На правах рукописи

ОСМАНОВА СЕЛИНА ЯГЬЯЕВНА

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Самара – 2026

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научные руководители:
кандидат фармацевтических наук, доцент **Сафронюк Сергей Леонидович**

Официальные оппоненты:
Курбатова Светлана Викторовна – профессор кафедры физической химии и хроматографии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», доктор химических наук, профессор.

Шмыгарева Анна Анатольевна – заведующая кафедрой управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор фармацевтических наук, профессор.

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», г. Воронеж.

Защита состоится «__» _____ 202_ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «___» _____202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент **Жданова Алина Валитовна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Антимикробная активность антибактериальных лекарственных средств – один из важнейших параметров, характеризующих их качество и целевое действие [Государственная Фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ), XIV-го издания; Бузмакова У.А. и др., 2018]. Данный показатель является количественной характеристикой антибиотика и измеряется в единицах действия или в микрограммах (мкг) [ГФ РФ, XIV-го издания]. Оценку антимикробной активности антибиотиков проводят с использованием различных методов, таких как Е-тесты, диффузия из лунок в агаре, из агаровых блоков, а также серийные разведения и турбидиметрия [Balouiri M. et al., 2016; Семенова Е.Н. и др., 2019] с использованием чувствительных тест-микроорганизмов.

Согласно ГФ РФ XIV-го издания, определение антимикробной активности антибиотиков проводят методом диффузии в агар. Данный способ имеет трудоемкую процедуру проведения анализа, требует использования разнообразных тест-микроорганизмов, которые, в соответствии с санитарными правилами Российской Федерации и принятой классификацией Всемирной организации здравоохранения, отнесены к различным группам патогенности [Кулешова С.И., 2015; СанПиН 3.3686-21, 2021]. Выполнение анализа возможно только при соблюдении строгих условий проведения исследования, так как на результаты могут влиять как количество микроорганизмов, так и качество питательных сред и реагентов [Сухорукова М.В., 2013].

Альтернативой методу диффузии в агар могут выступать подходы, основанные на явлении бактериальной биолюминесценции [Дерябин Д.Г., 2009; Ямпольский И.В. и др., 2014]. В настоящее время данное явление завоевало популярность среди методов оценки качества окружающей среды, а также в биотестировании токсичности различных веществ [Родичева Э.К. и др., 2004, Дерябин Д.Г., 2009]. Однако в последнее десятилетие в научной литературе все чаще уделяется внимание изучению биологической активности веществ с применением подходов на основе бактериальной биолюминесценции [Oliveira A. et al., 2017; Spina-Cruz M. et al., 2018; Li Y., 2022; Сафронюк С.Л., 2022]. Основными преимуществами таких подходов являются простота в использовании как оборудования, так и тест-микроорганизмов, быстрота получения результатов анализа и высокая чувствительность метода [Dai Y. et al., 2020], так как свет, излучаемый бактериями, легко и с большой точностью измеряется при помощи современной электронно-оптической техники.

Исходя из вышеперечисленного, актуальность темы диссертационного исследования обусловлена необходимостью разработки методики биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков как в лекарственной субстанции, так и в препаратах при контроле их качества.

Степень разработанности темы. Несмотря на обширный массив публикаций, посвященных изучению светящихся бактерий [Berglind R. et al., 2010; Jiang L. et al., 2010; Kirillova M.A. et al., 2018; Yao Z. et al., 2019; Muneeswaran T. et al., 2021; Perin L.S. et al., 2022], существующие исследования часто ограничиваются рассмотрением люминесцентных штаммов как общеизвестных систем оценки экологического состояния окружающей среды [Ruiz M.J. et al., 1997; Aguirre-Martínez G.V. et al., 2015; Iram W. et al., 2016; Tanet L. et al., 2020; Sazykin I. et al., 2025].

В последние годы значительный научный интерес направлен на изучение биолюминесцентных бактерий как тест-систем для оценки биологических эффектов веществ как неорганической, так и органической природы, чему способствовали работы зарубежных авторов [Oliveira A. et al., 2017; Spina-Cruz M. et al., 2018, 2021]. В свою очередь, ряд отечественных исследователей, таких как Дерябин Д.Г., Кацев А.М., Родичева Э.К. и др., также

расширили понимание феномена биолюминесценции и обозначили перспективы его практического применения в различных областях науки, в том числе и медико-фармацевтических исследованиях.

Однако анализ существующих публикаций позволяет заключить, что большинство этих работ не затрагивает использование методик биолюминесцентного анализа для количественного определения и оценки антимикробной активности антибиотиков.

Цель работы: разработать методику биолюминесцентного анализа определения антимикробной активности антибиотиков и антимикробных средств.

Задачи:

1. Оценить применимость биолюминесцентного метода анализа для определения антимикробной активности антибиотиков с использованием биолюминесцентных бактерий.
2. С использованием ВЭЖХ провести исследование химической деградации структуры некоторых антибиотиков в условиях стандартной процедуры определения антимикробной активности.
3. Разработать методику биолюминесцентного анализа определения антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной люминесценции *Photobacterium leiognathi* Sh1.
4. Определить валидационные характеристики методики определения антимикробной активности методом биолюминесцентного анализа.
5. Провести испытание методики определения антимикробной активности методом биолюминесцентного анализа для стандартизации некоторых противомикробных средств, не внесенных в ОФС.1.2.4.0010.18.
6. Разработать проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа».

Научная новизна. Впервые изучена применимость биолюминесцентных тест-бактерий для определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар, по результатам которой установлены взаимосвязи диаметров задержки роста штамма *P. leiognathi* Sh1 от концентраций 17 антибиотиков.

Впервые разработаны методики оценки антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1, для которых определены оптимальные условия культивирования бактерий, их количество, необходимое для получения достоверных результатов, и критерии регистрации биолюминесценции тест-микроорганизмов. Установлены растворители, пригодные для проведения анализа, и диапазон концентраций антибиотиков, позволяющий применять разрабатываемые методики.

Впервые проведена проверка и подтверждена пригодность методик определения антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1 путем определения валидационных характеристик.

Впервые определена антимикробная активность кларитромицина, меропенема тригидрата, хлорамфеникола, налидиксовой кислоты, левофлоксацина гемигидрата, ципрофлоксацина, фуразолидона и фурациллина по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1, выраженная биолюминесцентным индексом.

На основе полученных данных подготовлен проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств

методом биолюминесцентного анализа».

Научная новизна исследований подтверждена патентами RU 2838567 C1 «Способ оценки антимикробной активности веществ» (от 21.04.2025 г.) и RU 2867877 C1 «Способ оценки антимикробных свойств извлечений, полученных из растений семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) и выделенных из них биологически активных веществ» (от 11.08.2026 г.).

Теоретическая и практическая значимость. Расширены существующие знания о методах оценки качества антибиотиков, в частности их антимикробной активности с применением подходов на основе бактериальной люминесценции, которые основываются на собственных экспериментальных данных.

Проведена сравнительная оценка применимости люминесцентных бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1 для определения антимикробной активности антибиотиков, как параметра количественного содержания антимикробного средства.

Показаны преимущества природных люминесцентных микроорганизмов в качестве тест-штамма при проведении контроля качества антибиотиков в сравнении с тест-объектами рекомендованными ГФ РФ.

Представлено обоснование использования методик биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков, которое позволяет получать более точные и надежные результаты по сравнению с традиционным методом диффузии в агар.

Разработанные методики оценки антимикробной активности антибиотиков на основе люминесцентных бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1 нашли применение в учебном процессе и научно-исследовательской работе ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в учебной деятельности и научном процессе на кафедре медицинской и фармацевтической химии (акт внедрения № 1), фармации (акт внедрения № 2) Института биохимических технологий экологии и фармации, на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии (акт внедрения № 3), на кафедре базисной и клинической фармакологии (акт внедрения № 4), в Центральной научно-исследовательской лаборатории (акт внедрения № 5) Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского».

Личный вклад автора. Все экспериментальные результаты, представленные в диссертационном исследовании, получены самим автором. В частности, автором изучена антимикробная активность антибиотиков в отношении 2-х рекомендованных Государственной Фармакопеей штаммов, грамотрицательных и люминесцентных бактерий, разработаны и описаны методики определения активности антибиотиков и противомикробных средств с использованием биохемилюминометров, фиксирующих свечение биолюминесцентных микроорганизмов, а также разработаны соответствующие алгоритмы.

Автором разработан проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа».

Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ. Диссертационная работа выполнялась согласно плану научной работы кафедры медицинской и фармацевтической химии Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» «Разработка биолюминесцентных аналитических технологий

на основе светящихся бактерий акваторий Черного и Азовского морей и рекомбинантных lux-биосенсоров для оценки биологического действия веществ и материалов различной природы» (номер гос. регистрации 0108U001523, сроки выполнения: 2017 – 2022 гг.). Практическая реализация задач исследования также осуществлялась в рамках поддержанного Фондом содействия инновациям гранта по программе «УМНИК» по проекту «Разработка методик биотестирования веществ органической природы на наличие антимикробной активности с использованием светящихся бактерий» (Договор № 17405ГУ/2022 от 22.04.2022 г.).

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования базировалась на анализе данных научной литературы об определении чувствительности микроорганизмов и применении биолюминесцентных тест-систем для оценки биологической и антимикробной активности. Разработка методики включала подбор оптимальных условий анализа, оценку антимикробной активности различных групп антибиотиков в отношении люминесцентного штамма.

Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар проводилось согласно требованиям ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ГФ РФ XIV-го издания. В качестве тест-штаммов микроорганизмов использовали *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* MG1655 с плазмидой pXen7-lux и *P. leiognathi* Sh1. Определение стабильности антибиотиков проводили методом ВЭЖХ на высокоэффективном жидкостном хроматографе ProStar (Varian, Inc., США) с УФ-детектированием по требованиям ГФ РФ XV-го издания.

Регистрацию люминесценции тест-штаммов и анализ проводили согласно подходов описанных в ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04. Определение антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа осуществляли с использованием биохемилюминометров – БХЛ-06 (НПО «Биофармавтоматика», Россия) и LumiShot (НПП «Прикладные биосистемы», Россия), а оценку количества клеток тест-культур – с помощью денситометра DEN-1 (Biosan, Латвия). Антимикробную активность характеризовали индексом биолюминесценции. Обработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ по методикам, описанным в ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента и ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами, а также методов общей статистики [Dean C.B. et al., 2007]. Оценка валидационных характеристик аналитической методики осуществлялась согласно ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик ГФ РФ XV-го издания.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

1. Обоснование применимости биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков, включая сравнительную оценку с методом диффузии в агар и сопоставление результатов, полученных на тест-микроорганизмах, рекомендованных ГФ – *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633, грамотрицательных бактериях *E. coli* ATCC 25922, а также биолюминесцентном рекомбинантном штамме *E. coli* MG1655 (xen::lux).
2. Результаты исследования химической деградации натриевых солей ампициллина и цефотаксима методом ВЭЖХ в условиях стандартной процедуры определения антимикробной активности диффузией в агар.
3. Условия и результаты определения антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1, включая диапазон концентраций антибиотиков, обеспечивающий линейную зависимость сигнала и временные параметры измерения.

4. Результаты определения валидационных характеристик разработанной методики по параметрам: чувствительность, предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность и устойчивость.

5. Результаты испытания разработанной методики для стандартизации противомикробных средств, не внесенных в ОФС.1.2.4.0010.18, по измерению изменения интенсивности люминесценции *P. leiognathi* Sh1.

6. Результаты исследования по разработке проекта общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа».

Степень достоверности научных положений. Достоверность проведенных исследований подтверждена экспериментальными данными, полученными с использованием общепринятого и валидированного микробиологического метода – диффузии в агар. Использование сертифицированного оборудования, биохемилюминометра БХЛ-06 и LumiShot, фиксирующих бактериальное свечение, позволило проводить высокочувствительный анализ антимикробной активности, что повысило достоверность полученных результатов. Все экспериментальные данные подвергнуты статистической обработке с использованием прикладных программных средств. Полученные результаты сопоставлены с данными, опубликованными в научной литературе, что позволило подтвердить их соответствие существующим знаниям и выявить новые аспекты в изученной области.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа полностью соответствует пунктам 2 и 3 паспорта научной специальности 3.4.2 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 22 публикации, 18 из которых включены в РИНЦ, 3 – в журналах, включенных в перечень рекомендуемых ВАК научных изданий, 2 – включенные в ядро РИНЦ, 2 – патента на изобретение.

Апробация результатов исследования. Результаты диссертационного исследования представлены на всероссийских и региональных конференциях: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня основания медицинского вуза в Крыму «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, апрель 2021), II Межвузовской научно-практической конференции с международным участием «Синтез наук как основа развития медицинских знаний», посвященной 50-летию кафедры фармацевтического образования Самарского государственного медицинского университета (Самара, ноябрь 2021), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной проведению Международного года фундаментальных наук в интересах устойчивого развития «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, апрель 2022), Конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых им. А.Г. Гурвича (Симферополь, апрель 2023), I Всероссийской научно-практической конференции «Достижения современной науки: биотехнология, химия и фармация» (Симферополь, октябрь 2023), XVIII Всероссийской (92-ой Итоговой) студенческой научной конференции с международным участием «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» (Самара, апрель 2024), Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 150-летию со дня рождения Н.А. Семашко «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, апрель 2024), II Конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых им. А.Г. Гурвича

(Симферополь, апрель 2024), III Научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Современные проблемы фармации», посвященной 105-летию Самарского государственного медицинского университета (Самара, ноябрь 2024), II Всероссийской научно-практической конференции «Достижения современной науки: биотехнология, химия и фармация» (Симферополь, апрель 2025), IV Научно-практической конференции с международным участием «Современные проблемы фармации», посвященной 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля наук РФ, профессора А.А. Лебедева и 70-летию со дня рождения заслуженного работника высшей школы РФ, профессора В.А. Егорова (Самара, ноябрь 2025).

Объем и структура работы. Диссертационное исследование описано на 222 страницах машинописного текста. Результаты исследования иллюстрированы 12 таблицами и 54 рисунками. Работа включает в себя введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, 3 главы собственных исследований, выводы и заключение, список литературы, который состоит из 324 источников, из которых 172 – на иностранном языке, 5 приложений.

Глава 1 содержит обзор современных методов исследований антибиотиков и оценки их антимикробной активности, а также рассматривает применение биолюминесцентных бактерий в тестировании биологической активности органических и неорганических веществ в рамках фармацевтического анализа и контроля качества лекарственных средств.

В **главе 2** описаны предмет, объекты, оборудование и методы исследования, использованные при выполнении диссертационного исследования.

В **главе 3** представлены результаты определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием в качестве объектов рекомендованных ГФ тест-микроорганизмов – *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633, грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922, а также биолюминесцентных штаммов – рекомбинантного *E. coli* MG1655 с плазмидой pXen7-lux и морского изолята Азовского моря *P. leiognathi* Sh1.

Глава 4 описывает разработку новой методики определения антимикробной активности антибиотиков, основанной на измерении изменения интенсивности биолюминесценции бактерий *P. leiognathi* Sh1 в присутствии исследуемых веществ, включая подбор оптимальных условий тестирования и определения диапазонов линейных зависимостей интенсивности биолюминесценции от концентраций антибиотиков. Проведена оценка валидационных характеристик разработанной методики.

В **главе 5** представлена апробация разработанной методики определения антимикробной активности антибиотиков с помощью биолюминесцентного анализа по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции природных микроорганизмов *P. leiognathi* Sh1 для оценки антимикробной активности антибиотиков, не включенных в ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ГФ РФ XIV-го издания. Описано расширение сферы применения новой разработанной методики как экспресс-метода оценки антибиотиков.

Диссертация завершается выводами, заключением, списком литературы и приложениями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объектами исследования выступали фармацевтические субстанции антибиотиков (Sigma-Aldrich, USA): производные 6-аминопенициллановой кислоты – ампициллина натриевая соль (серия LC-10450.1); нафтацена – доксициклина (серия 03211) и тетрациклина (серия

180403-61) гидрохлориды; аминогликозиды – амикацина (серия 150320), гентамицина (серия G1914-250MG), канамицина (серия 54) и стрептомицина (серия 170410) сульфаты; 7-аминоцефалоспорановой кислоты (7-АЦК) – цефазолина (серия C5020-100MG), цефотаксима (серия C7039-100MG), цефтриаксона (серия C5793-250MG) и цефуроксима (серия 180720) натриевые соли, цефепима дигидрохлорид моногидрат (серия 5340621), цефтазидима пентагидрат (серия 190506); гликопептиды – ванкомицина гидрохлорид (серия VA-2023); макролиды, содержащие в молекуле лактонное кольцо, в состав которого входят 14 – 16 атомов: 14-членные (кларитромицин, серия A3487-100MG; эритромицин, серия 170410) и 15-членные азалиды (азитромицина дигидрат, серия 90323); карбапенемы (в основе структуры которых лежит конденсированное β-лактамное и пирролидиновое кольца) – меропенема тригидрат (серия PHR1772-500MG); линкозамиды – линкомицина гидрохлорид (серия 80322); производное п-нитробензола – хлорамфеникол (серия C0378-100G); а также антибактериальные вещества (Sigma-Aldrich, USA): хинолоны – налидиксовая кислота (серия N814600-25g); фторхинолоны – левофлоксацина гемигидрат (серия 2280920) и ципрофлоксацин (серия 025770.25); антибиотики синтетического происхождения – фуразолидон (серия F9505-10G) и фурациллин (серия 60416).

В исследовании применяли тест-микроорганизмы, рекомендованные Государственной Фармакопеей *Staphylococcus aureus* 209 P и *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [ГФ РФ, XIV-го издания], *Escherichia coli* ATCC 25922, а также рекомбинантный люминесцентный штамм *Escherichia coli* MG1655 с плазмидой pXen7-lux [Манухов И.В. и др., 2008; 2009; 2012; 2014] и природные светящиеся бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1 [Кацев А.М. и др., 2003; 2006].

Антимикробную активность антибиотиков оценивали методом диффузии в агар в соответствии с ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар [ГФ РФ, XIV-го издания]. Оценку стабильности антибиотиков в условиях, характерных для метода диффузии в агар, проводили путем инкубации их растворов при 37 ^{0}C (24 ч) и 25 ^{0}C (18 ч) с последующим хроматографическим анализом на высокоэффективном жидкостном хроматографе ProStar (Varian, Inc., США) с УФ-детектированием по методикам ГФ РФ XV-го издания. Результаты сравнивали со свежеприготовленными растворами антибиотиков.

Методику определения антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа разрабатывали путем подбора оптимальных условий тестирования и установления диапазонов линейных зависимостей интенсивности свечения штамма от концентраций антибиотиков. Интенсивность свечения измеряли биохемилюминометрами БХЛ-06 (НПО «Биофармавтоматика», Россия) и LumiShot (НПП «Прикладные биосистемы», Россия). Стабильность бактериальной суспензии *P. leiognathi* Sh1 контролировали путем определения количества клеток с использованием денситометра DEN-1 (Biosan, Латвия), камеры Горяева (МиниМед, Россия), микроскопа «Биомед-2» (ООО «Биомед», Россия) и оценки люминесцентной активности с помощью биохемилюминометров. Антимикробную активность характеризовали посредством биолюминесцентного индекса (БЛИ), который рассчитывают по формуле: БЛИ = $I_i/I_0 \times 100$ %, где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в контроле, I_0 – интенсивность свечения бактерий в опытной пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар

Основой для разработки методик биолюминесцентного анализа направленной на

определение качества антибактериальных лекарственных средств и их количественного содержания с использованием светящихся бактерий стало изучение влияния антибиотиков, а именно диаметров зон задержки роста, для штаммов *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* АТСС 6633, рекомендованных ОФС.1.2.4.0010.18 ГФ РФ XIV-го издания, от логарифмированных концентраций 17 антибиотиков, описанных в той же ОФС (рис. 1 и 2).

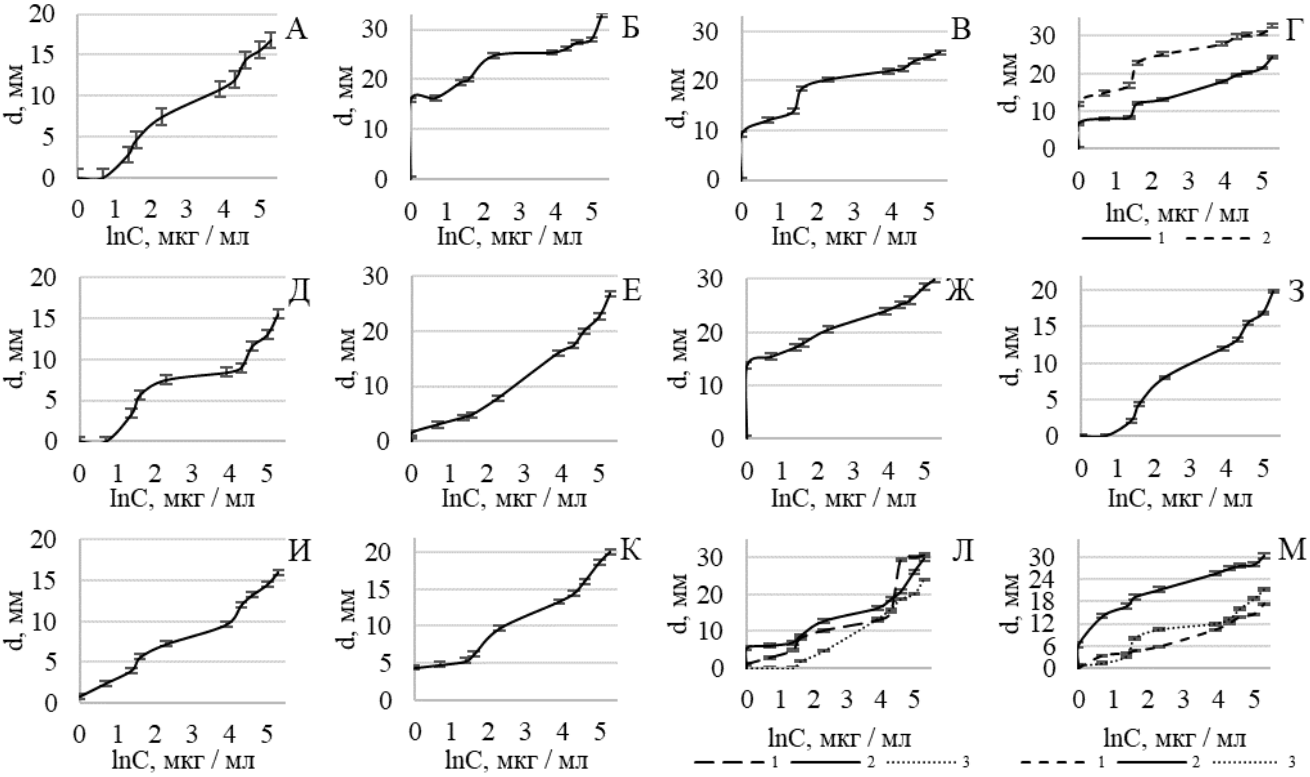
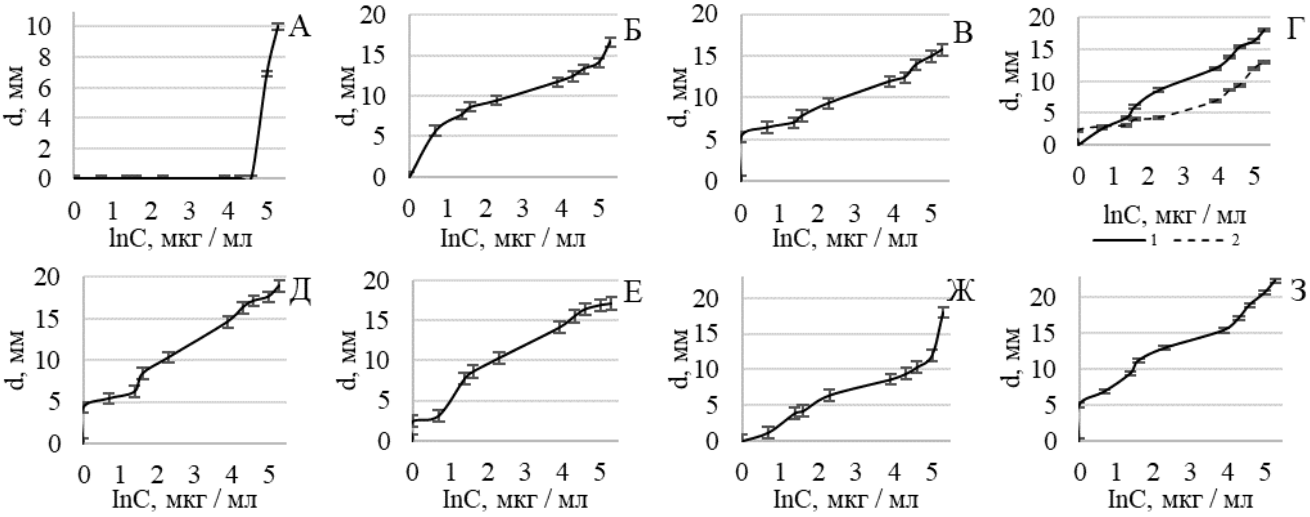


Рисунок 1 – Зависимости диаметров зон ингибирования роста тест-микроорганизма *S. aureus* 209 P от концентраций антибиотиков, где А – ампициллин натрия, Б – доксициклина гидрохлорид, В – тетрациклина гидрохлорид, $Г^1$ – амикацина сульфат, $Г^2$ – гентамицина сульфат, Д – канамицина сульфат, Е – стрептомицина сульфат, Ж – азитромицина дигидрат, З – эритромицин, И – ванкомицина гидрохлорид, К – линкомицина гидрохлорид, $Л^1$ – цефазолин натрия, $Л^2$ – цефепима дигидрохлорид моногидрат, $Л^3$ – цефотаксим натрия, $М^1$ – цефтазидима пентагидрат, $М^2$ – цефтриаксон натрия, $М^3$ – цефуроксим натрия.



Продолжение рисунка 2

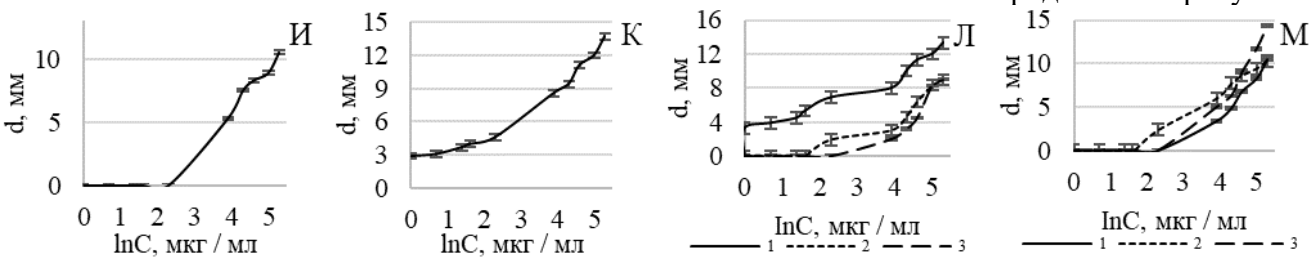


Рисунок 2 – Зависимости диаметров зон ингибирования роста тест-микроорганизма *S. aureus* 209 Р от концентраций антибиотиков, где А – ампициллин натрия, Б – доксициклина гидрохлорид, В – тетрациклина гидрохлорид, $Г^1$ – амикацина сульфат, $Г^2$ – канамицина сульфат, Д – гентамицина сульфат, Е – стрептомицина сульфат, Ж – азитромицина дигидрат, З – эритромицин, И – ванкомицина гидрохлорид, К – линкомицина гидрохлорид, $Л^1$ – цефазолин натрия, $Л^2$ – цефепима дигидрохлорид моногидрат, $Л^3$ – цефотаксим натрия, $М^1$ – цефтазидима пентагидрат, $М^2$ – цефтриаксон натрия, $М^3$ – цефуроксим натрия.

В ходе проведенных исследований установлено, что антибиотики 7 различных групп проявляют неодинаковую активность в отношении разных тест-микроорганизмов, что обусловлено их специфическим механизмом действия, спектром антимикробной активности и другими факторами, что находит свое отражение в работах [Ozçelik B. et al., 2004; Моисеева И.Я. и др., 2004; Амиров Н.Б. и др., 2012; Лобанова Е.Г. и др., 2021; Кукес, В.Г. и др., 2021]. Полученные результаты также показывают необходимость тщательного подбора штамма для конкретного антибиотика [Сухорукова М.В., 2013; Шкурат М.А. и др., 2014].

Однако определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с применением штаммов *S. aureus* 209 Р и *B. subtilis* АТСС 6633 позволило получить аппроксимированные математические модели для дальнейшего сопоставления, анализа и сравнения получаемых данных с применением альтернативных разрабатываемых подходов.

Ввиду того, что значительная часть современных бактериальных инфекций вызвана грамотрицательными бактериями, а большинство тест-микроорганизмов, предусмотренных фармакопейной методикой, являются грамположительными, внедрение грамотрицательных штаммов в качестве новых тест-объектов не вызывает сомнения.

Для доказательства возможности использования люминесцентных светящихся бактерий с грамотрицательным строением клеточной мембраны, следует оценить возможность применения микроорганизмов с таким же типом строения клеточной стенки бактерий. Для этого в работе выбран всемирно известный, всесторонне изученный и используемый как в клинической, так и в фармацевтической практике штамм *E. coli* АТСС 25922.

Сравнительное исследование воздействий антибиотиков на штамм *E. coli* АТСС 25922 и фармакопейные тест-микроорганизмы *S. aureus* 209 Р и *B. subtilis* АТСС 6633 продемонстрировало меньшую чувствительность исследуемого штамма, что проявилось в статистически значимом уменьшении диаметров зон ингибирования роста. Графическое влияние штамма *E. coli* АТСС 25922 на данную зависимость представлено на рисунке 3.

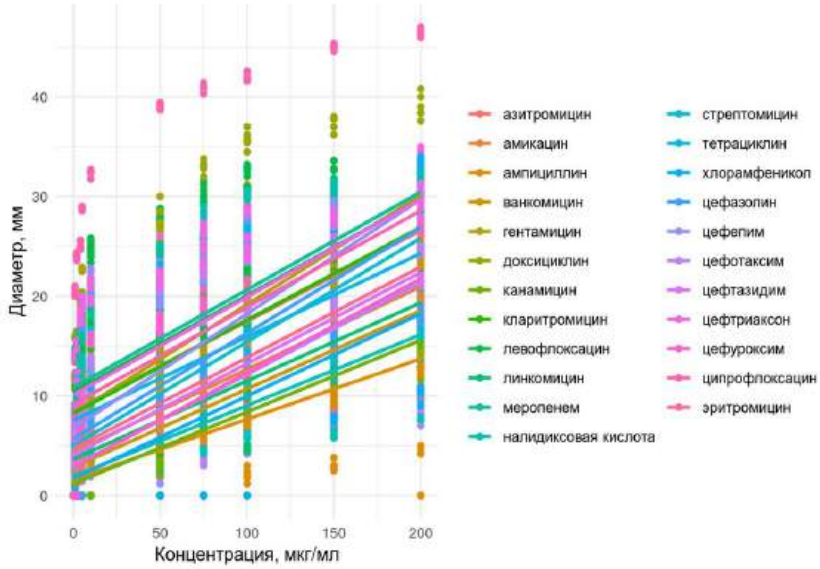


Рисунок 3 – Влияние штамма *E. coli* ATCC 25922 на зависимость диаметров от концентраций.

Анализ с использованием двойного одностороннего тестирования (TOST) показал, что угол наклона линии регрессии и величина ее смещения значительно более зависят от химической структуры антибиотика, чем от вида используемых микроорганизмов. Полученные результаты подтверждают корректность включения типа антибиотика в модель как случайного эффекта. Для проверки данного утверждения использовалась линейная регрессионная модель с учетом всех факторов как постоянных эффектов. Следует отметить, что даже для фиксированных значений факторов вида штамма (St) и структуры антибиотиков (A) зависимость диаметров от концентраций (d(C)) проявляет нелинейность.

Поэтому дополнительно рассмотрены модели, учитывающие эту нелинейность как полином второй и третьей степени от величины концентрации – $d(C^2)$ и $d(C^3)$ соответственно. Результаты сравнения моделей представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Качество моделей.

Модель	Df	AIC	BIC
$d = C + S_t + A$	29	45958,58	46158,27
$d = C + S_t + (1 + S_t \mid A)$	22	40739,79	40891,28
$d = C^2 + S_t + (1 + S_t \mid A)$	23	39195,98	39354,35
$d = C^3 + S_t + (1 + S_t \mid A)$	24	38753,86	38919,12

Примечание: C – концентрация антибиотиков, S_t – штамм, A – антибиотик, Df – степень свободы, AIC – информационный критерий Акаике, BIC – Байесовский информационный критерий.

Наименьшие значения AIC и BIC, представленные в таблице, указывают, что модель со смешанными эффектами и полином третьей степени для концентрации антибиотика является оптимальной и, соответственно, выбрана как лучшая.

Правильность выбора модели подтверждали статистической проверкой нулевой гипотезы. Таблица 2 содержит результаты проверки наличия объяснения дисперсии со стороны постоянных эффектов на основе F-теста.

Таблица 2 – Результаты F-теста постоянных параметров лучшей модели.

Параметр	F-статистика	p-значение
C^3	8287,37	$0{,}0\times e^{+0}$
S_t	11,39	$3{,}6\times e^{-5}$

Примечание: C – концентрация антибиотиков, S_t – штамм, F-статистика – F-критерий (критерий Фишера), описывающий соотношение межгрупповой дисперсии (обусловленной влиянием фактора C^3) к внутригрупповой

дисперсии (случайным колебаниям), p-значение – вероятность получить наблюдаемые или более экстремальные результаты при условии, что нулевая гипотеза верна.

Результаты доказывают, что включенные в эту модель факторы – нелинейная зависимость от концентрации и различия между штаммами – не являются случайными. Они объясняют наблюдаемые в эксперименте различия, что делает модель содержательной и полезной для выводов.

Удаление из модели различий в реакции штаммов на разные антибиотики (то есть допущение, что все штаммы одинаково реагируют на любой антибиотик) делает модель статистически несостоятельной. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнение качества исходной и редуцированной модели по отношению к влиянию типа антибиотика.

Модели	L	AIC	F-статистика	p-значение
$(1 + S_t \mid A)$	-19352,93	38753,86	–	–
$(1 \mid A)$	-22595,70	45211,41	6485,55	0

Примечание: A – антибиотик, S_t – штамм, L – логарифмическая функция правдоподобия, AIC – информационный критерий Акаике, F-статистика – критерий Фишера для сравнения моделей, p-значение – проверка нулевой гипотезы.

Данные показывают, что тип антибиотика существенно изменяет характер влияния штамма на изучаемый показатель. При оценке итоговой модели проведен анализ распределения остатков, который показал, что результаты приближены к нормальному распределению в контексте поставленных задач, так как существенные нарушения наблюдаются лишь в небольшом диапазоне.

Результаты теста TOST показали, что штамм *E. coli* АТСС 25922 не является статистически эквивалентным эталонному штамму *S. aureus* 209 Р при допустимой разнице в 10 % и 20 % (табл. 4).

Таблица 4 – Результаты теста на эквивалентность штаммов с *E. coli* АТСС 25922.

Тип штамма	$\lvert\delta\rvert$	$\mu_2 - \mu_1$	95%-ДИ		p-значение		Эквивалент *E. coli* АТСС 25922
			Нижний	Верхний	H-	H+	
S. aureus 209 Р	4,7	-14,58	-18,27	-10,88	0,999993	$0\times e^{+0}$	–
S. aureus 209 Р	9,4	-14,58	-18,27	-10,88	0,995910	$0\times e^{+0}$	–
B. subtilis АТСС 6633	4,7	2,52	-0,58	5,62	$4\times e^{-5}$	0,079492	–
B. subtilis АТСС 6633	9,4	2,52	-0,58	5,62	$0\times e^{+0}$	0,000070	Эквивалент

Примечание: $\lvert\delta\rvert$ – абсолютное значение разности между средними, $\mu_2 - \mu_1$ – разность средних значений, 95 %-ДИ – доверительный интервал, p-значение – проверка нулевой гипотезы.

При сравнении со штаммом *B. subtilis* АТСС 6633 *E. coli* АТСС 25922 не демонстрирует эквивалентности при допустимой разнице 10 %, однако может быть признан эквивалентным при 20 % и проявляет более высокую чувствительность к исследуемым антибиотикам.

Таким образом несмотря на то, что в качестве тест-микроорганизмов ГФ РФ рекомендует *S. aureus* 209 Р и *B. subtilis* АТСС 6633, которые являются грамположительными бактериями, данные показывают возможность использования грамотрицательных микроорганизмов, в частности штамм *E. coli* АТСС 25922 продемонстрировал пригодность для оценки антимикробной активности широкого спектра антибиотиков методом диффузии в агар.

Однако при определении антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар оптимальным размером зоны угнетения роста тест-микроорганизмов для минимальной концентрации антибиотика является диаметр не менее 14 мм [ГФ РФ XIV-го издания], что удалось установить для 14 из 17 протестированных антибиотиков, несмотря на замену штамма.

2. Определение антимикробной активности антибиотиков с использованием в качестве тест-объектов люминесцентных бактерий методом диффузии в агар

На основании проведенных ранее исследований оценили возможность использования биолюминесцентных тест-штаммов для определения антимикробной активности антибиотиков. В качестве тест-объекта для изучения активности антибиотиков использован рекомбинантный светящийся штамм *E. coli* MG1655 (xen`::lux), что обусловлено биологической близостью его структуры к патогенным видам *E. coli* [Edwards J.S. et al., 2000].

В ходе анализа результатов экспериментальных исследований выявили, что большинство антибиотиков оказывали меньшую активность в сравнении с «эталонной» кишечной палочкой, что может быть обусловлено влиянием lux-оперона на экспрессию других генов, а также наличием в питательной среде дополнительных концентраций ампициллина для стабилизации плазмиды и генетически запрограммированной устойчивостью к последнему антибиотику [Котова В.Ю. и др., 2009]. Наименьшую антимикробную активность проявляли азитромицина дигидрат, канамицина сульфат и цефотаксим натрия, что может указывать на увеличенную устойчивость рекомбинантного штамма к этим антибиотикам.

Использование рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 с плазмидой pXen7-lux в качестве тест-объекта для оценки антимикробной активности оказалось достаточно ограниченным, несмотря на выявленную эквивалентность эталону *B. subtilis* ATCC 6633 даже при 10 % наименьшей значимой разнице и различия в чувствительности штаммов, росте зон ингибирования (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты теста эквивалентности рекомбинантного штамма с *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633.

Тип штамма	$\lvert\delta\rvert$	$\mu_2 - \mu_1$	95%-ДИ		p-значение		Эквивалент
			Нижний	Верхний	H-	H+	*E. coli* MG1655 (xen`::lux)
S. aureus 209 P	4,7	-14,95	-19,81	-10,09	0,999879	$0\times e^{+0}$	–
S. aureus 209 P	9,4	-14,95	-19.81	-10,09	0,986493	$0\times e^{+0}$	–
B. subtilis ATCC 6633	4,7	2,14	-0,42	4,71	$8\times e^{-6}$	0,025414	Эквивалент
B. subtilis ATCC 6633	9,4	2,14	-0,42	4,71	$0\times e^{+0}$	0,000004	Эквивалент

Примечание: $\lvert\delta\rvert$ – абсолютное значение разности между средними, $\mu_2 - \mu_1$ – разность средних значений, 95 %-ДИ – доверительный интервал, p-значение – проверка нулевой гипотезы.

Таким образом, опираясь на данные научной литературы и результаты собственных экспериментальных исследований для разработки методики применили природные люминесцентные бактерии штамма *P. leiognathi* Sh1, обладающие наибольшей чувствительностью к антибиотикам, что выделяет его среди прочих изолятов, полученных из Черного и Азовского морей [Сафронюк С.Л. и др., 2013].

Поскольку существующий метод определения антимикробной активности антибиотиков не адаптирован для морских микроорганизмов, требовалась разработка собственной методики диффузии в агар. Это связано с тем, что данный штамм отличается по своим физиологическим характеристикам от микроорганизмов, описанных в ОФС.1.2.4.0010.18.

В связи с тем, что для культивирования природного биолюминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 требуется соленая среда, проведена оценка влияния натрия хлорида (NaCl) на стабильность свечения бактерий, измеряемую в относительных световых единицах (RLU), и на рост клеток, оцениваемый по оптической плотности (D) при 620 нм. Результаты представлены на рисунке 4.

В результате оптимальной для роста, метаболизма и максимальной люминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1 признана 3 % концентрация хлорида натрия. Установлено, что в

интервале 16 – 18 ч достигалась максимальная интенсивность свечения – 186 000 – 192 000 RLU, а значения D составили 0,822 – 0,884 и не выявили статистически значимых изменений количества клеток в зависимости от концентрации среды.

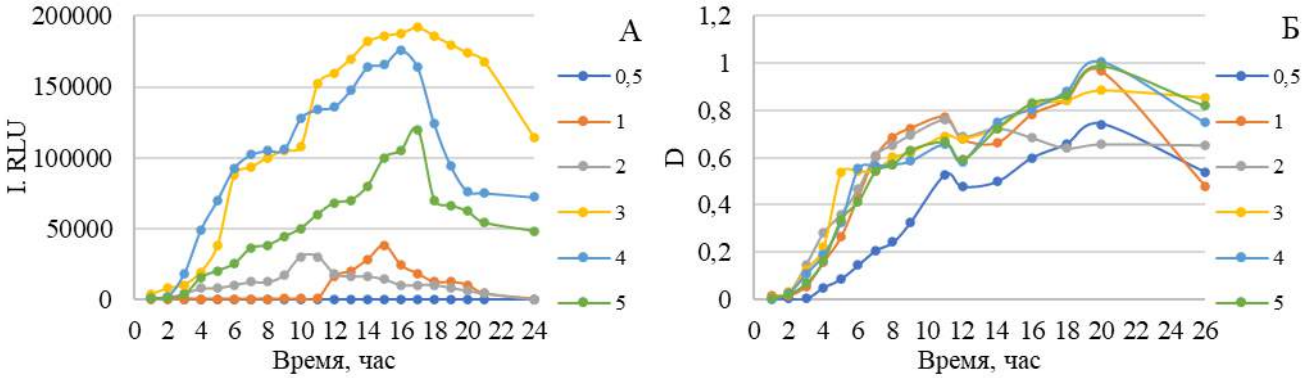
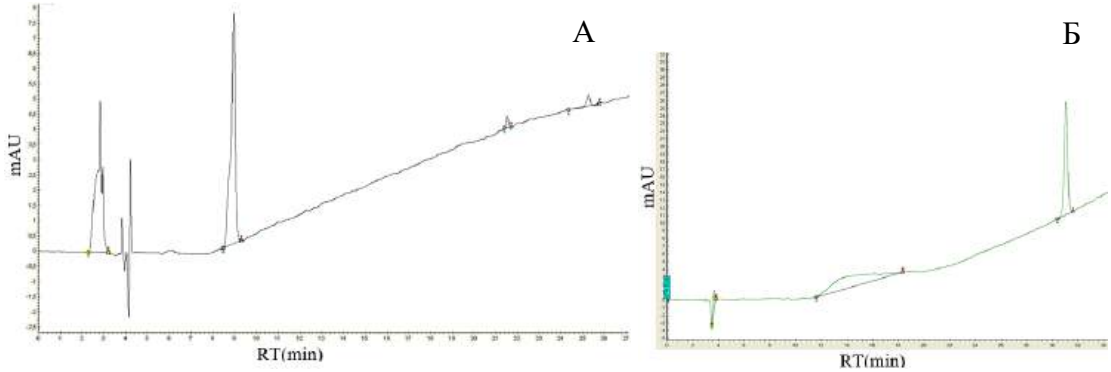


Рисунок 4 –Зависимость влияния различных концентраций натрия хлорида на люминесценцию (А) и количество клеток (Б) штамма *P. leiognathi* Sh1 в течении 24 часов, где 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % и 5 % – концентрации соли в среде с бактериями *P. leiognathi* Sh1.

Кроме того, для изготовления стандартных и испытуемых растворов антибиотиков в методе диффузии в агар, кроме воды очищенной, могут быть использованы различные органические растворители, в частности диметилсульфоксид (ДМСО). В ходе анализа влияния ДМСО на штамм *P. leiognathi* Sh1 не установлено угнетающего действия на рост культуры и интенсивность свечения в диапазоне концентраций 10 – 20 мкг / мл.

Дополнительно изучена зависимость свечения штамма при температурах культивирования от 15 до 37 ^{0}C и установлено, что оптимальной температурой для проведения анализа является 25 ^{0}C. Данная температура культивирования, на наш взгляд, позволит получать более достоверные результаты, поскольку, согласно данным научной литературы, для большинства антибиотиков 24-х часовая инкубация при 37 ^{0}C в методе диффузии в агар может снижать их антимикробную активность из-за нарушения структуры молекулы [Жильцов И.В. и др., 2011; Laure N.N. et al., 2021; Михайлова Н.И. и др., 2024]. Для подтверждения данной гипотезы проведен анализ растворов ампициллина и цефотаксима натрия с использованием ВЭЖХ после хранения в термостате в течение 24-х часов при 37 ^{0}C и 18-ти часов при в 25 ^{0}C в сравнении со свежеприготовленными растворами.

При инкубации ампициллина натрия 24 ч при 37 ^{0}C доля основных пиков снизилась на 32,36 – 53,31 %, суммарная площадь пиков выросла с 3,3 до 10,4 mAU / мин, появились пики продуктов распада (16,19 – 38,07 %). При хранении 18 ч при 25 ^{0}C потери основного вещества – около 5 %. Для цефотаксима после 24 ч инкубации при 37 ^{0}C – полное исчезновение основного пика (31,05 мин), рост общей площади пиков на 25,4 % и появление пиков продуктов гидролиза. Хроматограммы антибиотиков представлены на рисунке 5.



Продолжение рисунка 5

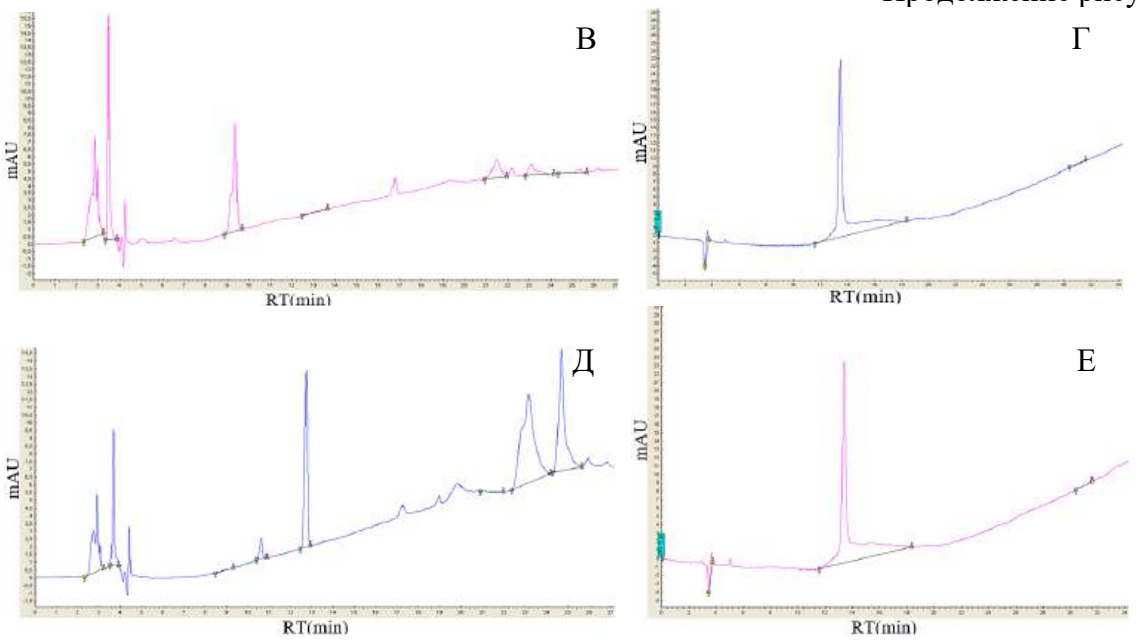


Рисунок 5 – Хроматограммы антибиотиков, где А – свежеприготовленный раствор ампициллина натрия, Б – свежеприготовленный раствор цефотаксима натрия, В – раствор ампициллина натрия после 18-ти часового выдерживания при 25 ^{0}С, Г – раствор цефотаксима натрия после 18-ти часового выдерживания при 25 ^{0}С, Д – раствора ампициллина натрия после 24-х часового выдерживания при 37 ^{0}С, Е – раствор цефотаксима натрия после 24-х часового выдерживания при 37 ^{0}С.

Сравнительный анализ показывает, что условия инкубации при 37 ^{0}С, моделирующие метод диффузии в агар, приводят к значительному гидролизу ампициллина и практически полной деградации исходного цефотаксима. При 25 ^{0}С общая площадь пиков указывает на частичную нестабильность антибиотиков. Следовательно, для получения достоверных и воспроизводимых результатов при оценке антимикробной активности β-лактамных антибиотиков исследования следует проводить при температуре 25 ^{0}С – это позволяет минимизировать деградацию антибиотиков, обеспечить получение достоверных данных и их корректную интерпретацию.

В результате подобраны и стандартизированы условия для оценки антибиотиков методом диффузии в агар с использованием *P. leiognathi* Sh1 – оптимальная солевая концентрация среды (3 %), температурный режим (25 ^{0}С) с временем выдерживания 16 – 18 ч, используемые растворители (вода очищенная, ДМСО). Проведена оценка антимикробной активности ряда антибиотиков методом диффузии в агар, в результате которой выявлена высокая чувствительность штамма *P. leiognathi* Sh1 к широкому спектру субстанций. Сравнение влияния антибиотиков на рост *P. leiognathi* Sh1 и *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) показало, что большинство антибиотиков проявляют более высокую активность в отношении природного люминесцирующего тест-микроорганизма, а в результате статистической проверки эквивалентности выявлено, что штамм является «аналогом» *B. subtilis* ATCC 6633.

Таким образом, природный люминесцирующий штамм *P. leiognathi* Sh1 признан наиболее перспективным тест-объектом для разработки методики оценки антибиотиков биолюминесцентным анализом ввиду высокой чувствительности, возможности тестирования субстанций в более низких концентрациях, чем с использованием других тест-микроорганизмов, визуализации эффекта, хорошей воспроизводимости результатов и сокращения времени выращивания культуры микроорганизмов.

3. Разработка методики определения антимикробной активности антибиотиков с использованием биолюминесцентных бактерий

При разработке методики для поддержания жизнедеятельности и культивирования природного люминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 использовали стандартную питательную среду Nutrient agar M001 500G (Himedia, Индия, lot: 0000387742) с обязательным дополнительным внесением NaCl до конечной концентрации равной 3 % в среде – в соответствии с ранее установленными оптимальными параметрами.

Подготовку бактериальной суспензии для проведения анализа проводили путем отбора свежей колонии (не старше 7 дней) с плотной питательной среды, с последующим внесением ее в питательный бульон Nutrient broth M002 500G (Himedia, Индия, lot: 0000387742) и термостатированием при 25 ^{0}C в течение 18 часов. Перед началом оценки влияния антибиотиков на люминесценцию тест-штамма полученную суспензию стандартизировали, путем разбавления 3 % раствором NaCl до конечной концентрации клеток 5×10^6 клеток / мл в инокуляте и $2{,}5 \times 10^5$ клеток / мл непосредственно в пробе с антибиотиком.

Растворы антибиотиков готовили в соответствии с растворимостью антибиотиков, описанных в ОФС на субстанции в ГФ РФ XV-го издания. В результате, водорастворимые субстанции, а именно сульфат амикацина, натрия ампициллин, гидрохлорид ванкомицина, сульфат гентамицина, гидрохлорид доксициклина, сульфат канамицина, гидрохлорид линкомицина, сульфат стрептомицина, гидрохлорид тетрациклина, натрия цефазолин, дигидрохлорид моногидрат цефепима, натрия цефотаксим, натрия цефтриаксон и натрия цефуроксим растворяли в стерильной воде очищенной, а субстанции с низкой растворимостью, а именно дигидрат азитромицина, пентагидрат цефтазидима и эритромицин – в диметилсульфоксиде. Концентрации последнего в конечной пробе находились в ранее установленном оптимальном диапазоне, не влияющем на жизнедеятельность штамма.

Методика тестирования заключалась в следующем: в стерильные пробы последовательно добавляли стандартизированную бактериальную суспензию и растворы антибиотиков в заданной концентрации. Контрольная проба содержала только суспензию бактерий в 3 % NaCl. Пробы инкубировали при 25 ^{0}C в течение 18 часов. После инкубации интенсивность биолюминесценции регистрировали на люминометрах – биохемилюминометре БХЛ-06 (НПО «Биофармавтоматика», Россия) и LumiShot (НПП «Прикладные биосистемы», Россия). Для каждой концентрации проводили не менее 3 измерений длительностью около 5 секунд.

Для количественной оценки антимикробной активности антибиотиков использовали индекс БЛИ, рассчитываемый по формуле: БЛИ (%) = $(I_i / I_0) \times 100$ %, где I_i – интенсивность свечения в пробе с антибиотиком, I_0 – интенсивность свечения в контрольной пробе (без антибиотика). Результаты значений БЛИ для каждой концентрации антибиотика подвергались статистической обработке в соответствии с требованиями ГФ РФ XV-го издания. На основе средних значений полученных данных строились кривые зависимости БЛИ от концентраций антибиотика.

На этапе разработки методики определяли диапазон линейности кривой зависимости снижения БЛИ от концентраций антибиотиков. В результате оценки 7 групп антибиотиков различных химических структур в интервале от 1 до 200 мкг / мл установлено, что все субстанции вызывают дозозависимое снижение БЛИ. Для соединений, полностью подавлявших свечение уже при низких концентрациях, анализ проводили в области более низких значений концентрации исследуемого вещества. Для каждого антибиотика установлен индивидуальный диапазон концентраций, в котором наблюдалась линейная зависимость БЛИ от lnC.

Для большинства антибиотиков линейный диапазон составил 1 – 10 мкг / мл, для азитромицина дигидрата – 0,05 – 1 мкг / мл, для тетрациклина гидрохлорида – 0,01 – 0,5 мкг / мл, для ампициллина натрия – 1 – 5 мкг / мл, для ванкомицина гидрохлорида, гентамицина сульфата, канамицина сульфата, линкомицина гидрохлорид, цефазолин натрия, цефотаксим натрия и эритромицина – 1 – 20 мкг / мл.

4. Определение валидационных параметров методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности антибиотиков

Пригодность методики для количественной оценки антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции *P. leiognathi* Sh1 подтверждали путем расчета основных валидационных параметров: чувствительность, ПО (предел обнаружения), ПКО (предел количественного определения), аналитическая область, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность и устойчивость. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Основные валидационные характеристики результатов эксперимента по измерению изменения интенсивности люминесценции *P. leiognathi* Sh1

Антибиотик	Уравнение линейной Зависимости	R^2	Аналитическая область, мкг / мл	ПО, мкг / мл	ПКО, мкг / мл	Δx, мкг / мл	Правильность (R, %)	S	S^2	$S_{\delta,\%}$
1	y = -16,454 × x – 3,752	0,965	0,32 – 2,31	0,32	0,96	0,05	99,6	1,028	1,416	17,59
2	y = -33,187 × x + 78,368	0,963	0,17 – 7,84	0,17	0,53	0,50	97,7	1,439	2,969	14,54
3	y = -17,11 × x + 30,005	0,999	0,27 – 3,22	0,27	0,82	0,48	99,8	0,888	1,642	11,29
4	y = -18,033 × x + 55,461	0,978	0,25 – 12,44	0,25	0,77	0,76	97,3	1,442	2,039	17,41
5	y = -28,391 × x + 82,44	0,957	0,21 – 12,82	0,21	0,63	0,13	98,7	1,746	3,392	17,21
6	y = -12,918 × x + 28,499	0,988	0,36 – 4,19	0,36	1,10	0,26	97,7	1,501	2,375	51,57
7	y = -25,081 × x + 84,502	0,960	0,22 – 19,49	0,22	0,65	0,23	99,9	1,380	2,099	4,90
8	y = -31,503 × x + 101,92	0,951	0,04 – 18,50	0,04	0,13	0,02	100,0	0,310	0,212	0,49
9	y = -21,288 × x + 46,229	0,964	0,20 – 5,48	0,20	0,62	0,19	101,6	1,045	1,298	9,88
10	y = -21,367 × x – 9,6044	0,968	0,50 – 2,50	0,50	1,51	0,01	100,4	1,640	5,910	2,74
11	y = -25,081 × x + 84,502	0,960	0,21 – 19,49	0,21	0,64	0,21	100,6	1,501	2,683	7,11
12	y = -23,124 × x + 52,709	0,955	0,25 – 6,34	0,25	0,77	0,51	102,8	1,291	3,064	10,43
13	y = -36,722 × x + 105,59	0,953	0,01 – 13,50	0,01	0,03	0,008	100,0	0,095	0,014	0,41
14	y = -37,519 × x + 77,659	0,959	0,01 – 6,07	0,01	0,04	0,008	100,2	0,085	0,018	4,37
15	y = -15,52 × x + 37,437	0,975	0,27 – 5,86	0,27	0,81	0,39	99,9	1,100	1,920	9,67
16	y = -33,244 × x + 82,436	0,984	0,19 – 8,83	0,19	0,56	0,30	101,8	1,318	2,486	10,03
17	y = -31,141 × x + 93,761	0,964	0,03 – 14,72	0,03	0,10	0,01	100,1	0,225	0,127	0,41

Примечание: 1 – азитромицина дигидрат, 2 – амикацина сульфат, 3 – ампициллин натрия, 4 – ванкомицина гидрохлорид, 5 – гентамицина сульфат, 6 – доксициклина гидрохлорид, 7 – канамицина сульфат, 8 – линкомицина гидрохлорид, 9 – стрептомицина сульфат, 10 – тетрациклина гидрохлорид, 11 – цефазолин натрия, 12 – цефепима дигидрохлорид моногидрат, 13 – цефотаксим натрия, 14 – цефтазидима пентагидрат, 15 – цефтриаксон натрия, 16 – цефуроксим натрия и 17 – эритромицин.

Для всех 17 исследуемых антибиотиков в указанных диапазонах концентраций

подтверждена линейная зависимость аналитического сигнала БЛИ (%) от lgC (мкг / мл). Высокие значения коэффициента детерминации ($R^2 \geq 0,951$) свидетельствуют об адекватности линейной модели для описания калибровочных данных.

Чувствительность методики биолюминесцентного анализа определяли по угловому коэффициенту (*b*) калибровочной зависимости интенсивности свечения *P. leiognathi* Sh1 от концентрации антибиотиков. Анализ коэффициентов *b* выявил разброс их абсолютных значений (от -12,918 для доксициклина гидрохлорида до -37,519 для цефтазидима пентагидрата). Более высокие абсолютные значения коэффициентов (например, у амикацина сульфата, линкомицина гидрохлорида моногидрата, цефотаксима натрия, цефтазидима пентагидрата, цефуроксима натрия и эритромицина), что указывает на большее изменение аналитического сигнала подавления люминесценции в ответ на минимальное изменение концентрации.

На основе полученных коэффициентов *a* рассчитывали ключевые валидационные параметры: ПО и ПКО. Согласно полученным данным, наиболее низкие значения демонстрирует цефотаксим натрия (ПО = 0,01 ± 0,008 мкг / мл, ПКО = 0,03 ± 0,008 мкг / мл), цефтазидима пентагидрат (ПО = 0,01 ± 0,008 мкг / мл, ПКО = 0,04 ± 0,008 мкг / мл), эритромицин (ПО = 0,03 ± 0,01 мкг / мл, ПКО = 0,10 ± 0,01 мкг / мл) и линкомицина гидрохлорид моногидрат (ПО = 0,04 ± 0,02 мкг / мл, ПКО = 0,13 ± 0,02 мкг / мл), что свидетельствует о высокой способности биолюминесцентного анализа количественно определять данные соединения даже в следовых концентрациях.

Аналитическая область для каждого антибиотика охватывает диапазон концентраций, в пределах которого находятся границы ее применимости. Для канамицина сульфата и цефазолина натрия верхние границы достигают 19,49 ± 1,38 и 19,49 ± 1,50 мкг / мл соответственно. В то же время для линкомицина гидрохлорида, цефотаксима натрия, цефтазидима пентагидрата и эритромицина нижняя граница аналитической области (ПО) снижена до 0,01 – 0,04 мкг / мл, что отражает чувствительность метода к разным классам антибиотиков.

Значения определения концентраций стандартных образцов антибиотиков находились внутри доверительных интервалов средних найденных значений, что подтвердило правильность методики с результатами соответствия в диапазоне 97,3 – 102,8 %. Критерий Аббе (0,9) свидетельствует об отсутствии систематической погрешности на всех уровнях значимости ($p = 0,001 – 0,05$). Значения внутрилабораторной прецизионности, выраженные через S, варьируются в интервале 0,085 – 1,746, S^2 – 0,014 – 5,910 и $S_{\delta,\%}$ – 0,41 – 51,57 % при 10-кратном повторении измерений. Особенно низкие значения $S_{\delta,\%}$ зафиксированы для: канамицина сульфата (0,41 %), цефотаксима натрия (0,41 %), эритромицина (0,41 %), линкомицина гидрохлорида (0,49 %), доксициклина гидрохлорида (4,90 %), цефтазидима пентагидрата (4,37 %) и тетрациклина гидрохлорида (2,74 %). Все показатели свидетельствуют о высокой воспроизводимости результатов в условиях одной лаборатории [Буйлова И.А. и др., 2020].

По показателю $S_{\delta,\%}$ разработанная методика демонстрирует повышенную устойчивость по сравнению со стандартной методикой диффузии в агар для линкомицина гидрохлорида, цефотаксима натрия и эритромицина; для стрептомицина сульфата, цефтриаксона натрия, цефепима дигидрохлорида моногидрата и цефазолина натрия – обеспечивает сопоставимую либо лучшую устойчивость.

Для оценки устойчивости корреляционной зависимости между интенсивностью свечения и концентрацией антибиотика, учитывая небольшой размер выборок ($n \leq 10$), применены

устойчивые статистические меры – 10% β-А-оценка дисперсии $\zeta_{pb0.1}$ и 20 % винсоризованный корреляционный коэффициент Пирсона $R_{w0.2}$. Для всех 17 антибиотиков обе устойчивые оценки имеют отрицательные значения, что подтверждает общий характер обратной зависимости от повышения концентрации антибиотика. Значения коэффициентов для большинства антибиотиков находятся в диапазоне от -0,9 до -1,0, что свидетельствует об очень сильной и устойчивой линейной зависимости даже при наличии асимметрии в данных.

5. Испытание методики биолюминесцентного анализа для оценки антибиотиков и других противомикробных веществ, не вошедших в ОФС.1.2.4.0010.18

Поскольку на сегодняшний день появилось большое количество новых антимикробных веществ, провели испытание разработанной методики, основанной на измерении изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции *P. leiognathi* Sh1, на противомикробных субстанциях, для которых в ГФ РФ XIV-го издания отсутствуют регламентированные испытания. В частности, показана ее апробация для хлорамфеникола, меропенема тригидрата, кларитромицина, фуразолидона, фурациллина, налидиксовой кислоты, левофлоксацина гемигидрата и ципрофлоксацина (рис. 6).

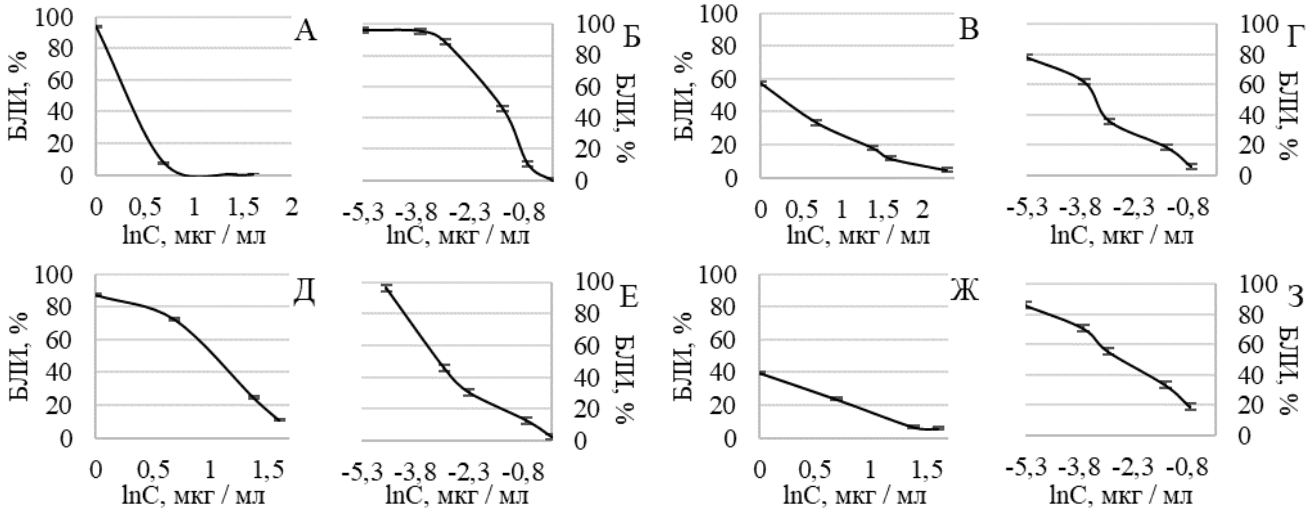


Рисунок 6 – Зависимости интенсивности биолюминесценции, выраженного в БЛИ (%), от концентраций субстанций через 18 часов, где А – хлорамфеникол, Б – меропенема тригидрат, В – кларитромицин, Г – фуразолидон, Д – фурациллин, Е – налидиксовая кислота, Ж – левофлоксацина гемигидрат, З – ципрофлоксацин.

Исследование подтвердило высокую чувствительность штамма *P. leiognathi* Sh1 к различным классам антимикробных средств. Так, хлорамфеникол подавлял биолюминесценцию до 7,7 % от контроля уже при 2 мкг / мл в пробе, меропенем полностью ингибировал свечение тест-штамма в диапазоне 1 – 10 мкг / мл, а для кларитромицина, как для большинства, исследованных ранее антибиотиков, была характерна обратная линейная зависимость влияния в том же интервале концентраций. При этом R^2 в диапазоне от 0,956 до 0,998 указывает на то, что линейная регрессия объясняет значительную часть вариации в данных и повышает достоверность полученных результатов оценки антимикробной активности.

Помимо антибиотиков, веществ микробиологического происхождения, существует целый класс синтетических антибактериальных средств, которые играют важную роль в борьбе с бактериальными инфекциями, но не представлены в ОФС.1.2.4.0010.18 [Супотницкий М.В., 2011; Перепанова Т.С., 2018; Popov D., 2020]. В частности, изучение влияния субстанций на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1 выявило, что фуразолидон оказывает сильное ингибирующее действие на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1, снижая ее до 5,7 % уже при

0,01 мкг / мл, в отличие от фурациллина, который демонстрирует значительно меньшую активность при концентрациях 1 – 5 мкг / мл, снижая БЛИ до 11,0 %. Налидиксовая кислота значительно подавляет биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1, снижая ее до 2,4 % от контрольных значений при концентрации 1 мкг / мл. Левофлоксацин также проявляет свойства по снижению бактериальной люминесценции с линейной зависимостью в диапазоне концентраций от 1 до 5 мкг / мл, но в меньшей степени, чем ранее описанные вещества. БЛИ при 5 мкг / мл составляет 5,9 %. Ципрофлоксацин характеризовался наибольшей активностью среди исследованных соединений этой группы, снижая биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1 до 18,7 % уже при 0,01 мкг / мл

На основании полученных результатов и проведенного анализа, можно предположить, что методика биолюминесцентного анализа является пригодной и перспективной для оценки веществ, обладающих антибактериальной активностью. Однако потенциал этой методики не ограничивается только оценкой антимикробных свойств при 18-ти часовой инкубации антибиотика с тест-штаммом. Благодаря высокой чувствительности *P. leiognathi* Sh1 к веществам различной природы, в том числе с антибактериальными эффектами, методика измерения изменения интенсивности люминесценции может быть использована для оценки веществ в кратковременном периоде. Оценка влияния веществ на *P. leiognathi* Sh1 в течение 15 – 30 минут представляет интерес для анализа бета-лактамных антибиотиков, которые согласно литературным данным, подвержены гидролизу в водных растворах.

Для демонстрации перспективности экспресс-оценки антибиотиков с использованием разработанной методики, исследован цефотаксим натрия. Анализ антимикробной активности проводили в соответствии с операциями и правилами определения антимикробной активности, предусмотренными разработанной методикой, но при сокращении времени инкубации с последующей регистрацией аналитического сигнала через 30 минут. На рисунке 7 представлен график зависимости БЛИ от логарифмированных концентраций цефотаксима.

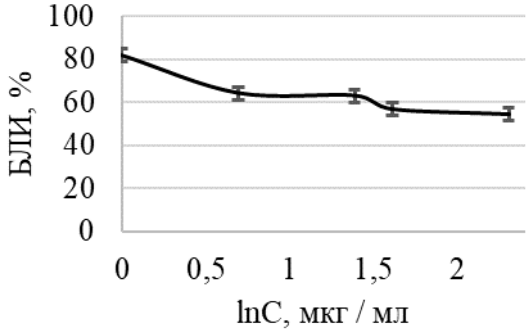


Рисунок 7 – График зависимости ингибирования интенсивности свечения бактерий от концентраций цефотаксима натрия через 30 минут.

Благодаря укороченному 30-ти минутному времени инкубации, методика позволяет минимизировать влияние нестабильности цефотаксима на результаты анализа. Применение описанного подхода позволит расширить область применения разработанной методики и включить в перечень анализируемых соединений термолабильные вещества, в том числе и антимикробные средства, открывая новые возможности для контроля их качества.

Исходя из представленных данных и проведенного анализа, можно предположить, что методика биолюминесцентного анализа оценки антимикробных свойств субстанций, основанная на измерении изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, может быть использована для экспресс-оценки антибиотиков и веществ, обладающих антибактериальными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований по разработке и валидации методики биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков и их количественного определения по измерению изменения интенсивности люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 позволило сделать следующие общие выводы:

1. Научно обоснована возможность использования *P. leiognathi* Sh1 и рекомбинантного *E. coli* MG1655 (xen::lux) в качестве тест-микроорганизма для определения антимикробной активности антибиотиков.

2. С помощью метода ВЭЖХ показан процесс деградации химической структуры некоторых антибиотиков в условиях проведения стандартной процедуры исследования антимикробной активности.

3. Разработана методика биолюминесцентного анализа определения антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 с учетом модификации условий проведения метода диффузии в агар: инкубация бактерий при 25 ^{0}C в течение 18-ти часов, растворители – вода очищенная и/или диметилсульфоксид, при концентрации клеток 5×10^6 клеток / мл в инокуляте и $2{,}5 \times 10^5$ клеток / мл непосредственно в пробе с антибиотиком. Показано, что тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 проявляет более высокую чувствительность к большинству протестированных антибиотиков по сравнению с рекомбинантным люминесцентным штаммом *E. coli* MG1655 (xen::lux).

4. Проведена оценка валидационных характеристик разработанной методики биолюминесцентного анализа определения антимикробной активности антибиотиков, характеризующаяся высокой чувствительностью, ПО равными 0,01 ± 0,008; 0,01 ± 0,008; 0,03 ± 0,01 и 0,04 ± 0,02 мкг / мл, ПКО – 0,03 ± 0,008; 0,04 ± 0,008; 0,10 ± 0,01 и 0,13 ± 0,02 мкг / мл для цефотаксима натрия, цефтазидима пентагидрата, эритромицина и линкомицина гидрохлорида соответственно, внутрилабораторной прецизионностью с S от 0,085 до 1,746, S^2 от 0,014 до 5,910 и S_δ от 0,41 до 17,59 % и правильностью с критериями открываемости 97,3 – 102,8 %. Диапазоны линейности составили: для азитромицина дигидрата 0,05 – 1 мкг / мл, для тетрациклина гидрохлорида – 0,01 – 0,5 мкг / мл, для амикацина сульфата, доксициклина гидрохлорида, стрептомицина сульфата, цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефтазидима пентагидрата, цефтриаксона натрия и цефуроксима натрия – 1 – 10 мкг / мл, для ампициллина натрия – 1 – 5 мкг / мл, для ванкомицина гидрохлорида, гентамицина сульфата, канамицина сульфата, линкомицина гидрохлорида, цефазолина натрия, цефотаксима натрия и эритромицина – 1 – 20 мкг / мл с R^2 от 0,951 до 0,999.

5. Проведенное испытание разработанной методики определения антимикробной активности с помощью биолюминесцентного анализа для некоторых противомикробных субстанций, не внесенных в ОФС.1.2.4.0010.18, показало возможность использования разработанного метода для целей стандартизации данной группы средств.

6. Разработан проект фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа».

Перспективы дальнейшей разработки темы. Основываясь на результатах проведенных исследований, разработанная методика биолюминесцентного анализа может быть применена для анализа антимикробной активности как антибиотиков, так и известных фармацевтических препаратов с антибактериальной активностью, не относящихся к антибиотикам, а также для новых синтезируемых соединений с потенциальным

противомикробным действием.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

- включенные в перечень ВАК:

1. Османова С.Я., Сафронюк С.Л., Кияев А.Х.Б., Кацев А.М. Сравнение метода диффузии в агар и биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2024. Т. 23, № 1. С. 248-254.
2. Кацев А.М., Сафронюк С.Л., Бурцева Е.В., Османова С.Я. Изучение антимикробных свойств веществ растительного происхождения и экстрактов лекарственных растений с использованием биолюминесцентных тест-бактерий // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023. Т. 22, № S6. С. 91.
3. Кацев А.М., Сафронюк С.Л., Бурцева Е.В., Османова С.Я. Могут ли биолюминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения? // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2023. Т. 12, № 4. С. 63-70.

- патенты:

1. Способ оценки антимикробной активности веществ: патент на изобретение № 2838567 Российская Федерация: МПК C12N1/20, G01N21/76, C12Q1/02, C12Q1/04 / [С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев]. – № 2024111496; заявл. 25.04.2024; опубл. 21.04.2025, Бюл. № 12.
2. Способ оценки антимикробных свойств извлечений, полученных из растений семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) и выделенных из них биологически активных веществ: патент на изобретение № 2867877 Российская Федерация: МПК C12Q1/02, C12N1/20, G01N21/76, A61K36/53 / [С.Л. Сафронюк, А.Б. Кияев, С.Я. Османова и др.]. – 2025133783; заявл. 01.12.2025, Бюл. № 23.

- включенные в РИНЦ:

1. Османова С.Я. Оценка валидационных характеристик методики определения антимикробной активности антибиотиков с применением светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1 // Теоретические и практические аспекты современной медицины. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня основания медицинского вуза в Крыму. 2021. С. 188-190.
2. Османова С.Я., Кондратьев Р.А. Оценка влияния органических растворителей и pH на биолюминесценцию рекомбинантных штаммов *E. coli* MG1655 // Теоретические и практические аспекты современной медицины. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня основания медицинского вуза в Крыму. 2021. С. 190-192.
3. Османова С.Я., Сафронюк С.Л., Кацев А.М. Сравнительный анализ методов определения антимикробной активности лекарственных препаратов // Синтез наук как основа развития медицинских знаний. Сборник материалов II Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию кафедры фармацевтического образования Самарского государственного медицинского университета. 2021. С. 79-86.
4. Османова С.Я. Определение антимикробной активности антибиотиков с применением *Photobacterium leiognathi* Sh1 и *Staphylococcus aureus*: сравнительный анализ //

Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной проведению Международного года фундаментальных наук в интересах устойчивого развития «Теоретические и практические аспекты современной медицины». 2022. С. 283-284.

5. Османова С.Я., Сафронюк С.Л., Кацев А.М. Применение биолюминесцентных бактерий для определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар // Сборник научных трудов конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых им. А.Г. Гурвича. 2023. С. 117-119.

6. Османова С.Я., Сафронюк С.Л., Кацев А.М. Исследование антимикробной активности антибиотиков в отношении *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и природных светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1 // Сборник материалов I всероссийской научно-практической конференции: «Достижения современной науки: биотехнология, химия и фармация». 2023. С. 179-180.

7. Османова С.Я. Возможность использования люминесцентных бактерий для определения антимикробной активности антибиотиков // Сборник материалов XVIII Всероссийской (92-ая Итоговой) студенческой научной конференции СНО с международным участием «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты». 2024. С. 595-598.

8. Османова С.Я. Изучение возможности использования бактерий вида *Escherichia coli* для оценки антимикробной активности антибиотиков // Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 150-летию со дня рождения Н.А. Семашко «Теоретические и практические аспекты современной медицины». 2024. С. 319-321.

9. Османова С.Я., Сафронюк С.Л., Кацев А.М. *E. coli* ATCC 25922 как тест-объект для количественного определения антибиотиков // Материалы II Конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых им. А.Г. Гурвича. 2024. С. 60.

10. Османова С.Я., Сафронюк С.Л., Кацев А.М. Влияние антибактериальных субстанций на рост биолюминесцентного тест штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1 // Сборник научных трудов III Научно-практической онлайн-конференции с международным участием, посвященной 105-летию Самарского государственного медицинского университета. 2024. С. 123-126.

11. Шухмахер А.В., Османова С.Я., Сафронюк С.Л. и др. Определение антимикробной активности производных нитрофурана методом диффузии в агар // Достижения современной науки: биотехнология, химия и фармация. Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции. 2025. С. 98-99.