



R. O. Shcherbyna¹, O. I. Panasenko¹, Ye. G. Knysht¹, H. A. Fotina², Ye. V. Vashchyk², T. I. Fotina²

The study of antimicrobial activity of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts

¹Zaporizhzhia State Medical University,

²Sumy National Agrarian University

Key words: 1,2,4-triazole, Antimicrobial Action, Hanging Drop Method, Serial Dilution Method.

The purpose of the work was to study the antimicrobial activity of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts by “hanging drop” and “serial dilution” methods in broth (limiting concentration option) and establish some patterns of “structure–action” depending.

Materials and methods. The objects of research were 9 new compounds of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts. These compounds are the crystal substances which are odorless, soluble in water and organic solvents. To achieve a more objective picture of the research we applied two methods: “hanging drop” and “serial dilution” in broth (limiting concentration option). To study the effectiveness of substances we used the test cultures of *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*.

Results and discussion. In the study we have found that 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts can differently inhibit the growth of test cultures. The results show that the data obtained by two methods correlated with each other. Thus, the 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts are active against most strains of *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. Analyzing the impact of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts we have noted that the replacement of the phenyl radical (PKR-135, 139) on the free amino group at N4 nitrogen of 1,2,4- triazole cycle (PKR-173, 177) leads to the disappearance of antimicrobial activity against the studied strains. It was established that the transition from morfolin cation (PKR-133) to the piperidyn cation (PKR-134) in the molecules of 2-((4-phenyl-3-(morpholinometylen)-4H-1,2,4-triazole-5-yl) thio) acetic acid is accompanied by a significant increase in antimicrobial effect. It was interesting that among all the cations in the molecules of 2-((4-amino-3-(morpholinometylen)-4H-1,2,4-triazole-5-yl) thio) acetic acid salt (PKR-173, 174, 177, 234) only the presence of sodium cation (PKR-174) leads to a pronounced antimicrobial effect against studied strains.

Conclusions. The study had found that the most effective in relation to the main groups of pathogenic bacteria are substances PKR-134, 135, 136, 139 and 174. Certain regularities based on “structure–action” have been established, this information can be integrated into future targeted search of substances with antimicrobial properties.

Дослідження протимікробної дії солей 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот

R. O. Щербина, O. I. Панасенко, Є. Г. Кныш, Г. А. Фотіна, Є. В. Ващук, Т. І. Фотіна

Мета роботи – дослідження протимікробної дії солей 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот методами «стікаючої краплі» та «серійних розведень» у бульйоні (варіант граничної концентрації), встановлення деяких закономірностей залежності «структура – дія».

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були 9 нових сполук солей 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот. Ці сполуки являють собою кристалічні речовини, що не мають запаху, розчинні у воді та органічних розчинниках. Для досягнення більш об'єктивної картини дослідження застосували два методи дослідження: «стікаючої краплі» та «серійних розведень» у бульйоні (варіант граничної концентрації). Для вивчення ефективності речовин використовували тест-культури *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*.

Результати. У підсумку дослідження встановили, що солі 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот по-різному здатні пригнічувати ріст тест-культур. Дані, що отримані двома способами, корелюють між собою. Так, солі 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот є найбільш активними щодо штамів *E. coli* та *Salmonella typhimurium*. Аналізуючи вплив солей 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот, відзначено: заміна фенільного радикала (ПКР-135, 139) за N₄ атомом азоту 1,2,4-тріазолового циклу вільною аміногрупою (ПКР-173, 177) призводить до зникнення протимікробної дії щодо штамів, що вивчали. Встановили, що перехід від катіона морфолінію (ПКР-133) до катіона піперидинію (ПКР-134) у молекулах солей 2-((4-феніл-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот супроводжується значущим підвищенням протимікробного ефекту. Цікаво, що зі всіх катіонів у молекулах солей 2-((4-аміно-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот (ПКР-173, 174, 177, 234) тільки наявність катіона натрію (ПКР-174) призводить до вираженого антимікробного ефекту щодо штамів мікроорганізмів, котрі досліджували.

Висновки. Встановили, що найбільш ефективними щодо основних груп патогенних бактерій є речовини ПКР-134, 135, 136, 139 і 174. Відзначені деякі закономірності залежності «структура – дія», що можуть бути інтегровані в цілеспрямований пошук речовин із протимікробними властивостями.

Ключові слова: 1,2,4-тріазол, протимікробна активність, метод стікаючої краплі, метод серійних розведень.

Запорізький медичний журнал. – 2016. – № 4 (97). – С. 97–100

Исследование противомикробного действия солей 2-((4-R-3 (морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот

R. O. Щербина, A. I. Панасенко, E. G. Кныш, A. A. Фотіна, E. B. Ващук, T. I. Фотіна

Цель работы – изучение противомикробного действия солей 2-((4-R-3-(морфолінометилен)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот методами «висячей капли» и серийных разведений в бульоне (вариант предельной концентрации) и установление некоторых закономерностей зависимости «структура – действие».

Материалы и методы. Объектами исследований были 9 новых соединений, солей 2-((4-*R*-3-(морфолинometилen)-4*H*-1,2,4-триазол-5-ил)тиo)ацетатных кислот. Данные соединения представляют собой кристаллические вещества без запаха, растворимые в воде и органических растворителях. Для достижения более объективной картины исследования были применены два метода исследования: «висячей капли» и «серийных разведений» в бульоне (вариант предельной концентрации). Для изучения эффективности веществ использовали тест-культуры *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*.

Результаты. Установлено, что соли 2-((4-*R*-3-(морфолинometилen)-4*H*-1,2,4-триазол-5-ил)тиo)ацетатных кислот по-разному способны подавлять рост тест-культур. Из результатов видно, что данные, полученные двумя способами, коррелируют между собой. Так, соли 2-((4-*R*-3-(морфолинometилen)-4*H*-1,2,4-триазол-5-ил)тиo)ацетатных кислот являются наиболее активными в отношении штаммов *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. Анализируя влияние солей 2-((4-*R*-3-(морфолинometилen)-4*H*-1,2,4-триазол-5-ил)тиo)ацетатных кислот, отмечено, что замена фенильного радикала (ПКР-135, 139) при N₁ атоме азота 1,2,4-триазолового цикла на свободную амино-группу (ПКР-173, 177) приводит к исчезновению противомикробного действия в отношении изучаемых штаммов. Важным является тот факт, что переход от катиона морфолина (ПКР-133) к катиону пиперидиния (ПКР-134) в молекулах солей 2-((4-фенил-3-(морфолинometилen)-4*H*-1,2,4-триазол-5-ил)тиo)ацетатных кислот сопровождается значительным повышением противомикробного эффекта. Интересным является тот факт, что из всех катионов в молекулах солей 2-((4-амино-3-(морфолинometилen)-4*H*-1,2,4-триазол-5-ил)тиo)ацетатных кислот (ПКР-173, 174, 177, 234) только наличие катиона натрия (ПКР-174) приводит к выраженному противомикробному эффекту относительно исследованных штаммов микроорганизмов.

Выводы. В результате исследования установлено, что наиболее эффективными по отношению к основным группам патогенных бактерий являются вещества ПКР-134, 135, 136, 139 и 174. Отмечены некоторые закономерности зависимости «структура – действие», которые могут быть интегрированы в дальнейшем при целенаправленном поиске веществ с противомикробными свойствами.

Ключевые слова: 1,2,4-триазол, противомикробное действие, метод висячей капли, метод серийных разведений.

Запорожский медицинский журнал. – 2016. – № 4 (97). – С. 97–100

Natural antibiotics and their synthetic counterparts are currently main methods to combat with pathogens which are the causative agents of various infectious diseases [1]. These classes of drugs exhibit pronounced antibacterial activity against wide range of bacterial strains. However, antibiotics kill sensitive microorganisms and cause deep and lasting negative consequences.

Unfortunately often and uncontrolled use of antibiotics has a number of negative consequences. The formation of microbial resistance to applied drugs is one of them. Allergic reactions, disorders of the digestive system, intestinal dysbiosis, nephrotic hepatotoxic effects and hematological disorders – this is only a partial list of side effects that can continue. Strains of bacteria, which are resistant to different groups of antibiotics are constantly emerging. Due to the above mentioned information the need of finding new, effective and safe antimicrobial agents undoubtedly has particular relevance [1,2].

1,2,4-triazole thioderivatives are unique heterocycles. They are actively investigated by foreign and domestic scientists, and according to obtained data we can create new original drugs based on them [3,4]. Analyzing literature sources it was found that the variety of heterocyclic systems based on 1,2,4-triazole-5-thiol have been investigated previously but poor attention was given to the derivatives of 3-(morpholinomethylene)-4-*R*-4*H*-1,2,4-triazole-5-thiols, although the presence of morpholine residue in the molecule can lead to a significant increase in the pharmacological effects of synthetic substances [5].

The purpose of the work was to investigate the antimicrobial activity of 2-((4-*R*-3-(morpholinomethylene)-4*H*-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts by “hanging drop” and “serial dilution” methods in broth (limiting concentration option) and establish some patterns of “structure–action” depending.

Materials and methods

The objects of research were 9 new compounds of 2-((4-*R*-3-(morpholinomethylene)-4*H*-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts which were synthesized at the toxicological and inorganic chemistry department, Zaporizhzhia State Med-

ical University. These compounds are the crystal substances which are odorless, soluble in water and organic solvents. The research of antimicrobial properties of synthesized substances was held in Sumy National Agrarian University under the direction of Doctor of Veterinary Science, Professor T. I. Fotina. To achieve a more objective picture of the research we applied two methods: “hanging drop” and “serial dilution” in broth (limiting concentration option). To study the effectiveness of substances we used the test cultures of *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*.

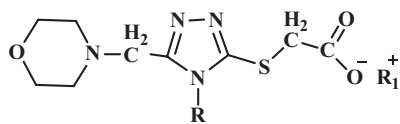
Hanging drop method. In this method test cultures are daily evenly distributed on the surface of MPA (meat peptone agar), which is kept in an incubator at +37°C for 40 min, then 1 drop of disinfectant solution (solution of studied compound diluted 1: 1 with sterile 0.9% saline) is put into each tube and is left to stand for drip drops. In other two test tubes disinfectants are not made and are left for control. Test tubes are incubated in thermostat at +38°C, the records were taken after 12, 24, 48 hours. The effective concentration of the disinfectant solution is the one with clearly manifested growth delay line at disinfectant solution application [6].

The serial dilutions method in broth (limiting concentration option). In this method 1 ml of studied compound (diluted 1:1 with sterile 0.9% saline) was poured into test tubes with 1 ml of MPB (meat peptone broth). One tube of MPB was left without studied solution to make the negative control. Each tube contained 1 ml of suspension of the studied test cultures. Suspension from broth cultures is prepared equivalent to turbidity standard 0.5 (by McFarland), and then diluted 100 times MPB. The incubation is carried out for 24 hours at + 37°C. The control tube is kept in a refrigerator at 4°C and used for comparison. Results were carried out visually by the presence or absence of crops growth in transmitted light, compared with control [7,8].

Results and discussion. In the study we have found that 2-((4-*R*-3-(morpholinomethylene)-4*H*-1,2,4-triazole-5-yl)thio) acetic acid salts can differently inhibit the growth of test cultures (Scheme 1).



Scheme 1



where R =phenyl, R_1 =morpholy (PKR-133); R =phenyl, R_1 =piperidyl (PKR-134); R =phenyl, R_1 =K (PKR-135); R =phenyl, R_1 =Na (PKR-136); R =phenyl, R_1 =NH₄ (PKR-139); R =amino, R_1 =K (PKR-173); R =amino, R_1 =Na (PKR-174); R =amino, R_1 =NH₄ (PKR-177); R =amino, R_1 =NH₄ (PKR-177); R =amino, R_1 =NH₂-CH₃ (PKR-234).

Experimental part

As a result of investigations by hanging drop method it was found that substances **PKR 133, 134, 135, 136, 174** were relatively effective against *E. coli*, **PKR-136, 174** were effective against *Salmonella typhymurium*, **PKR-134, 135, 136, 139, 174** – *Staphylococcus epidermidis*, **PKR-134, 136, 174** – *P. aeruginosa* respectively (Table 1).

Table 1

Bactericidal activity of drugs by hanging drop method

№	Compound	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella typhymurium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	PKR-133	+	–	–	–
2	PKR-134	+	+-	+	+
3	PKR-135	+	+-	+	+-
4	PKR-136	+	+	+	+
5	PKR-139	+-	–	+	+-
6	PKR-173	–	–	–	–
7	PKR-174	+	+	+	+
8	PKR-177	–	–	–	–
9	PKR-234	–	–	–	–

Note: “+” – the existence of the growth delay line of bacteria, presence of bactericidal action; “–” – no bacterial growth delay line, no bactericidal action; “+-” – fuzzy bacterial growth line delay, weak bactericidal action.

Further research was conducted by serial dilution in broth (limiting concentration option). As shown in Table 2, there were effective against *E. coli* salts **PKR-134, 135, 136, 139, 174**, on *Salmonella typhymurium* **PKR-134, 136, 174**, *Staphylococcus epidermidis* **PKR-135, 136, 139, 174**, *P. aeruginosa* – **PKR-135, 136, 174** respectively.

The results show that the obtained data in two methods correlated with each other. Thus, the 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio)acetic acid salts are active against most strains of *E. coli* and *Salmonella*

References

- Khalid, L., Mahsood, N., & Ali, I. (2016). The public health problem of OTC antibiotics in developing nations. *Research In Social And Administrative Pharmacy*, 12(5), 801–802. doi: 10.1016/j.sapharm.2016.03.003.
- Jethwa, S. (2016). Confronting the growing problem of antibiotic resistance. *Prescriber*, 27(2), 50–51. doi: 10.1002/psb.1438.
- Shcherbak, M., Kaplaushenko, A., Maletskiy, N., & Sharaya, Y. (2014). The research on creation the dosage form based on 3-(4-ni-

The serial dilutions method in broth (limiting concentration option)

№	Compound	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella typhymurium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	PKR-133	+-	–	–	–
2	PKR-134	+	+	+-	+-
3	PKR-135	+	+-	+	+
4	PKR-136	+	+	+	+
5	PKR-139	+	+-	+	–
6	PKR-173	–	–	–	–
7	PKR-174	+	+	+	+
8	PKR-177	–	–	–	–
9	PKR-234	–	–	–	–

Note: “+” – the existence of the culture growth, presence of bactericidal action; “–” – no bacterial growth, no bactericidal action; “+-” – low bacterial growth, weak bactericidal action.

typhymurium. Analyzing the impact of 2-((4-R-3-(morpholinomethylene)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio)acetic acid salts we have noted that the replacement of the phenyl radical (**PKR-135, 139**) on the free amino group at N4 nitrogen in 1,2,4-triazole cycle (**PKR-173, 177**) leads to the disappearance of antimicrobial activity against the studied strains. It was established that the transition from morfolin cation (**PKR-133**) to the piperidyn cation (**PKR-134**) in the molecules of 2-((4-phenyl-3-(morpholinometylen)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio)acetic acid is accompanied by a significant increase in antimicrobial effect. It was interesting that from all the cations in the molecules of 2-((4-amino-3-(morpholinometylen)-4H-1,2,4-triazole-5-yl)thio)acetic acid salt (**PKR-173, 174, 177, 234**) only the presence of sodium cation (**PKR-174**) leads to a pronounced antimicrobial effect against studied strains.

Conclusions

1. The antimicrobial action of 2-((4-R-3-(morpholinometylen)-4H-1,2,4-triazoles-5-yl)thio)acetic acid salts has been studied using hanging drop method and serial dilutions in broth (limit concentration option).

2. The study had found that substances **PKR-134, 135, 136, 139** and **174** are the most effective in relation to the main groups of pathogenic bacteria.

3. Certain regularities based on “structure–action” have been established. This can be integrated in the future for targeted search substances with antimicrobial properties.

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

trophenyl)-5-(nonylsulfonyl)-1,2,4-triazol-4-amine. *Zaporozhskij medicinskij jurnal*, 4(85), 82–85. <http://dx.doi.org/10.14739/2310-1210.2014.4.27449>. [in Ukrainian].

- Danilchenko, D., Parchenko, V., Panasenko, O., & Knysh, Y. (2015). Biological properties of the compounds formed by the combination of the 1,2,4-triazoles, furans and other functional substitutes. *Current Issues In Pharmacy And Medicine: Science And Practice*, 3(19). doi: 10.14739/2409-2932.2015.3.52627.
- Shcherbyna, R. O. (2016). The synthesis and prediction

- of biological activity in silico for new alkyl derivatives of 4-R-3-(morfolinometylen)-4H-1,2,4-triazole-5-thioles. *Ukrainskyi biofarmatsevtichnyi zhurnal*, 3, 34–38. [in Ukrainian].
6. Zon, H.A. & Vaschuk, Ye. V. (patentee) (2012). Patent. 69947 Ukraina, MPK (2012.01) A61L 12/00. Modyfikovanyi sposib vyznachennia bakterytsydneykh vlastyvoستي novykh dezinfikiuyuchykh zasobiv [Patent Ukraine. 69947 Modified method for determining the bactericidal properties of new disinfectants]. *Biuletyn*, 10. [in Ukrainian].
 7. Semina, S. A., Sidorenko, S. V., Rezvan, S. P., et al. (2004) Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*, 6(4), 306–359. [in Russian].
 8. Fotina, H. A., & Kovalenko, I. V. (2013). Chutlyvist mikroflory, shcho izolovana v inkubatoriakh do dezinfektantiv [The sensitivity of microflora, which is isolated in the hatchery to disinfectants]. *Veterynarna biotekhnolohiia*, 22, 620–625. [in Ukrainian].

Information about authors:

Shcherbyna R. O., PhD, Senior Lecturer, the Department of Toxicology and Inorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: rsherbyna@mail.ru.

Panasenko O. I., Dr.hab., Professor, Head of the Department of Toxicology and Inorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University.

Knysh Ye. G., Dr.hab., Professor, Head of the Department of Management and Pharmacy Economics, Medical and Pharmaceutical Commodity Research, Zaporizhzhia State Medical University.

Fotina H. A., Dr.hab., Professor, the Department of Parasitology and epizootiology, Sumy National Agrarian University.

Vashchuk Ye. V., PhD, Associate Professor, the Department of veterinary sanitary examination, microbiology, and zoohygiene safety and quality of animal products, Sumy National Agrarian University.

Fotina T. I., Dr.hab., Professor, Head of the Department of veterinary sanitary examination, microbiology, and zoohygiene safety and quality of animal products, Sumy National Agrarian University.

Відомості про авторів:

Щербина Р. О., канд. фарм. наук, старший викладач каф. токсикологічної та неорганічної хімії, Запорізький державний медичний університет, E-mail: rsherbyna@mail.ru.

Панасенко О. І., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. токсикологічної та неорганічної хімії, Запорізький державний медичний університет.

Книш Є. Г., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. управління та економіки фармації, медичного і фармацевтичного правознавства, Запорізький державний медичний університет.

Фотіна Г. А., д-р вет. наук, професор каф. епізоотології та паразитології, Сумський національний аграрний університет.

Ващик Є. В., канд. вет. наук, доцент, докторант каф. ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва, Сумський національний аграрний університет.

Фотіна Т. І., д-р вет. наук, професор, зав. каф. ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва, Сумський національний аграрний університет.

Сведения об авторах:

Щербина Р. О., канд. фарм. наук, старший преподаватель каф. токсикологической и неорганической химии, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: rsherbyna@mail.ru.

Панасенко А. И., д-р фарм. наук, профессор, зав. каф. токсикологической и неорганической химии, Запорожский государственный медицинский университет.

Кныш Е. Г., д-р фарм. наук, профессор, зав. каф. управления и экономики фармации, медицинского и фармацевтического правоведения, Запорожский государственный медицинский университет.

Фотина А. А., д-р вет. наук, профессор каф. эпизоотологии и паразитологии, Сумский национальный аграрный университет.

Ващик Е. В., канд. вет. наук, доцент, докторант каф. ветсанэкспертизы, микробиологии, зоогигиены и безопасности и качества продуктов животноводства, Сумский национальный аграрный университет.

Фотина Т. И., д-р вет. наук, профессор, зав. каф. ветсанэкспертизы, микробиологии, зоогигиены и безопасности и качества продуктов животноводства, Сумский национальный аграрный университет.

Поступила в редакцию 09.08.2016 г.