкостей та координат атомів з 1 фс (за замовчуванням) до 3 фс під час вільної динаміки. Всі ці елементи моделювання разом сформували досить ефективний інструмент для дослідження наших об’єктів. Атом магнію використовувався в якості координаційного металу для стабілізації фосфатного ланцюга молекули ГТФ.

Для більшої впевненості у результатах конформаційного аналізу та перебудов потенційного сайту зв’язування було одночасно досліджено цю саму систему протягом 1 мкс. Зважаючи на досить довгу тривалість молекулярної динаміки, було вибрано силове поле SIRAH2.0, що використовується для роботи із занадто великою кількістю атомів або для розширення часових меж [25].

Однією з переваг нашого експерименту було те, що була реальна змога порівняти напрямок структурних змін та поведінку об’єктів в залежності від типу молекулярної динаміки (Рис. 5.3).

Для переведення білкової молекули до нового силового поля було конвертовано молекулу у програмі Chimera (модуль PDB2PQR) [Wang J, 2004]. Для відповідності внутрішнім базам топологій залишків силового поля SIRAH2.0, типи атомів, що показувались при проведенні процедури, призначалися за схемою назв розробленою для повноатомного поля CHARMM [18].

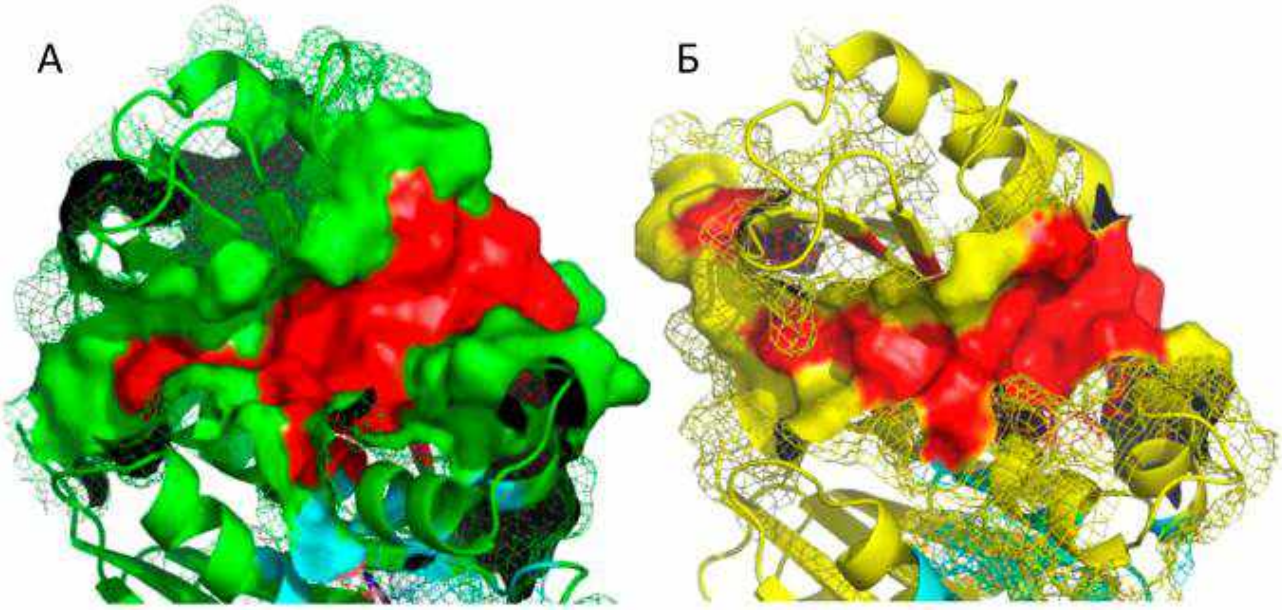


Рисунок 5.3 - В результаті 100 нс молекулярної динаміки аллостеричний сайт зв’язування, показано червоним, в молекулі MT (А) відчиняється, створюючи карман. В той же час, в молекулі SA (Б) сайт зв’язування, навпаки, майже зникає.

Результати розрахунків були опрацьовані інструментами з аналізу, що входили до пакету GROMACS та передбачали у першу чергу аналіз середньоквадратичного зміщення атомів (RMSD), дослідження укладки структури за допомогою значень радіусу гірації (Rg). Ці характеристики є чи не основними для підтвердження коректності проведеної роботи та доцільності подальшого аналізу траєкторії (Рис. 5.4).

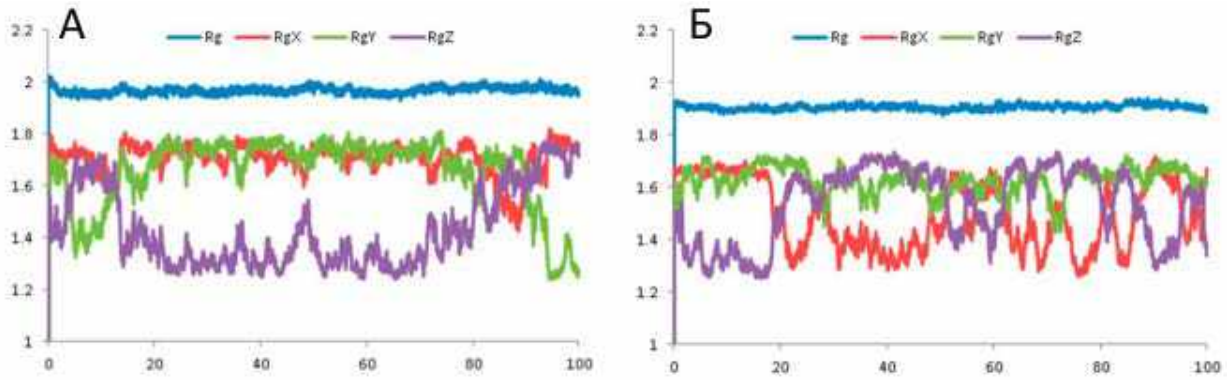


Рисунок 5.4 - Графики гірації SA (А) та MT (Б) демонструють певні структурні перебудови, що підтверджуються відповідною кількістю конвергенцій ліній. Так молекула MT виглядає значно стабільнішою, адже чим частіше спостерігається взаємне перетинання графіків (відповідають трьом осям у просторі), тим більш компактна структура молекули.

Для подальшого докінгу необхідно було вибрати ряд зрізів протягом кожної молекулярної динаміки, що відповідають найбільш стабільним та, водночас, відмінним між собою конформаціями. В даному випадку повернулися до більш точних розрахунків у системі повноатомних полів. Цей аналіз також базується на показниках RMSD, тому окремо було створено додатковий список номерів атомів, що належали досліджуваним на попередньому етапі амінокислотам. В цьому випадку, для дослідження поведінка оточення малого за розміром сайту була більш значущою ніж, можливо, суттєві зміни в інших ділянках білкової молекули. Під час аналізу до кластерів потрапляли лише конформації, що характеризувалися кроком зміщення в 0.15 нм для атомів сайту за показниками RMSD. Результатом аналізу став набір центральних структур кластерів та повний опис кластерів та ряду характеристик, що стосуються всіх компонентів кластерів (розмірів, ступінь девіації від початкових координат, часовий проміжок).

Таким чином, в результаті створення алгоритму відбору молекул за допомогою відкатки молекулярної динаміки однієї з ключових мішеней проєкту було отримано три зрізи молекулярної динаміки, які вказували, що сайти залишалися стабільними протягом довгого часу та демонстрували

повторюваність, з’являючись знову і знову у певних проміжках часу. Основним засобом для оцінки розміру, глибини та форми сайту є візуальний аналіз, що дозволив швидко та якісно порівняти між собою всі одинадцять зрізів молекулярної динаміки та зменшити їх до п’яти, відсіявши схожі між собою. Фінальним етапом підготовки алгоритму для високопропускного скринінгу багатомільйонної бази була проведена підготовка структури білка. В даному випадку для створення моделей використовувались отримані комплекси із накладеними один на одний лігандами.

6 ВІДБІР ПЕРШИХ 30-100 РЕЧОВИН АНАЛОГІВ ВІДОМИХ ПРЕПАРАТІВ ІЗ ПЕРЕДБАЧЕНОЮ ВИЩЕ АКТИВНІСТЮ. ОЦІНКА ADMET ПАРАМЕТРІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ДЕСКРИПТОРІВ

В ході даного етапу було проведено аналіз літературних даних відносно вже відомих сполук, які проявили активність на мішені (бактеріальні пептиди) задекларовані у даному проєкті. Аналіз відомих на цей час сполук, які проявляли на данні мішені активність, показав, що є багато скафолдів, які зовсім не задовольняють сучасним вимогам до Лікарських засобів, а саме: одні – не задовільнять вимогам розчинності, а інші не проходять токсикологічні тести, бо мають в собі завідома токсичні залишки чи функціональні групи. Розглянемо це на прикладі інгібіторів сульфгідрилази CysK1 (Рис. 6.1).

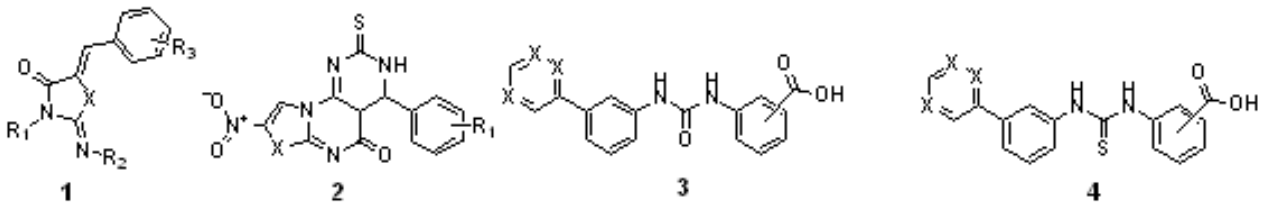


Рисунок 6.1 - Інгібітори O-acetylserinesulfhydrylase CysK1.

Перші **1,2** дуже погано розчинні тому постає питання доставки діючий речовини до мішені, крім того по своїй суті являються ковалентними інгібіторами – тобто утворюють ковалентні зв’язки з мішенню тому часто дуже токсичні. Сполуки типу **1** проявляють дуже високу протиракову активність – тобто дуже цитотоксичні, і постає задача селективності до патогенну, а не до всього організму. Але, безперечним здобутком ковалентних інгібіторів є те що на них в патогенах майже не виникає резистентності. На відміну, сполуки типу **3,4** – діють як протеїн-протеїн інгібітори, тому менш токсичні та краще виводяться з організму. Тому відомі інгібітори встановленого ряду білків було проаналізовано за двома видами

скаффолдів: ковалентного типу дії та білок-білкового. За допомогою докінгу та молекулярної механіки було відібрано 100 шт скринінговіх сполук з 2,5 млн., які є в наявності в базах компаній ІФЛАБ, Єнамін та Укрооргсинтез, та які можна об’єднати у скафолди (Рис. 6.2).

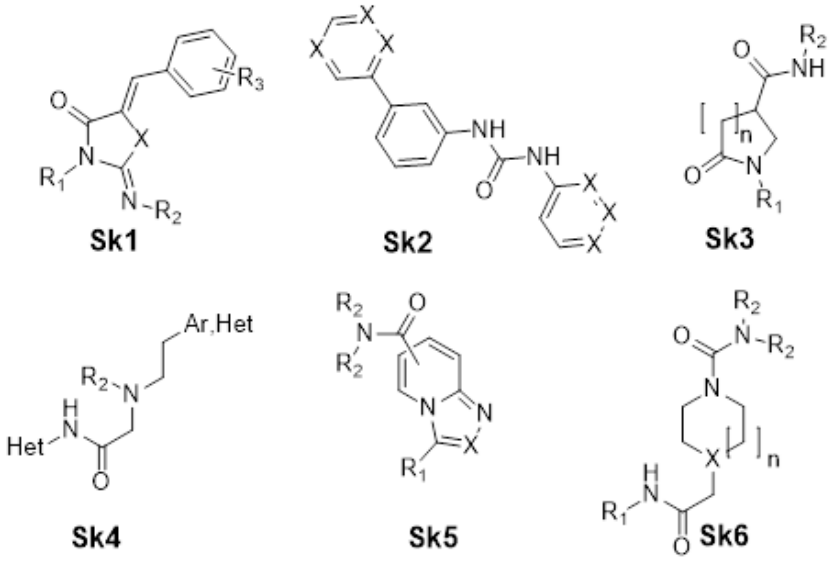


Рисунок 6.2 - Відібрані 100 шт скринінговіх сполук з 2,5 млн., які є в наявності в базах компаній ІФЛАБ, Єнамін та Укрооргсинтез, що об’єднати у скафолди.

Хоча первинне завдання було відібрати 3-4 скаффолдів, але після комп’ютерних розрахунків було прийнято рішення розширити діапазон пошуку до 6 скаффолдів на первинному скринінгу для більш повного дослідження. По даним скаффолдами було згенеровано 2 500 000 віртуальних сполук після фільтрації по молекулярній масі та LogP залишилось біля 150 000 сполук. Наступна фільтрація була зроблена за параметрами наявності вихідних сполук так, щоб можна було зробити їх синтез в один крок. В результані отримано бібліотеки віртуальних сполук, які можна синтезувати у продовж 1-2 тижнів (Sk1 – 1162 шт, Sk2 – 95 шт, Sk3 – 11883 шт, Sk4 – 12 шт, Sk5 – 12273 шт, Sk6 – 742 шт) та тестувати за допомогою докінгу та молекулярної механіки. Це дозволяє отримати ряд сполук, які мають найкращі дані енергії зв’язування з відповідним білком та кращі фізико-хімічні властивості.

7 АНАЛІЗ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ РЕЧОВИН ЦІЛЬОВИХ ПРОТЕЇНІВ *M. TUBERCULOSIS*, ОБРАНИХ ДЛЯ БІОХІМІЧНОГО СКРИНІНГУ *IN VITRO*. ЗАКЛАДКА АЛГОРИТМУ ЕКСПЕРИМЕНТУ *IN VITRO* З ІНТЕГРУВАННЯМ БІОІНФОРМАТИВНИХ ДАНИХ ДОКІНГУ ІЗ ДАНИМИ СУЧАСНИХ СВІТОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ПРОБЛЕМАТИКИ

Враховуючи вищеописану критичну роль FtsZ у клітинному поділі *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* та відсутність сучасних дієвих його інгібіторів, перш за все було опрацьовано літературу, відібрано та оптимізовано методику дослідження перспективної інгібувальної дії отриманих речовин імідазопиридинового скафолду на ГТФазну активність FtsZ *in vitro*. За основу взяли фундаментальну методику «GTP Hydrolysis Assay», яка використовувалася для вивчення базової структури і функцій протеїну FtsZ у житті бактеріальної клітини. Згідно неї, вимірювання ГТФазної активності FtsZ здійснювалося шляхом вимірювання вивільненого з реакції фосфату за допомогою колориметричного аналіз. Базовий фосфатний розчин використовувався для калібрування методу. FtsZ (концентрація від 0,1 до 0,2 мг/мл) інкубували при 30° С у буфері А (50 мМ Mes/NaOH, pH 6,5 та 50 мМ KCl) з $MgCl_2$ і $CaCl_2$. Реакція розпочинається з додаванням GTP у концентрації 1 мМ. У різні моменти часу протягом 30-хвилинного інтервалу, по 30 мкл зразків було вилучено та переносили на лід до 200 мкл розчину малахітового зеленого. Через 5 хв додавали по 30 мкл 34% розчину цитрату і відразу вимірювали поглинання при 660 нм спектрофотометрично. У процесі підготовки методу були проведені оптимізаційні розрахунки, згідно яким через економічні та ергономічні чинники було рекомендовано застосування мікропланшетного методу спектрофотометрії. Керуючись обраною стратегією було знайдено модифікацію методу із застосуванням набору CytoPhos (Cytoskeleton, США) для мікропланшетного способу визначення PO_4^{3-}

(основний продукт для термінальної детекції ГТФазної активності FtsZ під дією потенційних інгібітор них сполук), виробник якого гарантує оптимальні умови для визначення неорганічного фосфату у розчинах із малою концентрацією протеїну. У цій публікації автори використовують рекомбінантний *S. aureus* FtsZ у концентрації 7,5 мкМ, попередньо інкубуючи його з різними концентраціями досліджуваних інгібіторів у 50 мМ MOPS (4-морфолінпропансульфонова кислота, pH 6,5) буфері протягом 10 хв при 25° С. У контрольні проби інкубували з 1% розчином DMSO замість розчину досліджуваної сполуки. Надалі до зразків додавали розчини 5 мМ $MgCl_2$ та 200 мМ KCl як коензими. Реакцію ініціювали додаванням 500 мкМ GTP та інкубували при 37 ° С. Через 30 хв реакцію деактивували додаванням 100 мкл CytoPhos стоп-реагенту. Після 10 хв інкубації неорганічний фосфат кількісно визначали вимірюванням поглинання за 650 нм на мікропланшетному рідері.

Оцінивши усі можливості та умови постановки експерименту з дослідження перспективної інгібувальної дії отриманих речовин імідазопиридинового скафолду на ГТФазну активність FtsZ in vitro, було вирішено налагодити третю модифікацію методу, із застосуванням найменшої концентрації рекомбінантного протеїну. Згідно неї, рекомбінантний протеїн FtsZ у концентрації 3,5 мкМ попередньо інкубували з різними концентраціями інгібіторів та з 1% DMSO (як контролем) у 20 мМ Трис-буфері (pH 7,4, що містить 0,01% тритону X- 100, щоб уникнути агрегації сполук) протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім додавали 5 мМ $MgCl_2$ і 200 мМ KCl, як коферменти. Реакцію запускали додаванням 500 мМ GTP та інкубували при 37 с. Через 30 хв реакцію зупиняли додаванням 100 мкл реагенту CytoPhos стоп-реагенту протягом 10 хв. Неорганічний фосфат визначали кількісно, вимірюючи поглинання за 650 нм на мікропланшетному рідері. Загальна схема дослідження *in vitro* зображена на Рис. 7.1.

Разом з цим, паралельно із розробкою та оптимізацією методики з дослідження перспективної інгібувальної дії отриманих сполук імідазопиридинового скафолду на ГТФазну активність FtsZ in vitro було

підібрано оптимальні умови для аналізу динаміки полімеризації мономерів FtsZ за допомогою методу динамічного розсіювання світла або спектрофотометричної ідентифікації.

Рисунок 7.1 - Загальна схема дослідження ГТФазної активності під дією цільових сполук.

Основними вимогами до методологічних підходів вивчення сполук із потенційним впливом на полімеризацію протеїну FtsZ є їх висока вибірковість та конфірмаційна компліментарність до мономерів in vitro. За основу методики була взята праця частини співавторів проєкту [26]. Ліофільний протеїн ресуспендували у буфері (100 мМ MES-NaOH, pH = 6,5, 1 мМ EGTA, 10 мМ $CaCl_2$) до концентрації 1 мг/мл. Далі, зразок інкубували на льоді протягом 30 хв. Розчин FtsZ центрифугували при 14000 об / хв, відібравши супернатант для подальшого експерименту. Найвищою концентрація протеїну в реакційній суміші була визначена спектрофотометричним методом і досягла 88 мг/мл. Динаміку полімеризації білку FtsZ оцінювали в присутності гетероциклічних сполук, відібраних під час скринінгу, in silico, у концентрації 50 мкМ. Реакційну суміш з 1% диметилсульфоксидом використовувався як референсний.

Аналізуючи вірогідні фармакологічні мішені *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* окрім протеїнів молекулярної машинерії цитоскелету обов'язково слід згадати й про метаболічні ензими, які регулюють перебіг базових та життєвонеобхідних для бактеріальної клітини біохімічних реакцій й метаболічних шляхів. Таким чином, у процесі скринінгу бази даних обраних скафолдів та методами молекулярного докінгу було отримано ряд перспективних метаболічних ензимів мікобактерій: Fatty acyl-AMP ligases (FAAL), O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1), Serine/treonine protein kinases (STPKs), Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA), Pantothenate synthetase, PLP-dependent transaminase (BioA), protein-tyrosine kinase, alanine racemase (Alr), dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RmlC), Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (InhA), Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase (Dpre1), N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GLMU), Shikimate kinase (AroK), Beta-lactamase, Isocitrate lyase.

Дуже цікавим у аспекті інгібування виявився ензим ***O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1)*** - фермента, що каталізує реакцію поєднання неорганічного сульфіду з О-ацетилсерином з подальшим утворенням надважливої сірковмісної амінокислоти L-цистеїну. Найбільшу спорідненість до активного центру цього ензиму та відповідно перспективу інгібітора мала сполука 3-[(Z)- [(5Z)-5-[[2-(2-hydroxy-2-oxoethyloxy)phenyl]methylidene]-3-methyl-4-oxidanylidene-1,3-thiazolidin-2-ylidene]amino]benzoic acid (Рис. 7.2).

Було знайдено та опрацьовано потенційну методику дослідження інгібувального впливу вищезазначеної сполуки на активність CysK1. Аналіз на 0-ацетилсерин (тіол) ліазу. Так, активність вимірювали в обсязі 0,1 мл, що містить 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ DTT, 10 мМ О-ацетилсерину, 1 мМ сульфіду натрію (NazS) та відомих кількостей ферменту (до 0,2 мг*мл$^{-1}$). Реакцію ініціювали додаванням сульфіду. Після інкубації при 25 ° С протягом 5 хв реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 20% ТХА, а зв'язані білки видаляли шляхом центрифугування при 15000g протягом 2 хв. Супернатант переносили у скляну пробірку, що містить 100 мкл концентрованої оцтової кислоти та 200

мкл реагенту нінгідрину (250 мг нінгідрину, розчиненого в 10 мл концентрованої оцтової кислоти: концентрована HCl, 60 ~ 40 об / об). Суміш кип'ятили 10 хв, потім швидко охолоджували перед додаванням 600 ~ 195% (об / об) етанолу. Цистеїн визначали вимірюванням поглинання реакційної суміші при 560 нм (коефіцієнт екстинкції = 25000 $M^{-1}см^{-1}$). Одна одиниця активності відповідає кількості ферменту, який каталізував утворення 1 моля цистеїну на хвилину. Свіжі розчини 0-ацетилсерину готували щодня, розчиняючи спочатку у воді, а потім доводячи pH до 7,0 за допомогою Tris-HCl 1 M, pH 7,5, до кінцевої концентрації 200 мМ. Цей препарат дозволяє уникнути швидкого зсуву 0- до N-ацетилу, який швидко відбувається вище pH 7,5. Сульфідні розчини готували шляхом розчинення сухого Na_2S в 0,05 N NaOH. Концентрацію сульфіду складала приблизно 20 мМ, як визначено калориметричним методом Зігеля. Вихідні розчини витримували в аліквотах при -20 ° C.

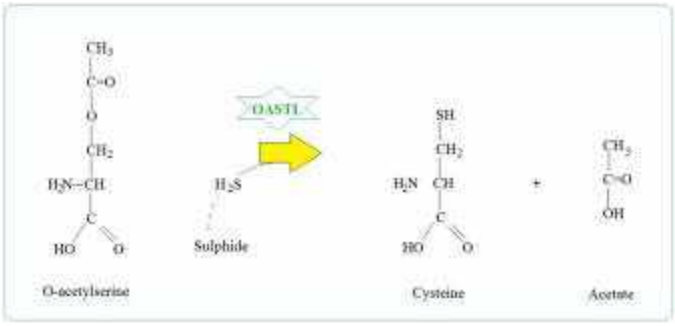


Рисунок 7.2 - Механізм дії ензиму CysK1.

Надзвичайно перспективним для роботи виглядає ензим Shikimate kinase (AroK), оскільки шикиматний шлях використовується у різних бактеріях, включаючи Mycobacterium tuberculosis, для виробництва фундаментальних біохімічних сполук - хоризматів, попередників ароматичних амінокислот та інших ароматичних сполук, а його веде до вірної загибелі патогенної бактеріальної клітини (Рис. 7.3).

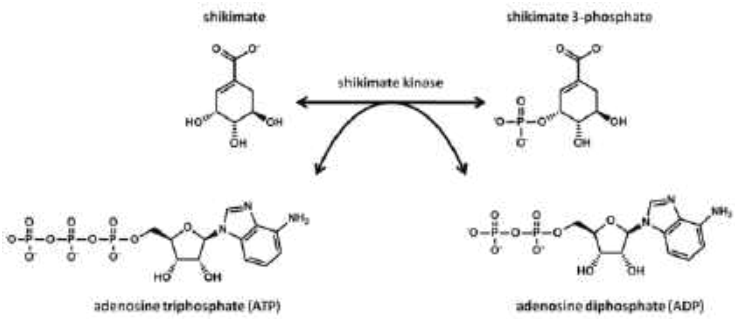


Рисунок 7.3 - Реакція шикимат-кінази мікобактерій.

Важливим моментом є те, що ссавці не мають ферментів шикіматного шляху, необхідних для синтезу цих амінокислот de novo, а скоріше отримують їх з дієти, що автоматично робить потенційні інгібітори SK селективними протитуберкульозним препаратами, тим паче, що у медицині подібних препаратів досі майже немає. Проведений нами біоінформатичний аналіз та методи молекулярного докінгу показують високу ступінь спорідненості та інгібувальний потенціал для одразу 2-х сполук з кластерів бібліотеки: (3r,4s,5r)-3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid та phosphomethylphosphonic acid adenylate ester. Шикіматну кіназу визначали шляхом вимірювання [^{14}C] шикімату-3-P, що утворюється в реакційному розчині, використовуючи 50 мм трис-HCl (pH 9,0). Використовували або метод осадження Ba^{2+} або метод іонного обміну. Для останнього реакцію зупиняли додаванням 50 мкл трихлороцтової кислоти (8,8%, мас./Об.). Суміш пропускали через колонку 100 мкл AG 1-X8 (CI-) у одноразовому наконечнику піпетки Eppendorf, заблокованому шматочком скловати. Колонку промивали 5 разів по 200 мкл 0,3 М оцтової кислоти, а смолу промивали у флакон з 0,8 мл H_2O, змішуючи з коктейлем Тритон-толуол і підраховували. Комбіновану ефективність підрахунку та відновлення обох процедур визначали шляхом додавання [^{14}C] глюкози (10 nCi, 230 Ci/моль) та гексокінази (0,1 одиниці) до стандартного розчину для аналізу шикимат-кінази, що містить нерадіоактивний шикімат авторадіографічно.

Результати аналізу дослідження на прикладі 2-х найперспективніших ферментів свідчить про відсутність готових протоколів дослідження ензиматичної активності мікобактерій, що ставить питання про необхідність розробки методик у наступних кварталах проєкту.

Ще одним критичним для метаболізму мікобактерій протеїном, а від того і перспективною молекулярною мішенню для розробки протитуберкульозних засобів, є ензим синтезу пантотенової кислоти - ***пантотенат синтетаза*** (пантоат-бета-аланинлигаза). Цей ензим належить до сімейства лігаз, зокрема тих, що утворюють вуглецево-азотні зв'язки, як кислотно-D-амінокислотні лігази (пептидні синтази). ПС каталізує реакцію конденсації пантоату із β-аланіном із утворенням пантотенової кислоти, використовуючи при цьому енергію макроергічних зв'язків 1 молекули АТФ (Рис. 7.4).

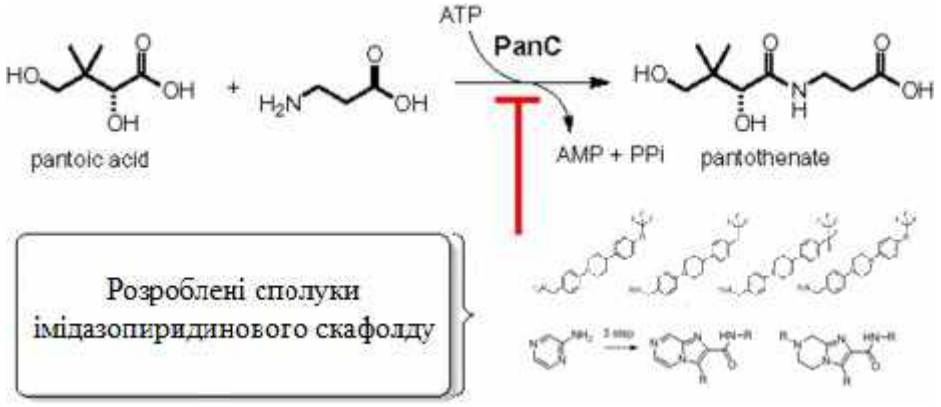


Рисунок 7.4 - Механізм роботи бактеріальної пантотенат синтетази.

Досліджувати інгібіторну дію сполук на активність цього ензиму можна згідно методики із застосуванням рекомбінантного протеїну. Активність пантотенат синтетази оцінювали шляхом з'єднання утворення АМФ при окисленні NADH з міокіназою, піруват кіназою та лактатдегідрогеназою. Зменшення поглинання NADH за 340 нм (e = 6,220 M-1 см-1) вимірювався у 96-лунковому планшеті на планшетному рідері під на програмному забезпеченні приладу. Температуру підтримували на рівні 25 ^{o}C протягом

усього аналізу. Розчин пантоату натрію (1 М) готували шляхом розчинення пантолактону (130 мг, 1,0 ммоль) у розчині NaOH (1 М, 1 мл). Аналізат містив 100 мМ Tpic, pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$, 1,5 мМ фосфоенолпірувату калію, 100 нМ His6-PS, 200 мМ NADH, 5 одиниць піруваткінази, 5 одиниць міокінази та 6 одиниць лактатдегідрогенази.

Пантоат та β-аланін додавались у концентрації 4 мМ, а концентрація АТФ та інгібіторів різнилися: чотири різні концентрації інгібіторів та чотири концентрації АТФ. Після інкубації розчину протягом 5 хвилин при 25 °С реакцію ініціювали додаванням пантоату до кінцевої концентрації 4 мМ. Кінцевий об'єм на лунку становив 200 мкл. Аналіз проводили у двох паралелях і показували середні значення.

Проведений нами біоінформатичний аналіз та методи молекулярного докінгу показують високу ступінь спорідненості та інгібувальний потенціал проти ***пантотенат синтетази*** для одразу 2х сполук з кластерів бібліотеки: 2-(2-((benzofuran-2-ylmethoxy)carbonyl)-5-methoxy-1H-indol-1-yl)acetic acid; 2-(5-methoxy-2-(tosylcarbamoyl)-1H-indol-1-yl)acetic acid.

Важко переоцінити важливість вкладу бактеріального ензиму ***декапренілфосфорил-бета-D-рибоза-оксидази*** (***Dpre1***) у формуванні ліпоарабіноманнанну та арабіногалактану клітинної стінки мікобактерій, що є однією з потенційних мішеней для перспективних фармацевтичних засобів.

Ферментну активність DprE1 оптимально визначати у двоступеневому зчепленому аналізі. Реакції проводяться у чорних 96-лункових планшетах на половину площі в кінцевому обсязі 25 мкл на лунку. Реакційна суміш складалася з білка DprE1 (концентрації білка адаптували для отримання подібних сигналів флуоресценції (1,5 мкМ), FAD (1 мкМ), пероксидаза хрону (HRP) (0,2 мкМ), Amplex Red (50 мкМ) та фарнезил-фосфорил-β-d-рибофураноза (FPR) (0 мкМ, 0,2 мкМ, 0,4 мкМ, 0,6 мкМ або 0,8 мкМ) у аналітичному буфері (50 мМ гліцилгліцину [pH 8,0], 200 мМ глутамату калію, 0,002% Brij 35) (Рис. 7.5).

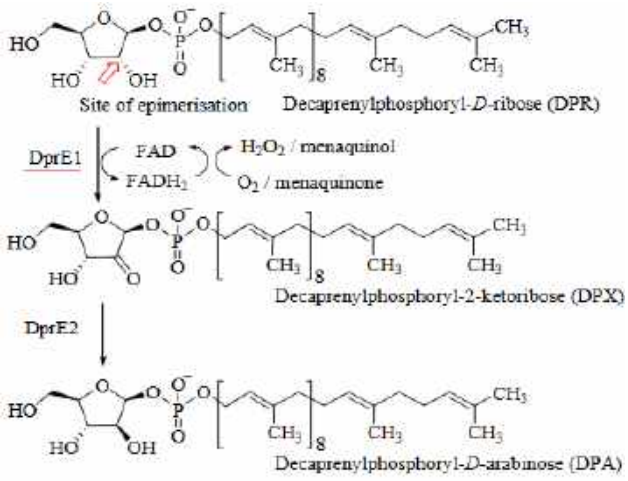


Рисунок 7.5 - Реакція Dpre1 мікобактерій.

Отримали стандартну криву з послідовним розведенням натрієвої солі резоруфіну. Для початку реакції використовували FPR, і перетворення Amplex Red у резоруфін негайно вимірюючи флуоресценцію (довжина хвилі збудження / випромінювання 560/590 нм) в кінетичному режимі на приладі Tecan M200 при 30 ° C. Для визначення 50% інгібуючих концентрацій (IC50s) реакційну суміш, що складається з DprE1, FAD, HRP та Amplex Red, спочатку інкубували з досліджуваним сполуками (із двократним послідовним розведенням, починаючи з диметилсульфоксиду [1% кінцевого ДМСО концентрація] протягом 10 хв при 30°C перед додаванням FPR (0,3 мкМ). Фонову інтенсивність флуоресценції з реакційної суміші без FPR віднімали від значень для всіх реакцій. Одиниці флуоресценції перетворювали в концентрації резоруфіну за допомогою стандартної кривої. присутності 40 мкМ інгібітора) для отримання IC50 за допомогою GraphPad Prism.

8 ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ НАУКОВИХ ДАНИХ ЩОДО СУЧАСНИХ ПІДХОДІВ ДО ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ПОРІВНЯННЯ ЇХ ІЗ ЗАТВЕРДЖЕНИМИ НОРМАТИВНИМИ ДОКУМЕНТАМИ В УКРАЇНІ. ПІДГОТОВКА ВНУТРІШНЬО-ЛАБОРАТОРНОГО АЛГОРИТМУ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ВІДІБРАНИХ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН ДО ВАКЦИННОГО ШТАМУ *M. BOVIS*

Чутливість мікобактерій до протитуберкульозних препаратів визначається нездатністю штаму рости на середовищі, що містить препарат, при стандартних умовах постановки досліду. Чутливими до певного препарату вважаються ті штами мікобактерій, на які цей препарат в критичній концентрації має бактерицидну або бактеріостатичну дію відповідно до прийнятого критерію стійкості. Стійкість (резистентність) визначається як зниження чутливості до такої міри, що даний штам мікобактерій здатний розмножуватися при впливі на нього препарату в критичній або більш високій концентрації. У разі наявності лікарської стійкості до двох або більше лікарських препаратів даний штам мікобактерій визначається як полірезистентний [27].

Визначення спектру і ступеня стійкості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів має важливе значення для тактики хіміотерапії хворих, контролю за ефективністю лікування, визначення прогнозу захворювання. Ступінь лікарської стійкості мікобактерій визначають відповідно до встановлених критеріїв, яка залежать як від протитуберкульозної активності лікарського препарату, так і його концентрації у вогнищі ураження, величини максимальної терапевтичної дози, фармакокінетики препарату та багатьох інших факторів [28, 29].

Обов'язковою умовою ефективного моніторингу, забезпечення епідеміологічного нагляду за лікарською стійкістю мікобактерій і поширенням лікарсько-стійких штамів збудника, а також зіставлення результатів досліджень і ефективності лікування в масштабах країни є використання уніфікованого методу [29].

Для визначення лікарської стійкості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів в міжнародній практиці використовуються такі мікробіологічні методи як метод пропорцій на середовищі Левенштейна-Йенсена або на середовищі Міддлбрука 7Н10; метод абсолютних концентрацій на щільному яєчному середовищі Левенштейна-Йенсена; метод коефіцієнта резистентності [30 - 32].

Метод пропорцій на середовищі Левенштейна-Йенсена або на середовищі Міддлбрука 7Н10. Суть методу полягає у порівнянні числа мікобактерій виділеної культури, що виросли у відсутності препарату і в його присутності в критичних концентраціях. З цією метою робочу суспензію мікобактерій розводять до концентрації $10^{(-4)}$ і $10^{(-6)}$. Обидва розведення суспензії інокулюють на живильне середовище без препарату і на набір середовищ з різними препаратами. Якщо на середовищі з препаратом кількість колонії, що виросли, складає більше 1% від числа колоній на середовищі без препарату, культура вважається стійкою до даного препарату. Якщо кількість колонієутворюючих одиниць (КУО), стійких до даного препарату, менше 1%, культура вважається чутливою.

Метод коефіцієнта резистентності. Суть даного методу полягає у визначенні співвідношення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), яка визначається для даного штаму конкретного хворого, до мінімально-інгібуючої концентрації лікарсько-чутливого стандартного штаму Н37Rv, які досліджують в одному і тому ж експерименті. В даному випадку штам Н37Rv використовується не для контролю дослідження, а для визначення можливих варіацій при постановці тесту.

Найбільш зручним, особливо для первинного скринінгу протимікробної дії нових хімічних сполук, є ***метод абсолютних концентрацій на середовищі Левенштейна-Йенсена***. З мікробіологічної точки зору цей метод є найбільш чутливим, й, виходячи з цього, точним, оскільки дозволяє здійснити підрахунки мінімальних концентрацій живих мікробних клітин (КУО) у посівній дозі [30 - 32].

Дотримання стандартної технології приготування поживного середовища з препаратами має найважливіше значення для отримання достовірних результатів тестування.

Для приготування поживних середовищ із метою визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів використовуються тільки хімічно чисті субстанції препаратів [29].

Внутрішньо-лабораторний алгоритм визначення протимікробної дії відібраних хімічних речовин до вакцинного (патогенного) *M. bovis*.

Основні етапи:

1. Приготування розведень хімічно-чистих субстанцій відібраних хімічних речовин;

2. Приготування середовища Левенштейна-Єнсена із різними концентраціями досліджуваних хімічних сполук;

3. Підготовка інокулюму досліджуваної культури вакцинного (патогенного) штаму *M. bovis,* інокуляція та інкубування культури.

4. Облік та інтерпретація отриманих результатів.

Етап 1. **Приготування розведень хімічно-чистих субстанцій відібраних хімічних речовин.** Наважки хімічно-чистої субстанції відібраного препарату готують за допомогою ваг, що повірені та дозволяють проводити зважування з точністю до 0,0001 г. Розчини хімічних сполук потрібно готувати безпосередньо перед приготуванням середовищ, оскільки під час зберігання розведених препаратів за температури +5 °С і вище довше ніж 6 год може відбутися зниження їх активності. Оптимальними умовами для зберігання

основних розчинів хімічних речовин є температура -60 °С і нижче, тривалість – не більше 6 міс.

Основні розчини хімічно-чистої субстанції препарату готують в концентрації 1000,0 мкг/куб.см і вище. З робочих розчинів готують двократні розведення речовини. Для скринінгу нових хімічних сполук можна використовувати більший крок розведень.

Схема приготування розведень на прикладі стрептоміцину:

Стрептоміцин (S) – 4,0 мкг/мл:

- 100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

- 1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

- 1,0 мл другого розведення + 4,0 мл стерильної дистильованої води = 200 мкг/мл (третє розведення);

- внести 1,0 мл третього розведення до 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 4,0 мкг/мл.

Етап 2. Виготовлення середовища з розведеннями досліджуваних хімічних сполук. Готують середовище Левенштейна-Йенсена з сухого комерційного середовища, відповідно до інструкції виробника. Робочі розведення хімічних речовин додають безпосередньо перед згортанням. Для кожної концентрації готують не менше трьох пробірок із середовищем. Після додавання розведеної речовини до середовища потрібно ретельно його перемішати, не допускаючи утворення бульбашок і піни, щоб забезпечити рівномірний розподіл препарату в середовищі. Паралельно готують контрольні пробірки з середовищем Левенштейна-Йенсена без вмісту досліджуваної хімічної речовини. Коагуляцію проводять за температури +85 °С протягом 40 хв..

Етап 3. Підготовка інокулюму досліджуваної культури вакцинного (патогенного) штаму M. bovis, інокуляція та інкубування культури.

Готують гомогенну бактеріальну суспензію культури вакцинного (патогенного) штаму *M.bovis* в ізотонічному розчині натрію хлориду. Для цього культура в активній фазі росту (15-20 день інкубації) знімається тампоном, попередньо змоченим у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду з середовища Левенштейна-Єнсена,. При цьому тампон має торкатися всієї поверхні середовища. Потім тампон занурюють у пробірку, що містить 2,0 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, культуру змивають в рідину, попередньо розтираючи по внутрішніх стінках пробірки. Пробірку залишають на 30 хв за кімнатної температури для осадження частинок культури.

Суспензію культури стандартизують за бактеріальним стандартом мутності з використанням денситометру до робочого розведення $1x10^7$ КУО. Інокулюм робочого розведення культури *M. Bovis* вносять у пробірки з середовищем, закривають щільно корками або ватно-марлевими тампонами та заливають парафіном. Після закінчення посіву засіяні пробірки поміщають у горизонтальні штативи і поміщають для інкубації в термостат за температури 37 С. При цьому поверхня скосу поживного середовища має знаходитись у горизонтальній площині, а нахил штатива має виключити торкання пробки з матеріалом посіву. Інокулюм, має рівномірно покривати всю поверхню скосу середовища [28].

Етап 4. Облік та інтерпретація отриманих результатів. Оцінку результатів визначення мікробної чутливості вакцинного (патогенного) штаму *M. bovis* до досліджуваної речовини проводять через три тижні інкубації в термостаті. У разі поганого росту культури мікобактерій на контрольному поживному середовищі слід почекати ще 1-2 тижні до отримання вираженого росту в контролі, після чого робиться остаточний висновок. Під час використання методу абсолютних концентрацій культура *M. bovis* вважається стійкою, якщо на поживному середовищі з певним препаратом виростає 20 і більше колоній мікроорганізмів у разі рясного росту в контрольній пробірці (без препарату) [28]. При рості не більше 20 КУО мікобактерій на поживному

середовищі вважається що така хімічна речовина проявляє інгібуючі властивості на культуру мікобактерій. В подальшому проводять визначення мінімально інгібуючої концентрації досліджуваної речовини із використанням двократних розведень.

Отже виходячи із аналізу нормативних та літературних даних щодо методів визначення протимікробних властивостей хімічних речовин щодо мікобактерій найчастіше використовують такі методи як метод пропорцій на середовищі Левенштейна-Йенсена або на середовищі Міддлбрука 7Н10, метод абсолютних концентрацій на щільному яєчному середовищі Левенштейна-Йенсена та метод коефіцієнта резистентності. Для скринінгу нових хімічних речових найбільш доцільним є використання методу абсолютних концентрацій, який і був використаний у наших дослідженнях для чого було підготовлено внутрішньо-лабораторний алгоритм визначення інгібуючих властивостей нових хімічних речовин щодо вакцинного (патогенного) штаму *M. bovis.*

9 АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ ЩОДО ІСНУЮЧИХ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ *M. BOVIS*, ЗОКРЕМА, ЩОДО МОЖЛИВОСТІ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВАКЦИННОГО ТА ПОЛЬОВИХ ШТАМІВ, ЗАМОВЛЕННЯ ПРАЙМЕРІВ ТА ЇХ АПРОБАЦІЯ. ПРОВЕДЕННЯ РОБОТИ ПО ВИДІЛЕННЮ ПОЛЬОВОГО ШТАМУ *M. BOVIS* ЗА ДОПОМОГО МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО МЕТОДУ

Зважаючи на глобальне значення проблеми туберкульозу в світі після відкриття полімеразної ланцюгової реакції та інших методів молекулярної біології їх почали активно застосовувати і для вирішення проблем у фтизіатрії, оскільки дані методи є швидкими і іноді є більш достовірними за мікробіологічні методи, особливо у питаннях видової ідентифікації мікобактерій [33]. Сьогодні у науковій літературі описано та апробовано значну кількість праймерів для ідентифікації роду *Mycobacterium* та ідентифікації різних видів мікобактерій як методом класичної ПЛР із детекцією продуктів ампліфікації в агарозному гелі так і для ПЛР в реальному часі.

Як і для інших мікроорганізмів для ідентифікації мікобактерій використовується ділянка 16S РНК. Wilton і Cousins (1992) описали метод для одночасної ідентифікації роду, видів та штамів *Mycobacterium spp* використавши для цього консервативні і варіабельні послідовності гену 16S rDNA [34]. Також в цій роботі розроблено праймери для ідентифікації *M. avium* та *M. intracellulare.* У 2017 році *Hansong Chae at all* запропоновано праймери для ідентифікації *Mycobacterium spp* на основі біоінформатичного аналізу іншої ділянки *16S rDNA* [35].

Значна увага при дизайні праймерів приділяється диференціації між мікобактеріями комплексу *Mycobacterium tuberculosis* до якого відносяться

такі види як *M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti, M. tuberculosis subsp. caprae and M. canetti* та мікобактеріями нетуберкульозного комплексу (*M. kansasii, M. marinum, M. scrofulaceum, M. xenopi, M. avium, M. intracellularae, M. fortuitum*). Richardson E.T at all (2009) розробили мультиплексну ПЛР в реальному часі із використанням інтеркалюючого барвника *SYBR green* за допомогою якої можна ідентифікувати 93 % патогенних мікобактерій в двух паралельних реакціях. За допомогою розроблених праймерів можливим є ідентифікація *Mycobacterium tuberculosis комплексу (MTC), M. avium комплексу (MAC),* групи *M. chelonae-M. abscessus (MCAG),* група *M. fortuitum (MFG),* і *M. mucogenicum* [36].

У 2008 Lim, S. Y. at all запропонували праймери для детекції мультикопійної ділянки *IS6110* як мішень для ідентифікації *M. tuberculosis complex* [37]. Однак у роботі Robert F. Luo at all [38] було показано що чутливість ПЛР із використанням даних праймерів при ідентифікації *M. tuberculosis compl*ex є нижчою порівняно із праймерами запропонованими Richardson E.T at all [36]. Mariana L. Sales at all (2014) здійснено дизайн праймерів для ідентифікації *M. tuberculosis* на основі аналізу ділянки гену *Rv1510* та проведено їх валідацію [39]. У роботі використано технологію *Eva Green* та показано що діагностична чутливість та специфічність ПЛР із використанням зазначених праймерів склала 100 %.

Hye Seung Lee at all (2011) були запропоновані праймери для ідентифікації *Mycobacterium tuberculosis Complex* за допомогою ПЛР в реальному часі на основі аналізу нуклеотидної послідовності ділянки геному мікобактерій senX3-regX3 [40]. Guarin N. at all (2010) розробили праймери для диференціації мікобактерій групи *M. chelonae-M. abscessus* (M. chelonae, M. abscessus, і M. immunogenum) [41].

Групою вчених Hansong Chae at all (2017) було запропоновано праймери для ідентифікації *M. tuberculosis complex, M. tuberculosis Beijing family* та *M. avium complex* методом мультиплексної ПЛР із детекцією результатів агарозному гелі [35].

Також актуальним питанням є диференціація між вірурентними штамами *Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium tuberculosis* та авірулентним штамом *Bacilius Calmette-Guerin (BCG)* від вірулентних штамів. У 1996 році Mahairas and all встановили генетичну відмінність між вакцинним штамом *BCG* та патогенними штамами мікобактерій у ділянці геному *RD1*, яка присутня у вірулентних штамів і відсутня у вакцинному штамі [42]. На основі даної інформації Talbot and all (1997) було розроблено праймери для диференціації вірулентних штамів *M. tuberculosis complex* та вакцинного штаму *BCG* [43]. Нуклеотидна послідовність та характеристика проаналізованих праймерів наведена в табл. 9.1.

Таблиця 9.1 - Характеристика праймерів для ідентифікації *Mycobacterium.*

П/п	Ген-мішень	Позначення праймеру	Ідентифікація виду(ів)	Нуклеотидна послідовність	Розмір продукту, п.н	Посилання
1	16S rDNA	MYCGEN F	*Mycobacterium spp*	agagtttgatcctggctcag	1030	[34]
		MYCGEN R		tgcacacaggccacaaggga		
2	16S rDNA	MYCGEN F	*M. avium*	agagtttgatcctggctcag	180	[34]
		MYCAV-R		accagaagacatgcgtcttg		
4	16S rDNA	MYCINT-F	*M. intracellulare*	cctttaggcgcatgtcttta	850	[34]
		MYCGEN R		tgcacacaggccacaaggga		
5	ITS	MTC FWD-01	*M. tuberculosis complex*	gcgagagccgggtgcatg	47	[36]
		MTC REW-01		aacagtgtgttggtggccaa		
6	IS6110	IS6110 F	*M. tuberculosis complex*	gaacggctgatgaccaaact	72	[39]
		IS6110 R		atcagcgatcgtggtcctg		
7	ITS	MCAG FWD-01	Група *M. chelonae-M. abscessus (MCAG)*	taaggagcaccatttcccag	128	[36]
		MCAG REV-01		cgacgttttgccgactacc		
8	Rv1510	Mtub.115.F	*M. tuberculosis*	ttcgatattcgcggtgtttt	115	[39]
		Mtub.115.R		cgcaactatttgggtggag		
9	16S rRNA	Forward	*Mycobacterium spp*	gagatactcgagtggcgaac	506	[35]
		Reverse		caacgcgacaaaccacctac		
10	rv0577	Forward	*M. tuberculosis complex*	atgcccaagagaagcgaatac	705	[35]
		Reverse		aatgtcagccggttccgcaa		
11	mtbk_20680	Forward	M. tuberculosis Beijing family	ttatgccagaaatacacccgcg	231	[35]
		Reverse		aatcgcgggcttgtggctac		

12	RD9	Forward	*M. tuberculosis*	gtgtaggtcagccccatcc	369	[44]
		Reverse		gtaagcgcgtggtgtgga		
13	131I1S	Forward	M. avium complex	tcgatcagtgcttgttcgcg	600	[35]
		Reverse		cgatggtgtcgagttgctct		
14	senX3-regX3	TAQ-T1	*M. tuberculosis complex*	gtagcgatgaggaggagtgg	Немає інформації	[40]
		TAQ-T2		actcggcgagagctgcc		
		TAQ-Tp		FAM-acgaggagtcgctggccgatcc-TAMRA-3		
15	mtp40	PT1	*M. tuberculosis*	caacgcgccgtcggtgg	386	[45]
	mtp40	PT2		ccccccacggcaccgc		
16	RD1	ET1	*M. tuberculosis complex* і *BCG*	aagcggttgccgccgaccgacc-	150/200	[43]
		ET2		ctggctatattcctgggcccgg		
		ET3		gaggcgatctggcggtttgggg-		

Методика полімеразної ланцюгової реакції для диференційної діагностики *Bacilius Calmette-Guerin (BCG)* та *M. tuberculosis complex*.

Екстракція ДНК із культури мікобактерій. Для виділення ДНК із мікроорганізмів використовуються різні методи. Нами для екстракції ДНК із мікобактерій було апробовано метод сорбції на оксиді кремнію відповідно до методу описаного описаним R. Boom із співавторами [46] та експрес-метод екстракції ДНК шляхом кип'ятіння.

Виділення ДНК експрес методом. Вирощені на щільному поживному середовищі Левенштейна-Єнсена колонії мікобактерій зняти бактеріологічною петлею і помістити в 200 мкл ТЕ-буферу. Інкубувати в термостаті впродовж 20 хв при температурі +95 °С, після чого центрифугувати пробірки на 13 000 об/хв. впродовж 5 хв і відібрати 180 мкл супернатанту. Отриманий супернатант використовують для ПЛР.

Проведення полімеразної ланцюгової реакції із детекцією продуктів ампліфікації в агарозному гелі.

Було замовлено праймер для диференційної діагностики *Bacilius Calmette-Guerin (BCG)* та *M. tuberculosis complex* які мають наступну нуклеотидну послідовність *ET1*-5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3', *ET2*- 5'CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3'і *ET3*, 5'-

GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3’. За ампліфікації пари праймерів *ET2* and *ET3* штами *M. tuberculosis complex* утворють ПЛР-продукт розміром 150 п.н. тоді як ампліфікація вакцинного штаму із даною парою праймерів не дає специфічного ПЛР-продукту. При використанні пари праймерів *ET1* and *ET3* вірулентні штами не дають специфічного продукту тоді як ампліфікація *(BCG)* дає специфічний продукт розміром 200 п.н.

Реакцію ампліфікації проводили в реакційній суміші об’ємом 25 мкл, яка включала: 10хПЛР буфер (*Thermo Fisher Scientific*), 2,5 мМ $MgCl_2$ *(Thermo Fisher Scientific*), 2,0 мМ кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів (*Thermo Fisher Scientific)*, по 5 пМоль праймерів *ET1* та *ET2* і 25 пМоль та по 0,1 U Taq-ДНК-полімерази (*Thermo Fisher Scientific)*. ДНК вносили в кількості 5,0 мкл (100-150 нг). Ампліфікацію здійснювали в термоциклері 2720 (Applied Biosystems) із наступним температурним режимом: активація ДНК полімерази – 3 хв. при 95°С, та 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію (30 с при 94°С), відпалювання праймерів (1 хв при 65°С) та фінальну елонгацію (10 хв при 72°С).

Продукти ампліфікації аналізували шляхом розділення в 1,5 % агарозному гелі за наявністю чи відсутністю специфічної смуги відповідного розміру, або порівнюючи отримані смуги із позитивним контролем.

На рисунку 9.1 показано приклад електрофореограми апробації праймерів на вакцинному штамі *Mycobacterium bovis* (BCG) (200 п.н).

Таким чином нами було проаналізовано дані літератури щодо існуючих праймерів для ідентифікації роду *Mycobacterium*, вибрано праймери для диференційної ідентифікації вакцинного штаму *M. bovis* та *M. tuberculosis complex*, проведено їх апробацію. Також здійснено перевірку різних протоколів екстракції ДНК із мікобактерій, оптимізовано параметри ПЛР реакції.

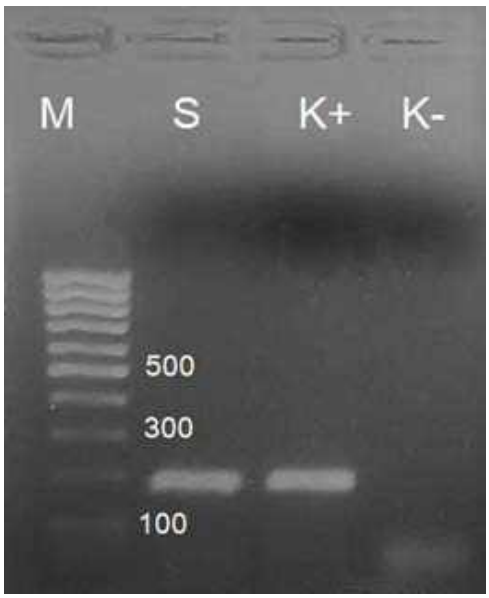


Рисунок 9.1 - Приклад електрофореограми продуктів ПЛР спрямованого на визначення генетичного матеріалу вакцинного штаму *M. bovis*. М – маркер молекулярних мас (100 н.п.); S – зразок; «К+» – позитивний контроль; «К-» – негативний контроль.

Таким чином нами було проаналізовано дані літератури щодо існуючих праймерів для ідентифікації роду *Mycobacterium*, вибрано праймери для диференційної ідентифікації вакцинного штаму *M. bovis* та *M. tuberculosis complex*, проведено їх апробацію. Також здійснено перевірку різних протоколів екстракції ДНК із мікобактерій, оптимізовано параметри ПЛР реакції.

Виділення польового штаму *Mycobacterium bovis* за допомогою мікробіологічного та молекулярно-генетичного методів.

Виділення *Mycobacterium bovis* проводили із об’єктів навколишнього середовища у господарстві Київської області, яке у 2011 році було неблагополучне щодо туберкульозу великої рогатої худоби.

Відбір зразків здійснювали у одноразові пластикові контейнери у кількості 30 – 50 гр. Проведено відбір 12 зразків. Підготовку зразків здійснювали відповідно до посібників «Методы почвенной микробиологии и

биохимии» [47] та «Практикум по микробиологии» [48]. Посів відібраних зразків проводили на середовище Левенштейна-Єнсена Інкубація зразків відбуваються при температурі + 37 °С. Перегляд посівів здійснювали кожні 72 години інкубування. На рис. 9.2 показано закладання посівів відібраних зразків навколишнього для виділення польового штаму *M. bovis* .

Рисунок 9.2 – Посіви відібраних зразків із об’єктів навколишнього середовища на середовище Левенштейна-Єнсена.

Результати дослідження отриманих проб щодо виділення польового штаму *M. bovis* мікробіологічним методом наведені в табл. 9.2.

Таблиця 9.2 - Результати дослідження щодо виділення польового штаму *M.bovis* із об’єктів навколишнього середовища.

Джерело	Кількість зразків	Результат
Вода	3 зразки	не виділено
Ґрунт	3 зразки	не виділено
Гноївка	3 зразки	не виділено
Перегній	3 зразки	не виділено

Як видно із представлених в таблиці даних за допомогою мікробіологічного методу у жодному із досліджених об’єктів навколишнього середовища не виділено польовий штам *M.bovis* в зв’язку із чим молекулярно-біологічне дослідження не проводилось.

10 ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ 3-5 ХІМІЧНИХ СПОЛУК НА ВАКЦИННИЙ ШТАМ *M. BOVIS*. ВИВЧЕННЯ ЕПІЗООТИЧНОЇ СИТУАЦІЇ З ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В УКРАЇНІ У 2001-2010 РОЦІ

Першочергово була проведена адаптація стандартного алгоритму визначення протимікробної чутливості методом абсолютних концентрацій на середовищі Левенштейна-Єнсена для потреб дослідження, а саме визначення протимікробної дії протимікробних речовин (стрептоміцину та рифампіцину) щодо вакцинного штаму *M. bovis*, який використовується в наших дослідженнях.

Приготування розведень досліджуваних речовин

Розведення досліджуваних препаратів готовили із хімічно чистої порошкоподібної форми препарату, за розрахунками наведеними в (https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text) [29].

Схема приготування серійних розведень препаратів:

Рифампіцин (R) рекомендована концентрація – 40,0 мкг/мл. До 100,0 мг активної речовини хімічно чистої субстанції препарату додавали 2,0 мл етилового спирту та 8,0 мл стерильної дистильованої води що було першим розведенням із концентрацією 10 000 мкг/мл. Для другого розведення 1,0 мл першого розведення додавали до 9,0 мл стерильної дистильованої води (концентрація 1 000 мкг/мл).

Стрептоміцин (S) рекомендована концентрація – 4,0 мкг/мл. До 100,0 мг активної речовини хімічно чистої субстанції препарату додавали 10,0 мл стерильної дистильованої води що було першим розведенням 10 000 мкг/мл. Для другого розведення 1,0 мл першого розведення додавали до 9,0 мл стерильної дистильованої води (концентрація 1 000 мкг/мл), а далі 1,0 мл другого розведення додавали до 4,0 мл стерильної дистильованої води із утворенням концентрації 200 мкг/мл (третє розведення).

Виготовлення поживних середовищ Левенштейна-Єнсена із вмістом серійних розведень тестових сполук. У поживне середовище Левенштейна-Йенсена безпосередньо перед згортанням додавали серійні розведення досліджуваних препаратів. Було виготовлено 5 варіантів середовища Левенштейна-Йенсена з концентраціями рифампіцину 10 мкг/мл, 20,0 мкг/мл, 40,0 мкг/мл, 80,0 мкг/мл, 100,0 мкг/мл. та 5 варіантів середовища Левенштейна-Йенсена з концентраціями стрептоміцину 1,0 мкг/мл., 2,0 мкг/мл., 4,0 мкг/мл., 10 мкг/мл, 15 мкг/мл по 5 повторів кожної концентрації.

Інокулюм вакцинного штаму *Mycobacterium bovis* стандартизували за коефіцієнтом мутності по Макфарленду до концентрації $1x10^7$ КУО та у кількості 1 мл вносили у приготовлені середовища Левенштейна-Йенсена. Посіви інкубували за температури 37 ^{0}С впродовж 30 діб, здійснювали перегляд пробірок 1 раз на 48 годин. Результати визначення інгібуючої дії рифампіцину на культуру вакцинного штаму *Micobacterium bovis* відображені в табл. 10.1.

Таблиця 10.1 - Результати визначення інгібуючої дії рифампіцину на культуру *M. bovis*, n=5

Концентрація рифампіцину в середовищі Левенштейна-Йенсена, мг/л.	Середня кількість, КУО	Кількість КУО в пробірці, за культивування 37 ^{0}С/30 діб				
		Повтор1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5
10,0 мкг/мл	>20	>20	>20	>20	>20	>20
20,0 мкг/мл	21,2	16	28	18	23	21
40,0 мкг/мл	1,2	2	1	0	3	0
80,00 мкг/мл	0	0	0	0	0	0
100,0 мкг/мл	0	0	0	0	0	0
Контроль без хімічної речовини	>20	>20	>20	>20	>20	>20

Було встановлено задовільний рівень чутливості досліджуваного вакцинного штаму *M. bovis* по відношенню до рифампіцину. Так, за концентрації препарату у середовищі Левенштейна-Йенсена 40,0 мкг/мл кількість колоній у пробірках становила від 0 до 2 (в середньому 1,2). Із

зменшенням концентрації антимікробного препарату відмічали збільшення кількості колоній.

Результати визначення інгібуючої дії стрептоміцину на культуру вакцинного штаму *M. bovis* відображені в таблиці 10.2.

Таблиця 10.2 - Результати визначення інгібуючої дії стрептоміцину на культуру вакцинного штаму *Mycobacterium bovis*, n=5

Концентрація стрептоміцину в середовищі Левенштейна-Йенсена, мг/л.	Середня кількість, КУО	Кількість КУО в пробірці, за культивування 37 ^{0}С/30 діб				
		Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5
1,0 мкг/мл	>20	>20	>20	>20	>20	>20
2,0 мкг/мл	11	12	8	11	9	15
4,0 мкг/мл	1,4	1	1	3	2	0
10 мкг/мл	0	0	0	0	0	0
15 мкг/мл	0	0	0	0	0	0
Контроль без хімічної речовини	>20	>20	>20	>20	>20	>20

Було встановлено задовільний рівень чутливості досліджуваного вакцинного штаму *M. bovis* по відношенню до стрептоміцину. Так, за концентрації препарату у середовищі Левенштейна-Йенсена 4,0 мкг/мл кількість колоній у пробірках становила від 0 до 3 (в середньому 1,4). Із зменшенням концентрації антимікробного препарату відмічали збільшення кількості колоній.

Таким чином, було експериментально підтверджено чутливість досліджуваного вакцинного штаму *M. bovis* до стандартних протимікробних речовин (рифампіцину та стрептоміцину), що використовуються для лікування туберкульозу в рекомендованих концентраціях, а саме 40 мкг/мл для рифампіцину та 4 мкг/мл для стрептоміцину.

Вивчення епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби в Україні у 2001-2010 році. За даними ВООЗ, які озвучив на пресконференції голова правління ГО «Експертна спільнота пацієнтів України» Ігор Горбасенко, Україна займає 4 місце в світі за рівнем

захворюваності на туберкульоз дорослих, і п'яте місце за рівнем захворюваності дітей серед 53 регіонів, які контролюються Європейським бюро ВООЗ [49].

У світі більше 1,5 млн людей щорічно гинуть від туберкульозу, а це більше ніж від будь якої іншої інфекційної хвороби. У дослідженні організації «Зупинимо туберкульоз» (Stop TB Partnership), яке проведене спільно з імперським коледжем Лондона та Університетом Джона Хопкінса показано, як у країнах, де зафіксована найбільша кількість випадків COVID-19, проводять діагностику та лікування туберкульозу. Спрогнозувано, що за період 2020-2025 р. р. 6,3 млн. людей захворіє на туберкульоз, а ситуація погіршиться до показників 5-8-річної давнини [50]. Зі слів виконавчого директора цієї організації Лючіца Діціу, вакцина BCG придатна лише для профілактики хвороби у дітей, тому у нас в процесі розробки 2-3 потенційних вакцини від туберкульозу для дорослих. Нам потрібно до 2027 р. вакцинувати пів мільярда людей, а ми з подивом дивимся на захворювання спричинене коронавірусом, якому 120 діб, і похапцем розробляємо проти нього 100 вакцин.

Зв’язок туберкульозу людей і тварин давно відомий. Збудник туберкульозу великої рогатої худоби (*Mycobacterium bovis*) та людей (*Mycobacterium tuberculosis*) належать до однієї генетичної групи. Люди хворіють туберкульозом, інфікуючись збудником туберкульозу великої рогатої худоби.

Сприйнятливість до захворювання викликаного збудником туберкульозу бичачого виду (*Mycobacterium bovis*) надзвичайно висока у мавп, морських свинок, кролів, кажанів, норок, тхорів та хом’яків. Висока сприйнятливість у великої рогатої худоби, буйволів, кіз, свиней, кішок. Посередня у слонів, овець та верблюдів. Помірна (близько 10 %) у людини, коней, віслюків, собак та мишей. До речі, до збудника туберкульозу людського виду (*Mycobacterium tuberculosis*) також помірна сприйнятливість у людини,

свиней, собак та мишей. Тобто *Mycobacterium bovis* та *M. tuberculosis* однаково небезпечні для людей.

Туберкульоз великої рогатої худоби, викликаний збудником туберкульозу бичачого виду теж має світове поширення. Так у 2002 р. в країнах Європи було виявлено 13377 вогнищ, Північної та південної Америки – 3527, Азії – 355, Африки – 303, Австралії і Океанії 365 [51].

В Україні, за офіційними даними у 2001-2010 роках туберкульоз великої рогатої худоби реєстрували у Черкаській, Київській, Запорізській, Кіровоградській, Одеській, Миколаївській, Сумській, Харківській, Хмельницькій, Чернігівській, Луганській, Дніпропетровській областях. На початок 2001 року в нашій державі оголошено неблагополучними 118 пунктів. Найбільша кількість вогнищ відмічалась у Запорізькій та Київській областях. Там виявлено по 14 пунктів. У Сумській і Миколаївській по 11. Кіровоградській і Луганській по 10 [52].

У 2001 році з діагностичною метою піддано забою 13182 голови тварин, які реагували на туберкулін. У 2129 тушах виявлено патолого-анатомічні зміни, що притаманні туберкульозу. На початок 2001 року у 82 господарствах виділено культури *Mycobacterium bovis*. Ці культури найбільше виділяли у господарствах Київської області – 14, Херсонської – 12, Миколаївської – 9, а у Дніпропетровській, Луганській, та Черкаській областях по 7 культур [52].

Щоб уявити масштаб поширення туберкульозу у межах одної Сумської області відзначимо що з 2001 до 2006 р. виявлено 41 неблагополучний пункт. У них виявлено близько 7000 хворих тварин. Лише у 2003 році в цій області встановлено 15 неблагополучних пунктів [53].

За даними Д.В. Ляшкевича [54] з 2001 до 2009 р. включно з діагностичною метою в Україні піддано забою 48266 голів великої рогатої худоби, але підтвердження діагнозу бактеріологічно лише у 821 тварини.

Протягом досліджуваного періоду відмічалось збільшення кількості неблагополучних пунктів у Київській області у 2006-2007 році. Це пов’язано із підтвердженням діагнозу у багатьох господарствах Яготинського району.

Горжеєв В.М. [55] вказує на зменшення кількості неблагополучних пунктів з 2005 до 2010 р., з 29 до 7.

Які ж причини обумовлюють складність ліквідації туберкульзу серед поголів'я великої рогатої худоби? Кульбако В.Д. та співавт. [56] визначили цілу низку причин. Однією з причин є хворі на туберкульоз люди. Так не одноразово епізоотичним обстеженням встановлювали причетність хворих та перехворілих людей до розповсюдження туберкульозу серед тварин.

За даними Горбатюк О.І. [57], аналіз епізоотичного процесу щодо туберкульозу великої рогатої худоби в господарствах Київської області затягується на тривалий час, виявлення збудників туберкульозу *Mycobacterium bovis* із ґрунту, що відібрано на території ферм, свідчить про стабільність джерел збудника інфекції. За даними цього автора у Київській області, а саме в лісостеповій, поліській та приміській зонах в останні роки є тенденція до підвищення рівня інфікованості поголів'я.

Одним з господарств Київської області є відокремлений підрозділ НУБіП України «НДГ Великоснітинське ім. О.В. Музиченка», що розташований у Фастівському районі. Це господарство оздоровлено від туберкульозу у 2010 р. У господарстві туберкульоз був значно поширений, так за 2009 р. та першу половину 2010 р. виявлено 217 тварин, що прореагували на туберкулін, що склало 26,5% досліджуваного поголів'я (табл. 10.3).

У цьому ж господарстві крім корів було інфіковано і молодняк великої рогатої худоби, що вказує на значне розповсюдження на території господарства та досить тривалий період існування вогнища (табл. 10.4).

Отже, у 2001-2010 р.р. туберкульоз великої рогатої худоби в Україні був досить поширеним захворюванням. Протягом аналізованого періоду спостерігалася тенденція до зменшення кількості неблагополучних пунктів. На початку 2001 р. в Україні було 118 неблагополучних пунктів, а на кінець 2010 р. лише 7. Кількість епізоотичних вогнищ туберкульозу зменшилася на 94,1 %.

Таблиця 10.3. - Виявлення тварин інфікованих *Mycobacterium bovis* у ВП НДГ «Великоснітинське, ім. О.В. Музиченка» по групах корів (01.01.2009-01.05.2010.)

№ п/п	Кількість тварин у групі	Тварини які прореагували на туберкулін	% тварин що прореагували від загальної кількості досліджених
1	44	19	43,1
2	41	4	9,7
3	49	12	24,5
4	42	6	14,2
5	54	7	12,9
6	53	6	11,3
7	47	11	23,4
8	57	18	31,5
9	58	16	27,5
10	53	18	33,9
11	60	14	23,3
12	57	4	7,0
13	59	19	32,2
14	44	11	25,0
15	48	34	70,8
16	50	18	36,0
Всього	816	217	26,5

Таблиця 10.4. - Інфікованість *Mycobacterium bovis* молодняку великої рогатої худоби у ВП НДГ «Великоснітинське, ім. О.В. Музиченка»

Місяць та рік дослідження	Досліджено тварин	Виявлено інфікованих алергічним дослідженням (туберкуліном)			
		За двохразової туберкулінової проби		Всього по стаду	
		голів	%	голів	%
Січень 2009 р.	1045	0	0	0	0
Лютий	1	0,1	0	1	0,1
квітень	970	0	0	0	0
червень	1108	0	0	0	0
липень	949	24	2,5	24	2,5
серпень	1090	59+24	5,4+2,3	84	7,7
жовтень	997	20+5	2,0+0,5	025	2,5
листопад	826	4	0,5	4	0,5
грудень	803	1	01,	1	0,1
лютий 2010 р.	892	3+5	0,3+0,5	8	0,8
березень	824	5+12	0,6+1,7	17	2,0
квітень	854	0	0	0	0
травень	902	0	0	0	0
всього	940	117+46	12,4+5,1	163	17,5

11 ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ЗАПРОПОНОВАНИХ ВІРТУАЛЬНИХ РЕЧОВИН У САЙТИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ БІЛКІВ-МІШЕНЕЙ З МЕТОЮ ВИЯВЛЕННЯ МОЖЛИВИХ ЛІДЕРНИХ СПОЛУК; ПРОВЕДЕННЯ СИМУЛЯЦІЇ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ ДЛЯ ОЦІНКИ ЙМОВІРНОСТІ ДИСОЦІАЦІЇ ОБРАНИХ ЛІДЕРНИХ СПОЛУК У КОМПЛЕКСІ З БІЛКАМИ-МІШЕНЯМИ

Ідентифікація сайту зв'язування FTsZ *MT* з інгібіторами. Молекулярний докінг з FTsZ було виконано в програмі CCDC Gold 5.1 із використанням генетичного алгоритму для генерації конформацій ліганду. Було використано наступні параметри докінгу: розмір популяції 100, вибірка 1.1, островів 10, генетичних операцій 100.000. В результаті із 70 відомих інгібіторів (50 та 20 речовин у *S. aureus* та *M. tuberculos*, відповідно) в активні сайти контрольних мішеней (*Staphylococcus aureus ma tuberculosis*) потрапили 35 молекул. Результати докінгу полягали у визначені ключових амінокислотних залишків, здатних формувати водневі зв'язки, та порівняні значень енергій одних і тих же молекул в сайтах різних білків (Рис. 11.1).

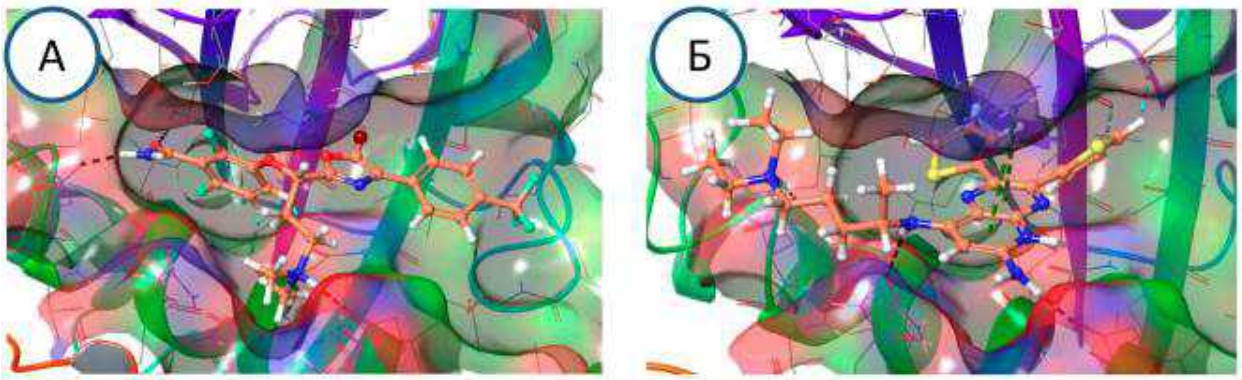


Рисунок 11.1 - Мапа взаємодій двох інгібіторів CHEMBL3098679 (А) та CHEMBL1926725 (Б) із досліджуваним сайтом зв'язування MT. Чорним пунктиром показано водневі зв'язки, зеленим пунктиром - стекінг взаємодії. Схема кольорів для поверхні сайту відповідає парціальним зарядам на атомах амінокислот.

Було враховано три оціночні функції – ChemScore, ASP та GoldScore, кожна з яких давала вичерпну інформацію щодо отриманої конформації. В деяких випадках було використано моделювання рухливі залишки, збільшуючи тим самим простір аналізу. Після аналізу результатів всіх п’яти запусків докінгу було встановлено ряд співпадань розташування функціональних груп, що відрізнялися формою, довжиною та орієнтацією в сайті зв’язування.

Цікавим виявився факт, що наразі відомі речовини, які інгібують як полімеризацію FtsZ із *M. bovis/M. tuberculosis*, так і *S. aureus*. При цьому, показано, що ці молекули не є ГТФ-конкурентними. Отже залишається лише одна ділянка, що може відповідати за взаємодію із ними із аллостеричним сайтом. В структурі FtsZ рухливість аллостеричного сайту не залежить від наявності ГТФ у апікальному сайті зв’язування. Одним із результатів першого етапу стали дані щодо структур та активності референтних речовин-інгібіторів FtsZ із *M. bovis/M. tuberculosis* та *S.aureus*. В базі низькомолекулярних речовин ChEMBL були знайдені дуже подібні ліганди, що, до того ж, мають низьку спорідненість до FtsZ із *M. bovis/M. tuberculosis*. Ці молекули, що зазвичай містять бензамідне ядро, менш активні ніж аллостеричні інгібітори FtsZ проти *M.bovis/M.tuberculosis* та *S.aureus*. Проте, вони цілком очевидно можуть інгібувати процес полімеризації лише зв’язуючись із якоюсь частиною аллостеричного сайту. Молекулярна динаміка структури FtsZ із *M. tuberculosis* показала зачинення цього сайту і формування іншого сайту, менш глибокого, поряд із ним (Рис. 11.2).

Тому було вирішено провести «Induced Fit Docking» в топологічно близькі аллостеричні сайти структур *M. bovis/M. tuberculosis* із дозволом на підвищену рухливість амінокислот аллостеричного сайту. Молекулярний докінг показав три різні положення референтних сполук із досить коректним, з точки зору фізико-хімічних властивостей поверхні сайту, розташуванням ароматичних систем у трьох позиціях. Результатом віртуального скринінгу речовин проти FtsZ із *M.tuberculosis* зі скринінгових баз НВП «ЄНАМІН» та

«ІФЛАБ» стало формування похідної бібліотеки із 75 речовин, серед яких 45 мали необхідну розчинність. Для FtsZ із *S.aureus* було відібрано 30 речовин, мішенню яких ми визначили саме аллостеричний сайт.

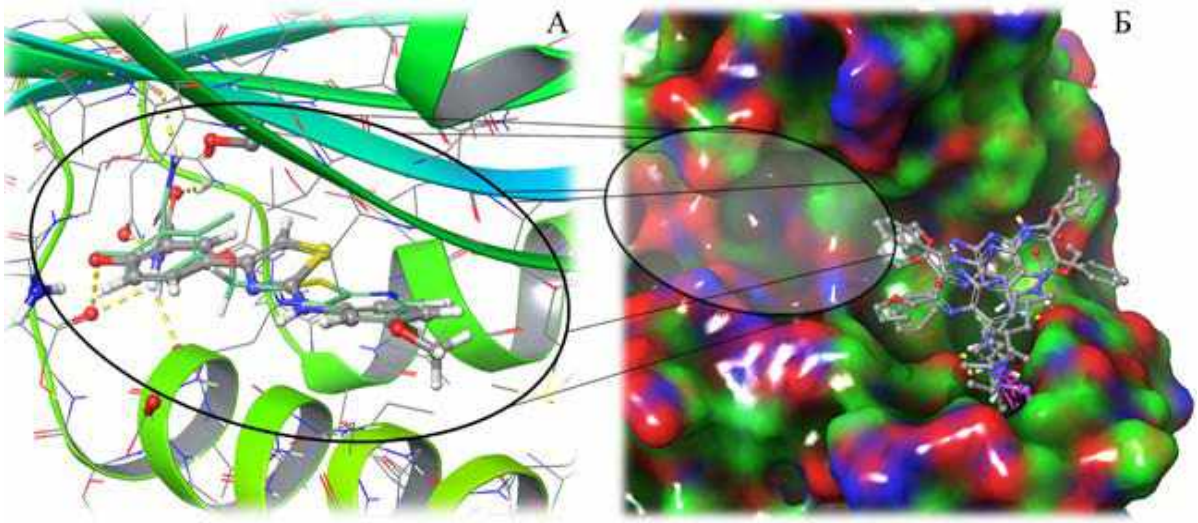


Рисунок 11.2 - Структура FtsZ із *S.aureus* із накладенням референтної речовини та скринінгової речовини із бази даних НВП "ЄНАМІН" (А). Відповідний аллостеричний сайт зв'язування в FtsZ із *M.tuberculosis* повністю зникав після певної тривалости молекулярної динаміки. Але отримані результати структурно-біологичного дослідження визначили альтернативний сайт до якого референтні сполук визначили помітну спорідненість (Б).

Реконструкція комплексів CysK1 та CysM з інгібіторами та дослідження їх сайтів зв'язування. *O-acetylserine sulfhydrylase* – група сульфодрилаз, що каталізують перетворення О-ацетілсеріну в цистеїн. Послідовності сульфодрилаз типу CysK1 ідентичні для різних видів мікобактерій. Що стосується подібності *CysK1* та *CysM,* то, незважаючи на належність до одної групи, майже однакову довжину амінокислотної послідовності та, в решті-решт, однакові функції, ці ензими подібні лише на 37%. Цікаво, що аналіз просторової структури дозволив встановити близьких гомологів, які у подальшому були використані для реконструкції повної просторової моделей. Для подальшого аналізу було обрано декілька PDB-

структур - 2Q3B, 3ZEI та 2Q3D з ідентичністю 85-92% та роздільною здатністю ≤2 Å. Аналіз амінокислотного оточення сайту зв'язування сульфодрилази CysK1 та низькомолекулярного похідного інгібітору тріазолідину дозволив встановити ключові амінокислотні залишки для подальшого докінгу референсних сполук: Thr71, Ser72, Gln144, Phe145, Lys215, Gly222, Ala225 і Phe227. Для структури ми визначили взаємодії між лігандом (скеффолд базується на фрагменті сечовини) та Thr81, Ser82, Gln154 та площиною пірідоксаль фосфату (вітамін B6) в структурі 5I7A.

Відповідно до попередніх даних, структури CysK1 та CysM були досліджені та підготовлені за стандартним протоколом, що включає мінімізацію енергії, врівноваження системи водного оточення та релаксацію. Обидва фармакофори були включені в процес пошуку для більшого наближення в процесі пошуку до структури закристалізованого ліганду (Рис. 11.3).

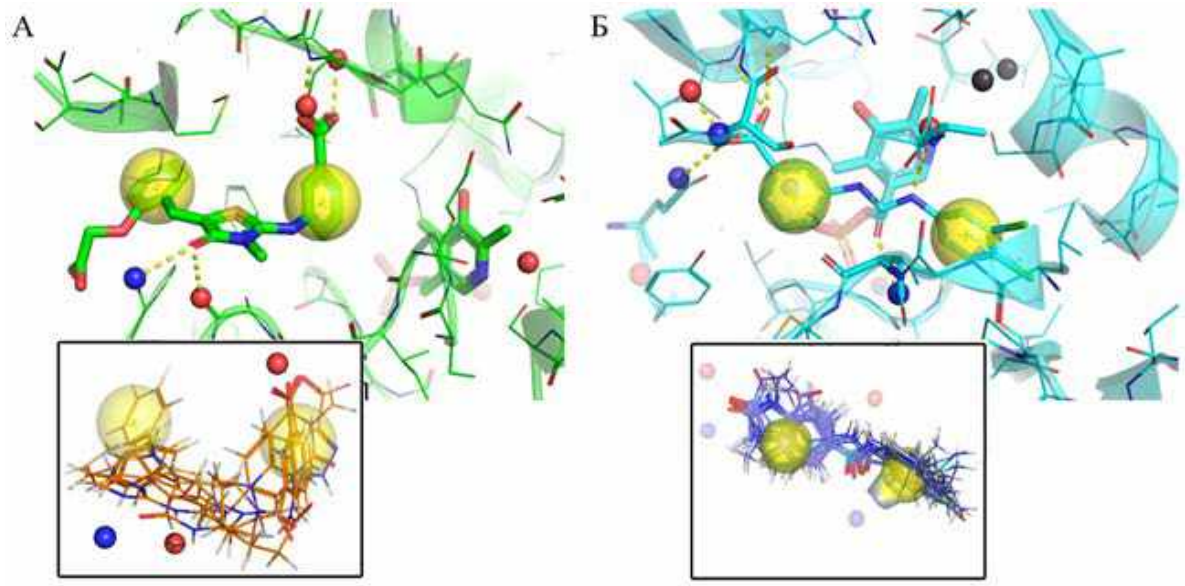


Рисунок 11.3 - Фармакофорні моделі (ароматичні системи та водневі зв'язки) на основі структур сайтів CysK1 (А) та CysM (Б) із закристаллізованими лігандами. Результати молекулярного докінгу прпредставлені у вигляді суперпозиції скринінгових речовин під кожною з моделей.

Модель CysK1 включала два просторових примушення, що відповідали ароматичним структурам для можливості формування стекінгу. При цьому ще два водневих зв'язки мали бути обов'язково присутні і формуватися за рахунок Thr78, Thr82, Gln151, Asn221 та Ala323. Структура CysM (PDB ID: 5I7A) була досліджена та підготовлена за стандартним протоколом, що включає мінімізацію енергії, врівноваження системи водного оточення та релаксації. Результатом цього дослідження стало створення двох фармакофорних моделей, які базувалися на різному розташуванні амінокислот, що формують водневі зв'язки та стекінг із функціональними групами. При цьому молекула кофактору залишалася в сайті зв'язування в процесі докінгу. Таким чином, наша модель включала два просторових примушення, що відповідали ароматичним структурам для можливості формування стекінгу. Для більшого наближення в процесі пошуку до структури закристалізованого ліганду було вирішено включити обидва примушення в процедуру пошуку. Група амінокислотних залишків (Gly73, Ser72, Thr71, Gln144) здатна утворювати досить міцну сітку водневих зв'язків. З іншого боку знаходилась позитивно заряджена група, утворена кінцевим азотом Lys215, що може приймати участь як в утворені водневих зв'язків, так і в формуванні Pi-катіон взаємодії.

В результаті візуальної інспекції розташування інгібторів ми відібрали по 150 речовин проти кожної мішені. Після цього, за оцінювальними функціями та показниками фізико-хімічних параметрів, в тому числі розчинності, ми залишили та представили для *in vivo* скринінга 25 речовин проти CysK1 та 15 речовин проти CysM.

Пошук та аналіз просторової структури молекулярної мішені rmlC із *M. tuberculosis.* Клітинна стінка Mtb є однією з перевірених мішеней для ліків [58]. Біосинтез дезоксисахариду L-рамнозилу здійснюється чотирма ферментами, а саме RmlA (глюкозо-1-фосфаттимидилтрансфераза), RmlB (dTDPD-глюкоза 4,6-дегідратаза), RmlC (dTDP-6-дезокси-Dxylo-4-гексулоза)

та RmlD. Ці гомодимерні за будовою ензими стали потенційними мішенями для лікування туберкульозу. Механізм роботи каталітичного сайту RmlB та RmlC відомий - відбувається епімеризація положень C3 і C5 dTDP-6-дезокси-D-ксило-4-гексулози з утворенням dTDP-6-дезокси-L-ліксо-4-гексулози. Функцірнально α-L-рамнозил-(1→3)-α-D-N-ацетил-глюкозамінозил-1-фосфат це дисахаридний лінкер присутній у клітинній стінці Mtb [16, 58]. Цей критичний із структурної точки зору лінкер зв'язує галактанову область арабіногалактану з пептидогліканом через фосфодіефірний зв'язок і є частиною біогенезу зовнішньої мембрани бактерій.

На сьогодні відомі три кристалічні структури - 1PM7, 1UPI, 2IXC із досить високою роздільною здатністю та різною кількістю зв’язаної води. Відповідно до даних із бази даних Uniprot (код P9WH11), сайт зв’зування сформований амінокислотними залишками Arg59, His62, Lys72, Tyr132, Tyr138, Glu143, Arg170 одного ланцюга і His19, Phe26, Glu28 другого ланцюга. Жодна з молекул води в сайті зв’язування не є постійно зв’язаною із амінокислотами сайту зв’язування. В структурі 2IXC в сайті зв’язування є також молекула ліганду, що допоможе ідентифікувати ліганд-білкові взаємодії. Амінокислота сайту Tyr138 бере участь у стекінг-взаємодії з тимідиновим кільцем dTDP-4-оксо-6-дезоксиглюкози. Це характерно для багатьох інших білків із наявними нуклеотид-зв'язуючими областями [16, 58]. Взагалі, активні сайти як RmlB, так і RmlC можна розділити на чотири області: область зв'язування піримідин-2,4 (1H, 3H)-діону (PDR); зв'язувальна область тетрагідрофуран-3-олу (TDR); область зв'язування фосфатних груп (PR); та область зв'язування гексозного кільця (HR).

Проведено порівняльний аналіз RmlB та RmlC. Так, Tyr204, Gln191, Arg190 і Lys202 складають PDR-область RmlB, Tyr204 і Gln191 відповідають за π–π-стекінг та утворення H-зв'язку з піримідин-2,4 (1H, 3H)-діоном. Область PDR RmlC складається з Tyr138, Gln47 та Asn49, Tyr138 утворює π – π-стекінг з піримідином, а Asn49 утворює H-зв'язок з одним атомом кисню піримідин-2,4(1H, 3H)-діону. Поблизу області DR RmlC немає залишків, тоді як Asp84,

Asn246 та His273 розташовані поблизу області TDR RmlB. Залишки Arg відіграють важливу роль у створенні області PR, Arg211 та Arg270 становлять область PR RmlB, тоді як область PR RmlC складається з Arg59 та Arg170. Ці залишки Arg відповідальні за заряд-зарядові взаємодії з фосфатними групами.

Високо консервативними в активному сайті RmlC MTB є діади амінокислотних залишків His-Asp His119-Asp83 і His62-Asp171, а також Lys72, всі вони є іонізованими, стратегічно розміщеними для участі в кислотно-основній хімії в активному центрі. Phe121 і Tyr138, які беруть участь у зв'язуванні вуглеводів [58], і гідрофільні залишки Gln47, Asn49, Ser1 і Ser53, які складають мережу для зв'язування субстрату і каталізу, також дуже консервативні. Нажаль, жодної інформації щодо точкових амінокислотних мутацій в сайті зв’язування для визначення критичних взаємодій із субстратом на даний час не встановлено.

Ми налаштовували параметри докінгу та функції обрахунку різних типів взаємодій доти, доки продокована структура 2'-дезоксітимідин-бета-l-рамноза не виявилась якомога ближчою до вихідної кристалізованої структури. В результаті значення середньоквадратичного відхилення (RMSD) між здокованою та кристалізованою конформаціями для 2'-дезоксітимідин-бета-l-рамноза були нижче 1,5 Å.

Наша фармакофорна модель для пошуку інгібіторів RmlC містить шість опорних елементів, включаючи дві акцепторні групи водневих зв'язків (HBA), пару донорних водневих зв'язків (HBD), ділянку простору, де має знаходитись негативно іонізований атом (NI) та ароматичне кільце (RA).

До того ж ми використовували техніку включення сполук «пасток». «Пастки» зазвичай мають більшу молекулярну масу і більше циклічних елементів, ніж активні речовини. В нашому випадку це призводить до збільшення значень оцінювальних функцій пасток через гідрофобні взаємодії без водневих зв'язків з рецептором, проте, суттєвими взаємодіями типу пі-пі-стекінгу з Phe26, Tyr132 та Tyr138. Відповідно, бензамідна корова структура зв'язується в або поряд з нуклеотид-зв'язувальною областю за аналогією з

гомологічними структурами, тоді як тіазолідинонові ядерні структури зв'язуються в або поряд з фосфат-зв'язувальної областю. Переваги цих структур у зв'язуванні можна пояснити їх електростатичним потенціалом поверхні. Заміщені тіазолідинони мають спільні риси із сполуками, які, як вважається, імітують дифосфатний фрагмент у стані переходу.

Продоковані активні ліганди та аналог продукту 2'-дезоксітимідин-бета-l-рамноза досліджували, щоб охарактеризувати важливі взаємодії сайту зв'язування RmlC (Рис. 11.4).

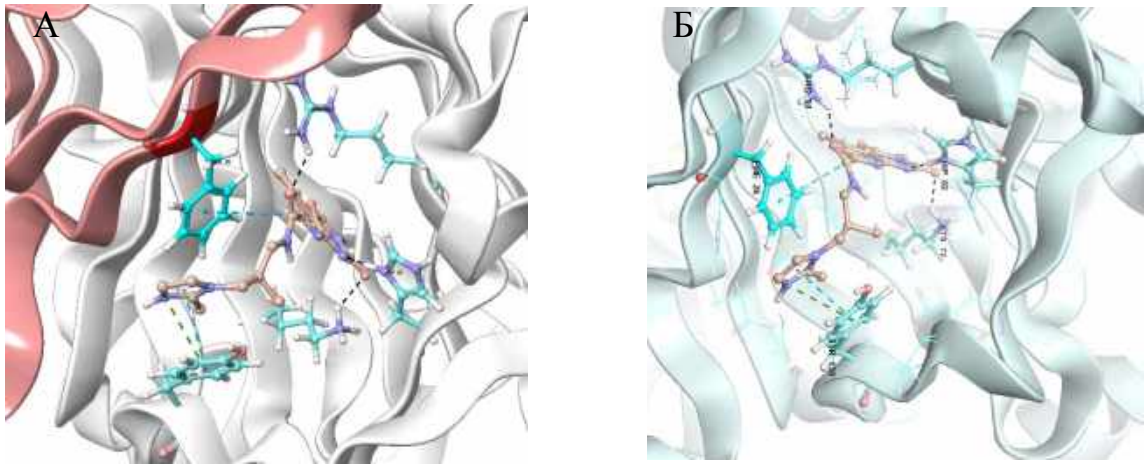


Рисунок 11.4 - Система Pi-Pi стекінгу та водневі зв’язки є спільною рисою взаємодії ідентифікованих потенційних інгібіторів та сайту зв’язування RmlC (А, Б).

Як і передбачалось, у всіх варіантах комбінацій фармакофорних груп в моделі гідрофобні взаємодії рі-рі стекінгу роблять значний внесок в оцінку докінгу активних сполук в активному сайті RmlC. Гідрофобна взаємодія між активними речовинами та рецептором часто включає Tyr132 та Tyr138 з ланцюга A та Phe26 з ланцюга B (зверніть увагу, що частина ланцюга B утворює бічну стінку активного сайту ланцюга A і навпаки). За рахунок взаємодії з основними залишками сайту зв'язування та запобігання доступу молекул води до Phe26 та Tyr132, активні речовини забезпечують рясні гідрофобні контакти для досягнення високої афінності зв'язування. Крім описаних вище гідрофобних контактів деякі активні речовини також утворюють водневі зв'язки з Ser51, Arg59 і Arg170.

В результаті процессінгу хімічних баз даних ми отримали 10000 речовин, які потім оброблялися біль точним методом молекулярного докінгу. Зважаючи на малу кількість анотованих речовин, ми очікували дуже високих показників оцінювальних функцій для нового набору сполук, навіть із такої великої бази. Виходячи з цього, найкращий інгібітор мав відповідати таким параметрам як наявна ароматична структура (на відстані до 6Å від Tyr204 і Gln191); ліганд має утворювати як мінімум один водневий зв'язок із пари Arg59 та Arg170; один водневий зв'язок із пари Asn49 та Tyr138; та один водневий зв'язок із пари Tyr138, Gln47. При чому всі ці групи геометрично зафіксовані, а отже нові ліганди за формою все ж таки мають нагадувати субстрат або його аналог із кристалічної структури.

Фармакофорна гіпотеза ліганд-залежного інгібування мікобактеріальної шикіматної кінази aroK. Ревізія PDB визначила 22 структури мікобактеріальної aroK, проте, лише структура 4BQS (2,15Å) місить опорну сполуку інгібітору aroK - K2Q ((1R,6R,10S)-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(Z),7-diene-8-carboxylic acid) [59]. Для конструювання фармакофорної гіпотези було обрано комплекс 4BQS_A. Ліганди, що не приймають участь у зв'язуванні K2Q було видалено. Молекули води було видалено, за виключенням HOH2006, HOH2026, HOH2039 і HOH2052, що потенційно здатні утворювати водневі мостики з лігандом (див. діаграму взаємодії ліганду K2Q – Рис. 11.5 а). Наступна підготовка структури виконувалась за стандартним протоколом.

Помилки зв'язків і відсутні водні K2Q, виправлялися у автоматичному (Auto/e-Pharmacophores) і мануальному (Manual) режимах. Як контроль, було використано дані RCSB PDB і CCPDB in Europe (EMBL-EBI).

Після первинної генерації, остаточна фармакофорна гіпотеза будувалась у мануальному режимі з врахуванням карти ліганд-білкової взаємодії (Рис. 2.5а). Остаточна фармакофорна модель («4BQS_A_

K2Qcomplex_ManPharm.mae») містить чотири дескрипторі акцепторних центрів ліганду (A1, A2, A4 і A7) і однієї донорної ділянки «D7» (Рис. 11.5 б).

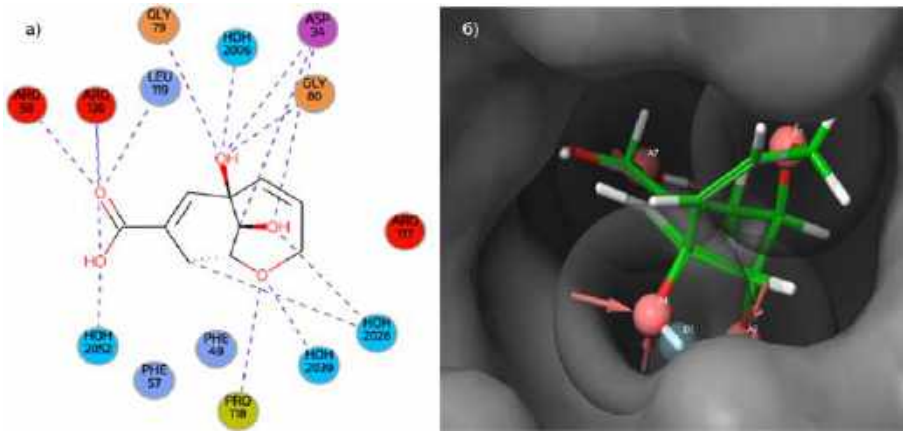


Рисунок 11.5- Карта ліганд-білкової взаємодії (а) і фармакофорна гіпотеза ліганд-залежного інгібування шикіматної кінази aroK *M. tuberculosis* в оточенні цільового сайту мішені.

Фармакофорна гіпотеза ліганд-залежного інгібування мікобактеріальної аланін-рацемази (alr). Аланін-рацемаза одна з перспективних мішеней долання мультирезистентності [60], і її специфічне інгібування є літальним для *Mycobacteria in vitro* та *in vivo* [60-62].

Порівняння послідовностей підтвердило ідентичність alr *M. tuberculosis* і *M. bovis*, а аналіз інформації PDB визначив комплекси (1XFC (1.9 Å) і 6SCZ (1.57 Å)) із специфічними інгібіторами: L7N (PDB: 6SCZ), PLP (PDB: 1XFC) і OJQ (PDB: 6SCZ), що зв’язуються за рахунок водневих зв’язків з амінокислотами: K44, Y48, N214, S215, R230, G232, I233, Y273, M321, Y366) і Pi-взаємодій з залишками: W90 і H174. Окрім зазначених комплексів, було визначено 43 бактеріальні структури. Загалом, було визначено 12 додаткових лігандів (сумарно 15), що було визначено як позитивний контроль: IN5, EPC, PP3, PDD, DCS, DLY, PMH, PMP, PE1, EOW, EM2 і LLP (Рис. 11.6).

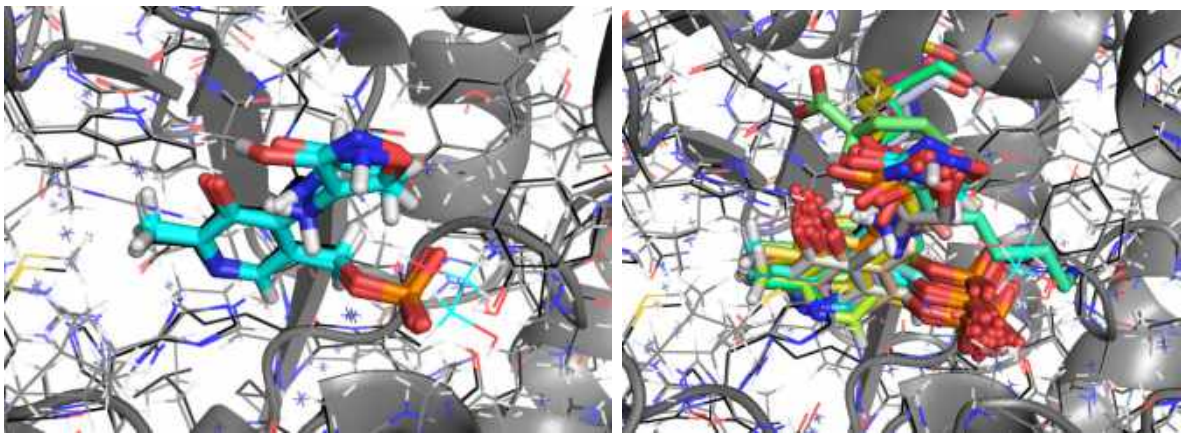


Рисунок 11.6 - Топологія лігандів в активному сайті аланін-рацемази (alr) *M. tuberculosis* (PDB: 6SCZ, 1XFC і 6SCZ) – *ліворуч*, а також, результати вирівнювання лігандів усіх лігандів позитивного контролю - *праворуч*.

Конструювання фармакофорної гіпотези було виконано із використанням мануального протоколу «Manual» аналітичного блоку «Develop Pharmacophore Model». При цьому, було враховано рецептор-залежні обмеження об’єму, обмеження радіусів Ван-Дер-Ваальса, фіксований масштабний фактор (0.50), ігнорування дистанцій до атомів рецептору (≤2.0 Å і ≥5.0 Å). Очікувальна кількість дескрипторів фармакофору була зазначена як максимальна. Препроцесінг визначив 7 дескрипторів, один з яких («A5») було виключено на підставі візуального аналізу. Також, було додано дискріптор ароматичного фрагменту («R13»). Таким чином, остаточна фармакофорна гіпотеза - «6SCZ_A_complex_ManPharm.mae» містила 5 акцепторів - A1, A2, A7, A8 і A9; 1 донор водневого зв’язку – H12 і 1 дескриптор ароматичного фрагменту – R13. Коректність моделі була підтверджена вирівнюванням з комплексами контрольної групи (Рис. 11.7). В результаті було відібрано ряд лідерних сполук, що спрямовані на такі молекулярні мішені медикаментозного лікування туберкульозу - шикіматну кіназу aroK і аланін-рацемазу (alr).

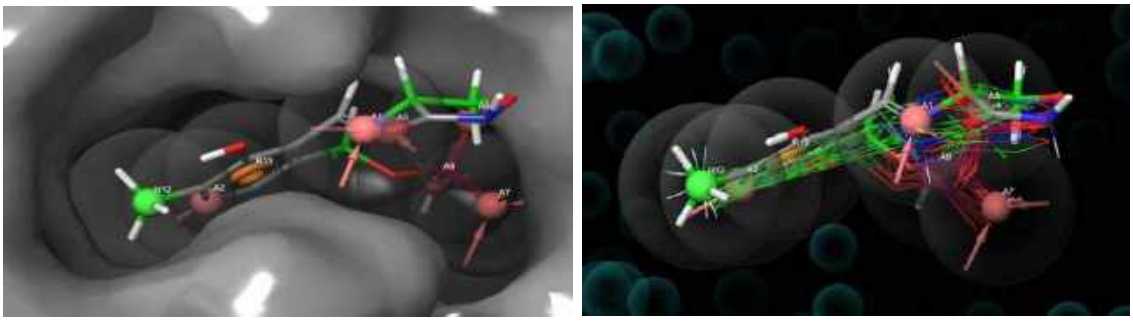
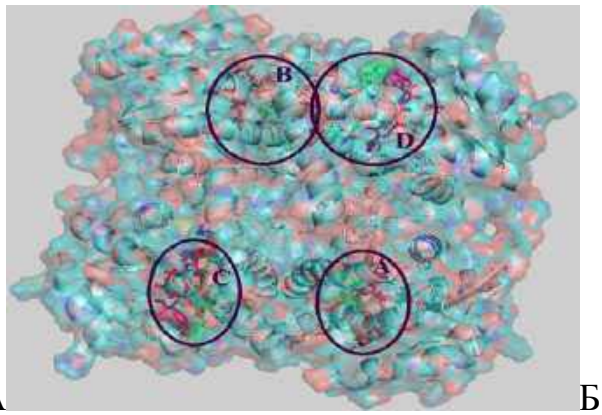


Рисунок 11.7 - Фармакофорна гіпотеза ліганд-залежного інгібування аланін-рацемази (alr). Топологія гіпотези відносно ліганду L7N і цільового сайту зв'язування. Структурне вирівнювання побудованої гіпотези і інших інгібіторів бактеріальних alr, що на момент дослідження були депоновані в RCSB Protein Data Bank: OJQ, IN5, EPC, PP3, PDD, DCS, DLY, PMH, PMP, PE1, EOW, EM2 і PLP.

Реконструкція комплексів ENR з потенційними інгібіторами. На основі аналізу мутацій молекулярної мішені ENR з *M. bovis* було встановлено ряд важливих амінокислотних залишків для подальшого молекулярного докінгу. До сиквенсу SIU00123.1, що є ідентичним P0A5Y7 (*M.bovis*) та P9WGR1 (*M.tuberculosis*), було розглянуто мутації, що можуть вливати на зв’язування з активним сайтом, інгібування та активність ферменту. Було встановлено, що багато клінічних ізолятів, стійких до протитуберкульозних ліків, містять мутації в локусі inhA (зокрема: серину 94 на аланін, аспарагінової кислоти в положенні 148 на гліцин, заміна тирозину на аланін у положенні 158, тощо.). Дані стосовно мутацій в ENR важливих для *M. tuberculosis/M. bovis* було враховано при побудові карти сайту для проведення докінгу та при формуванні фармакофорних моделей.

Структури кристалів (PDB ID: 5UGU, PDB ID: 5G0T, PDB ID: 5G0V) були накладені на реконструйовану ENR, ліганди та іони перенесені до реконструйованої структури. Було створено чотири фармакофорні гіпотези. Всі гіпотези були згенеровані з урахуванням попереднього докінгу в активний сайт. В результаті докінгу було встановлено, що всі речовини з вибірки взаємодіють в основному в ділянках взаємодії інгібіторів в активному сайті,

що розташована на відстані від ділянки взаємодії НАД (нікотинамід-аденін-динуклеотид). На основі аналізу сайтів зв'язування в кристалічних структурах було встановлено, що ділянки взаємодії НАД в чотирьох ідентичних ланцюгах редуктази в усіх розглянутих кристалах були майже ідентичними. Таким чином було сформовано одну загальну гіпотезу для НАД та три гіпотези для кожного з інгібіторів (Рис. 11.8).

А 

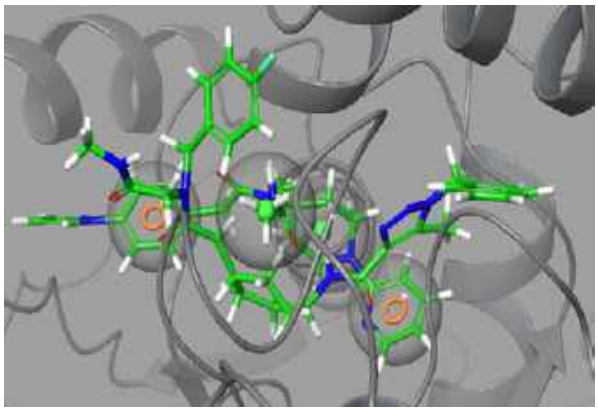
Б 

Рисунок 11.8 - Візуалізація активного сайту на поверхні реконструйованої моделі мономерів ENR (А) та приклад фармакофорної гіпотези (Б)

На основі створених гіпотез було проведено віртуальний скринінг та відібрано 1339 конформерів (889 сполук) потенційних лігандів. За допомогою молекулярного докінгу сет скорочено до 116 потенційних перспективних інгібіторів ENR.

Реконструкція комплексів blaC з потенційними інгібіторами. В базі даних Protein Data Bank було розглянуто 25 кристалічних структур P9WKD2 (*M.tuberculosis*)/P0A5I7(*M.bovis*), що на 100% ідентичні сиквенсу. Було відібрано три структури з відмінними лігандами: 4Q8I, 6B6D, 7K8K – сайти яких відмічено на Рис. 11.9: А-сайт: TEB (рожевим кольором), 9F2 (фіолетовим кольором), FSZ (салатовим кольром), 0RN (жовтим кольором). Сайт B: ліганд TSL. Сайт C: ліганд 0RN. Сайт D: ліганд TSL. Так як проведення попереднього докінгу у активні сайти бета-лактамази було неможливим у

зв’язку з майже повною відсутністю лігандів з підтвердженою активністю у базах даних малих сполук, скринінг проводився з урахуванням взаємодій в активних сайтах відібраних комплексів. В результаті первинного скринінгу було відібрано 2739 конформерів для 1679 унікальних потенційних інгібіторів. Ефективність гіпотези було підтверджено подальшим докінгом всієї бібліотеки в активний сайт blaC, та відібрано 97 сполук. Речовини, що мали найвищі показники docking score, glide gscore та glide emodel під час докінгу були присутніми серед хітів скринінгу фармакофорних моделей.

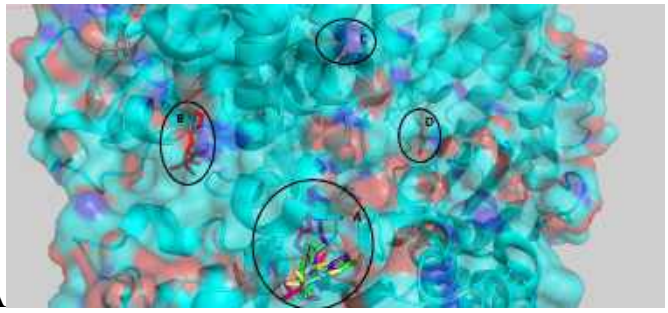
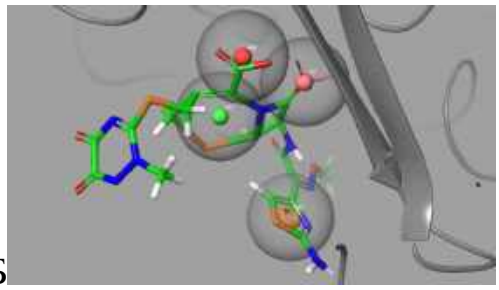
А  Б 

Рисунок 11.9 - Візуалізація на поверхні реконструйованої моделі blaC (А) та приклад фармакофорної гіпотези (Б)

Реконструкція комплексів Dpre1 з потенційними інгібіторами. На основі реконструйованої нами повної просторової структури Dpre1 (UnipprotKB: SIU02448.1) було розроблену карту взаємодії керуючись даними експериментально отриманих структур 4P8C, 4NCR та 4P8N (Рис. 11.10А). Показано, що амінокислотні залишки Asn63, Ile184, Gly57, Gly55, Thr122, Leu56, Cys129, Ser59, Arg58, His132 та Gly117 беруть участь в утворенні водневих зв’язків з аміно, кето, гідрокильними та фосфатними групами ліганду. Arg54 та Lys418 утворюють координаційні зв’язки з фосфатною групою та шестичленним циклом ліганду відповідно. Tyr60 бере участь в утворенні Pi-Pi Stacked зв’язку з ароматичною групою ліганду. Gly124 бере участь в утворенні Amide-Pi Stacked зв’язків з ароматичною групою та п’ятичленним циклом. Thr16 та Ala128 беруть участь в утворенні Pi-Alkyl зв’язків з метильною групою, п’ятичленним циклом та ароматичною групою

ліганду відповідно. Ile131 та Pro116 беруть участь в утворенні слабких карбон-водневих зв’язків (нумерація залишків наведена для шаблону по 4P8C). Структури ліганду ФАД, що майже в точності повторюють взаємодії в сайтах трьох різних кристалічних структур, на рисунку позначено червоним кольором. Ліганд 26J позначено блідо коричневим кольором, R57 – фіолетовим, Y22 – блакитним, 2J3 – синім.

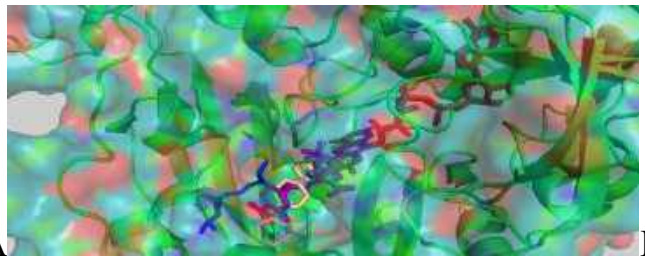
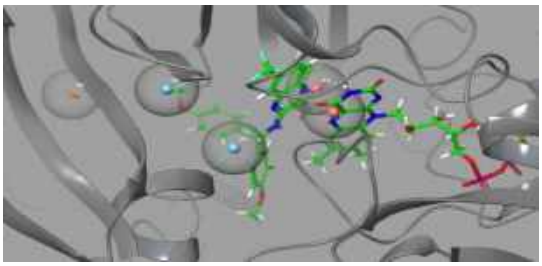
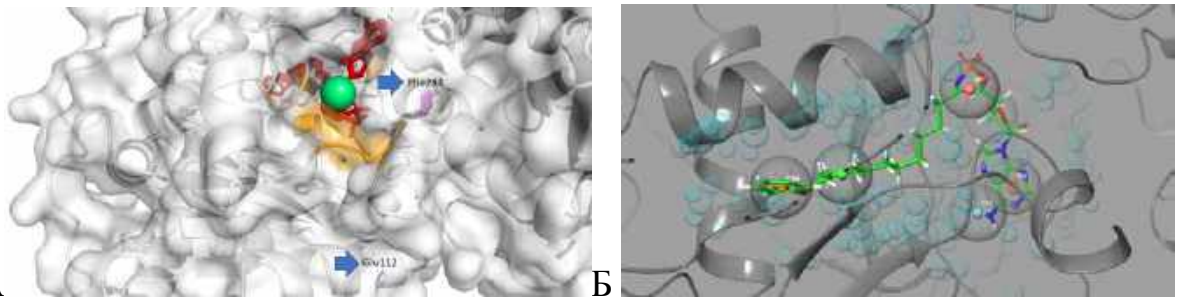
А  Б 

Рисунок 10.10 - Візуалізація на поверхні реконструйованої моделі Dpre1 (А) та приклад фармакофорної гіпотези (Б)

Так як результати скринінгу по трьом гіпотезам давали значну вибірку сполук при скринінгу бази даних, з метою скорочення вибірки, а також враховуючи результати докінгу та аналіз сайту, було вирішено поєднати три гіпотези, відібравши ключові вектори. Злита (merged) гіпотеза включає п’ять фармакофорних векторів: два акцептори водневого зв’язку (A1, A2), два донори водневого зв’язку (D3, D4) та один ароматичний вектор (R5). Вектори A1, A2, D4 було згенеровано на основі кристалічної структури 4P8N (ліганд 26J). Вектор R5 було згенеровано на основі кристалічної структури 4NCR (ліганд R57). Вектор D3 було згенеровано на основі кристалічної структури 4P8C (ліганд 2J3). При відборі векторів було враховано взаємодії, що найбільш часто зустрічалися в докінгу: вектор A1 направлений на амінокислотний залишок Gly117, A2 – Lys418, D3 – Ser288, D4 – Tyr314, R5 – Thr230. За результатами віртуального скринінгу було відібрано 2126 конформерів (1140 унікальних сполук) та у двічі скорочено за допомогою молекулярного докінгу.

Реконструкція комплексів FAAL з потенційними інгібіторами. Нами було виконано пошук та аналіз просторових структур ацил-АМФ лігаз депонованих в RCSB PDB. Аналіз декількох сотень депонованих структур визначив певну гетерогенність представників родини. У випадку типу 32 було визначено 142 референсні структури, проте для подальшого аналізу відібрані наступні структурами: з інгібіторами - 5HM3_1, 5EY9_1, 5ICR_1, 3KXW_1, 3LNV_1 та субстратом - 5D6J_1, з ідентичністю вище 74% і роздільною здатністю 2,25-3,5 Å. Аналіз структур 5HM3_1, 5EY9_1 і 5D6J_1 дозволив визначити профілі сайтів зв’язування лігандів, зокрема було виконано аналіз комплексу FadD32 з інгібітором PhU-AMS зв’язаному з активним сайтом ферменту. Також було встановлено структуру та особливості N-кінцевого і C-кінцевого доменів, інгібітору PhU-AMS і FAAL-специфічного інсерційного мотиву (залишки 369-397) в структурі FadD32. Встановлено 18-ть залишків (V218, L222, G230, T244, L247, A248, L251, F285, A287, L318, E322, P323, Y350, G351, L352, L357 і I487), що відповідають за гідрофобні взаємодії і 7 залишків (H238, D239, S321, S349, A353, D476 і K608, що утворюють водневі-зв'язки під час взаємодії з лігандом (Рис. 11.11).



А Б

Рисунок 11.11 - Порівняльний аналіз PDB-структур із зв’язаними лігандами (А) та приклад фармакофорної гіпотези (Б).

Загалом, було встановлено, що розміщення інгібітору у FadD32 подібне до того, що спостерігається у випадку формування комплексу FAAL з *L. pneumophila* і ациденіланілату C12. Також, на прикладі FadD32 *M. tuberculosis* було визначено дві відмінні ділянки, що специфічно взаємодіють з лігандами,

відмінними від PhU-AMS. Хоча це не субстрати або продукти каталізованої реакції, їх топологія вказує на функціональну важливість відповідних сайтів і важливість їх подальшого дослідження. На основі кристалічних структур (PDBID: 5D6J, 5EY9, 5HM3) було створено три фармакофорні гіпотези.

В результаті лише фармакофорна гіпотеза на основі кристалічної структури 5HM3 та ліганду 649 дала не значну вибірку речовин: 508 конформерів (347 сполук) потенційних лігандів. Гіпотеза до 5D6J (ліганд АТФ) дала 2337 конформерів (1282 сполуки), гіпотеза до 5EY9 (ліганд 5SV) – 6389 сполук. Враховуючи, що всі три ліганди з трьох різних кристалічних сполук знаходяться в межах одного сайту зв'язування, а докінг на основі грід-карт з урахуванням лише взаємодій лише в одному з кристалів, не давав результатів, було прийнято рішення взяти лише вибірку гіпотези до ліганду 649 у подальшу роботу.

Реконструкція комплексів FBA з потенційними інгібіторами. Для створення фармакологічних гіпотез та скринінгу було проведено просторове суміщення реконструйованих нами моделей на структуру Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase, ліганди та іони перенесені до реконструйованої структури. Скринінг було проведено з урахуванням результатів попереднього докінгу в активні сайти (грід-карти згенеровано на основі взаємодій у сайтах кристалів PDB ID: 4A22, 4DEL, 4LV4 (Рис. 11.12). В результаті скринінгу було відібрано 1109 конформерів (597 сполук) та потенційних лігандів та скорочено до 89 унікальних структур за допомогою молекулярного докінгу.

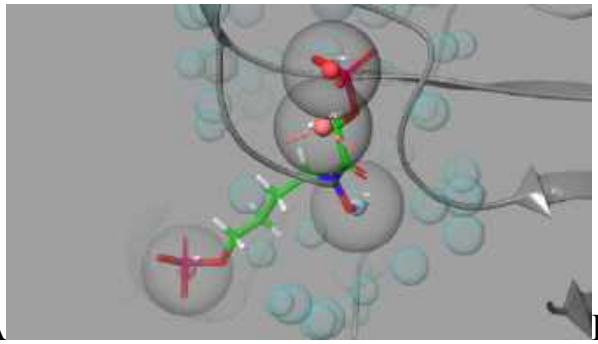
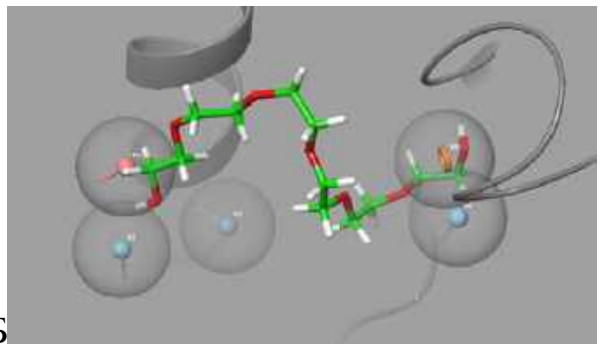
А  Б 

Рисунок 11.12 - Приклад фармакофорних моделей на основі кристалічних структур 4A22 (TD4) і 4DEL (P6G). А - модель включає в себе чотири фармакофорні вектори: акцептор водневого зв'язку (A2), донор водневого зв'язку (D5) та два негативні іонні вектори (N7, N10); Б – модель включає в себе п'ять фармакофорних векторів, що за результатами докінгу в активний сайт найчастіше взаємодіють з амінокислотними залишками рецептора: A1 – акцептор водневого зв'язку, взаємодіє з Gln15, D2 (донор водневого зв'язку) – Gly14, D3 (донор водневого зв'язку) – Glu18, D4 (донор водневого зв'язку) – Pro246, R5 (ароматичне кільце) – Ala196.

Реконструкція комплексів PanC з потенційними інгібіторами. Розробка інгібіторів PanC була проведена на основі основі кристалічних структур (PDB ID: 3IUB та 3IOC) та реконструйованої нами структури ортолога. За результатами структурного аналізу нами створено п'ять фармакофорних гіпотез, за відповідними сайтами ефекторів. Проте результати скринінгу потребували корекції оскількиз сайтом FG2 (302) у ланцюгу A зв'язалося 128382 ліганди, з сайтом FG2 (303) структури 3IOC у ланцюгу A – 88320 лігандів, з сайтом FG2 у ланцюгу B – 56019 лігандів, з сайтом A5D у ланцюгу A – 24337 лігандів, з сайтом A5D у ланцюгу B – 24335 лігандів. Зважаючи на результати скринінгу було виділено два основні сайти: сайт зв'язування одного ліганду FG2 в ланцюгу A та сайт трьох лігандів FG2, A5D та 2B5 в ланцюгу A (що є майже ідентичним такому ж сайту в ланцюзі B). Враховуючи особливості взаємодії у вказаних сайтах, було повторно проведено докінг та згенеровано нові гіпотези (11.13).

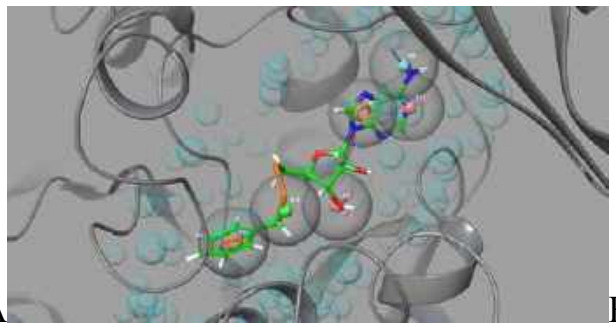
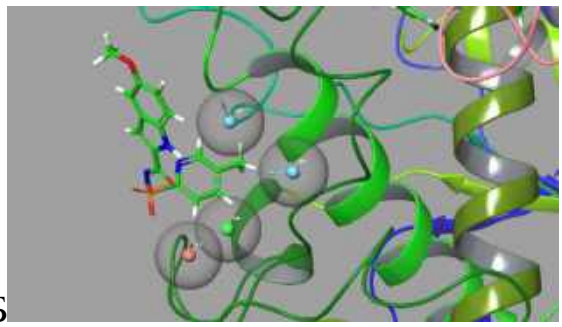
А  Б 

Рисунок 11.13 - Приклад фармакофорних моделей на основі кристалічних структур 3IOC (A5D) та 3IUB ліганд FG2. Модель А - має два сайти зв’язування (по одному в А- та В-ланцюгах). Фармакофорна модель до A5D у ланцюгу А включає два фармакофорних ароматичних вектори (R13 і R15), два вектори акцептори водневого зв’язку (A1 та A4), один донор водневого зв’язку (D9) та один гідрофобний вектор (H11). Б - фармакофорна модель по кристалічній структурі 3IUB ліганд FG2 включає в себе чотири фармакофорні вектори: A1 – акцептор водневого зв’язку, взаємодіє з Gln119, D2 (донор Н зв’язку) – Gln119, D3 (донор Н зв’язку) – Pro133, H4 – гідрофобний вектор залишку Leu114.

На основі віртуального скринінгу фармакофорної моделі по структурі 3IUB ліганд FG2 ми відібрали 455 унікальних структур потенційних інгібіторів. За результатами докінгу до сайтів трьох вказаних лігандів було встановлено, що більшість сполук зв’язуються в ділянках поблизу пептидного ліганду 2B5, тож структура 3LE8 (ліганд 2B5) з урахуванням всіх можливих взаємодій під час докінгу є найбільш вигідною для аналізу.

12 НАЛАШТУВАННЯ БІОХІМІЧНОЇ МЕТОДИКИ СКРИНІНГУ ІНГІБУВАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПЕРСПЕКТИВНИХ СПОЛУК *IN VITRO* ЗГІДНО ОБРАНИХ ПРОТОКОЛІВ

Попередній етап нашого проєкту продемонстрував наявність достатнього різноманіття методик дослідження інгібувальної дії перспективних сполук імідазопиридинового скафолду на ГТФазну активність FtsZ *in vitro*. За 2й етап виконання проєкту було опрацьовано кілька методик вивчення інгібувальної дії досліджуваних сполук на ГТФазну активність FtsZ із метою визначення найоптимальнішої. Причиною цього є значна кількість варіабельних факторів: виробник FtsZ та його концентрація у реакційній суміші (від 1,5 до 20 мкМ); тип буферного агента та pH буферного розчину (Tris-HCl, MES, PIPES, Hepes, MOPS, тощо з рейнжем pH від 6.0 до 7.8); концентрація субстрату GTP; сольовий склад – $MgCl_2$*KCl (із концентраціями 2 – 20 мкМ та 50 – 300 мкМ відповідно) чи MgAc*KAc (із концентраціями 2 – 10 мкМ та 50 – 300 мкМ відповідно); спосіб детекції вивільненого внаслідок реакції гідролізу GTP результуючого неорганічного фосфату (Pi). Неорганічний фосфат було вирішено детектувати за допомогою надчутливого (0,1 – 2,5 нМ концентрації) набору CytoPhos Endpoint Phosphate Kit (BK054, Cytoskeleton Inc., США). Згідно інструкції набору CytoPhos було проведено калібрувальні заміри із стандартом неорганічного фосфату (Рис. 12.1 а):

В першу чергу, було відпрацьовано протокол Sun et al. (2017) [63], згідно якому, FtsZ у концентрації 3,5 мкМ попередньо інкубували з vehicle (1% ДМСО) або з різними концентраціями кожної досліджуваної сполуки у 20 мМ Tris-HCl буфері (pH 7,4, що містив 0,01% тритону X-100, щоб уникнути агрегації сполук) протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім додавали 5 мМ $MgCl_2$ і 200 мМ KCl. Реакцію гідролізу ГТФ FtsZ ініціювалась додаванням 500 мкМ GTP з наступною інкубацією при 37°C впродовж 30 хв. Зупинення реакції здійснювалось додаванням 100 мкл цитофосфорного реагенту

(експозиція 10 хв.). Кількісне визначення неорганічного фосфату здійснювалось фотометрично при 650 нм за допомогою мікропланшетного рідера Multiskan EX (Thermo, США). За результатами відпрацювання методики було відзначено слабку різницю між контролем і зразками, що містили FtsZ, що підтвердило незначну ГТФ-гідроксилазну активність (Рис. 12.1b).

Було вирішено залучити протокол дослідження інгібувальної дії перспективних сполук імідазопиридинового скафолду на ГТФазну активність FtsZ *in vitro* за методом Fung-Yi Chan, 2013 [64], для якого характерно використання більших концентрацій рекомбінантного FtsZ і буферна система на основі 3-морфолінопропансульфонової кислоти (MOPS, pH=6,5).

Активність GTPase на моделі рекомбінантного FtsZ з *S. aureus*, вимірювали у 96-лунковій мікропланшеті за допомогою CytoPhos Biochem Kit (Цитоскелет, США) згідно до оптимізованого протоколу виробника. 7,5 мкМ розчин FtsZ попередньо інкубували з серійним розведенням кожної з досліджуваних сполук у 50 мМ буфері 4-морфолінпропансульфоновій кислотні (MOPS, pH 6,5, 10 хв за 25 °C), з наступним додаванням 5 мМ $MgCl_2$ та 200 мМ KCl. Замість розчину сполуки, контрольні зразки містили 1% ДМСО або етанол. Реакція ініціювалась додаванням 500 мкМ GTP з наступним інкубуванням при 37°C. Термінація реакції здійснювалась через 30 хв. шляхом додаванням 100 мкл реактиву CytoPhos. Через 10 хвилин інкубації неорганічний фосфат був кількісно визначений шляхом вимірювання поглинання при 650 нм за допомогою мікропланшетного рідера Multiskan EX (Thermo, США).

Проте, як показав результат відпрацювання методики дослідження інгібувальної дії перспективних сполук імідазопиридинового скафолду на ГТФазну активність FtsZ *in vitro* за Fung-Yi Chan, 2013 [64], різниця між контролем і зразками зросла, проте об’єктивно, залишалась недостатньою (Рис. 12.1c1).

Виходячи з вищезазначеного, увагу було зфокусовано на рекомендації з інструкції виробника рекомбінантного FtsZ з *S. aureus* (FTZ02-A, Cytoskeleton Inc., США).

У інструкції від виробника було позначено, що їх продукт є дуже чутливим до іонного складу буферного розчину, та цілком імовірно, що іони Cl^- у складі сольового буферу можуть пригнічувати природню активність як полімеризації рекомбінантного FtsZ *S. aureus*, так і його гідроксилазну активність. Тому було вирішено замінити хлорид на ацетат йони із рекомендованими концентраціями.

Загалом, було запропоновано 5 буферів для роботи з їх продуктом:

Buffer 1: 50mM MES-KOH pH 6.5, 50mM KCl, 5mM MgCl2.

Buffer 2: 50mM Hepes-KOH pH 6.8, 250mM KCl, 5mM Mg acetate.

Buffer 3: 50mM Hepes-KOH pH 7.5, 300mM K-acetate, 5mM Mg acetate.

Buffer 4: 50mM Hepes-KOH pH 7.5, 100mM K-glutamate, 300mM K-acetate, 5mM Mg-acetate, 20% Ficoll 70K.

Buffer 5: 50mM PIPES-KOH pH 6.8, 250mM KCl, 5mM Mg acetate.

Таким чином, спробувавши різні комбінації буферних компонентів, стало очевидним, що контрольні зразки із базальним рівнем активності рекомбінантного FtsZ з *S. aureus*, де у складі реакційної суміші був наявний *Buffer 3 (50mM Hepes-KOH pH 7.5, 300mM K-acetate, 5mM Mg acetate),* виявляли найбільшу гідроксилазну активність та виявляли найінтенсивніше забарвлення CytoPhos реактиву під час вимірів, порівняно із іншими варіантами сольового складу (Рис. 12.1c2).

Слід відмітити, що вміст фосфатів у домішках реагенту калій ацетату викликав появу незначного фону, рівно як і реагент GTP. То ж також була проведена робота по оптимізації робочих концентрацій згаданих компонентів реакційної суміші, із урахуванням найоптимальнішої функціональної активності рекомбінантного FtsZ.

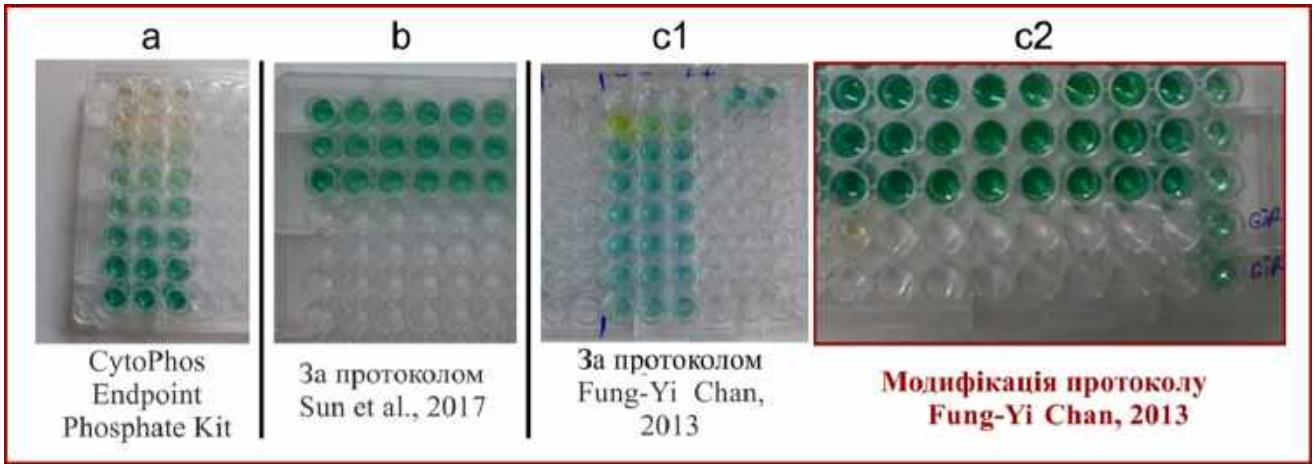


Рисунок 12.1 - Відпрацювання протоколу детекції ГТФ-гідроксилазної активності FtsZ на прикладі рекомбінантного FtsZ білку з *S. aureus*:

a - за допомогою набору CytoPhos Endpoint Phosphate Kit (BK054, Cytoskeleton Inc., США). Згідно протоколу виробника;

b - за методом Sun et al. (2017);

c1 - за стандартним методом Fung-Yi & Chan, 2013 [64];

c2- ОПТІМАЛЬНИЙ ПРОТОКОЛ. Модифікованний метод Fung-Yi & Chan, 2013 з врахуванням рекомендацій виробника рекомбінантного FtsZ білку.

То ж, за результатами роботи по оптимізації було отримано наступну модифікацію методики [64]: ГТФазну активність рекомбінантного FtsZ вимірювали на 96-лунковій мікропланшеті за допомогою CytoPhos Endpoint Phosphate Kit (BK054, Cytoskeleton Inc., США) згідно до оптимізованого протоколу на основі даних виробника інструкції. 7,5 мкМ FtsZ попередньо інкубували з серійними розведеннями кожної досліджуваної сполуки (1, 10 та 100 мкг/мл) у буфері, який містив 50 мМ 4-морфолінпропансульфону кислоту (MOPS, pH 6,5, 10 хв при 25°C). Контрольні проби проводили з 1% ДМСО чи абсолютизованим етанолом замість розчину сполуки. Після інкубації додавали 5 мМ MgAc та 250 мМ KAc. Реакцію полімеризації FtsZ із подальшим

гідролізом GTP розпочинали з додавання 500 мкМ GTP (10106399001, Roche, Німеччина) та інкубували 30 хв. при 37°C. Реакція зупинялась додаванням 140 мкл CytoPhos. Через 10 хвилин інкубації кількість неорганічного фосфату визначалась шляхом фотометрії (650 нм). Дослідження виконувалось тричі. Наведені репрезентативні графіки відображають відсоток інгібування ГТФазної активності FtsZ у залежності від концентрації досліджуваних сполук.

Маючи досвід роботи із дослідження властивостей скаффолда сполук у якості інгібіторів ГТФазної активності рекомбінантного протеїну FtsZ *S. aureus*, нами було оптимізовано й налагоджено методику дослідження інгібувальних властивостей іншого скаффолда сполук, які згідно нашим біоінформаційним даним мали потенціал інгібування щодо ГТФазної активності рекомбінантного протеїну FtsZ M.tuberculosis. Так, за основу методики було обрано протокол за публікацією Sridevi et al., 2017 [65]. Згідно цього протоколу ГТФазну активність рекомбінантного протеїну FtsZ *M. tuberculosis* вимірювали за кількістю вивільнених в результаті гідролізу фосфатних залишків у 96-лункових мікропланшетах за допомогою реагенту малахітового зеленого. За цим методом, 6 мкМ рекомбінантного FtsZ попередньо інкубували з контролем розведення (1% ДМСО) або різними концентраціями кожної досліджуваної сполуки у буфері MOPS (50 мМ MOPS pH 7,2, 5 мМ $MgCl_2$, 200 мМ KCl) за кімнатної температури. Реакцію починали із додавання до реакційної суміші 500 мкМ GTP та інкубували при 37°C. Через 15 хв реакцію зупиняли та додавали малахітовий реагент (BIOMOL R Green reagent, Enzo Life Sciences, USA). Неорганічний фосфат кількісно визначали шляхом вимірювання поглинання за 650 нм за допомогою зчитувача для мікропланшетів Specord 210 (Analytik Jena, Німеччина). Стандартну криву готували з чистим KH2PO4.

Виробник рекомбінантного протеїну FtsZ *M. tuberculosis* (Рис. 12.2), який ми використовували у експерименті (MBS1174701, MyBioSource, USA),

надіслав протеїн у ліофілізованому вигляді, містивши наважку Tris та NaCl із розрахунком розведення у 1 мл дист. H_2O (pH=8).

Рисунок 12.2 - Рекомбінантний FtsZ *M.tuberculosis*

Проте, для дослідження ГТФазної активності рекомбінантного протеїну FtsZ саме *M. tuberculosis*, за даними літератури, найоптимальнішим був діапазон pH=6,5–7,2 (Рис. 12.3). Таким чином, дослідивши основні властивості отриманого комерційного рекомбінантного протеїну та умови його використання, було прийняте рішення про розведення протеїну у 500 мкл дист. H_2O із розрахунком еквімолярних співвідношень буферного агенту MOPS та Tris, який містився у ліофілізаті таким чином, щоб кінцева pH=7. Також, щоб зняти напруження реакційної суміші надлишком хлорид аніонів, було вирішено використовувати ацетат магнію, замість магній хлориду. До того ж, у зв’язку із добре зарекомендованого на попередньому етапі методу визначення результуючої концентрації фосфатів за допомогою CytoPhos Endpoint Phosphate Kit (BK054, Cytoskeleton Inc., США), було вирішено використовувати саме його замість малахітового реагенту за умови зменшення концентрації рекомбінантного протеїну FtsZ M. tuberculosis з 6 мкМ до 3,5

мкМ у реакційній суміші, продовживши реакційний час інкубації до 30 хв. Таким чином, загальний вигляд оптимізованого протоколу виглядав наступним чином. Дослідження інгібування ГТФазної активності рекомбінантного FtsZ M. tuberculosis (MBS1174701, MyBioSource, USA) проводилася у 96-лункових мікропланшетах із використанням CytoPhos phosphate assay Biochem Kit (Cytoskeleton, США) згідно з оптимізованою нами методикою на основі Sridevi et al., 2017 [65]. Так, 3,5 мкМ рекомбінантного FtsZ M. tuberculosis попередньо преінкубували з контролем розведення (1% ДМСО) або різними концентраціями кожної досліджуваної сполуки у буфері MOPS (50 мМ MOPS, pH=6,5, 5 мМ $Mg(CH_3COO)_2$, 200 мМ KCl) за кімнатної температури.

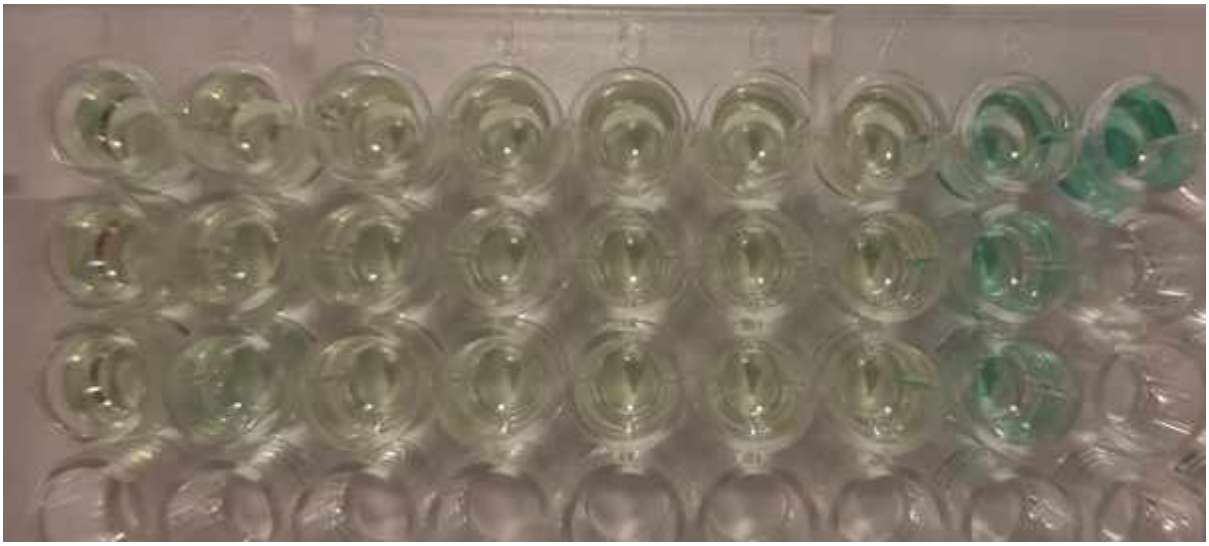


Рисунок 12.3 - Оптимізація та валідація методу дослідження інгібування ГТФазної активності рекомбінантного протеїну FtsZ *M. tuberculosis*.

Реакцію починали додаванням 500 мкМ GTP, після чого інкубували за 37°C. Через 30 хв реакцію припиняли додаванням 140 мкл реагенту Cytophos Endpoint Phosphate (у пропорції 3/7) у кожну лунку та витримували у темному місці протягом 10 хв. Неорганічний фосфат кількісно визначали шляхом вимірювання поглинання за 650 нм за допомогою мікропланшетного рідера Specord 210 (Analytik Jena, Німеччина). Стандартну криву готували з чистим KH_2PO_4.

Ще одним рекомбінантним протеїном *M. tuberculosis*, дослідження інгібування ензиматичної активності якого in vitro стало реальним у межах нашого проєкту, виявився ензим ***О-ацетилсеринсульфгідрилаза (CysK1).*** Дослідивши основні літературні джерела на предмет найбільш оптимальної методики для скринінгу потенційних інгібіторів ензиматичної активності О-ацетилсеринсульфгідрилази, вирішили використати метод Droux et al., 1992 [66] із власними модифікаціями.

Активність вимірювали в об'ємі 0,1 мл, що містив 50 мМ Трис-HCl (pH=7,5), 5 мМ DTT, 10 мМ О-ацетилсерину, 1 мМ сульфіду натрію (Na_2S) та 0,2 мг*мл$^{-1}$ рекомбінантного ензиму О-ацетилсеринсульфгідрилази (MBS1003730, MyBioSource, USA). Реакцію ініціювали додаванням сульфіду натрію. Після інкубації за 25°C протягом 5 хв реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 20% ТХА (мас./об.), після чого осад преципітованих протеїнів видаляли центрифугуванням за 15 000 g протягом 2 хв. Супернатант переносили в скляну пробірку, що містила 100 мкл концентрованої оцтової кислоти і 200 мкл реагенту нінгідрину (250 мг нінгідрину, розчиненого у 10 мл концентрованої оцтової кислоти/концентрованої HCl, у пропорції 60/40 об./об.). Суміш кип’ятили 10 хв, потім швидко охолоджували перед додаванням 600 мкл 95% (об/об) етанолу (22). Цистеїн визначали шляхом вимірювання поглинання реакційної суміші за 560 нм (коефіцієнт екстинкції = 25 000 М$^{-1}$*см$^{-1}$), адаптувавши під це 96-лунковий планшет та використовуючи мікропланшетний рідер Specord 210 (Analytik Jena, Німеччина). Одна одиниця активності відповідає кількості ферменту, який каталізував утворення 1 мкмоля L-цистеїну за хвилину. Свіжі розчини О-ацетилсерину готували безпосередньо перед використанням шляхом розчинення спочатку у воді, а потім доводячи до pH=7,0 за допомогою Tris-HCl 1 М, pH 7,5, до кінцевої концентрації 200 мМ. Такий спосіб приготування запобігає швидкому хімічному зсуву від 0 до N-ацетилу, який може легко відбуватися вище pH=7,5.

Розчин сульфіду натрію готували розчиненням сухого Na_2S у 0,05 N NaOH. Концентрацію сульфіду становила приблизно 20 мМ. Маточні стоки зберігали аліквотами на -20°С. Результати модифікації методу наведені на рисунку 12.4.

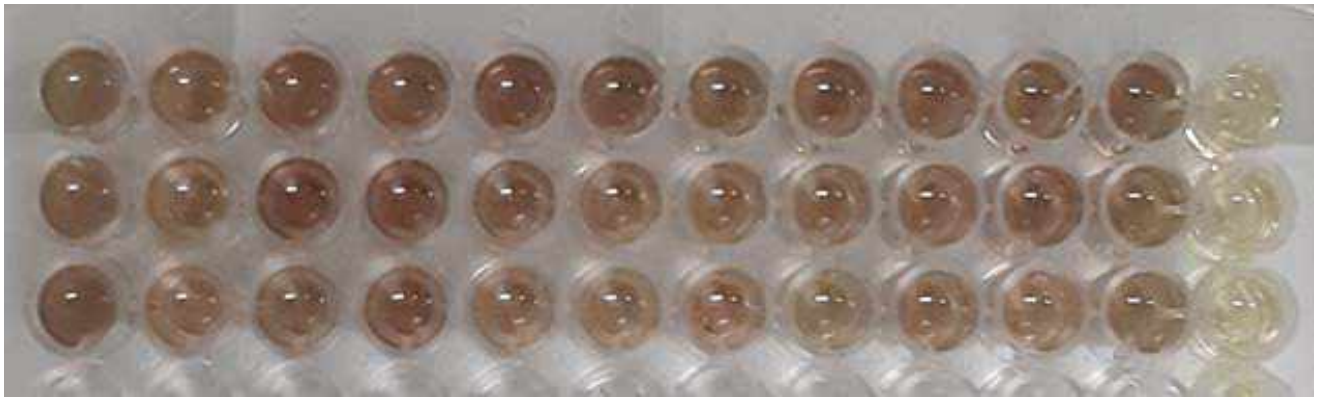


Рисунок 12.4 - Оптимізація та валідація методу дослідження інгібування О-ацетилсеринсульфгідрилазної активності рекомбінантного ензиму *CysK1 M. tuberculosis.*

13 ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ 3-Х ХІМІЧНИХ СПОЛУК ЩОДО ВАКЦИННОГО ШТАМУ *M. BOVIS*; ПРОВЕДЕННЯ РОБОТИ ПО ВИДІЛЕННЮ ПОЛЬОВОГО ШТАМУ *M. BOVIS* В ЗОВНІШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ (ГРУНТ, ВОДА) ЗА ДОПОМОГО МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО МЕТОДУ. ВИВЧЕННЯ ЕПІДЕМІЧНОЇ СИТУАЦІЇ З ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЗА ПЕРІОД 2001-2010 РР.

Дослідження протимікробної дії 3-5 хімічних сполук на вакцинний штам *M. bovis.* Для проведення аналізу протимікробної дії на вакцинному штамі *M. bovis* було досліджено 3 хімічні сполуки, мішенню яких є FtsZ мікобактерій, що були підібрані біоінформатичним шляхом. Дослідження проводили в діапазоні концентрацій 40 мкг/мл, 8 мкг/мл, 1,6 мкг/мл 0,32 мкг/мл.

Аналіз результатів протимікробної дії досліджуваних речовин проводили через 5 тижнів після посіву. Для приготування інокулюму вакцинного штаму *M. bovis* використовували культуру в активній фазі росту (2-3 тижні). У табл. 13.1 наведені дані щодо протимікробних властивостей досліджуваних речовин.

Таблиця 13.1. Результати дослідження інгібуючих властивостей 3 хімічних речовин мішенню яких є FtsZ мікобактерій

П/п	Код речовини	Мішень	Концентрація досліджуваної речовини в середовищі Левенштейна-Єнсена, n=3			
			40 мкг/мл	8 мкг/мл	1,6 мкг/мл	0,32 мкг/мл
1	G201-1765	FtsZ	>20 КУО*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
2	KS13384	FtsZ	**Поодинокі колонії (<20 КУО)**	**Поодинокі колонії (< 20 КУО)**	>20 КУО	>20 КУО
3	KS26817	FtsZ	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
4	Контроль (без додавання речовини)		Інтенсивний ріст культури вакцинного штаму *M. bovis* (>20 КУО)			

В результаті скринінгу досліджуваних хімічних сполук встановлено значну інгібуючу дію речовини KS13384 щодо вакцинного штаму *M. bovis* в діапазоні концентрацій від 8 мкг/мл до 40 мкг/мл, при яких відмічали ріст культури вакцинного штаму у вигляді поодиноких колоній.

Проведення роботи по виділенню польового штаму *Mycobacterium bovis* за допомогою мікробіологічного та молекулярно-генетичного методів (відбір зрізків та закладання посівів). Оскільки у попередньому етапі проєкту (пункт 8) спроба виділити польовий штам була невдалою, проведено відбір зразків із навколишнього середовища у іншому господарстві, яке у 2005 році також було неблагополучне щодо туберкульозу великої рогатої худоби. Відбір зразків здійснювали у одноразові пластикові контейнери у кількості 30 – 50 гр. Проведено відбір 7 зразків. Підготовку зразків здійснювали відповідно до посібників «Методы почвенной микробиологии и биохимии» [47] та «Практикум по микробиологии» [48]. Посів відібраних зразків проводили на середовище Левенштейна-Єнсена. Інкубація зразків відбуваються при температурі + 37 °С. Перегляд посівів здійснювали кожні 72 години інкубування. На рис. 13.1 показано відібрані проби та закладання посівів відібраних зразків навколишнього для виділення польового штаму *M. bovis.*

Рисунок 13.1 – Посіви відібраних зразків із об’єктів навколишнього середовища на середовище Левенштейна-Єнсена.

Вивчення епідемічної ситуації з туберкульозу за період 2001-2010 р.р. Епідемічна ситуація з туберкульозу в Україні протягом 2001-2010 р. р. відзначалася значним поширенням. Щороку кількісні показники істотно змінювалися.

Так у 2001 р. захворюваність на туберкульоз становила 68,6 випадків на 100 тис. населення, і повідомлялося, що цей показник збільшився порівняно із 2000 р. В 2003 р. захворюваність відмічалася на рівні 75,6 осіб на 100 тис. населення. У 2003 р. цей показник зріс до 77,5. Аналогічна тенденція відмічалася і в 2004 р. – 80,9 осіб на 100 тис. населення, цього року виявлено 38403 нових випадки захворювання. У 2005 р. реєстрували найвищий рівень захворюваності – 84,1 випадків на 100 тис. населення а смертність становила 25,8 на 100 тис. населення.

У наступні роки відмічалась тенденція до поступового зниження показників захворюваності. Наприклад, у 2007 р. захворюваність становила 79,8, а смертність 22,6 на 100 тис. населення. У цьому ж році було вперше виявлено 37095 ТБ- позитивних осіб, з яких 10506 осіб померли.

У 2010 р. статистичні показники склали: захворюваності - 68,4 на 100 тис. населення, поширення – 171,4, а смертність – 16,8 на 100 тис. населення. З загального пулу хворих, 16 % мали підтверджену форму мультирезистентного туберкульозу. Протягом 2001-2010 р. р. смертність від туберкульозу знизилася з 22,2 до 16,8 на 100 тис. населення. Щоб уявити масштаб хвороби, наводимо дані стосовно кількості хворих на активний туберкульоз в Україні за період з 2006 по 2010 р.р. (табл. 13.2).

Щодо поширення захворювання у різних регіонах, то протягом періоду досліджень ця хвороба реєструвалася у всіх областях без виключення. Найбільша кількість хворих зареєстрована у Херсонській, Миколаївській, Одеській, Луганській та Донецькій областях. Найнижчі показники захворюваності виявлено у м. Києві, Волинській, Тернопільській, Хмельницькій, Харківській та Вінницькій областях. З цих даних можна

зробити узагальнення про більшу поширеність туберкульозу людей у Південно-Східних регіонах України та меншу у Північно-Західних.

Таблиця 13.2 - Офіційні дані стосовно кількості хворих на активний туберкульоз в Україні за період з 2006 по 2010 р.р.

Рік дослідження	**Кількість хворих осіб на активний туберкульоз**
2006	99247
2007	93195
2008	88785
2009	83990
2010	75653

Як видно з вище представленої таблиці, за п’ять років кількість хворих зменшилася на 23594 особи. Отже, за проаналізований період кількість кількість людей, що хворіють на туберкульоз в Україні зменшилася на 23,8 %.

14 СИНТЕЗ ВІРТУАЛЬНИХ СПОЛУК З НАЙБІЛЬШ ЕФЕКТИВНИМИ КОЕФІЦІЄНТАМИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ

Перший запланований хімічний скринінг був проведений для FtsZ мішені. Аналіз літературних даних показав найбільш перспективні на цей час напрямки побудови молекул (Рис. 14.1).

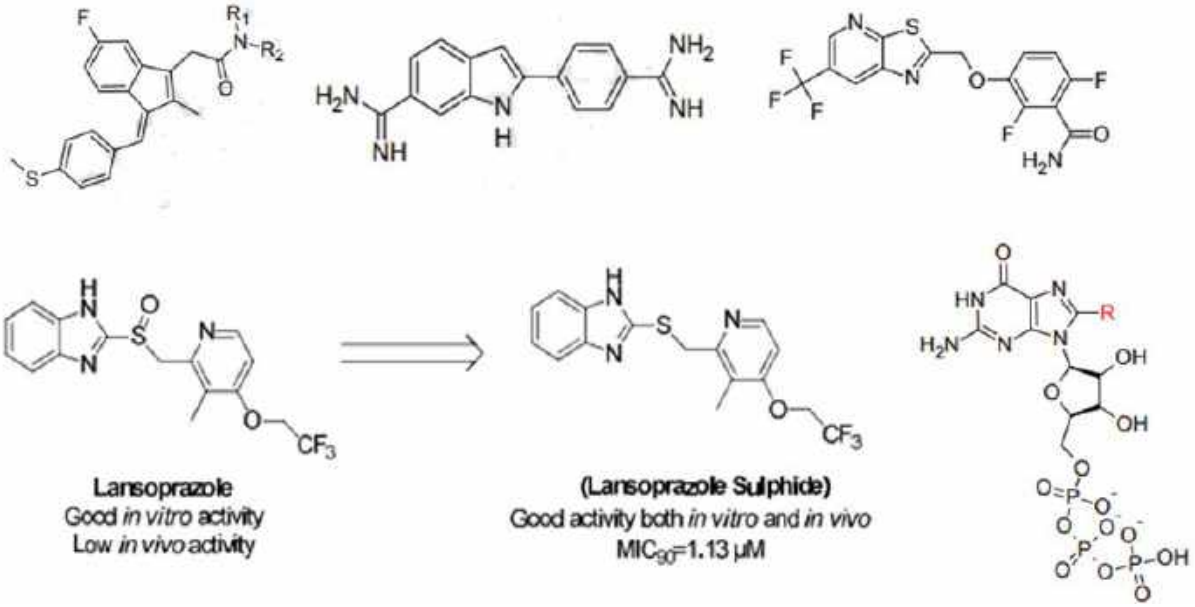


Рисунок 14.1 - Головні інгібітори FtsZ -білків з підтвердженою активністю.

Також перспективним скафолдом є синтезований Remuiñán tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine та його похідні (Рис.14.2).

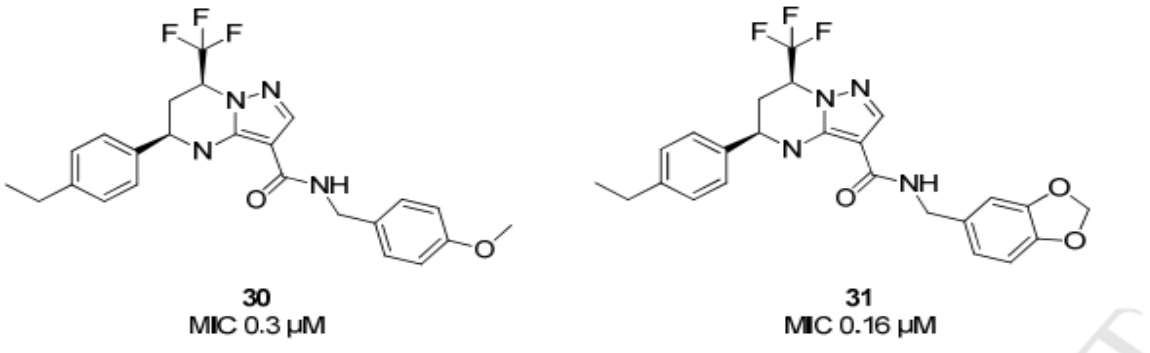
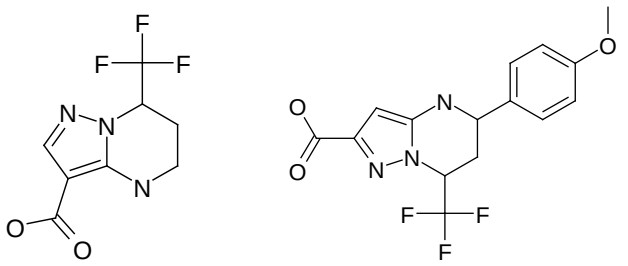


Рисунок 14.2 – 2Д-структури похідних tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine.

На основі вказаних опорних структур було перевірено синтез таких похідних та напрацьовані дві відповідні кислоти, які ми можемо модифікувати в один крок, що дозволило дослідити, яким чином буде впливати на активність зміна положення карбоксильної групи у піразольній частині (Рис. 14.3).



EN300-1073102 EN300-230269

Рисунок14.3 – Приклад синтезованих структур на основі піримідинового скафолду.

Дуже перспективний, з нашої точки зору є імідазопиридиновий скафолд [67] в якому дуже велику роль відіграває замістник в амідній частині (Рис.14.4). Слід відмітити що за результатом докінгу ці сполуки показують найкращій результат оціночних функцій.

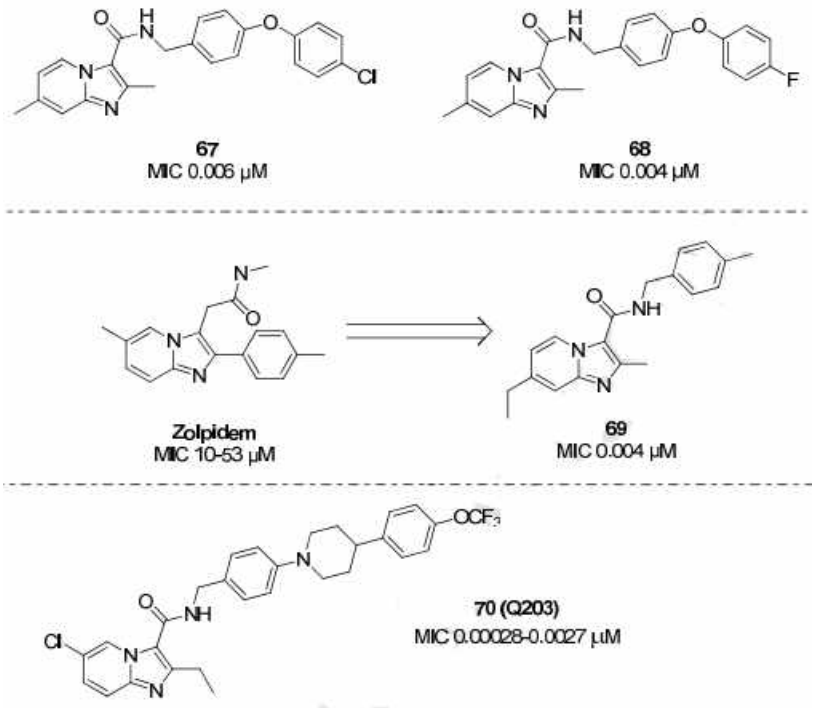
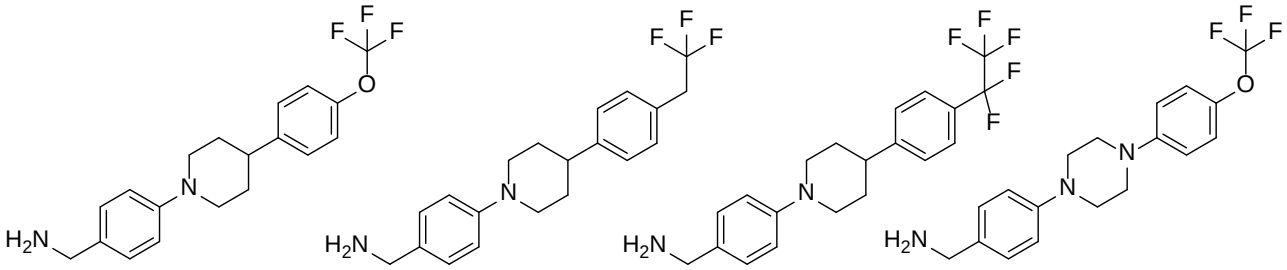


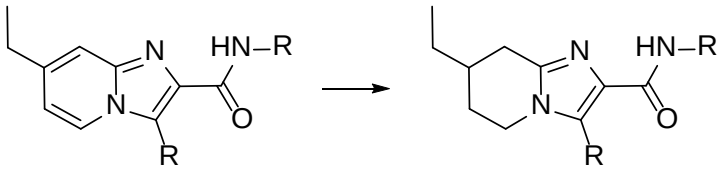
Рисунок14.4 – Приклад синтезу похідних імідазопиридинового скафолду.

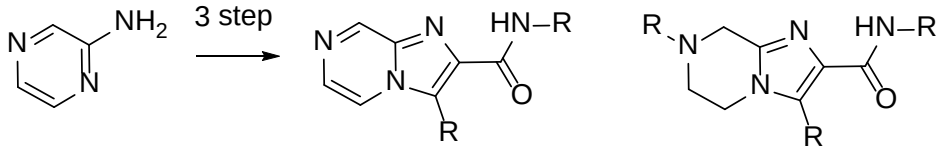
Дуже великий вплив на активність відіграє амін, тому синтетична робота по оптимізації цього скафолду буде складатися з двох частин:

1) Синтез нових аналогів піперидину з метою пошуку ще більш активного фармакофора амідної частки:

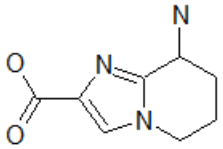


2) Модифікація імідазопиридиної частки молекули, в тому числі відновлення її у більш дінамічну 3d-структуру:

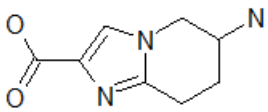




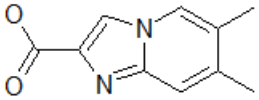
На данний час вже отримані деякі вихідні для їх синтезу:



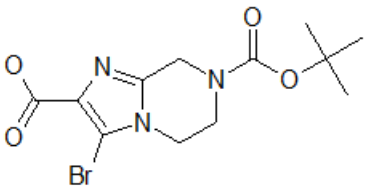
0722-823



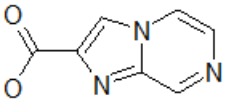
0732-548



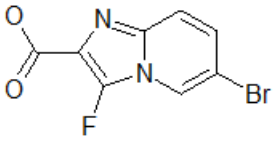
0752-195



0812-778



182-334



0492-155

Тіж самі аміни було використано для тіазолоімідазольного скафолду з вже синтезованих кислот бо як свідчать літературні джерела [68] вони не менш привабливі для даних мішеней (Рис.14.6).

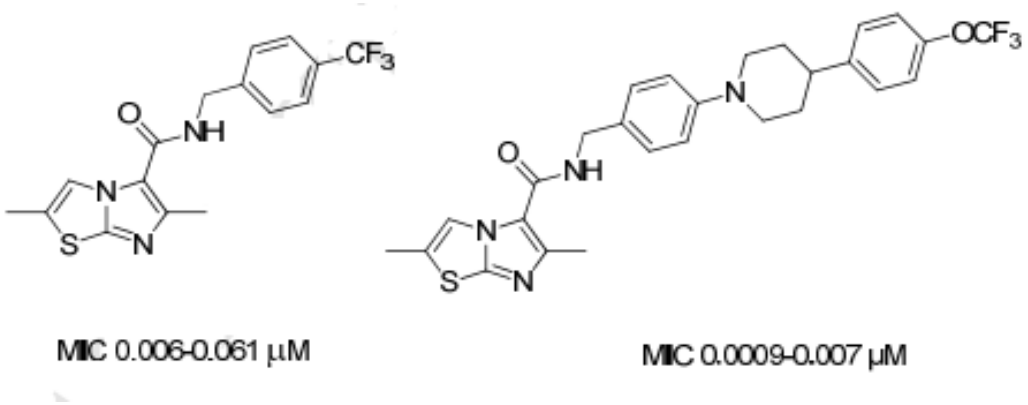


Рисунок 14.5 – Приклад синтезованих сполук на основі тіазолоімідазольного скаффолду.

Наступним кроком було проведено дослідження обох типів скаффолдів: ковалентного типу дії та PPi взаємодії. За допомогою докінгу та молекулярної механікі було відібрано 186 шт скрінінгових сполук з 2,5 млн, що надані компаніями ІФЛАБ, Єнамін та Укрооргсинтез. Наступні дослідження дозволили відібрати 68 сполук, які за розрахунками мають найбільшу енергію зв’язування з нашим лігандом та мають скафолди, які є найбільш перспективними для дії на цю мішень. З встановлених скаффолдів було відкинуто сполуки з поганою розчинністю та відібрано невеликий сет сполук для первинного скринінгу на FtsZ мішень, при чому упор був зроблений на максимальне різноманіття скафолдів з цих 68 молекул, а не на відбір з найбільшим докінг рейтингом.

15 ПРОВЕДЕННЯ БІОХІМІЧНОГО СКРИНІНГУ ІНГІБУВАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ 1-Ї ПАНЕЛІ ПЕРСПЕКТИВНИХ СПОЛУК *IN VITRO* ЗГІДНО ОБРАНИХ ПРОТОКОЛІВ

Для вивчення інгібувальних ефектів ГТФазної активності рекомбінантного протеїну FtsZ *M.tuberculosis* було використано 10 сполук, з яких тільки 7 мали відчутний інгібувальний ефект на згадану реакцію у частині 11 звіту. Для оптимізації реакцій у часі нами було використано модифікацію із 96-лунковим планшетом на вимірюванням на мікропланшетному рідері. Згідно графіку (Рис. 15.1) найбільш перспективними інгібіторами ГТФазної активності рекомбінантного FtsZ *M. tuberculosis*, відповідно і полімеризації FtsZ у мікротрубочки, стали сполуки Z65190667 та Z1574680729, найвищий рівень інгібування від яких спостерігався у всіх 3х досліджуваних концентраціях: 1 мкг/мл, 10 мкг/мл та 100 мкг/мл.

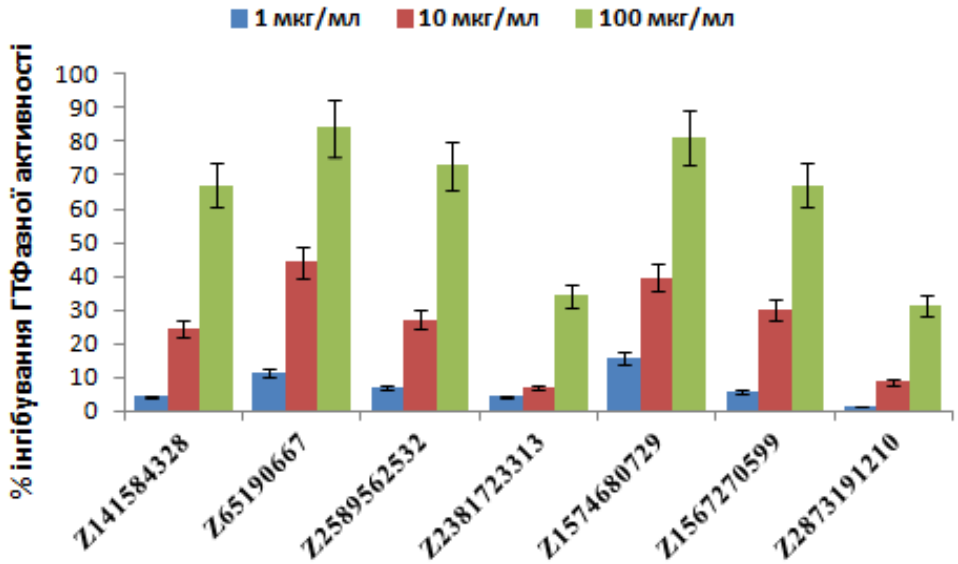


Рисунок 15.1 - Дослідження ефективності сполук на основі імідазопиридинового скафолду проти FtsZ *M.tuberculosis in vitro.*

З менш вираженою ефективністю проявляли свої інгібувальні властивості сполуки Z1567270599, Z2589562532 та Z141584328. І нарешті, з найменш вираженою ефективністю інгібували ГТФазну активність рекомбінантного протеїну FtsZ *M.tuberculosis* сполуки Z2381723313 та Z2873191210.

16 ADMET ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ СПОЛУК- КАНДИДАТІВ. НА ОСНОВІ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДАНИХ, У РАЗІ ВИСОКОЇ ТОКСИЧНОСТІ, СИНТЕЗ-ОПТИМІЗАЦІЯ СТРУКТУРИ ЛІДЕРІВ. ВІРТУАЛЬНИЙ ВИСОКО-ПРОПУСКНИЙ СКРИНІНГ

На попередніх етапах роботи, з бази даних ChEMBL було відібрано речовини, що взаємодіють з протеомом *Mycobacterium tuberculosis*. Первинна бібліотека була скорочена до групи лігандів, що утворюють комплекси з цільовими мішенями проєкту. Оскільки нові інгібітори будуть розроблені на основі відомих опорних сполук, передбачається, що механізми їх зв'язування будуть аналогічним. Це вимагало проведення додаткового дослідження токсичності опорних речовин для клітин ссавців з метою редагування обмежень відбору хітів віртуального скринінгу.

Для цього нами було отримано всі ADME-дескриптори, що характеризують основні властивості активних сполук опорної групи. Зокрема: ліпофільність, розмір, полярність, розчинність, насичення та гнучкість за допомогою серверу SwissADME. Відібрані сполуки також оцінювались на здатність проникати через гемато-енцефалічний бар'єр (ГЕБ), адсорбуватися через шлунково-кишковий тракт (ШКТ), чи є сполука P-gp субстратом (що показує, чи може сполука виводитися з організму), чи є токсичність, тощо. Особлива увага приділялася здатності адсорбуватися через ШКТ та токсичності. Інші показники у списках сполук не мали значної кореляції, проте окремі сполуки мали показники, що не відповідали нормальному розподіленню.

В результаті аналізу з первинного сету сполук тестового докінгу, були обрані лише ті, що відповідають за трьома показниками: P-gp субстрат, адсорбція (HIA), токсичність (за PAINS структурними фільтрами). Це дозволило сформувати правила фільтрації для потенційних інгібіторів

розроблених на основі молекулярного моделювання. Узагальнена статистика скринінгу наведена в Таблиці 16.1.

Таблиця 16.1 - Результати ADMET-ранжування інгібіторів досліджуваних ферментів мікобактерії з залученням експериментально-підтверджених порогів активності.

Фермент мікобактерії	Кількість структур лігандів, депонованих в ChEMBL*	Кількість лігандів відсіяних за показниками: P-gp субстрат, адсорбція (HIA) і токсичність (PAINS)	Кількість лігандів, що залишились після відсіювання
Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA)	158	100 (*63,29%*)	58
Isocitrate lyase	110	101 (*91,8%*)	9
Decaprenylphosph-beta-D-ribose oxidase	110	93 (*84,54%*)	17
dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (rmlC)	10	2 (*20%*)	8
Enoyl reductase	9	3 (*33,33%*)	6
O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1)	131	131 (*100%*)	0
Pantothenate synthetase (PanC)	188	149 (*79,25%*)	39
PLP-dependent transaminase (BioA)	298	138 (*46,3%*)	160
Serine/treonine protein kinases (STPKs, pknA)	24	14 (*58,33%*)	10
Fatty acyl-AMP ligases (FAAL)	159	84 (*52,83%*)	75
N-acetylglucos-1-phosph uridyltransferase (WecA)	4	4 (*100%*)	0
Shikimate kinase (AroK1)	15	11 (*73,33%*)	4
Beta-lactamase (blaC)	312	260 (*83,33%*)	52

* - без врахування неактивних сполук та повторів.

Отримані дані передбачають, що на рівні організму пацієнта, відібрані потенційні протитуберкульозні ліки будуть здатні досягти своєї молекулярної мішені в достатній концентрації, досить/достатньо тривалий час перебувати в клітині у біоактивній формі, що є необхідною умовою факту цільової біологічні події. Таким чином, розроблені комп’ютерні моделі є достатньо

наближеною альтернативою повноцінного лабораторного скринінгу (Рис. 16.1).

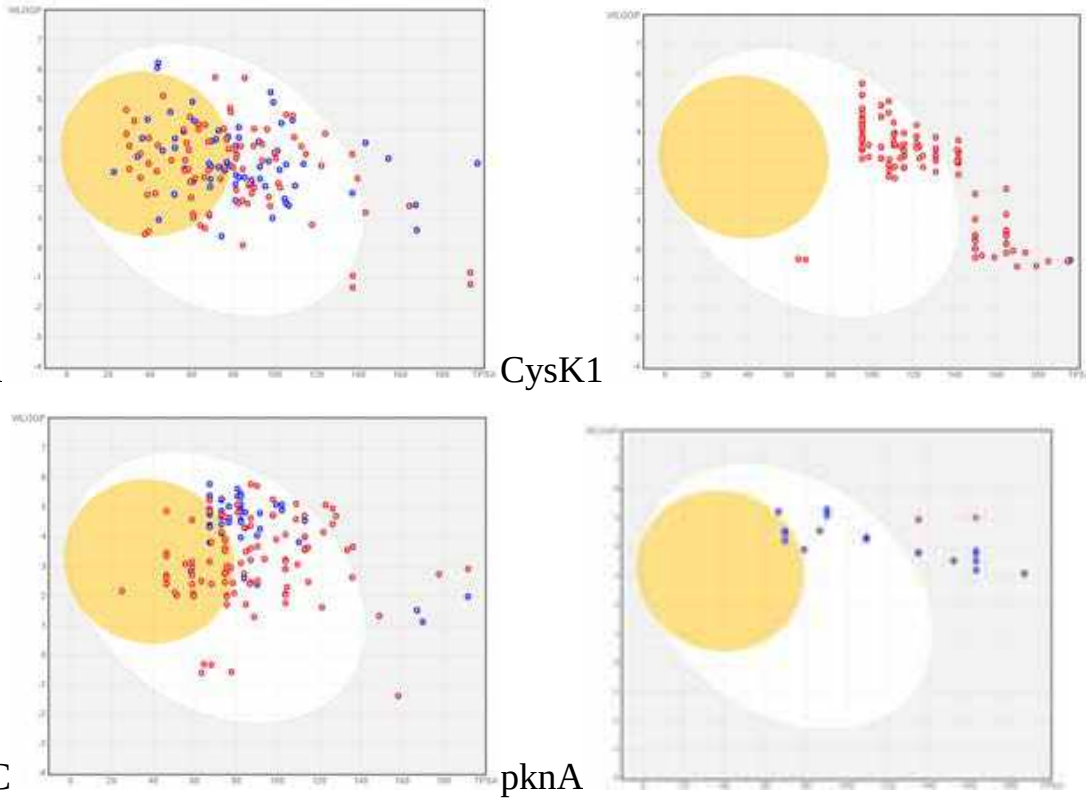


Рисунок 16.1 - Приклад результатів кореляції параметрів на основі моделей BOILED-Egg, отриманих за допомогою серверу SwissADME для ферментів *M. tuberculosis*. Примітки: жовтим - відмічено сполуки, що проходять гемато-енцефалічний бар'єр (ГЕБ), білим - адсорбуватися через шлунково-кишковий тракт (ШКТ), синіми та червоними кульками - чи є сполука P-gp субстратом, що показує, чи може сполука виводитися з організму (синіми - PGP+ та червоними PGP-).

Оскільки на актуальному етапі дослідження ми маємо великий пул сполук, але доступ до фізичних зразків та ряду експериментальних методик обмежений, аналіз ADMET дозволяє нам спрогнозувати і оцінити показники поглинання, розподілу речовини, метаболізму та виведення потенційних інгібіторів, а також відсортувати наступні результати віртуального скринінгу.

На основі токсикологічних даних та первинних даних скринінгу було знайдено повне інгібування у випадку 13 речовин *in vivo* на вакцинний штам BCG методом ПЛР та 13 сполук *in vitro* на FtsZ *S. aureus* з 186, які були запропоновані за результатами докінгу та після фільтрації за ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, Toxicity) параметрами (Рис. 16.2).

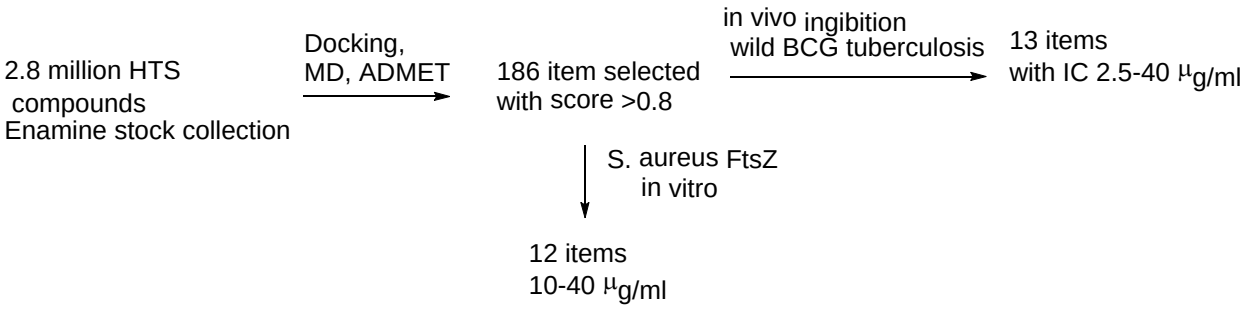
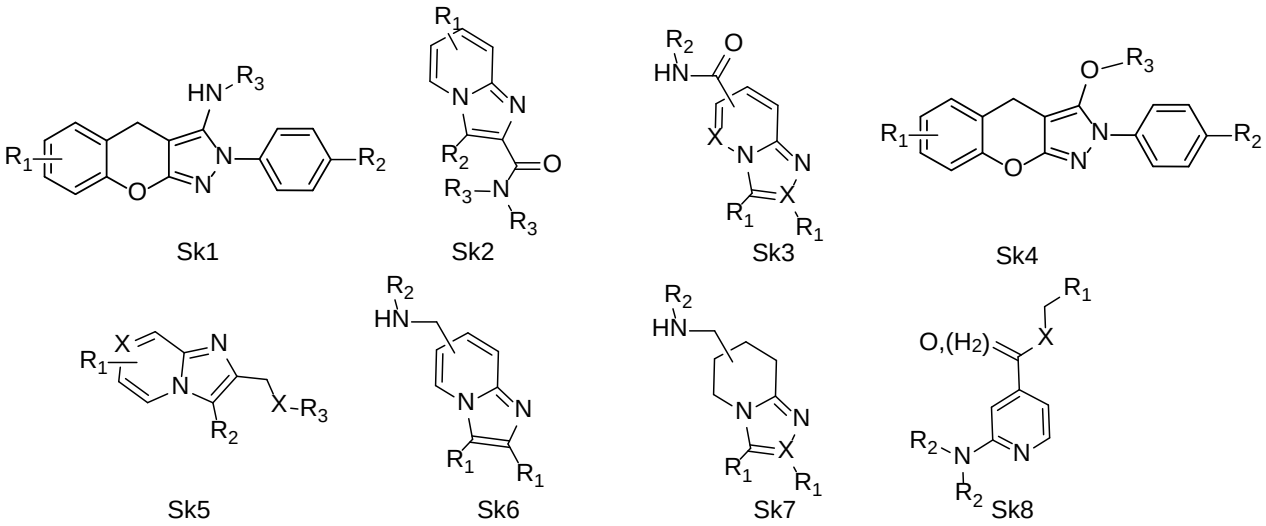


Рисунок 16.2 - Схема отримання найактивних сполук на штам BCG методом для подалбшої лід оптимізації

Аналізуючи отриманні данні ми виділили наступні перспективні скафолди для наступної лід-оптимізації:



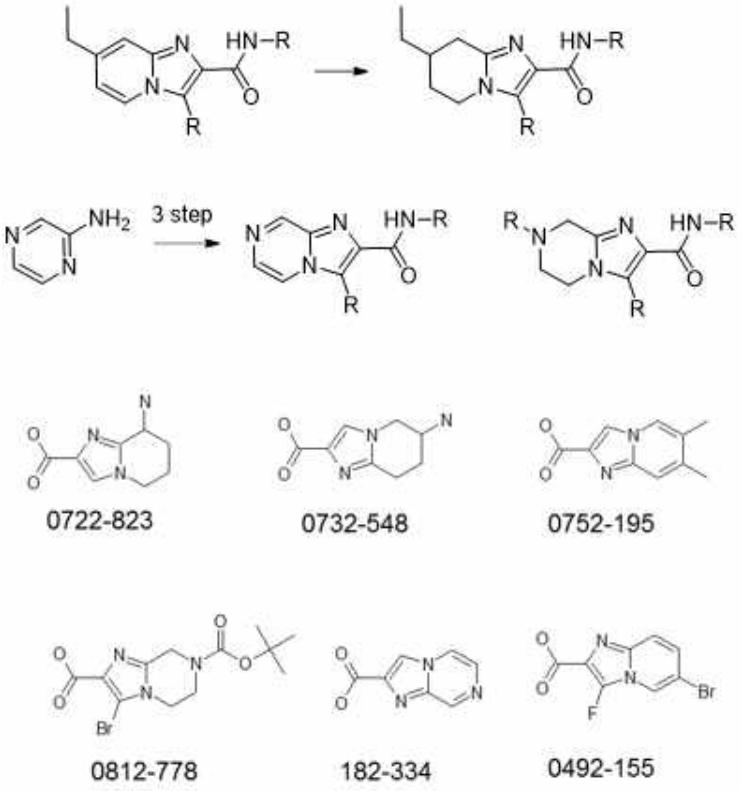
Чому саме ці скафолди:

- По-перше, деякі з них майже не представлені в літературі. Щодо Sk5-7, то зустрічаються тільки дані з патентів, що каже про незначну вивченість цих похідних, а Sk1,4 є нашою розробкою, яка ще не

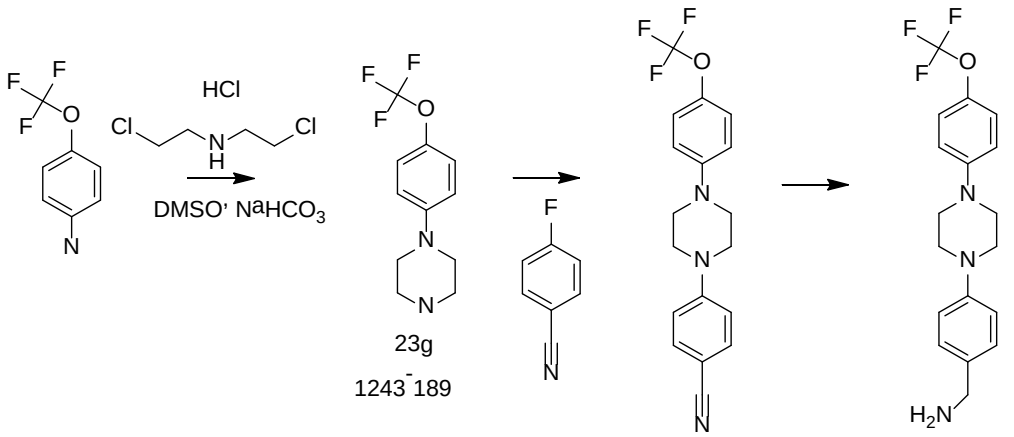
описана в літературі,. Ці скафолди можуть бути запатентовані як інтелектуальна власність в рамках проєкту.

- По-друге, вони показали гарну активність на первинному скринінгу, а також на штам BCG *in vivo* так і на *S. aureus FtsZ in vitro,* тому такі скафолди заслуговують на більш детальне вивчення.

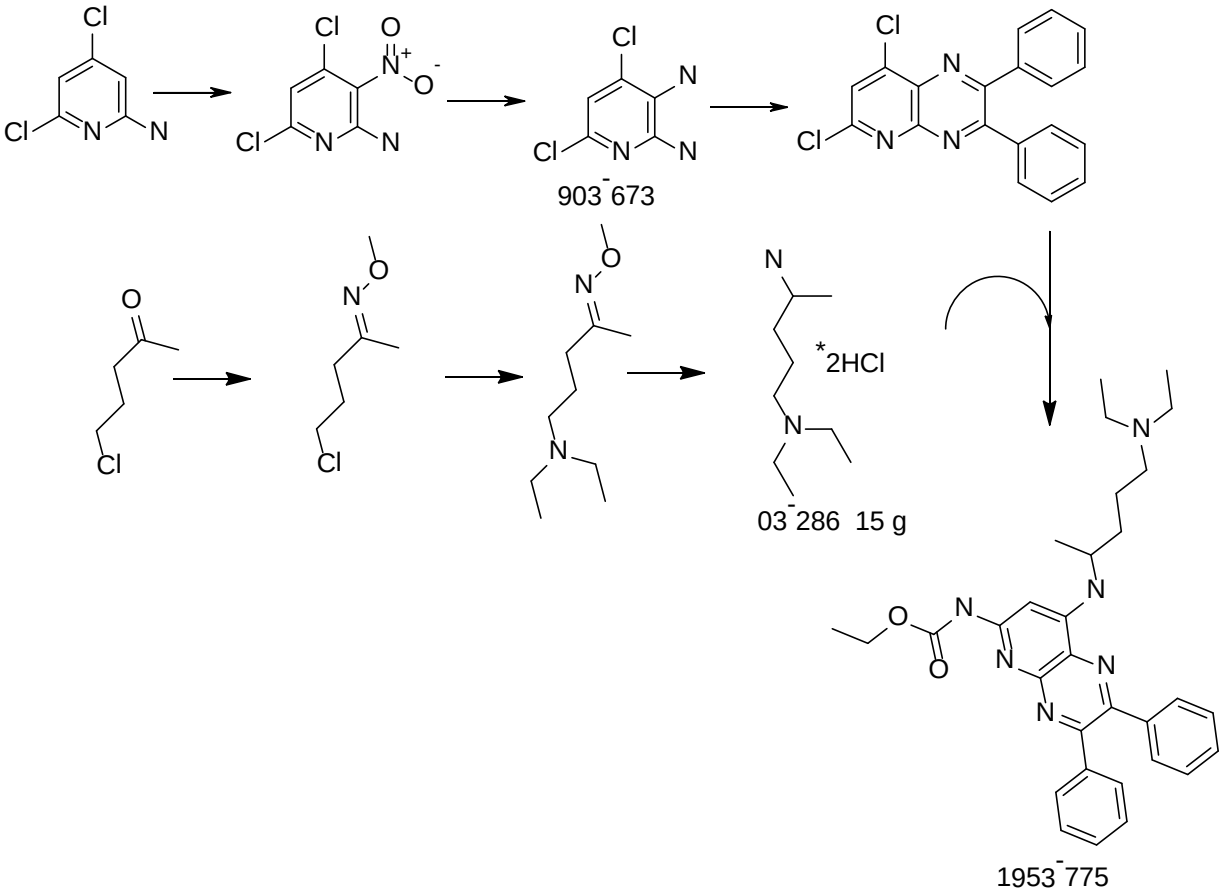
З метою оптимізації біологічної активності потрібно було синтезувати вихідні білдінг блоки, які містять фрагмент імідазопиридину Sk2,3 в тому числі відновлення їх у більш дінамічну 3d-структуру:



З літературних джерел відомо, що замісник в амідному фрагменті молекули має дуже суттєвий вплив на активність сполуки, тому нами розпочато синтез відповідного трофторметильованого аміну. Наразі отримано 23 г сполуки 1243-189. Зараз триває арилювання відповідного піперазину 4-фторбензонітрилом з подальшим відновленням нітрильної групи:

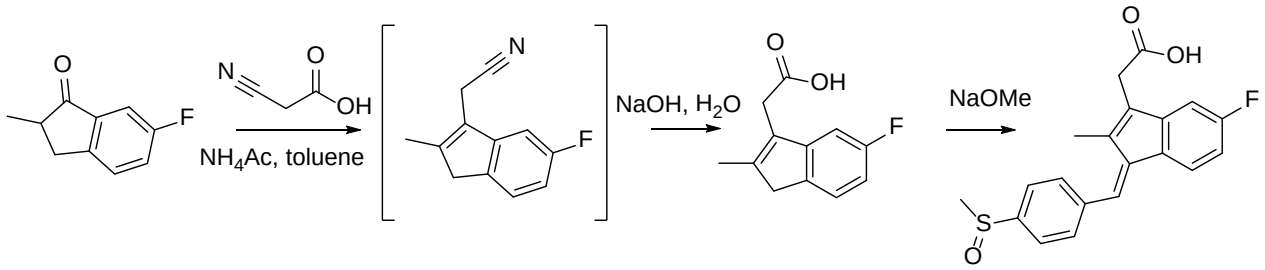


Для порівняння наших сполук з відомими було розпочато синтез реферестних сполук на FtsZ мішень: 1953-775, 1973-629 та 1973-630.

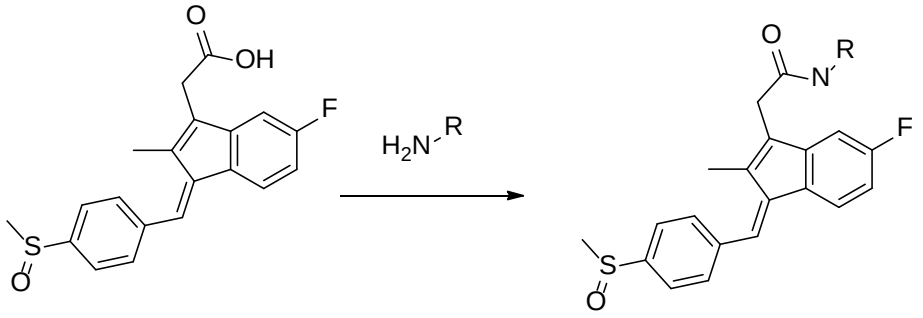


Наразі відпрацьовуємо відновлення нітропохідного у відповідний діамін 903-775, отримано 15 г гідрохлориду 03-286.

Також планується отримати Сулиндак 0982-412 синтез за схемою:



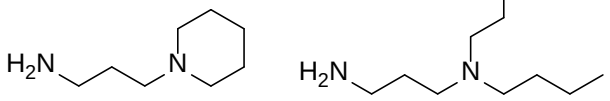
Надалі будемо проводити ацілювання з амінами 83-373 та 1823-292, які є в наявності у Енамін ЛТД у відповідні аміди 1973-629 та 1973-630.



0982-412
SULINDAC

1973-629

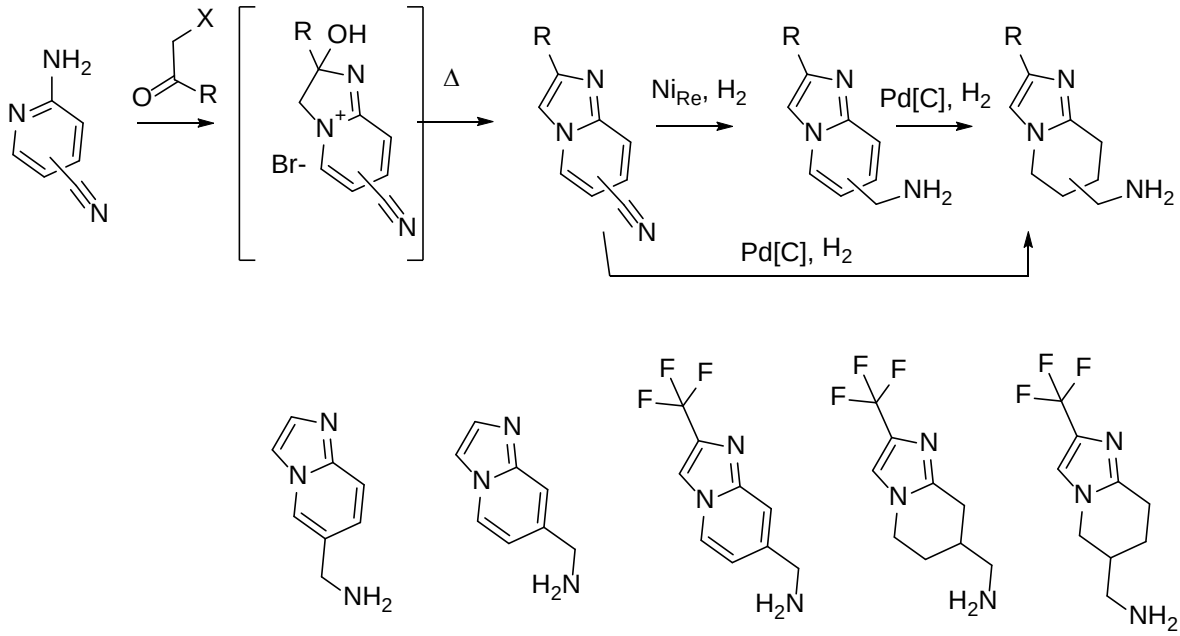
1973-630



83-373

1823-295

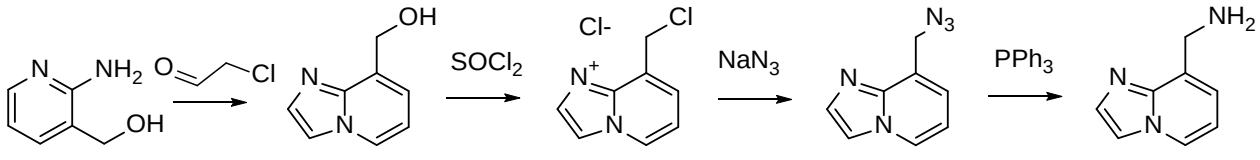
Також нашу увагу привабили амінометил похідні імідазопиридину для скафолдів Sk5-7 на відміну від скафолдів, які мають карбоксильну групу Sk2,3. Потрібно відмітити, що цей клас сполук є майже не представленим в літературі. Було вирішено синтезувати відповідні аміни, де амінна компонента була б привнесена як з боку імідазолу, так і з боку піридина, піразина. Для синтезу відповідних амінів була використана наступна схема:



Для першої стадії було використано описану нами у 2014 процедуру [69].

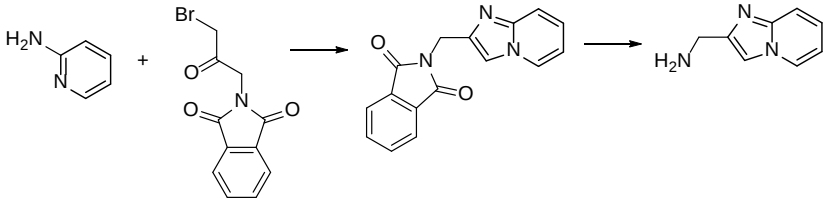
Для проведення наступної стадії – відновлення нітрильної групи довелося дуже ретельно підбирати умови, причому слід відзначити, що отримання імідазопіридинів так, щоб зберегти невідновленним піридиновий цикл, виявилося дуже складною задачею, т.к. у більшості звичайних методів відновлення разом з нітрильною групою відновлюється і фрагмент піридинової ланки у відповідні імідазолопіперидини як, наприклад, під дією $NaBH_4$+$CoCl_2$, $LiAlH_4$, H_2+Pd(C) [70]. Єдиний метод, що спрацював – відновлення на нікелі Ренеля з пониженим тиском водню та додаванням амоніаку за для запобігання дімеризації. Для збільшення проникаючий властивості у мембрану клітини були отримані ще трифторметильні похідні.

У випадку 2-аміно-3-циано піридина така циклізація не вийшла із-за побічних реакцій, тому довелося його робили іншим шляхом:

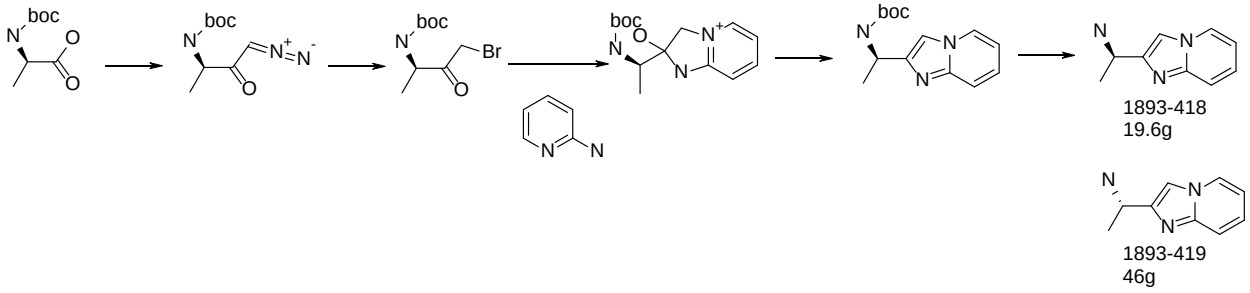


Перша стадія робилася у попередніх умовах, але у якості вихідного було використано відповідний аміно спирт піридину. Подальшою обробкою хлористим тіонілом з наступною заміною активного хлору на азідну групу та після виділення відповідного азіду його відновлення за допомогою трифенілфосфіном за реакцією Штаудінгера було отримано цільову сполуку.

Для скафолдів Sk5 було відпрацьовано аналогічний метод з використанням фталімід заміщеного бром аміно ацетону з патенту US2003/187040, 2003, A1 [71]:



Крім того, виходячи з хірального альфа-аланіна нам вдалося отримати відповідні хіральні аміни у дуже м’яких умовах дегідратації, вихідні бром кетони були синтезовані за допомогою діазометану з відповідними природними R і S – аланінами, з наступним перегрупуванням у відповідні бром кетони:



Енантіомерну чистоту підтверджено завдяки хіральній хроматографії, домішки рацемізованого продукту зафіксовано не було (Рис. 16.3).

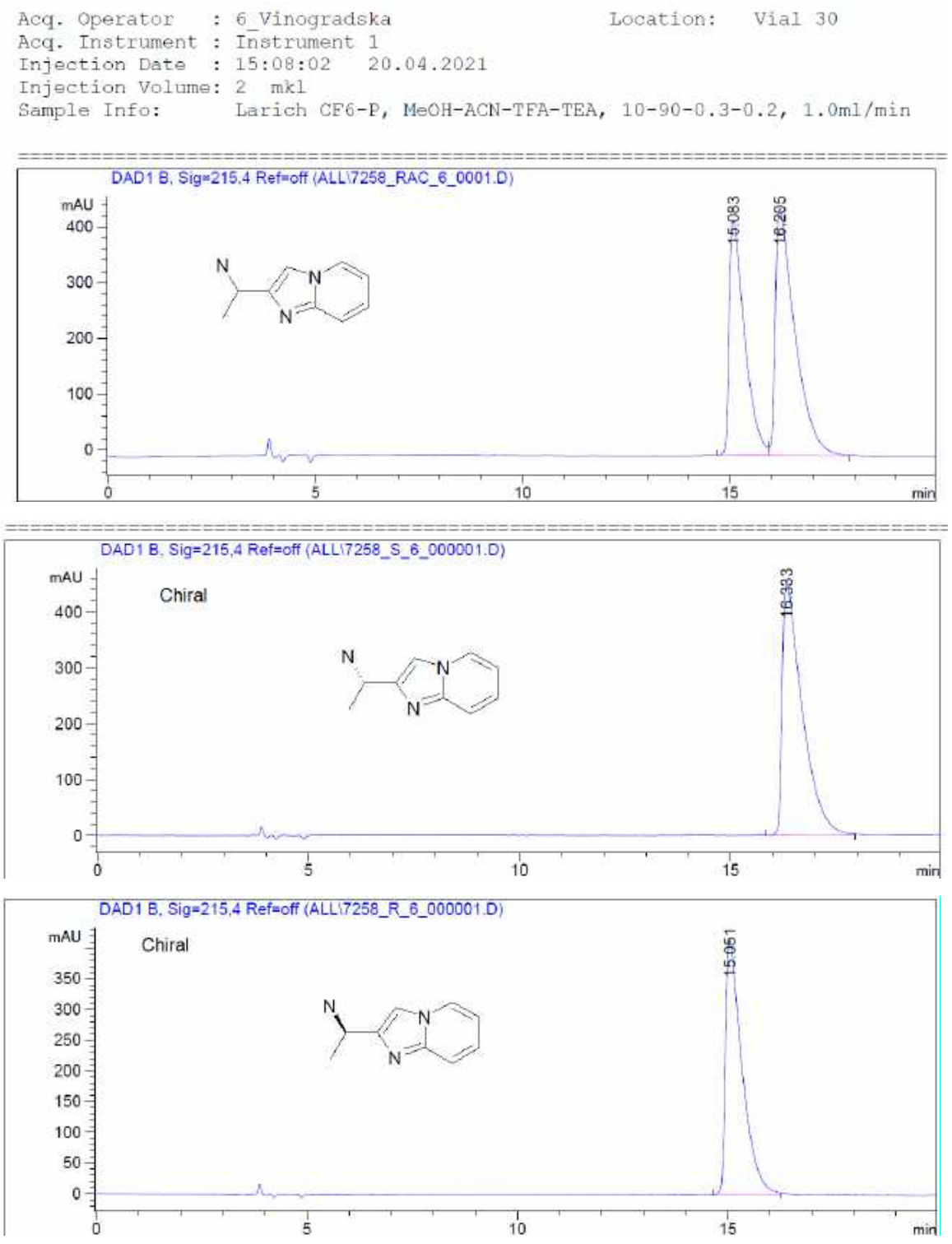
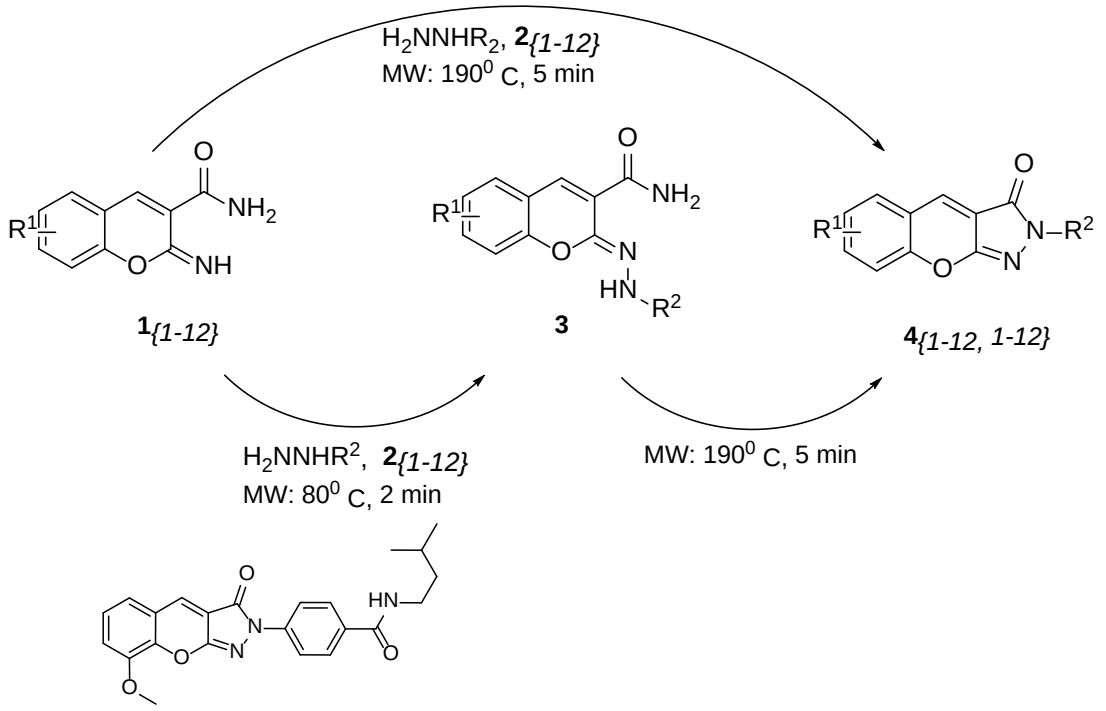


Рисунок 16.3 - ВЕРХ хроматограмма рацемічного 1-(imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)ethan-1-amine та R і S – ізомерів на хіральній колонці .

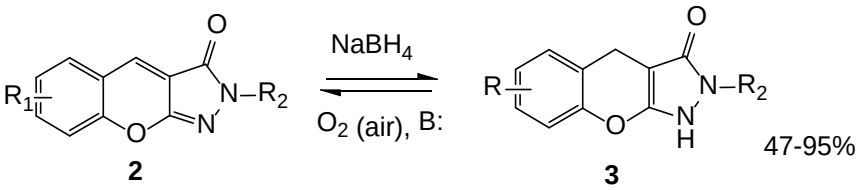
Як ми згадували раніше представники скафолдів Sk1,4, які мають у своїй будові бензопіранопіразольний фрагмент, теж проявили себе на обидві мішені.

Вихідні сполуки для скафолда Sk4 ми синтезували за описаною у попередній роботі процедурі [72] за допомогою мікрохвильового випромінювання в лабораторіях НТК Інституту Монокристалів.



Сполука KS26817 виявила 2% інгібування ГТФазної активності FtsZ при концентрації 1 мкг/мл, 25% на фоні 10 мкг/мл і 32% на фоні 100 мкг/мл.

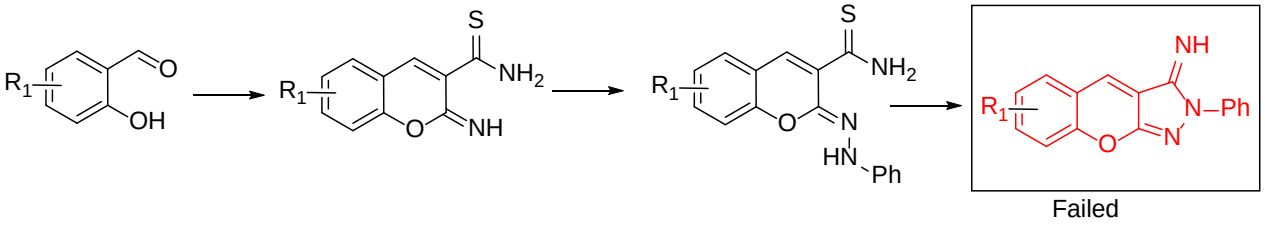
Але більшисть структури з цього типу сполук не підходили за АДМЕТ параметрами, тому що мали дуже низьку розчинність в органічних розчинниках та були зовсім нерозчинні у водних розчинах. Успішно вирішити цю проблему вдалося частковим відновлення бензопіранового фрагменту Боргідридом натрію:



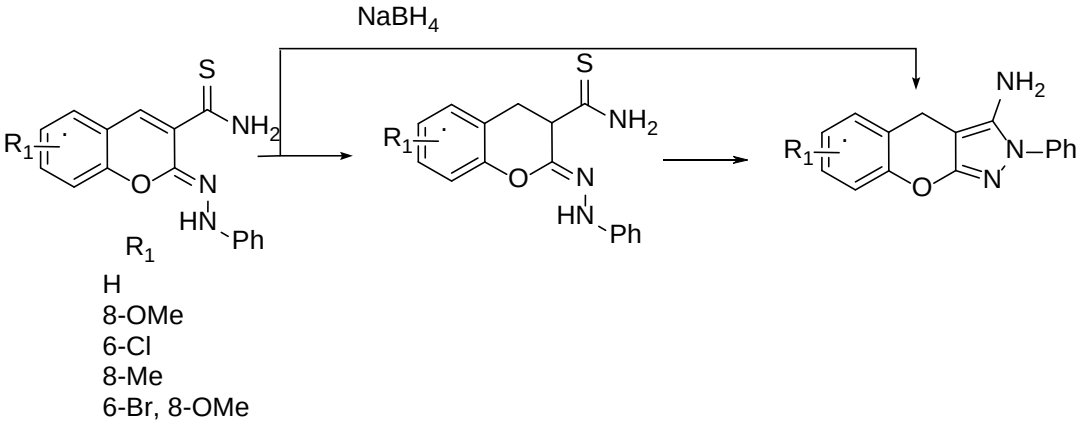
У ході реакції ми помітили, що ці процес можуть йти у зворотному напрямку під дією кисня з повітря у слідових кількостях основ. Таким чином, отримані сполуки можуть бути антиоксидантами у біологічних процесах.

Сполука C201-1785 блокувала ГТФазну активність рекомбінантного протеїну FtsZ менш ефективно за KS26817, але все ж мала інгібування на рівні 2, 21 та 29 % відповідно у концентраціях 1, 10 та 100 мкг/мл.

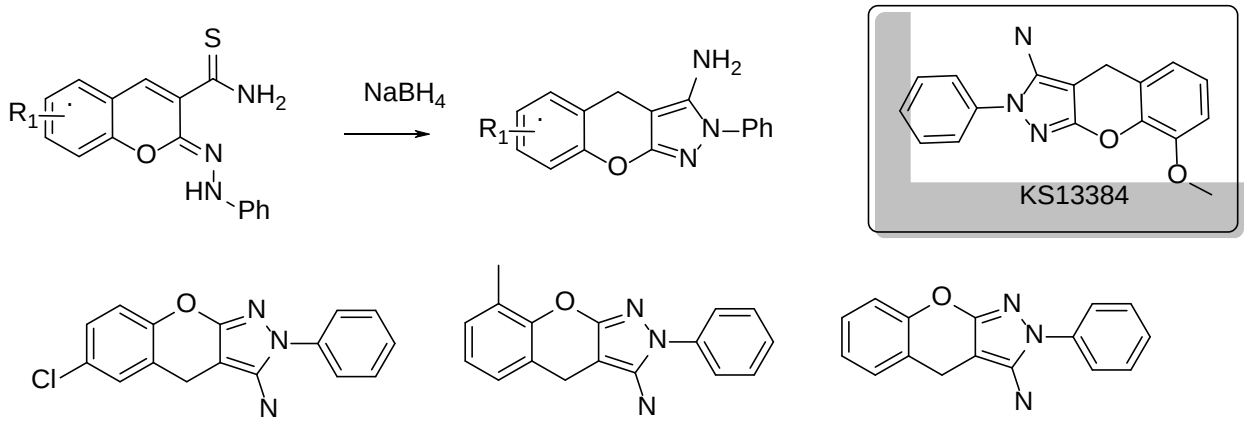
Дуже складний шлях був до похідних бензопіранопіримідінов, які мають замість карбонільної групи піразолона аміно групу. Вихідні гідразони 2-імінокумаринів було синтезовано виходячи з відповідних саліцилових альдегідів та циантіоацетаміда, за процедурою описаною [72], але будь які намагання провести циклізацію з єлімінуванням сірководню відповідних гідразонів у зазначених вище умовах потерпіли поразку:



Нарешті вдалося винайти підхід до їх синтезу:

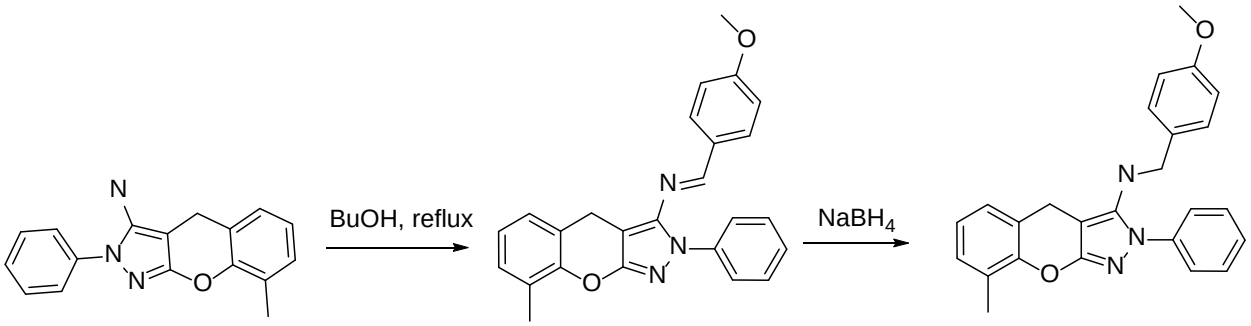


Циклізацію проводили за допомогою відновлення боргідридом подвійного зв’язку кумаринового фрагменту при кімнатній температурі, у результаті чого вдалося виключити із схеми нестійкі імінопродукти, а також отримати більш конфірмаційно рухливі продукти, які вже при невеликому нагріві утворювали цільові продукти завдяки швидкої внутрішньо-молекулярної циклізацією на тіоамідний фрагмент.



Сполука KS13384 проявляє інгібуючу активність на штам BCG методом ПЛР у концентрації 8 мкг/мл, а також зниження ГТФазної активності FtsZ (1 мкг/мл 3%-не, 10 мкг/мл - 26%-не, 100 мкг/мл - 39%).

Далі нами було синтезовано представники 3-N-бензіл похідні 2-феніл-2,4-дігідробензопирано[2,3-c]піразол-3-аминов. Була розроблена технологія отримання основ Шиффа відповідних бензопирано[2,3-c]піразол-3-аминов та подальше відновлення азометинового подвійного зв'язку за допомогою боргідрида натрію за схемою:



Наразі співавторами ведеться дослідження їхньої активності.

Попередні дослідження свідчать, що найбільш активними сполуками з протимікробною активністю на штам BCG є Z1574680729 і Z65190667. Сполука KS13384 проявляє активність як до штаму BCG, так і до мішені FtsZ з *S. aureus*. Це дозволило розглядати ці речовини для подальшої лід оптимізації на основі скафолду SK1-7, який був основою для синтезу бібліотек комбінаторних сполук. Замісники у комбінаторних реакціях для встановлення

подальшої оптимізації біологічної активності сполук визначені на основі даних літератури і результатів аналізу ліганд-білкових взаємодій.

17 ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ 30-100 ВІДІБРАНИХ ХІМІЧНИХ СПОЛУК ДО ВАКЦИННОГО ШТАМУ *M.BOVIS* (НУБіП УКРАЇНИ)

Для проведення аналізу протимікробної дії на вакцинному штамі *M. bovis* загалом було досліджено 72 хімічні сполуки – підібраних біоінформатичним шляхом в різних концентраціях.

Аналіз результатів протимікробної дії досліджуваних речовин проводили через 5 тижнів після посіву. Для приготування інокулюму вакцинного штаму *M. bovis* використовували культуру в активній фазі росту (2-3 тижні). Перед кожним посівом культури на живильні середовища і тестуванням дії нової сполуки на протимікробну чутливість проводили перевірку вакцинного штаму *M. bovis* методом ПЛР. Протягом звітного періоду було виконано аналіз 48 різних пасажів культури вакцинного штаму *BCG* методом полімеразної ланцюгової реакції. В усіх дослідженнях було отримано позитивний результат щодо наявності генетичного матеріалу вакцинного штаму *BCG.*

У табл. 17.1 наведені дані щодо протимікробних властивостей 22 речовин за концентрацій 80 мкг/мл, 40 мкг/мл, 20 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл.

Як видно із таблиці, такі речовини як Z352121084, Z651728048, Z1982261981, Z1994215952, Z2052474496, Z1762183742, Z1495811966, Z1762139880, Z511532506, Z68424055, та Z44503904 не проявляли протимікробних властивостей щодо вакцинного штаму *M. bovis*. При дослідженні зазначених речовин спостерігався активний ріст вакцинного штаму *M. bovis* на середовищі Левенштейна-Єнсена у кількості більше 20 КУО у діапазоні концентрації від 80 мкг/мл до 0,32 мкг/мл.

Для окремих речовин було відмічено незначну інгібуючу дію а саме пригнічення росту вакцинного штаму *M. bovis* на рівні ≤ 20 КУО.

Таблиця 17.1 - Результати дослідження інгібуючих властивостей 22 хімічних речовин щодо вакцинного штаму *M. bovis*.

П/п	Код речовини	Мішень	Концентрація досліджуваної речовини в середовищі Левенштейна-Єнсена, n=5					
			80 мкг/мл	40 мкг/мл	20 мкг/мл	10 мкг/мл	5 мкг/мл	2,5 мкг/мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Z352121084 (I)	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
2	Z651728048 (II)	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
3	Z1982261981 (III)	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
4	Z1994215952 (IV),	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
5	Z2052474496 (V)	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
6	Z1762183742 (VI)	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
7	Z1495811966 (VII)	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
8	Z65190667 (VIII)	*FtsZ M.tuberculosis +S.aureus*	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**
9	Z1574680729 (IX)	*FtsZ S.aureus*	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**	**Ріст відсутній**
10	Z2589562532 (X)	*FtsZ S.aureus*	**Ріст відсутній**	<20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
11	Z141584328 (XI)	*FtsZ S.aureus*	**Ріст відсутній**	**≤20 КУО**	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
12	Z1567270599 (XII)	*FtsZ S.aureus*	**Ріст відсутній**	**<20 КУО**	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
13	Z2973191210 (XIII)	*FtsZ S.aureus*	**Ріст відсутній**	<20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
14	Z2381723313 (XIV)	*FtsZ S.aureus*	**≤20 КУО**	**≤20 КУО**	**≤20 КУО**	**≤20 КУО**	>20 КУО	>20 КУО
15	Z2599752817 (XV)	*FtsZ S.aureus*	**≤20 КУО**	**≤20 КУО**	**≤20 КУО**	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
16	Z1759934893 (XVI)	*FtsZ S.aureus*	**≤20 КУО**	**≤20 КУО**	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
17	Z1762139880 (XVII)	*FtsZ S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
18	Z511532506 (XVIII)	*FtsZ S.aureus*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО

1	2	3	4	5	6	7	8	9
19	Z232378082 (XIX)	*FtsZ S.aureus*	**≤20 КУО**	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
20	Z105863984 (XXI)	*FtsZ S.aureus*	н/д	**≤20 КУО**	-	-	-	-
21	Z68424055 (XXII)	*FtsZ S.aureus*	н/д	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
22	Z44503904 (XXIII)	*FtsZ S.aureus*	н/д	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
23	Контроль (без додавання речовини)		Інтенсивний ріст культури вакцинного штаму *M. bovis* (>20 КУО)					

Так для речовини Z232378082 така дія була помітна при концентрації 80 мкг/мл, для речовин Z105863984 та Z175993489 при концентрації 40 мкг/мл, для речовини Z2381723313 починаючи із концентрації 10 мкг/мл і для речовини Z2599752817 починаючи з концентрації 20 мкг/мл.

Більш виражену інгібуючу активність виявлено у речовин Z2589562532, Z141584328, Z1567270599 і Z2873191210. Їх вплив має більш плавну негативну кореляцію між концентрацією і активністю росту вакцинного штаму *M. bovis*. У діапазоні концентрацій від 40 до 80 мкг/мл зазначені сполуки повністю зупиняють утворення колоній вакцинного штаму *BCG*. Так, через 5 тижнів інкубації, ознаки інтенсивного росту (>20 КУО) вакцинного штаму *BCG* було виявлено у дослідних зразках що мали 2.5, 5, 10 і 20 мкг/мл щодо речовини Z2589562532. У дослідних пробірках з концентрацією діючої речовини 40 мкг/мл реєстрували ріст штаму *BCG* у кількості <20 КУО у кожній пробірці. При концентрації діючої речовини 80 мкг/мл, ріст культури зупинявся. Таким чином, отримані результати вказують на низьку інгібуючу дію Z2589562532 у концентраціях 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, помірну дію – у концентрації 40 мгк/мл і виражену інгібуючу дію за концентрацією 80 мкг/мл.

Крім того, виявлено виражену протимікробну активність речовин Z65190667 і Z1574680729. У діапазоні досліджених концентрацій (80 мгк/мл – 2,5 мгк/мл) росту вакцинного штаму *M. bovis* не спостерігалося.

При дослідженні окремих сполук Z2589562532, Z141584328, Z1567270599 і Z2873191210, відмічали ріст вакцинного штаму *M. bovis* у

вигляді плівки. У таких випадках проводили фарбування культури по Цілю-Нельсону та проводили мікроскопічне дослідження. На рис. 17.1. показано результати такого дослідження для речовини Z2589562532.

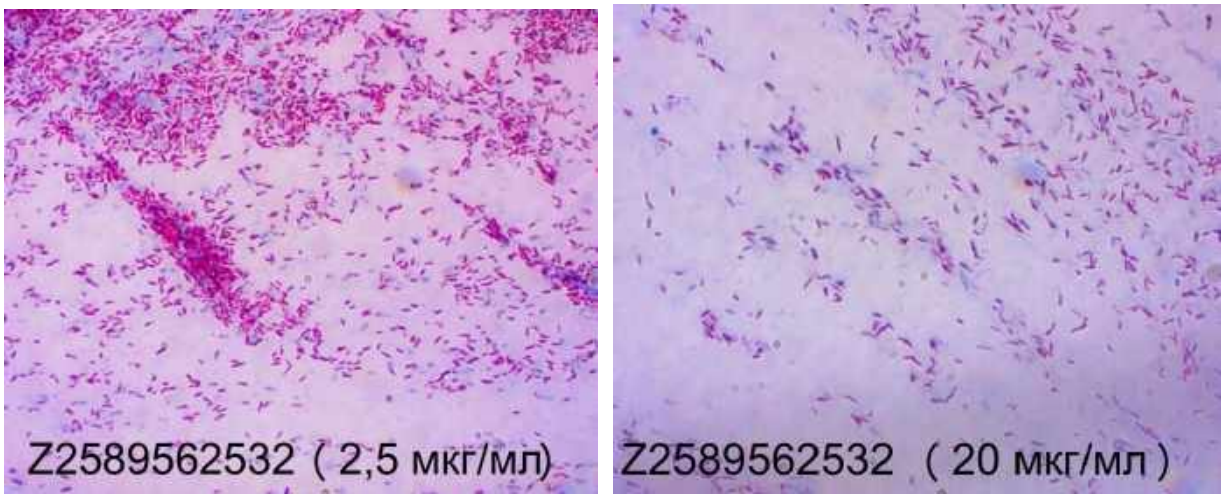


Рисунок 17.1 – Приклади препаратів культур вакцинного штаму *M. bovis* що вирощувались за умов різних концентрацій сполуки Z2589562532 (фарбування по Цілю-Нельсону).

Як можна побачити на рис. 17.1 при мікроскопічному дослідженні спостерігається негативна кореляція концентрації речовин і кількості мікобактерій із збільшенням концентрації речовини. На рис. 17.2 наведено приклад посівів середовища Левенштейна-Йенсена із різними концентраціями хімічної речовини із вираженою протимікробною дією та за відсутності останньої.

Оскільки в ході дослідження нами було отримано дві речовини Z1495811966 і Z1574680729, для яких за досліджуваного діапазону концентрацій не було встановлено мінімально інгібуючої концентрації, тому для наступних 16 речовин використовували діапазон від 20 мкг/мл до 0,032 мкг/мл.

В результаті дослідження хімічних сполук наведених в Табл. 17.2 не встановлено інгібуючих властивостей для жодної із них.

В подальшому проводили дослідження протимікробних властивостей сполук мішенями як є *FtsZ* та *CysK1*.

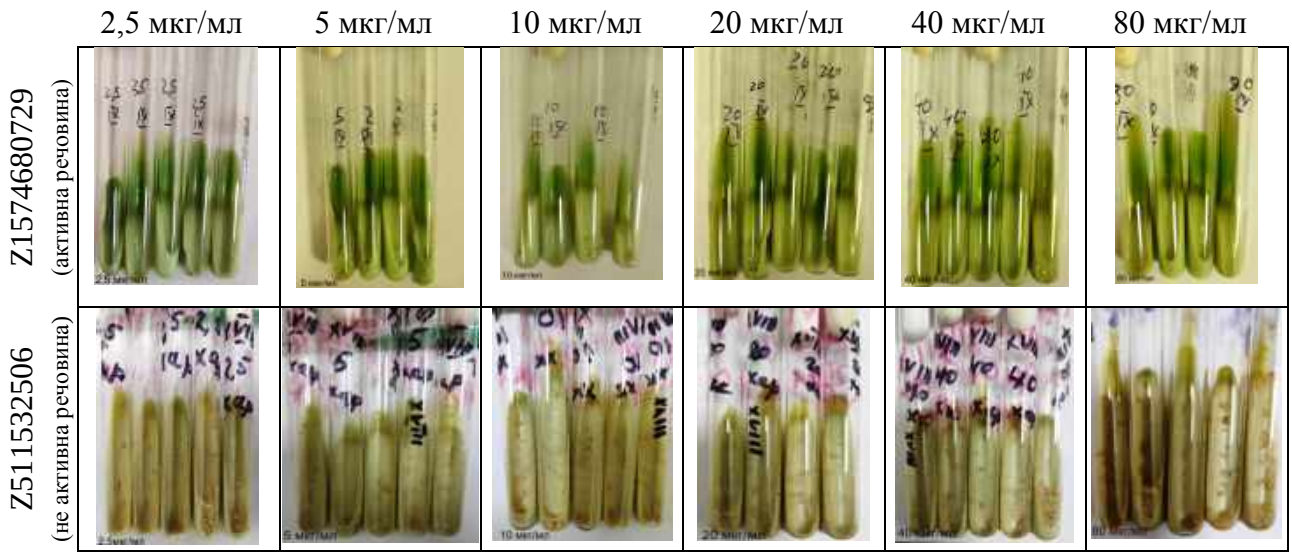


Рисунок 17.2 - Приклад речовини із вираженою протимікробною дією (Z1574680729) і речовини яка не має інгібуючої дії на вакцинний штам *M. bovis* (Z511532506) після 5 тижнів інкубування.

Таблиця 17.2 - Результати дослідження інгібуючих властивостей 12 хімічних речовин щодо вакцинного штаму *M. bovis*.

П/П	Код речовини	Мішень	Концентрація досліджуваної речовини в середовищі Левенштейна-Єнсена, n=4				
			20 мкг/мл	4 мкг/мл	0,8 мкг/мл	0,16 мкг/мл	0,032 мкг/мл
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Z1764879138 (XX)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
2	Z51139282946 (XXIV)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
3	Z1553790476 (XXV)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
4	Z3686172495 (XXVI)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
5	Z2762514401 (XXVII)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
6	Z74756224 (XXVIII)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
7	Z135976820 (XXIX)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
8	Z319371362 (XXX)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
9	Li003 (XXXI)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
10	Li 001 (XXXII)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО

1	2	3	4	5	6	7	8
11	Li 002 (XXXIII)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
12	G3000739 (XXXIV)	*M. bovis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
13	Контроль (без додавання речовини)		Інтенсивний ріст культури вакцинного штаму *M. bovis* (>20 КУО)				

Результати дослідження протимікробної дій наступних 38 речовин наведено в таблицях 17.3 та 17.4 в залежності від мішені. Дослідження проводили у діапазоні концентрацій від 40 мкг/мл до 0,32 мкг/мл.

Таблиця 17.3 - Рзультати дослідження інгібуючих властивостей 16 хімічних речовин, мішенню яких є *FtsZ M. tuberculosis*

П/п	Код речовини	Мішень	Концентрація досліджуваної речовини в середовищі Левенштейна-Єнсена, n=3			
			40 мкг/мл	8 мкг/мл	1,6 мкг/мл	0,32 мкг/мл
1	Z48853818	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
2	Z1576908429	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
3	Z1359824832	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
4	Z854297304	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
5	Z1024231758	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
6	Z1710028705	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
7	Z1390713295	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
8	Z6649992	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
9	Z1462541066	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
10	Z1533668860	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
11	Z1754374135	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
12	Z1755273594	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
13	Z1716224477	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
14	Z1492679130	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
15	Z2674894316	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
16	Z16397525117	*FtsZ M.tuberculosis*	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
17	Контроль (без додавання речовини)		Інтенсивний ріст культури вакцинного штаму *M. bovis* (>20 КУО)			

Таблиця 17.4 - Результати дослідження інгібуючих властивостей 22 хімічних речовин мішенню яких є фермент *CysK1*

П/п	Код речовини	Мішень	Концентрація досліджуваної речовини в середовищі Левенштейна-Єнсена, n=3			
			40 мкг/мл	8 мкг/мл	1,6 мкг/мл	0,32 мкг/мл
1	Z1385378118	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
2	Z2184557171	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
3	Z2002676283	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
4	Z113161546	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
5	Z1537403121	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
6	Z2358050317	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
7	Z1537403121	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
8	Z2353759154	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
9	Z55547467	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
10	Z45538401	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
11	Z1444847973	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
12	Z45731639	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
13	Z56899619	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
14	Z214971184	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
15	Z2352616584	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
16	Z1743244050	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
17	Z2595688905	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
18	Z1537406475	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
19	Z64576265	CysK1	**Ріст відсутній***	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
20	Z1537406115	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
21	Z3686986806	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
22	Z3690567184	CysK1	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
23	Контроль (без додавання речовини)		Інтенсивний ріст культури вакцинного штаму *M. bovis* (>20 КУО)			

В результаті скринінгу хімічних сполук, мішенню яких є *FtsZ M.tuberculosis,* в діапазоні концентрацій від 40 мкг/мл до 0,32 мкг/мл не встановлено інгібуючих властивостей щодо вакцинного штаму *M. bovis y* жодної із них.

В результаті скринінгу хімічних сполук, мішенню яких є фермент *CysK1 M.tuberculosis* в діапазоні концентрацій від 40 мкг/мл до 0,32 мкг/мл встановлено значну інгібуючу дію речовини Z64576265 щодо вакцинного штаму *M. bovis* за концентрації 40 мкг/мл. Так, в діапазоні концентрацій від 0,32 мкг/мл до 8 мкг/мл відмічали активний ріст культури вакцинного штаму *M. bovis* проте за концентрації 40 мкг/мл ріст повністю припинявся.

Таким чином, підтверджено виражену інгібуючу дію для речовин Z65190667, Z1574680729 у концентраціях від 2,5 мкг/мл до 80 мкг/мл. Для окремих речовин було відмічено незначну інгібуючу дію. Більш виражену інгібуючу активність виявлено у речовин Z2589562532, Z141584328, Z1567270599 і Z2873191210. Крім того, за концентрації 40 мкг/мл виявлено інгібуючу дію у речовини Z64576265 мішенню якої є білок *CysK1*.

18 ПРОВЕДЕННЯ РОБОТИ ПО ВИДІЛЕННЮ ПОЛЬОВОГО ШТАМУ *MYCOBACTERIUM BOVIS* ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО МЕТОДІВ. ВИВЧЕННЯ ЕПІЗООТИЧНОЇ СИТУАЦІЇ З ПОШИРЕННЯ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ПЕРІОД 2011- 2019 РОКИ

Проведення роботи по виділенню польового штаму *Mycobacterium bovis* за допомогою мікробіологічного та молекулярно-генетичного методів (результати дослідження). Результати дослідження отриманих проб щодо виділення польового штаму *M. bovis у* 7 зразках мікробіологічним методом наведені в табл. 18.1.

Таблиця 18.1 – Результати дослідження щодо виділення польового штаму *M.bovis* із об'єктів навколишнього середовища.

Джерело	Кількість зразків	Результат
Вода	2 зразки	не виділено
Ґрунт	1 зразки	не виділено
Гноївка	2 зразки	не виділено
Перегній	2 зразки	не виділено

Як видно із представлених в таблиці даних за допомогою мікробіологічного методу у жодному із досліджених об'єктів навколишнього середовища не виділено польовий штам *M.bovis* в зв'язку із чим молекулярно-біологічне дослідження не проводилось.

Вивчення епізоотичної ситуації з поширення туберкульозу великої рогатої худоби за період 2011- 2019 роки. З початку 2011 р. в Україні не виявлено жодного неблагополучного пункту щодо туберкульозу великої рогатої худоби. Така оптимістична картина зберігалася і протягом 2012-2013 р. р. У 2014 році виділена одна культура *Mycobacterium bovis* від однієї голови великої рогатої худоби.

Цю культуру виділено від тварини з господарства ДППЗ «Плосківський» розташованого у Київській області, Броварському районі, с. Плоске. Станом на початок 2015 року повідомлялося про виявлення 55 хворих тварин із вказаного господарства. Всіх хворих тварин піддано забою.

У жовтні 2016 року господарство ДППЗ «Плосківський» оздоровлено від туберкульозу. З цього часу і по кінець 2019 року в Україні не виявлялося нових вогнищ туберкульозу великої рогатої худоби.

Кожного року в Україні проводяться планові алергічні дослідження на туберкульоз всього поголів'я великої рогатої худоби. Якщо виявляють позитивно реагуючих тварин, то їх обов'язково піддають діагностичному забою із подальшим бактеріологічним дослідженням: бактеріоскопією, культуральним дослідженням та біологічною пробою. Завдяки таким заходам, останнім часом, найчастіше виділяються лише атипові мікобактерії, тобто псевдопозитивні реакції тварин на туберкульоз були пов'язані з мікроорганізмами, що не належать до *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Протягом аналізованого періоду в Україні було виявлено лише одне неблагополучне господарство по туберкульозу великої рогатої худоби. З листопада 2016 р. і до кінця 2019 р. Україна, за офіційними даними вільна від туберкульозу великої рогатої худоби.

19 ПРОВЕДЕННЯ БІОХІМІЧНОЇ ПЕРЕВІРКИ ІНГІБУВАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ 2-Ї ПАНЕЛІ ПЕРСПЕКТИВНИХ СПОЛУК *IN VITRO* ЗГІДНО ОБРАНИХ ПРОТОКОЛІВ

Результати дослідження ефектів потенційних інгібіторів ензиму О-ацетилсеринсульфгідрилази *M.tuberculosis in vitro* продемонстрували, що серед 40 сполук, які було виокремлено в результаті біоінформаційного докінгу, відчутний інгібувальний ефект у хоча б 1 досліджуваній концентрації проявило тільки 4 речовини:

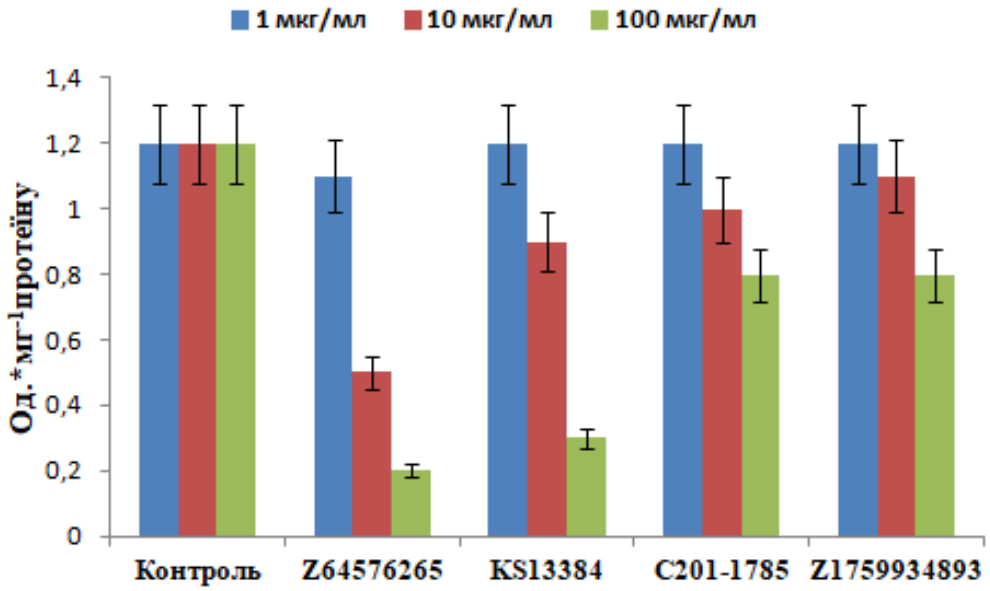


Рисунок 19.1 - Дослідження ефективності основної групи сполук із потенціалом інгібувальної дії щодо ензиму CysK1 *M.tuberculosis in vitro*

Як видно з рисунку 19.1, найбільш ефективно інгібувала О-ацетилсеринсульфгідрилазну активність сполука Z64576265 (більш ніж у 2 рази у концентрації 10 мг/мл та майже у 6 разів за концентрації 100 мг/мл). Відчутно менш ефективною стала сполука KS13384. І нарешті найменш дієвою, але із мінімальним ефектом у найвищих концентраціях виявилися сполуки C201-1785 та Z1759934893.

20 ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ХІМІЧНИХ СПОЛУК НА ВАКЦИННИЙ ШТАМ *M. BOVIS*. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИХ ІЗ ВИРАЖЕНОЮ ПРОТИМІКРОБНОЮ ДІЄЮ НА ВАКЦИННИЙ ШТАМ *M.BOVIS* НА ПАТОГЕННОМУ ТА ПОЛЬОВОМУ ШТАМАХ. ВИВЧЕННЯ ЕПІДЕМІЧНОЇ СИТУАЦІЇ З ТУБЕРКУЛЬОЗУ У 2011-2019 Р.Р.

Для проведення аналізу протимікробної дії на вакцинному штамі *M. bovis* було досліджено 12 хімічних сполук мішенню яких є фермент *CysM*, які були підібрані біоінформатичним шляхом. Дослідження проводили в діапазоні концентрацій 40 мкг/мл, 8 мкг/мл, 1,6 мкг/мл 0,32 мкг/мл. У табл. 20.1 наведені дані щодо протимікробних властивостей досліджуваних речовин.

Таблиця 20.1 - Результати дослідження інгібуючих властивостей 12 хімічних речовин мішенню яких є фермент *CysM*.

П/п	Код речовини	Мішень	Концентрація досліджуваної речовини в середовищі Левенштейна-Єнсена, n=3			
			40 мкг/мл	8 мкг/мл	1,6 мкг/мл	0,32 мкг/мл
1	Z2933252946	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
2	Z164748540	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
3	Z57913158	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
4	Z1196167937	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
5	Z168478202	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
6	Z1763645072	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
7	Z166762558	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
8	Z73298212	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
9	Z164727144	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
10	Z26794481	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
11	Z198295716	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
12	Z164744724	CysM	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО	>20 КУО
13	Контроль (без додавання речовини)		Інтенсивний ріст культури вакцинного штаму *M. bovis* (>20 КУО)			

В результаті скринінгу хімічних сполук, мішенню яких є *CysM M.tuberculosis* в діапазоні концентрацій від від 40 мкг/мл до 0,32 мкг/мл не встановлено інгібуючих властивостей щодо вакцинного штаму *M. bovis у* жодної із них.

Вивчення епідемічної ситуації з туберкульозу у 2011-2019 р.р. За даними Ю. І. Фещенко та співавторів [73] у 2011-2018 р.р. захворюваність на туберкульоз та смертність від нього в Україні поступово знижувались (Табл.20.2).

Таблиця 20.2 - Епідеміологічна ситуація з туберкульозу в Україні за 2011-2018 р.р.

Роки спостереження	Захворюваність	Смертність
2011	67,2	15,2
2012	68,1	15,1
2013	67,9	14,1
2014	59,5	12,2
2015	55,9	10,8
2016	54,7	9,5
2017	51,9	9,3
2018	50,5	9,4

Однак смертність у 2018 р. стала дещо вищою у порівнянні із 2017 р., а саме на 1,1 %.

Викликає стурбованість, за даними цих же авторів, летальність від туберкульозу у період до одного року спостереження (табл. 20.3).

Тобто зростає тяжкість перебігу туберкульозного процесу та знижується ефективність його лікування. У зв’язку з такими даними прогноз щодо подальшого перебігу епідемії туберкульозу в Україні надзвичайно тривожний.

За оцінками ВООЗ захворюваність туберкульозом у 2018 р. становила 80 нових випадків і рецидивів на 100 тис. населення.

Таблиця 20.3 - Летальність від туберкульозу людей в Україні у період до одного року спостереження

Роки спостереження	Летальність у період до 1 року спостереження (%)
2011	16,2
2012	17,7
2013	18,6
2014	20,3
2015	21,2
2016	24,9
2017	25,0

Щодо розповсюдження туберкульозу по регіонах України, то за період 2013-2019 р.р. у Закарпатській, Дніпропетровській, Вінницькій, Кіровоградській, Чернівецькій областях виявлено тенденцію до зростання рівня захворюваності від 2,2 до 14,7 %. Найбільша кількість хворих була у Одеській – 138,5, Дніпропетровській – 79,1, Херсонській – 77,9 та Кіровоградській – 75,4 областях (на 100 тисяч населення). А найменша кількість хворих у Чернівецькій – 40,6, Тернопільській – 42,3, Харківській – 48,7 областях та у м. Києві -45,0 осіб на 100 тисяч населення.

Отже епідеміологічна ситуація з туберкульозу в Україні за проаналізований період має тенденцію до незначного зниження захворюваності, підвищення смертності, та значного (8,8%) підвищення смертності у період до одного року спостереження.

21 СТВОРЕННЯ ТА ВАЛІДАЦІЯ QSAR МОДЕЛІ НА ОСНОВІ ВІДОМИХ ТА ОТРИМАНИХ ДАНИХ ЗА ЕФЕКТИВНОСТІ ХІМІЧНИХ СПОЛУК

Не всі тагетні бібліотеки інгібіторів можна було отримати за допомогою фармакофорного скринінгу чи молекулярного докінгу. Прогнозування активних сполук та реконструкція комплексів BioA з інгібіторами була отримана саме за допомогою створеної QSAR моделі. Порівняння амінокислотних послідовностей ензиму Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase (BioA) штамів *M. tuberculosis* (A0A0E8U3C7, A0A655JM28), *M. bovis* (strain ATCC BAA-935 / AF2122/97) P0A4X7, *M. tuberculosis* var. *bovis* BCG A0A0Y1BZ45 проводились для визначення ступеня подібності досліджуваних білків.

Два штами різних організмів, *M. tuberculosis* A0A655JM28 та *M. tuberculosis* var. *bovis* BCG A0A0Y1BZ45, із 320 залишками в обох випадках, ідентичні на 100%. Виходячи із розташування, різноманітності лігандів та цілісності структури були обрані кристалічні структури 3TFT, 4CXQ, 4WYE, 4XJO, 5KGT. Для атомів у площині кільця ліганду у комплексі 4XJO, 5KGT, 4CQX та 3TFU ми визначили наявність стекінгу із триптофаном (TRP64) на допустимій відстані від 3.4 до 3.5 Å. А у комплексі 4WYE ліганди формують стекінг-взаємодію у 3,2 Å із Phe402. При цьому спостерігається як звичайний «сендвіч» стекінг, так і Т-стекінг, що фіксують площини ненасичених систем лігандів у просторі. Ліганд комплексу 4WYE, 4CQX утворює водневий зв’язок між кетогрупою і аміногрупою триптофана (TRP64), у випадку 4CQX ще із аміногруппою Arg400. В комплексі 4XJO ми також спостерігали міцний водневий зв’язок із Arg403. Як видно, в основному, взаємодія відбувається між кетогрупою ліганду і аміногрупою амінокислотних залишків. Ліганд rjvgktrce 4WYE утворює міцний водневий зв’язок аміногрупи із гідроксильною групою Tyr25 та кетогрупою Gly316. 10 молекул

води утворюють водневі зв’язки із групами амінокислотних залишків: Arg400, Tyr407, Thr64; Ser12, Asp160; Ser26, Arg400, Pro24; Phe319, Asp122, Ser291; Gly225, Glu220, Ala226; Gly227, Arg403, Gly172, Asp169; Val223, Gly225, Glu220; Thr258, Ala257, Asp254; Val90, Phe92, Met320, Thr318; His89, Thr318 і Ser63.

Всі доступні речовини були завантажені і конвертовані із формату *.tsv у *.sdf із збереженням основних дісскріпторів: ChEMBL, Smiles, MW, Standard Type, Standard Relation, Standard Value, Standard Units і Target Name. В програмі DataWarrior ми сортували інгібітори за активністю із пороговим значення 10 Мкм, з 298 сполук отримали 242 в межах від 75 нМ до 9860 нМ, з них 180 до 5000 нМ. Достатня кількість активних і неактивних речовин дозволила об’єднати метод молекулярного докінгу та QSAR (Рис. 21.1).

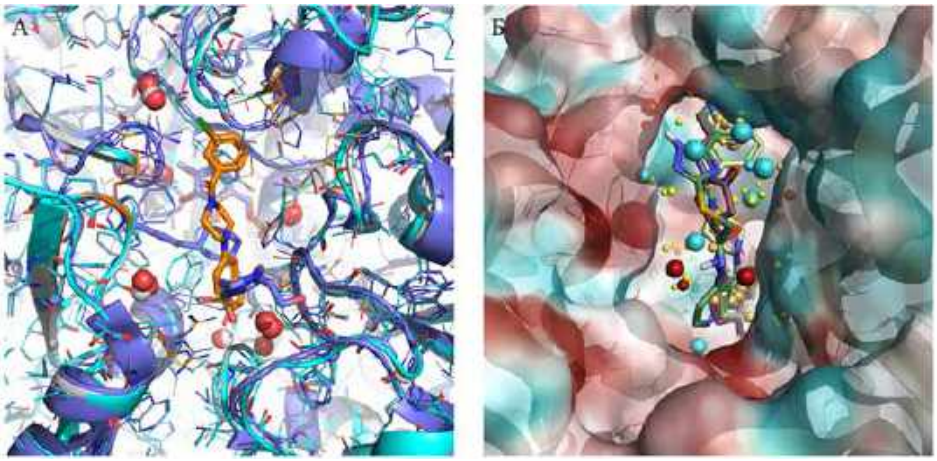


Рисунок 21.1 - Суперпозиція кристалічних структур із зв’язаними лігандами та оточуючими молекулами води (А). 3D-QSAR модель із подібним розташуванням силових полів (Б).

Структури лігандів відображені в програмі Cresset після їх множинного взаємного вирівнювання відображені в просторових межах обумовлених сайтом зв’язування білка. Створення 3D-QSAR моделі було проведено на основі структурного різноманіття та опублікованих даних з активності.

На основі вирівнювання структур анотованих лігандів ми побудували 3D-QSAR модель із подібним розташуванням силових полів, та відібрали невелику вибірку сполук для подальшого тестування.

22 ПОРІВНЯННЯ ТОЧНОСТІ ТА СЕЛЕКТИВНОСТІ НОВОСТВОРЕНИХ ІНСТРУМЕНТІВ ВІДБОРУ ХІТІВ. ПІДГОТОВКА ПРОТОКОЛУ СИНТЕЗУ РЕЧОВИН НА ОСНОВІ РЕЗУЛЬТАТІВ QSAR

Раніше в межах попередніх проєктів, спрямованих на пошук інгібіторів тубуліну і FtsZ, нами було розроблено гібридний протокол, що ґрунтується на спільному використанні віртуального скринінгу і лабораторної верифікації ліганд-білкової взаємодії [26]. Зокрема, із залученням інфраструктури і обчислювального потенціалу віртуальної організації CSLabGrid, нами було виконано пошук і підтверджена здатність відібраних лідерів інгібувати полімеризацію і ГТФ-азну активність бактеріального FtsZ [26]. Проте, задачі актуального проєкту охоплювали значно більший спектр молекулярних мішеней і методів, що вимогло значну переробку і вдосконалення раніше розробленого протоколу [26]. Слід зазначити, що на відміну від попередніх досліджень, де віртуальний скринінг ґрунтувався на результатах молекулярного докінгу і молекулярної динаміки, актуальний проєкт вимагав залучення кардинально нових протоколів, що враховували залучення методів хемоінформатики, фармакофорного пошуку і попереднього ранжирування речовин за властивостями. Після аналізу сайтів зв’язування BioA та InhA, розробки фармакофорних моделей та розрахунків QSAR моделі ми дійшли висновку, що потенціалом для розвитку та змін хімічних властивостей володіють саме похідні сечовини.

Результати повторного молекулярного докінгу модифікованих сполук показали, що додавання нітрогрупи до аліфатичного/арильного кільця може збільшити міцність зв’язування через утворення додаткового водневого зв’язку із амінокислотами сайту зв’язування. Так ми вважаємо, що додавання галогенів у пара-положення фенільного кільця (у випадку переходу від аліфатичної до арильної групи) може збільшити афінність речовини. Проте

зміна довжини ланцюга або його метилювання може негативно вплинути на рухливість та гнучкість ліганду і його можливість взаємодіяти із гідрофобним сайтом зв’язування.

На даному етапі роботи синтез було спрямовано на отримання двох підсерій сполук. Спочатку планується синтез похідних N-пиридин-N'-арилтіосечовини, з введення (заміщенням) фенілу/нафтильного кільця в структуру сполук на Рис. 22.1. Згодом можна буде отримати бензил- і фенілзаміщені похідні тіосечовини в якості другрї підсерії. Оскільки нашою метою є проведення різних модифікацій ліганду (аналог закристалізованого ліганду із структури PDB:5OIL) на основі досить слабкого інгібітору сечовини, для досягнення зростання активності ми замінюватимемо функціональну групу сечовини на групу тіосечовини у цих сполуках. Щоб перевірити обґрунтованість цієї модифікації, ми також синтезуємо сполуки сечовини, представлені в комплексах, і додамо їх у цю підсерію. Всі сполуки повинні бути синтезовані простим одностадійним методом реакції аміну з еквівалентною кількістю різних похідних ізотіоціанатів/ізоціанатів у толуолі при 80°C.

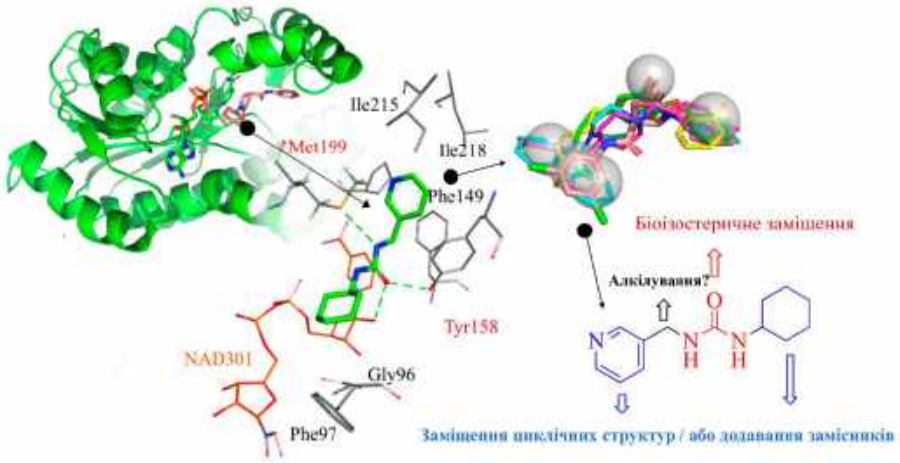


Рисунок 22.1 - Особливості будови сайту зв’язування InhA та взаємодії обраного ліганду. Створення фармакофорної моделі та використання QSAR методу для визначення особливо ефективних функціональних груп.

23 ДОСЛІДИТИ ПРОТИМІКРОБНУ ДІЮ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН ІЗ ВИРАЖЕНОЮ ПРОТИМІКРОБНОЮ ДІЄЮ ДО ВАКЦИННОГО ШТАМУ *M. BOVIS* НА ПАТОГЕННОМУ ТА ПОЛЬОВОМУ ШТАМАХ (НУБІП УКРАЇНИ). ПРОВЕСТИ УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ДОСЛІДЖЕНИХ ХІМІЧНИХ СПОЛУК ПО ВІДНОШЕННІ ДО ВАКЦИННОГО ТА ПАТОГЕННОГО ШТАМІВ *M. BOVIS* (НУБіП).

Усі речовини які проявили інгібуючі властивості на вакцинному штамі *M. bovis* були перевірені щодо їх властивостей на патогенному штамі *M. bovis* Результати наведені у таблицях 23.1 та 23.2.

Таблиця 23.1 - Результати дослідження інгібуючих властивостей 11 хімічних речовин на патогенному штамі *M. bovis*

Номер речовини	Концентрація речовини в середовищі					
	80 мкг/мл	40 мкг/мл	20 мкг/мл	10 мкг/мл	5 мкг/мл	2,5 мкг/мл
Z105863984 (XXI)	н/д	+				
Z232378082 (XIX)	+					
Z1759934893 (XVI)	+	+				
Z25997528117(XV)	+	+	+			
Z2381723313 (XIV)	+	+	+	+		
Z2973191210 (XIII)	+++	++				
Z1567270599 (XII)	+++	++				
Z141584328 (XI)	+++	++				
Z2589562532 (X)	+++	+				
Z1574680729 (IX)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Z65190667 (VIII)	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ ≤ 20 колоній; ++ поодинокі колонії; +++ відсутність росту

Таблиця 23.2 - Результати дослідження інгібуючих властивостей 2 хімічних речовин на патогенному штамі *M. bovis*

	40 мкг/мл	8 мкг/мл	1.6 мкг/мл	0.32 мкг/мл
KS13384 (9)	++	++		
Z64576265 (42/50)	+++			

+ ≤ 20 колоній; ++ поодинокі колонії; +++ відсутність росту

Таким чином, за результатами мікробіологічних досліджень щодо інгібуючих властивостей відібраних хімічних речовин на вакцинному штамі *M. bovis* та патогенному штамі *M. bovis*, було підтверджено виражену інгібуючу дію для речовин Z65190667, Z1574680729 у концентраціях від 2,5 мкг/мл до 80 мкг/мл. Для окремих речовин було відмічено незначну інгібуючу дію, а саме пригнічення росту вакцинного штаму *M. bovis* на рівні ≤ 20 КУО. Для речовини Z232378082 така дія була помітна при концентрації 80 мкг/мл, для речовин Z105863984 та Z175993489 - при концентрації 40 мкг/мл, для речовини Z2381723313 - починаючи із концентрації 10 мкг/мл і для речовини Z2599752817 - починаючи з концентрації 20 мкг/мл. Більш виражену інгібуючу активність виявлено у речовин Z2589562532, Z141584328, Z1567270599 і Z2873191210. Крім того, за концентрації 40 мкг/мл виявлено інгібуючу дію у речовини Z64576265, мішенню якої є білок *CysK1,* та у речовини KS13384 в діапазоні концентрацій від 8 мкг/мл до 40 мкг/мл, при яких відмічали ріст культури вакцинного штаму у вигляді поодиноких колоній.

24 ВИВЧИТИ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЮДЕЙ ТА ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ПЕРІОД 2001-2019 Р.Р.

За весь проаналізований період епідеміологічна та епізоотологічна ситуація з туберкульозу в Україні має спільну тенденцію до зниження кількості випадків.

Однак, якщо туберкульоз великої рогатої худоби фактично ліквідований згідно офіційних статистичних даних із 2016 року, і останнє вогнище було виявлене у Київській області (Броварський район), то захворюваність серед людей залишається набагато вищою за епідемічний поріг і про ліквідацію цього захворювання не може бути і мови у найближчі 50 років. У всіх регіонах України реєструють туберкульоз у людей. Особливо високою є захворюваність у Південно-Східному регіоні (Одеська, Дніпропетровська, Херсонська, Кіровоградська область).

Враховуючи генетичну спорідненість збудників туберкульозу людей та великої рогатої худоби, їх перехресну патогенність для людей і тварин, надзвичайну мінливість біологічних властивостей обох видів збудника можна узагальнити, що небезпека зараження туберкульозом людей від тварин залишається високою.

25 ПІДГОТУВАТИ МАТЕРІАЛ ДЛЯ НАПИСАННЯ ОГЛЯДОВОЇ ПУБЛІКАЦІЇ ІЗ ОЦІНКОЮ РІЗНИХ ПІДХОДІВ ДЛЯ ВИРІШЕННЯ ЗАДАЧІ ІЗ ПОШУКУ ІНГІБІТОРІВ НА КОНКРЕТНИХ ПРИКЛАДАХ. ПІДГОТУВАТИ ОПИС ДОСЛІДЖЕНИХ КЛАСІВ ХІМІЧНИХ СПОЛУК ІЗ ПРОТИ-ТУБЕРКУЛЕЗНОЮ АКТИВНІСТЮ

Протокол високопропускного віртуального скринінгу засобами BO CSLabGrid і лабораторної верифікації протитуберкульозної активності сполук-лідерів. В межах попередніх проєктів, спрямованих на пошук інгібіторів тубуліну і FtsZ, нами було розроблено гібридний протокол, що ґрунтується на спільному використанні віртуального скринінгу і лабораторної верифікації ліганд-білкової взаємодії [26]. Зокрема, із залученням інфраструктури і обчислювального потенціалу віртуальної організації CSLabGrid, нами було виконано пошук і підтверджена здатність біоінформатично визначених речовин-лідерів інгібувати полімеризацію і ГТФ-азну активність бактеріального FtsZ [16, 26].

Без сумніву, зазначена мішень має як переваги так і недоліки. По-перше, спрямоване пригнічення головного білку клітинного поділу мікобактерії має значну літальну дію через порушення формування Z-кільця і апарату поділу. По-друге, слід зазначити, що важливою «лінією оборони» мікобактеріальної клітини є так звана «бактеріальна клітинна стінка», «мікрокапсула» або «плівка», яка утворює додатковий механічний і осмотичний захист. Зазначена структура складається з полісахаридів і дозволяє дискретним мікобактеріям збиратись у колоніє-подібні утворення. Механічні властивості зазначеної плівки утворюють досить суттєві перепони для проникнення ліків і захист від фізичних факторів, а здатність окремих мікобактерій об'єднуватись, помітно посилює колективний захист колонії. Доведено, що ключову роль у синтезі клітинної стінки грає саме FtsZ [74]. Численні дослідження довели здатність препаратів, спрямованих на FtsZ, долати клітинну стінку [75]. Таким чином,

після проникнення в бактеріальну клітину, зазначені агенти не лише порушують апарат поділу, але також, опосередковано послабляють клітинну стінку, що зніжує механічний бар'єр, і полегшує проникнення ліків. Проте, негативною стороною FtsZ є структурна подібність з тубуліном. Незважаючи на те, що розрахунки підтверджують можливість диференційованого впливу на FtsZ бактерій, якій практично не впливає на ізотипи тубуліну людини, подібність цільових сайтів суттєво знижує структурну і конформаційну свободу під час розробки специфічних лігандів. Враховуючи адаптаційну здатність і геномну пластичність мікобактерії, виникнення нових резистентних штамів є виключно питанням часу.

Слід зазначити, що більшість раніше відібраних протитуберкульозних препаратів була визначена шляхом прямого скринінгу хімічних сполук на культурах мікобактерії. Тобто, інгібуюча дія оцінювалась за летальністю для інтактної бактеріальної клітини, і у більшості сполук на момент відкриття, молекулярна мішень залишалась невідомою, а у окремих випадках невідома і досі (на приклад - етамбутол / Ethambutol = (2S,2’S)-2,2’-(Ethane-1,2-diyldiimino)dibutan-1-ol).

Зараз ситуація значно змінилася. Із появою нових методів раціонального драгдизайну і таргетного скринінгу пошук нових ліків став більш обґрунтовано прив'язаний до певних молекулярних мішеней. Це призвело до активного пошуку останніх, і у випадку мікобактерії, більшість нових перспективних мішеней належить ферментам, серед яких було визначено білки, що практично не мають структурних гомологів в протеомах ссавців. Також, с часом, було визначено, що деякі із раніше впроваджених протитуберкульозних препаратів (Rifampin, Isoniazid, Ethambutol, Moxifloxacin, тощо) аналогічним чином діють через ферменти мікобактерії [76]. Проте, незважаючи на більш селективну дію, і потенційно меншу токсичність для людини, адаптація до інгібіторів ферментів у бактерій відбувається значно скоріше, що знову призводить до появи резистентних штамів. Саме тому, все частіше, для лікування нових штамів туберкульозу

застосовують препараті, що мостять комбінацію діючих агентів [77]. Проте, у будь якому випадку, існування мультирезистентних штамів мікобактерії є фактом, що відбувся [77].

Таким чином, у нашому розумінні, ефективність протитуберкульозного препарату це не лише ефективність пригнічення мішені у ідеалістичних умовах *in vitro*, а комплекс умов, серед яких ключові позиції займають здатність проникати в клітину, унікальність мішені і знижена токсичність для організму пацієнта.

Саме тому ідея, що була сформульована ще під час написання запиту проєкту і остаточно сформувалася під час його виконання, ґрунтується на стратегії пошуку агентів, що мають таргетно діяти на 1) FtsZ і 2) на специфічні ферменти мікобактерії. На нашу думку, це передбачає подальше спільне використання визначених агентів у комбінаціях, де інгібітор FtsZ буде виконувати функцію не лише порушення клітинного поділу, а навіть скоріше, фактору, що буде допомогти другому, більш таргетному компоненту - інгібітору ферменту, долати бар'єр клітинної стінки бактерії. Це має значно скоротить час і дози агентів під час лікування, зменшить токсикологічне навантаження на пацієнта, і найважливіше, скоротить тривалість курсі лікування, що наряду із використанням комбінації діючих агентів, має зменшити вірогідність виникнення резистентності.

Ця задача охоплювала значно більший спектр молекулярних мішеней і методів, що у свою чергу, потребує переробки і вдосконалення раніше розробленого протоколу [26]. Слід зазначити, що на відміну від попередніх досліджень, де віртуальний скринінг ґрунтувався на результатах молекулярного докінгу і молекулярної динаміки, актуальний проєкт вимагав залучення кардинально нових протоколів, що враховували залучення методів хемоінформатики, фармакофорного пошуку і попереднього ранжирування речовин за властивостями. Також, застосований раніше протокол залучував лабораторне дослідження біоінформатично - визначених лідерів лише із використанням методів спектрофотометрії, що лише підтверджувало, або

спростовувало сам факт ліганд-білкової взаємодії у ідеалістичної моделі *in vitro*.

У протоколі актуального проєкту, наряду із методами спектрофотометрії, було залучено тестування сполук-лідерів на живих культурах вакцинних і польових штамів мікобактерії. Це надавало можливість перевірки результатів віртуального скринінгу не лише в умовах ідеалістичної моделі (молекулярний рівень), але і враховувало їх прижиттєву дію на рівні інтактної клітини мікобактерії в організмі.

Згідно із протоколом, першим етапом після визначення кола молекулярних мішеней і перспективних сайтів зв'язування лігандів, стала реконструкція просторових структур цільових білків і формування відповідної бібліотеки. Водночас, на підставі характеристик і властивостей опорних лігандів, було сформовано похідні бібліотеки лігандів. Основну увагу було надано відкритим бібліотекам репозиторіїв Zink і ChEMBL, що зокрема надають інформацію стосовно біологічної активності і хімічних властивостях опорних сполук, а також, бібліотекам, що ґрунтувалися на репозиторіях сполук українських компаній НВП «І.Ф.ЛАБ», ТОВ «НВП Єнамін» і ТОВ «НВП УКРОРГСИНТЕЗ», що надавало можливість замовлення зразків, або синтезу сполук-лідерів для остаточного дослідження на етапі лабораторного дослідження.

Як це позначено на рисунку 25.1 етап віртуального скринінгу включав операції, що виконувались із залученням молекулярної динаміки в Gromacs, а саме, оптимізацію молекулярних структур, верифікацію ліганд-білкових комплексів, визначення первинних конфірмацій, тощо, а також, віртуальний молекулярний скринінг, що ґрунтується на протоколах ліганд-білкового докінгу, хемоінформатичного і фармакофорного пошуку. Первинний цикл віртуального скринінгу дозволяв відбирати від 200 до 300 перспективних речовин для кожної молекулярної мішені.

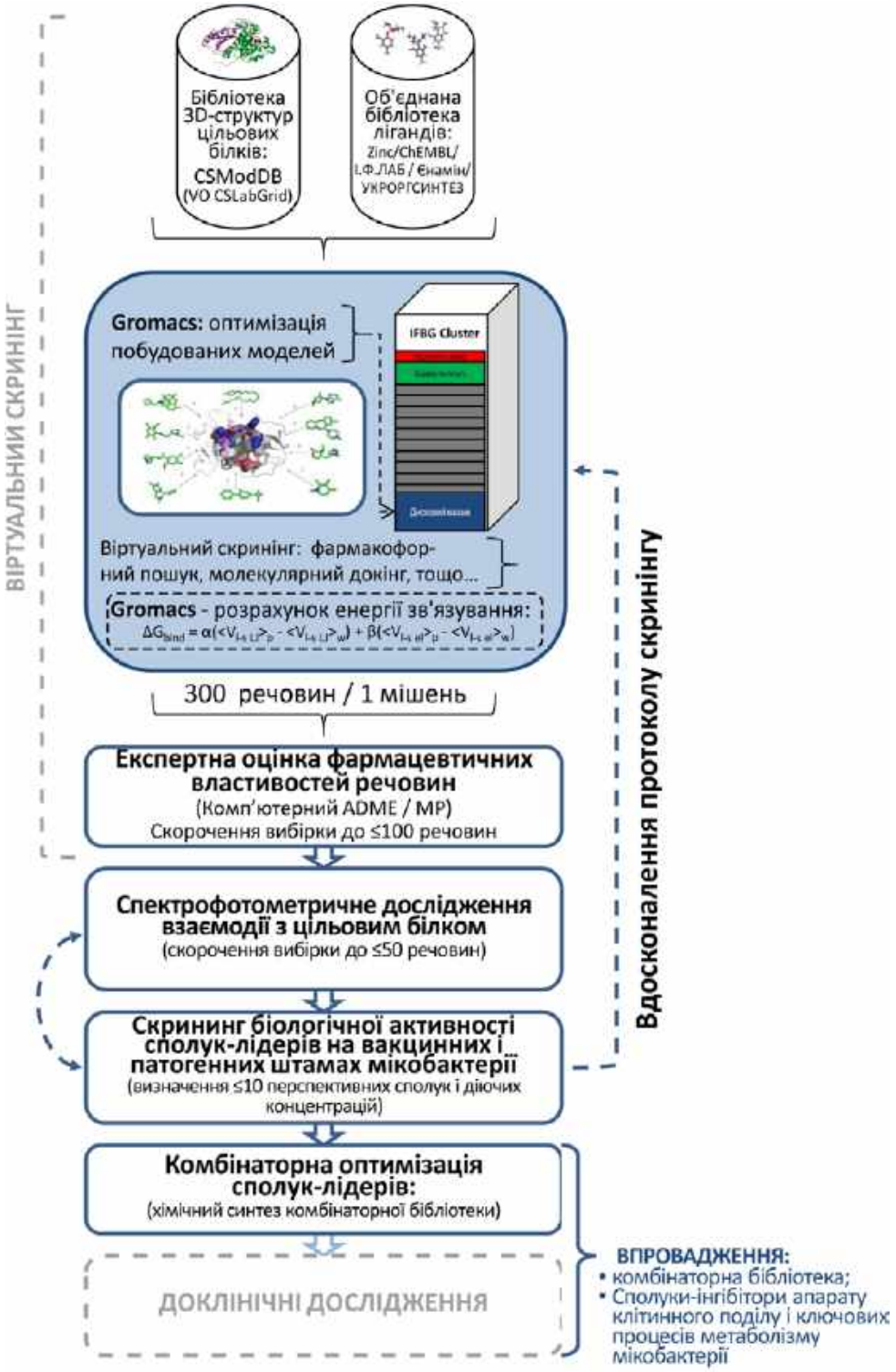


Рисунок 25.1 - Узагальнена схема повного протоколу високопропускного віртуального скринінгу і лабораторної верифікації нових протитуберкульозних агентів і формування комбінаторних бібліотек, що ґрунтуються на структурах визначених лідерів.

Наступна експертна перевірка за результатами прогнозу комп'ютерного ADME / молекулярні властивості (Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion / MP) скорочувала попередні вибірки до 50-100 речовин / 1 мішень. Це відсіювало речовини, що є потенційно токсичні для людини, або не здатні долати перепони клітинної мембрани.

На наступному етапі скринінгу виконувалась спектрофотометрична перевірка *in vitro*, що скорочувало вибірку до 10-50 речовин, і скринінг біологічної активності визначених сполук - лідерів на культурах вакцинних і патогенних штамів мікобактерії.

Ці етапи були ключовими для остаточного відбору найбільш перспективних сполук, визначали діючі концентрації і дозволяли вносити необхідні корекції у віртуальну частину протоколу з метою поліпшення алгоритму віртуального скринінгу.

За результатом виконання повного циклу зазначеного протоколу була визначена група сполук-інгібіторів апарату клітинного поділу і ключових процесів метаболізму мікобактерії. Використовуючи зазначені речовини як опорні, в межах проєкту, була сформована комбінаторна бібліотека, сильною стороною якої є відома молекулярна мішень і сайт ліганд-білкової взаємодії.

Визначення сполук, що належать до першої лінії офіційно-впроваджених протитуберкульозних препаратів і потенційних альтернативних молекулярних мішеней протеому людини. Як відправну крапку пошуку було використано інформацію з NCBI Bookshelf "Antitubercular Medications" (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557666/?report=printable), що курується National Institutes of Health (www.nih.gov). Згідно офіціальному реєстру, до актуального списку протитуберкульозних препаратів першої лінії належать лише чотири сполуки: рифампін, ізоніазид, піразинамід і етамбутол (Табл. 25.1). Наступний аналіз здійснювався шляхом перехресного аналізу інформації баз даних RCSB Protein Data Bank, UniProtKB, ChEMBL і PubChem. Метою аналізу було визначення

пріоритетних молекулярних мішеней зазначених сполук в клітинах мікобактерії і людини. Було визначено існування експериментальних PDB-комплексів рифампіцину - RFP (5UHG, 5UHD, 5UHB, 5UH6, 5UHC), ізоніазиду - ZID (4TRO, 2NV6, 2IDZ), піразинаміду - PZA (5FPD) і етамбутолу - 95E (7BVF). Інформація з RCSB Protein Data Bank вважалась пріоритетною.

Таблиця 25.1 – Узагальнення результатів пошуку пріоритетних молекулярних мішеней офіційно-впроваджених протитуберкульозних препаратів першої лінії в клітинах мікобактерії і людини.

Сполука	PDB Ligand ID:	Молекулярна мішень в клітині мікобактерії	PDB ID:	Молекулярна мішень в клітині людини	UniProtKB
First Line					
Rifampin	RFP	«reversibly inhibiting DNA-dependent RNA polymerase **rpoB»** = (DNA-directed RNA polymerase subunit beta) = P9WGY9 (RPOB_MYCTU)	5UHG 5UHD 5UHB 5UH6 5UHC	**RCSB: Protein Data Bank** PDB: 1SKX - Structural Disorder in the Complex of Human PXR and the Macrolide Antibiotic Rifampicin	O75469 (NR1I2_HUMAN) Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2
Isoniazid	ZID	«inhibiting the biosynthesis of mycolic acid **inhA»** = Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] = P9WGR1 (INHA_MYCTU)	4TRO 2NV6 2IDZ	**SIB Blast** Q9BY49 (PECR_HUMAN)=Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PECR Identities = 71/278 (26%), Positives = 113/278 (41%), Gaps = 44/278 (16%)	Q9BY49 (PECR_HUMAN) Низька вірогідність
Pyrazinamide	PZA	Н.д.> за гомологією: HSP72_HUMAN ‣ **SIB Blast** > P9WMJ9 (DNAK_MYCTU) = **Chaperone protein DnaK** = dnaK Rv0350, MTCY13E10.10	AF-P9WMJ9-F1 (AlphaFold)	**RCSB: Protein Data Bank** 5FPD=Structure of heat shock-related 70kDA protein 2 with small-molecule ligand pyrazine-2-carboxamide (AT513) in an alternate binding site (**CHAPERONE**) = P54652 (HSP72_HUMAN)	P54652 (HSP72_HUMAN)
Ethambutol	95E	inhibits the enzyme arabinosyltransferases embA = Probable arabinosyltransferase A = P9WNL9 (EMBA_MYCTU)	7BVF	**RCSB: Protein Data Bank** 5NR3 = Human DNMT3B PWWP domain in complex with ethambutol = DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B = Q9UBC3 (DNM3B_HUMAN)	Q9UBC3 (DNM3B_HUMAN)

Таким чином, за результатами дослідження, було визначено відомі, або потенціальні молекулярні мішені. Так, у випадку рифампіну, мікобактеріальною мішенню є зворотня ДНК-залежна РНК-полімераза (rpoB) і представник підродини ядерних рецепторів NR1I2. У випадку ізоніазиду, експериментально-доведеною молекулярною мішенню є inhA, при цьому, явні гомологи в протеомі людини відсутні. При цьому, найближчим білком згідно із звітом Blast є пероксисомальна транс-2-еноіл-КоА-редуктаза.

У випадку піразинаміду існує кристалографічне підтвердження взаємодії цієї сполуки і шаперону HSP72 людини. Аналогічні дані для мікобактерії зараз відсутні, проте, протитуберкульозна дія піразинаміду була підтверджена шляхом тестування на живих культурах мікобактерії. Наступний пошук бактеріальних гомологів визначив мікобактеріальний шаперон DnaK як пріоритетну молекулярну мішень. Аналогічна ситуація спостерігалася і у випадку етамбутолу, для якого існують PDB-структури комплексів з DNMT3B людини, і, незважаючи на доведений інгібіторний ефект на культури мікобактерії, молекулярна мішень і досі залишається невідомою. Наступне сканування протеому мікобактерії, визначило потенційну арабінозилтрансферазу А (embA) як найбільш імовірну молекулярну мішень етамбутолу.

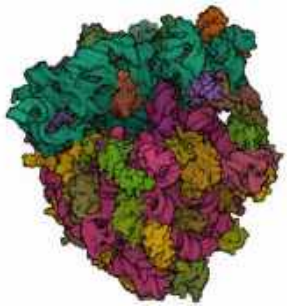
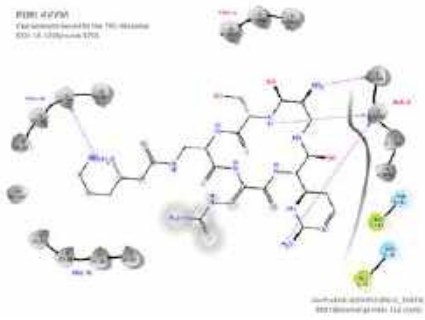
Визначення сполук що на 2021 рік належать до другої лінії «Second Line» офіційно-впроваджених протитуберкульозних препаратів і дослідити можливість існування альтернативних молекулярних мішеней у протеомі людини. Відправною крапку пошуку була інформація NCBI Bookshelf «Antitubercular Medications» (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557666/?report=printable), що курується National Institutes of Health (www.nih.gov). Згідно офіціальному реєстру, до офіційного списку протитуберкульозних препаратів другої лінії зараз належать чотири сполуки: канаміцин, стрептоміцин, поліпептиди

капреоміцин, амікацин, левофлоксацин ((S)-офлоксацин або кравіт) і моксифлоксацин (BAY 12-8039) (Табл. 25.2)

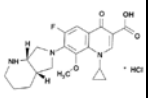
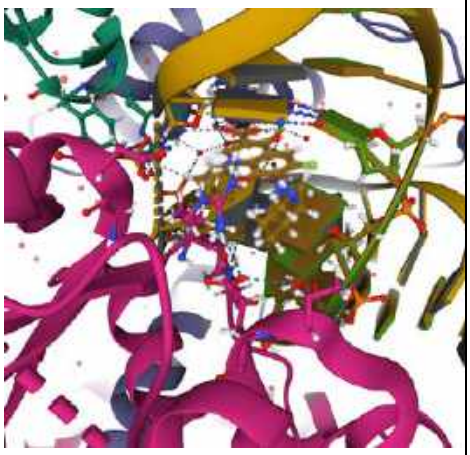
За результатами дослідження, було визначено відомі, або потенціальні молекулярні мішені. Так, у випадку канаміцину, підтверджено існування двох мікобактеріальних мішеней - рибосомальної субодиниці 30S і аміноглікозид-трансферазного комплексу. Водночас, зазначена сполука взаємодіє з мішечною L-ацетат дегідрогеназою людини, що підтверджується даними кристалографії (PDB: 4OKN). У випадку стрептоміцину, інгібуюча дія пов'язана з впливом на біосинтез білку, через зв'язування з рибосомальною субодиницею 30S. При цьому, як і у випадку канаміцину, так і у випадку стрептоміцину, молекулярні мішені гомологічні бактеріальної 30S зараз не відомі. Ще одна сполука з переклику протитуберкульозних ліків другої лінії - капреоміцін, спрямована на порушення функціонування рибосомального комплексу бактерій, що реалізується за рахунок зв'язування з субодиницями 30S, 50S і 70S. Так, зараз існує кристалографічно-доведений комплекс капреоміцину з бактеріальною субодиницею 70S (PDB: 4V7M, 3KNL, 3KNM, 3KNN, 3KNO). Згідно аналізу зазначених комплексів, зв'язування капреоміцину з рибосомою відбувається за рахунок взаємодії з складним сайтом, що утворюється 30S-рібосомальним протеїном S12, tRNA-Gln, а також, субодиницями рРНК 16S і 23S. Гомологічні структури у випадку людини зараз не відомі.

Біохімічно доведено, що інгібування культур мікобактерії відбувається шляхом аміксоцін-залежного пригнічення рибосом, через зв'язування з субодиницею 30S. Це підтверджується існуванням відповідних комплексів з зазначеними мішенями інших бактерій, але, мікобактеріальні комплекси зараз не відомі. Також відсутні кристалографічні дані ліганд-білкових взаємодій для мішеней людини. Проте, відомо існування токсичного ефекту аміксоціну на пацієнтів.

Таблиця 25.2 – Узагальнення результатів пошуку пріоритетних молекулярних мішеней офіційно-впроваджених протитуберкульозних препаратів другої ліній в клітинах мікобактерії і людини.

Сполука	PDB Ligand ID:	Молекулярна мішень в клітині мікобактерії	PDB ID:	Молекулярна мішень в клітині людини
1	2	3	4	5
Kanamycin * (канаміцин)	KAN	1. binding to the 30S subunit of ribosomes and inhibiting the protein synthesis 2. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*- Complex with Coenzyme A and Kanamycin A=aac = Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase Gene = P9WQG9 (AAC2_MYCTU)	- 1M4I	- 4OKN = Crystal structure of human muscle L-lactate dehydrogenase, ternary complex with NADH and oxalate = L-lactate dehydrogenase A chain - P00338 (LDHA_HUMAN)
Streptomycin	SRY	binding to the 30S subunit of ribosomes and inhibiting the protein synthesis	За гомологією	-//-
Capreomycin (полипептид) CHEMBL2221250 Capreomycin and viomycin are structurally similar antibiotics and both inhibit bacterial protein synthesis by binding to 30S, 50S and 70S ribosomal subunits.	PDB: PRD_000193	PDB: 4V7M (The structures of Capreomycin bound to the 70S ribosome.)   70S ribosome in complex with three tRNAs and bound to capreomycin [DOI: 10.1038/nsmb.1755; DOI: 10.1128/AAC.00628-11] **DrugBank Accession Number: DB00314** –	4V7M Попередні депонування: 3KNL, 3KNM, 3KNN, 3KNO 30S-рібосомальний білок S12 16S-рібосомальна RNA: MT431442.1 *Mycobacterium tuberculosis* strain Ahvaz-F98 tRNA-Gln	-//- -//- -//-

1	2	3	4	5
		Little is known about capreomycin's exact mechanism of action, but it is thought to inhibit protein synthesis by binding to the 70S ribosomal unit. Capreomycin also binds to components in the bacterial cell which result in the production of abnormal proteins. These proteins are necessary for the bacteria's survival. Therefore the production of these abnormal proteins is ultimately fatal to the bacteria. 30S-ribosomal protein S12 16S-ribosomal RNA: MT431442.1 Mycobacterium tuberculosis strain Ahvaz-F98 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		
Amikacin (Амікацин)	AKN	Зв'язується з 30S-субодиницією рибосом і пригнічує синтез білку. **RCSB PDB:** Acinetobacter baumannii ATCC 19606 = CIP 70.34 = JCM 6841 (6YPU) Providencia stuartii (6VTA) Staphylococcus aureus (6CGD) synthetic construct (4P20) Має бактеріостатичну дію на *Mycobacterium tuberculosis*, стійкі до стрептоміцину, ізоніазиду, ПАСК та інших протитуберкульозних ЛЗ (крім віоміцину та капреоміцину). Амікацин не втрачає активності під дією ферментів, що інактивують інші аміноглікозиди, і може залишатися активним щодо штамів стійких до тобраміцину, гентаміцину та нетилміцину.	-//-	**Мишени невідомі.** Не метаболізується. Зв'язування з білками плазми 4-11 %. Долає плацентарній бартер. Бічна дія: з боку харчової системи: нудота, блювання, порушення функціонування печінці (пригнічення активності печіночних трансаміназ, гіпербілірубінемія); з боку системи кровотворення: анемія, лейкопенія, гранулоцітопенія, тромбоцитопенія; З боку ЦНС і периферичної нервової системи: головна біль, сонливість, нейротоксична дія (судоми м'язів, анемія, епілептичні припадки), порушення нервово-м'язової передачі (зупинення дихання); з боку органів чуття: ототоксичність, токсична дія на вестибулярний апарат; з боку сечової системи: нефротоксичність, олігурія, протеїнурия, мікрогематурія; Алергія: кожний сип, свербіж, гіперемія шкіри, лихорадка, набряк Квінке.

1	2	3	4	5
Levofloxacin (S)-ofloxacin or cravit	LFX	• gyrB (P9WG45, GYRB_MYCTU) - DNA gyrase subunit B (type II topoisomerase) = 5BTI (5BS8, 5BTA, 5BTC, 5BTD, 5BTF, 5BTG, 5BTI, 5BTL, 5BTN); • inhibiting DNA gyrase and topoisomerase IV("?") Блокирует ДНК-гиразу (топоизомеразу II) и топоизомеразу IV, нарушает суперспирализацию и сшивку разрывов ДНК, подавляет синтез ДНК, вызывает глубокие морфологические изменения в цитоплазме, клеточной стенке и мембранах бактерии.	5BTI 5BTG	Поза організму людини, левофлоксацин проявляє себе як потенційно токсична сполука. На сьогодні молекулярні мішені левофлоксацину в клітинах людини невідомі.
Moxifloxacin = BAY 12-8039 “a new 8-methoxyquinolone with activity against Gram-positive cocci and anaerobic bacteria” 	MFX	Інгібує: ДНК-гіразу, топоізомеразу II і IV  Сайт зв'язування утворюється субодиницями A та B, а також дволанцюжковою ДНК. Діє шляхом інгібування ДНК-гірази, топоізомерази типу II і топоізомерази IV - ферментів, необхідних для поділу бактеріальної ДНК, тим самим пригнічуючи реплікацію клітин.	5BS8, 5BTA, 5BTN, 5BTL, 5BTF, 5BTD, 5BTI, 5BTG, 5BTC	Незважаючи на певні алергічні реакції і наявність в клітині людини гомологів зазначених білків, ділянки цільових сайтів мають значні відмінності амінокислотного складу, що обумовлює відсутність ліганд-білкової взаємодії з білками людини.

Левофлоксацин (Levofloxacin = (S)-ofloxacin = cravit) - фторхінолон, що блокує ДНК-гіразу (топоізомеразу II) та топоізомеразу IV, порушує суперспіралізацію та зшивання розривів ДНК, пригнічує синтез ДНК, викликає глибокі морфологічні зміни в цитоплазмі, клітинній стінці та

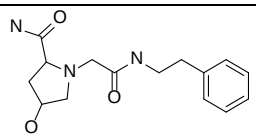
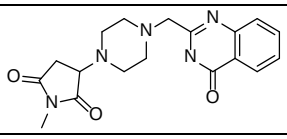
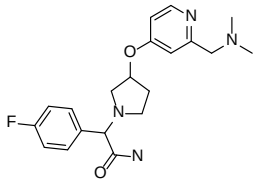
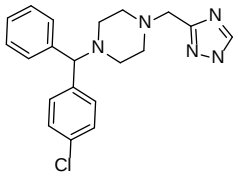
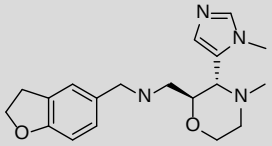
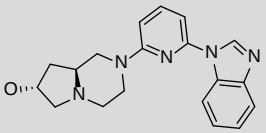
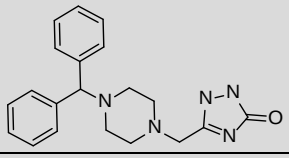
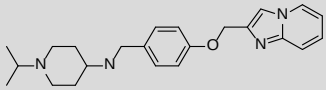
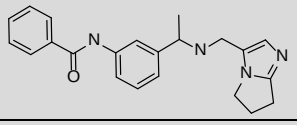
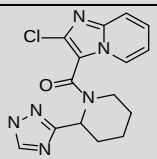
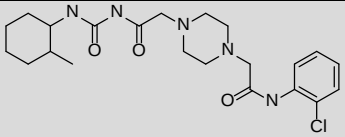
мембранах бактерії. Незважаючи на інформацію стосовно існування бічних ефектів і алергічних реакцій, пріоритетні молекулярні мішені в клітинах ссавців зараз невідомі.

Моксіфлоксацін (Moxifloxacin, BAY 12-8039) інгібує ДНК-гіразу і топоізомеразу IV. Незважаючи на певні алергічні реакції і наявність в клітині людини гомологів зазначених білків, ділянки цільових сайтів мають значні відмінності амінокислотного складу, що обумовлює відсутність ліганд-білкової взаємодії з білками людини.

Відбір сполук, що під час лабораторного дослідження проявили біологічну дію на вакцинному і польовому штамах мікобактерії, а також, результати біохімічного підтвердження їх взаємодії з цільовими білками. Відповідні похідні бібліотеки сполук-лідерів, в межах актуального проєкту були отримані для всіх молекулярних мішеней, що були визначені на початку проєкту. Проте, враховуючи складність і коштовність експериментального підтвердження, остаточні лабораторні дослідження було виконано для групи сполук, що були визначені як потенційні ефектори FtsZ і сульфгідрилаз (CysK1 та CysM). Загалом, за результатами експериментальної перевірки в межах актуального проєкту, біологічна активність була доведена для 25 речовин, що були визначені як остаточні лідери. Як було зазначено раніше, дослідження, здійснювалось із використанням живих культур (вакцинний і патогенні штами) і біохімічного аналізу безпосередньої взаємодії з молекулярною мішенню.

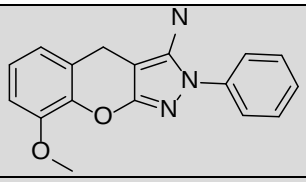
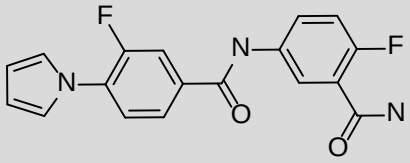
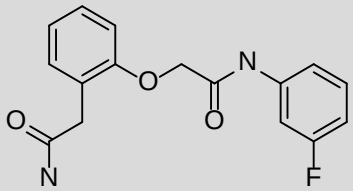
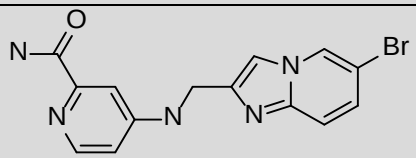
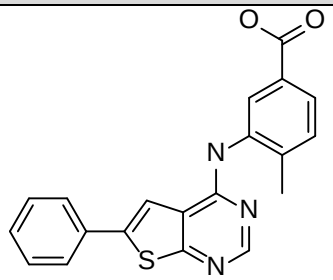
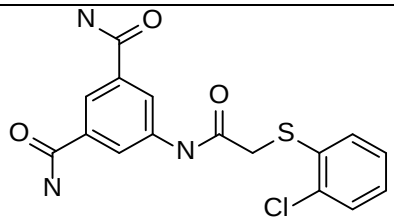
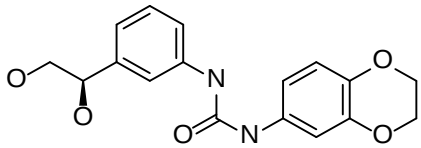
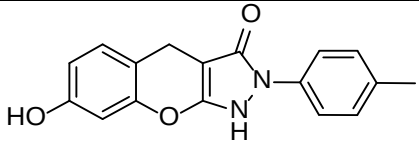
З 25 відібраних речовин, найбільшу перспективну дію мали 13 (Табл. 25.3 і 25.4). При цьому було визначено 9 лідерів: Z2381723313 (XIV), Z2973191210 (XIII), Z1567270599 (XII), Z141584328 (XI), Z2589562532 (X), Z1574680729 (IX), Z65190667 (VIII), KS13384 (9) і Z64576265 (42/50) (Табл. 25.3 і 25.5), активність яких була підтверджена як на живих культурах так і на цільових білках.

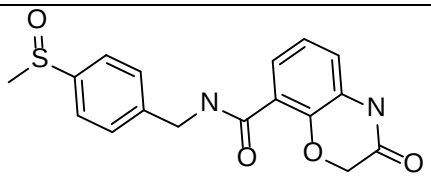
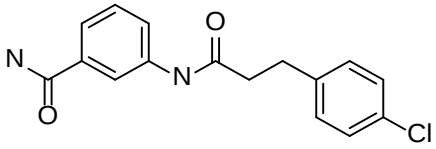
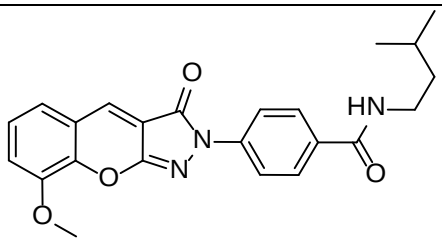
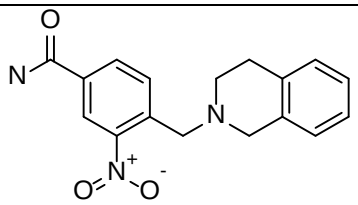
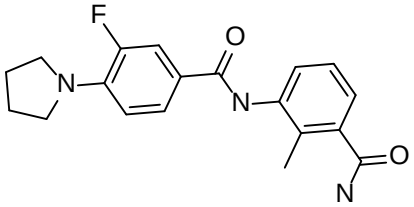
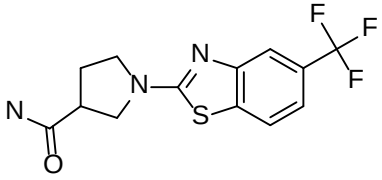
Таблиця 25.3 – Результати впливу на ріст культури мікобактерії, лідерів, що були визначені за результатами віртуального скринінгу, які підтвердили свою здатність інгібувати полімеризацію FtsZ

ID	Structure	Concentration os substance in medium μg/ml					
		80	40	20	10	5	2,5
Z105863984 (XXI)		N/A	+	-	-	-	-
Z232378082 (XIX)		+	-	-	-	-	-
Z1759934893 (XVI)		+	+	-	-	-	-
Z2599752817 (XV)		+	+	+	-	-	-
Z2381723313 (XIV)		+	+	+	+	-	-
Z2973191210 (XIII)		+++	++	-	-	-	-
Z1567270599 (XII)		+++	++	-	-	-	-
Z141584328 (XI)		+++	++	-	-	-	-
Z2589562532 (X)		+++	+	-	-	-	-
Z1574680729 (IX)		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Z65190667 (VIII)		+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ ≤ 20 colonies; ++ single colonies;+++ absence of growth

Таблиця 25.4 – Речовини, що проявили здатність інгібувати полімеризацію в моделі FtsZ з *Staphylococcus aureus*

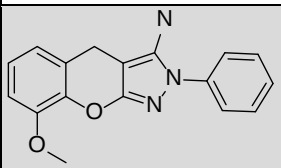
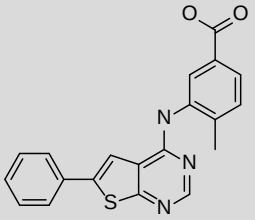
ID	Structure	% інгібування при концентрації		
		1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
KS13384		**3**	**26**	**39**
Z1126833954		**4**	**31**	**43**
Z1454498428		**3**	**28**	**41**
Z5027530097		**2**	**23**	**39**
Z64576265				
Z18459099		2	21	37
Z5027530244		2	21	34
C201-1785		2	21	29

EN300-26819293		2	19	31
Z192888140		2	25	36
KS26817		2	21	33
Z5027530017		2	23	31
Z1144101057		2	15	29
Z5027530051		1	10	16

С зазначених речовин, 7 сполук визначили здатність взаємодіяти з FtsZ, а 2 речовини (KS13384 (9) і Z64576265 (42/50)) підтвердили здатність інгібувати сульфгідрилази. (Табл. 25.5).

При цьому сполука KS13384 в наших експериментах проявила активність як у випадку сульфгідрилаз, так і під час дослідження її впливу на полімеризацію FtsZ *Staphylococcus aureus*. Інша сполука - Z64576265 проявила активність виключно як специфічний інгібітор сульфгідрилаз. Водночас, із підтвердженням активності на культурах мікобактерії, сполуки KS13384 і Z64576265 визначалися як найбільш перспективні речовини актуального проєкту і як лідери подальшої комбінаторної модифікації.

Таблиця 25.5 – Результати впливу на рост культури мікобактерії, лідерів, що були визначені за результатами віртуального скринінгу, які підтвердили здатність інгібувати активність мікобактеріальних сульфгідрилаз (CysK1 та CysM)

		40 μg/ml	8 μg/ml	1.6 μg/ml	0.32 μg/ml
KS13384 (9)		++	++	-	-
Z64576265 (42/50)		**+++**	**-**	-	-

+ ≤ 20 colonies; ++ single colonies;+++ absence of growth

Відповідна похідна бібліотека була створена в межах проєкту, і пропонується як базовий вектор подальшої структурної оптимізації протитуберкульозних агентів, що діють за механізмом ліганд-залежної дисфункції сульфгідрилаз CysK1 і CysM. Інші з визначених лідерів підтвердили свою активність через взаємодію з FtsZ (Табл. 25.3).

Водночас перевірка 168-мі біоінформатично-визначених лідерів, із використанням *in vitro* моделі на основі FtsZ з *Staphylococcus aureus*, визначила 14 сполук, що мають інгібуючий вплив на полімеризацію Z-кільця. При цьому, чотири речовини з тестової групи визначались як беззаперечні лідери: KS13384, Z1126833954, Z1454498428 і Z5027530097 (Табл. 25.5). З позиції можливого подальшого впровадження, беззаперечно заслуговують уваги, оскільки раніше ніколи не були описані ні як інгібітори FtsZ, ні як можливі антибактеріальні агенти. Водночас зазначені агенти визначили гарні показники інгібування ГТФ-азної активності FtsZ-білку (за методом Fung-Yi Chan, 2013) [64], що визначає їх як лідерів зазначеного скринінгу за обома показниками: здатністю інгібувати полімеризацію (формування Z-кільця) і здатністю пригнічувати гідроліз ГТФ (Рис. 25.2, 25.3). Водночас, виконане порівняння результатів експерименту і

найкращих показників докінгу речовин, що входять до «скаффолду» визначених лідерів, дозволяє нам зробити припущення, що зв'язування речовин зазначеної групи відбувається у аллостеричному сайті, що формується спіраллю «Helix 7», петлею T7 і С-кінцевим доменом бактеріального FtsZ.

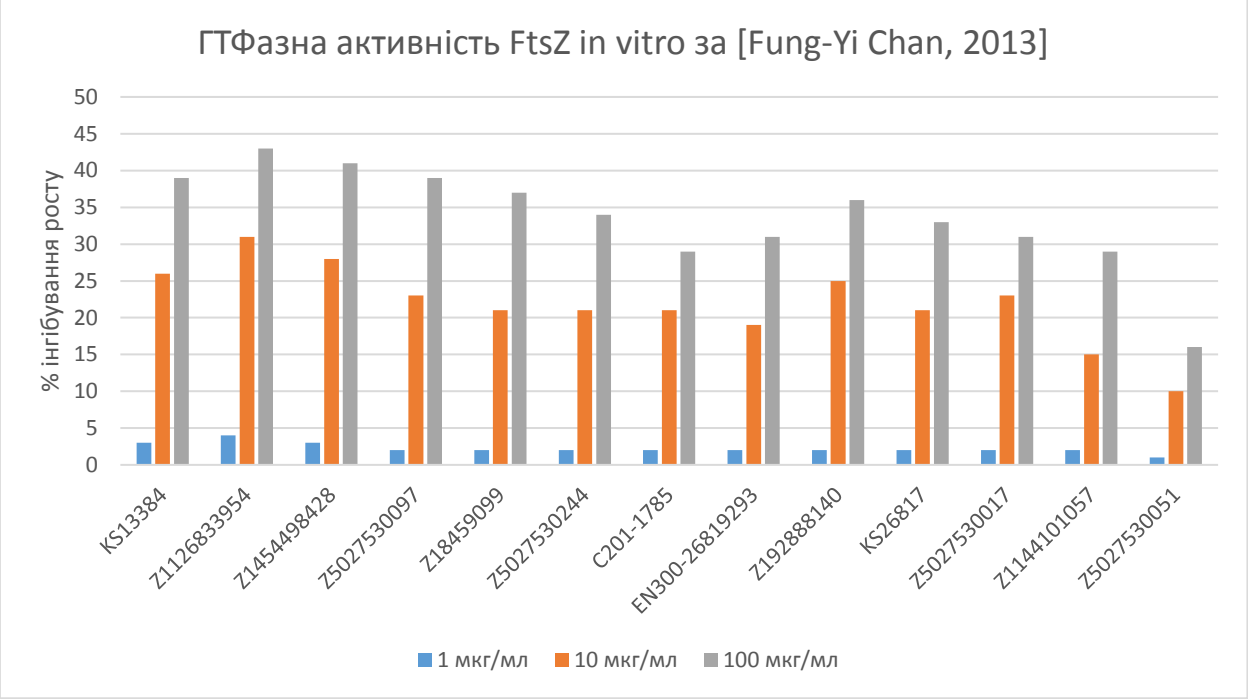


Рисунок 25.2 - Підтвердження здатності визначених інгібіторів полімеризації FtsZ пригнічувати ГТФ-азної активності в моделі в моделі білку з *Staphylococcus aureus* (за методом Fung-Yi Chan, 2013).

Узагальнюючи результати експериментальної перевірки здатності відібраних сполук пригнічувати ріст живих культур мікобактерії і отриманої інформації стосовно молекулярних механізмів їх ліганд білкової взаємодії, ми вправі зробити певні висновки стосовно можливостей наступного використання визначених агентів.

На актуальної стадії дослідження, перш за все, нами розроблені значні за об'ємом похідні бібліотеки протитуберкульозних сполук, і визначено скаффолди речовин, що мають міцне теоретичне і експериментальне обґрунтування біологічної дії.

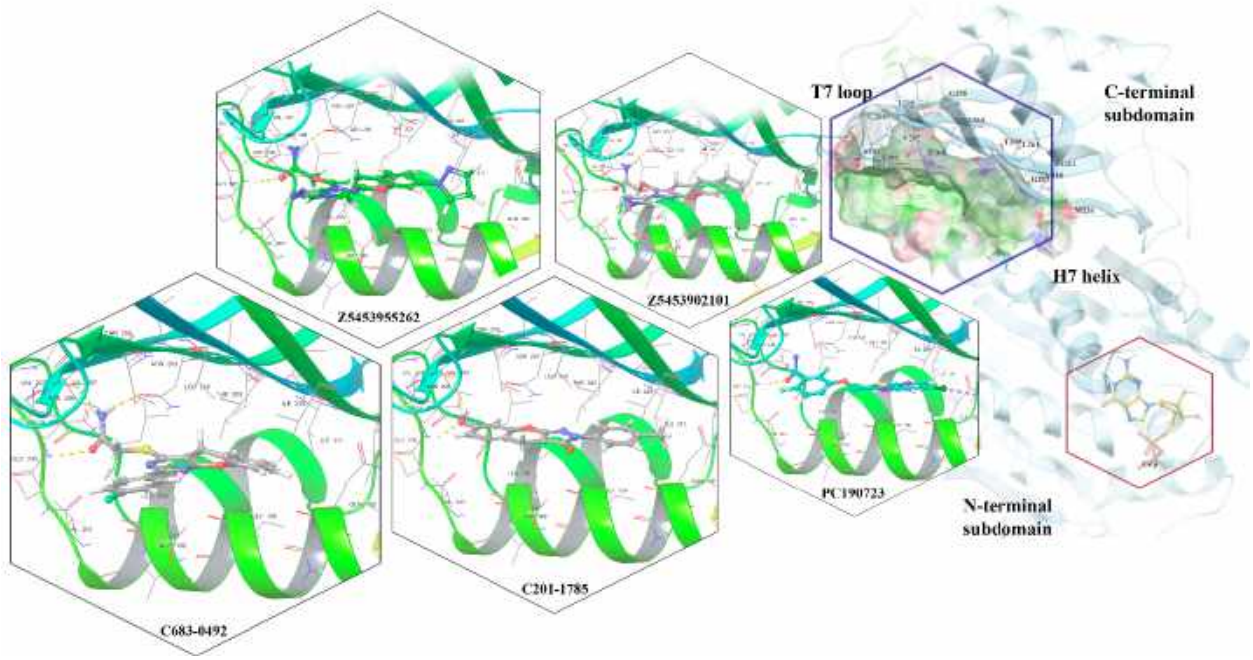


Рисунок 25.3 – Структури, що входять до бібліотеки «скаффолду» визначених інгібіторів FtsZ *Staphylococcus aureus* і мають найвищі показники оцінювальних функцій, що дозволяє визначити зазначені речовини як ліганди алостеричного сайту (формується спіраллю Helix7, T7 петлею і С-кінцевим доменом (позначено фіолетовою рамкою), сайт ГТФ позначено червоною рамкою).

Взагалі, отримані дані, визначають стратегічний вектор подальшого раціонального дизайну протитуберкульозних сполук, що спрямовані саме на унікальні молекулярні мішені мікобактерії. Так, в межах проєкту, відповідні бібліотеки було розроблено для всіх пріоритетних мішеней, що були визначені на 1 етапі проєкту. Проте в наслідок об'єктивних технічних і ресурсних обмежень, повний цикл запропонованого нами гібридного - віртуального, біохімічного і біологічного скринінгу у актуальному проєкті було зроблено лише для мішеній, пріоритет яких нами було визначено на стадії біоінформатичних досліджень.

З точки зору визначених лідерів, вважаємо, що їх подальше впровадження має здійснюватися як потенційного двокомпонентного препарату, де ключова біологічна активність покладається на інгібітори

мікобактеріальних сульфгідрилаз CysK1 та CysM (KS13384 і Z64576265). При цьому, другим компонентом має стати одна з сполук, що проявила активність проти FtsZ-білку. Останні, на нашу думку, не лише забезпечать певний вплив на апарат клітинного поділу мікобактерії, але також мають послабити механічний бар'єр мікобактеріальної клітинної стінки (і відповідно мікобактеріальної плівки), до синтезу якої FtsZ має безпосереднє відношення. При цьому, на нашу думку, компонент спрямований на сульфгідрилази має домінувати, що обумовлюється потенційною відсутністю гомологічних мішеней у протеомі ссавців. Агенти спрямовані на FtsZ мають бути використані у меншої концентрації, що обумовлено більшим ризиком альтернативних взаємодій з боку протеому людини, і вперш за все, певною структурною гомологією FtsZ бактерій і тубуліну.

Також, всі відібрані інгібітори сульфгідрилаз і FtsZ будуть залучені у процес раціонального драгдизайну, як відправні крапки синтезу більш ефективних протитуберкульозних агентів і формування похідних бібліотек за результатами скринінгу.

26 ПІДГОТОВИТИ ЗВІТИ ТА НАУКОВІ ПУБЛІКАЦІЇ (ВСІ ОРГАНІЗАЦІЇ)

Успішне виконання даного проєкту обумовлено тим, що всі представники робочої групи є фахівцями, що мають величезний досвід досліджень та розробок у різних галузях біоінформатики, органічної та аналітичної хімії, молекулярної генетики, геноміки, клітинної біології, а також ветеринарії та епізоотології.

Задля поставленої мети були використані методи хемо- і біоінформатики, біохімічного і молекулярно-генетичного дослідження та методи з верифікації отриманих результатів із використанням молекулярно-генетичних досліджень, мікробіологічних досліджень, тощо.

Специфіка проведення досліджень передбачала використання високотехнологічного обладнання, тому у рамках договорів про співпрацю у авторського колективу був доступ до всього необхідного обладнання та матеріально-технічної бази.

Даний проєкт об'єднує досвід і ресурси трьох дослідницьких груп і є принципово новим науковим продуктом замкнутого циклу, поєднуючи біоінформатичні розрахунки, цільовий хімічний синтез, верифікацію в умовах *in vitro* та *in situ* та ІТ-підтримку у реальному часі. Так персональним вкладом кожного учаснику проєкту було:

- Завідувач лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ, д.б.н., старш. наук. спів. ***Павло Карпов*** - Керівник проєкту. Формування загальної ідеології проєкту, реферату, вступу та обгрунтування результатів і висновків. Створення алгоритму оцінки якості ферментів. Розробка фармакофорних гіпотез ліганд-залежного інгібування мікобактеріальної шикіматної кінази aroK та аланін рацемази.
- Наук. спів. лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ, к.б.н. ***Дарія Самофалова*** - відповідальний виконаввець проєкту. Формування робочої програми та технічого завдання. Проведення

високопропускного скринінгу на попередньо розроблених фармакофорних та докінгових моделях задля створення бібліотек речовин проти ENR, DrpE, FAAL, PanC. ADMET та дослідження токсикологічної дії сполук- кандидатів

- Мол. наук. спів. лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ, к.б.н. ***Олексій Раєвський*** - відповідальний виконаввець проєкту. Розробка нових методів та алгоритмів біоінформатичних досліджень. Проведення високопропускного скринінгу на попередньо розроблених фармакофорних та докінгових моделях, розробка бібліотек речовин проти FTsZ, CysK1/M, BioA та rmlC. Створення та валідація QSAR моделей.
- Старш. наук. спів. лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ, к.б.н. ***Світлана Співак*** – підготовка хімічних баз даних для виконання віртуального скринінгу та молекулярного докінгу, розробка бібліотек для альдолаз типу 2 (FBA). Також оформлення та узгодження наукової і фінансової, договірної, звітної та супутної документації.
- Старш. наук. спів. лабораторії біоінформатики та структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ, к.б.н. ***Сергій Ожерєдов*** – реконструкція просторової структури мішеней та докінг референтних сполук для вивчення особливостей взаємодії молекул, розробка бібліотек речовин для бета-лактамази. Також закупівля матеріалів необхідних для виконання дослідницької роботи, оформлення та супровід тендерної документації, перемовини та координація дій з контрагентами.
- Старш. наук. спів. відділу № 6 хімії біологічно активних речовин Інституту органічної хімії, к.х.н. ***Олександр Борисов*** - хімічний синтез, аналіз опорних та скринінг інгібувальної дії новосинтезованих сполук.
- Наук. спів. відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії НАН України, к.б.н. ***Дмитро Лабудзинський*** - біохімічний скринінг інгібувальних властивостей перспективних сполук *in vitro*.
- Завідувач відділу молекулярно-біологічних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК, Національного

університету біоресурсів та природокористування України, старш. наук. спів., к.в.н. ***Людмила Іщенко*** – Підбір праймерів для диференційної ідентифікації вакцинного штаму *M. bovis* і *M. tuberculosis* complex та проведення їх апробацію, перевірено різні протоколи екстракції ДНК із мікобактерій, оптимізовано параметри ПЛР реакції, виділення польового штаму *M.bovis* із об'єктів навколишнього середовища.

- Доцент кафедри акушерства факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів та природокористування України, наук. спів., к.в.н. ***Валерій Мазур*** - Приготування серійних розведень хімічних сполук у середовищі Левенштейна-Єнсена для тестування протимікробних властивостей. Огляд та аналіз епізоотичної та епідеміологічної ситуації щодо туберкульозу впродовж 2001-2021 рр.
- Завідувач наково-дослідного відділу мікробіологічних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК, Національного університету біоресурсів та природокористування України, старш. наук. спів., д.в.н. ***Лілія Виговська*** - Тестування протимікробних властивостей досліджуваних сполук методом абсолютних концентрацій у середовищі Левенштейна-Єнсена щодо їх інгібуючих властивостей на вакцинному та польовому штамі *M. bovis*.
- Завідувач відділу комп'ютерного забезпечення наукових досліджень і науково-технічної інформації Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова, к.т.н. ***Сергій Свістунов*** - ІТ-підтримка у реальному часі, створення алгоритмів, налаштування Грід-інфраструктури та оновлення кластеру ДУ "ІХБГ НАН України".

Також на безоплатній основі до наукової роботи було залучено аспірантів та студентів, з них варто відзначити магістрів 2го року навчання Київського національного університету імені Тараса Шевченка ***Марію Стихиляс*** (біоінформатичні дослідження), ***Олександру Старокадомську*** (мікробіологічні дослідження) та аспіранта 1го року ДУ "ІХБГ НАН України" ***Іллю Булгакова*** (молекулярно-біологічні дослідження).

Частина матеріалів проєкту була опублікована на офіційному сайті ДУ «ІХБГ НАН України», залучена до навчання студентів Київського національного університету імені Тараса Шевченка освітнього рівня «магістр» та подана до фахових виданнь, зокрема журналів 1-2 кварталів, вітчизнятих та закордонних конференцій:

- Rayevsky O., Samofalova D., Ishchenko L., Vygovska L., Labudzynskyi D.O., Borysov O., Mazur V., Stykhylias M., Bulgakov I., Blume Ya.B., Karpov P. Structure-based virtual screening and biological evaluation of novel inhibitors of mycobacterium Z-ring formation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2021 (in print).
- Samofalova D, Balabon O. Identification of novel potential inhibitors of DPRE1 from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. 3rd *Molecules Medicinal Chemistry Symposium—Shaping Medicinal Chemistry for the New Decade* (MMCS2022), Rome, Italy, 16-18 February 2022 (in print).
- Borysov O.V., Gorobets N.Yu., Volochnyuk D.M., Karpov P.O., Ryabukhin S.V., Zhuravel' I.O., Kovalenko S.M., Rusano E.B., Samofalova D., Rayevsky O., Labudzynskyi D., Spivak S., Ozheredov S., Ishchenko L., Vygovska L., Mazyr V. Efficient Parallel Synthesis of Diverse and Druglike Library of the dihydrobenzopyrano[2,3-c]pyrazole. *Molecular Diversity*. 2021 (in print).
- Самофалова Д.О., Раєвський О.В., Ожерєдов С.П., Співак С.І., Стихиляс М.М., Ожерєдов Д.С., Карпов П.А. Аналіз механізмів взаємодії основних мішеней таргетної терапії туберкульозу з їх селективними інгібіторами // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2021. т.28. https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1390.
- Borysov O.V., Karpov P.A., Rayevsky O.V., Samofalova D.O., Spivak S.I., Ozheredov S.P., Labudzynskyi D.O., Volochnyuk D.M., Voloshchuk V.V., Pendyukh V.V., Ishchenko L.M., Vygovska L.M., Mazyr V.M. Creation of new effective inhibitors of Z-ring formation in order to obtain anti-tuberculosis drugs with antimitotic action. *OrgMedChem Symposium 2021*. September 19-25, 2021 in Lviv, Ukraine.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено критерії ранжування молекулярних мішеней медикаментозного лікування туберкульозу і створено базу структурних моделей цільових білків, яка задовольняє умовам молекулярного докінгу і віртуального скринінгу. На підставі відповідних комплексів з RCSB Protein Data Bank, визначено особливості ліганд-білкових взаємодій і запропоновано фармакофорні гіпотези, що максимально описують потенціальні взаємодії цільових сайтів і задовольняють умовам фармакофорного пошуку.
2. За результатами аналізу баз даних PubChem, ZINC, ChEMBL, Google Patents, і eMolecules відібрано 23734 референсних антимікобактеріальних речовин, що задовольняють пороговим критеріям: IC50/Ki≤10 мкМ, інгібування >25%, тощо. На підставі фільтрів PAINS, ADMET-ранжування і відомих порогів активності і токсичності, первинна вибірка була скорочена до групи інгібіторів цільових ферментів, які задовольняють показникам: P-gp субстрат, адсорбція (HIA), токсичність, а також, відповідають правилам фільтрації і налаштування систем скринінгу.
3. Відібрано 6 основних скаффолдів сполук, що спрямовані на пріоритетні молекулярні мішені протитуберкульозної терапії. Це дозволило визначити первинну вибірку похідних (~2 млн. сполук), що за результатами застосування ключових фільтрів була скорочена до 26167 унікальних сполук, синтез яких можливий в один крок. Аналіз активності опорних сполук на вакцинному штамі BCG *M. bovis*, визначив ключові напрямки синтезу інгібіторів FtsZ і ключових ферментів мікобактерії.
4. Створено 3Д базу даних хімічних сполук та їх можливих конформерів, яка ґрунтується на репозиторіях українських компаній: ІФЛАБ, Єнамін і Укрооргсинтез, склала близько 15 мільйонів лігандів (2,5 млн унікальних сполук) і враховувала набір фізико-хімічних показників, вихідну геометрію, можливі конформери і електростатичні мапи поверхонь.

5. Виконано модифікацію протоколу високопропускного віртуального скринінгу засобами ВО CSLabGrid і лабораторної верифікації протитуберкульозної активності сполук, що залучує методи спектрофотометрії та тестування на культурах вакцинних і польових штамах мікобактерії. Згідно протоколу, була визначена опорна група інгібіторів апарату клітинного поділу і ключових процесів метаболізму мікобактерії, що була використана, як референс комбінаторної бібліотеки сполук і спрямована на заздалегідь відомі молекулярні мішені і сайти ліганд-білкової взаємодії.
6. Згідно оновленому протоколу, створено бібліотеку структурних файлів речовин, що враховують: ChEMBL№, Smile-запис, MW та параметри експериментальної активності (Standard Type, Standard Relation, Standard Value, Standard Units і Target Name). Це дозволило здійснити сортування за активністю із врахуванням порогових показників при концентраціях в 10 Мкм, 75-9860 нМ і 180-5000 нМ. Водночас, достатня репрезентативність груп активних і неактивних речовин дозволила об'єднати методи молекулярного докінгу і QSAR.
7. Виходячи з задач біохімічного скринінгу *in vitro*, було виконано аналіз фізико-хімічних параметрів цільових білків, зокрема, опрацьовано кілька методик визначення інгібувальної дії сполук на ГТФазну активність FtsZ, опановано протоколи Sun et al. (2017), методики оцінювання інгібувальної дії перспективних сполук імідазопиридинового скафолду на ГТФазну активність FtsZ *in vitro* за Fung-Yi Chan (2013), протоколи Cytoskeleton Inc. (США) і визначена оптимальний протокол визначення інгібіторів ензиматичної активності О-ацетилсеринсульфгідрилази, за методом Droux et al., (1992).
8. Відпрацьовано протокол визначення інгібіторів ГТФазної активності в моделі рекомбінантного FtsZ *S.aureus*. Оцінено інгібуючий потенціал сполук імідазопиридинового скаффолду, що визначило речовини KS13344, Z5027530097, Z1454498428 і Z112683954, які найбільш ефективні

інгібітори ГТФазної активності FtsZ-білку в умовах *in vitro*. При цьому, Z1126833954 було відібрано як опорну сполуку-лідера, що здатна зніжувати *in vitro* ГТФазну активність рекомбінантного FtsZ, на 4%, 31% і 43% у відповідних концентраціях 1, 10 і 100 мкг/мл. Відпрацьовано метод оцінки інгібування О-ацетилсеринсульфгідрилазної активності рекомбінантного ензиму *CysK1 M. tuberculosis.*

9. За даними літератури вибрано та апробовано праймери для диференційної ідентифікації вакцинного штаму *M. bovis* (BCG) та *M. tuberculosis* complex, відпрацьовано протоколи екстракції ДНК з мікобактерій та оптимізовано параметри полімеразної ланцюгової реакції. Їх використання дозволило верифікувати стан штамів перед кожним етапом тестування протимікробної активності нових потенційних інгібіторів.
10. Підтверджена порогова чутливість штаму *Mycobacterium bovis* до рифампіцину та стрептоміцину, що засвідчило відповідність лінії нормативним вимогам і її придатність для подальшого тестування біологічно-активних сполук і зокрема, для оцінки їх протимікробної дії в умовах *in vitro*. За результатами випробувань біоінформатично-визначених речовин, помітна інгібуюча дія була підтверджена для речовин Z65190667, Z1574680729 у концентраціях від 2,5 мкг/мл до 80 мкг/мл і Z2589562532, Z141584328, Z1567270599 та Z2873191210 у концентраціях 40 мкг/мл та 80 мкг/мл. Помірна інгібуюча дія підтверджена для речовин Z232378082 при концентрації 80 мкг/мл, Z105863984 та Z175993489 при концентрації 40 мкг/мл, для речовини Z2381723313 при концентрації ≥10 мкг/мл і для Z2599752817 при концентрації ≥20 мкг/мл. Крім того за концентрації 40 мкг/мл виявлено інгібуючу дію у речовини Z64576265 мішенню якої є білок *CysK1* та речовина KS13384 у концентрації 8-40 мкг/мл.
11. За результатами скринінгу, визначено оптимальні опорні сполуки для синтезу нових речовин і лід оптимізації, а саме: Z1574680729 і Z65190667, що мають найбільший вплив на штам BCG і речовину KS13384, що помітно пригнічувала культуру BCG і інгібувала дискретний *FtsZ з S. aureus*.

Зроблено висновок стосовно перспективності подальшої лід оптимізації скаффолдів SK1-7 та отримано вихідні бібліотеки для синтезу комбінаторних сполук. Згенеровані відповідні віртуальні бібліотеки лігандів, що пройшли необхідну оптимізацію і адаптовані для докінгу. Зроблено висновки, щодо замісників у комбінаторних реакціях, які мають забезпечити успішну оптимізацію біологічної активності і сформовано відповідні бібліотеки.

12. За результатами вивчення в епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби в Україні (2001-2021) було встановлено, що загальна ситуація має спільну тенденцію до зниження кількості зареєстрованих випадків. Проте туберкульоз великої рогатої худоби ліквідований в Україні з 2016 р., туберкульоз людей залишається захворюванням із значно перевищеним епідемічним порогом та дуже повільною тенденцією до зменшення показників захворюваності і летальності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Guo, H., Li, X., Guo, Y. et al. An overview of tubulin modulators deposited in protein data bank. Med Chem Res 28, 927–937 (2019). https://doi.org/10.1007/s00044-019-02352-2.
2. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):235-42. doi: 10.1093/nar/28.1.235. PMID: 10592235; PMCID: PMC102472.
3. Velankar S, Burley SK, Kurisu G, Hoch JC, Markley JL. The Protein Data Bank Archive. Methods Mol Biol. 2021;2305:3-21. doi: 10.1007/978-1-0716-1406-8_1. PMID: 33950382.
4. Higurashi M, Ishida T, Kinoshita K. PiSite: a database of protein interaction sites using multiple binding states in the PDB. Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(Database issue):D360-4. doi: 10.1093/nar/gkn659. Epub 2008 Oct 4. PMID: 18836195; PMCID: PMC2686547.
5. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D480-D489. doi: 10.1093/nar/gkaa1100. PMID: 33237286; PMCID: PMC7778908.
6. Stierand K, Rarey M. Drawing the PDB: Protein-Ligand Complexes in Two Dimensions. ACS Med Chem Lett. 2010 Aug 31;1(9):540-5. doi: 10.1021/ml100164p. PMID: 24900245; PMCID: PMC4007829.
7. Bergner A, Günther J, Hendlich M, Klebe G, Verdonk M. Use of Relibase for retrieving complex three-dimensional interaction patterns including crystallographic packing effects. Biopolymers. 2001-2002;61(2):99-110. doi: 10.1002/1097-0282(2001/2002)61:2<99::AID-BIP10075>3.0.CO;2-8. PMID: 11987159.
8. Desaphy J, Bret G, Rognan D, Kellenberger E. sc-PDB: a 3D-database of ligandable binding sites--10 years on. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D399-404. doi: 10.1093/nar/gku928. Epub 2014 Oct 9.

PMID: 25300483; PMCID: PMC4384012.

9. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic Acids Res. 2019 Jul 2;47(W1):W636-W641. doi: 10.1093/nar/gkz268. PMID: 30976793; PMCID: PMC6602479.
10. Damkliang K, Tandayya P, Sangket U, Pasomsub E. Integrated Automatic Workflow for Phylogenetic Tree Analysis Using Public Access and Local Web Services. J Integr Bioinform. 2016 Nov 28;13(1):287. doi: 10.2390/biecoll-jib-2016-287. PMID: 28187423.
11. Sousa da Silva AW, Vranken WF. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. BMC Res Notes. 2012 Jul 23;5:367. doi: 10.1186/1756-0500-5-367. PMID: 22824207; PMCID: PMC3461484.
12. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. J Comput Chem. 2002 Dec;23(16):1623-41. doi: 10.1002/jcc.10128. PMID: 12395429.
13. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. J Comput Chem. 2004 Jul 15;25(9):1157-74. doi: 10.1002/jcc.20035. Erratum in: J Comput Chem. 2005 Jan 15;26(1):114. PMID: 15116359.
14. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015. v.1-2. P.19-25. doi.: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
15. Lindahl E., Abraham M.J., Hess B., van der Spoel D. GROMACS 2020 Manual. v2020.1 software. doi.org/10.5281/zenodo.3562512.
16. Karpov P.A., Brytsun V.M., Rayevsky A.V., Demchuk O.M., Pydiura N.O., Ozheredov S.P., Samofalova D.A., Spivak S.I., YemetsA.I., Kalchenko V.I., Blume Ya.B. High-throughput Screening of New Antimitotic Compounds

Based on Potential of Virtual Organization CSLabGrid. Nauka innov. 2015, 11(1):92-100 doi.: 10.15407/scin11.01.092

17. Miller EB, Murphy RB, Sindhikara D, Borrelli KW, Grisewood MJ, Ranalli F, Dixon SL, Jerome S, Boyles NA, Day T, Ghanakota P, Mondal S, Rafi SB, Troast DM, Abel R, Friesner RA. Reliable and Accurate Solution to the Induced Fit Docking Problem for Protein-Ligand Binding. J Chem Theory Comput. 2021 Apr 13;17(4):2630-2639. doi: 10.1021/acs.jctc.1c00136.
18. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, Grubmüller H, MacKerell AD Jr. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. Nat Methods. 2017 Jan;14(1):71-73. doi: 10.1038/nmeth.4067.
19. Rakhshani H, Dehghanian E, Rahati A. Enhanced GROMACS: toward a better numerical simulation framework. J Mol Model. 2019 Nov 25;25(12):355. doi: 10.1007/s00894-019-4232-z.
20. Verma J, Khedkar VM, Coutinho EC. 3D-QSAR in drug design--a review. Curr Top Med Chem. 2010;10(1):95-115. doi: 10.2174/156802610790232260. PMID: 19929826.
21. Macalino S, Billones J, OrganoV, Carrillo M. In Silico Strategies in Tuberculosis Drug Discovery. Molecules . 2020 Feb 4;25(3):665. doi: 10.3390/molecules25030665.
22. https://www.who.int/tb/publications/2019/consolidated-guidelines-drug-resistant-TB-treatment/en/.
23. Stephani Joy Y. Macalino, Junie B. Billones, Voltaire G. Organo, Maria Constancia O. Carrillo. In Silico Strategies in Tuberculosis Drug Discovery., Molecules. 2020 Feb; 25(3): 665. Published online.
24. Xiaocui Wu, Jinghui Yang, Guangkun Tan, Haican Liu, Yin Liu, Yinjuan Guo, Rongliang Gao, Baoshan Wan, Fangyou Yu. Drug Resistance Characteristics of Mycobacterium tuberculosis Isolates From Patients With Tuberculosis to 12 Antituberculous Drugs in China., Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9: 345. Published online/

25. Huang J, MacKerell AD Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. J Comput Chem. 2013 Sep 30;34(25):2135-45. doi: 10.1002/jcc.23354. Epub 2013 Jul 6. PMID: 23832629; PMCID: PMC3800559.
26. Карпов П.А., Демчук О.М., Брицун В.М., Литвин Д.І., Пидюра М.О., Раєвський О.В., Самофалова Д.О., Співак С.І., Волочнюк Д.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Нові імідазольні похідні як інгібітори FtsZ-білків мікобактерій: від високопропускного молекулярного скринінгу в Ґрід до експериментального аналізу *in vitro*. Nauka innov. 2016, 12(3):44-59. http://dx.doi.org/10.15407/scin12.03.044
27. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf
28. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm: ECDC; 2016 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/tuberculosis-laboratory-diagnostic-methods-eu.pdf
29. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0886-19#Text
30. FernandoAlcaidea, JaimeEstebanb, JuliàGonzález-Martinc, Juan-JoséPalacios. Methods for determining the antimicrobial susceptibility of Mycobacteria Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017; 35(8) :527–533 DOI: 10.1016/j.eimce.2017.08.005
31. Sulochana Somasundaram 1, N Chinnambedu Paramasivan Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis strains to gatifloxacin and moxifloxacin by different methods. Chemotherapy. 2006. 52(4):190-5 doi: 10.1159/000093486
32. Nele Coeck, Bouke C. de Jong, Maren Diels, Pim de Rijk, Elisa Ardizzoni, Armand Van Deun, and Leen Rigouts. Correlation of different phenotypic drug susceptibility testing methods for four fluoroquinolones in

Mycobacterium tuberculosis J Antimicrob Chemother. 2016 May; 71(5): 1233–1240. doi: 10.1093/jac/dkv499.

33. WHO (2019) Global tuberculosis report 2019.
34. Wilton S., Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. PCR Meth. Appl., 1992. 1, 269–273.
35. Hansong Chae, Seung Jung Han, Su-Young Kim, Chang-Seok Ki, Hee Jae Huh, Dongeun Yong, Won-Jung Koh, Sung Jae Shin.Development of a One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection of Major Mycobacterium Species. J Clin Microbiol. 2017. Sep;55(9):2736-2751.
36. Richardson E.T, Samson D, Banaei N.. Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacteria by multiplex, real-time PCR. J Clin Microbiol. 2009. 47:1497-1502.
37. Lim, S. Y., B. J. Kim, M. K. Lee, and K. Kim.. Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of Mycobacterium species. Lett. Appl. Microbiol. 2008. 46:101–106
38. Robert F. Luo, Michael D. Scahill, and Niaz Banaei. Comparison of Single-Copy and Multicopy Real-Time PCR Targets for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Paraffin-Embedded Tissue. J Clin Microbiol. 2010 Jul; 48(7): 2569–2570.
39. Mariana L. Sales, Antônio Augusto Fonseca, Júnior, Lívia Orzil, Andrea Padilha Alencar, Marcio Roberto Silva, Marina Azevedo Issa, Paulo Martins Soares Filho, Andrey Pereira Lage, and Marcos Bryan Heinemann. Validation of a real-time PCR assay for the molecular identification of Mycobacterium tuberculosis. Braz J Microboil. 2014; 45(4): 1363–1369
40. Hye Seung Lee, Kyoung Un Park, Jung Ok Park, Ho Eun Chang, Junghan Song, Gheeyoung Choe. Rapid, sensitive, and specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex by real-time PCR on paraffin-embedded human tissues. J Mol Diagn. 2011 Jul;13(4):390-4

41. Guarin N, Budvytiene I, Ghafghaichi L, Banaei N.. Comparison of real-time polymerase chain reaction and conventional biochemical methods for identification of Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus group to the species level. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010.67:333-336.
42. Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh, and C. K. Stover.. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. J. Bacteriol. 1996.178:1274–1282.
43. E A Talbot, D L Williams, and R Frothingham PCR Identification of Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol. 1997 Mar; 35(3): 566–569.
44. Perez-Osorio A.C, Boyle D.S, Ingham Z.K, Ostash A, Gautom R.K, Colombel C, Houze Y, Leader B.T.. Rapid identification of mycobacteria and drug-resistant Mycobacterium tuberculosis by use of a single multiplex PCR and DNA sequencing. J Clin Microbiol. 2012.50:326–336
45. Herrera E.A., Segovia J.D. (1996): Evaluation of mtp40 genomic fragment amplification for specific detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 34, 1108–1113.
46. Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids *Journal of clinical microbiology*, 28(3), 495–503
47. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: МГУ, 1991. – 304 с.;
48. Практикум по микробиологии // Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. – М.: Изд. Центр «Академия», 2005. – 608 с.
49. https://www.ukrinform.ua/rubric-presshall/3136853-perspektivi-ukraini-infekcijna-epidemia-so-dihae-v-potilicu-koronavirusu-tuberkuloz.html
50. https://www.interfax.ru/world/707430
51. Овдиенко Н.П., Найманов А.Х., Солодова И.В. Эпизоотическая обстановка по туберкульозу крупного рогатого скота в зарубежных странах в начале 21 века // Ветеринарная патология. Современные

проблемы диагностики и профилактики туберкулёза животных. 2004. №1-2. С. 42-63.

52. Зелінський М. Туберкульоз великої рогатої худоби. Причини виникнення та фактори, що стримують оздоровлення неблагополучних господарств // Ветеринарна медицина України. – 2001. №6. С. 15-16.

53. Власенко О.А. Проблеми і перспективи оздоровлення неблагополучних господарств сумської області від туберкульозу великої рогатої худоби // Ветеринарна медицина України, №7, 2007 р. С. 13-14.

54. Ляшкевич Д.В. Проблеми діагностики туберкульозу великої рогатої худоби // Сучасні проблеми ветеринарної медицини з питань інфекційної патології та патоморфології тварин. Матер. Всеукраїнської науково-практ. Конф. 18-19 трав. 2017 р. Полтава. С. 68-69.

55. Горжеєв В.М. Причини виникнення туберкульозної інфекції у господарствах України // Ветеринарна медицина. Вип. 97. 2013 р. С. 18-20.

56. Причини рецидивів туберкульозу великої рогатої худоби в раніше оздоровлених господарствах Чернігівської області. В.Д. Кульбако., М.В. Іванченко, І.О. Данько // Ветеринарна медицина України, 2007. №7, С. 11-12.

57. Горбатюк О.І. Ретроспективний аналіз епізоотичного процесу при туберкульозі великої рогатої худоби в господарствах Київської області. Вісн. Білоцерківського держ. Аграр. Ун-ту: Зб. наук. пр. – Біла Церква, 2001. Вип. 16. С. 58-69.

58. Babaoglu K, Page M, Jones V., McNeil M., Dong C., Naismith J., Lee R. Novel inhibitors of an emerging target in Mycobacterium tuberculosis; substituted thiazolidinones as inhibitors of dTDP-rhamnose synthesis. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2003. 13 (19), 3227-3230.

59. Blanco B, Prado V, Lence E, Otero JM, Garcia-Doval C, van Raaij MJ, Llamas-Saiz AL, Lamb H, Hawkins AR, González-Bello C. Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase inhibitors: design and simulation studies of the

catalytic turnover. J Am Chem Soc. 2013 Aug 21;135(33):12366-76. doi: 10.1021/ja405853p. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23889343.

60. de Chiara, C., Homšak, M., Prosser, G.A. *et al.* d-Cycloserine destruction by alanine racemase and the limit of irreversible inhibition. *Nat Chem Biol* **16,** 686–694 (2020). https://doi.org/10.1038/s41589-020-0498-9.

61. Awasthy D, Bharath S, Subbulakshmi V, Sharma U. Alanine racemase mutants of Mycobacterium tuberculosis require D-alanine for growth and are defective for survival in macrophages and mice. Microbiology (Reading). 2012 Feb;158(Pt 2):319-327. doi: 10.1099/mic.0.054064-0. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22075031.

62. Lee Y, Mootien S, Shoen C, Destefano M, Cirillo P, Asojo OA, Yeung KR, Ledizet M, Cynamon MH, Aristoff PA, Koski RA, Kaplan PA, Anthony KG. Inhibition of mycobacterial alanine racemase activity and growth by thiadiazolidinones. Biochem Pharmacol. 2013 Jul 15;86(2):222-30. doi: 10.1016/j.bcp.2013.05.004. Epub 2013 May 13. PMID: 23680030; PMCID: PMC3700342.

63. Sun N, Lu YJ, Chan FY, Du RL, Zheng YY, Zhang K, So LY, Abagyan R, Zhuo C, Leung YC, Wong KY. A Thiazole Orange Derivative Targeting the Bacterial Protein FtsZ Shows Potent Antibacterial Activity. Front Microbiol. 2017 May 11;8:855. doi: 10.3389/fmicb.2017.00855. PMID: 28553278; PMCID: PMC5426085.

64. Chan FY, Sun N, Neves MA, Lam PC, Chung WH, Wong LK, Chow HY, Ma DL, Chan PH, Leung YC, Chan TH, Abagyan R, Wong KY. Identification of a new class of FtsZ inhibitors by structure-based design and in vitro screening. J Chem Inf Model. 2013 Aug 26;53(8):2131-40. doi: 10.1021/ci400203f.

65. Sridevi D, Sudhakar KU, Ananthathatmula R, Nankar RP, Doble M. Mutation at G103 of MtbFtsZ Altered their Sensitivity to Coumarins. Front Microbiol. 2017 Apr 6;8:578. doi: 10.3389/fmicb.2017.00578.

66. Droux M, Martin J, Sajus P, Douce R. Purification and characterization of O-acetylserine (thiol) lyase from spinach chloroplasts. Arch Biochem Biophys. 1992 Jun;295(2):379-90. doi: 10.1016/0003-9861(92)90531-z.

67. M. Esposito, et all, A Phenotypic Based Target Screening Approach Delivers New Antitubercular CTP Synthetase Inhibitors, ACS infect Dis, 3 (2017) 428-437

68. B. Gold, G.M. Rodriguez, S.A. Marras, M. Pentecost, I. Smith, The Mycobacterium tuberculosis IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages, Mol Microbiol, 42 (2001) 851-865

69. Borisov A. V.; Tolmachev A. A.; Zavada O. A.; Zhuravel' I. A.; Kovalenko S. N. Synthesis of imidazo[1,2-a]pyrazine and imidazo[1,2-a]pyrimidine derivatives. Chem. Heterocycl. Compd. 2013, 49 (5), 704-711. DOI: 10.1007/s10593-013-1301-6.

70. Timothy Kercher, Chang Rao, Josef R. Bencsik, and John A. Josey. Diversification of the Three-Component Coupling of 2-Aminoheterocycles, Aldehydes, and Isonitriles: Efficient Parallel Synthesis of a Diverse and Druglike Library of Imidazo- and Tetrahydroimidazo[1,2-a] Heterocycles. J. Comb. Chem. 2007, 9, 6, 1177–1187. https://doi.org/10.1021/cc0700290.

71. Paolo Pevarello, Pavia (IT); Raffaella Amici, Piacenza (IT); Gabriella Tracquandi, Milano (IT); Manuela Villa, Lurago d'Erba (IT); Anna Vulpetti, Brugherio (Milano) (IT); Antonella Isacchi, Milano (IT). 2-UREIDO-THIAZOLE DERIVATIVES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND THEIR USE AS ANTITUMORAGENTS. Patent Application Publication. US2003/187040, 2003, A1.

72. Alexander V Borisov, Nikolay Yu Gorobets, Sergey A Yermolayev, Irina O Zhuravel', Sergiy M Kovalenko, Sergey M Desenko. One-pot microwave-assisted synthesis of a benzopyrano[2,3-c]pyrazol-3(2H)-one library. J Comb Chem. 2007;9(6):909-11. doi: 10.1021/cc700090c.

73. Епідеміологічна ситуація з туберкульозу в Україні / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник, М. І. Гуменюк, М. І. Линник / ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», м. Київ, Infusion & Chemotherapy, 4–2019, С. 5-9.
74. Schoenemann KM, Margolin W. Bacterial Division: FtsZ Treadmills to Build a Beautiful Wall. Curr Biol. 2017 Apr 24;27(8):R301-R303. doi: 10.1016/j.cub.2017.03.019. PMID: 28441562.
75. Araújo-Bazán L, Ruiz-Avila LB, Andreu D, Huecas S, Andreu JM. Cytological Profile of Antibacterial FtsZ Inhibitors and Synthetic Peptide MciZ. Front Microbiol. 2016 Oct 3;7:1558. doi: 10.3389/fmicb.2016.01558. PMID: 27752253; PMCID: PMC5045927.
76. Luthra S, Rominski A, Sander P. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium abscessus Drug Resistance. Front Microbiol. 2018 Sep 12;9:2179. doi: 10.3389/fmicb.2018.02179.
77. Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Appl Microbiol. 2020 Jun;128(6):1547-1567. doi: 10.1111/jam.14478.