ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. В.И. ВЕРНАДСКОГО»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ОСМАНОВА СЕЛИНА ЯГЬЯЕВНА

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Сафронюк Сергей Леонидович
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Симферополь – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1. ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА В СРАВНЕНИИ С ТРАДИЦИОННЫМИ ПОДХОДАМИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА АНТИБИОТИКОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 16
1.1 Особенности антибиотиков 16
1.2 Микробиологические методы анализа антибиотиков 22
1.1.2 Лабораторные исследования в клинической микробиологии. 22
1.1.3 Микробиологический контроль качества лекарственных препаратов. 25
1.3 Физико-химические методы анализа антибиотиков 28
1.2.1 Хроматографические подходы 28
1.2.2 Спектрофотометрические методы 31
1.3 Биолюминесцентный анализ 34
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1 39
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 41
2.1 Предмет и объект исследования 41
2.2 Методы исследования 43
2.2.1 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар 43
2.2.2 Измерение интенсивности бактериальной биолюминесценции под действием антибиотиков 44
2.3 Статистическая обработка данных 45
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР 47
3.1 Определение активности антибиотиков с использованием в качестве тест-объектов *Staphylococcus aureus* 209 P и *Bacillus subtilis* ATCC 6633 методом диффузии в агар 47
3.2 Определение активности антибиотиков с использованием в качестве тест-объектов *E. coli* ATCC 25922 методом диффузии в агар 65
3.3 Определение активности антибиотиков с использованием в качестве тест-

объектов люминесцентных бактерий методом диффузии в агар 80
3.4 Определение активности антибиотиков с использованием люминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 методом диффузии в агар 87
3.4.1 Хроматографическая оценка стабильности β-лактамных антибиотиков при различных температурных режимах 100
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3 106
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ 108
4.1 Подбор условий тестирования для определения активности антибиотиков с использованием *P. leiognathi* Sh1 108
4.1.1 Подготовка рабочего места и оборудования к исследованию 109
4.1.2 Подготовка питательных сред для культивирования *P. leiognathi* Sh1..... 110
4.1.3 Подготовка, выращивание и хранение культуры *P. leiognathi* Sh1 111
4.1.4 Подготовка и стандартизация бактериальной суспензии для исследования112
4.1.5 Подготовка анализируемых растворов для исследования..... 113
4.1.6 Подготовка исследуемых образцов и проведение анализа..... 114
4.1.7 Обработка и анализ результатов..... 115
4.2 Определение диапазонов линейности активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции бактерий..... 117
4.3 Основные статистические и валидационные параметры методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности антибиотиков 127
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4 140
ГЛАВА 5. ИСПЫТАНИЕ МЕТОДИКИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЕЩЕСТВ..... 142
5.1 Методика биолюминесцентного тестирования антибиотиков, не входящих в перечень Государственной Фармакопеи XIV-го издания..... 142
5.2 Применение разработанной методики определения активности веществ, обладающих антибактериальной активностью, по измерению изменения интенсивности биолюминесценции тест-штамма 145

5.3 Перспективы экспресс-оценки антибиотиков с помощью разработанной методики измерения изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма 150
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5 153
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 154
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 159
ПРИЛОЖЕНИЯ 194
Приложение 1. Результаты статистической обработки полученных результатов. 194
Таблица 1. Результаты статистической обработки данных изменения интенсивности свечения *P. leiognathi* Sh1 под действием испытуемых концентраций антибиотиков. 194
Приложение 2. Проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа». 200
Приложение 3. Патент «Способ оценки антимикробной активности веществ». . 213
Приложение 4. Патент «Способ оценки антимикробных свойств извлечений, полученных из растений семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) и выделенных из них биологически активных веществ». 214
Приложение 5. Акты внедрения. 215

ВВЕДЕНИЕ

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.

ГЛАВА 1. ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА В СРАВНЕНИИ С ТРАДИЦИОННЫМИ ПОДХОДАМИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА АНТИБИОТИКОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Обеспечение безопасности и эффективности лекарственных препаратов (ЛП) осуществляется за счёт соблюдения правил надлежащей производственной практики, реализуемых в РФ согласно ГОСТ Р 52249-2004 [31] на всех этапах, от сырья до готовой продукции и мониторинга [18, 24, 73]. Для контроля качества лекарственных субстанций применяются физические, физико-химические, химические и биологические подходы [147]. В данном литературном обзоре рассматриваются перспективы использования биолюминесцентного анализа как альтернативы традиционным способам оценки качества антибиотиков.

1.1 Особенности антибиотиков

По химическому строению традиционно выделяют несколько основных классов антибиотиков, каждый из которых обладает уникальными реакционными центрами, функциональными группами и физико-химическими свойствами, что, в свою очередь, определяет подходы к их аналитическому контролю [164].

Наиболее обширную и клинически значимую группу представляют β-лактамные антибиотики, к которым относятся пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы [68, 320]. Основу их структуры составляет лактамное кольцо – четырёхчленный циклический амид [29], а реакционная активность связана с атомом азота, благодаря которому обеспечивается антимикробное действие против различных бактерий [165].

β-лактамные антибиотики в смесях сложно разделить хроматографически, поскольку возникает наложение пиков и снижает точность количественного определения без оптимизации условий [238]. Кроме того, наличие β-лактамного цикла и его конденсация с другими циклами делает эти соединения склонными к гидролизу [47, 248].

Согласно данным научной литературы, большое количество антибиотиков

различных классов подвержено гидролитическим процессам [47, 88, 248], а для β-лактамных производных этот процесс особенно характерен и приводит к образованию биологически неактивных соединений [17], таких как пенициллоевая или цефалоспорановая кислоты (рисунок 1).

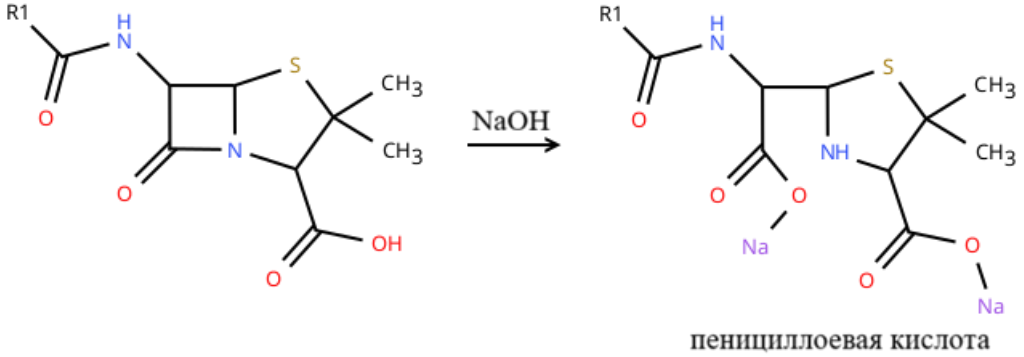


Рисунок 1 – Гидролиз β-лактамных производных пенициллинов, где R_1 = $-CH_2-C_6H_5$ (бензилпенициллин), $-CH_2-O-C_6H_5$ (феноксиметилпенициллин), $-CH(-NH_2)-C_6H_5$ (ампициллин), $-CH(-NH_2)-C_6H_4OH$ (амоксициллин) и др.

Протекание реакции существенно зависит от pH, температуры и состава растворителя [9, 17], что напрямую определяет стабильность соединений в экспериментальных условиях. В частности, данные антибиотики нестабильны в стандартных условиях фармакопейного метода диффузии в агар. Для анализа препаратов, подверженных гидролизу, следует учитывать, что культивирование при 37 ^{0}C в течение 24-х часов, могут влиять на сохранность химической структуры самих антибиотиков [88, 171]. Кроме того, продукты разложения могут обладать характеристиками, близкими к исходному веществу, что требует оптимизации условий для корректного количественного определения и оценки антимикробной активности, напрямую связанной с целостностью β-лактамного цикла [70, 248].

Аминогликозиды представляют собой класс антибиотиков, характеризующийся принципиально отличной от других групп химической структурой. Молекулы аминогликозидов представляют собой соединения, в которых аминосахара связаны гликозидной связью с агликоновым фрагментом, представленный гексозой [29]. Количество остатков аминосахаров у представителей аминогликозидов разное. Например, у неомицина их три, у

канамицина и гентамицина – две [34].

Кроме того, ключевой особенностью химической структуры аминогликозидов является наличие множества положительно заряженных функциональных групп – амино- и гуанидиновых [75], что обусловливают механизм антимикробного действия препаратов [108, 149], но при этом затрудняют применение физико-химических методов для их анализа, в том числе при контроле качества их субстанций и препартов, так как антибиотики не обладают выраженной флуоресценцией и слабо поглощают в ультрафиолетовой области спектра [132, 238].

При синтезе или хранении аминогликозидов образуются продукты деструкции, которые искажают количественное определение и влияют на биологическую активность, что важно при контроле качества [6]. Стрептомицин гидролизируются на продукты стрептобиозамин и стрептидин, а канамицин и амикацин гидролизируется с полной потерей активности [17, 77, 132]. Гидролиз антибиотика стрептомицина представлен на рисунке 2.

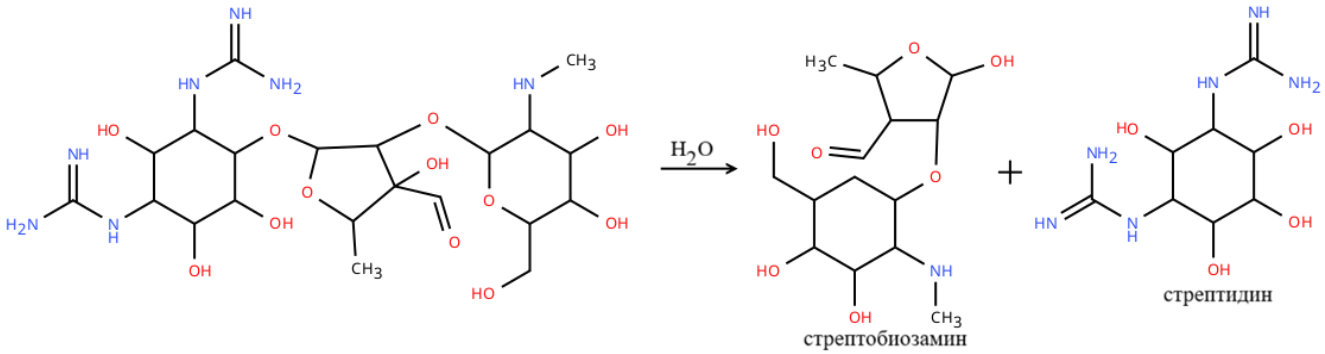


Рисунок 2 – Гидролиз стрептомицина.

В свою очередь, антибиотики группы тетрациклинов – полифункциональные соединения с четырьмя связанными бензольными кольцами, являются более «удобными» веществами для контроля их качества [238]. В их структуру входят также несколько функциональных групп: фенольный гидроксил, енольный дикетон и диметиламиногруппа [17].

Их структура делает молекулы чувствительными к внешним воздействиям: температуре, pH среды, свету и кислороду, что повышает риск образования токсичных продуктов деградации, которые необходимо выявлять и

контролировать [143].

Важнейший структурный элемент – дикетонный фрагмент, обеспечивающий способность к хелатированию ионов металлов, что лежит в основе его антимикробного действия за счёт взаимодействия тетрациклина с 30S-субъединицей рибосомы бактерий [139, 250]. Реакция хелатирования представлена на рисунке 3.

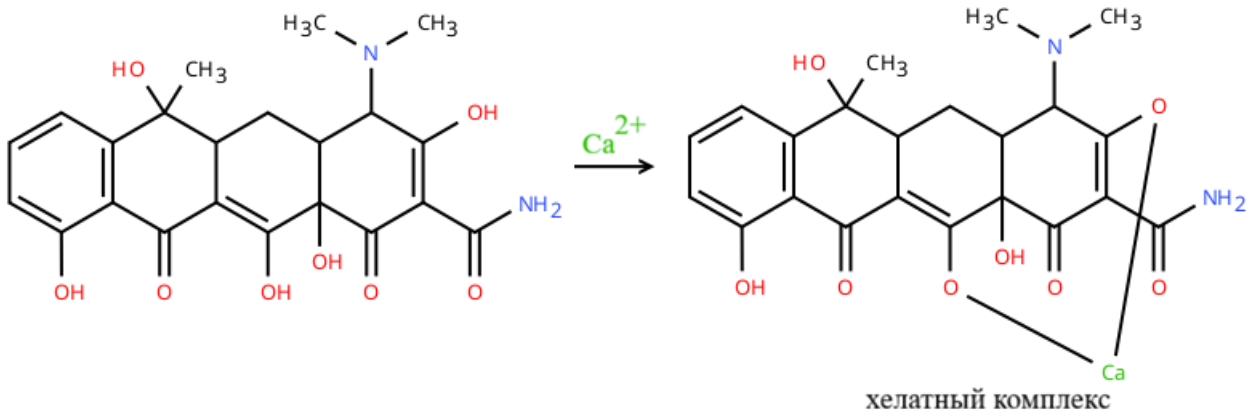


Рисунок 3 – Образование хелатного комплекса тетрациклина.

Кроме того, хелаты тетрациклинов приводят к искажению результатов количественного анализа, так как они имеют имеют другое оптическое поглощение, чем свободное основание, а также сильно флуоресцируют, что приводит к ложному завышению результата [28, 143].

Макролиды относятся к числу сложных для исследования соединений – их структура включает крупное лактонное кольцо, состоящее из 14, 15 или 16 атомов, к которому посредством гликозидных связей присоединены дезоксисахара [9, 131]. Одним из представителей класса макролидных антибиотиков является эритромицин – он представляет собой смесь антибиотиков-макролидов, продуцируемых штаммом *Streptomyces erythreus* [34]. Основными компонентами смеси выступают эритромицины A, B и C, среди которых преобладающим и наиболее фармакологически значимым является эритромицин A [146]. Структурные формулы антибиотиков представлены на рисунке 4.

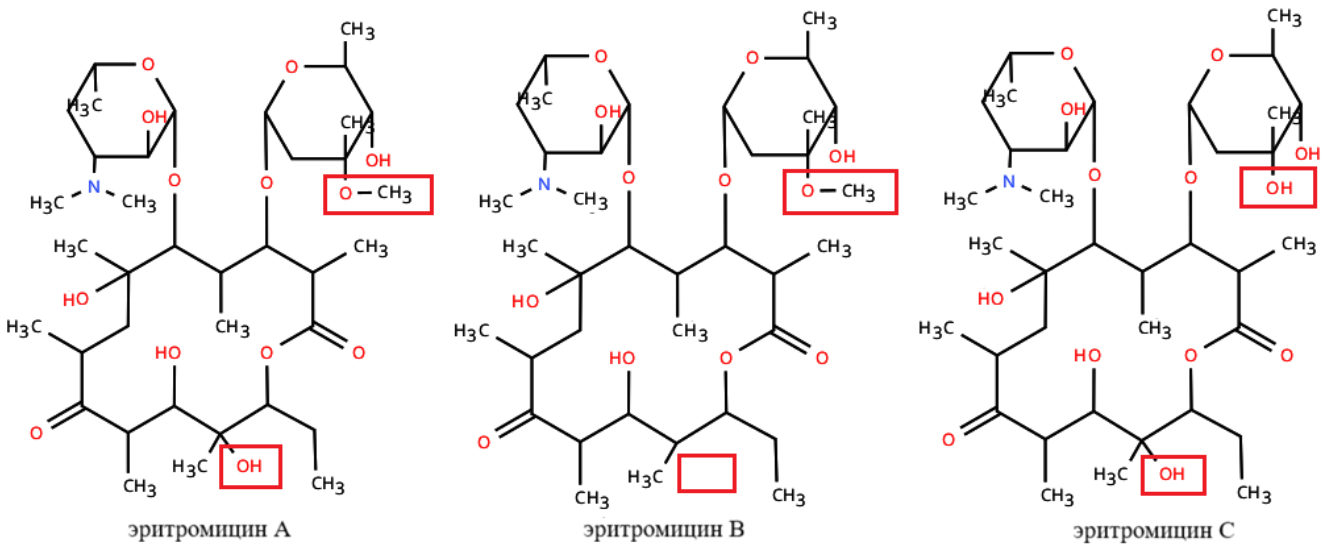


Рисунок 4 – Структурные отличия антибиотиков-макролидов, продуцируемых штаммом *Streptomyces erythreus*.

Макролиды являются сложными для анализа, что обусловлено не только многокомпонентным составом смеси, но и структурной лабильностью веществ [29]. При проведении спектрофотометрии или хроматографии они могут подвергаться химическим превращениям и даже небольшое отклонение pH от оптимального может изменить форму пика препарата [34]. Например, эритромицина А неустойчив в кислой среде (рисунок 5).

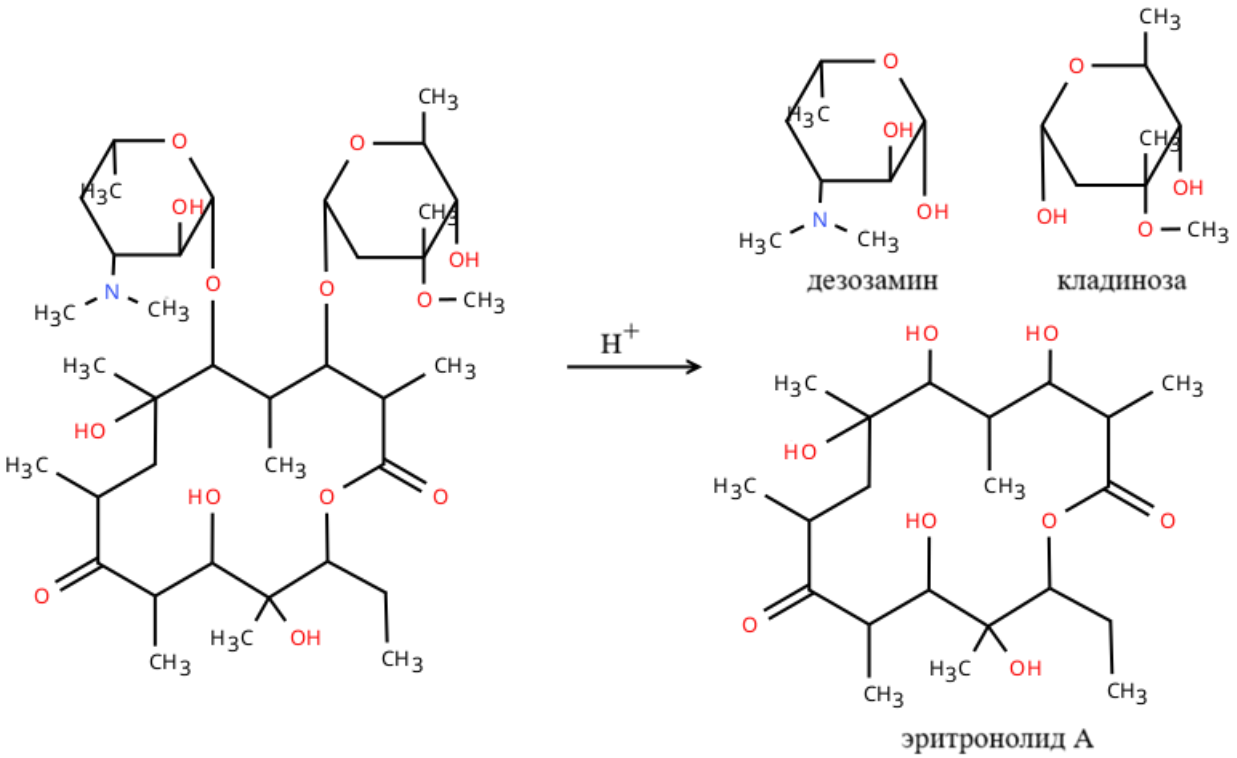


Рисунок 5 – Реакция распада эритромицина А.

Гликопептиды, к которым относятся ванкомицин, тейкопланин и др., характеризуются наличием гликозилированного циклического или полициклического пептида и ковалентно присоединёнными углеводными фрагментами [17, 41, 54]. Антибиотики отличаются высокой молекулярной массой и полярностью, что затрудняет хроматографическое разделение [6, 238]. Они подвергаются гидролизу, окислению и другим превращениям (рисунок 6).

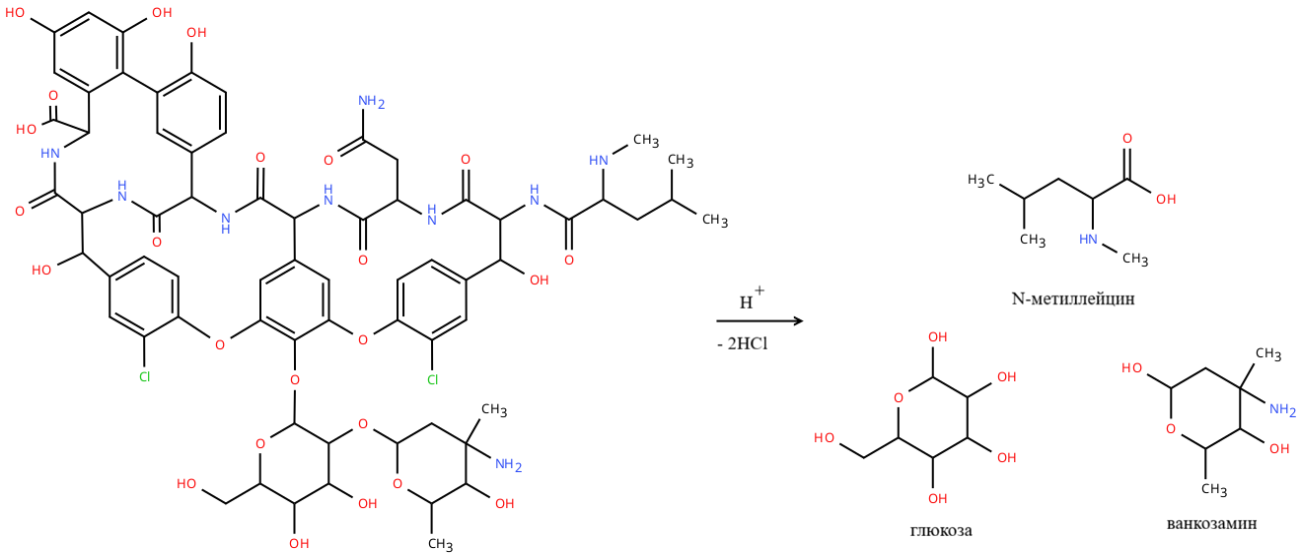


Рисунок 6 – Гидролиз ванкомицина.

В отличие от многих природных и полусинтетических антибиотиков, фторхинолоны представляют собой класс полностью синтетических антибактериальных соединений [95, 275]. Структурную основу фторхинолонов составляет хинолоновое ядро с атомом фтора, что повышает антимикробную активность и расширяет спектр действия [84, 257, 277] (рисунок 7).

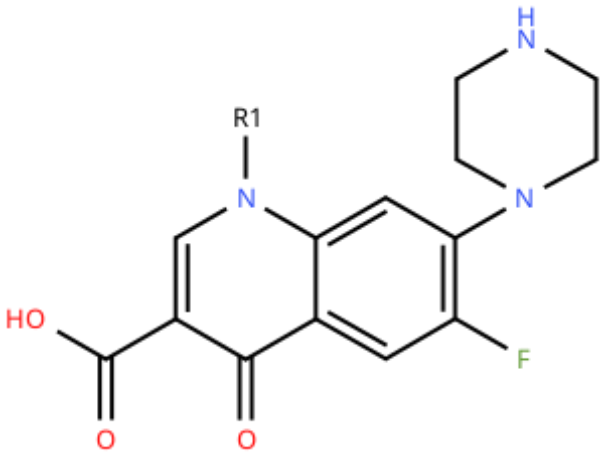


Рисунок 7 – Общая структура фторхинолонов, где R_1 = -C_3H_5 (ципрофлоксацин), -CH_2-CH_3 (норфлоксацин) и др.

Хотя некоторые фторхинолоны обладают собственной флуоресценцией, что открывает возможности для флуориметрического детектирования, не все соединения в этой группе проявляют такие свойства [133, 244]. В сложных случаях применяют более селективные и чувствительные комбинации методов анализа, например высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, что усложняет и удорожает методику, а также требует специального оборудования и навыков [112].

Таким образом, анализ структурных особенностей основных классов антибиотиков показал, что физико-химические свойства и лабильность ряда структур существенно зависят от условий аналитических испытаний. В связи с этим далее в обзоре рассматриваются современные физико-химические и микробиологические методы анализа антибиотиков, применяемые для идентификации и количественного определения данных соединений.

1.2 Микробиологические методы анализа антибиотиков

Микробиологические методы анализа – это совокупность лабораторных подходов, основанных на оценке биологического действия антибиотиков на микроорганизмы [6]. Основным свойством антибиотиков является способность угнетать рост и деление микроорганизмов (бактерий, вирусов и грибков), то есть их антимикробная активность [22, 285]. Она является одним из наиболее значимых показателей качества антибиотиков [22, 33], так как микробиологические методы позволяют не только проверить эффективность антибиотиков против конкретного микроорганизма, но также установить их количественное содержание антимикробных агентов в ЛП [6, 107].

1.1.2 Лабораторные исследования в клинической микробиологии.

Определение антимикробной активности антибиотиков, согласно Европейскому комитету по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, Швеция), рекомендациям Института клинических лабораторных стандартов

(Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, США) и ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro,* проводят с использованием методов серийных разведений и диффузионных подходов [90, 97, 224].

Сущностью методов серийных разведений является определение величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК), которая характеризует наименьшее количество антибиотика, частично или полностью подавляет рост бактерий, грибков или вирусов [97]. Важными показателями являются значения МИК-50 и МИК-90, которые обозначают минимальные концентрации содержания веществ, при которых рост микроорганизмов ингибируется на 50 % и 90 % от контрольных значений, соответственно [231, 237].

Различают два вида метода серийных разведений в бульоне: макрометод (пробирочный) и микрометод [225]. Преимуществом микрометода является возможность тестирования большого количества образцов и экономичность благодаря тестированию проб небольшого объема [297].

Простота применения, доступность и невысокие материальные затраты на проведение анализа делают данные методы наиболее популярными подходами для оценки активности антибиотиков [162]. Такие системы используют для тестирования патогенов, которые требуют быстрой и точной оценки чувствительности к антибиотикам, например *Enterobacteriaceae, Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [224, 231]. EUCAST и CLSI рекомендуют спектрофотометрические подходы для объективной регистрации роста бактерий при определении МИК [224, 253]. ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 допускает использование оптических методов для оценки замедления или полного прекращения роста микроорганизмов *in vitro* [97].

В современной фармацевтической микробиологии для автоматизации и ускорения определения МИК широко применяются инструментальные оптические методы анализа [28, 200]. К их числу относятся турбидиметрия, основанная на измерении оптической плотности культуральной среды, и нефелометрия, фиксирующая интенсивность светорассеяния [33, 132, 144].

Внедрение турбидиметрии и нефелометрии в оценку чувствительности дает возможность сократить продолжительность анализа с 24 часов до 6 – 8 часов, повысить точность определения МИК, унифицировать условия измерения (длина волны, длительность инкубации, объем образца), минимизировать влияние субъективного фактора и сформировать базы данных для различных бактериальных штаммов [85, 120]. Методы способны детектировать изменения концентрации клеток порядка $10^5 – 10^6$ КОЕ / мл [35]. Они обладают экономичностью, так как оборудование (спектрофотометры, нефелометры, микропланшетные ридеры) значительно дешевле системы высокоэффективной жидкостной хроматографии, а пробоподготовка минимальна [225]. Турбидиметрию и нефелометрию успешно сочетают с методом серийных разведений в бульоне [35, 311].

Для количественной оценки роста микроорганизмов или концентрации клеток в микробиологических исследованиях используют денситометрию, которая в отличие от методов подсчета колоний позволяет получать результат практически мгновенно по поглощению или рассеянию света, что делает её незаменимой для мониторинга кинетики роста в режиме реального времени и для автоматизации рутинных анализов [2].

Данный метод лежит в основе стандартизации инокулята, что критически важно для корректной постановки тестов на антибиотикочувствительность и для воспроизводимости экспериментов [231]. Кроме того, в фармацевтической микробиологии денситометрию используют в качестве быстрого метода для оценки эффективности антибактериальных препаратов [194].

В свою очередь диффузионные методы характеризуются проникновением антибиотика в толщу агаризированных сред из бумажных дисков, полосок или лунок [144, 225]. Они менее точны, чем методы серийных разведений, но более просты в исполнении и позволяют определять несколько ЛП одновременно [308]. Такие подходы не позволяют оценивать сложные по составу композиции и различающиеся по молекулярной массе вещества [171]. Помимо этого, для некоторых патогенов, таких как грамотрицательные бактерии, может

потребоваться проведение дополнительных тестов, поскольку на результаты исследования влияет активность ферментов, разрушающих антибиотики [66, 109].

В настоящее время используется модифицированный диффузионный метод, предложенный Альфредом У. Бауэром и Уильямом М. Кирби [183, 203]. Он отличается использованием дисков из фильтровальной бумаги, пропитанных различными антибиотиками [134]. В ходе анализа применяются стандартные коммерческие диски с фиксированными дозировками антибиотика [180, 230]. Условия их хранения должны строго соблюдаться в соответствии с инструкцией производителя, чтобы избежать погрешностей при измерении диаметров зон подавления роста, вызванных потерей активности препарата [203]. Соблюдение этих правил способствует ускорению анализа и повышению его точности [134].

Метод дисковой диффузии нашел широкое применение в микробиологии для определения чувствительности различных микроорганизмов к антибиотикам и другим химическим веществам [180]. Основным результатом является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности: мало-, умеренно-, высокочувствительные или резистентные [225, 231].

Этот метод применяется в диагностике инфекций для подбора оптимальной схемы лечения [134]. Метод используется для тестирования чувствительности пародонтальных патогенов к антимикробным препаратам, определения фенотипа металло-бета-лактамаз, изучения характеристик изолятов и в других научных исследованиях [1, 204, 264].

Определение чувствительности клинических изолятов к противомикробным средствам *in vitro* чаще всего проводят с помощью стандартизированного диско-диффузионного метода – это связано с тем, что он дает стабильные и достоверные данные [180, 214]. Этот тест используется в микробиологии и медицине для анализа эффективности антибиотиков, антисептиков и других антимикробных средств против различных патогенных микроорганизмов [86, 225, 298].

1.1.3 Микробиологический контроль качества лекарственных препаратов.

Согласно Государственной Фармакопее РФ XIV-го издания,

антимикробную активность оценивают методом диффузии в агар [33]. Данный подход основан на сравнении диаметров угнетения роста микроорганизмов, образуемых при внесении в лунки испытуемых растворов антибиотиков [33, 70]. При равных условиях тестирования размеры зон подавления роста обусловлены чувствительностью тест-штамма микроорганизма, содержанием антибиотика в лунке и его способностью к диффузии в толще агара [171].

Фармакопейная статья регламентирует условия и последовательность выполнения анализа, перечень необходимого оборудования, рабочие концентрации исследуемых веществ, а также режимы культивирования и инкубации микроорганизмов, проявляющих чувствительность к конкретному антибиотику [33, 92]. В качестве тест-микроорганизмов используют представители видов *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Bordetella bronchiseptica, Candida utilis* и *Pseudomonas aeruginosa*, для которых описаны разные условия проведения анализа. Активность тестируемых антибиотиков сопоставляется со стандартными образцами, валидированными с помощью биологических либо химических методов [33].

Благодаря таким достоинствам, как простота, доступность и возможность количественной оценки ингибирующей активности веществ, метод диффузии в агар является одним из ключевых подходов при контроле качества антибиотиков [69, 159]. Для измерения диаметра зоны используется миллиметровая линейка или специальные измерительные устройства, что позволяет легко интерпретировать полученные результаты [167].

Отличительной особенностью данного метода является его применимость для определения антимикробной активности не только действующих веществ, но и их готовых лекарственных форм [14, 183]. В первую очередь это связано с тем, что такой фактор, как посторонние примеси, содержащиеся в испытуемых образцах, в меньшей степени влияют на результат в отличие от физико-химических методов определения [171, 199].

Несмотря на ряд преимуществ, метод диффузии в агар характеризуется существенными ограничениями. Во-первых, он является трудоемким, поскольку

требует значительных временных и организационных затрат на подготовку и поддержание стабильных условий культивирования агаровых чашек и тест-микроорганизмов [42, 92, 263]. Во-вторых, результаты анализа чувствительны к изменениям состава питательной среды и pH [114, 140, 186], что требует строгого контроля этих параметров. В-третьих, данный метод имеет узкую область применения, ограничиваясь определением антимикробной активности антибиотиков, включенных в ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар Государственной Фармакопее РФ XIV-го издания [33]. Это ограничение во многом обусловлено длительной и многоэтапной процедурой включения новых методик или новых объектов анализа в фармакопейные документы [92, 94]. Наконец, метод диффузии в агар уступает по чувствительности и точности современным лабораторным методам, используемым для анализа антибиотиков [231, 263, 304].

Метод диффузии в агар рекомендован для определения количественного содержания некоторых антибиотиков в препаратах, для которых анализ с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии затруднен [144]. Отечественная фармакопея рекомендует данный подход для определения антимикробной активности 45 антимикробных веществ [33, 34]. Согласно Европейской фармакопее 10.0, методом диффузии в агар количественно оценивают гликопептиды – ванкомицин и тейкопланин, а также аминогликозиды – стрептомицин, канамицин, гентамицин [195].

Еще одним распространенным подходом является метод градиентной диффузии (эпсилометрический тест, Е-тест) [159, 184]. Он выполняется аналогично диско-диффузионному анализу, но с применением полоски, содержащей антибиотик в градиенте концентраций [180]. Значительное преимущество Е-теста заключается в возможности получения точных количественных данных, выраженных в значениях МИК [183, 184].

Метод позволяет исключить необходимость трудоемкого процесса подготовки, характерного для стандартных диффузионных подходов, однако не является приоритетным в выборе в связи с высокой стоимостью Е-тестов. Хотя в

сравнении с методом серийных разведений характеризуется меньшими затратами на анализ, включающий материалы и труд [144, 162, 307].

В связи с ограничениями микробиологических методов, такими как зависимость от роста микроорганизмов и сложность количественной оценки, актуальным является применение физико-химических методов, позволяющих проводить прямой анализ действующих веществ.

1.3 Физико-химические методы анализа антибиотиков

В отличие от микробиологических методов, сфокусированных на активности, физико-химические методы позволяют характеризовать структуру, чистоту и стабильность антибиотиков, что является критически важным для разработки новых и контроля качества уже известных лекарственных средств.

1.2.1 Хроматографические подходы

Широко используемым физико-химическими методами для оценки подлинности, чистоты и количественного анализа лекарственных средств является подходы основанные на разделении смеси веществ путем распределения их между несмешивающимися фазами [12, 93, 176]. Основными ее видами являются тонкослойная (ТСХ) и высокоэффективная жидкостная (ВЭЖХ) хроматография [16, 34].

Метод ТСХ основывается на разделении веществ в тонком слое сорбента, которое осуществляется благодаря адсорбции и различиям в сродстве к нему в ходе элюирования [93, 213]. В фармацевтическом анализе антибиотиков ТСХ позволяет оценить присутствие активных фармацевтических субстанций, а также определить чистоту и выявить примеси [16, 17, 34, 199]. Он прост в использовании, характеризуется поддержанием постоянных и оптимизированных условий и требует минимальных затрат на оборудование [21, 98], что делает его доступным для лабораторий различного уровня. ТСХ характеризуется высокой чувствительностью, обеспечивает получение достоверных данных [21, 294] и позволяет обнаруживать даже следовые количества веществ благодаря

использованию адсорбентов и реагентов высокого качества [213]. Данный метод является экономичным, так как требует небольшого количества реактивов и образцов, что снижает затраты на проведение анализа [119, 174]. Однако тонкослойная хроматография не обеспечивает достаточную селективность при разделении близких по свойствам соединений, что может привести к перекрытию аналитических зон на пластине и затруднить интерпретацию результатов [144, 288]. Еще одной серьезной проблемой является зависимость получения данных от условий проведения эксперимента, таких как тип используемой неподвижной фазы, растворитель, температура и т.д. [213, 278]. Эти факторы могут значительно варьироваться, что делает стандартизацию процесса сложной задачей. Также стоит отметить, что ТСХ требует визуализации разделенных веществ, что иногда затруднительно, особенно при наличии неокрашенных или слабо флуоресцирующих компонентов [174, 309].

Согласно ГФ РФ XV-го издания, ТСХ применяют для определения подлинности пенициллинов – ампициллина, амоксициллина и бензилпенициллина [34]. Этот метод используется для количественного определения цефалоспоринов (цефепим, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим, цефалексин, цефазолин) и карбопенемов (меропенем, имипенем) [34]. ТСХ позволяет идентифицировать тетрациклины (тетрациклин, окситетрациклин), макролиды (эритромицин) и линкозамида – клиндамицина, а также количественно определять доксициклин и кларитромицин [17, 34].

Европейская фармакопея 11.0 рекомендует ТСХ для идентификации и количественного определения бензатина бензилпенициллина, феноксиметилпенициллина, а также для подтверждения подлинности аминогликозидных антибиотиков (канамицина, стрептомицина, амикацина, гентамицина сульфатов) [195].

С помощью тонкослойной хроматографии можно быстро оценить соответствие лекарственной субстанции установленным стандартам. Методику часто используют в сочетании с другими аналитическими методами, такими как ВЭЖХ и газовой хроматографией, что позволяет повысить точность и

достоверность получаемых результатов [43, 175, 190]. ТСХ комбинируют со спектроскопией, масс-спектрометрией и другими методами [177, 216] для расширения возможностей анализа, автоматизации и повышения производительности [292]. Однако это требует специальной квалификации и увеличивает стоимость анализа [144, 177].

В ряду хроматографических методик для оценки качества антибиотиков наиболее широко применяется ВЭЖХ, которая позволяет решать такие задачи, как разделение, идентификация и количественное определение компонентов [169, 290]. С помощью ВЭЖХ можно проводить качественное и количественное определение антибиотиков в различных образцах, включая лекарственные формы, пищевые продукты и биологические жидкости [69, 155, 176, 255].

ВЭЖХ использует неподвижную фазу, подвижную фазу из смеси растворителей и детектор [191], разделяя компоненты по полярности. В зависимости от механизма разделения выделяют несколько типов ВЭЖХ: адсорбционная (разделение на поверхности сорбента), распределительная (разделение между фазами), ионообменная (ионное взаимодействие), эксклюзионная (разделение по размеру) и хиральная (разделение энантиомеров) хроматография [155, 169, 246].

Подходы к анализу с применением ВЭЖХ характеризуются высокой чувствительностью и прецизионностью, что делает данные методы идеальными для изучения различных образцов [151, 254]. Ключевыми параметрами метода являются выбор подходящей колонки, природа подвижной фазы и режимы элюирования [251]. Использование детекторов, таких как ультрафиолетовый, флуоресцентные или масс-спектрометрические, позволяет обеспечить высокую надежность результатов [155, 206].

ВЭЖХ рекомендована фармакопеями РФ, США и Европы для определения родственных примесей, идентификации и количественной оценки антибиотиков различных классов, включая производные 6-аминопенициллановой кислоты, цефалоспорины, монобактамы, аминогликозиды, макролиды, гликопептиды, нафтацены, линкозамиды и другие [34, 195, 212]. Пригодность фторхинолонов,

благодаря их свойствам, определяют анализом методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием [112, 287].

Благодаря жидкой (подвижной) фазе ВЭЖХ отличается высокой универсальностью и способностью адаптироваться к разнообразным типам проб и задачам разделения [155, 232]. Вместе с тем, несмотря на перечисленные достоинства подходы с применением ВЭЖХ для скрининга, идентификации и установления фармакологической активности лекарственных средств отличаются высокой трудоемкостью, низкой эффективностью, значительной стоимостью и требуют существенных временных затрат на такие этапы, как пробоподготовка, проверка, разделение и очищение [151, 191, 232, 242]. Указанные стадии являются обязательными для последующего количественного определения и выявления фармакологической активности соединений [169]. В свою очередь, основные этапы, в особенности подготовка проб, являются той частью аналитического процесса, которая имеет наибольшее влияние на точность и воспроизводимость результатов анализа [216].

Кроме того, особую сложность при анализе представляет склонность бета-лактамных антибиотиков к гидролизу, приводящему к образованию неактивных продуктов, что описано ранее в разделе 1.1. В этой связи метод ВЭЖХ является незаменимым инструментом: он обеспечивает высокую селективность и чувствительность, а его условия могут быть адаптированы для надежного разделения антибиотика и продуктов его распада [119, 151].

1.2.2 Спектрофотометрические методы

Спектрофотометрические методы представляют собой подходы, основанные на поглощении веществ монохроматического электромагнитного излучения в ультрафиолетовом (УФ), видимом и инфракрасном (ИК) диапазонах спектра [12, 93, 300]. Спектрофотометрия обеспечивает высокую точность и чувствительность при определении различных веществ [63, 182]. Основные преимущества спектрофотометрических методов – их простота в использовании, отсутствие необходимости в сложной подготовке образцов и возможность

одновременного анализа нескольких компонентов [182, 228]. Это делает спектрофотометрию инструментом для быстрого и эффективного анализа.

Методы, такие как УФ- и видимо-световая спектрофотометрия, позволяют эффективно определять концентрации активных веществ в различных матрицах, например, биологических жидкостях или экстрактах [4, 179, 228], применимы для исследования различных лекарственных форм, включая таблетки, растворы и мази [45, 63, 80]. Благодаря этому спектрофотометрические подходы активно используются для контроля качества в производственных процессах, обеспечивая соответствие лекарственных препаратов установленным стандартам [4, 121, 230].

Также спектрофотометрия применяется и для контроля качесва антибиотиков за счет наличием хромофорных групп в их молекулах [6]. Так, у β-лактамных антибиотиков основной вклад в спектр даёт амидная группа кольца, которая формирует слабую полосу поглощения при 210 – 220 нм [34]. У цефалоспоринов хромофорный вклад вносит как ацетильная группа, так и сопряженные системы двойных связей в дигидротиазиновом кольце [34, 156]. Тетрациклины, как и фторхинолоны, благодаря своей структуре, характеризуются интенсивной собственной флуоресценцией и характерным УФ-спектром [112]. В частности, доксициклин содержит протяженную систему сопряженных еноновых и фенольных групп, которая отвечает за их характерные полосы поглощения и позволяет легко идентифицировать его даже в сложных смесях [34, 145]. Помимо этого, хелатообразование тетрациклинов с ионами металлов и чувствительность к pH среды обусловливают возможность применения прямых спектрофотометрических методов [8, 319].

УФ-спектроскопию испольузуют для идентификации и количественного определения антибактериальных соединений. Например, для офлоксацина определят максимумы поглощения в УФ-диаппазоне в растворе метилового спирта [34]. Амоксициллин и цефазолин натрия идентифицируют после осаждения кристаллов из водного раствора уксусной кислоты и последующей промывки ацетоном [196, 198]. Количественное определение хлорамфеникола проводят методом УФ-спектрофотометрии [34].

Государственная фармакопея РФ XV-го издания предлагает использовать метод инфракрасной спектроскопии для идентификации ряда антибиотиков, включая азитромицин дигидрат, натриевую и трегидратную формы амоксициллина, натриевую и калиевую формы бензилпенициллина, кларитромицин, левофлоксацин, офлоксацин, хлорамфеникол, натриевую соль цефотаксима, натриевую соль цефтриаксона и ципрофлоксацин [34, 197].

Однако у спектрофотометрических методов есть и недостатки. Например, они требуют высокой однородности образца, так как наличие примесей или неоднородностей может искажать результаты [144, 182]. Важно учитывать, что чувствительность метода зависит от длины волны, а для некоторых соединений анализ может быть недоступен из-за перекрытия поглощательных спектров [268].

В спектрофотометрии также часто применяются вспомогательные устройства, такие как термостатические камеры для поддержания стабильной температуры образцов и автоматические дозаторы для точного добавления реагентов [3, 313]. Эти устройства помогают увеличить точность и воспроизводимость измерений, что критически важно в количественном анализе веществ [3, 13, 182]. Однако оборудование может быть дорогостоящим и требует регулярного обслуживания и калибровки, а также является менее чувствительным и специфичным в отличие ВЭЖХ [144, 151, 268].

Спектрофотометрия представляет собой не просто процесс измерения поглощения света, а комплексную процедуру, которая требует детальной подготовки и соблюдения ряда технологических этапов [63, 182]. Выбор конкретных стадий зависит от природы анализируемого вещества, целей анализа и требуемой точности [182]. Все эти стадии требуют времени и внимания, что может увеличивать общую продолжительность исследования. Однако правильная подготовка образца и калибровка прибора необходимы для получения точных и надежных результатов спектрофотометрического анализа [300].

Несмотря на свои недостатки, спектрофотометрические методы продолжают быть важным инструментом в фармацевтическом анализе. Совершенствование спектрофотометрических методов, включая использование

многомерного анализа и автоматизацию процессов, способствует увеличению эффективности и надежности получаемых данных.

1.3 Биолюминесцентный анализ

В то время как хроматографические и спектроскопические методы предоставляют ценную информацию о чистоте, концентрации и других физико-химических характеристиках антибиотиков, они не позволяют оценивать их антимикробное действие, что является ключевым показателем качества [33].

Для получения целостной картины характеристик антимикробных веществ – их антибиотической активности и количественного содержания, перспективным направлением могут стать методы, основанные на бактериальной люминесценции [39, 150, 249, 296]. Биолюминесценция – свечение, возникающее в результате биохимических реакций у различных живых организмов, таких как морские и наземные бактерии, грибы, насекомые и морские животные [208, 273].

Методы с использованием люминесценции бактерий основаны на регистрации изменения интенсивности свечения в результате влияния анализируемого вещества [170, 173, 220]. В основе светоизлучения бактерий лежат ферментативные реакции, представленные на рисунке 8.

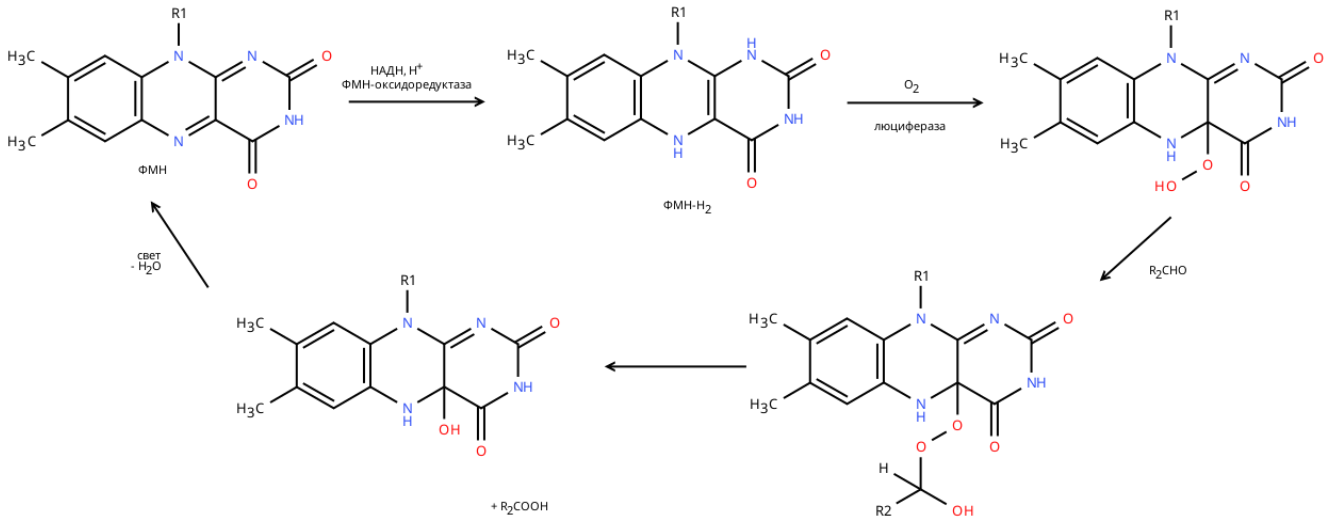


Рисунок 8 – Схема люциферин-люциферазной реакции, где R_1 = $-CH_2-(CH-(OH))_3-CH_2-O-PO(OH)_2$, $R_2 = C_nH_{2n}$, где $n \geq 8$.

Для протекания реакции необходимы восстановленный флавин-мононуклеотид, кислород, длинноцепочечный альдегид и фермент люцифераза, а конечными продуктами являются жирная кислота, вода и видимый свет [118, 209, 314].

Для измерения биолюминесценции используются люминометры, разрабатываемые с 1970-х годов [220], которые позволяют регистрировать интенсивность света, испускаемого источниками, в том числе бактериями, и изучать факторы, влияющие на свечение [226, 252, 315]. Современные люминометры характеризуются высокой точностью и широким функционалом, что делает их важным инструментом в исследованиях с люминесцентными тест-системами [220, 226]. Использование люминометров обеспечивает быстрое и точное измерение люминесценции, существенно повышая эффективность исследований за счет экономии времени и трудозатрат [209, 312, 316], что делает методы биолюминесцентного анализа особенно привлекательным для широкого спектра задач.

За последние 20 лет биолюминесцентный анализ нашел применение в исследованиях загрязнений окружающей среды, оценки качества воды и других научных областях, включая исследования *in vivo* [39, 118, 209, 219, 239]. Одним из направлений является разработка альтернативных, более быстрых и эффективных методов, заменяющих традиционные подходы [60, 323]. В 2013 году разработана автоматизированная система тестирования токсичности на основе люминесцентных бактерий *Aliivibrio fischeri* с использованием микротитрования [252].

На основе биолюминесцентных бактерий производят биотесты, которые позволяют определять наличие токсичных веществ в окружающей среде [153, 218, 286, 293, 305]. Благодаря автоматизированным системам и современным приборам биотесты на основе биолюминесцентных бактерий обеспечивают быструю и точную оценку экологической обстановки в различных сферах деятельности человека [272, 282, 317], например, при контроле за качеством воды, почвы и продуктов питания [185, 239, 241].

Биотесты на светящихся бактериях в сравнении с известными тестами на основе инфузорий, дафний, водорослей, рыб являются более чувствительными и простыми в использовании [178, 227]. Они позволяют тестировать одновременно большое количество проб и с большой точностью определять количественное содержание токсикантов [249, 283, 310].

На сегодняшний день наиболее распространенными в научных исследованиях, экологическом мониторинге, а также при проведении экспертизы продукции являются биотесты на основе родов *Photobacterium* и *Aliivibrio* [118].

С помощью таких тестов можно выявить наличие токсичных веществ, таких как тяжелые металлы, пестициды или нефтепродукты, а также оценить их концентрацию [152, 178, 188].

Наиболее известным биотестом является Microtox, созданный на основе живых лиофилизированных клеток *Aliivibrio fischeri* [192, 260], который можно применять к различным средам, включая питьевую воду, ливневые стоки, сточные воды, промышленные сбросы, почвы и отложения [198, 222, 223]. Большинство образцов не требует специальной подготовки перед тестированием, за исключением доведения солености до 2 % пробы и осаждения твердых частиц для мутных растворов [192, 270].

Биотесты на основе светящихся бактерий являются инновационным и перспективным инструментом в современных исследованиях [192, 198]. В медицине и фармакологии биотесты на основе светящихся бактерий используются для скрининга новых препаратов, оценки их токсичности или эффективности, а также для исследования действия определенных веществ на живые организмы [123, 152, 223].

Результаты интерпретируются по снижению интенсивности светоизлучения у штаммов под воздействием токсичного вещества. Одними из самых распространенных ингибиторов свечения биолюминесцентных бактерий являются промышленные яды, инсектициды, пестициды, отравляющие и лекарственные вещества, такие как анестетики, наркотические вещества и др. [82, 265, 269]. Известны исследования, где биолюминесцентные бактерии используют для

оценки токсичности лекарственных препаратов и лекарственного растительного сырья [26, 58, 59, 258]. К наиболее значимым параметрам, позволяющим оценивать токсичность, относят среднюю смертельную концентрацию и среднюю смертельную дозу [233, 244, 277].

В современной фармацевтической науке активно развиваются исследования, направленные на оценку неспецифической биологической активности лекарственных препаратов [245, 262, 299]. Они позволяют не только быстро оценивать общее токсическое или стимулирующее действие, но и изучать механизмы взаимодействия фармакологических агентов с клетками [289, 303].

В ряду светящихся бактерий особый интерес представляют штаммы вида *Photobacterium leiognathi*. Их автономная и интенсивная биолюминесценция делает их ценными объектами для создания стандартизированных биотестов [99, 256]. В работах Кацева А.М. и Сафронюка С.Л. подробно описан люминесцентный штамм *P. leiognathi* Sh1, выделенный из образцов мелких морских планктонных ракообразных Азовского моря методом фильтрации через мембранные бактериологические фильтры и посева на плотные питательные среды [124, 125].

Особую ценность для фармацевтических исследований представляет высокая чувствительность штамма *P. leiognathi* Sh1 к антибиотикам, что выделяет его среди прочих изолятов, полученных из Черного и Азовского морей [57, 126]. Эта чувствительность позволяет использовать его как эффективный инструмент для скрининга и оценки активности антимикробных агентов. Кроме того, штамм демонстрирует значительную устойчивость к колебаниям температурного режима, pH и другим экологическим параметрам [60, 318], что обеспечивает надежность и воспроизводимость получаемых экспериментальных данных. Эта устойчивость создает прочную основу для его использования в долгосрочных и сложных экспериментах, направленных на изучение лекарственных веществ.

Благодаря высокой чувствительности светящихся бактерий к различным видам токсикантов такие тесты позволяют сократить время и затраты на исследования, ускоряя процесс разработки новых лекарственных препаратов [188,

221]. Кроме того, использование биотестов на светящихся бактериях в исследованиях позволяет получать результаты в режиме реального времени. Обнаружение и изменение свечения бактерий происходит практически мгновенно, что значительно сокращает время для анализа и интерпретации результатов [252, 262].

В последнее время в подходах биолюминесцентного анализа развиваются методы на основе генно-инженерных бактерий, содержащих lux-оперон. Данные штаммы эффективно используются для оценки токсичности веществ [65, 127, 163]. Биотесты с lux-генами применяются для изучения различных аспектов бактерий, включая патогенность и метаболизм [38, 247]. Использование рекомбинантных штаммов повышает чувствительность и расширяет возможности биотестов, позволяя выявлять определенные вещества или токсины [48, 64, 236].

Разнообразие биолюминесцентных биотестов на основе природных и рекомбинантных штаммов открывает широкие возможности для исследований в области экологии, фармации и других отраслей [127-129, 293]. Измеряя реакции биолюминесценции на различные вещества, биолюминесцентный анализ позволяет оценить степень уменьшения количества микроорганизмов и точно определить содержание исследуемых соединений в пробе [130, 236]. С использованием данных подходов возможно обнаруживать даже минимальные количества антибиотиков в образцах благодаря высокой чувствительности бактерий к веществам различной природы [118, 317]. Еще одним преимуществом является экономическая эффективность: для проведения анализа требуется минимальное оборудование и закупка небольшого количества расходного материала, что делает его доступным для многих лабораторий и исследовательских центров [283, 296].

Таким образом, биолюминесцентный анализ представляет собой многообещающую альтернативу традиционным методам оценки антимикробной активности. Его ключевые достоинства позволяют преодолеть основные ограничения, присущие хроматографическим, спектроскопическим и микробиологическим подходам.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Проведенный анализ отечественной и зарубежной научной литературы, а также нормативной документации (Государственная фармакопея Российской Федерации, Фармакопеи США и Европейского Союза) показал, что современные методы контроля качества антибиотиков охватывают физико-химические (ВЭЖХ, спектроскопия), химические и микробиологические подходы. Каждый из этих методов имеет четко определенную область применения и сопровождается определенными ограничениями.

2. Установлено, что хроматографические (ВЭЖХ) и спектроскопические методы являются наиболее надёжными и широко применяемыми для идентификации и количественного определения антибиотиков различных химических групп (амоксициллин, цефалоспорины, аминогликозиды и др.). Вместе с тем высокая стоимость оборудования, сложность пробоподготовки, необходимость привлечения высококвалифицированного персонала, а также невозможность прямой оценки антимикробной активности, обусловленная регистрацией исключительно химической структуры вещества, ограничивают их применение в качестве единственного инструмента контроля.

3. Выявлено, что стандартные микробиологические методы остаются единственными способами оценки антимикробной активности антибиотиков. Несмотря на высокую значимость методов диффузии в агар и серийных разведений, им присущи существенные недостатки: значительная продолжительность анализа (получение результата через 18 - 48 часов), высокая трудоемкость, вариабельность результатов и сложность автоматизации, что не в полной мере соответствует современным требованиям фармацевтического экспресс-анализа.

4. Для ускорения, повышения точности и минимизации человеческого фактора классических микробиологических методов используют турбидиметрию и нефелометрию, основанные на измерении интенсивности света, рассеянного или поглощённого микробной суспензией, что напрямую коррелирует с концентрацией клеток в среде.

5. Выявлены перспективы использования биолюминесцентных бактерий (родов *Photobacterium* и *Aliivibrio*) для оценки антимикробной активности, поскольку данный подход позволяет в режиме реального времени регистрировать изменение метаболической активности микробных клеток под действием антибиотика. Однако критическим препятствием для внедрения биолюминесцентного метода в практику фармацевтического анализа является отсутствие унифицированных и валидированных методик, интегрирующих данный подход в фармакопейный анализ для целей качественного и количественного определения антибиотиков. Имеющиеся в литературе сведения носят фрагментарный характер и, как правило, касаются биотестирования общей токсичности различных веществ и оценки качества окружающей среды.

Таким образом, выявлена потребность в экспрессных и чувствительных методах оценки антимикробной активности антибиотиков, с одной стороны, и отсутствием стандартизированных, валидированных методик на основе бактериальной биолюминесценции, пригодных для включения в фармакопейный анализ, с другой стороны. Данное обстоятельство обосновывает актуальность и определяет направление настоящего диссертационного исследования.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Предмет и объект исследования

Предметом исследования являлось изучение антимикробной активности антибиотиков, которая, согласно Государственной Фармакопее РФ XIV-го издания, количественно выражается в единицах действия (ЕД) или микрограммах (мкг) [33].

Объектами исследования выступали фармацевтические субстанции антибиотиков (Sigma-Aldrich, USA):

- производные 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) – ампициллина натриевая соль (серия LC-10450.1);
- нафтацена – доксициклина (серия 03211) и тетрациклина (серия 180403-61) гидрохлориды;
- аминогликозидов – 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 моногидрат (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 рекомендованные Государственной Фармакопеей тест-микроорганизмы *Staphylococcus aureus* 209 Р и *Bacillus subtilis* АТСС 6633, грамотрицательный штамм – модельные бактерии *Escherichia coli* АТСС 25922. Музейные штаммы патогенов входят в коллекцию кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского».

В качестве люминесцентных тест-микроорганизмов использовали рекомбинантный штамм *Escherichia coli* MG1655 (pXen7), который синтезирован и любезно предоставленные доктором биологических наук, заведующим лабораторией молекулярной генетики ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт» И.В. Мануховым. Структурно данный штамм сохраняет многие ключевые элементы, присущие патогенным видам *E. coli*, а благодаря плазмиде pXen7-lux обеспечивает высокочувствительное и специфическое обнаружение различных веществ за счет экспрессии генов, ответственных за синтез люциферина и люциферазы [48, 64, 65, 82].

Для разработки методики определения антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции использованы природные светящиеся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенные из Азовского моря д.б.н., профессором А.М. Кацевым [56]. Коллекция люминесцентного штамма принадлежит кафедре медицинской и фармацевтической химии Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар

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 [33].

Для культивирования фармакопейных тест-микроорганизмов, *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633, применяли соответствующие АПИные среды, состав которых описан в ГФ РФ XIV-го издания [33]. Для культивирования альтернативных штаммов использовали питательные среды Nutrient agar M001-500G (Himedia, Индия; серия 0000387742), при необходимости включали дополнительные компоненты для поддержания жизнеспособности и специфических свойств культур [11, 46, 62]. Для стабильного функционирования плазмиды, в питательные среды с рекомбинантным тест-штаммом *E. coli* MG1655 (xen`::lux) дополнительно вводили 100 мкг / мл антибиотика ампициллина натрия (NeoFroxx GmbH, Германия) [64, 65]. Культивировали бактерии в термостатах ТСО-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия), в подходящих для микроорганизмов условиях среды, при температуре 37 ^{0}C для *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* MG1655 (xen`::lux) до 24 часов [33, 71, 90]. Для *P. leiognathi* Sh1 ввиду специфики данного штамма, перед непосредственным выполнением испытаний, потребовался предварительный подбор оптимальных условий культивирования и постановки теста методом диффузии в агар.

Количество посевной дозы *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633 в питательную среду для анализа антибиотиков, не входящих в состав ГФ РФ XIV-го издания, составило 20 млн микробных клеток на 1 мл среды [33], а для производных 7-АЦК – 100 млн спор на 1 мл среды, что соответствует определению антимикробной активности цефалексина, представителя группы, указанного в Фармакопее [33]. Количество посевной дозы *E. coli* ATCC 25922 составило 0,7 мл бульонной культуры на 100 мл среды [141].

Испытуемые растворы антимикробных субстанций готовили, вносили в

питательную среду и инкубировали в соответствии с регламентированной методикой, при этом диапазон концентраций субстанций, включая контрольные значения, соответствовал требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIV-го издания [33]. Антимикробную активность оценивали по диаметрам зон подавления роста тест-штаммов, а результаты представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($x \pm S$). Для обеспечения достоверности данных исследования выполняли в нескольких повторах в разные дни.

Оценку стабильности антибиотиков в условиях проводили путем инкубации их растворов при 37 ^{0}C (24 часа) и 25 ^{0}C (18 часов), что соответствует условиям тестирования методом диффузии в агар и биолюминесцентного анализа соответственно [33]. Проводили хроматографический анализ на высокоэффективном жидкостном хроматографе ProStar (Varian, Inc., США) с УФ-детектированием. Условия хроматографирования соответствовали требованиям ГФ РФ XV-го издания на фармакопейные статьи ФС.2.1.0056 Ампициллин натрия и ФС.2.1.0212 Цефотаксим натрия [34]. Результаты сравнивали со свежеприготовленными растворами антибиотиков.

2.2.2 Измерение интенсивности бактериальной биолюминесценции под действием антибиотиков

В основу разработки новой методики определения антимикробной активности антибиотиков по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции положены результаты диссертационного исследования Сафронюка С.Л. «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов» [124]. В частности, методика опирается на опыт использования генно-инженерных люминесцентных тест-объектов на основе *E. coli* и установленную перспективность использования *P. leiognathi* Sh1 для изучения антимикробной активности фармацевтических субстанций [57, 127].

Регистрацию светового сигнала, его изменение и анализ проводили согласно ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 Методике определения интегральной

токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» [111].

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. Поддержание и подготовка культуры *P. leiognathi* Sh1 осуществлялись в соответствии с подобранными условиями культивирования тест-штамма. 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 [124].

2.3 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили методами вариационной статистики, корреляционным и регрессионным анализом согласно ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар [33], 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 [34].

Для статистической обработки результатов рассчитывали среднее значение (x), стандартное отклонение (S), дисперсию (S^2), полуширину доверительного интервала (Δx), относительную ошибку результата среднего определения (ε), относительное стандартное отклонение среднего результата – коэффициент вариации ($S_{\delta,\%}$) и величину систематической ошибки (δ). Корреляционный и регрессионный анализы применяли для оценки меры взаимосвязи между сравниваемыми методиками. Для оценки эквивалентности штаммов проводили тест по методу TOST для фиксированного эффекта [187].

Оценку валидационных параметров, таких как чувствительность, ПО (предел обнаружения), ПКО (предел количественного определения), аналитическая область, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность и устойчивость для разрабатываемой аналитической методики, проводили согласно Государственной фармакопее РФ XV-го издания ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик [34] и с применением статистических методов.

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР

Как показано в Главе 1, существующие методы контроля качества антибиотиков обладают существенными ограничениями, такими как сложность пробоподготовки, субъективность интерпретации результатов, длительность анализов, а результаты, получаемые методом диффузии в агар, сильно зависят от условий культивирования микроорганизмов, их количества и видовой принадлежности.

В связи с чем разработка методик оценки антимикробной активности антибиотиков как показателя количественного содержания антимикробного агента в образце путем регистрации изменения интенсивности люминесценции бактериальных тест-объектов представляет собой особый интерес.

3.1 Определение активности антибиотиков с использованием в качестве тест-объектов *Staphylococcus aureus* 209 P и *Bacillus subtilis* ATCC 6633 методом диффузии в агар

В соответствии с требованиями ГФ РФ XIV-го издания для определения антимикробной активности антибиотиков в качестве тест-микроорганизмов используют 9 штаммов, в частности, *Staphylococcus aureus* 209 P и *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [33].

Штаммы *S. aureus*, как тест-объект, обладают рядом ключевых преимуществ: они просты в культивировании и демонстрируют высокую скорость репродукции, что существенно упрощает и ускоряет процесс экспериментальных исследований, широко используются в исследованиях антимикробной активности, что позволяет проводить сопоставительный анализ полученных результатов с существующими данными [30, 306]. Однако бактерии являются клинически значимыми патогенами с растущей антибиотикорезистентностью [142, 210, 267, 291], кроме того, использование *S. aureus* 209 P требует соблюдения строгих мер биобезопасности, учитывая его патогенность [44, 70]. Необходимо учитывать, что результаты, полученные в отношении *S. aureus* 209 P,

имеют ограниченную применимость, так как не могут оценивать весь спектр антибиотиков [157, 189, 201], а также не учитывают специфику грамотрицательных бактерий, обладающих принципиально иными механизмами резистентности и строением клеточной стенки [20, 36].

Государственная фармакопея РФ XIV-го издания рекомендует *S. aureus* 209 P для изучения антимикробной активности ампициллина, бензилпенициллина, диклоксациллина, метициллина, нетилмицина, оксациллина и феноксиметилпенициллина при контрольных концентрациях в диапазоне от 1 до 20 мкг / мл [33]. На сегодняшний день применение большинства перечисленных антибиотиков может быть ограничено из-за распространения устойчивых штаммов [37, 87, 235, 321], а также частоты побочных эффектов, особенно метициллина и нетилмицина, которые практически не используется в клинической практике из-за высокой нефротоксичности [79, 116, 280].

В результате исследования ингибирования роста *S. aureus* 209 P от концентраций ампициллина натрия выявлено, что минимальная подавляющая концентрация антибиотика составляет 4 мкг / мл, при этом наблюдается незначительное воздействие на рост штамма с диаметром 2,8 ± 0,23 мм [99]. Увеличение концентрации ампициллина с 5 до 10 мкг / мл сопровождалось умеренным ростом диаметра зоны задержки с 4,6 ± 0,13 до 7,4 ± 0,22 мм. Более выраженное увеличение диаметра зоны ингибирования роста наблюдалось в диапазоне концентраций от 50 до 200 мкг / мл с диаметрами с 10,8 ± 0,36 до 16,8 ± 0,22 мм, что свидетельствует о выраженной антимикробной активности ампициллина натрия в данном диапазоне. Согласно ГФ РФ XIV-го издания, результаты оценивали с использованием стандартной кривой логарифмируя концентрации антибиотиков. Полулогарифмическая зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 9.

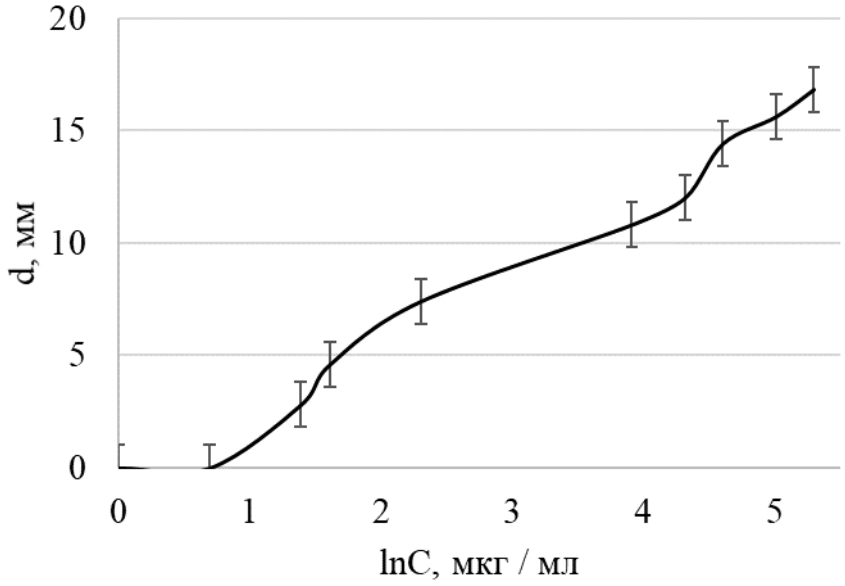


Рисунок 9 – Зависимость диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *S. aureus* 209 Р от концентраций ампициллина натрия.

Полученные данные свидетельствуют о нелинейном, экспоненциальном характере зависимости, что согласуется с закономерностями, описанными в научной литературе [261, 319] и отражает эффект «насыщения», когда дальнейшее увеличение концентрации препарата не приводит к пропорциональному увеличению антибактериального эффекта, измеряемого в данном случае диаметром зоны ингибирования роста.

Несмотря на относительно умеренную активность ампициллина в отношении *S. aureus* 209 Р, проявляющуюся в формировании зон ингибирования роста небольшого диаметра, результаты статистической обработки полученных данных свидетельствуют о высокой точности и воспроизводимости полученных экспериментальных результатов. Значения ε, находящиеся в диапазоне 0,297 – 0,8 %, указывают на стабильность получаемых значений. Показатели S^2, равные 0,015 – 0,107 и S – 0,121 – 0,327, подтверждают низкую степень вариабельности результатов и, следовательно, их высокую достоверность. Коэффициент $S_{\delta,\%}$, составивший 2,8 %, демонстрирует однородность выборки и свидетельствует о незначительном разбросе данных относительно среднего значения, что дополнительно подтверждает надежность полученных результатов.

В фармакопейной статье [33], наряду с *S. aureus* 209 Р, в качестве тест-

культуры для определения антимикробной активности антибиотиков используется бактерия *B. subtilis* АТСС 6633. Палочки рода *Bacillus*, а именно *B. cereus*, *B. pumilus* и *B. subtilis*, представляют собой грамположительные, подвижные, спорообразующие микроорганизмы, способные к факультативному анаэробиозу [25, 51, 158], характеризующиеся высокой степенью фенотипического и генетического сходства [51]. Штамм *B. subtilis* АТСС 6633 широко применяется в научных исследованиях благодаря способности продуцировать широкий спектр ферментов, антибиотиков и других биологически активных веществ, а также находит применение в биотехнологии и пищевой промышленности [207]. Несмотря на эти преимущества, следует учитывать, что *B. subtilis* АТСС 6633, будучи грамположительной бактерией, наряду с *S. aureus* 209 Р не позволяет адекватно оценить антимикробную активность антибиотиков в отношении грамотрицательных патогенов, нацеленных на специфические мишени, отсутствующие в данном микроорганизме [172]. Кроме того, спорообразование *B. subtilis* АТСС 6633 может создавать трудности при стандартизации и интерпретации результатов антимикробной активности, требуя учета влияния спор на общую жизнеспособность культуры [172, 302].

Государственная фармакопея РФ XIV-го издания регламентирует использование *B. subtilis* АТСС 6633 для оценки активности ряда антибиотиков, включая амикацин, блеомицетин, ванкомицин, гелиомицин, канамицин В, капреомицин, линкомицин, оливомицин, рифампицин, флоримицин, цефалексин и цефалотин [33]. При этом для большинства антибиотиков стандартные концентрации растворов сравнения варьируют в диапазоне от 1 до 10 мкг / мл, за исключением ванкомицина, капреомицина и линкомицина, для которых контрольная концентрация составляет 100 мкг / мл.

В рамках исследования антимикробной активности производных аминогликозидов установили зависимости между концентрациями антибиотиков амикацина и канамицина сульфатов и диаметрами зон ингибирования роста бактерий *B. subtilis* АТСС 6633. Амикацин оказывал влияние на рост *B. subtilis* АТСС 6633, начиная с концентрации 2 мкг / мл с диаметром равным

2,6 ± 0,23 мм. Зависимость между концентрацией и диаметром зоны ингибирования не являлась строго линейной; увеличение эффекта более выражено при высоких концентрациях. При минимальных концентрациях до 10 мкг / мл наблюдалось постепенное увеличение диаметра зон ингибирования до 8,6 ± 0,24 мм. В диапазоне высоких концентраций отмечался более выраженный рост активности препарата: зона подавления увеличивалась с 12 ± 0,23 до 18 ± 0,32 мм. Канамицин проявлял антимикробную активность уже при концентрации 1 мкг / мл, формируя зону ингибирования с диаметром 2,3 ± 0,20 мм. В диаметре концентраций канамицина от 50 до 200 мкг / мл рост диаметров имел линейный характер. Зависимости диаметров зон от концентраций антибиотиков представлены на рисунке 10.

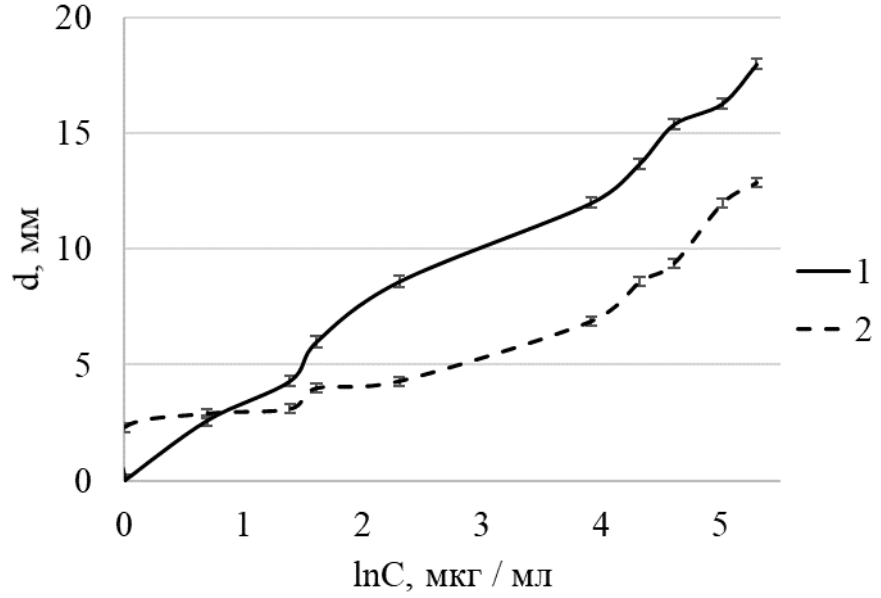


Рисунок 10 – Зависимости диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *B. subtilis* АТСС 6633 от концентраций аминогликозидов, где 1 – амикацина сульфат, 2 – канамицина сульфат.

Результаты статистической обработки демонстрируют однородность, воспроизводимость и высокую точность данных. Об этом свидетельствуют низкие значения S^2, которые не превышали 0,119 и 0,061, S – 0,345 и 0,248, а также δ – 0,713 и 0,368 соответственно для амикацина и канамицина. Стабильность изучаемых концентраций антибиотиков подтверждается показателем ε, составившей не более 0,845 и 0,607 %. Коэффициенты $S_{\delta,\%}$, равные 3,4 и 3,9 %,

указывают на высокую степень надежности полученных результатов.

При исследовании линкомицина гидрохлорида моногидрата установлено, что субстанция проявляла свою активность против тест-культуры *B. subtilis* АТСС 6633 уже при концентрации 1 мкг / мл с диаметром равным 2,9 ± 0,21 мм. Дальнейшее увеличение концентраций приводило к линейному росту диаметров зон ингибирования роста тест-микроорганизма (рисунок 11).

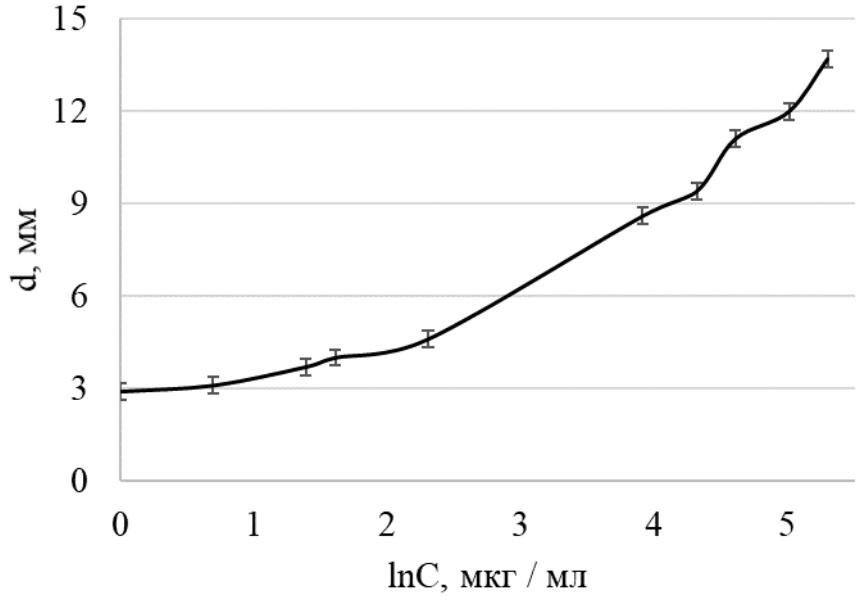


Рисунок 11 – Зависимость диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *B. subtilis* АТСС 6633 от концентраций линкомицина гидрохлорида моногидрата.

S^2 варьируется от 0,036 до 0,101, S находится в диапазоне от 0,189 до 0,318, а показатель δ изменяется от 0,213 до 0,608. Во всем диапазоне концентраций наблюдается низкая вариабельность результатов, о чем свидетельствуют основные статистические показатели. ε составляет от 0,462 до 0,780 %. Показатель $S_{\delta,\%}$ составил 5,1 %.

Среди исследованных антибиотиков ванкомицина гидрохлорид показал слабую антимикробную активность в отношении *B. subtilis* АТСС 6633. Результаты демонстрировали отсутствие антимикробной активности в виде зон задержки роста бактерий при низких концентрациях. При концентрации 50 мкг / мл диаметры зон задержки роста составили 5,3 ± 0,26 мм, постепенно увеличиваясь до 10,5 ± 0,28 мм при 200 мкг / мл. На рисунке 12 представлена

зависимость диаметров зон ингибирования роста бактерий от концентраций антибиотика.

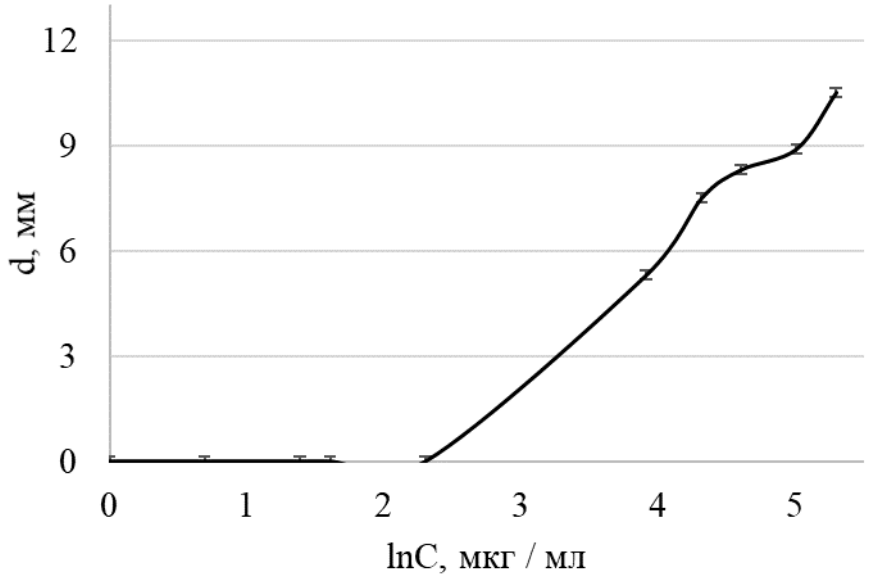


Рисунок 12 – Зависимость диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *B. subtilis* ATCC 6633 от концентраций ванкомицина гидрохлорида.

Статистический анализ данных ванкомицина показал высокую точность при расчете параметров S^2, S, δ, Δx и ε, которые не превышали 1. Коэффициент $S_{\delta,\%}$ составил 3,3 %. Полученные результаты находят отражение в научной литературе, где механизм действия ванкомицина связан с ингибированием синтеза клеточной стенки бактерий путем связывания с D-аланин-D-аланиновыми концевыми остатками предшественников пептидогликана [19, 41, 68]. Это предотвращает образование пептидогликанов, необходимых для формирования клеточной стенки, что приводит к гибели бактериальных клеток [154].

В результате выявлено, что полученные значения основных статистических параметров указывают на незначительный разброс данных относительно среднего значения диаметра зоны ингибирования роста для каждой концентрации антибиотика. Коэффициенты $S_{\delta,\%}$ для амикацина (3,4 %), ванкомицина (3,3 %), канамицина (3,9 %) и линкомицина (5,1 %) свидетельствуют о высокой степени однородности полученных экспериментальных данных для каждого из представленных антибиотиков. Показатель, не превышающий 10 %, традиционно

рассматривается как показатель хорошей воспроизводимости и надежности результатов [211]. Это подкрепляет вывод о стабильности получения результатов исследования и закономерный дозо-зависимый эффект, указывая на то, что изменения зон ингибирования роста обусловлены концентрацией антибиотика, а не случайными факторами.

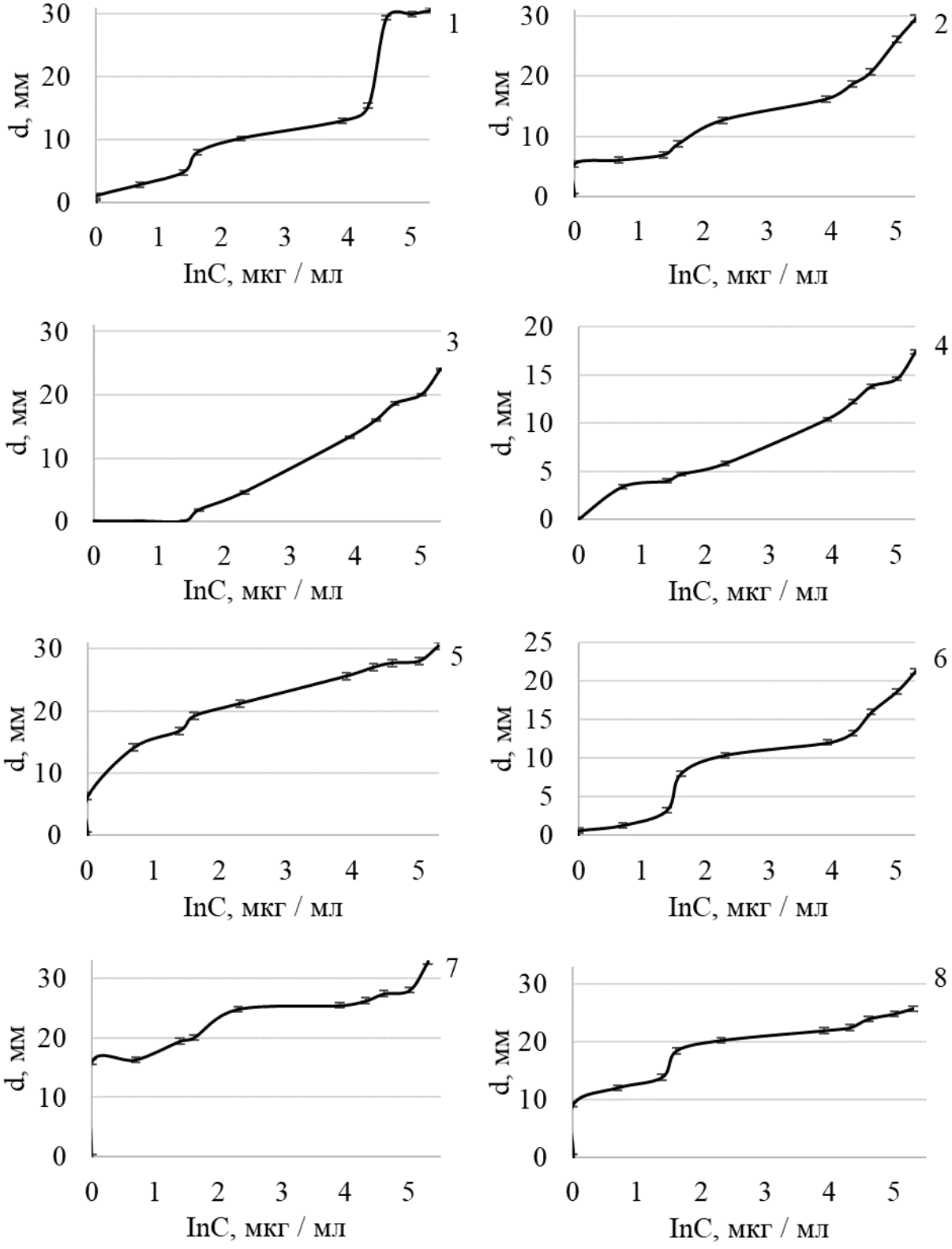
Основой для разработки методик биолюминесцентного анализа направленной на определение качества антибактериальных лекарственных средств и их количественного содержания с использованием светящихся бактерий стало изучение влияния антибиотиков, а именно диаметров зон задержки роста, для штаммов *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633, рекомендованных ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ГФ РФ XIV-го издания, от логарифмированных концентраций 17 антибиотиков, описанных в той же ОФС.

С целью всесторонней оценки и выявления потенциальных достоинств и недостатков существующей методики определения антимикробной активности антибиотиков, представленной в Государственной фармакопее РФ XIV-го издания, объектами исследования выбраны фармацевтические субстанции различных групп антибиотиков, представленные в перечне статьи. Это позволит всесторонне оценить преимущества и недостатки метода диффузии в агар.

Несмотря на то, что рекомендованные виды тест-культур отличаются, основной целью получения результатов является не определение точной активности конкретного антибиотика в отношении штаммов, а оценка воспроизводимости и надежности самой методики, включающая в себя анализ трудоемкости, временных затрат и других недостатков. Кроме того, стоит отметить, что перечень антибиотиков, описанных в фармакопейной статье, представленной в ГФ РФ XIV-го издания, не обновлялся с 2007 года [32]. Это может существенно ограничивать применимость методики для оценки активности современных антибактериальных веществ, обладающих иными механизмами действия и спектром активности [49, 139].

В результате проведенных исследований установлены диаметры зон

задержки роста бактерий при различных концентрациях антибиотиков в лунке [99]. Полулогарифмические зависимости диаметров зон ингибирования роста бактерий *S. aureus* 209 P от концентраций антибиотиков представлены на рисунке 13.



Продолжение рисунка 13

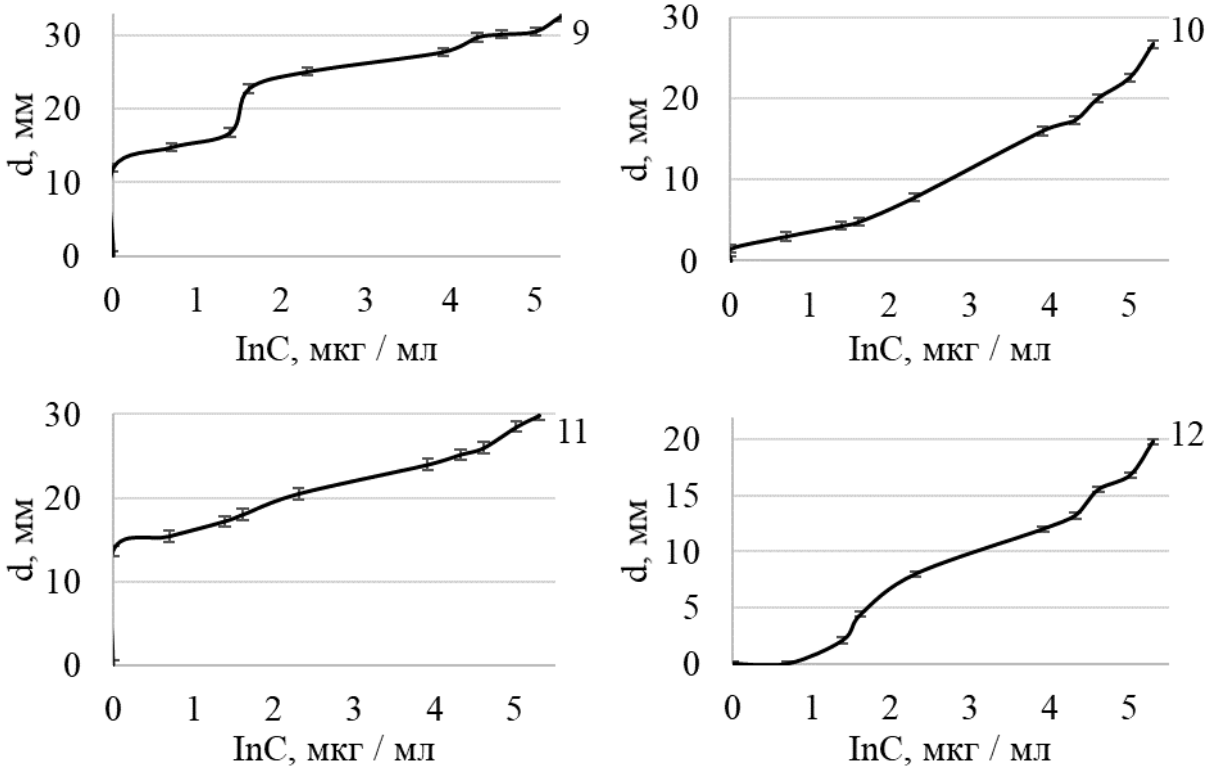
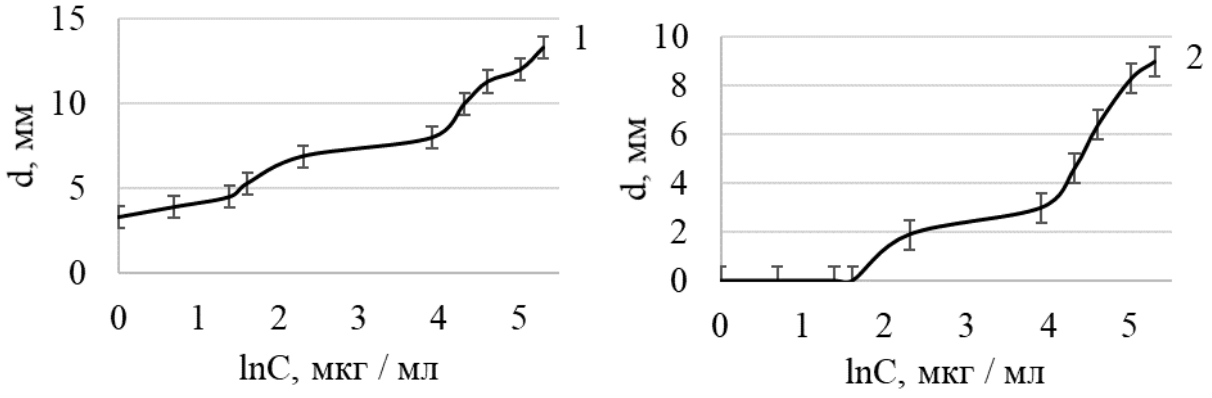
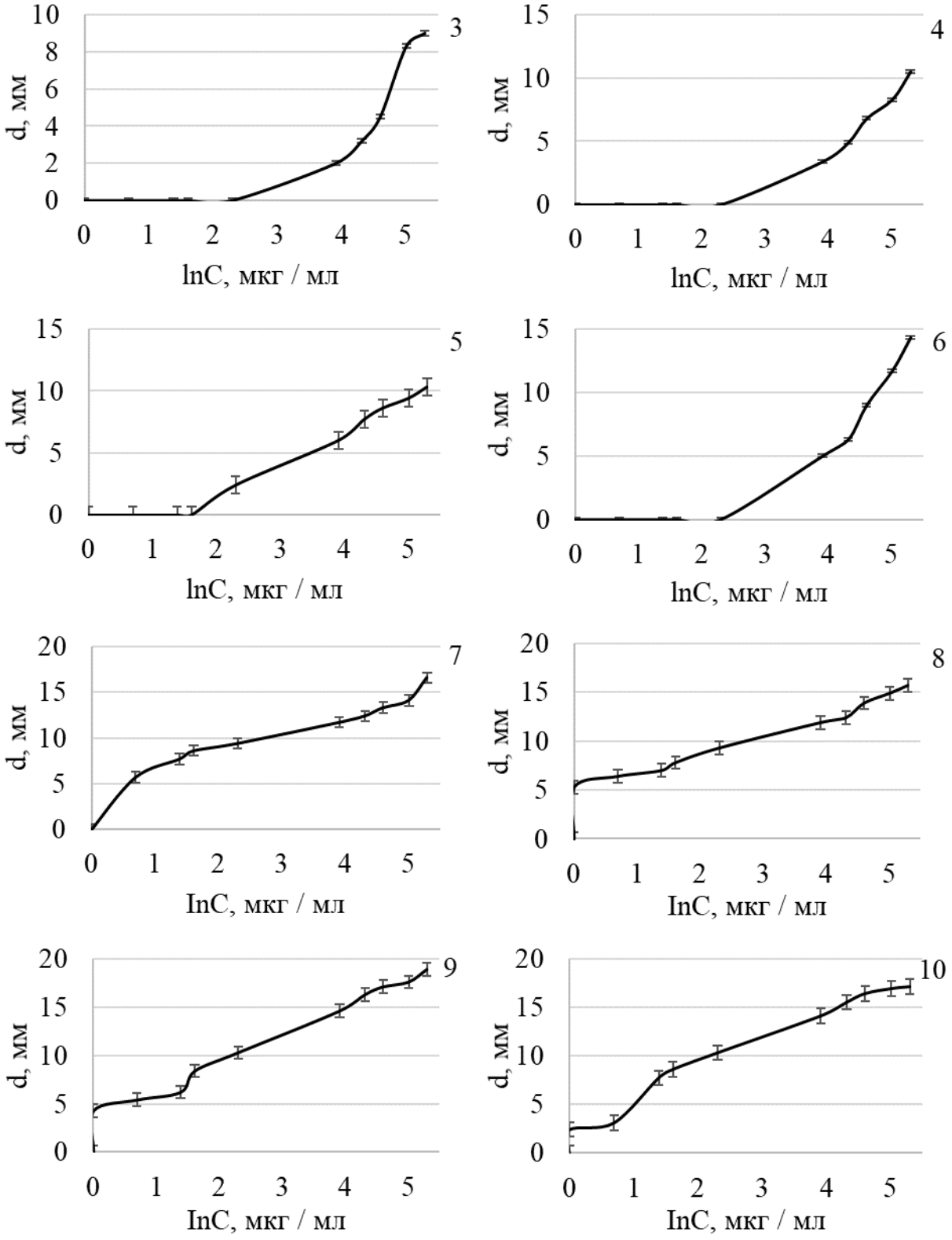


Рисунок 13 – Зависимости диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *S. aureus* 209 P от концентраций антибиотиков, где 1 – цефазолин натрия, 2 – цефепима дигидрохлорид моногидрат, 3 – цефотаксим натрия, 4 – цефтазидима пентагидрат, 5 – цефтриаксон натрия, 6 – цефуроксим натрия, 7 – доксициклина гидрохлорид, 8 – тетрациклина гидрохлорид, 9 – гентамицина сульфат, 10 – стрептомицина сульфат, 11 – азитромицина дигидрат, 12 – эритромицин.

На рисунке 14 представлены полулогарифмические зависимости диаметров зон ингибирования роста *B. subtilis* ATCC 6633 от концентраций антибиотиков.



Продолжение рисунка 14



Продолжение рисунка 14

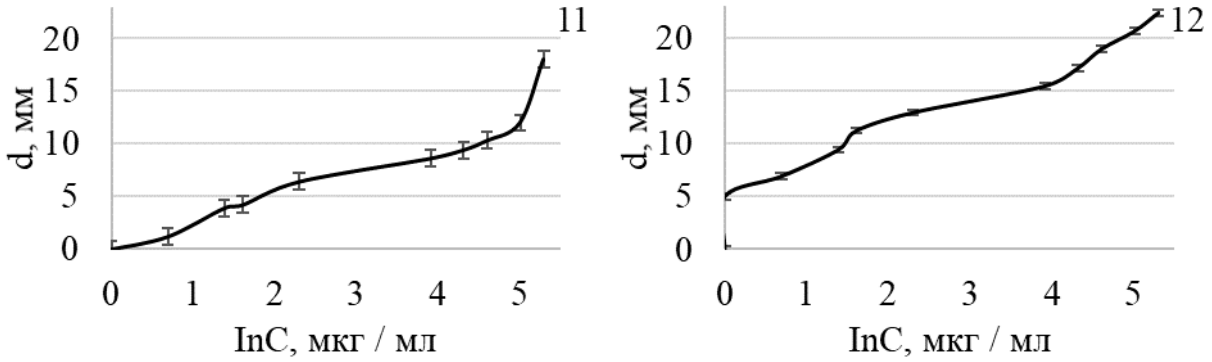


Рисунок 14 – Зависимости диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *B. subtilis* АТСС 6633 от концентраций антибиотиков, где 1 – цефазолин натрия, 2 – цефепима дигидрохлорид моногидрат, 3 – цефотаксим натрия, 4 – цефтазидима пентагидрат, 5 – цефтриаксон натрия, 6 – цефуроксим натрия, 7 – доксициклина гидрохлорид, 8 – тетрациклина гидрохлорид, 9 – гентамицина сульфат, 10 – стрептомицина сульфат, 11 – азитромицина дигидрат, 12 – эритромицин.

Фармакопейная статья об определении антимикробной активности антибиотиков из производных 7-АЦК рассматривает представителей I поколения, таких как цефалексин и цефалотин, хотя в современной медицине широко используются более новые поколения препаратов [54, 78]. Антибиотики III – V поколений играют важную роль в рациональной лечебной терапии и рассматриваются как препараты группы резерва [113, 202]. В связи с этим актуальным представляется расширение спектра исследования, включив в него цефалоспорины более поздних поколений, что позволит получить комплексное представление об их анализе при контроле качества.

В отношении фармакопейных штаммов представители группы цефалоспоринов оказывали различную активность, выраженную в зонах ингибирования. В частности, в отношении *S. aureus* 209 P наибольшие зоны ингибирования образуют цефепима дигидрохлорид моногидрат и цефтриаксон натрия, а наименьшие – цефотаксим натрия, цефтазидима пентагидрат и цефуроксим натрия.

Для *B. subtilis* АТСС 6633 наибольшую активность продемонстрировал

цефазолин натрия, в то время как цефалоспорины II – IV поколений показали минимальную активность или полное её отсутствие ингибирования в концентрациях от 1 до 10 мкг / мл.

В целом активность цефалоспоринов в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 ниже, чем по отношению к *S. aureus* 209 P, за исключением цефазолина натрия, который вызывал сопоставимую задержку роста тест-микроорганизмов, а в больших концентрациях от 50 до 200 мкг / мл – образовывал большие зоны ингибирования против *S. aureus* 209 P с диаметрами от 13 ± 0,63 до 30,6 ± 0,44 мм.

В результате влияния на *S. aureus* 209 P наименьшую вариабельность в результатах показал цефтриаксон ($S_{\delta,\%}$ = 2,5 %), что указывает на наиболее стабильный и предсказуемый эффект. Цефепим ($S_{\delta,\%}$ = 3,2 %), цефазолин ($S_{\delta,\%}$ = 3,7 %), цефотаксим ($S_{\delta,\%}$ = 3,9 %) и цефтазидим ($S_{\delta,\%}$ = 3,2 %) продемонстрировали умеренную вариабельность. Цефуроксим показал наибольшую вариабельность ($S_{\delta,\%}$ = 6,9 %), свидетельствующую о наименее стабильном эффекте. Однако в целом коэффициент $S_{\delta,\%}$ не превышал 10 %, что указывает на низкую изменчивость или высокую однородность данных.

В отношении *B. subtilis* ATCC 6633 цефазолин ($S_{\delta,\%}$ = 11,7 %) показал умеренную вариабельность, в то время как цефепим ($S_{\delta,\%}$ = 32,5 %) и цефтриаксон ($S_{\delta,\%}$ = 25,2 %) продемонстрировали высокую вариабельность и, соответственно, наименее стабильный эффект. Цефотаксим ($S_{\delta,\%}$ = 6,0 %), цефтазидим ($S_{\delta,\%}$ = 4,5 %) и цефуроксим ($S_{\delta,\%}$ = 3,3 %) показали низкую вариабельность, но при этом и полное отсутствие активности в низких концентрациях.

Результаты определения производных 7-аминоцефалоспорановой кислоты для *S. aureus* 209 P демонстрировали более стабильные и хорошо воспроизводимые данные, чем *B. subtilis* ATCC 6633. Сравнение антимикробной активности показало, что цефазолин демонстрирует более выраженную активность, особенно при низких концентрациях. Это подтверждается статистическим анализом, демонстрирующим высокую стабильность действия цефазолина в концентрациях от 1 до 10 мкг / мл (значения ε в диапазоне

0,220 – 0,337 %) и усиление эффекта при концентрациях от 50 до 200 мкг / мл (ε = 0,984 – 2,835 %). Аналогичная тенденция наблюдалась для цефуроксима, цефтриаксона и цефепима. Цефуроксим, хотя и обладает схожей эффективностью против стафилококка, согласно данным научной литературы, оказался менее активным в методе диффузии в агар в отношении *S. aureus* 209 P [157, 189]. Антибиотики цефотаксим и цефтазидим по показателям *ε* стабильны во всем диапазоне концентраций и не превышали 1 %.

Из производных нафтацена доксициклина гидрохлорид продемонстрировал высокую активность против *S. aureus* 209 P, так как при концентрации 1 мкг / мл диаметр зоны ингибирования составил от 15,9 ± 0,08 мм. Согласно источникам, этот антибиотик активен в отношении аэробных грамположительных бактерий, в том числе *Staphylococcus spp*. (включая штаммы, продуцирующие пенициллиназу) [7, 68]. В диапазоне концентраций от 10 до 50 мкг / мл увеличение зоны ингибирования становится менее заметным. Разница между 10 мкг / мл (24,8 ± 0,12 мм) и 50 мкг / мл (25,4 ± 0,57 мм) составила всего около 0,6 мм, что указывает на замедление роста зоны ингибирования и приближение к насыщению, как отмечалось и для других антибиотиков. Статические параметры также показали увеличение *ε* с увеличением концентраций до 1,268 %. Однако в диапазоне концентраций от 50 до 100 мкг / мл наблюдалось увеличение зон ингибирования примерно на 2 мм, после чего при значительном увеличении концентрации, до 200 мкг / мл, диаметр зоны ингибирования увеличился значительно (до 32,8 ± 0,80 мм). Этот «скачок» может свидетельствовать о достижении критического порога концентрации, при котором доксициклин оказывает более выраженное воздействие на бактерии [122]. Важно учитывать, что чувствительность *S. aureus* 209 P к доксициклину может постепенно снижаться, поскольку этот тетрациклиновый антибиотик блокирует связывание аминоацил-тРНК с рибосомой, ингибируя синтез белка [68, 194]. Аналогичный механизм действия наблюдается и у тетрациклина [68, 89], что позволяет рассматривать оба антибиотика в контексте их общего влияния на бактериальные культуры.

В ходе исследования влияния тетрациклина гидрохлорида на рост штамма *S. aureus* 209 Р при минимальной концентрации 1 мкг / мл зона ингибирования составила 9,2 ± 0,08 мм. Наблюдалась четкая тенденция к увеличению значений зон ингибирования с ростом концентраций антибиотика, при этом значения S^2 и S оставались низкими, что свидетельствует о достаточной воспроизводимости результатов. Однако для тетрациклина при высоких концентрациях отмечалось увеличение показателей S^2, S и ε, что, вероятно, связано с нелинейным характером зависимости зоны ингибирования от концентрации в данном диапазоне либо с погрешностями измерения при больших диаметрах зон [132, 140].

Анализ влияния доксициклина и тетрациклина гидрохлоридов на *B. subtilis* АТСС 6633 показывает аналогичную концентрационно-зависимое ингибирование, однако активность выражена меньшими диаметрами зон задержки роста, чем для *S. aureus* 209 Р. Зоны ингибирования доксициклина увеличиваются с 5,7 ± 0,86 мм при концентрации 2 мкг / мл до 16,6 ± 0,93 мм при 200 мкг / мл, а для тетрациклина – с 5,3 ± 0,74 мм при концентрации 1 мкг / мл до 15,7 ± 1,42 мм при 200 мкг / мл.

Для оценки точности данных рассчитаны средние значения $S_{\delta,\%}$, которые для *S. aureus* 209 Р составили 1,8 % и 2,2 %, а для *B. subtilis* АТСС 6633 – 6,3 % и 6,8 % для доксициклина и тетрациклина соответственно. Значительно более низкие значения $S_{\delta,\%}$ для *S. aureus* 209 Р указывают на большую воспроизводимость и точность данных, полученных для этого штамма, по сравнению с *B. subtilis* АТСС 6633.

Полученные данные в отношении *S. aureus* 209 Р показывают, что с увеличением концентраций антибиотиков S^2 изменялась в пределах от 0,005 до 1,079 и от 0,006 до 1,672, S – от 0,069 до 1,039 и от 0,076 до 1,293, δ – от 0,028 до 6,475 и от 0,035 до 10,033, ε варьировалась от 0,168 до 2,545 % и от 0,187 до 3,168, а в отношении *B. subtilis* АТСС 6633 – S^2 в пределах от 0,049 до 0,973 и от 0,141 до 1,681, S – от 0,223 до 0,986 и от 0,376 до 1,297, δ – от 0,295 до 5,835 и от 0,848 до 10,088, ε от 0,543 до 2,416 % и от 0,921 до 3,177 % соответственно для

доксициклина и тетрациклина.

Аминогликозиды, к которым относится гентамицин и стрептомицин, являются антибиотиками широкого спектра действия, оказывающими бактерицидный эффект за счет нарушения синтеза белка в микробной клетке [77, 149]. Однако в отличие от некоторых других антибиотиков они искажают считывание генетической информации, что объясняет особенности его воздействия на микроорганизмы [75, 108, 194].

Установлено, что гентамицина сульфат активно подавляет рост *S. aureus* 209 P, причем его антимикробное влияние возрастает с увеличением концентрации. Изучение влияния гентамицина на *S. aureus* 209 P показало, что при концентрации 1 мкг / мл зона ингибирования составляет 12 ± 0,19 мм, при увеличении концентрации до 10 мкг / мл она возрастает до 25,1 ± 0,20 мм, а при увеличении концентрации стрептомицина сульфата – от 1,5 ± 1,23 до 7,8 ± 0,33 мм и до 26,7 ± 0,28 мм при 10 и 200 мкг / мл соответственно.

Важно отметить, что для гентамицина и стрептомицина значения S^2 и S оставались низкими – не более 1,662, 1,289 и 1,576, 1,255 соответственно во всем диапазоне концентраций, что подтверждает высокую точность полученных результатов. Однако при повышении концентраций гентамицина (от 50 до 200 мкг / мл) рост зоны ингибирования замедляется, а ε увеличивается в 12 раз (от 0,261 до 3,159 %). Нелинейный рост и увеличение ошибки указывают на приближение к насыщению эффекта антибиотика, когда дальнейшее увеличение концентрации не приводит к пропорциональному увеличению его активности.

Результаты определения антимикробной активности в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 антибиотики продемонстрировали сопоставимое влияние. Полученные результаты о S^2, S и ε свидетельствуют о высокой точности оценки гентамицина и стрептомицина в исследованном диапазоне концентраций. В отношении *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633 гентамицин показал низкую вариабельность данных с $S_{\delta,\%}$ равными 2,0 и 6,8 %, а стрептомицин – умеренную вариабельность с 14,1 и 11,4 %.

В результате исследования в качестве макролидных антибиотиков

использовали 15-членный азалид азитромицина дигидрат и 14-членный эритромицин по влиянию на рост двух бактериальных культур.

При исследовании влияния азитромицина дигидрата на *S. aureus* 209 Р выявлена четкая прямая зависимость между концентрацией антибиотика и величиной зоны подавления роста. Препарат проявлял высокую активность с концентрацией 1 мкг / мл, формируя зону ингибирования диаметром 13,7 ± 0,22 мм. Постепенное увеличение концентрации в диапазоне от 1 до 10 мкг / мл приводило к увеличению зоны ингибирования до 20,5 ± 0,90 мм. В концентрациях от 50 до 200 мкг / мл активность антибиотика продолжала расти – зона подавления увеличивалась с 24 ± 0,65 до 29,9 ± 0,83 мм.

Интересно, что с увеличением среднего диаметра зоны ингибирования при повышении концентрации азитромицина также возрастали показатели S^2 и S. Это свидетельствует о том, что эффект препарата становится менее предсказуемым при высоких концентрациях. Значения S^2 увеличивались с 0,021 до 1,449, а S – с 0,146 до 1,204 соответственно. Также наблюдалось увеличение ε начиная с концентрации 10 мкг / мл, достигая наибольших значений при концентрациях 100 мкг / мл (ε = 2,935 %) и 150 мкг / мл (ε = 2,949 %).

В отличие от азитромицина эритромицин проявлял значительно меньшую активность против *S. aureus* 209 Р. Минимальная подавляющая концентрация для эритромицина составила 4 мкг / мл, что свидетельствует о его более низкой эффективности против данного штамма по сравнению с азитромицином. Однако статистическая обработка данных показала стабильность и хорошую воспроизводимость, не превышая S^2 – 0,161, S – 0,402, δ – 0,968 и ε – 0,984 %. Средние значения $S_{\delta,\%}$ составили 2,7 % и 4,0 %.

При изучении влияния макролидов на *B. subtilis* АТСС 6633 установлено, что эритромицин проявляли свою активность, начиная с концентрации 1 мкг / мл с диаметром зоны ингибирования 5 ± 0,46 мм, а азитромицина дигидрат – при 2 мкг / мл с диаметром равным 1,2 ± 1,06 мм. В целом зависимость зоны ингибирования роста бактерий от концентраций макролидов в отношении *B. subtilis* АТСС 6633 была линейной.

Статистический анализ данных для эритромицина показал высокую степень точности результатов (S^2 и S не превышали 0,179 и 0,423, δ – 1,079 и ε – 1,036 %). В то же время азитромицин показал увеличение значений ε до 3,334 %, что указывает на снижение точности измерений. Азитромицин продемонстрировал значительно более высокую вариабельность и в результате расчета $S_{\delta,\%}$ (19,0 %) по сравнению с эритромицином (2,7 %), что указывает на меньшую стабильность его антимикробной активности.

Таким образом, полученные результаты статистического анализа позволяют заключить, что низкие концентрации большинства антибиотиков характеризуются более высокой точностью и воспроизводимостью результатов в отношении обеих бактериальных культур, что подтверждается низкими показателями S^2, S и Δx.

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 [68, 77, 89, 131, 266]. Полученные результаты также показывают необходимость тщательного подбора штамма для конкретного антибиотика [140, 148].

Вместе с тем следует учитывать ограничения, присущие методам определения антимикробной активности с использованием патогенных микроорганизмов. Необходимость соблюдения строгих мер биобезопасности и использования специализированного оборудования усложняет исследования и увеличивает их стоимость [70, 96, 147].

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

3.2 Определение активности антибиотиков с использованием в качестве тест-объектов *E. coli* АТСС 25922 методом диффузии в агар

В настоящее время значительную долю бактериальных инфекций человека (нозокомиальных, урогенитальных, кишечных) вызывают именно грамотрицательные микроорганизмы [267, 319]. К ним относятся такие клинически значимые патогены, как *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii,* и представители семейства *Enterobacteriaceae* [175, 181, 215, 271]. 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 [205]. Кроме того, сложная клеточная стенка с наружной мембраной является ключевым барьером для проникновения многих классов антибиотиков [40, 137]. Следовательно, использование грамотрицательной модели позволит оценивать активность соединений с учётом этого важнейшего механизма устойчивости [49, 243].

В частности, доступным для биолюминесцентного анализа грамотрицательным штаммом является генетически модифицированные *Escherichia coli* с клонированными генами люциферазы, которые демонстрируют более высокую ферментативную и люминесцентную стабильность [160, 301].

Однако представленные тест-микроорганизмы в Государственной Фармакопее РФ XIV-го издания ограничены *Pseudomonas aeruginosa* и *Bordetella bronchiseptica*. Применение *P. aeruginosa* сужено до контроля качества лишь одного антибиотика – карбенициллина [33, 116], что объясняется его природной высокой устойчивостью к широкому спектру антимикробных препаратов [205,

271, 281]. Альтернативный фармакопейный микроорганизм, *B. bronchiseptica*, также имеет существенные ограничения, связанные со строгими требованиями к условиям культивирования (обогащенные среды, специфическая газовая среда), низкой скоростью роста и узким спектром чувствительности, в основном к бета-лактамным антибиотикам [11, 33]. Эти факторы снижают его универсальность для анализа. Принципиально важно, что действующая фармакопейная статья допускает использование иных микроорганизмов, чувствительных к исследуемому антибиотику, при условии валидации методики [33], что создаёт нормативную основу для расширения перечня тест-штаммов.

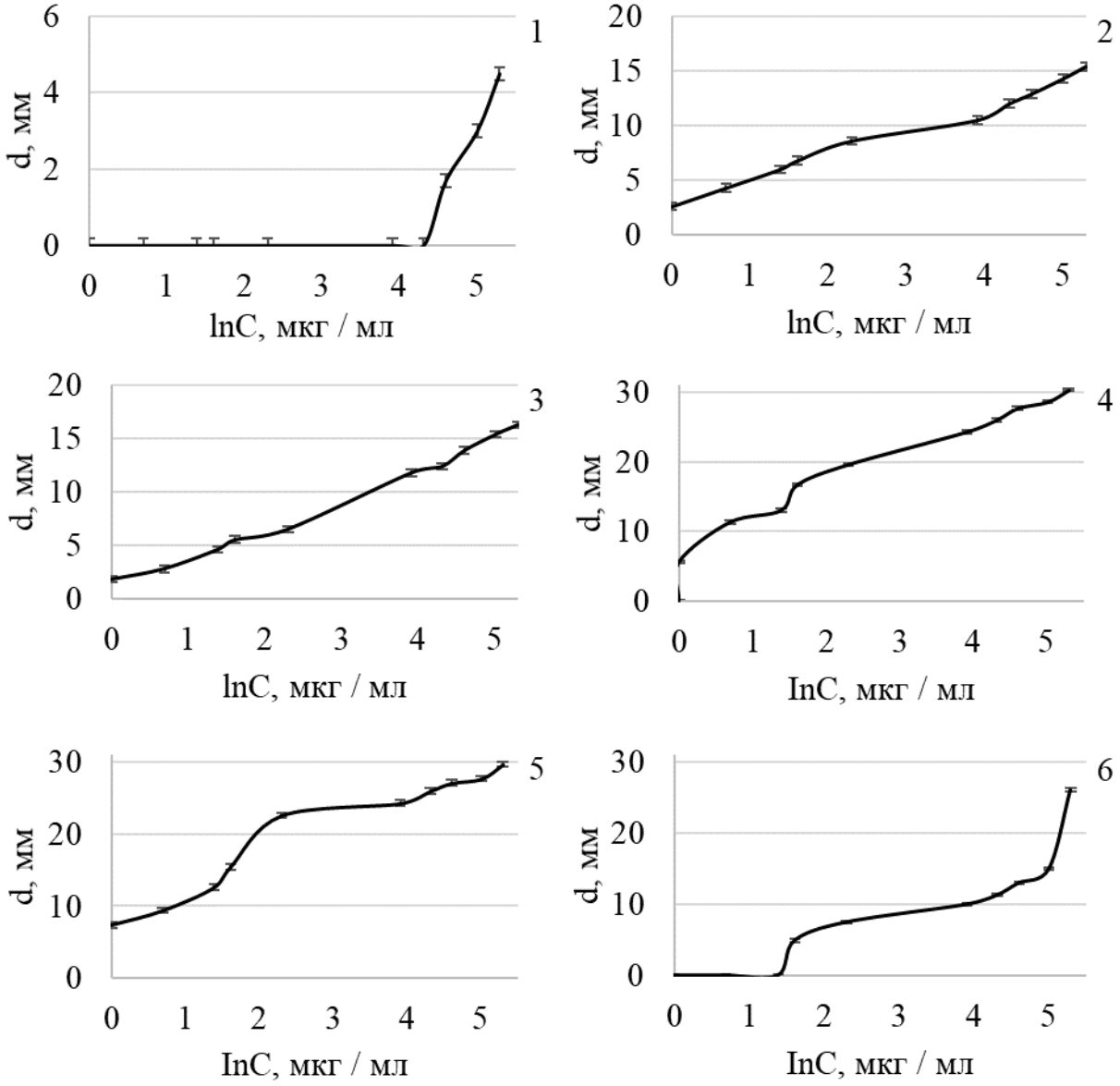
В свою очередь в современных микробиологических исследованиях среди всего многообразия грамотрицательных микроорганизмов широкое применение нашли представители видов *Mycoplasma genitalium, Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* [74, 240, 277]. Бактерии *E. coli* как представитель семейства *Enterobacteriaceae* [67, 204] уже более 80 лет служат модельными микроорганизмами в микробиологических, молекулярно-генетических, биотехнологических и других исследованиях благодаря низкой вирулентности (третья группа патогенности) [117, 181], простоте культивирования, умеренной генетической пластичности, быстрому размножению при 37 ^{0}C, устойчивости во внешней среде и способности к длительному сохранению в замороженном состоянии [11, 27, 67]. В то же время, стандартизованный штамм бактерий *E. coli* АТСС 10536 входит в перечень тест-микроорганизмов в Фармакопее США [212].

Однако, несмотря на широкое применение в различных областях науки, *E. coli* не входят в перечень тест-микроорганизмов, описанных в соответствующей фармакопейной статье ГФ XIV-го издания [33].

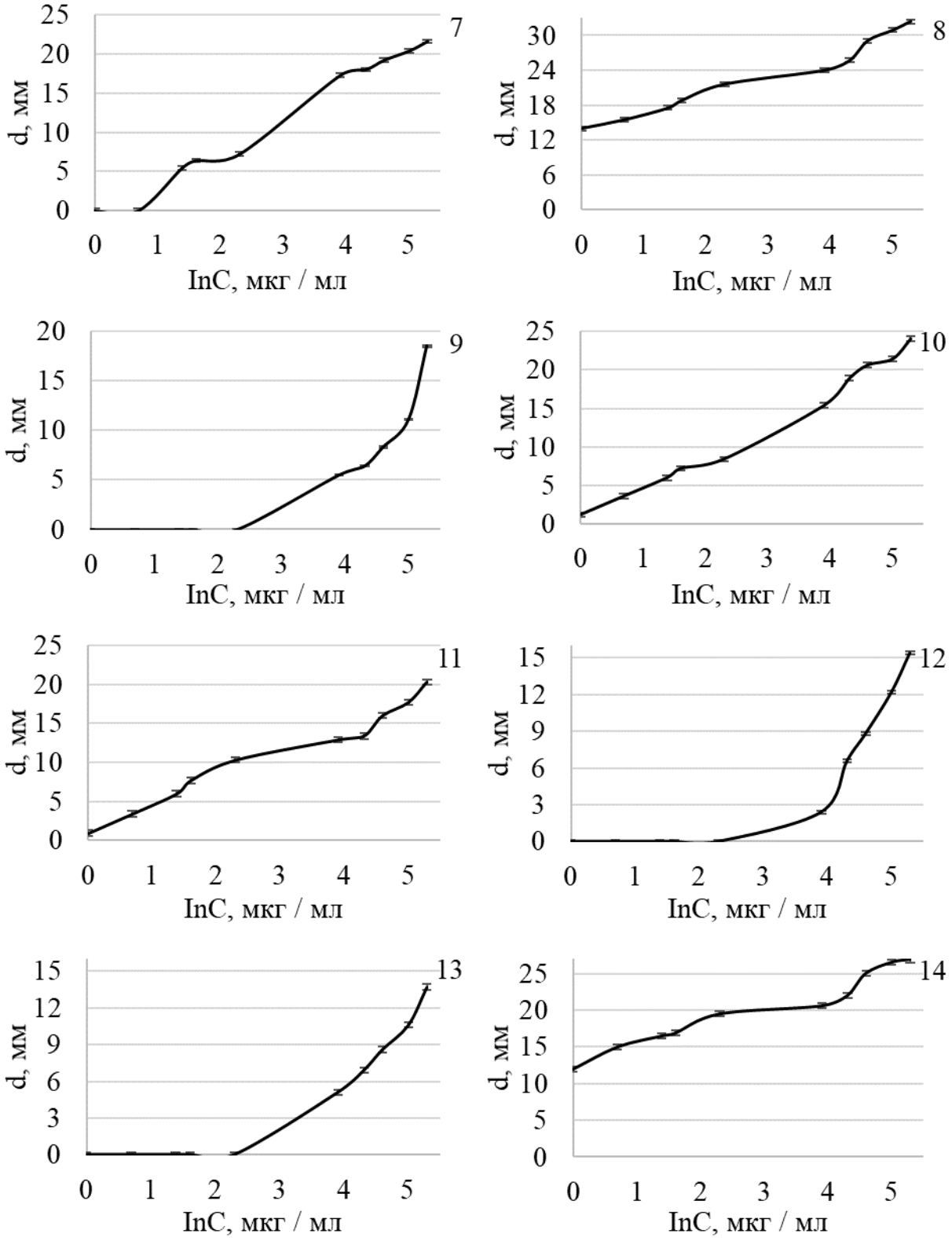
В связи с этим в работе выбран всемирно известный, всесторонне изученный и используемый как в клинической, так и в фармацевтической практике штамм *E. coli* АТСС 25922. Его выбор обусловлен тем, что в отличие от применяемого в Фармакопее США для узкого спектра препаратов *E. coli* АТСС 10536, *E. coli* АТСС 25922 является тщательно охарактеризованным эталонным штаммом, обладающим стандартизированной чувствительностью к широкому

перечню современных антимикробных препаратов различных классов [141, 212]. Это делает его значительно более универсальной моделью для разработки новых аналитических методик.

Исследование 17 антибиотиков 7 различных химических структур методом диффузии в агар с использованием грамотрицательного штамма *E. coli* ATCC 25922 показало зоны задержки роста в концентрациях от 1 до 200 мкг / мл [99]. Полулогарифмические зависимости диаметров зон ингибирования роста бактерий от концентраций антибиотиков представлены на рисунке 15.



Продолжение рисунка 15



Продолжение рисунка 15

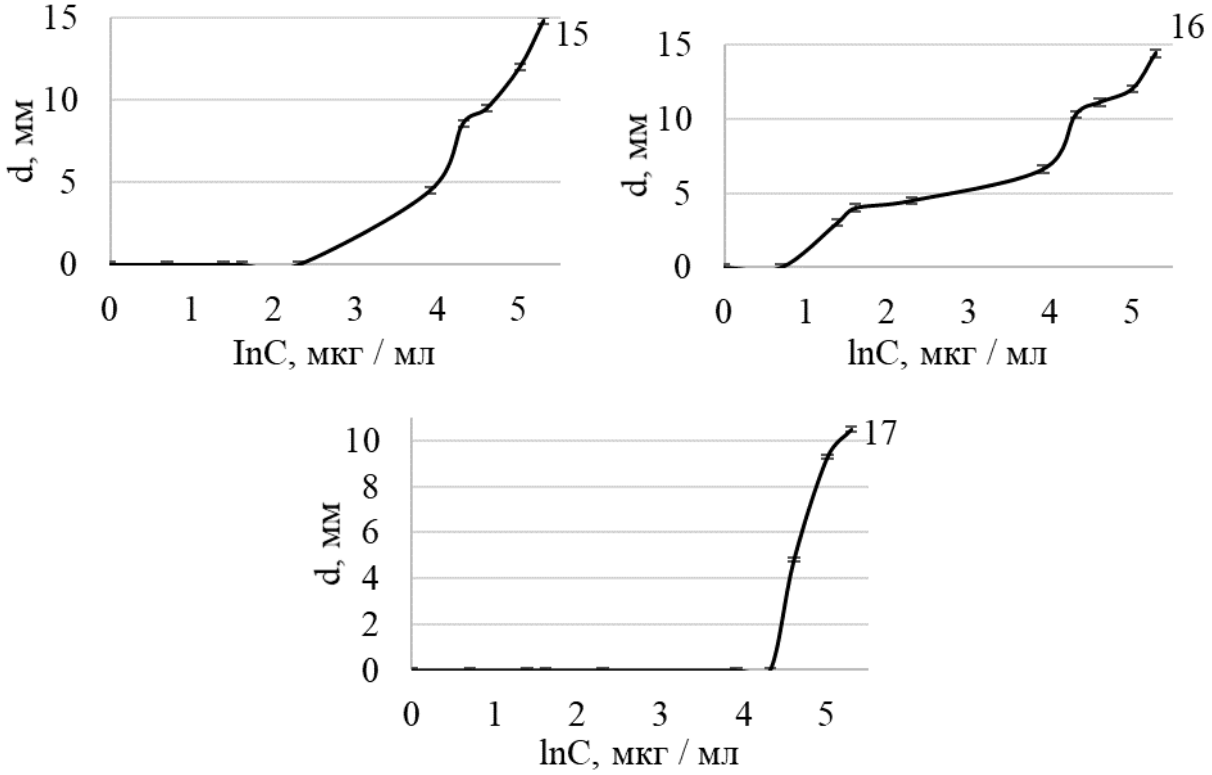


Рисунок 15 – Зависимости диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *E. coli* ATCC 25922 от концентраций антибиотиков, где 1 – ампициллин натрия, 2 – доксициклина гидрохлорид, 3 – тетрациклина гидрохлорид, 4 – цефазолин натрия, 5 – цефепима дигидрохлорид моногидрат, 6 – цефотаксим натрия, 7 – цефтазидима пентагидрат, 8 – цефтриаксон натрия, 9 – цефуроксим натрия, 10 – гентамицина сульфат, 11 – стрептомицина сульфат, 12 – амикацина сульфат, 13 – канамицина сульфат, 14 – азитромицина дигидрат, 15 – эритромицин, 16 – ванкомицина гидрохлорид, 17 – линкомицина гидрохлорид моногидрат.

Для различных групп антибиотиков выявлены некоторые закономерности. В результате определения антимикробной активности производного 6-АПК ампициллина натрия выявлено, что в области концентраций от 1 до 75 мкг / мл средние значения диаметров зон ингибирования оставались на нулевом уровне, что указывает на то, что используемый метод и тест-микроорганизмы не обладают достаточной чувствительностью для определения концентраций ампициллина натрия в указанном диапазоне [324]. При увеличении концентрации до 100 мкг / мл зафиксирована зона ингибирования, однако её размеры не

превышали 1,7 ± 1,04 мм, что меньше рекомендованного 14-милиметрового диаметра зоны угнетения для минимальной концентрации антибиотика, согласно ГФ РФ XIV-го издания.

Значения ε и $S_{\delta,\%}$ уменьшались с увеличением концентрации в диапазоне от 100 до 200 мкг / мл, что характерно для аналитических методов и указывает на возрастание точности определения при увеличении концентрации ампициллина натрия. Значения ε изменялось с 2,327 до 0,880 %. Несмотря на это, значения $S_{\delta,\%}$ для концентрации 100 мкг / мл (60 %) и даже для более высоких концентраций 150 мкг / мл (14 %) и 200 мкг / мл (9 %) свидетельствуют об относительно высокой степени разброса результатов, что может быть неприемлемо для целей количественного анализа.

Результаты исследования производных нафтацена показали, что тетрациклина и доксициклина гидрохлориды демонстрировали меньшие диаметры зон ингибирования роста в отношении *E. coli* ATCC 25922 в сравнении с *S. aureus* 209 P и сопоставимую активность с *B. subtilis* ATCC 6633. Несмотря на различия в химическом строении, являясь препаратами I и II поколений, указанные антибиотики действуют по схожему механизму: они ингибируют синтез белка в бактериальной клетке [68, 194, 229].

Тетрациклин показал диаметр зоны ингибирования 1,8 ± 0,20 мм при концентрации 1 мкг / мл и 16,3 ± 0,56 мм при 200 мкг / мл. Для доксициклина эти значения составили 2,6 ± 0,13 и 15,4 ± 0,70 мм соответственно. Примечательно, что при высоких концентрациях происходит увеличение S^2, S и *ε*. Значения S^2, S и δ не превышали 1, а *ε* оставалась низкой до концентрации 50 мкг / мл. Значения $S_{\delta,\%}$, равные 3,5 и 4,1 %, указывают на высокую степень надежности полученных результатов.

В результате исследования цефалоспорины показали различную чувствительность *E. coli* ATCC 25922 к исследуемым антибиотикам. Цефтриаксон натрия ингибировал рост микроорганизмов при концентрации 1 мкг / мл, а размеры зон задержки роста составили 14 ± 0,13 мм. *ε* цефтриаксона при высоких концентрациях продемонстрировала увеличение показателей с 0,183 до 1,848 %,

что может указывать на возрастание вариабельности результатов при высоких концентрациях.

Цефазолин натрия и цефепима дигидрохлорид моногидрат при концентрации 1 мкг / мл также показали зоны ингибирования с диаметрами 5,6 ± 0,37 и 7,4 ± 0,12 мм соответственно. Антибиотики показали стабильный рост активности с увеличением концентраций до диаметров 30,3 ± 0,12 и 29,7 ± 0,96 мм при 200 мкг / мл. Низкие значения ε при высоких концентрациях цефазолина говорят о высокой воспроизводимости результатов (не более 0,830 %). Цефепим, обладая умеренной активностью, демонстрировал сравнительно низкую S^2 и S во всем диапазоне концентраций (S^2 не более 0,761 и S не более 0,873), однако при высоких концентрациях от 50 до 200 мкг / мл наблюдалось увеличение показателя ε с 0,274 до 2,138 %.

Для некоторых антибиотиков, таких как цефтазидима пентагидрат и цефотаксим натрия, формирование зон ингибирования роста штамма начиналось при концентрации 4 и 5 мкг / мл, с диаметрами 5,4 ± 0,33 и 4,9 ± 0,39 мм соответственно. При увеличении концентраций антибиотиков диаметры зон ингибирования возрастали, достигая при 200 мкг / мл значений 21,6 ± 0,50 и 26,1 ± 0,35 мм соответственно. ε колебалась от 0,523 до 1,120 % для цефтазидима и от 0,410 до 0,913 % для цефотаксима, не превышая 1 %, что указывает на приемлемую точность методики.

Для цефуроксима натрия зоны ингибирования не наблюдались при концентрациях от 1 до 10 мкг / мл. Активность цефуроксима проявлялась только при концентрациях 50 мкг / мл с диаметром 5,5 ± 0,15 мм. В то же время при концентрации 200 мкг / мл цефуроксим продемонстрировал зону ингибирования, равную 18,5 ± 0,20 мм. Значение ε для цефуроксима не превышало 0,440 %, что указывает на высокую точность измерений. Статистические параметры S^2, S и δ оставались стабильно низкими.

При анализе $S_{\delta,\%}$, полученных для различных цефалоспоринов, все значения находились в диапазоне от 1,4 до 3,0 %. Такие значения $S_{\delta,\%}$ указывают на высокую однородность выборок и незначительный разброс полученных данных

относительно среднего значения, что свидетельствует о хорошей прецизионности и надежности проведенных измерений для всех исследованных цефалоспоринов: цефазолина (1,6 %), цефепима (1,7 %), цефотаксима (3,0 %), цефтазидима (2,7 %), цефтриаксона (1,4 %) и цефуроксима (2,0 %).

Антибиотики аминогликозидов, в частности, гентамицина и стрептомицина сульфаты демонстрировали большие диаметры зон ингибирования роста в отношении *E. coli* ATCC 25922, составляющие $1,2 \pm 0,16$ и $0,9 \pm 0,52$ мм при концентрации 1 мкг / мл соответственно. Антибиотики демонстрировали постепенное увеличение активности с ростом концентрации до $24 \pm 0,39$ и $20,3 \pm 0,67$ мм при 200 мкг / мл. S^2, S и Δx для антибиотиков не превышали значения 1. Результаты отличались высокой точностью. Значения $S_{\delta,\%}$ составили 3,5 и 7,9 % соответственно для гентамицина и стрептомицина.

В то же время для амикацина и канамицина сульфатов не наблюдалось зон ингибирования при концентрациях от 1 до 10 мкг / мл. Активность амикацина и канамицина проявлялась только при концентрациях 50 мкг / мл с диаметрами, равными $2,4 \pm 0,36$ и $5,1 \pm 0,31$ мм соответственно. При концентрации 200 мкг / мл амикацин и канамицин продемонстрировали зоны ингибирования, равные $15,4 \pm 0,37$ и $13,7 \pm 0,82$ мм.

Полученные данные указывают на значительные различия в чувствительности используемого штамма *E. coli* ATCC 25922 к различным аминогликозидам. Это ограничивает применимость метода для анализа образцов с низким содержанием данных антибиотиков. Статистический анализ данных антибиотиков показал высокую точность при расчете параметров S^2, S, δ и Δx, которые не превышали 1. Только для канамицина при высоких концентрациях (100 – 200 мкг / мл) наблюдалось повышение показателя ε до 1,825 %. Значения $S_{\delta,\%}$ составили 4,6 и 5,1 % соответственно для амикацина и канамицина.

Исследование антимикробной активности азитромицина дигидрата и эритромицина показало существенные различия между двумя макролидами. Азитромицин продемонстрировал способность ингибировать рост *E. coli* ATCC 25922 при концентрации 1 мкг / мл с формированием зон задержки

роста диаметром 12 ± 0,27 мм. Для антибиотика установлено, что зоны ингибирования увеличиваются с ростом концентраций, однако после 100 мкг / мл этот рост замедляется. В отличие от него для эритромицина не наблюдалось зон ингибирования при концентрациях от 1 до 10 мкг / мл, а активность проявлялась только при концентрации 50 мкг / мл с диаметром 4,5 ± 0,45 мм. При концентрации 200 мкг / мл эритромицин формировал зону ингибирования диаметром 14,8 ± 0,37 мм.

Анализ прецизионности метода определения эритромицина показал ε в диапазоне от 0,833 до 1,007 %, что может свидетельствовать о стабильности результатов. Значение ε для азитромицина показало рост в пределах от 0,168 до 1,917 %, что может свидетельствовать о повышении вариабельности результатов при концентрациях от 50 до 200 мкг / мл. Для эритромицина метод демонстрирует приемлемую точность только при высоких концентрациях со значением $S_{\delta,\%}$ равным 4,6 %, а для азитромицина – 1,7 %.

Ванкомицина гидрохлорид проявляет активность в отношении *E. coli* ATCC 25922 с формированием зон ингибирования роста, начиная с концентрации 4 мкг / мл с диаметром 3 ± 0,20 мм. При увеличении концентрации антибиотика до 200 мкг / мл, диаметр зоны ингибирования достигал 14,4 ± 0,29 мм.

Параметры S^2, S, δ и Δx показали высокую точность, не превышая 1. ε составила от 0,457 до 0,943 %. Средний $S_{\delta,\%}$ составил 4,5 %. Наибольшие значения $S_{\delta,\%}$ наблюдаются при низких концентрациях, что указывает на снижение прецизионности в этой области. При более высоких концентрациях $S_{\delta,\%}$ снижается, демонстрируя лучшую прецизионность.

Линкомицина гидрохлорид моногидрат, представитель линкозамидных антибиотиков, проявил отсутствие зон ингибирования роста *E. coli* ATCC 25922 под действием концентраций от 1 до 10 мкг / мл. Активность в виде зон задержки роста микроорганизмов обнаруживалась только при концентрации 100 мкг / мл, где зона ингибирования составила 4,8 ± 0,28 мм, а при концентрации 200 мкг / мл – 10,5 ± 0,30 мм.

Значение ε колебалось от 0,633 до 0,921 %, что свидетельствует о приемлемой точности измерений. Коэффициент $S_{\delta,\%}$ составил 4,0 %. Тем не менее обнаруженная нечувствительность к линкомицину в широком диапазоне концентраций указывает на значительные недостатки в применении тест-штамма и непригодности для определения антибиотика.

Сравнительное исследование воздействий антибиотиков на штамм *E. coli* ATCC 25922 и фармакопейные тест-микроорганизмы *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633 продемонстрировало меньшую чувствительность исследуемого штамма, что проявилось в статистически значимом уменьшении диаметров зон ингибирования роста. Графическое влияние штамма *S. aureus* 209P на данную зависимость представлено на рисунке 16.

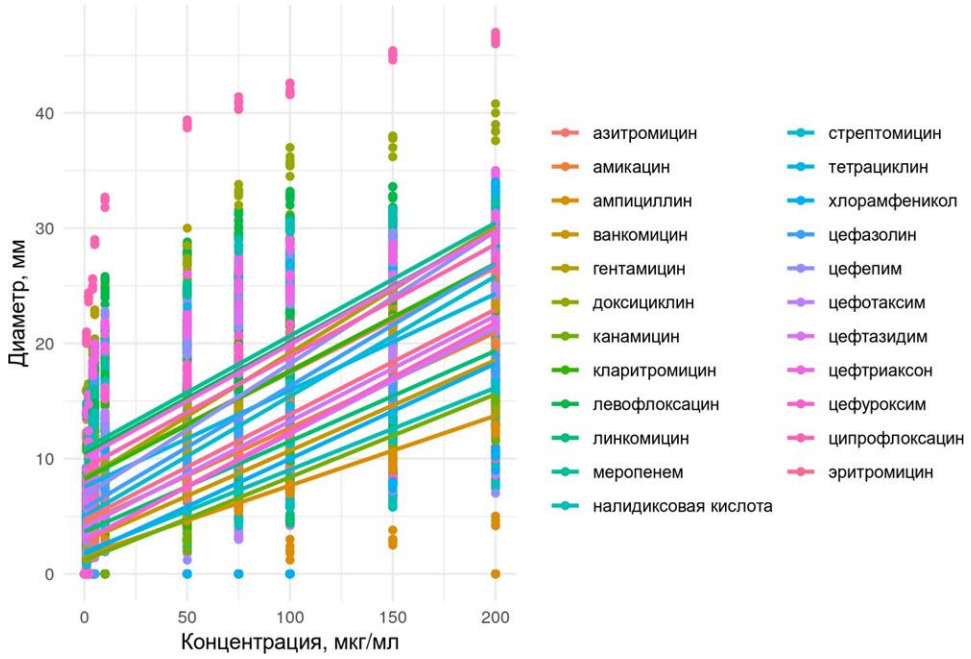


Рисунок 16 – Влияние штамма *S. aureus* 209P на зависимость d(C).

Для количественной оценки влияния антибиотика (A) и вида тест-штамма (S_t) на зависимость диаметра зоны ингибирования (d) от концентрации антибиотика (C) применена линейная регрессионная модель со смешанными эффектами [187]. Данная модель позволила использовать процедуру двойного одностороннего тестирования (TOST) для статистического подтверждения эквивалентности аналитических свойств исследуемых тест-систем по отношению к эталонным.

Регрессионный анализ показал, что угол наклона линии регрессии и величина её смещения значительно более зависят от химической структуры антибиотика, чем от вида используемого микроорганизма.

Сходные тенденции отмечены для штаммов *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922, где параметры зависимости d(C), зависят от химической структуры антибиотика больше, чем от вида тест-штамма. Влияния штаммов представлены на рисунках 17 и 18.

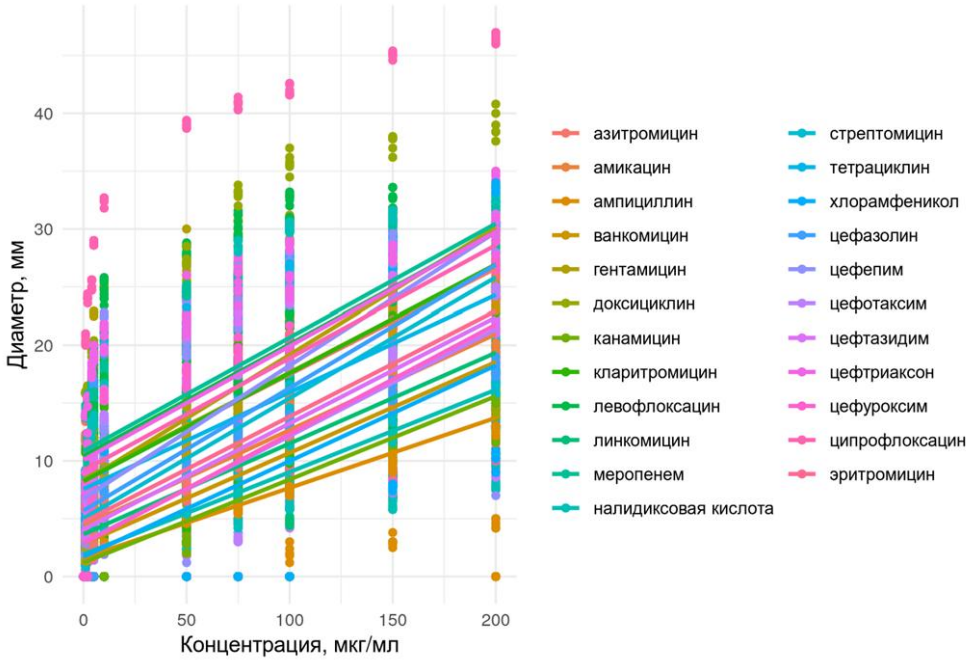


Рисунок 17 – Влияние штамма *B. subtilis* ATCC 6633 на зависимость d(C).

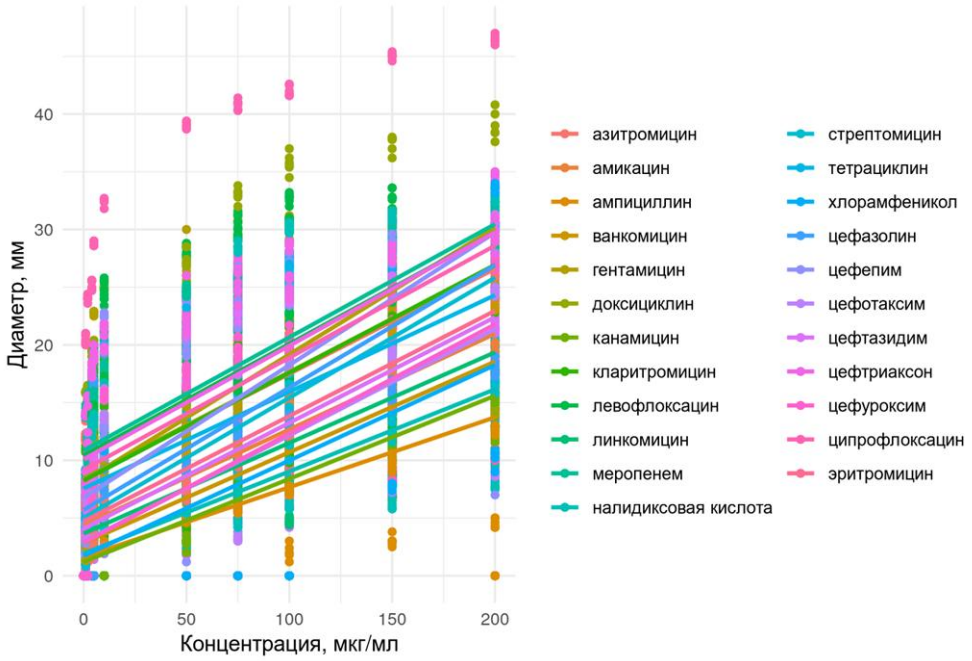


Рисунок 18 – Влияние штамма *E. coli* ATCC 25922 на зависимость d(C).

Результаты подтверждают корректность включения типа антибиотика в модель как случайного эффекта. Для проверки данного утверждения использовалась линейная регрессионная модель с учётом всех факторов как постоянных эффектов. Следует отметить, что для фиксированных значений факторов S_t и A зависимость 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, 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. Ее правильность 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, 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 убедительно показывают, что тип антибиотика существенно изменяет характер влияния штамма на изучаемый показатель.

Для оценки итоговой модели был проведён анализ распределения остатков. Несмотря на некоторые отклонения, распределение остатков можно считать приближённо нормальным в контексте поставленных задач, так как существенные нарушения наблюдаются лишь в небольшом диапазоне. Эмпирическое распределение остатков представлено на рисунке 19.

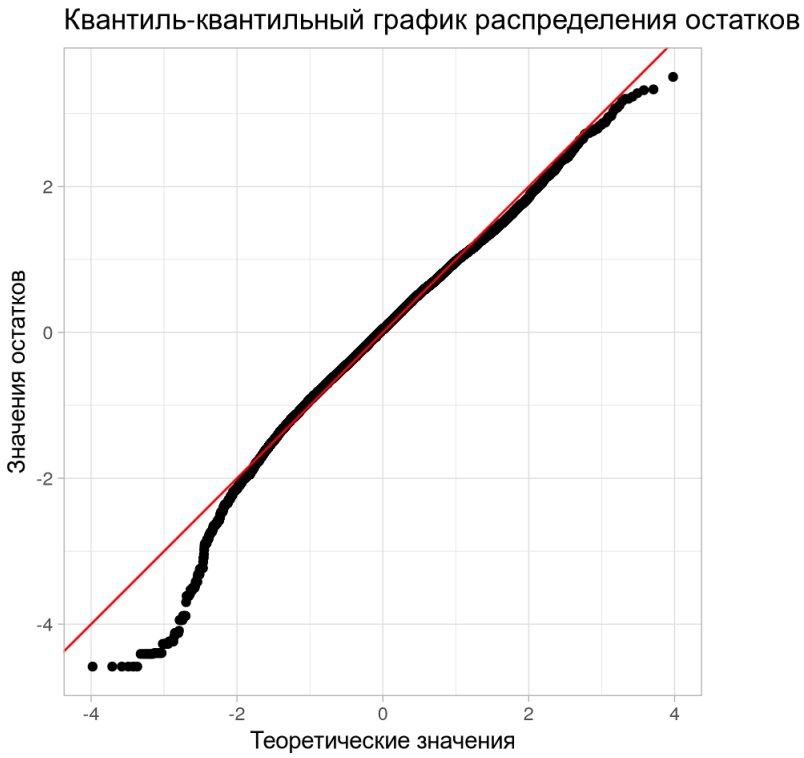


Рисунок 19 – Эмпирическое распределение остатков модели.

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

Таблица 4 – Результаты теста на эквивалентность штамма *E. coli* ATCC 25922 с *S. aureus* 209 P.

Тип штамма	$\lvert\delta\rvert$	$\mu_2 - \mu_1$	95 %-ДИ		p-значение		Эквивалент
			нижний	верхний	H-	H+	*E. coli* ATCC 25922
E. coli ATCC 25922	4,7	-14,58	-18,27	-10,88	0,999993	$0\times e^{+0}$	—
E. coli ATCC 25922	9,4	-14,58	-18,27	-10,88	0,995910	$0\times e^{+0}$	—

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* ATCC 6633 *E. coli* ATCC 25922 не демонстрирует эквивалентности при допустимой разнице 10 %, однако может быть признан эквивалентным при 20 % и проявляет более высокую чувствительность к исследуемым антибиотикам (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты теста на эквивалентность штамма *E. coli* АТСС 25922 с *B. subtilis* АТСС 6633.

Тип штамма	$\lvert\delta\rvert$	$\mu_2 - \mu_1$	95 %-ДИ		p-значение		Эквивалент
			нижний	верхний	H-	H+	*E. coli* АТСС 25922
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.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что статистическая оценка результатов определения антимикробной активности методом диффузии в агар существенно зависит от чувствительности конкретного тест-микроорганизма к антибиотику, что обусловливает невозможность прямого сравнения или эквивалентности данных между различными штаммами. Эта закономерность согласуется с фундаментальными различиями в клеточной организации, метаболизме и механизмах резистентности грамположительных и грамотрицательных бактерий [37, 50, 76], которые напрямую влияют на эффективность различных классов антибактериальных субстанций [52, 138].

В результате для некоторых групп антибиотиков отмечены особенности: цефалоспорины показывают от высокой (цефазолин натрия) до низкой (цефтазидима пентагидрат) активности, а аминогликозиды – среднюю (стрептомицина, амикацина и канамицина сульфаты). Результаты тестирования антибиотика ампициллина натрия указывают на начальную неэффективность при малых концентрациях. Что подтверждает результаты, полученные при статистической обработке и описанные в предыдущей главе о несхожей активности различных химических групп антибиотиков.

Таким образом несмотря на то, что в качестве тест-микроорганизмов ГФ РФ рекомендует *S. aureus* 209 P и *B. subtilis* АТСС 6633, которые являются грамположительными бактериями, данные показывают возможность использования грамотрицательных микроорганизмов, в частности штамм

E. coli ATCC 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 [33]. Установлено, что 14 из 17 протестированных антибиотиков характеризовались зонами задержки роста, которые соответствуют рекомендациям фармакопеи, несмотря на замену тест-штамма. В результате метод диффузии в агар с *E. coli* ATCC 25922 может быть использован для оценки антимикробной активности антибиотиков азитромицина дигидрата, амикацина сульфата, гентамицина сульфата, стрептомицина сульфата, ванкомицина гидрохлорида, доксициклина гидрохлорида, тетрациклина гидрохлорида, цефазолина натрия, цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефотаксима натрия, цефтазидима пентагидрата, цефтриаксона натрия, цефуроксима натрия и эритромицина.

3.3 Определение активности антибиотиков с использованием в качестве тест-объектов люминесцентных бактерий методом диффузии в агар

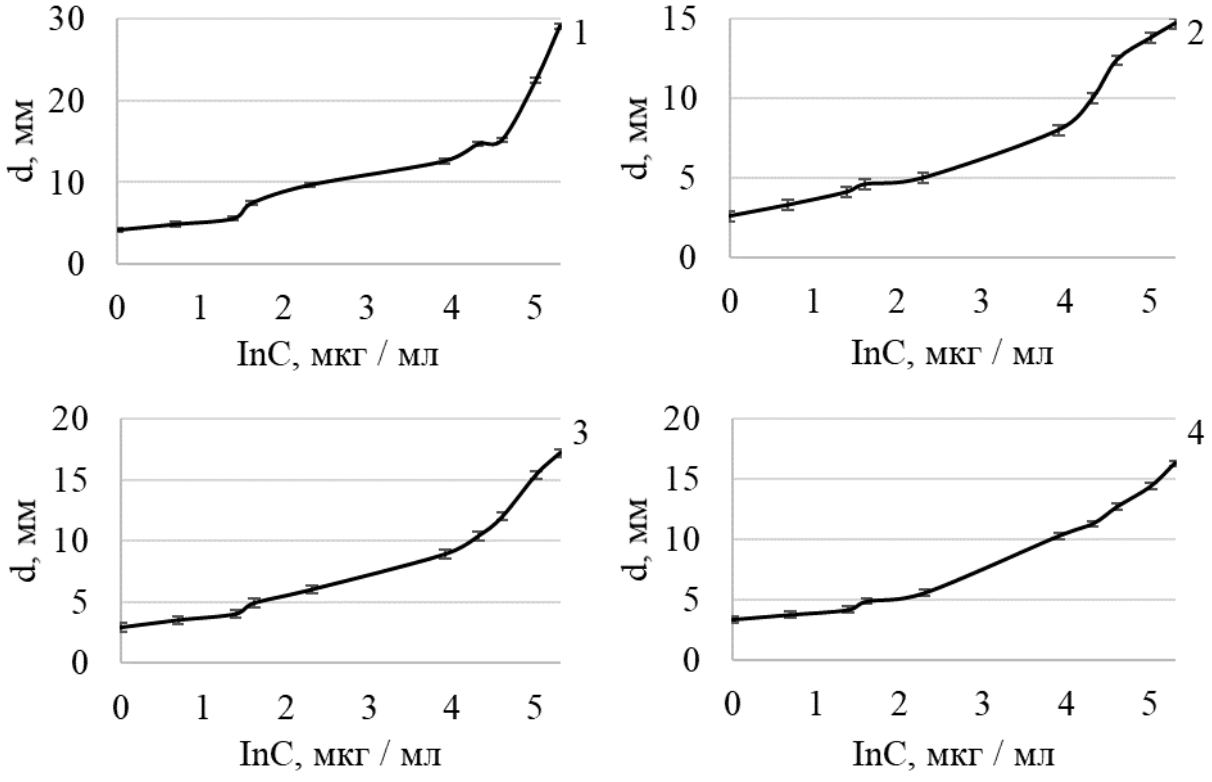
Как показано в разделах 3.1 и 3.2, проведённые экспериментальные исследования подтвердили принципиальную необходимость дифференцированного подбора патогенных микроорганизмов при разработке и валидации методики диффузии в агар для оценки антимикробной активности антибиотиков. Ключевым аспектом является установление тесной взаимосвязи между ответной реакцией бактериального штамма и концентрацией антибиотиков.

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

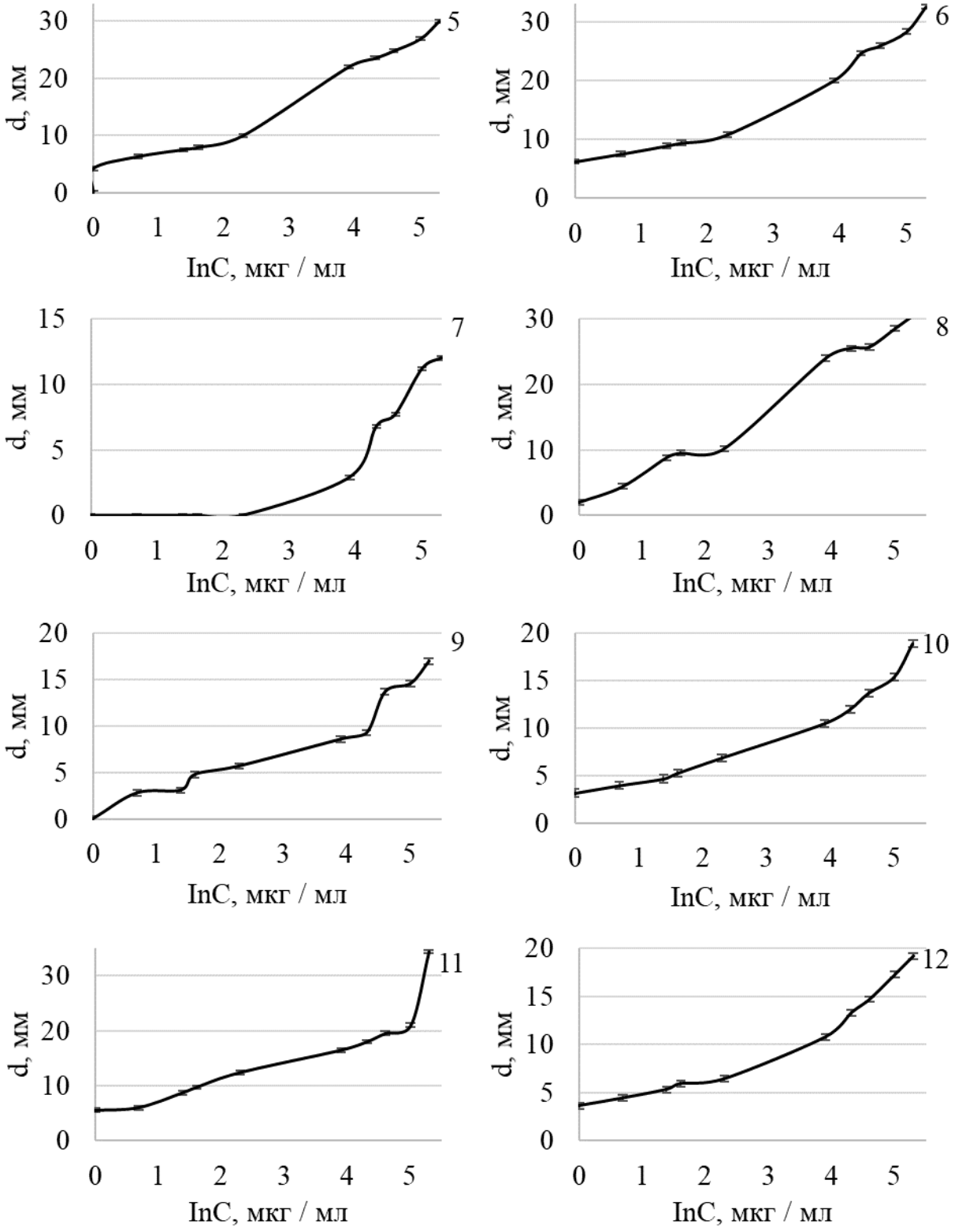
структуры к патогенным видам *E. coli* [48, 64, 193].].

Анализ позволит оценить применимость штамма для определения антимикробной активности антибиотиков, а также исследовать влияние антибактериальных субстанций на метаболизм бактерий, в частности, на процесс биолюминесценции [160]. Это создаёт основу для разработки новой методики, основанной на измерении интенсивности бактериальной биолюминесценции с помощью специализированных устройств, что обеспечит более точную и быструю оценку антимикробной активности препаратов [38].

Тестирование антимикробной активности фармацевтических субстанций антибиотиков по отношению к рекомбинантному тестовому штамму *E. coli* MG1655, содержащему плазмиду pXen7-lux, проводили в пределах концентраций от 1 до 200 мкг / мл. Для каждой концентрации антибиотиков выполнено 6 параллельных измерений. Для большинства антибиотиков получены зависимости диаметров зон ингибирования от роста. Полулогарифмические зависимости ингибирования роста *E. coli* MG1655 (xen`::lux) от концентраций антибиотиков представлены на рисунке 20.



Продолжение рисунка 20



Продолжение рисунка 20

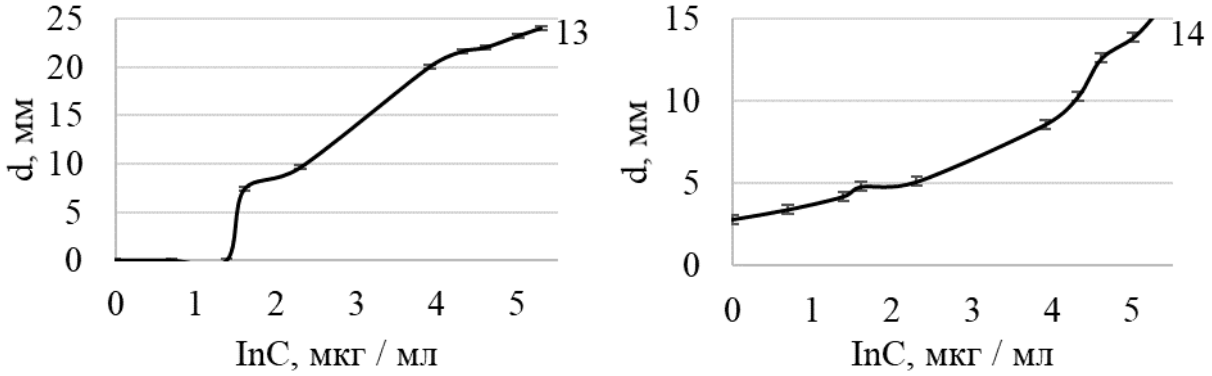


Рисунок 20 – Зависимости диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) от концентраций антибиотиков, где 1 – ампициллин натрия, 2 – доксициклина гидрохлорид, 3 – тетрациклина гидрохлорид, 4 – амикацина сульфат, 5 – гентамицина сульфат, 6 – стрептомицина сульфат, 7 – канамицина сульфат, 8 – цефепима дигидрохлорид моногидрат, 9 – цефотаксим натрия, 10 – цефтазидима пентагидрат, 11 – цефтриаксон натрия, 12 – цефуроксим натрия, 13 – азитромицина дигидрат, 14 – линкомицина гидрохлорид моногидрат.

Результаты исследования демонстрируют пригодность метода диффузии в агар с использованием *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) для определения ампициллина натрия в диапазоне концентраций от 1 до 200 мкг / мл. Метод характеризуется достаточной точностью, воспроизводимостью и чувствительностью. Показатели S^2 и S характеризуются низким разбросом значений вокруг среднего. ε не превышает 1,046 % во всех исследуемых точках, что подтверждает высокую точность и надежность полученных данных. Значения коэффициента $S_{\delta,\%}$ не превышают 3,1 %, что говорит о хорошей прецизионности метода.

Производные нафтацена также показали зоны ингибирования в широком диапазоне от 1 до 200 мкг / мл. Среднее значение зоны ингибирования для тетрациклина выше, чем для доксициклина, при сопоставимых концентрациях. Низкие значения S^2 и S для каждой концентрации антибиотиков указывают на высокую степень сходимости результатов измерений и хорошую воспроизводимость методики. В целом, значения S^2, S и ε остаются стабильными в исследуемом диапазоне концентраций для обоих антибиотиков, что говорит о

воспроизводимости и надежности данных. Средние значения коэффициентов $S_{\delta,\%}$ (5,5 % для доксициклина и 5,6 % для тетрациклина) также подтверждают этот вывод.

Анализ полученных данных амикацина, гентамицина и стрептомицина сульфатов в исследуемых концентрациях показал возможность определения антибиотиков во всем диапазоне. Однако для канамицина определение возможно только при концентрациях, начиная с 50 мкг / мл, что указывает на недостаточную чувствительность бактерий для определения низких концентраций данного антибиотика. При этом полученные данные (S^2, S, δ, Δx, ε) подтверждают высокую точность и воспроизводимость экспериментов. Коэффициент $S_{\delta,\%}$, характеризующий прецизионность метода, снижался с увеличением концентрации для всех аминогликозидов, что указывает на повышение точности метода при более высоких концентрациях. Средние значения коэффициентов $S_{\delta,\%}$ составили 4,2, 2,5, 3,9 и 3,1 для амикацина, гентамицина, канамицина и стрептомицина соответственно.

При анализе производных 7-АЦК обнаружили возможность определения для цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефотаксима натрия, цефтазидима пентагидрата, цефтриаксона натрия и цефуроксима натрия. Метод оказался неприменим для определения цефазолина натрия. В результате статистического анализа данные показали общую тенденцию к снижению прецизионности (увеличению коэффициента $S_{\delta,\%}$) при анализе низких концентраций цефалоспоринов, что указывает на необходимость улучшения метода для работы с низкими уровнями концентрации. Однако средние коэффициенты $S_{\delta,\%}$, равные 5,3, 5,7, 5,9, 3,2 и 4,7 %, указывают на высокую степень надежности полученных результатов.

Из макролидов только азитромицина дигидрат демонстрирует зависимость между концентрацией антибиотика и средним значением зоны ингибирования роста, начиная с $7{,}4 \pm 0{,}36$ мм при 5 мкг / мл. Наблюдается тенденция к увеличению зоны ингибирования с ростом концентрации, однако это увеличение не является строго линейным. Значения S^2 и S для каждой концентрации

указывают на высокую степень воспроизводимости и надежности полученных результатов. Показатели S^2 и S не превышали 0,109 и 0,330. Значения ε также достаточно малы и уменьшались с повышением концентраций (ε не превышала 0,808 %), что указывает на высокую точность измерений. Средний коэффициент $S_{\delta,\%}$ составил 1,8 %.

Линкомицина гидрохлорид моногидрат демонстрировал относительно плавный и умеренный рост зоны ингибирования с увеличением концентраций производного линкозамидов. При концентрации 1 мкг / мл среднее значение зоны ингибирования составляет $2,8 \pm 0,27$ мм, а при концентрации 200 мкг / мл – $15,4 \pm 0,34$ мм. Показатели S^2 (не более 0,126) и S (не более 0,354), аналогично большинству антибиотиков, свидетельствуют о хорошей сходимости результатов. Значения Δx (от 0,004 до 0,010) и ε (не более 0,869 %) также указывают на приемлемую точность получаемых данных. Коэффициент $S_{\delta,\%}$ составил 4,5 %.

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 [64]. Наименьшую антимикробную активность проявляли азитромицина дигидрат, канамицина сульфат и цефотаксим натрия, что может указывать на увеличенную устойчивость рекомбинантного штамма к этим антибиотикам.

Зоны ингибирования роста *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) в сравнении с патогенным штаммом *E. coli* ATCC 25922 продемонстрировали большую активность по отношению к рекомбинантному штамму антибиотиков амикацина сульфата, ампициллина натрия, гентамицина сульфата, линкомицина гидрохлорида моногидрата, стрептомицина сульфата и цефуроксима натрия. Азитромицина дигидрат, гентамицина сульфат и доксициклина гидрохлорид наиболее эффективно подавляли *S. aureus* 209 P, а гентамицина и канамицина

сульфаты – *B. subtilis* АТСС 6633, что подтвердило различное влияние субстанций на рост микроорганизмов, как и в предыдущем разделе.

Результаты теста эквивалентности продемонстрировали, что, аналогично патогенному тест-микроорганизму, рекомбинантный штамм *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) не является эквивалентом *S. aureus* 209 P (таблица 6), но статистически эквивалентен *B. subtilis* АТСС 6633.

Таблица 6 – Результаты теста эквивалентности рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) с *S. aureus* 209P.

Тип штамма	$\lvert\delta\rvert$	$\mu_2 - \mu_1$	95 %-ДИ		p-значение		Эквивалент *E. coli* MG1655 (pXen7-lux)
			Нижний	Верхний	H-	H+	
S. aureus 209P	4,7	-14,95	-19,81	-10,09	0,999879	$0\times e^{+0}$	—
S. aureus 209P	9,4	-14,95	-19.81	-10,09	0,986493	$0\times e^{+0}$	—

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.

Примечательно, что для рекомбинантного штамма эквивалентность с *B. subtilis* АТСС 6633 наблюдается уже при пороговом значении наименьшей значимой разницы – 10 % (таблица 7).

Таблица 7 – Результаты теста эквивалентности рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) с *B. subtilis* АТСС 6633.

Тип штамма	$\lvert\delta\rvert$	$\mu_2 - \mu_1$	95 %-ДИ		p-значение		Эквивалент *E. coli* MG1655 (pXen7-lux)
			нижний	Верхний	H-	H+	
B. subtilis АТСС 6633	4,7	2,14	-0,42	4,71	$8\times e^{-6}$	0,025414	эквивалент
B. subtilis АТСС 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.

Более того, рекомбинантный штамм *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) проявляет более высокую чувствительность к исследуемым антибиотикам по сравнению с

B. subtilis ATCC 6633. Это указывает на перспективность его использования в качестве модельной системы для определения антимикробной активности антибиотиков, что потенциально способно оптимизировать процессы анализа.

Тем не менее, применение рекомбинантного штамма в качестве универсальной модели для оценки антимикробной активности сопряжено с рядом ограничений. К ним относятся потенциально сниженная чувствительность к отдельным классам антибиотиков и различия в формировании зон ингибирования. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо минимизировать влияние данных факторов, которые могут приводить к искажению интерпретации [140].

Таким образом, 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. Это требует поиска тест-микроорганизмов, обладающих большей чувствительностью и устойчивостью к внешним факторам, для разработки надежной методики измерения интенсивности люминесценции.

3.4 Определение активности антибиотиков с использованием люминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 методом диффузии в агар

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 [124]. Кроме того, штамм характеризуется высокой устойчивостью к колебаниям температуры, pH и другим факторам среды, что обеспечивает надёжность экспериментальных данных [56].

Для разработки надежной и воспроизводимой методики необходимо учитывать не только характеристики нового штамма *P. leiognathi* Sh1, описанные

в литературном обзоре настоящей диссертационной работы, но и его отклик на воздействие различных факторов. В связи с этим важным этапом является анализ взаимодействия данного штамма с различными субстанциями методом диффузии в агар. Этот этап позволит оценить чувствительность *P. leiognathi* Sh1 к антибиотикам и установить тот диапазон концентраций, который вызывает зоны ингибирования роста природного люминесцентного штамма.

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 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

В связи с тем, что для культивирования природного биолюминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 требуется соленая среда [57, 81], проведена оценка влияния натрия хлорида (NaCl) на стабильность свечения бактерий, измеряемую в относительных световых единицах (RLU). Результаты представлены на рисунке 21.

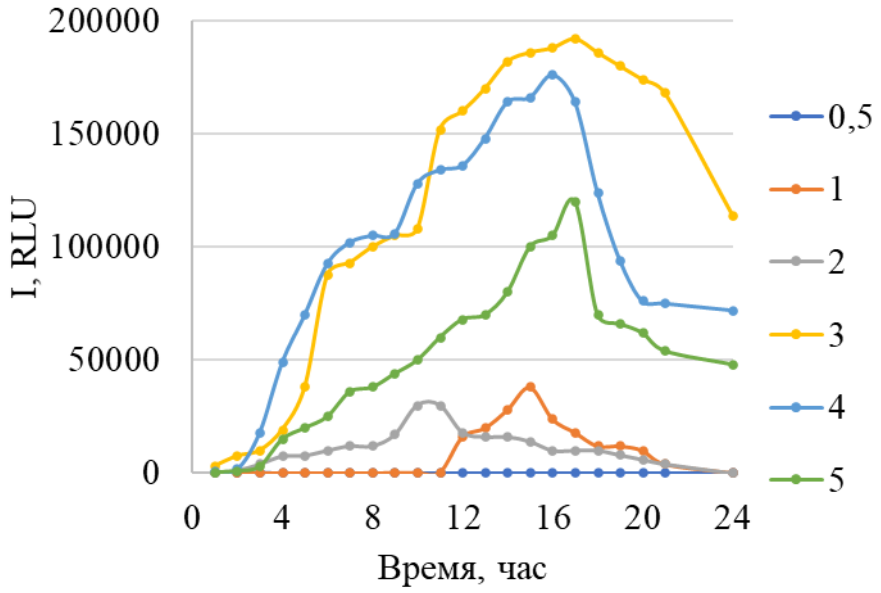


Рисунок 21 – Зависимость влияния различных концентраций натрия хлорида на люминесценцию штамма *P. leiognathi* Sh1 в течение 24 часов, где 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % и 5 % – концентрации соли в среде с бактериями.

В результате оптимальной для максимальной люминесценции штамма *P. leiognathi* Sh1 признана 3 % концентрация NaCl. Установлено, что в интервале 16 – 18 ч достигалась максимальная интенсивность свечения от 186 000 до 192 000 RLU.

Результаты оценки оптической плотности (D) при длине волны 620 нм использовали для количественной характеристики роста клеток культуры *P. leiognathi* Sh1. Установлено, что в исследованном диапазоне концентраций натрия хлорида не наблюдается статистически значимых изменений показателя D. Значения оптической плотности находились в узком диапазоне 0,822 – 0,884, что отражает стабильный уровень клеток в условиях варьирования концентрации NaCl. Зависимость влияния различных концентраций натрия хлорида на оптическую плотность культуры *P. leiognathi* Sh1 представлена на рисунке 22.

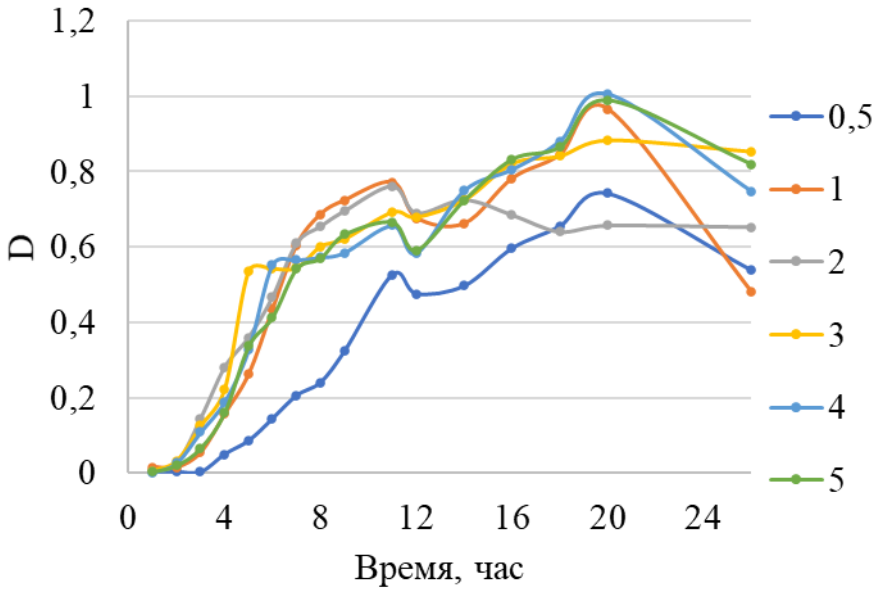


Рисунок 22 – Зависимость влияния различных концентраций натрия хлорида на оптическую плотность штамма *P. leiognathi* Sh1 в течение 24 часов, где 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % и 5 % – концентрации соли в среде с бактериями.

При подборе условий культивирования штамма *P. leiognathi* Sh1 за основу взяты данные, опубликованные в предшествующих работах [124-126]. В соответствии с ними, для обеспечения роста и поддержания жизнеспособности бактерий использовалась питательная среда следующего состава (на 1 литр дистиллированной воды): натрия хлорид – 30,0 г; калий фосфорнокислый

двузамещенный – 15,0 г; пептон – 5,0 г; дрожжевой экстракт – 5,0 г; аммоний фосфорнокислый двузамещенный – 0,5 г; кальция карбонат – 0,2 г; магния сульфат – 0,1 г; глицерин – 3,0 мл. Помимо указанной рецептуры, в твердые и жидкие питательные среды добавляли содержание хлорида натрия 3 %.

Дополнительно изучена зависимость свечения штамма при температурах культивирования от 15 до 37 ^{0}C. В ходе сравнительного анализа измерения интенсивности биолюминесценции установлено, что оптимальной температурой культивирования для проведения анализа является 25 ^{0}C (рисунок 23).

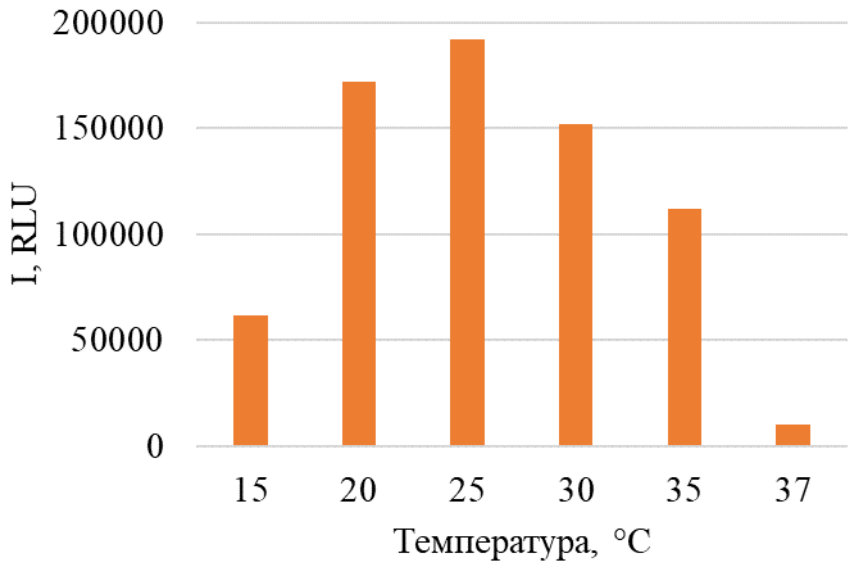


Рисунок 23 – Влияния температур на люминесценцию *P. leiognathi* Sh1.

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 [47, 88, 240].

Кроме того, методика диффузии в агар предполагает использование большого количества растворителей для антибиотиков [33]. 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).

Благодаря своей сильной растворяющей способности для разработки

методики биолюминесцентного анализа выбран растворитель ДМСО. Учитывая высокую чувствительность *P. leiognathi* Sh1 к компонентам внешней среды, оценена его токсичность (рисунок 24).

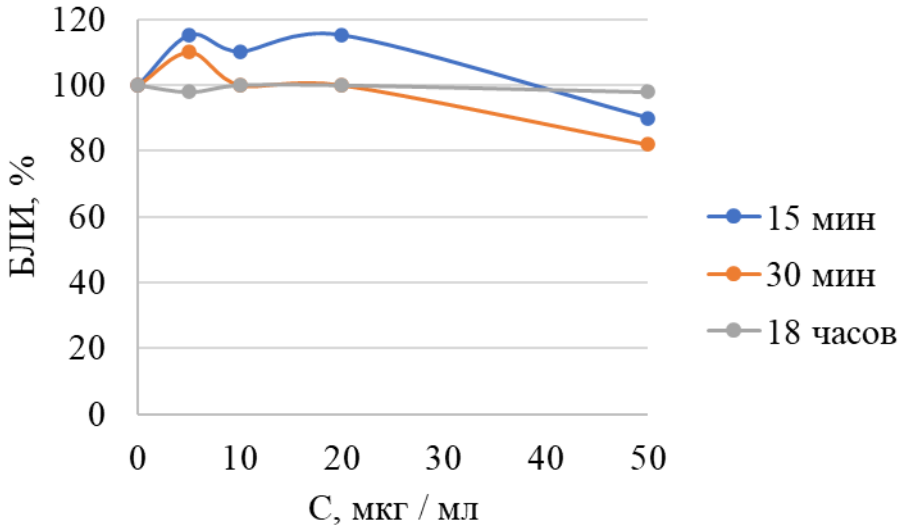


Рисунок 24 – Зависимости влияния ДМСО на рост *P. leiognathi* Sh1.

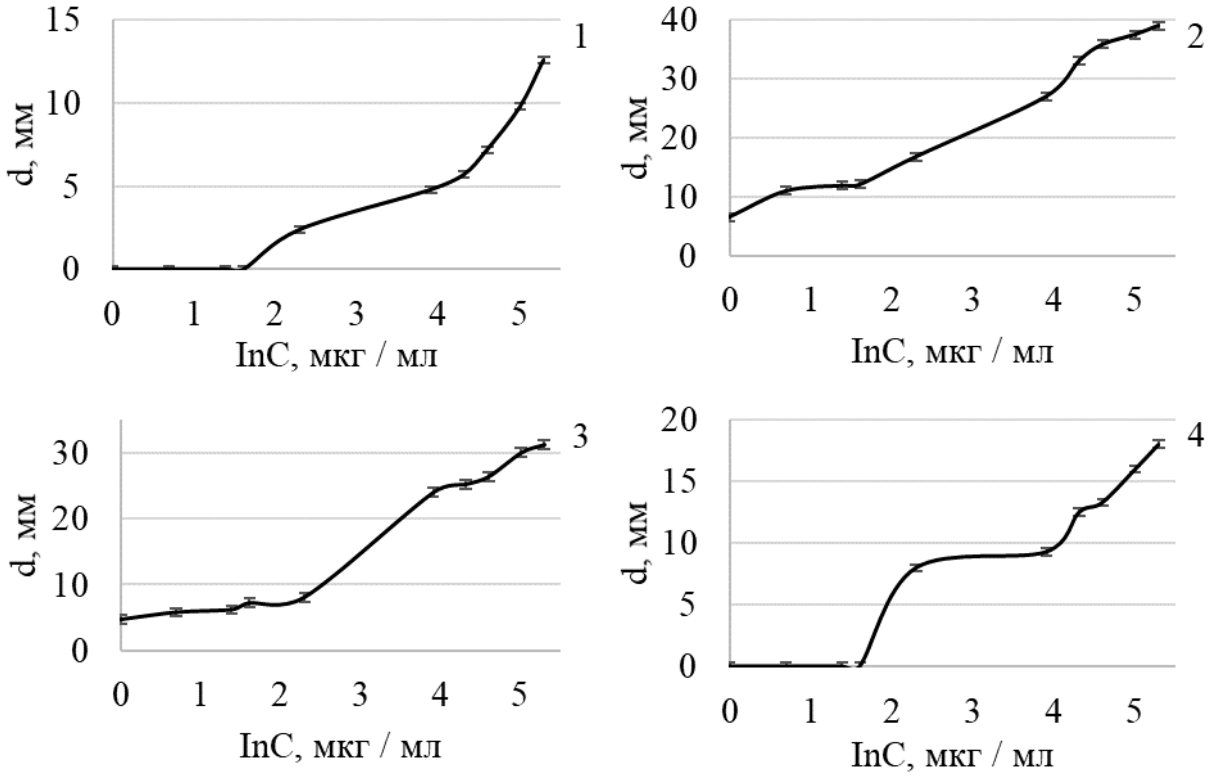
В ходе анализа влияния ДМСО на природный люминесцентный штамм *P. leiognathi* Sh1 не установлено статистически значимого угнетающего действия на рост бактериальной культуры и интенсивность свечения в диапазоне концентраций от 10 до 20 мкг / мл.

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}C) с временем выдерживания 16 – 18 ч, используемые растворители (вода очищенная, ДМСО).

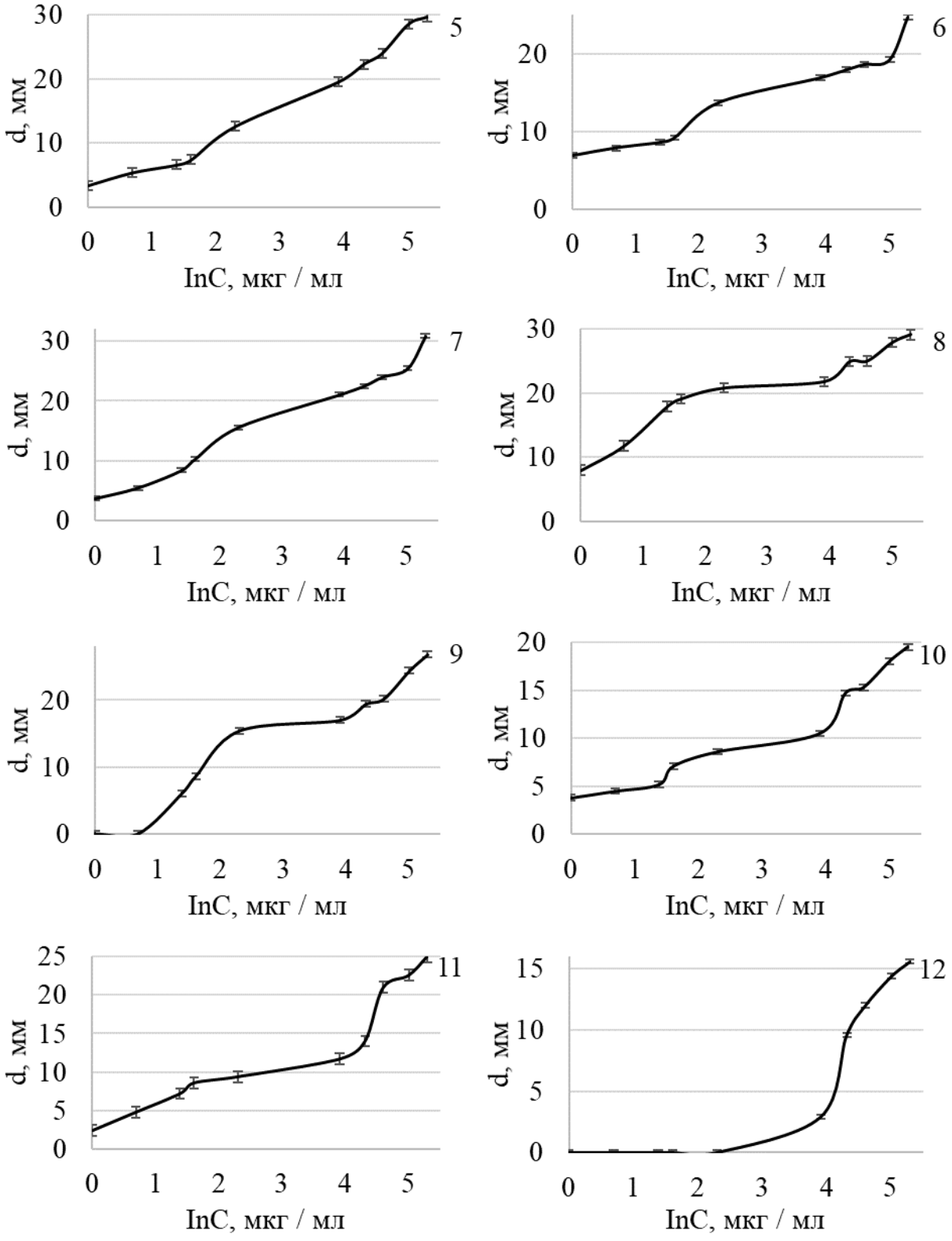
На заключительном этапе проведена оценка антимикробной активности ряда антибиотиков методом диффузии в агар с использованием предложенной модифицированной тест-системы и учетом изменения условий тестирования. Антимикробную активность исследуемых антибиотиков в отношении штамма *P. leiognathi* Sh1 определяли методом диффузии в агар с использованием диапазона концентраций от 1 до 200 мкг / мл. Выбор данного диапазона обусловлен результатами, полученными в предшествующих разделах (3.1, 3.2, 3.3), где изучена чувствительность фармакопейных тест-штаммов,

грамотрицательного штамма *E. coli* ATCC 25922, рекомбинантных люминесцентных бактерий *E. coli* MG1655 (xen7::lux) к тем же антибиотикам и установлена зависимость диаметров зон ингибирования роста от концентраций субстанций. Анализ продемонстрировал, что для большинства антимикробных агентов эффект проявлялся в указанном интервале концентраций [99, 102-104]. Применение единого диапазона для оценки нового штамма *P. leiognathi* Sh1 обеспечивает методологическую сопоставимость, позволяет провести сравнительный анализ его чувствительности и установить характерные для него рабочие концентрации, ингибирующие рост данного люминесцентного микроорганизма.

В результате определения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием биолюминесцентных микроорганизмов *P. leiognathi* Sh1 установили, что все субстанции антибиотиков ингибировали рост микроорганизмов в испытуемых концентрациях. Полулогарифмические зависимости представлены на рисунке 25.



Продолжение рисунка 25



Продолжение рисунка 25

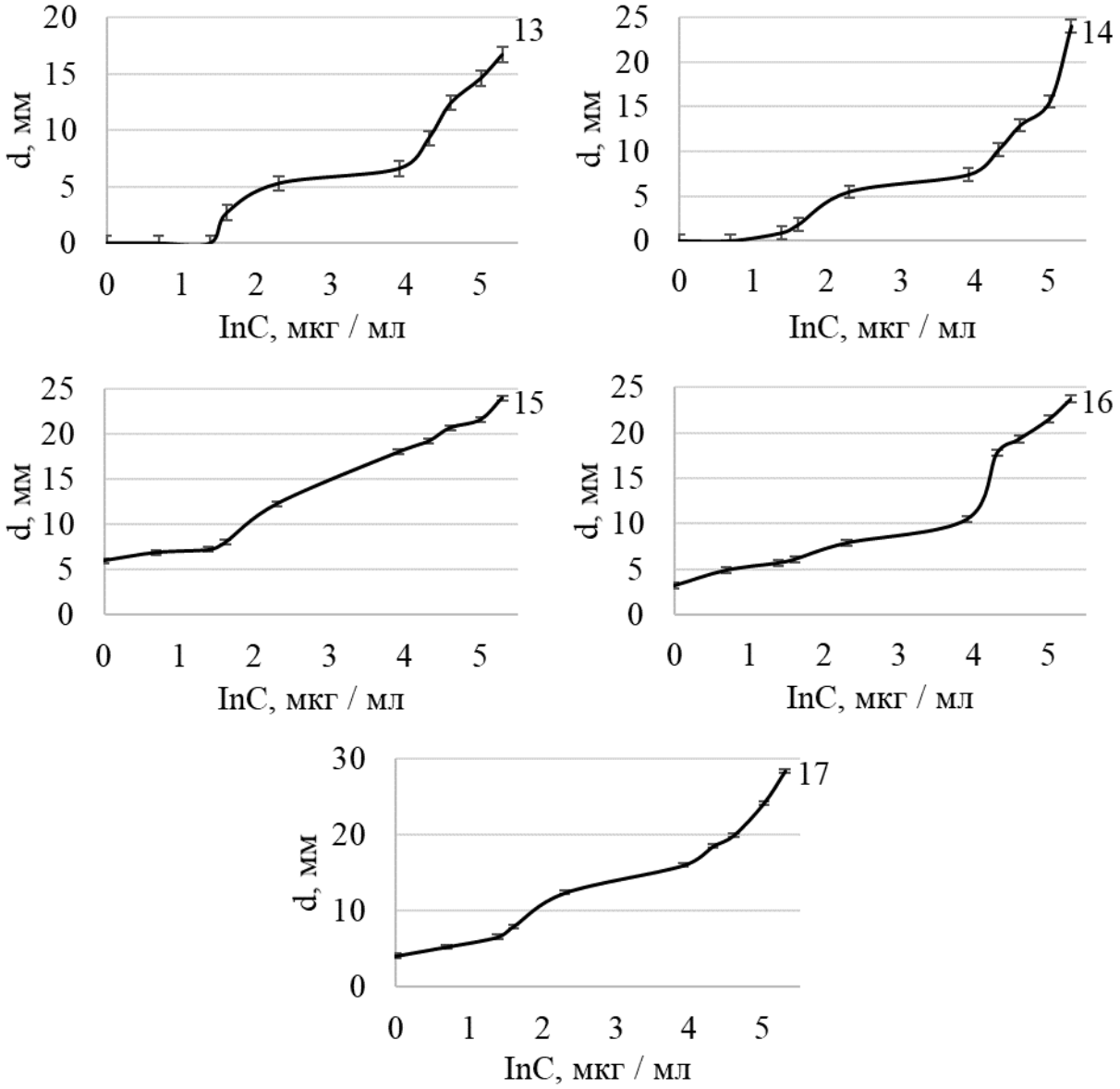


Рисунок 25 – Зависимости диаметров зон ингибирования тест-микроорганизма *P. leiognathi* Sh1 от концентраций антибиотиков, где 1 – ампициллин натрия, 2 – доксициклина гидрохлорид, 3 – тетрациклина гидрохлорид, 4 – цефазолин натрия, 5 – цефепима дигидрохлорид моногидрат, 6 – цефотаксим натрия, 7 – цефтазидима пентагидрат, 8 – цефтриаксон натрия, 9 – цефуроксим натрия, 10 – амикацина сульфат, 11 – гентамицина сульфат, 12 – канамицина сульфат, 13 – стрептомицина сульфат, 14 – азитромицина дигидрат, 15 – эритромицин, 16 – ванкомицина гидрохлорид, 17 – линкомицина гидрохлорид моногидрат.

В результате ампициллин натрия вызывал задержку роста бактерий на

2,4 ± 0,30 мм при 10 мкг / мл и с увеличением концентрации антибиотика наблюдается увеличение среднего диаметра зоны ингибирования до 12,6 ± 0,36 мм.

Данные характеризуются относительно низкой вариабельностью: значения S^2 (не более 0,241) и S (0,491) остаются невысокими, что указывает на высокую воспроизводимость результатов экспериментов. ε (не более 0,013 %) и коэффициент $S_{\delta,\%}$ (5,4 %) также демонстрируют стабильность результатов, особенно при высоких концентрациях ампициллина.

Производные нафтацена оказывали влияние на рост *P. leiognathi* Sh1 при минимальной концентрации вещества, равной 1 мкг / мл, с диаметром 6,6 ± 0,40 и 4,7 ± 0,90 мм соответственно для доксициклина и тетрациклина гидрохлоридов [100, 105, 106].

В целом доксициклин оказывает более выраженное ингибирующее действие на рост *P. leiognathi* Sh1 по сравнению с тетрациклином, что проявляется в большем диаметре зоны ингибирования при одинаковых концентрациях антибиотиков. Для доксициклина наибольшие значения S^2 и S при 200 мкг / мл, где S^2 = 1,152 и S = 1,073, а для тетрациклина при 50 мкг / мл – S^2 = 1,121 и S = 1,059. Значения ε варьировали в диапазонах 0,732 – 2,630 % и 0,440 – 2,594 % соответственно для доксициклина и тетрациклина. Для обоих антибиотиков наблюдается тенденция к снижению коэффициента $S_{\delta,\%}$ с увеличением концентрации, что говорит о повышении точности определения зон ингибирования при высоких концентрациях. Средние коэффициенты $S_{\delta,\%}$ составили 3,6 и 6,4 %.

Из производных 7-АЦК при минимальной концентрации вещества 1 мкг / мл влияние на рост оказывали цефепима дигидрохлорид моногидрат, цефотаксим натрия, цефтазидима пентагидрат и цефтриаксон натрия, где диаметры зон ингибирования для этих антибиотиков составили 3,4 ± 0,59, 6,9 ± 0,27, 3,7 ± 0,31 и 8 ± 0,65 мм соответственно [100, 105, 106].

Цефазолин натрия показал зону ингибирования 8 ± 0,68 мм при концентрации 10 мкг / мл, в то время как цефуроксим натрия продемонстрировал

ингибирование роста бактерий с минимальной ингибирующей концентрацией 4 мкг / мл и диаметром зоны ингибирования 6 ± 0,72 мм.

Основные статистические показатели: для цефтриаксона при 2 мкг / мл – S^2 = 2,069 и S = 1,438, а при 200 мкг / мл – S^2 = 1,352 и S = 1,163, для цефепима и цефтриаксона значения ε находились в диапазонах 1,214 – 2,412 и 0,925 – 3,524 % соответственно. Значения коэффициентов $S_{\delta,\%}$ для всех цефалоспоринов небольшие, что указывает на хорошую воспроизводимость результатов. Значения $S_{\delta,\%}$ составили 4,2, 6,9, 2,5, 3,1, 4,3 и 4,7 %.

Для амикацина и гентамицина сульфатов минимальная концентрация вещества, вызывающая задержку роста бактерий, составила 1 мкг / мл, а диаметры зон ингибирования для этих антибиотиков составили 3,8 ± 0,31 и 2,4 ± 1,49 мм соответственно [100, 105, 106].

Статистические параметры не превышали S^2 = 0,208 и S = 0,456 для амикацина и S^2 = 1,849 и S = 1,360 для гентамицина. Значения ε для антибиотиков находились в диапазонах 0,440 – 1,118 % и 0,434 – 3,332 % соответственно, что указывает на высокую точность и низкую вариабельность полученных данных. Амикацин демонстрирует наименьшие значения коэффициента $S_{\delta,\%}$ (3,4 %) по сравнению с другими антибиотиками, что указывает на более высокую стабильность и воспроизводимость результатов для этого антибиотика.

Стрептомицина сульфат вызывал задержку роста бактерий на 2,7 ± 1,44 мм при 5 мкг / мл в пробе, а канамицина сульфат начинает проявлять заметную активность только при высоких концентрациях – 2,9 ± 0,50 мм при 50 мкг / мл [105, 106].

Гентамицин и стрептомицин характеризуются более высоким коэффициентом $S_{\delta,\%}$ (11,0 и 14,3 %) по сравнению с амикацином и канамицином (5,5 %), что может указывать на большую изменчивость результатов для этих антибиотиков.

Различные группы макролидов вызывали задержку роста бактерий при 1 мкг / мл с диаметром равным 6 ± 0,23 мм и при 4 мкг / мл – 0,9 ± 1,03 мм соответственно для эритромицина и азитромицина дигидрата. С увеличением

концентрации антимикробная активность обоих антибиотиков возрастает, что проявляется в увеличении диаметра зоны ингибирования. При этом при 200 мкг / мл азитромицин образовывал зоны, равные 24 ± 0,99 мм, что сопоставимо с антибиотиками, показавшими высокую активность к *P. leiognathi* Sh1.

Данные по эритромицину характеризуются низкой вариабельностью, что подтверждается низкими показателями S^2 (не более 0,201) и S (0,449) во всем диапазоне концентраций. Азитромицин характеризуется более высокими показателями при низких концентрациях. Для него наибольшие значения S^2 и S при 10 мкг / мл, где S^2 = 2,492 и S = 1,579. Коэффициент $S_{\delta,\%}$ азитромицина выше при низких концентрациях (от 4 до 10 мкг / мл), в то время как при более высоких концентрациях он снижается до 9,5 %. Несмотря на то, что коэффициент $S_{\delta,\%}$ азитромицина выше, чем у эритромицина (2,3 %), он все равно демонстрирует достаточную стабильность и воспроизводимость результатов.

Для ванкомицина гидрохлорида минимальная концентрация вещества, вызывающая задержку роста бактерий, составила 1 мкг / мл, диаметр зоны ингибирования – 3,2 ± 0,34 мм.

Сопоставимые результаты показал линкозамид – линкомицин, где статистические показатели S^2, S и ε во всем исследованном диапазоне не превышали 1. Коэффициент $S_{\delta,\%}$ составил 2,4 %.

Таким образом, 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. В результате сопоставления данных с рекомбинантным штаммом выявлено, что амикацина сульфат, доксициклина гидрохлорид, канамицина сульфат, линкомицина гидрохлорид моногидрат, тетрациклина гидрохлорид, цефтазидима пентагидрат и цефтриаксон натрия образовывали зоны задержки роста при более

низких концентрациях, а также большие в диаметре зоны, в сравнении с рекомбинантным штаммом.

Проведенный статистический анализ эквивалентности продемонстрировал, что природный штамм *P. leiognathi* Sh1 не может быть признан эквивалентом эталонного штамма *S. aureus* 209 P в отношении чувствительности к исследуемым антибиотикам. Как видно из данных таблицы 8, разность средних значений ($\mu_2 - \mu_1$) составила -10,57, что указывает на статистически значимую (p-значение для гипотезы эквивалентности H+ < 0,001) более низкую чувствительность штамма Sh1 по сравнению с эталоном. Данный вывод остается справедливым как для минимальной значимой разницы ($|\delta|$ = 4,7), так и при ее двукратном увеличении ($|\delta|$ = 9,4), что подтверждается доверительными интервалами, полностью лежащими в отрицательной области.

Таблица 8 – Результаты теста эквивалентности природного штамма *P. leiognathi* Sh1 с *S. aureus* 209P.

Тип штамма	$\|\delta\|$	$\mu_2 - \mu_1$	95 %-ДИ		p-значение		Эквивалент
			нижний	верхний	H-	H+	*P. leiognathi* Sh1
S. aureus 209P	4,7	-10,57	-16,15	-5,00	0,980071	$5\times e^{-6}$	—
S. aureus 209P	9,4	-10,57	-16,15	-5,00	0,666562	$0\times e^{+0}$	—

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

В то же время в отношении другого эталонного микроорганизма, *B. subtilis* ATCC 6633, штамм *P. leiognathi* Sh1 показал иные результаты (таблица 9). При уровне наименьшей значимой разницы в 9,4 установлена статистическая эквивалентность двух штаммов. Положительное значение разности средних ($\mu_2 - \mu_1$ = 6,52) свидетельствует о более высокой чувствительности штамма Sh1 к действию антибиотиков. Важно отметить, что эквивалентность соблюдается лишь при определенном пороге $|\delta|$, что указывает на необходимость строгого определения этого критерия при планировании подобных сравнений.

Таблица 9 – Результаты теста эквивалентности природного штамма *P. leiognathi* Sh1 с *B. subtilis* ATCC 6633.

Тип штамма	$\lvert\delta\rvert$	$\mu_2 - \mu_1$	95 %-ДИ		p-значение		Эквивалент
			Нижний	верхний	H-	H+	*P. leiognathi* Sh1
B. subtilis ATCC 6633	4,7	6,52	3,62	9,42	$0\times e^{+0}$	0,896855	—
B. subtilis ATCC 6633	9,4	6,52	3,62	9,42	$0\times e^{+0}$	0,025906	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, природный люминесцирующий штамм *P. leiognathi* Sh1 признан наиболее перспективным тест-объектом для разработки методики определения антимикробной активности антибиотиков по измерению интенсивности люминесценции ввиду следующих преимуществ:

1) Высокая чувствительность. Уже при концентрации 1 мкг / мл зоны задержки роста тест-штамма выявлены для амикацина сульфата, ванкомицина гидрохлорида, гентамицина сульфата, доксициклина гидрохлорида, линкомицина гидрохлорида моногидрата, тетрациклина гидрохлорида, цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефотаксима натрия, цефтазидима пентагидрата, цефтриаксона натрия и эритромицина.

2) Возможность тестирования субстанций в более низких концентрациях, чем с использованием других тест-микроорганизмов. В то время как антибиотики подавляли рост природных бактерий *P. leiognathi* Sh1 при концентрациях от 1 до 10 мкг / мл, для рекомбинантного штамма зоны ингибирования формировались только при более высоких концентрациях – от 50 до 200 мкг / мл.

3) Визуализация эффекта. Свечение бактериальных клеток в абсолютной темноте даёт возможность зафиксировать четкое формирование зон ингибирования, которое позволяет легко оценить активность субстанции.

4) Хорошая воспроизводимость результатов. Анализ с применением *P. leiognathi* Sh1 показал низкие показатели S, S^2 – не превышают 1 и малое

значение ε – менее 1 % для большинства антибиотиков.

5) Сокращение времени выращивания культуры микроорганизмов. Время инкубации природного люминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1, составляющее 16 – 18 часов при температуре 25 ^{0}C, что от 2-х до 8-ми часов меньше, чем для тест-микроорганизмов, рекомендованных Государственной Фармакопеей РФ XIV-го издания. Например, для *S. aureus* 209 P необходимо инкубировать 18 – 20 часов при 36 ^{0}C, после чего следует выдержка в течение 24 часов при комнатной температуре. Инкубация *B. subtilis* ATCC 6633 также требует 18 – 20 часов при 36 ^{0}C.

Таким образом, полученные результаты подтверждают пригодность использования природных бактерий *P. leiognathi* Sh1 для разработки методики биолюминесцентного анализа определения антимикробной активности антибиотиков.

3.4.1 Хроматографическая оценка стабильности β-лактамных антибиотиков при различных температурных режимах

Согласно данным научной литературы, антибиотики различных классов, и в особенности β-лактамные производные, подвержены гидролизу [9, 240]. В связи с этим необходимо учитывать, что условия проведения метода диффузии в агар, а именно длительная инкубация при температуре 37 ^{0}C в течение 24 часов, могут оказывать влияние на химическую стабильность самих антимикробных субстанций, а также на их антимикробную активность, которая напрямую связана с сохранностью активной структуры молекулы – например, целостности β-лактамного цикла. Для подтверждения гипотезы, что 25 ^{0}C является оптимальной температурой для проведения анализа антибиотиков, проведен анализ растворов ампициллина натрия 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.

По результатам хроматографического анализа свежеприготовленного раствора ампициллина натрия (концентрация 1 мкг / мл) детектировано четыре

пика (рисунок 26).

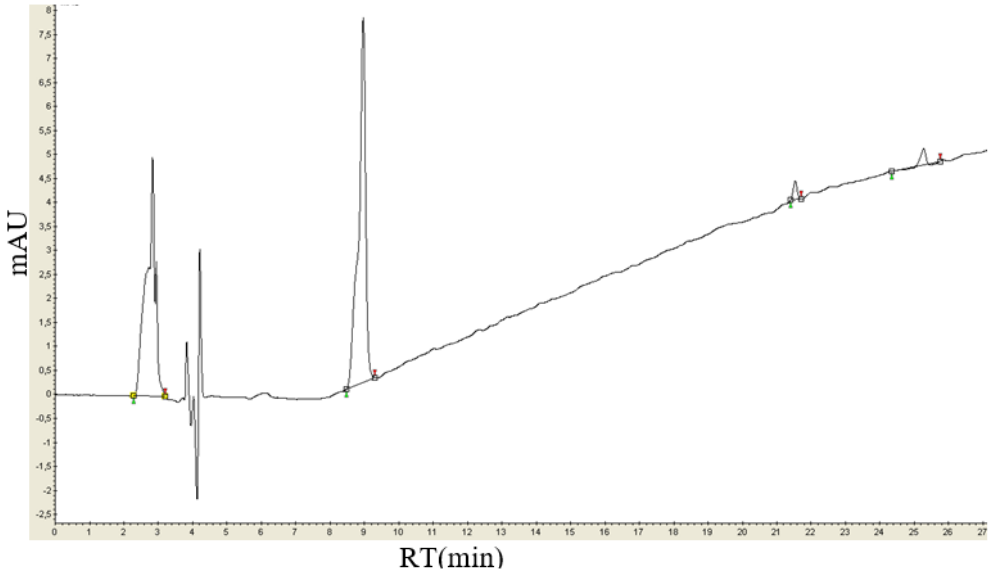


Рисунок 26 – Хроматограмма свежеприготовленного раствора ампициллина натрия.

Два основных пика имели времена удерживания 2,29 мин (43,84 % от общей площади, что соответствует 1,5 mAU / мин) и 8,47 мин (53,39 % от общей площади, что соответствует 1,8 mAU / мин). Дополнительно были зарегистрированы два минорных пика при 21,40 мин (1,48 %) и 24,34 мин (1,29 %). Суммарная площадь всех пиков составила 3,3 mAU / мин.

После инкубации раствора ампициллина натрия в течение 24 часов при 37 ^{0}C наблюдалась выраженная деградация антибиотика, представленная на рисунке 27.

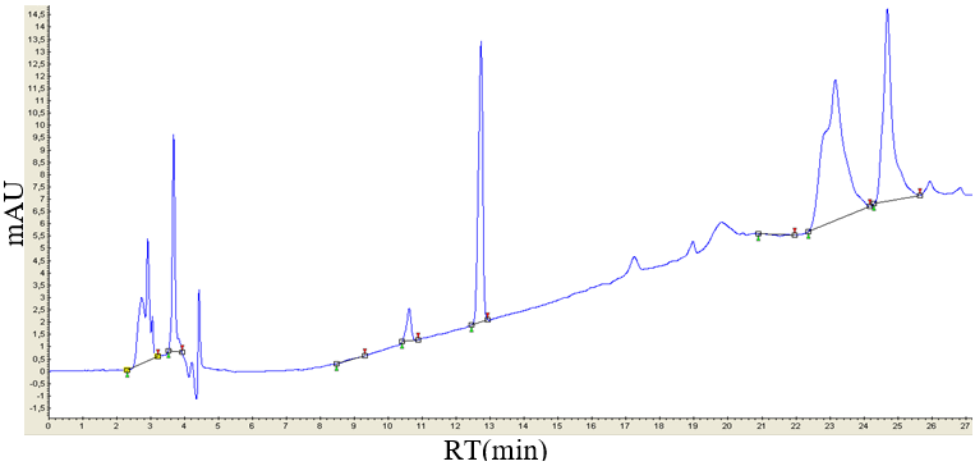


Рисунок 27 – Хроматограмма ампициллина натрия после 24-х часового выдерживания раствора при 37 ^{0}C.

Основные пики (2,3 и 12,45 мин) снизились до 11,48 и 0,08 %, что на 32,36 и 53,31 % меньше по сравнению со свежеприготовленным раствором. При этом появились новые, значительные пики продуктов деструкции с временем удерживания 12,45, 22,36 и 24,31 мин и площадью 16,19, 38,07 и 24,05 %. Суммарная площадь пиков возросла до 10,4 mAU / мин, что свидетельствует об активном протекании процессов гидролиза и накоплении продуктов распада ампициллина.

В растворе, хранившемся в течение 18 часов при 25 ^{0}C, деградация ампициллина натрия менее выражена, чем при 37 ^{0}C, но также имела место. На рисунке 28 представлена хроматограмма ампициллина натрия после 18-ти часового выдерживания раствора при 25 ^{0}C.

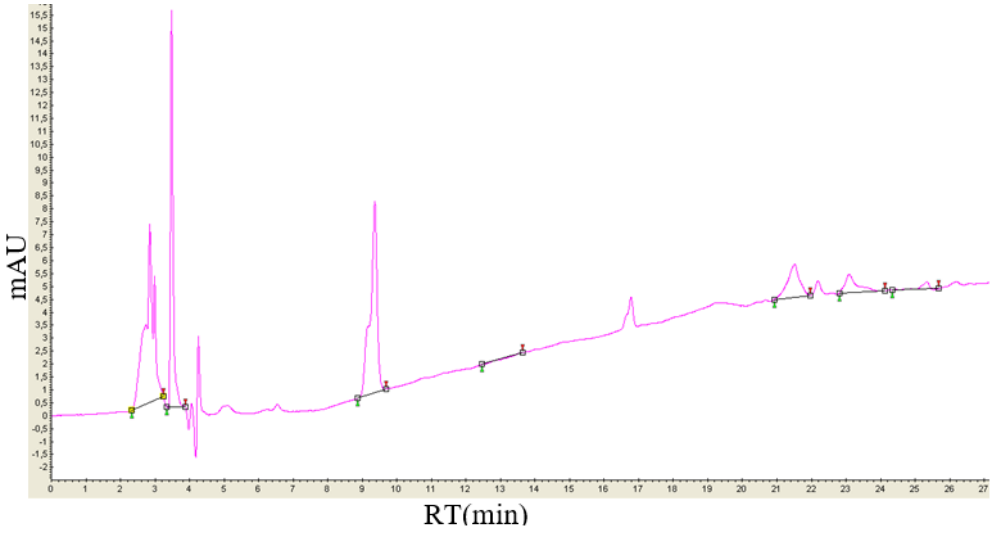


Рисунок 28 – Хроматограмма ампициллина натрия после 18-ти часового выдерживания раствора при 25 ^{0}C.

Основные пики при 2,32 и 8,87 мин составили 33,36 и 29,07 % от общей площади. При этом, в отличие от свежеприготовленного образца, пик с временем удерживания около 3,34 мин детектировался и составил 22,86 %, что указывает на иной профиль деградации.

Таким образом, результаты ВЭЖХ-анализа наглядно демонстрируют, что повышение температуры до 37 ^{0}C и длительная инкубация (24 часа) приводят к значительному гидролизу ампициллина: содержание основного вещества снижается более 35 % площади основного пика и сопровождается образованием дополнительных продуктов деструкции. При комнатной температуре (25 ^{0}C,

18 часов) потери основного вещества составляют лишь около 5%.

На хроматограмме свежеприготовленного раствора цефотаксима натрия (концентрация 5 мкг / мл) детектировалось множество пиков, что характерно для данного антибиотика, склонного к частичной деградации даже в исходном состоянии. Хроматограмма свежеприготовленного раствора цефотаксима натрия представлена на рисунке 29.

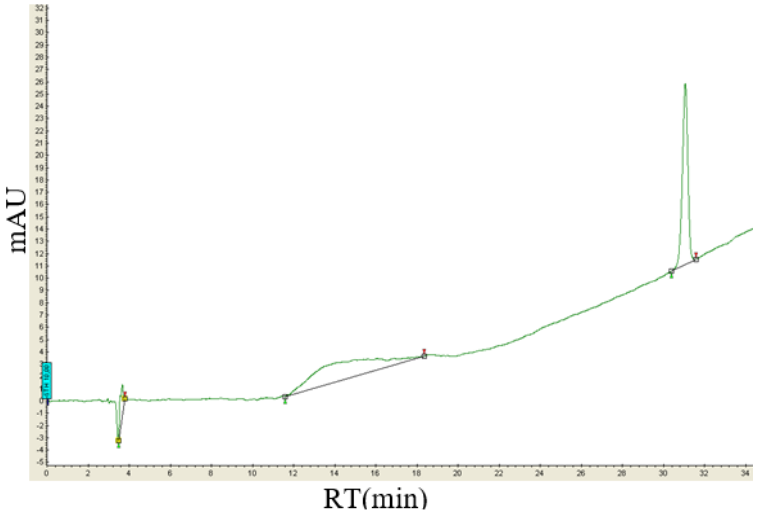


Рисунок 29 – Хроматограмма свежеприготовленного раствора цефотаксима натрия.

Основной пик с временем удерживания 31,05 мин составлял 25,88 % от общей площади (4,8 mAU / мин) при высоте 14,8 mAU. Среди значимых пиков также детектировались пики при 13,95 мин (14,12 %, 2,6 mAU / мин) и ряд минорных пиков в диапазоне 14,24 – 15,49 мин с суммарной долей около 8,3 %. Общая площадь всех пиков составила 18,5 mAU / мин.

После инкубации в течение 24 часов при 37 ^{0}C наблюдалась значительная деградация цефотаксима натрия с перераспределением профиля примесей (рисунок 30).

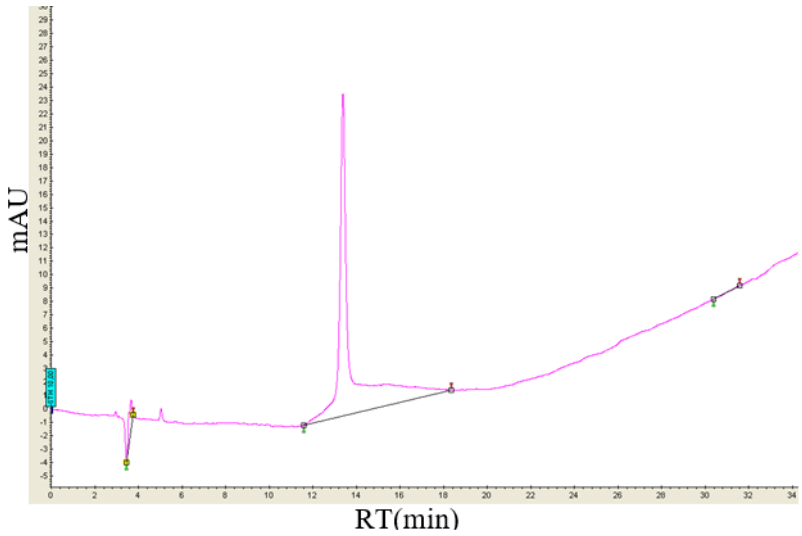


Рисунок 30 – Хроматограмма цефотаксима натрия после 24-х часового выдерживания раствора при 37 ^{0}C.

Появился новый пик при 3,28 мин (4,39 %, 1,0 mAU / мин), отсутствовавший в свежем растворе. Пик при 13,38 мин увеличился до 30,34 % (7,0 mAU / мин) по сравнению с 14,12 % в свежем растворе, что свидетельствует о накоплении продуктов распада. Основной пик, соответствующий свежеприготовленному цефотаксиму (в свежем растворе – 31,05 мин), в образце после 37 ^{0}C не детектировался. Общая площадь пиков возросла до 23,2 mAU / мин, что подтверждает активный гидролиз антибиотика и образование множества соединений с различной полярностью.

Рисунок 31 демонстрирует, что при инкубации в течение 24 часов при 25 ^{0}C деградация цефотаксима натрия была менее выражена, но также имела место.

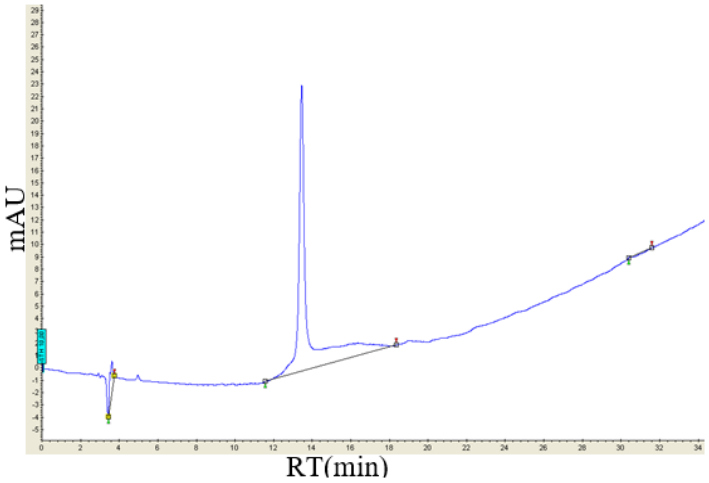


Рисунок 31 – Хроматограмма цефотаксима натрия после 18-ти часового выдерживания раствора при 25 ^{0}C.

Как и в образце при 37 ^{0}C, появился пик при 3,27 мин (4,97 %, 0,9 mAU / мин) и пик при 3,61 мин (3,50 %, 0,6 mAU / мин). Пик при 13,45 мин значительно вырос до 40,27 % (7,4 mAU / мин) по сравнению с 14,12 % в свежем растворе. Основной пик (ранее при 31,05 мин) также не детектировался, а пик при 49,15 мин (13,51 %, 2,5 mAU / мин) оказался существенно меньше, чем при 37 ^{0}C (22,93 %). Общая площадь пиков составила 18,5 mAU / мин – такая же, как у свежеприготовленного раствора.

Сравнительный анализ показывает, что условия инкубации при 37 ^{0}C (моделирующие метод диффузии в агар) приводят к практически полной деградации исходного цефотаксима: основной пик полностью исчезает, а общая площадь возрастает на 25,4 %, что свидетельствует об интенсивном образовании продуктов гидролиза. При 25 ^{0}C общая площадь пиков не увеличивается, однако профиль хроматограммы претерпевает значительные изменения: доля пика при 13,45 мин возрастает в 2,85 раза по сравнению со свежим раствором, что указывает на частичную нестабильность антибиотика даже при комнатной температуре. Таким образом, цефотаксим натрия проявляет крайне низкую химическую стабильность в условиях длительной инкубации, особенно при 37 ^{0}C, что необходимо учитывать при интерпретации результатов микробиологических тестов.

Полученные данные показывают, что при стандартной постановке эксперимента диффузии в агар, предусматривающей инкубацию в течение 24-х часов при 37 ^{0}C, часть антибиотиков, диффундирующих в агар, могут подвергаться гидролизу. Это приводит к снижению реальной концентрации активного вещества в зоне диффузии и, как следствие, к занижению диаметров зон ингибирования роста тест-штамма.

Следовательно, для получения достоверных и воспроизводимых результатов при оценке антимикробной активности β-лактамных антибиотиков исследования следует проводить при температуре 25 ^{0}C – это позволяет минимизировать деградацию антибиотиков, обеспечить получение достоверных данных и их корректную интерпретацию.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Фармакопейным методом диффузии в агар установлено, что антибиотики 7 различных групп проявляют неодинаковую активность в отношении разных тест-микроорганизмов (*S. aureus* 209 P и *B. subtilis* ATCC 6633), что обусловлено их специфическим механизмом действия, спектром антимикробной активности и другими факторами, что определяет необходимость тщательного подбора тест-штамма для каждого конкретного антибиотика при разработке методик контроля качества.

2. В ходе статистического анализа выявлена вариабельность результатов для некоторых антибиотиков, особенно в диапазонах низких концентраций, что ограничивает точность количественного определения в этом диапазоне. Коэффициенты $S_{\delta,\%}$ для большинства антибиотиков не превышают 10 %, однако для азитромицина дигидрата, цефепима дигидрохлорида моногидрата и цефтриаксона натрия отмечена наибольшая вариабельность с $S_{\delta,\%}$ равными 19,0, 25,2 и 32,5 %. Данный фактор подчеркивает необходимость особого внимания к аналитическим характеристикам метода при разработке методик и установлении адекватных критериев приемлемости результатов анализа.

3. Штамм *E. coli* ATCC 25922 продемонстрировал пригодность для оценки антимикробной активности 14 из 17 протестированных антибиотиков методом диффузии в агар, о чем свидетельствуют зоны ингибирования, значения $S_{\delta,\%}$ в диапазоне 1,4 – 7,9 %, а также эквивалентность с *B. subtilis* ATCC 6633 при допустимой разнице 20 % (p-значение для гипотезы эквивалентности $H^+ = 0{,}000070$). При сравнении результатов с *S. aureus* 209 P штамм не является статистически эквивалентным при 10 и 20 % допустимой разнице.

4. Использование рекомбинантного штамма *E. coli* MG1655 с плазмидой pXen7-lux в качестве тест-объекта для оценки антимикробной активности антибиотиков оказалось достаточно ограниченным, так как определение канамицина сульфата возможно только при концентрациях ≥ 50 мкг / мл, методика неприменима для анализа цефазолина натрия, а наибольшую устойчивость штамм проявил к азитромицину дигидрату, канамицину сульфату и

цефотаксиму натрия, несмотря на выявленную эквивалентность результатов эталону *B. subtilis* АТСС 6633 даже при 10 % наименьшей значимой разнице.

5. Стандартизированы условия тестирования антибиотиков с использованием *P. leiognathi* Sh1 методом диффузии в агар: оптимальная концентрация NaCl – 3 %, температура – 25 ^{0}C, диапазон концентраций ДМСО, не угнетающий рост и люминесценцию штамма, – от 10 до 20 мкг / мл. В отношении *P. leiognathi* Sh1 выявлена высокая чувствительность в отношении широкого спектра антибиотиков – зоны ингибирования роста фиксировались уже при концентрациях 1 – 10 мкг / мл для большинства тестируемых субстанций, что позволяет считать его оптимальным тест-штаммом для оценки антимикробной активности среди использованных видов бактерий, а в результате статистической проверки эквивалентности выявлено, что штамм является «аналогом» *B. subtilis* АТСС 6633.

6. Результаты ВЭЖХ-анализа показали, что в условиях, моделирующих стандартную постановку метода диффузии в агар, антибиотики подвергаются значительному гидролизу. Ампициллин натрия демонстрирует частичную стабильность при 25 ^{0}C, теряя лишь около 5 % активного вещества за 18 часов, тогда как при 37 ^{0}C за 24 часа его деградация превышает 35 %. Цефотаксим натрия проявляет крайне низкую стабильность: даже при 25 ^{0}C наблюдается значительная деградация, а при 37 ^{0}C происходит практически полная деструкция вещества.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ

Исходя их теоретических данных научной литературы (глава 1) и экспериментальных результатов (глава 3) фармакопейный метод диффузии в агар имеет ряд ограничений. К ним относятся значительная вариабельность результатов для ряда антибиотиков, особенно в диапазоне низких концентраций, и зависимость размера зон ингибирования от выбора тест-штамма и его специфической чувствительности (глава 3, раздел 3.1).

В главе 3, раздел 3.4, проведенные сравнительные исследования продемонстрировали высокую и универсальную чувствительность природного биолюминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 к широкому спектру антибиотиков различных групп, значительно превосходящую таковую у «эталонных» и модельных микроорганизмов. Высокая точность и стабильность результатов, полученных с применением природных бактерий, а также наличие удобного сигнального параметра – интенсивности биолюминесценции, позволяют рассматривать тест-штамм *P. leiognathi* Sh1 в качестве высокоперспективного тест-объекта для разработки и оптимизации унифицированной методики определения антимикробной активности антибиотиков.

4.1 Подбор условий тестирования для определения активности антибиотиков с использованием *P. leiognathi* Sh1

Принцип подхода определения антимикробной активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности свечения тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 заключается в корреляции между метаболической активностью биолюминесцентных клеток и уровнем их свечения и как следствие ингибирование роста или гибель клеток под действием антибиотика, что приводит к снижению интенсивности свечения и позволяет количественно оценить антимикробную активность антибактериальных веществ.

В связи с этим данная глава концентрируется на стандартизации всех этапов

анализа, начиная с подготовки рабочего места, культивирования тест-микроорганизма, приготовлении бактериальной суспензии, смешивании ее с исследуемым образцом, инкубации и заканчивая проведением измерений интенсивности свечения бактерий, определении изменений биолюминесцентного индекса при добавлении антибиотиков относительно контроля, обработкой результатов.

4.1.1 Подготовка рабочего места и оборудования к исследованию

Все процедуры при исследованиях выполнялись в соответствии со стандартными микробиологическими требованиями к обеспечению стерильности и воспроизводимости [11, 15, 46, 62].

Перед началом исследований рабочую поверхность ламинарного бокса подготавливают, убирая все лишние предметы и дезинфицируя поверхность мягкой тканью, смоченной в 3%-ном растворе перекиси водорода с 0,5%-ным моющим средством или в 70%-ном этиловом спирте [115].

После очистки проводят обеззараживание рабочей зоны с помощью ультрафиолетовой лампы, встроенной в ламинарный бокс (Lamsystems, Россия). Время облучения составляло не менее 30 минут.

После завершения УФ-обработки на рабочую поверхность ламинарного бокса с помощью распылителя, обеспечивая равномерное покрытие, наносят 70 %-ый раствор этилового спирта, а затем протирают стерильной одноразовой тканью или ватой.

Кроме того, для обеспечения стабильной работы оборудования осуществляется включение люминометров – биохемилюминометра БХЛ-06 (НПО «Биофармавтоматика», Россия) и LumiShot («Научно-производственное предприятие «Прикладные биосистемы», Россия) согласно инструкциям к эксплуатации.

Важным этапом являлась подготовка посуды, включающая очистку и стерилизацию стеклянных кювет объемом 1 – 2 мл посредством их промывания, обработки хромовой смесью, ополаскивания дистиллированной водой,

высушивания и стерилизации в сухожаровом шкафу или автоклаве [71, 91].

4.1.2 Подготовка питательных сред для культивирования *P. leiognathi* Sh1

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).

В состав питательной среды Nutrient agar M001-500G входят:

1) пептический перевар животной ткани: 5,00 г / л;
2) мясной экстракт: 1,50 г / л;
3) дрожжевой экстракт: 1,50 г / л;
4) натрия хлорид: 5,00 г / л;
5) агар-агар: 15,00 г / л.

Питательную среду готовили с обязательным дополнительным внесением NaCl до конечной концентрации 3 % в среде в соответствии с ранее установленными оптимальными параметрами.

В результате, для приготовления питательной среды Nutrient agar M001, согласно инструкции, сохраняли соотношения порошка к дистиллированной воде – 28,0 г к 1 литру и в полученную среду дополнительно добавляли NaCl до его конечной концентрации, равной 3 %.

Полученный мутный раствор перемешивали вручную или механически с использованием орбитального шейкера (Biosan, Латвия) со скоростью 180 об / мин и нагревали до кипения на водяной бане до полного растворения компонентов среды. Готовый светло-янтарный прозрачный раствор стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм в течение 15 минут. Полученную стерильную расплавленную питательную среду разливали в стерильные чашки Петри.

В качестве бульона применяют порошок Nutrient Broth M002-500G (Himedia, Индия, lot: 0000387742). В раствор, полученный путем растворения порошка в дистиллированной воде (соотношение 13,0 грамм к 1000 мл),

добавляют необходимое количество NaCl и стерилизуют, аналогично агару.

В состав питательной среды Nutrient Broth M002-500G входят:

1) пептический перевар животной ткани: 5,00 г / л;
2) мясной экстракт: 1,50 г / л;
3) дрожжевой экстракт: 1,50 г / л;
4) натрия хлорид: 5,00 г / л.

4.1.3 Подготовка, выращивание и хранение культуры *P. leiognathi* Sh1

Посев микроорганизмов на готовые среды осуществляют стандартными микробиологическими методами.

Штамм *P. leiognathi* Sh1 демонстрирует оптимальный рост и биолюминесценцию в температурном интервале $20 – 30\ ^0$C, с максимальной интенсивностью свечения при $25\ ^0$C. Пик люминесценции достигается после 12 часов инкубации, что соответствует активной логарифмической фазе развития, обеспечивающей однородность культуры в экспериментальных повторностях, и сохраняет стабильный уровень свечения в течение 8 часов [55]. Процесс требует аэрации, поскольку светообразование у данного микроорганизма зависит от наличия кислорода [5].

Первичное выращивание и поддержание жизнеспособности штамма осуществляется на агаризованных средах в чашках Петри, с регулярным пересевом на свежую среду каждые $10 – 14$ дней либо использованием лиофилизированных клеток для длительного сохранения [81]. Для краткосрочного хранения культуры применяют запаянные пробирки с плотными питательными средами, хранящиеся при $4 – 8\ ^0$C до 45 суток, после чего требуется повторный посев [27].

Для проведения анализа используют чистую культуру *P. leiognathi* Sh1, выращенную на чашках Петри с агаризованной питательной средой и оценивают характерные признаки отдельных колоний. Колонии штамма *P. leiognathi* Sh1 на плотных средах имеют средний размер – $4 \pm 0{,}2$ мм, округлую форму с гладкой поверхностью, выпуклым профилем и ровным краем [56, 124]. Они

характеризуются аморфной структурой, слизистой консистенцией и отсутствием видимой пигментации (белый цвет), что типично для представителей рода *Photobacterium* [38, 118]. Колонии, соответствующие морфо-культуральным признакам, отбирают и переносят в пробирки с бульоном аналогичного солевого состава для получения взвесей вегетативных клеток. Культивируют при 25 ^{0}C в течение установленного периода. При необходимости взвесь используют для приготовления бактериальной суспензии, используемой для оценки антимикробной активности антибиотиков. Используемая в тестах взвесь 18-ти часовой культуры готовится непосредственно перед проведением анализа.

4.1.4 Подготовка и стандартизация бактериальной суспензии для исследования

Подготовку бактериальной суспензии для проведения анализа проводили путем отбора свежей колонии (не старше 7 дней) с плотной питательной среды Nutrient agar M001-500G, с последующим внесением ее в питательный бульон Nutrient broth M002-500G и термостатированием. Инкубацию проводили в термостате при температуре 25 ^{0}C в течение 18 часов для достижения стационарной фазы роста культуры.

Для количественной оценки концентрации клеток в суспензии применяли комбинированный подход, включающий денситометрический и микроскопический методы. Оптическую плотность (OD) бактериальной взвеси измеряли на денситометре DEN-1 (Biosan, Латвия) при длине волны 620 нм. Полученные значения OD сопоставляли с фактической концентрацией клеток, определённой с помощью камеры Горяева (МиниМед, Россия).

Для определения концентрации микроорганизмов готовили разведение исходной суспензии в соотношении 1:10 3 % раствором NaCl. В камеру Горяева с помощью микропипетки наносили 10 мкл (0,01 мл) разведённой суспензии под покровное стекло, выдерживали в течение 2 – 3 минут для их равномерного распределения.

Подсчёт клеток осуществляли с использованием микроскопа «Биомед-2»

(ООО «Биомед», Россия) при увеличении 40х в трех повторах. Концентрацию клеток в 1 мл исходной суспензии рассчитывали по формуле: $N = (a \times n \times 10^4) / V$, где N – количество клеток в 1 мл (клеток / мл), a – среднее количество клеток в одном большом квадрате, n – коэффициент разведения (n = 10), 10^4 – коэффициент, учитывающий перевод в миллилитры, V – объём суспензии, внесённой в камеру (V = 0,01 мл).

На основании полученных данных строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации клеток. Линейность зависимости подтверждали коэффициента аппроксимации, значение которого составляло не менее 0,99. По графику определяли текущую концентрацию клеток в исходной суспензии, что служило основой для последующего приготовления рабочих разведений.

Перед началом оценки влияния антибиотиков на люминесценцию тест-штамма суспензию разбавляли 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.

Важнейшей характеристикой используемой бактериальной суспензии являлась его способность генерировать стабильный и интенсивный световой сигнал, коррелирующий с метаболической активностью клеток. Абсолютную интенсивность люминесценции культуральной жидкости измеряли в трех повторностях в относительных световых единицах (RLU) с помощью биохемилюминометров БХЛ-06 (НПО «Биофармавтоматика», Россия) и LumiShot (НПП «Прикладные биосистемы». Измеренная абсолютная интенсивность люминесценции культуральной жидкости достигала $1,09 \pm 0,15 \times 10^6$ RLU, а удельное свечение, отражающее светоотдачу на одну клетку, составило $3,87 \times 10^{-3}$ RLU / клетка.

4.1.5 Подготовка анализируемых растворов для исследования

В соответствии с нормативно-технической документацией, включая Государственную фармакопею РФ XV-го издания, основные растворы

антибиотиков готовятся заранее с использованием подходящего растворителя, обеспечивающего их растворимость и стабильность.

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 [34]. Концентрации последнего в конечной пробе находились в ранее установленном оптимальном диапазоне, не влияющем на жизнедеятельность штамма.

Полученные основные растворы антибиотиков для исследования воздействия на уровень люминесценции бактерий *P. leiognathi* Sh1 последовательно разбавляют 3 % раствором NaCl до требуемых концентраций с учетом объема бактериальной суспензии в пробе.

4.1.6 Подготовка исследуемых образцов и проведение анализа

Методика тестирования заключалась в следующем: в стерильные пробы последовательно добавляли стандартизированную бактериальную суспензию и растворы антибиотиков в заданной концентрации. Количество клетов в пробе с антибиотиком составило $2{,}5 \times 10^5$ клеток / мл [135, 136].

Контрольная проба содержала только суспензию бактерий в 3 % NaCl. Данный контрольный образец состоит из бактериальной суспензии, раствора натрия хлорида и/или ДМСО для некоторых антибиотиков. Контроль позволяет определить исходный уровень биолюминесценции бактерий в отсутствие антимикробного воздействия и необходим для исключения влияния растворителя на интенсивность люминесценции.

Пробы инкубировали при 25 ^{0}C в течение 18 часов. Измерение люминесценции культуры проводят через 18 часов после начала эксперимента, что обеспечивает достаточное время для проявления эффекта антибиотиков.

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.

4.1.7 Обработка и анализ результатов

Для количественной оценки антимикробной активности антибиотиков использовали индекс БЛИ, рассчитываемый по формуле: БЛИ (%) = (I_i / I_0) × 100 %, где I_i – интенсивность свечения в пробе с антибиотиком, I_0 – интенсивность свечения в контрольной пробе (без антибиотика).

Оценка антимикробной активности антибиотиков основана на построении калибровочных кривых. Для построения графической зависимости на оси абсцисс (X) фиксируют логарифм концентрации антибиотика (lgC), на оси ординат (Y) – измеренные значения интенсивности свечения в БЛИ. Точки соединяют гладкой линией, которая составляет калибровочную кривую. Для построения линейной прямой зависимости БЛИ от концентраций антибиотиков используют метод наименьших квадратов, в некоторых случаях применяют преобразования переменных для линеаризации графической зависимости.

Полученные результаты БЛИ подвергались статистической обработке в соответствии с 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 [34]. Для проверки надежности калибровочной кривой оценивают стандартное отклонение, доверительные интервалы и другие статистические параметры. В результате предложена схема выполнения методики (рисунок 32).

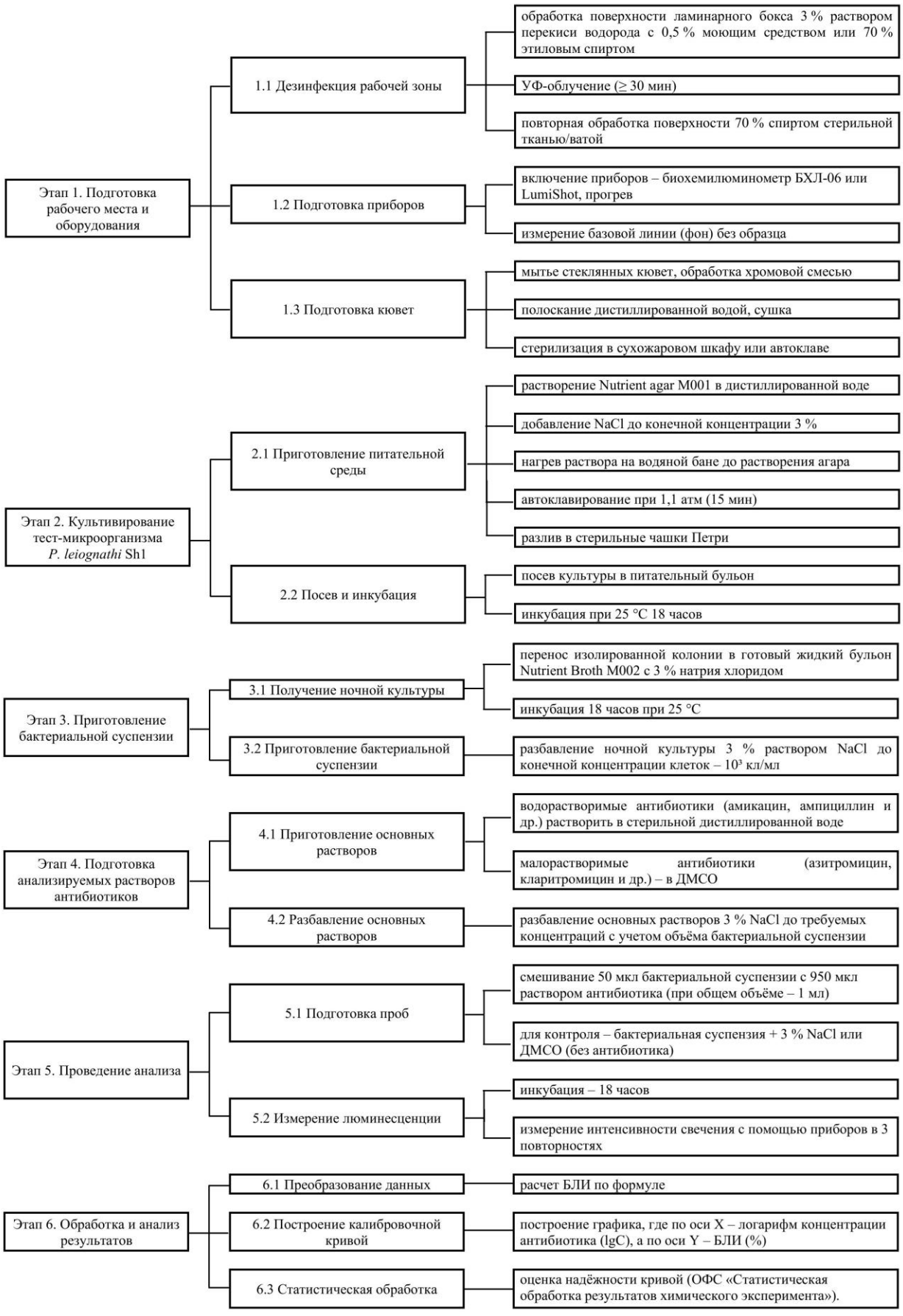


Рисунок 32 – Технологическая схема методики определения антимикробной активности антибиотиков биолюминесцентным анализом.

В результате проведенных исследований и испытаний разработан проект фармакопейной статьи на биолюминесцентный метод определения антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств (приложение 2).

4.2 Определение диапазонов линейности активности антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции бактерий

В ходе разработки методики определялся диапазон линейности кривой снижение БЛИ от концентраций антибиотиков. Подбор концентраций осуществлялся, основываясь на экспериментах, полученных методом диффузии в агар с использованием *P. leiognathi* Sh1. Полученные результаты будут использованы для оптимизации условий пробоподготовки количественного определения антибиотиков с перспективой внедрения в проект фармакопейной статьи.

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 получения линейной зависимости средних значений БЛИ от концентраций субстанций, полученные при исследовании 10 проб концентраций антибиотиков, аналогично методу диффузии в агар, логарифмированы по натуральному основанию. В результате для каждого антибиотика установлен индивидуальный диапазон концентраций, в котором наблюдалась линейная зависимость БЛИ от lnC.

В ходе исследования получены данные о влиянии концентраций производных нафтацена на подавление интенсивности свечения. Тетрациклина гидрохлорид оказывает более сильное воздействие на биолюминесценцию по сравнению с доксициклина гидрохлоридом. Он достигал полного подавления люминесценции при концентрации в 20 раз меньшей, чем для доксициклина.

Результаты представлены на рисунке 33 в виде полулогарифмической прямой.

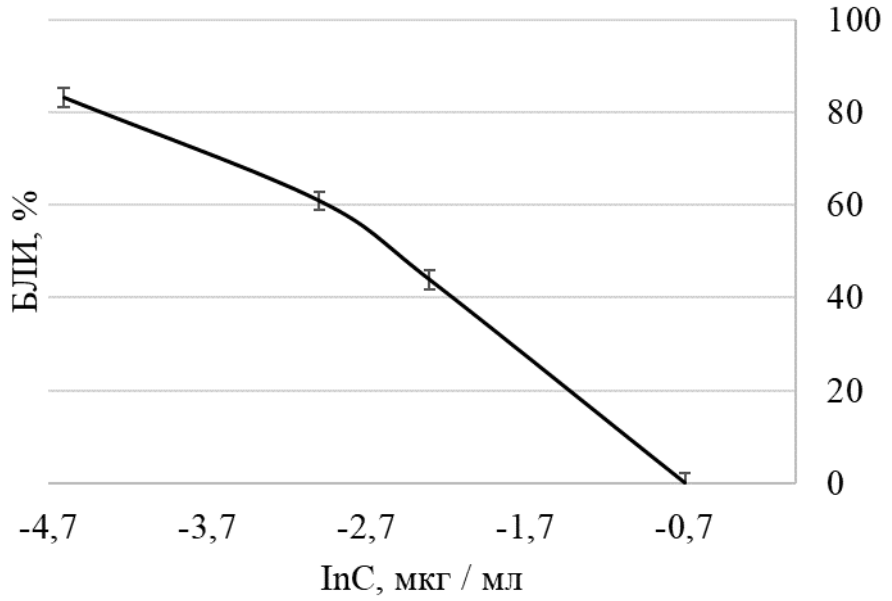


Рисунок 33 – Зависимости интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций тетрациклина гидрохлорида.

Установлено, что при концентрации 0,1 мкг / мл тетрациклина наблюдалось снижение интенсивности люминесценции до 43,9 ± 2,47 % от контрольного значения, а при концентрации 0,5 мкг / мл – практически полное подавление свечения [101, 105].

Доксициклина гидрохлорид также оказывал выраженное влияние на биолюминесценцию, однако эффект проявлялся при более высоких концентрациях. Снижение уровня биолюминесценции до 29,7 ± 2,14 % наблюдалось при концентрации доксициклина 1 мкг / мл, а при концентрации 5 мкг / мл – до 6,3 ± 1,63 % [101, 105]. Для доксициклина полное подавление биолюминесценции наблюдалось при концентрации 10 мкг / мл. На рисунке 34 представлена зависимость БЛИ от концентраций антибиотика.

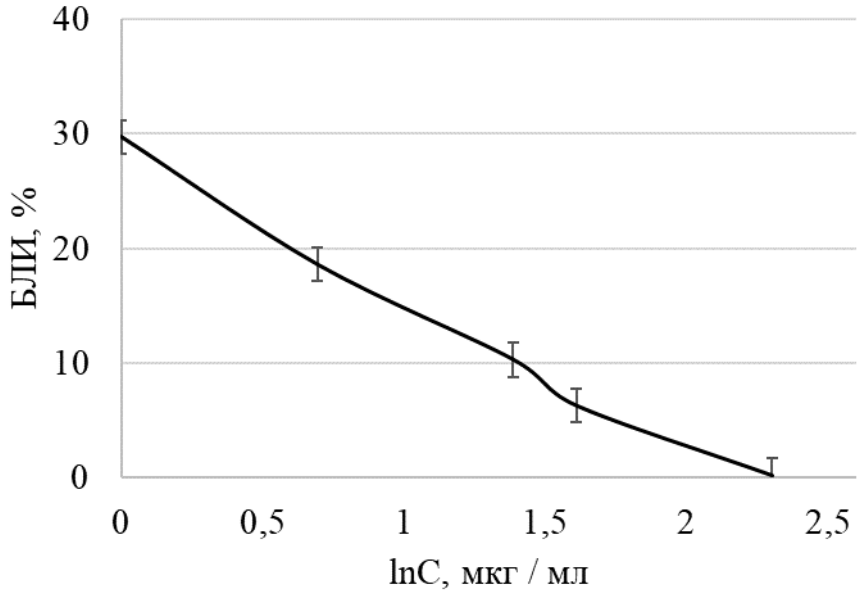


Рисунок 34 – Зависимости интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций доксициклина гидрохлорида.

Для всех аминогликозидов (амикацина, гентамицина, канамицина и стрептомицина сульфатов) наблюдается закономерное снижение среднего значения БЛИ с увеличением исходной концентрации до 10 мкг / мл [101, 105]. На рисунке 35 представлены зависимости БЛИ от концентраций амикацина и гентамицина сульфатов.

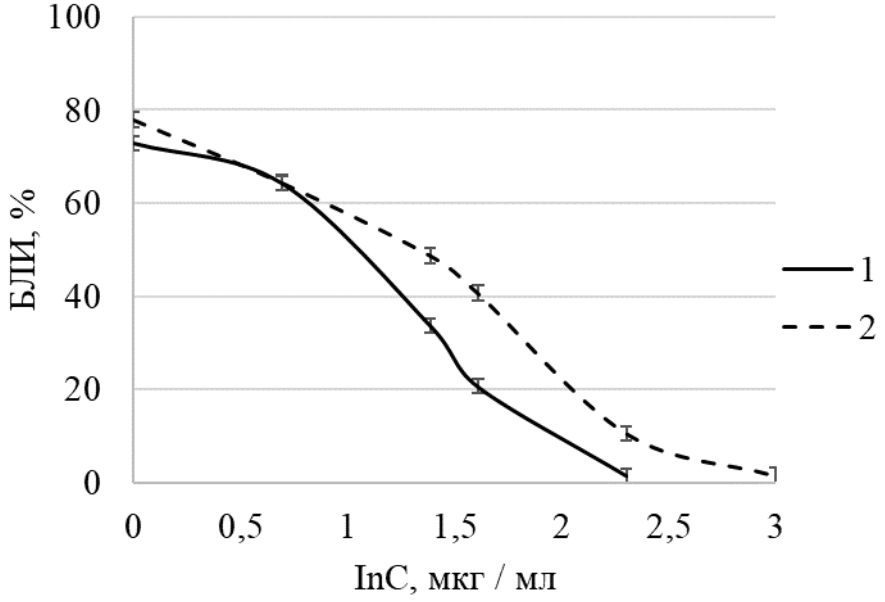


Рисунок 35 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций производных аминогликозидов, где 1 – амикацина сульфат, 2 – гентамицина сульфат.

Амикацин, гентамицин и канамицин снижали интенсивность свечения

более чем на 50 % уже при 5 мкг / мл. Зависимость БЛИ от концентраций антибиотика канамицина сульфата представлена на рисунке 36.

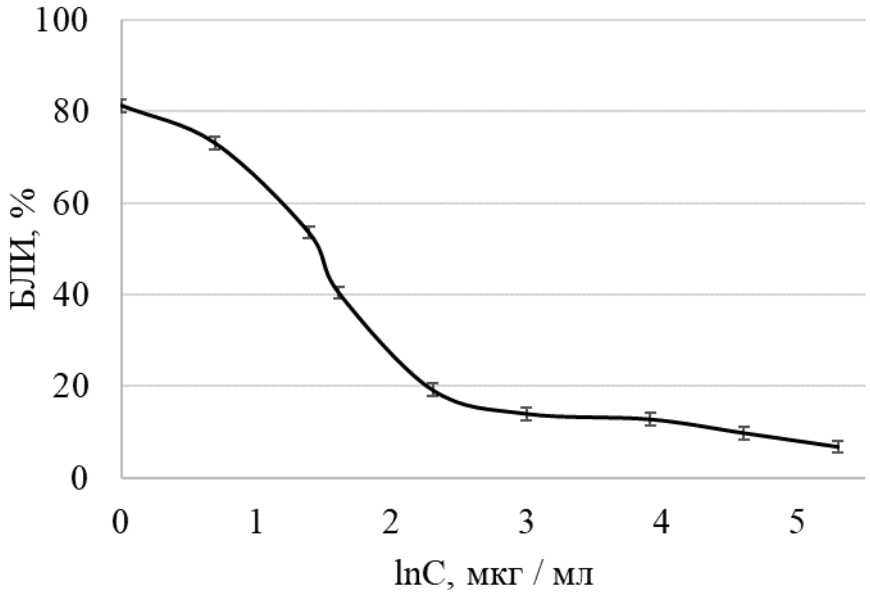


Рисунок 36 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций канамицина сульфата.

Среди исследованных аминогликозидов наиболее выраженным влиянием на люминесценцию бактерий обладал стрептомицин – при концентрации 1 мкг / мл он снижал интенсивность свечения более чем на 50 %, при 5 мкг / мл БЛИ составил 5,7 ± 0,82 % (рисунок 37).

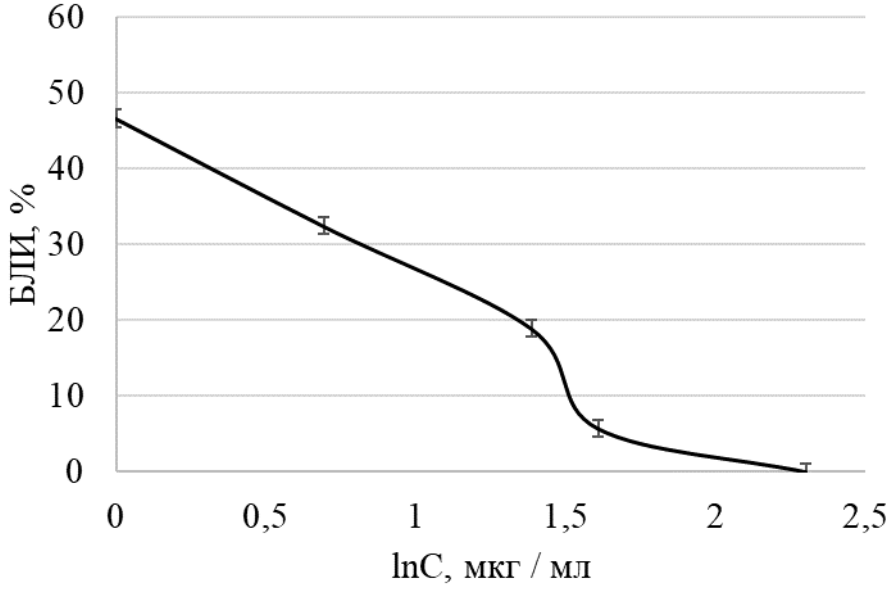


Рисунок 37 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций стрептомицина сульфата.

Из макролидов азитромицина дигидрат оказывал более выраженное влияние

концентрации на аналитические характеристики. При концентрации азитромицина 0,01 мкг / мл интенсивность люминесценции снизилась до 78,1 ± 2,50 % от контрольного значения. Полулогарифмическая зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 38.

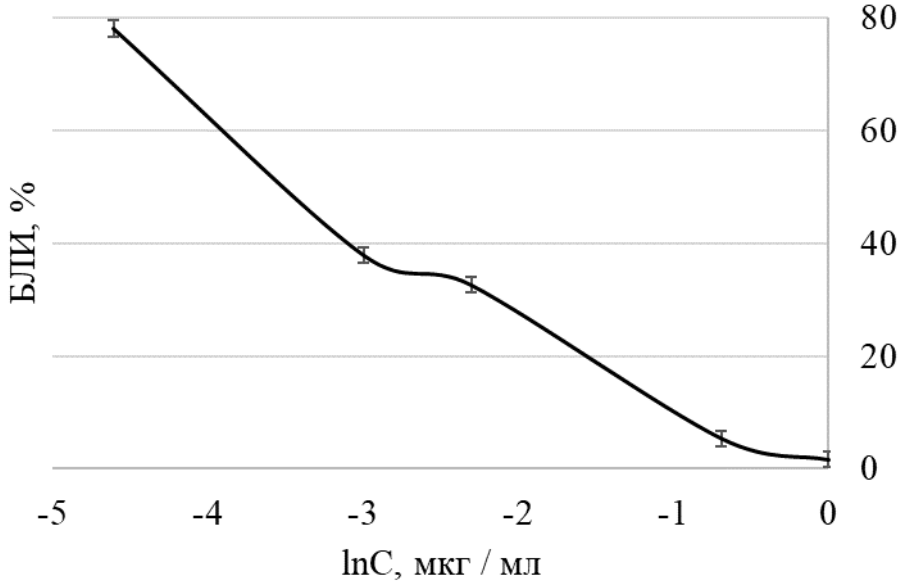


Рисунок 38 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций азитромицина дигидрата.

Последующее увеличение концентрации азитромицина до 0,05 мкг / мл привело к значительному снижению люминесценции до 37,9 ± 2,62 %. Дальнейшее повышение концентрации до 0,1 мкг / мл вызвало снижение интенсивности свечения до 32,6 ± 1,46 %, а при концентрации 0,5 мкг / мл наблюдалось практически полное подавление биолюминесценции, значение БЛИ составило всего 5,4 ± 0,96 %. При концентрации 1 мкг / мл азитромицина биолюминесценция полностью подавлена.

При повышении концентрации эритромицина от 1 до 10 мкг / мл средние значения снижаются от 86,8 ± 0,67 до 14,2 ± 0,05 %. Зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 39.

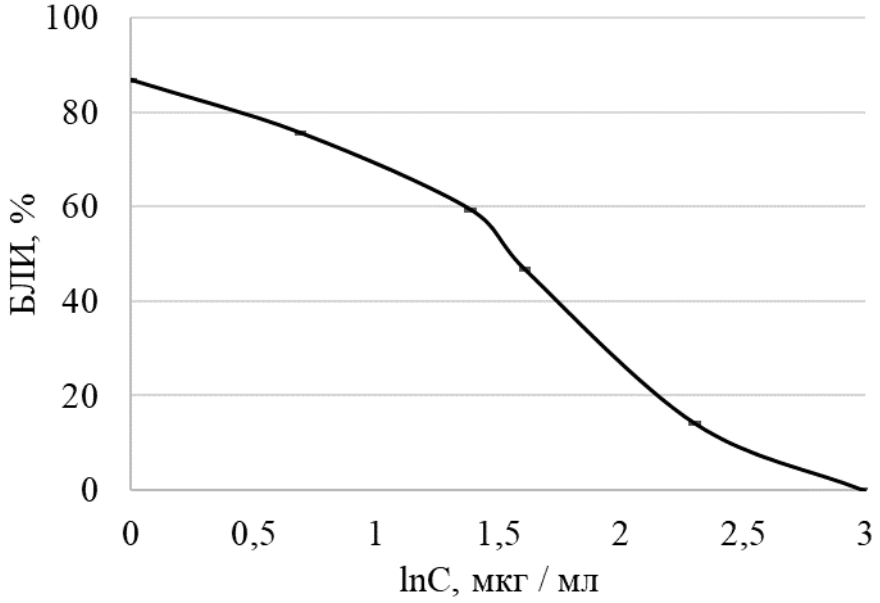


Рисунок 39 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций эритромицина.

При увеличении концентрации гликопептида – ванкомицина гидрохлорида отмечено снижение интенсивности свечения уже при концентрации 1 мкг / мл, среднее значение БЛИ снижается до 51,6 ± 1,91 %, а при концентрации 20 мкг / мл – до 0,8 ± 0,82 %. На рисунке 40 представлена зависимость БЛИ от концентраций антибиотика.

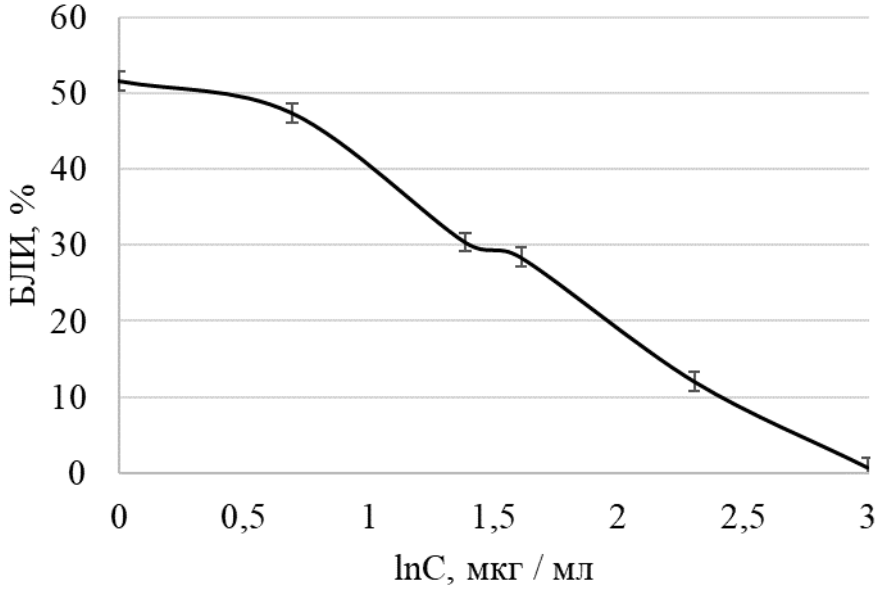


Рисунок 40 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций ванкомицина гидрохлорида.

Исследование влияния линкомицина гидрохлорида моногидрата на люминесценцию бактерий выявило дозозависимое подавление свечения.

Концентрация антибиотика 1 мкг / мл снижала люминесценцию до 91,5 ± 0,19 %. При увеличении концентраций до 2 и 4 мкг / мл интенсивность свечения падала до 84 ± 0,67 и 76,4 ± 0,3 %. Концентрация 10 мкг / мл вызвала подавление люминесценции до 28,4 ± 0,13 %. Полулогарифмическая зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 41.

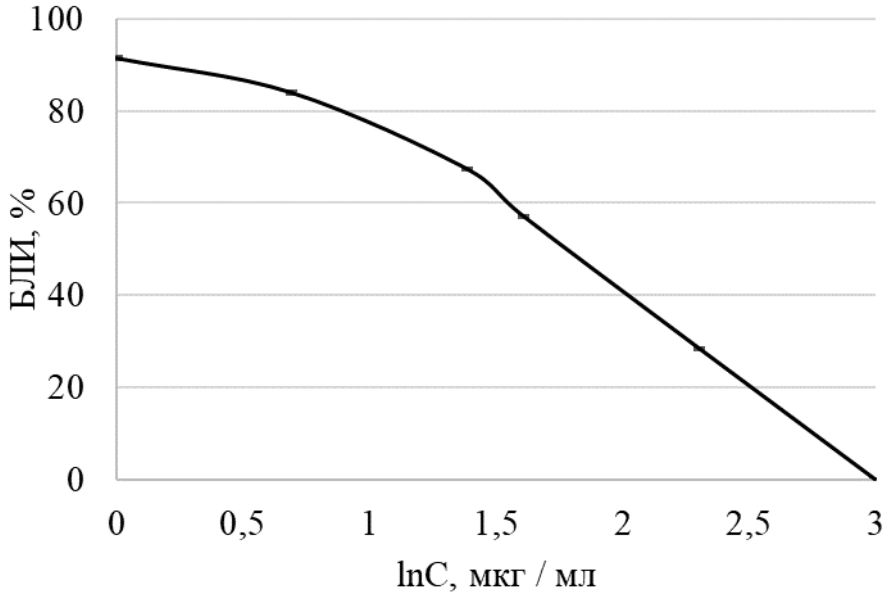


Рисунок 41 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций линкомицина гидрохлорида моногидрата.

Среди исследованных цефалоспоринов цефтриаксон натрия продемонстрировал наибольшее влияние на люминесценцию бактерий. При применении концентрации 1 мкг / мл наблюдалось снижение уровня люминесценции до 39,6 ± 2,36 %, а при 5 мкг / мл этот показатель упал до 5,9 ± 0,74 % [101, 105, 106]. Вероятно, цефтриаксон оказывает комплексное воздействие на основные ферментные системы бактерий, ответственные за процессы свечения [194]. Полулогарифмическая зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 42.

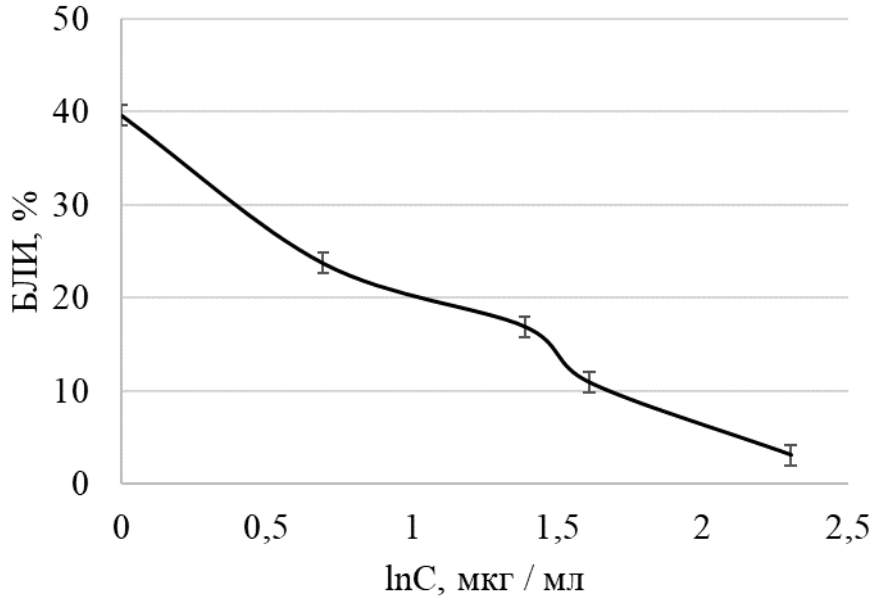


Рисунок 42 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций цефтриаксона натрия.

Цефепима дигидрохлорид моногидрат проявлял более выраженное ингибирующее действие по сравнению с цефазолином натрия. При концентрации 1 мкг / мл уровень люминесценции снижался до 57,2 ± 2,21 %, а при концентрации 10 мкг / мл составлял всего 4,6 ± 1,28 % [101]. Зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 43.

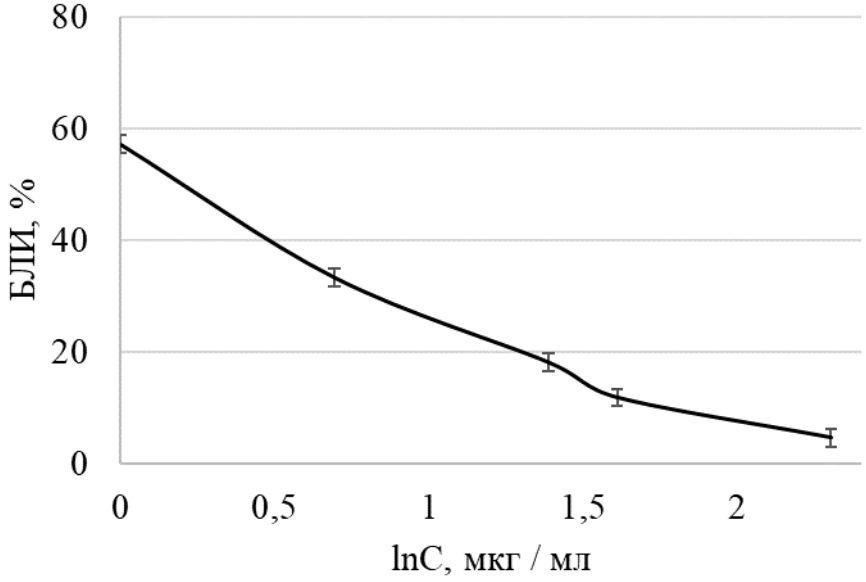


Рисунок 43 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций цефепима дигидрохлорида моногидрата.

Эти результаты свидетельствуют о том, что цефепим обладает значительным антибактериальным потенциалом, превосходящим активность

цефазолина. Высокая ингибирующая способность цефепима, вероятно, объясняется его улучшенной способностью проникать через клеточную стенку бактерий и взаимодействовать с пенициллинсвязывающими белками.

Цефазолин натрия продемонстрировал постепенное снижение уровня люминесценции с увеличением его концентрации: от 81,3 ± 2,15 % при 1 мкг / мл до 17,2 ± 0,86 % при 10 мкг / мл. В отличие от цефтриаксона натрия и цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефазолин оказывает менее выраженное влияние на бактериальную люминесценцию. На рисунке 44 представлена зависимость БЛИ от концентраций антибиотика.

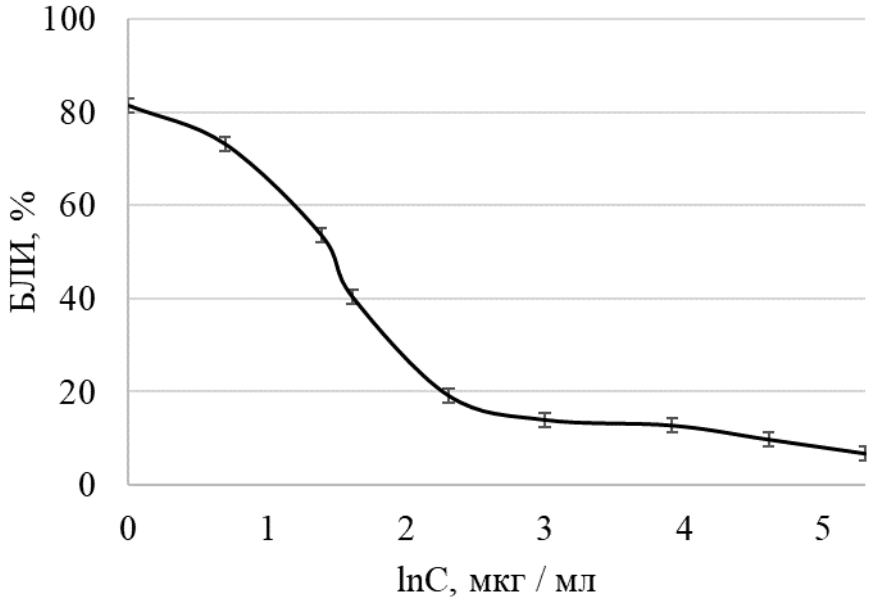


Рисунок 44 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций цефазолина натрия.

Цефуроксим натрия показал промежуточные результаты: при концентрации 1 мкг / мл уровень люминесценции снижался до 86,2 ± 2,08 %, а при концентрации 10 мкг / мл составлял 9,9 ± 1,91 %. Следовательно, цефуроксим располагается между наиболее активными цефалоспоринами (цефтриаксон, цефепим) и менее активным цефазолином в тесте ингибирования бактериальной люминесценции *P. leiognathi* Sh1. Полулогарифмическая зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 45.

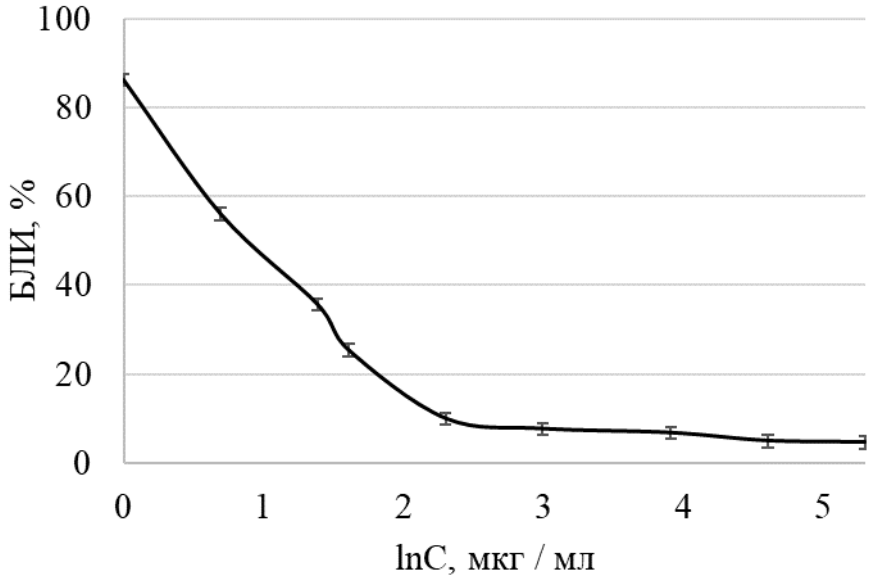


Рисунок 45 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций цефуроксима натрия.

Таким образом, экспериментальные данные продемонстрировали, что все протестированные антибиотики оказывают влияние на интенсивность свечения *P. leiognathi* Sh1. В ходе исследования разработанная методика оценки антимикробной активности позволила определить оптимальные диапазоны концентраций 7 групп антибиотиков различных химических структур, при которых наблюдается линейная зависимость между изменением интенсивности люминесценции и концентрацией антибиотика. Для большинства антибиотиков (амикацина сульфата, доксициклина гидрохлорида, стрептомицина сульфата, цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефтазидима пентагидрата, цефтриаксона натрия и цефуроксима натрия) 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 гидрохлорида моногидрата, цефазолин натрия, цефотаксим натрия и эритромицина – 1 – 20 мкг / мл.

4.3 Основные статистические и валидационные параметры методики биолюминесцентного анализа антимикробной активности антибиотиков

Для повышения надежности полученных результатов необходимо провести статистический анализ, включающий меры изменчивости и выявление выбросов. Кроме того, следует оценить валидационные характеристики методики измерения интенсивности люминесценции, что подразумевает оценку точности, воспроизводимости и надежности для подтверждения соответствия результатов измерений реальному содержанию антибиотиков в пробе.

Влияние антибиотиков на люминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1 исследовано в 10 различных концентрациях антибиотиков и 10 повторностях (n = 10), что обеспечивает 9 степеней свободы (f = 9) для статистического анализа.

Статистическая обработка данных измерения изменения интенсивности бактериальной люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 включала расчет среднего значения БЛИ при различных концентрациях антибиотика, показателей S^2, S, δ, Δx и ε. Результаты представлены в таблице приложения 1.

Исследование влияния 15-членного азалида группы макролидов азитромицина дигидрата показало, что при концентрации 0,05 мкг / мл наблюдается заметное увеличение S^2 до 3,958 и S до 1,989, а ε составила 4,496 %. Дальнейшее увеличение концентрации до 0,1 мкг / мл характеризовалось уменьшением S^2 и S, а ε становится 2,993 %. При концентрации 0,5 мкг / мл S^2 и S минимальны, ε составляет 1,977 %. При концентрации 1 мкг / мл S^2 и S имеют сравнительно высокие значения – 1,419 и 1,191, а ε – 2,692 %. В целом, наблюдается тенденция уменьшения ε с уменьшением среднего значения люминесценции, что может указывать на большую подверженность случайным ошибкам при измерении с высокими значениями БЛИ.

Сравнение макролидов выявило, что небольшие значения S^2 и S для эритромицина указывают на хорошую согласованность результатов в пределах каждой концентрации. Наименьшие значения S^2, S и ε составили 0,349, 0,591 и 1,335 соответственно при 5 мкг / мл. Очень малые значения S^2 и S для эритромицина свидетельствуют о высокой точности и воспроизводимости

измерений. При 10 мкг / мл показатели составили 0,002 и 0,048 соответственно.

Полученные результаты демонстрируют выраженное ингибирующее влияние антибиотиков макролидного ряда на биолюминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1. Различия в активности между азитромицином и эритромицином могут быть связаны с различиями в их химической структуре и механизме действия [138].

Среди исследованных аминогликозидов наиболее выраженным влиянием на люминесценцию бактерий обладал стрептомицина сульфат. Представители группы – амикацина, гентамицина и канамицина сульфаты – демонстрировали схожие результаты подавления, но с меньшей активностью. При увеличении концентрации амикацина и гентамицина до 5 мкг / мл отмечалось не только снижение люминесценции, но и увеличение S^2 и S, что указывало на возрастающую вариабельность результатов. Для амикацина S^2 и S составили 3,789 и 1,947, а для гентамицина – 4,413 и 2,101 соответственно. *ε* при этом не превышала 5 %.

Значения S^2, S, Δx, δ для тетрациклина и доксициклина гидрохлоридов также демонстрируют тенденцию к снижению с увеличением концентрации. Показатели ε не превышали 8,873 и 5,234 %. Следует отметить, что коэффициент $S_{\delta,\%}$, напротив, имеет тенденцию к увеличению с уменьшением концентрации, особенно в области малых значений для доксициклина. Средние значения коэффициентов $S_{\delta,\%}$ составили 2,7 и 9,4 % соответственно для тетрациклина и доксициклина. *ε* доксициклина варьировала от 4,588 % при 1 мкг / мл до 4,747 % при 5 мкг / мл. Значения ε для тетрациклина находились в диапазоне 4,660 – 4,832 %.

Среди исследованных цефалоспоринов цефтриаксон натрия продемонстрировал наибольшее влияние на люминесценцию бактерий. Значение ε варьировало в пределах от 1,665 до 4,060 %. *ε* измерения цефепима варьировала от 2,884 до 4,985 %. Показатель ε для цефазолина колебался в диапазоне от 1,934 до 4,948 %. *ε* измерений цефуроксима варьировала от 3,148 до 4,701 %.

В ходе исследования обнаружено, что ванкомицина гидрохлорид при

1 мкг / мл характеризуется следующими показателями вариабельности: S^2 – 3,652, S – 1,911, ε – 4,319 %. Увеличение концентрации ванкомицина до 2 мкг / мл сопровождалось некоторым повышением вариабельности (S^2 = 4,081, S = 2,020, ε = 4,565 %). Концентрация 4 мкг / мл сопровождалась уменьшением вариабельности результатов (S^2 = 2,011, S = 1,418, ε = 3,205 %). Дальнейшее повышение концентрации до 5 мкг / мл приводило к сохранению тенденции к уменьшению вариабельности (S^2 = 1,590, S = 1,261, ε = 2,850 %). При 10 мкг / мл наблюдалась минимальная вариабельность данных по сравнению с другими концентрациями (S^2 = 0,838, S = 0,915, ε = 2,068 %).

Таким образом, с увеличением концентрации ванкомицина наблюдалось не только снижение интенсивности люминесценции, но и уменьшение вариабельности показателей, что свидетельствует о более стабильном и предсказуемом эффекте антибиотика при высоких концентрациях.

Исследование влияния линкомицина при минимальной концентрации антибиотика (1 мкг / мл) показало вариабельность, равную S^2 0,036, S 0,190 и ε 0,429 %. При увеличении концентрации до 2 мкг / мл интенсивность свечения падала с увеличением S^2 (0,450) и S (0,671), что отразилось в росте ε (1,516 %). При концентрации 4 мкг / мл вариабельность уменьшилась (S^2 0,088, S 0,297, ε 0,671 %). Дальнейшее увеличение концентрации до 5 мкг / мл приводило к увеличению вариабельности (S^2 0,553, S 0,744, ε 1,681 %). При максимальной концентрации линкомицина (10 мкг / мл) отмечена наименьшая вариабельность (S^2 0,018, S 0,133, ε 0,301 %), что указывает на стабилизацию эффекта при высокой концентрации антибиотика.

В целом, с увеличением концентрации линкомицина гидрохлорида моногидрата наблюдалось последовательное снижение интенсивности люминесценции, нелинейные изменения показателей S^2, минимальная вариабельность в контроле и при максимальной концентрации антибиотика, а также максимальные колебания показателей – при концентрациях 2 и 5 мкг / мл.

Для производного 6-АПК – ампициллина натрия значения S^2 уменьшались с 3,473 до 0,512, S – от 1,864 до 0,715, δ – от 34,730 до 5,115, Δx – с 0,038 до 0,015, а

ε – с 4,212 до 1,616 %.

Проведенный статистический анализ подтверждает, что методика биолюминесцентного анализа обладает высокой точностью и воспроизводимостью. Об этом свидетельствуют низкие значения ключевых статистических параметров (S, ε) для большинства антибиотиков в установленных рабочих диапазонах концентраций, что указывает на приемлемую прецизионность и правильность измерений.

Далее пригодность методики для количественной оценки антибиотиков по измерению изменения интенсивности люминесценции *P. leiognathi* Sh1 подтверждали путем расчета основных валидационных параметров: чувствительность, ПО, ПКО, аналитическая область, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность и устойчивость.

Для всех 17 исследуемых антибиотиков в указанных диапазонах концентраций подтверждена линейная зависимость аналитического сигнала БЛИ (%) от lgC (мкг / мл). Для этого для каждого антибиотика строили калибровочные кривые зависимостей значения интенсивности свечения в БЛИ от логарифма концентрации антибиотика, которые представлены в предыдущем разделе.

Полученные результаты прямо пропорциональны концентрации раствора антибиотика и находятся в диапазонах 0,01 – 0,5 мкг / мл – для тетрациклина гидрохлорида, 0,05 – 1 мкг / мл – для азитромицина дигидрата, 1 – 5 мкг / мл – для ампициллина натрия, 1 – 10 мкг / мл – для амикацина сульфата, доксициклина гидрохлорида, стрептомицина сульфата, цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефтазидима пентагидрата, цефтриаксона натрия и цефуроксима натрия, 1 – 20 мкг / мл – для ванкомицина гидрохлорида, гентамицина сульфата, канамицина сульфата, линкомицина гидрохлорида моногидрата, цефазолина натрия, цефотаксима натрия и эритромицина. Высокие значения коэффициента детерминации ($R^2 \geq 0{,}951$) свидетельствуют об адекватности линейной модели для описания калибровочных данных. Результаты валидационной оценки представлены в таблице 10.

Таблица 10 – 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, %)	Внутрилабораторная прецезионность		
								S	S^2	$S_{\delta,\%}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
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

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	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	0,01	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	0,01	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 моногидрат, 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.

Чувствительность методики биолюминесцентного анализа характеризуется значением углового коэффициента (*b*) в уравнении калибровочной зависимости БЛИ от концентраций антибиотиков. Данный показатель показывает, насколько сильно меняется аналитический сигнал при изменении концентрации. В методе диффузии в агар рост концентрации антибиотика приводит к увеличению зоны ингибирования, в методике измерения свечения *P. leiognathi* Sh1 наблюдается обратная корреляция – увеличение концентрации антибиотика вызывает снижение интенсивности биолюминесценции (отрицательный коэффициент). Если при небольшом росте концентрации сигнал заметно растёт, чувствительность высокая.

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) указывает на более крутой наклон калибровочной прямой, а значит, на большее изменение аналитического сигнала подавления люминесценции в ответ на минимальное изменение концентрации. Это свидетельствует о повышенной чувствительности методики к данным соединениям в установленном диапазоне. В целом большинство антибиотиков характеризовались высокими значениями коэффициентов чувствительности, что характеризует одноименный валидируемый параметр.

На основе полученных коэффициентов *b* рассчитывали ключевые валидационные параметры: ПО и ПКО. Согласно полученным данным, наиболее низкие значения демонстрирует цефотаксим натрия (ПО = 0,01 ± 0,01 мкг / мл, ПКО = 0,03 ± 0,01 мкг / мл), цефтазидима пентагидрат (ПО = 0,01 ± 0,01 мкг / мл, ПКО = 0,04 ± 0,01 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. Для веществ с относительно пологим наклоном, таких как тетрациклина гидрохлорид, значение ПКО составило 1,51 ± 0,01 мкг / мл, что подтверждает сниженную чувствительность метода к данному антибиотику в сравнении с вышеперечисленными субстанциями.

На основании полученных регрессионных моделей установили аналитические области, характеризующие диапазоны концентраций, определяющие границы ее применимости. Выявлено, что рабочие диапазоны концентраций для отдельных антибиотиков существенно различается. Для канамицина сульфата и цефазолина натрия верхние границы достигают 19,49 ± 0,23 и 19,49 ± 0,21 мкг / мл соответственно. В то же время для линкомицина гидрохлорида моногидрата, 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. Это указывает на исключительно высокую чувствительность люминесцентного метода к данным антибиотикам, что является критически важным преимуществом при анализе образцов с низким содержанием аналита, позволяя минимизировать процедуру разведения и связанные с ней погрешности.

Правильность методики оценивали путем анализа стандартных образцов исследуемых антибиотиков для 10 определений 5 различных концентраций, охватывающих весь диапазон аналитической области методики. В качестве опорного значения принимали средние показатели концентраций стандартных образцов антибиотиков, поскольку данные образцы имеют точно известную концентрацию. Результаты правильности характеризовали критерием открываемости R, который выражали в процентах. Значения определения концентраций стандартных образцов антибиотиков находились внутри доверительных интервалов средних найденных значений, что подтвердило правильность методики с результатами соответствия R в диапазоне 97,3 – 102,8 %. Полученные значения критерия R для всех антибиотиков

свидетельствует о высокой степени извлечения и отсутствии значимых систематических ошибок.

Кроме того, для выявления систематической погрешности в ряду результатов наблюдений применяли критерий Аббе. Данный критерий позволяет оценить, является ли варьирование средних значений случайным или содержит систематическую составляющую. Расчетное значение критерия Аббе составило 0,9 и превышает все критические значения при p = 0,001, 0,01 и 0,05, тоесть результаты свидетельствуют об отсутствии систематических расхождений между измерениями для всех указанных уровней значимости. Эти данные, наряду с высокими значениями коэффициентов аппроксимации R^2 (0,951 – 0,999), подтверждают точность и линейность калибровочных зависимостей в установленных аналитических областях.

Оценка внутрилабораторной прецизионности метода, определяемой через S, S^2 и $S_{\delta,\%}$ при 10-кратном повторении измерений концентраций антибиотиков в пробах, показала высокую воспроизводимость результатов. Низкие значения S (в пределах 0,085 – 1,746), S^2 (0,014 – 5,910) и $S_{\delta,\%}$ (0,41 – 17,59 %) для всех антибиотиков свидетельствуют о минимальном разбросе данных. Особенно низкие значения S_δ (менее 5 %) зафиксированы для канамицина сульфата (0,41 %), цефотаксима натрия (0,41 %), эритромицина (0,41 %), линкомицина гидрохлорида моногидрата (0,49 %), доксициклина гидрохлорида (4,90 %), цефтазидима пентагидрата (4,37 %) и тетрациклина гидрохлорида (2,74 %). Полученные показатели соответствуют общепринятым критериям приемлемости для аналитических методов (значения стандартного отклонения, как правило, не превышает 10 – 15 %, а коэффициента вариации – не более 0 – 20 %) [2, 31].

Устойчивость методики биолюминесцентного анализа оценена по показателю $S_{\delta,\%}$ и сопоставлена с результатами метода диффузии в агар. Результаты сравнительной оценки устойчивости методик представлены в таблице 11, где приведены значения $S_{\delta,\%}$ для 17 исследованных антибиотиков.

Таблица 11 – Сравнительная оценка устойчивости биолюминесцентного анализа и метода диффузии в агар по показателю $S_{\delta,\%}$.

Антибиотик	Биолюминесцентный анализ	Метод диффузии в агар	
		S. aureus 209 P	*B. subtilis* ATCC 6633
Азитромицина дигидрат	17,59	2,97	20,77
Амикацина сульфат	14,54	2,26	3,72
Ампициллин натрия	11,29	3,10	2,88
Ванкомицина гидрохлорид	17,41	14,45	3,60
Гентамицина сульфат	17,21	2,22	7,47
Доксициклина гидрохлорид	51,57	1,96	6,92
Канамицина сульфат	4,90	3,62	4,24
Линкомицина гидрохлорид моногидрат	0,49	3,92	5,59
Стрептомицина сульфат	9,88	15,41	12,50
Тетрациклина гидрохлорид	2,74	2,40	7,47
Цефазолин натрия	7,11	3,65	11,74
Цефепима дигидрохлорид моногидрат	10,43	3,16	32,48
Цефотаксим натрия	0,41	3,94	6,04
Цефтазидима пентагидрат	4,37	3,15	4,54
Цефтриаксон натрия	9,67	2,54	25,20
Цефуроксим натрия	10,03	6,91	3,26
Эритромицин	0,41	4,36	2,91

Примечание: для метода диффузии в агар значения представлены для двух фармакопейных тест-штаммов: *S. aureus* 209 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Как следует из данных таблицы, сравнительный анализ значений подтверждает преимущества биолюминесцентной методики в части устойчивости для ряда исследуемых антибиотиков, а также демонстрирует влияние выбора тест-штамма на вариабельность результатов при использовании стандартного

метода диффузии в агар. Разработанная методика демонстрирует повышенную устойчивость по сравнению со стандартной методикой диффузии в агар для линкомицина гидрохлорида моногидрата, цефотаксима натрия и эритромицина со значениями S_δ равными 0,49, 0,41 и 0,41 % соответственно. Антибиотики канамицина сульфат и цефтазидима пентагидрат показали сопоставимую устойчивость с методом диффузии в агар, а стрептомицина сульфат, цефтриаксон натрия, цефепима дигидрохлорид моногидрат и цефазолин натрия – сопоставимую либо лучшую устойчивость стандартной методики. В частности цефазолин натрия, исследованный методом диффузии в агар с использованием *S. aureus* 209 P, характеризовался $S_{\delta,\%}$ = 3,65 в сравнении со значением S_δ равному 7,11 % в биолюминесцентном анализе, однако обеспечивали лучшую устойчивость при сравнении с тест-микроорганизмом *B. subtilis* ATCC 6633 ($S_{\delta,\%}$ = 11,74).

Кроме того, для оценки устойчивости корреляционной зависимости между интенсивностью свечения и концентрацией антибиотика, учитывая небольшой размер выборок (n ≤ 10), применены устойчивые статистические меры [295] – 10 % β-A-оценка дисперсии $\zeta_{pb0.1}$ и 20 % винсоризованный корреляционный коэффициент Пирсона $R_{w0.2}$. Принцип интерпретации этих показателей аналогичен классическому коэффициенту корреляции Пирсона. Результаты расчета для каждого антибиотика представлены в таблице 11.

Таблица 12 – Корреляционные коэффициенты между интенсивностью свечения и концентрацией антибиотика.

Антибиотик	n	$\zeta_{pb0.1}$	$R_{w0.2}$
Азитромицина дигидрат	9	-0,647	-0,684
Амикацина сульфат	5	-0,984	-0,986
Ампициллин натрия	5	-0,972	-0,997
Ванкомицина гидрохлорид	6	-0,982	-0,978
Гентамицина сульфат	5	-0,994	-0,988
Доксициклина гидрохлорид	5	-0,970	-0,997
Канамицина сульфат	10	-0,764	-0,840

Продолжение таблицы 12

Линкомицина гидрохлорид моногидрат	6	-0,996	-0,998
Стрептомицина сульфат	6	-0,830	-0,805
Тетрациклина гидрохлорид	4	-1,000	-0,969
Цефазолин натрия	10	-0,758	-0,830
Цефепима дигидрохлорид моногидрат	6	-0,950	-0,930
Цефотаксим натрия	6	-0,935	-0,928
Цефтазидима пентагидрат	5	-0,912	-0,971
Цефтриаксон натрия	6	-0,871	-0,841
Цефуроксим натрия	10	-0,703	-0,841
Эритромицин	5	-0,960	-0,923

Примечание: n – объем выборки, $\zeta_{pb0.1}$ – 10 % β-А-оценка дисперсии, $R_{w0.2}$ – 20 % винсоризованный коэффициент корреляции Пирсона).

Как видно из таблицы, для всех исследуемых антибиотиков направление корреляционной связи является обратным. Для всех антибиотиков коэффициенты отрицательны (от -0,647 до -1,000). Это подтверждает ключевой принцип метода и описанные ранее результаты: с увеличением концентрации антибиотика происходит закономерное подавление биолюминесценции.

Сила связи большая и очень большая, за исключением азитромицина дигидрата, для которого сила связи несколько слабее и характеризуется как выраженная. Очень сильную связь ($R_{w0.2} \geq 0,9$) демонстрируют амикацина сульфат, ампициллин натрия, ванкомицина гидрохлорид, гентамицина сульфат, доксициклина гидрохлорид, линкомицина гидрохлорид моногидрат и др. Сильную связь с показателями $0,8 \leq |R_{w0.2}| < 0,9$ показали стрептомицина сульфат, цефепима дигидрохлорид моногидрат, цефотаксим натрия, цефтазидима пентагидрат, цефтриаксон натрия.

Данные характеризуются устойчивостью результатов к выбросам и малым выборкам, что подтверждают значения $\zeta_{pb0.1}$. Выводы не обусловлены выбросами или искажением распределений, а также не обусловлены статистическими артефактами и отражают устойчивую и воспроизводимую закономерность.

Оценка валидационных характеристик методики, включающая анализ

чувствительности, ПО, ПКО, аналитической области, линейности, правильности, внутрилабораторной прецизионности и устойчивости, является подтверждением её надёжности и точности в установленном диапазоне концентраций в рамках одной лаборатории [23, 211].

Несмотря на то, что метод диффузии в агар является хорошо зарекомендовавшим себя подходом для оценки антимикробной активности, представленные данные позволяют сделать вывод о преимуществах методики биолюминесцентного анализа для количественного определения ряда антибиотиков. Более высокая чувствительность, линейность и возможность автоматизации делает этот метод более перспективным и надежным для определения антимикробной активности антибиотиков, в том числе как способа экспресс-оценки качественного и количественного содержания антибактериальных веществ.

Методика определения антимикробной активности по изменению интенсивности люминесценции *P. leiognathi* Sh1 в сравнении с методом диффузии в агар позволила сократить время на проведение исследования, в том числе исключить необходимость длительной подготовки питательных сред и инкубирования на них микроорганизмов [106].

Таким образом, новая разрабатанная методика биолюминесцентного анализа по определению антимикробной активности представляет собой современный автоматизированный подход, основанный на оценке результатов с использованием современного оптического оборудования – люминометрах. Он позволяет более быстро измерять, анализировать результаты, а также обладает высокой чувствительностью и способностью обнаруживать даже низкие концентрации антибиотиков. Методика биолюминесцентного анализа антибиотиков отличается значительной экономичностью времени и ресурсов, так как этап подготовки и анализа в сравнении с методом диффузии в агар не занимает несколько дней, а также способствует быстрому получению и интерпретации результатов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. В результате разработаны и оптимизированы условия тестирования антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа. Установлены ключевые параметры методики: состав питательных сред Nutrient agar M001-500G с добавлением NaCl до 3 % содержания, условия культивирования тест-микроорганизма *P. leiognathi* Sh1 – 25 ^{0}C, пик люминесценции через 16 – 18 часов, подготовка бактериальной суспензии с конечной концентрацией $2{,}5 \times 10^5$ клеток / мл и интенсивностью свечения $1{,}09 \pm 0{,}15 \times 10^6$ RLU.

2. Установлены линейные зависимости, позволяющие оценивать концентрации антибиотиков по ингибированию люминесценции природного штамма *P. leiognathi* Sh1: для большинства антибиотиков (амикацина сульфата, доксициклина гидрохлорида, стрептомицина сульфата, цефепима дигидрохлорида моногидрата, цефтазидима пентагидрата, цефтриаксона натрия и цефуроксима натрия) они находятся в диапазонах 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 гидрохлорида моногидрата, цефазолина натрия, цефотаксима натрия и эритромицина – 1 – 20 мкг / мл. Линейность калибровочных зависимостей подтверждена коэффициентами аппроксимации R^2 в диапазоне 0,951 – 0,999.

3. Наибольшую чувствительность методика демонстрирует в отношении цефотаксима (ПО = 0,01 ± 0,10 мкг / мл, ПКО = 0,03 ± 0,10 мкг / мл), цефтазидима (ПО = 0,01 ± 0,09 мкг / мл, ПКО = 0,04 ± 0,09 мкг / мл), эритромицина (ПО = 0,03 ± 0,23 мкг / мл, ПКО = 0,10 ± 0,23 мкг / мл) и линкомицина (ПО = 0,04 ± 0,31 мкг / мл, ПКО = 0,13 ± 0,31 мкг / мл).

4. Аналитическая область охватывает различные диапазоны концентраций для субстанций: для канамицина сульфата и цефазолина натрия верхние границы достигают 19,49 ± 1,38 и 19,49 ± 1,50 мкг / мл соответственно, для линкомицина гидрохлорида моногидрата, цефотаксима натрия, цефтазидима

пентагидрата и эритромицина нижняя граница аналитической области (ПО) снижена до 0,01 – 0,04 мкг / мл.

5. 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).

6. Значения внутрилабораторной прецизионности варьируются в интервале S – 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 моногидрата (0,49 %), доксициклина гидрохлорида (4,90 %), цефтазидима пентагидрата (4,37 %) и тетрациклина гидрохлорида (2,74 %).

7. По показателю $S_{\delta,\%}$ разработанная методика демонстрирует повышенную устойчивость по сравнению со стандартной методикой диффузии в агар для линкомицина гидрохлорида моногидрата, цефотаксима натрия и эритромицина; для стрептомицина сульфата, цефтриаксона натрия, цефепима дигидрохлорида моногидрата и цефазолина натрия – обеспечивает сопоставимую либо лучшую устойчивость. Оценка устойчивости корреляционной зависимости между интенсивностью свечения и концентрацией антибиотика с использованием 10 % β-А-оценки дисперсии $\zeta_{pb0.1}$ и 20 % винсоризованного корреляционного коэффициента Пирсона $R_{w0.2}$ подтвердила обратное направление связи и наличие очень сильной устойчивой линейной зависимости даже при наличии асимметрии в данных.

ГЛАВА 5. ИСПЫТАНИЕ МЕТОДИКИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЕЩЕСТВ

В ходе исследований, описанных в главах 3 и 4, разработана и оптимизирована высокочувствительная методика биолюминесцентного анализа для оценки антимикробной активности антибиотиков, определены ее валидационные характеристики.

Основной целью настоящей главы является апробация методики для определения антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных веществ, не вошедших в перечень ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ГФ РФ XIV-го издания, а также оценка перспективности экспресс-оценки антибиотиков с использованием разработанной методики.

5.1 Методика биолюминесцентного тестирования антибиотиков, не входящих в перечень Государственной Фармакопеи XIV-го издания

В предыдущей главе разработана методика биолюминесцентного анализа, оценены её основные статистические и валидационные параметры для антибиотиков, представленных в перечне Государственной фармакопеи XIV-го издания. Полученные результаты показали высокую чувствительность, точность и воспроизводимость методики, что позволило расширить его применение для оценки антимикробной активности других антибиотиков.

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. Оценена применимость методики для амфениколов (хлорамфеникол) и карбапенемов (меропенем). Кроме того, несмотря на то, что в Государственной Фармакопее присутствует представитель макролидов – эритромицин, для лечения инфекций чаще используется кларитромицин [72].

Согласно фармакопейным статьям, хлорамфеникол характеризуется малой растворимостью в воде, меропенема тригидрат – умеренной, а кларитромицин практически нерастворим в водной среде. В связи с этим, растворы указанных субстанций готовили в ДМСО в соответствии с ранее разработанной методикой.

В ходе исследования воздействия хлорамфеникола на биолюминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1 установлено, что антибиотик продемонстрировал наиболее выраженный ингибирующий эффект при концентрации 2 мкг / мл. Наблюдалось резкое снижение интенсивности биолюминесценции до 7,7 % от контрольного значения, а при увеличении концентрации до 4 мкг / мл биолюминесценция практически полностью подавлялась (БЛИ = 0,1 %). Зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 46.

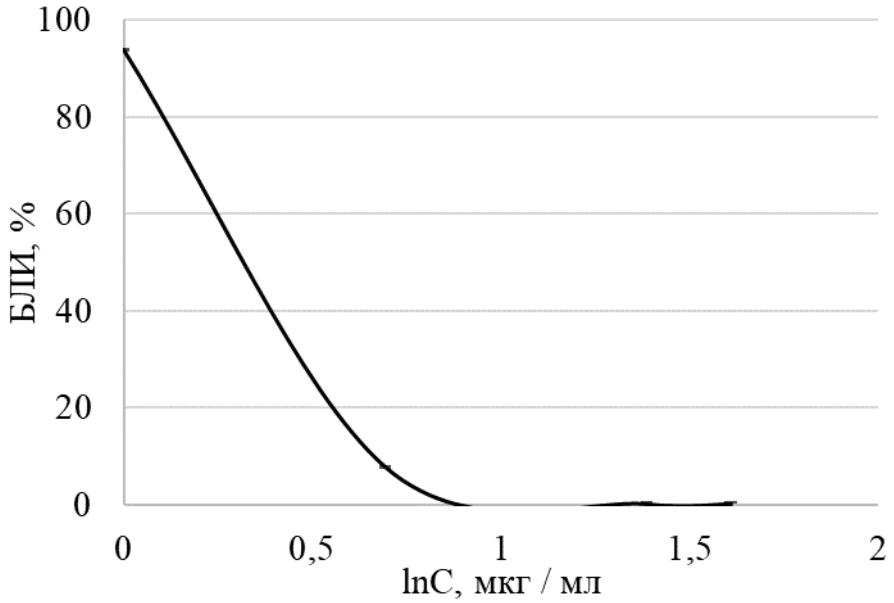


Рисунок 46 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций хлорамфеникола.

Полученные данные свидетельствуют о высокой антимикробной активности хлорамфеникола в отношении *P. leiognathi* Sh1. Это подтверждает пригодность разработанного метода для количественного определения данного антибиотика.

В ходе исследования воздействия меропенема тригидрата на биолюминесценцию бактерий *P. leiognathi* Sh1 установлено, что в концентрациях от 1 до 10 мкг / мл интенсивность свечения полностью подавлялась. Антибиотик демонстрировал подавление бактериальной люминесценции *P. leiognathi* Sh1 при

более низком диапазоне концентраций от 0,005 до 0,5 мкг / мл. Зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 47.

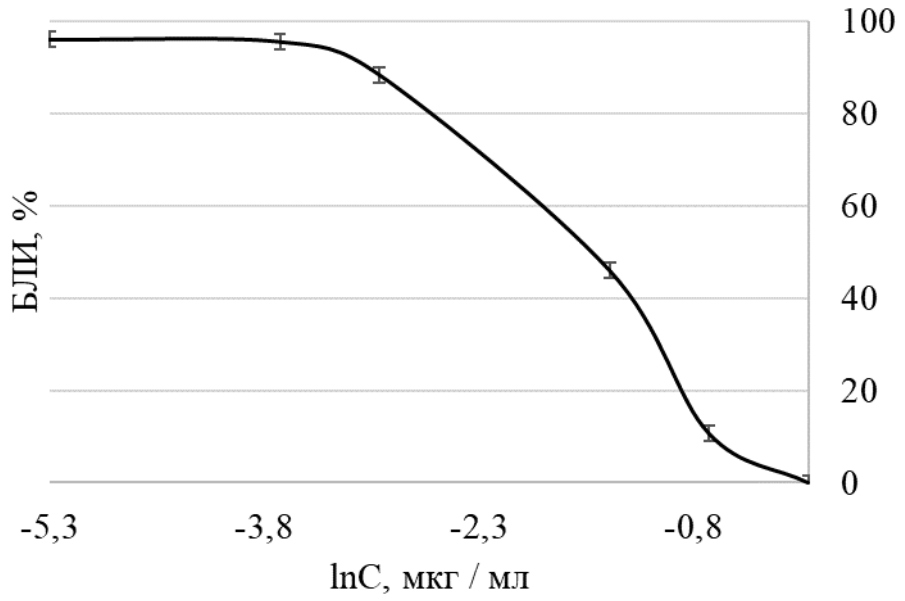


Рисунок 47 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций меропенема тригидрата.

Наличие линейной зависимости кларитромицина обнаружено от 1 до 10 мкг / мл как для большинства антибиотиков, исследованных ранее. На рисунке 48 представлена линейная зависимость БЛИ от концентраций кларитромицина.

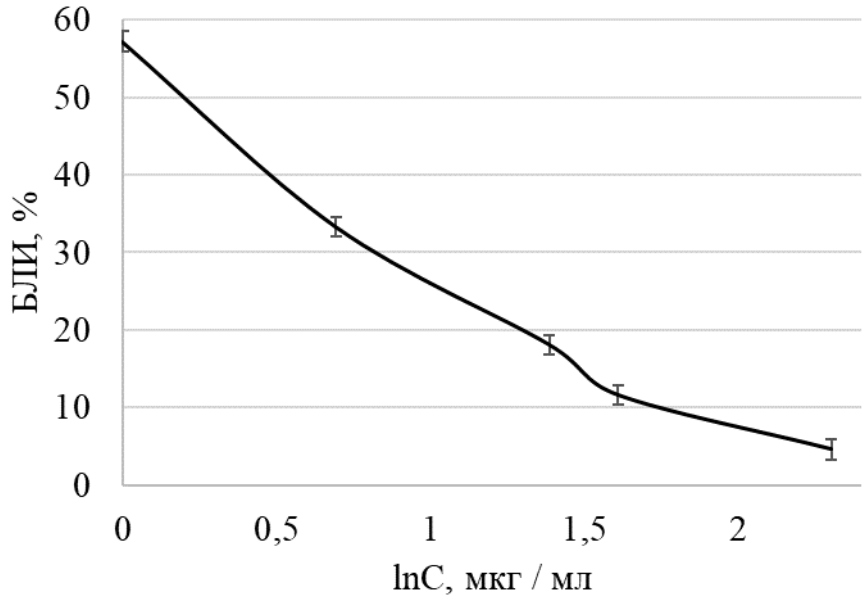


Рисунок 48 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций кларитромицина.

Высокие значения коэффициента детерминации для всех трех антибиотиков

свидетельствуют о хорошей степени соответствия полученных данных линейной регрессионной модели. R^2 в диапазоне от 0,956 до 0,998 указывает на то, что линейная регрессия объясняет значительную часть вариации в данных, что повышает достоверность полученных оценок антимикробной активности.

Значения коэффициентов наклона *b* в уравнениях показывают, что меропенем демонстрирует значительно более высокий данный показатель в сравнении с кларитромицином и хлорамфениколом. Это свидетельствует о более быстром снижении жизнеспособности бактерий от концентраций антибиотика.

Для всех трех антибиотиков при концентрациях, оказывающих максимальное ингибирующее действие на *P. leiognathi* Sh1, наблюдается относительно высокая точность результатов. Об этом свидетельствуют низкие значения S^2 и S, а также величины ε, которые чаще всего не превышают 10. Это указывает на хорошую воспроизводимость результатов при концентрациях, близких к минимальной ингибирующей концентрации.

Таким образом, экспериментальные данные продемонстрировали влияние субстанций на штамм *P. leiognathi* Sh1, что открывает возможность использования методики для оценки антимикробной активности антибиотиков, не представленных в Государственной Фармакопее. Условия проведения испытаний для антибиотиков, включая параметры тестирования и диапазоны концентраций, внесены в проект фармакопейной статьи.

5.2 Применение разработанной методики определения активности веществ, обладающих антибактериальной активностью, по измерению изменения интенсивности биолюминесценции тест-штамма

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 [10, 61, 83, 110, 279, 320]. В последнее время класс синтетических антибиотиков становится всё более перспективным в связи с развитием методов синтеза новых лекарственных молекул с заданными

свойствами: высокой активностью, специфичностью действия и минимальным риском развития резистентности у бактерий [133].

В связи с этим методика биолюминесцентного анализа и измерение изменения интенсивности свечения *P. leiognathi* Sh1 под действием синтетических антибактериальных веществ может служить критерием качества и методом количественного определения.

Основываясь на результатах, полученных в предыдущих главах, для определения антимикробной активности группы нитрофуранов (фурациллина и фуразолидона) и хинолонов (налидиксовой кислоты), а также их фторированных производных (левофлоксацина и ципрофлоксацина), исследовано влияние различных концентраций субстанций на интенсивность биолюминесценции бактерий *P. leiognathi* Sh1. Субстанции, аналогично ранее исследованным антибиотикам, растворяли в ДМСО, что обусловлено их растворимостью.

Полученные результаты продемонстрировали, что фуразолидон проявил высокую активность в подавлении бактериальной люминесценции *P. leiognathi* Sh1 при более низких концентрациях по сравнению с фурациллином. Графическое представление линейной зависимости представлено на рисунке 49.

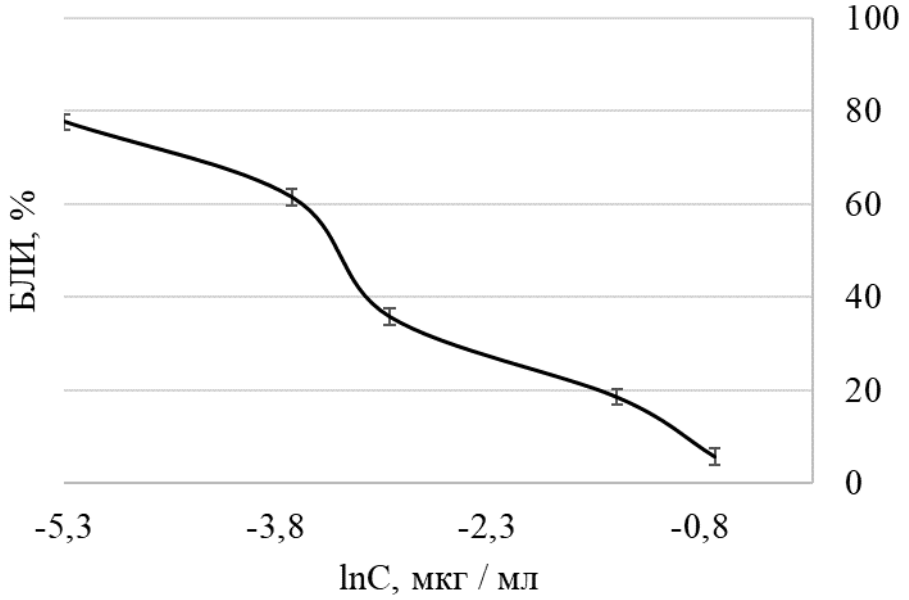


Рисунок 49 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ, от концентраций фуразолидона.

Изучение влияния производных нитрофурана на биолюминесценцию

P. leiognathi Sh1 выявило существенные различия в их активности. Фуразолидон оказывает выраженное ингибирующее воздействие на бактериальную люминесценцию, что выражено снижением интенсивности свечения до 35,8 % относительно контрольного значения уже при низкой концентрации 0,005 мкг / мл, а при увеличении концентрации до 0,01 мкг / мл люминесценция снижается до 5,7 %. Влияние сопоставимо с результатами антибиотика меропенема тригидрата. Полулогарифмическая зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 50.

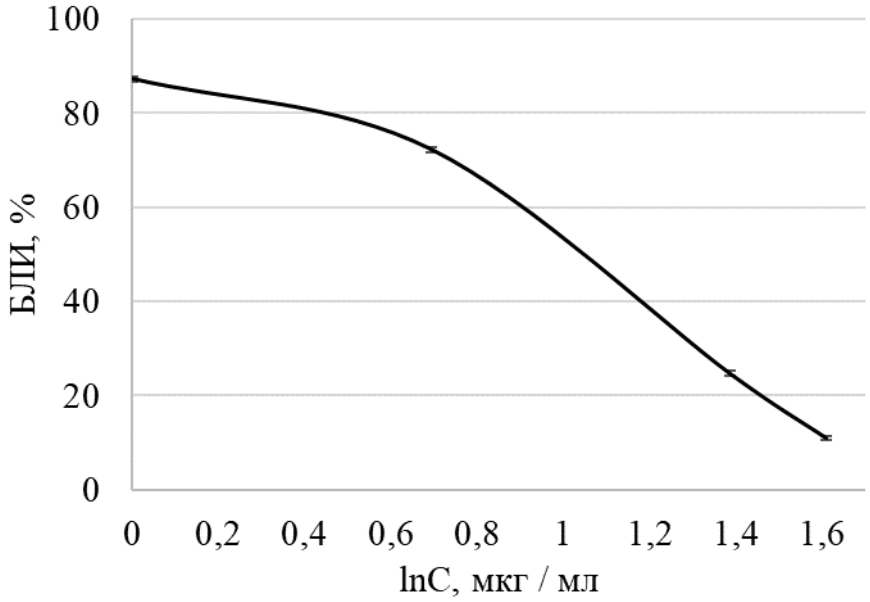


Рисунок 50 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ, от концентраций фурациллина.

Снижение интенсивности биолюминесценции при воздействии нитрофуранов может быть обусловлено как подавлением роста и жизнедеятельности бактерий в результате нарушения синтеза ДНК, РНК, белков или клеточной стенки [53], так и прямым воздействием на систему люминесценции, включая подавление синтеза люциферазы или изменение доступности необходимых для свечения субстратов. Количественная оценка зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации антибиотика с помощью коэффициента *b* подтверждает выраженную антимикробную активность фуразолидона (*b* = -244,62).

В отличие от фуразолидона фурациллин демонстрирует значительно более

слабую активность. Линейная зависимость БЛИ от концентраций антибиотика наблюдается в диапазоне концентраций от 1 до 5 мкг / мл, однако даже при концентрации 5 мкг / мл биолюминесценция сохраняется на уровне 11,0 %. Низкое значение коэффициента наклона линии регрессии (b = -0,5217) подтверждает, что фурациллин оказывает наименьшее влияние на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1 по сравнению с фуразолидоном.

Налидиксовая кислота группы хинолонов также проявляет ингибирующее воздействие на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1 (Рисунок 51).

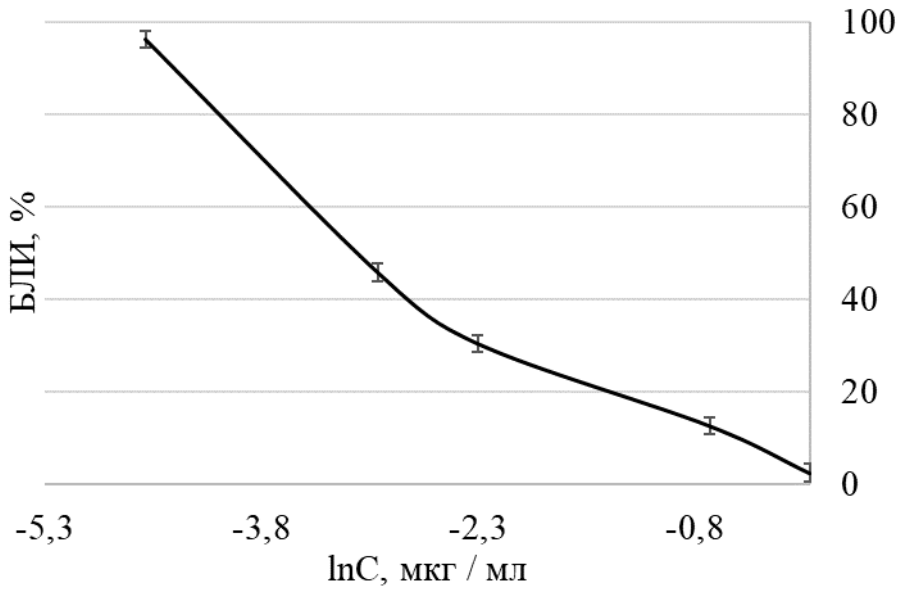


Рисунок 51 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций налидиксовой кислоты.

При концентрации 0,05 мкг / мл интенсивность свечения снижается до 45,8 % от контрольного значения, а при увеличении концентрации до 1 мкг / мл происходит практически полное подавление биолюминесценции (2,4 %). Коэффициент наклона b = -3,2751 указывает на существенное снижение интенсивности биолюминесценции с ростом концентрации налидиксовой кислоты, сравнимое с активностью азитромицина и тетрациклина (глава 4.2).

В то же время левофлоксацина гемигидрат (фторхинолон) демонстрирует сопоставимую, но менее выраженную активность в отношении ингибирования биолюминесценции. Линейная зависимость наблюдается в диапазоне концентраций от 1 до 5 мкг / мл и представлена на рисунке 52.

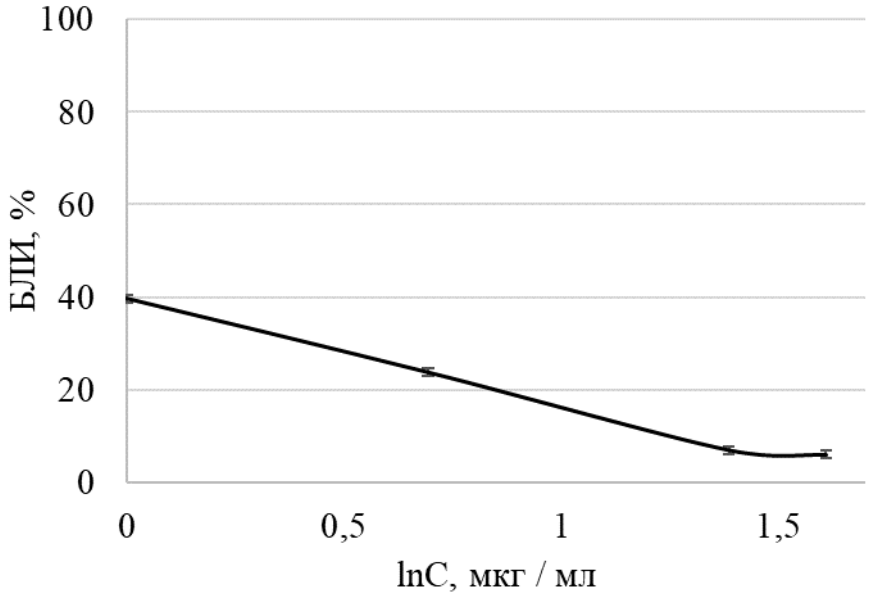


Рисунок 52 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций левофлоксацина гемигидрата.

Ципрофлоксацин, также относящийся к фторхинолонам, оказывает наименьшее воздействие на биолюминесценцию *P. leiognathi* Sh1. Даже при концентрации 0,01 мкг / мл уровень биолюминесценции составляет 18,7 %, что может свидетельствовать о более низкой чувствительности бактерий к данному антибиотику по сравнению с фуразолидоном. Зависимость БЛИ от концентраций антибиотика представлена на рисунке 53.

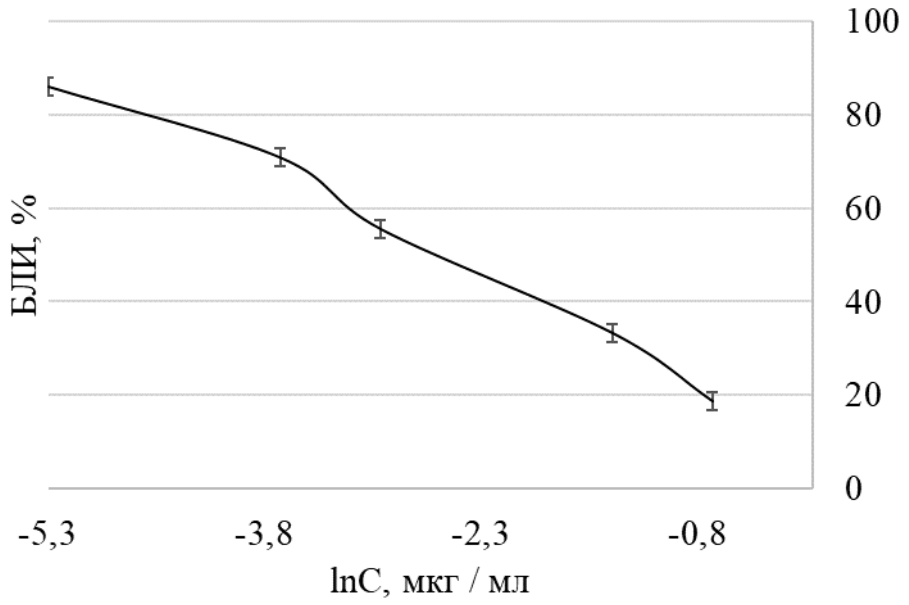


Рисунок 53 – Зависимость интенсивности биолюминесценции, выраженной в БЛИ (%), от концентраций ципрофлоксацина.

Снижение интенсивности биолюминесценции при воздействии всех

протестированных антибиотиков, как нитрофуранов, так и хинолонов, может быть связано с упомянутыми ранее факторами, влияющими как на жизнедеятельность бактерий, так и на функционирование системы биолюминесценции [95].

На основании полученных результатов и проведенного анализа можно заключить, что методика оценки антимикробных свойств, основанная на измерении изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, является пригодной и перспективной для оценки веществ, обладающих антибактериальной активностью. Установленные условия тестирования исследованных выше веществ включены в проект фармакопейной статьи.

5.3 Перспективы экспресс-оценки антибиотиков с помощью разработанной методики измерения изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма

Однако потенциал этой методики не ограничивается рассмотренными выше исследованиями. Благодаря высокой чувствительности биолюминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 к различным стрессовым факторам методика биолюминесцентного анализа может быть также использована для оценки веществ в кратковременном периоде. Оценка их влияния в течение 15 – 30 минут особенно актуальна при анализе соединений, подверженных гидролизу в водных растворах.

Известно, что бета-лактамные антибиотики в различной степени подвержены гидролизу в водных растворах. Для определения антимикробной активности ампициллина, бензилпенициллина, диклоксациллина, карбенициллина, метициллина, оксациллина, феноксиметилпенициллина, цефалексина и цефалотина Государственная фармакопея РФ XIV-го издания предлагает использование штаммов *S. aureus* 209 P, *P. aeruginosa* NCTC 2134 и *B. subtilis* ATCC 6633 для культивирования которых необходима температура (36 ± 1) ^{0}C [32].

Как показано в главе 3.4.1, повышение температуры до 37 ^{0}C и длительная инкубация (24 часа) приводят к значительной деградации бета-лактамных антибиотиков: для ампициллина натрия – снижение содержания основного вещества более чем на 35 % площади пика, для цефотаксима натрия – полное исчезновение основного пика и образование множества продуктов гидролиза. При 25 ^{0}C стабильность антибиотиков существенно выше: потери ампициллина составляют около 5 %, а для цефотаксима изменения менее выражены. Однако результаты тестирования тоже могут приводить к занижению реальной концентрации активного вещества в пробе и, как следствие, к искажению результатов оценки антимикробной активности.

С использованием методики определения антимикробной активности, основанной на измерении изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, анализируемые вещества будут менее гидролизоваться, так как бактерии культивируются при (25 ± 1) ^{0}C. Такой подход позволяет минимизировать влияние гидролиза на результаты измерения и получить более быстрое представление о концентрации активного вещества.

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. В ходе эксперимента установлено, что цефотаксим натрия оказывает снижение интенсивности свечения *P. leiognathi* Sh1 практически на 50 % в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкг / мл. На рисунке 54 представлен график зависимости БЛИ от логарифмированных концентраций цефотаксима.

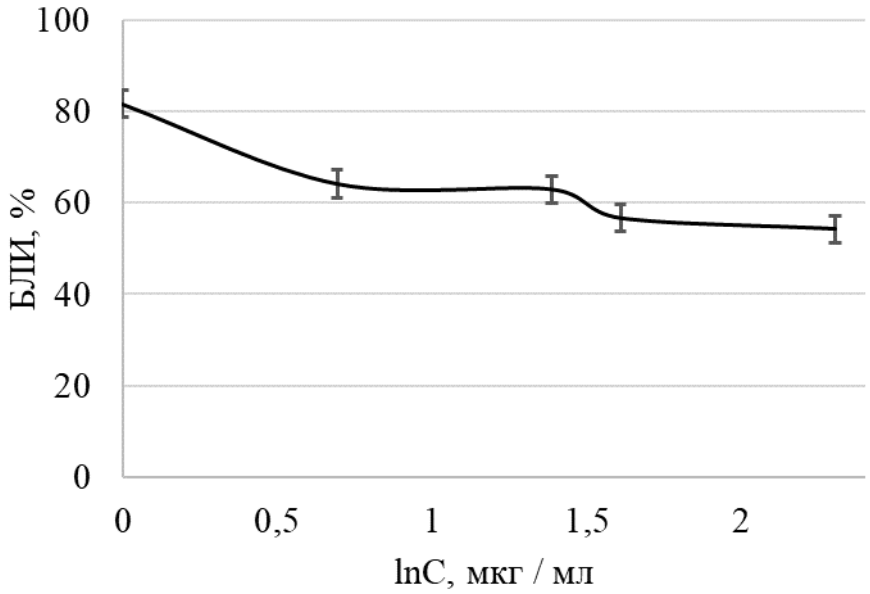


Рисунок 54 – Зависимость ингибирования интенсивности свечения бактерий, выраженной в БЛИ (%), от концентраций антибиотика цефотаксима натрия через 30 минут.

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 за счёт включения в перечень анализируемых соединений термолабильных антимикробных веществ, что создаёт дополнительные 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.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. В результате проведенных исследований продемонстрировано, что разработанная методика биолюминесцентного анализа применима для оценки антимикробной активности антибиотиков, не входящих в перечень ОФС.1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар Государственной Фармакопеи XIV-го издания. В частности, хлорамфеникол оказывал выраженный ингибирующий эффект при концентрации 2 мкг / мл, при которой интенсивность биолюминесценции снижалась до 7,7 % от контрольного значения, для меропенема тригидрата фиксировалось полное подавление свечения в диапазоне от 1 до 10 мкг / мл и заметное снижение бактериальной люминесценции при более низких концентрациях – до 0,5 мкг / мл, а для кларитромицина – линейная зависимость БЛИ от концентрации антибиотика в диапазоне от 1 до 10 мкг / мл.

2. Оценка влияния синтетических антибактериальных веществ на интенсивность свечения *P. leiognathi* Sh1 подтвердила пригодность разработанной методики для оценки их антибактериальной активности. Фуразолидон проявил высокую активность – снижение биолюминесценции до 5,7 % при 0,01 мкг / мл, коэффициент наклона b = -244,62, сопоставимую с меропенемом, тогда как фурациллин показал значительно более слабое действие (11 % свечения при 5 мкг / мл, b = -0,5217). Налидиксовая кислота (b = -3,2751) сопоставима с азитромицина дигидратом и тетрациклина гидрохлоридом, а ципрофлоксацин оказал наименьшее воздействие среди всех протестированных веществ.

3. Разработанная методика, основанная на измерении изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции *P. leiognathi* Sh1, обладает потенциалом для экспресс-оценки веществ, в том числе нестабильных антибиотиков. Методика предполагает 30-минутную инкубацию бактериальной суспензии *P. leiognathi* Sh1 с антибиотиком при 25 ± 1 ^{0}C, что замедляет гидролиз бета-лактамного кольца и сокращает время анализа. Для цефотаксима натрия рабочий диапазон концентраций составляет 1 – 10 мкг / мл.

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 ± 0,10; 0,01 ± 0,09; 0,03 ± 0,23 и 0,04 ± 0,31 мкг / мл, ПКО – 0,03 ± 0,10; 0,04 ± 0,09; 0,10 ± 0,23 и 0,13 ± 0,31 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 СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей диссертационной работе применяют следующие сокращения и обозначения:

$|\delta|$ – абсолютное значение разности между средними.

ε – относительная ошибка результата единичного определения.

δ – квадратичное отклонение.

$\mu_2 - \mu_1$ – разность средних значений.

x – среднее значение.

Δx – полуширина доверительного интервала.

b – коэффициент угла наклона.

A – фактор типа антибиотика.

AIC – информационный критерий Акаике.

BIC – Байесовский информационный критерий.

C – концентрация.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute – Институт клинических и лабораторных стандартов.

Df – степень свободы.

d(C) – зависимость величины диаметра зоны задержки от концентрации антибиотика.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам.

f – число степеней свободы.

F-статистика – F-критерий (критерий Фишера).

GMP – Good Manufacturing Practice – надлежащая производственная практика.

n – объем выборки, повторность.

P – доверительная вероятность (уровень значимости).

p-значение – проверка нулевой гипотезы.

pH – водородный показатель.

R^2 – коэффициент достоверности аппроксимации.

$R_{w0.2}$ – 20 % винсоризованный корреляционный коэффициент Пирсона.

S – фактор тип штамма.

S^2 – дисперсия.

S – стандартное отклонение.

t – Т-критерий Стьюдента.

6-АПК – производные 6-аминопенициллановой кислоты.

7-АЦК – производные 7-аминоцефалоспорановой кислоты.

95 %-ДИ – доверительный интервал.

АГ – производные аминогликозидов.

БЛИ – биолюминесцентный индекс.

БХЛ-06 – биохемилюминометр.

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

ЕД – единицы действия.

ИК – инфракрасная.

ИО – испытуемые образцы.

КФУ – Крымский федеральный университет.

Л-БАТ – лаборатория биохемилюминесцентных аналитических технологий.

ЛП – лекарственный препарат.

мг – масса в миллиграммах.

МИК – минимально ингибирующая концентрация.

МИК-50 – минимальная концентрация антибиотика, при которой подавляется рост бактерий на 50 %.

МИК-90 – минимальная концентрация антибиотика, при которой подавляется рост бактерий на 90 %.

мкг – масса в микрограммах.

мкг / мл – микрограмм на миллилитр.

мкл – объем в микролитрах.

мм – миллиметр.

ОФС – общая фармакопейная статья.

ПК – пороговая концентрация.

ПКО – предел количественного определения.

ПО – предел обнаружения.

ПС – питательная среда.

РНК – рибонуклеиновая кислота.

СО – стандартный образец.

ТСХ – тонкослойная хроматография.

УФ – ультрафиолетовая.

ФГАОУ ВО – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования.

ФС – фармацевтическая субстанция.

$ЭК_{50}$ – полумаксимальная эффективная концентрация.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдуевская Н.Н., Капустин А.В., Семина Л.К. Сравнительная оценка диско-диффузионного метода: модифицированного и стандартизированного // Вестник Ульяновской ГСХА. 2023. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnaya-otsenka-disko-diffuzionnogo-metoda-modifitsirovannogo-i-standartizirovannogo (дата обращения: 14.08.2026).

2. Аверина М.В., Цыганов И.В., Ахова А.В. и др. Зависимость между концентрацией биомассы и оптической плотностью бактериальной культуры на разных стадиях роста // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология. 2024. №2. С. 20-31.

3. Акмаров К.А., Белов Н.П., Смирнов Ю.Ю. и др. Лабораторный спектрофотометр для видимой области спектра // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2013. № 5(87). С. 39-44.

4. Александрова Т.В., Крючкова Л.К., Буданова Н.А. и др. Актуальность применения метода ИК-спектрометрии при определении подлинности лекарственных средств в условиях испытательной лаборатории по контролю качества лекарственных средств // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 10-4. С. 609-613.

5. Алешина Е.С., Каримов И.Ф., Дерябин Д.Г. Методы биолюминесцентного тестирования: методические указания к лабораторному практикуму // Оренбургский государственный университет. 2011. 56 с.

6. Алсовэйди А.К.М., Караваева О.А., Гулий О.И. Методы и подходы для определения антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. 2022. №1-2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/metody-i-podhody-dlya-opredeleniya-antibiotikov (дата обращения: 09.08.2026).

7. Аль-Шукри А.С., Коломийцева М.Р., Петров С.Б. Доксициклин в лечении инфекций мочевыводящих путей // Consilium Medicum. 2024. Т. 26, № 7. С. 471-477.

8. Андреева Е.А. Определение тетрациклина в лекарственных препаратах // БМИК. 2019. Т. 9, № 2. С 87.

9. Арзамасцев А.П. Фармацевтическая химия: учеб. пособие для студентов мед. вузов, обучающихся по специальности 04.05.00 – Фармация // М.: Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2004. 635 с.

10. Архипов Е.В., Сигитова О.Н., Богданова А.Р. Современные рекомендации по диагностике и лечению пиелонефрита с позиции доказательной медицины // Вестник современной клинической медицины. 2015. Т. 8, № 6. С.115-120.

11. Асташкина А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения // Томск: Издательство Томского политехнического университета, 2015. 19 с.

12. Афанасьев А.В., Белова Е.В., Герман К.Э. и др. Химические и физико-химические методы исследования в медицине и биологии: Учебное пособие // М.: Издательство «Граница», 2019. 148 с.

13. Ахатов А.Р., Парманов Б.З., Эштемиров Б.Ш. Состав устройства монохроматора для микропроцессорного портативного спектрофотометра // Вестник науки и образования. 2021. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/sostav-ustroystva-monohromatora-dlya-mikroprotsessornogo-portativnogo-spektrofotometra (дата обращения: 16.03.2026).

14. Басарева О.И., Костров С.В., Букреева Е.М. и др. Сравнительный анализ антимикробной активности новых биологически активных соединений и лекарственных форм на их основе // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 5. С. 148.

15. Батаева Д.С., Панфилова Е.П. Качество питательных сред – залог достоверности и воспроизводимости результатов микробиологических исследований // Журнал Все о мясе. 2018. №2. С. 41-45.

16. Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза // М.: Техносфера, 2009. 472 с.

17. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия: учебное пособие для

студентов, обучающихся по специальности 06.01.08 (04.05.00) – Фармация. 3-е изд. // М.: МЕДпресс-информ, 2009. 615 с.

18. Белов М.В., Шахмурадян М.А. Совершенствование бизнес-процессов фармацевтического предприятия на этапе доклинической разработки лекарственного средства // Бизнес-информатика. 2019. Т. 13, № 4. С. 17-27.

19. Белоусов Ю.Б., Филиппова О.В., Селютин О.А. и др. Сравнительная характеристика препаратов ванкомицина, зарегистрированных в РФ // Качественная клиническая практика. 2009. URL: https://www.critical.ru/actual/IT/vankocomp.htm (дата обращения: 16.03.2026).

20. Бисекенова А.Л., Рамазанова Б.А., Адамбеков Д.А. и др. Молекулярные механизмы резистентности грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей инфекций к бета-лактамным антибиотикам // Вестник КазНМУ. 2015. №3. С. 223-227.

21. Будунова А.Ю., Гольцберг М.А., Красивский Г.А. Количественная тонкослойная хроматография перспективный метод определения органических и неорганических веществ // Известия вузов. Пищевая технология. 2003. № 5-6. С. 115-118.

22. Бузмакова У.А., Кудряшова О.С. Химическая классификация и методы определения антибиотиков // Вестник ПГУ. 2018. Т. 8, № 1. С. 6-28.

23. Буйлова И.А., Савкина М.В., Саяпина Л.В. и др. Оценка современного состояния фармацевтической разработки противостафилококковых профилактических препаратов // Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2024. Т. 101, № 4. С. 560-572.

24. Васильев А.Н., Гавришина Е.В., Ниязов Р.Р. и др. GMP как элемент обеспечения качества, безопасности и эффективности лекарственных препаратов // Ремедиум. 2014. №3. С.18-24.

25. Габриэлян Н.И., Драбкина И.В., Крупенио Т.В. и др. Антимикотическая активность штамма *Bacillus subtilis* 534 – основы лекарственного препарата пробиотика споробактерина // Антибиотики и химиотерапия. 2017. Т. 62, №11-12. С. 7-11.

26. Гавриченко Ю.Ю., Сафронюк С.Л., Кацев А.М. и др. Скрининг антимикробной активности водных и спиртовых извлечений из растительного сырья с использованием биолюминесцентных бактерий // Вестник Воронежского государственного университета. 2022. № 1. С. 60-69.

27. Герна Р. Хранение микроорганизмов. Методы общей бактериологии: пер. с англ. // М.: Мир, 1983. 534 с.

28. Глазырина Ю.А., Сараева С.Ю., Козицина А. Н. и др. Оптические методы в фармацевтическом анализе: лаборатор. практикум // Екатеринбург: Издательство УрГУ, 2015. 96 с.

29. Глухарева Т.В., Селезнева И.С., Уломский Е.Н. Основы получения и применения антибиотиков: учебное пособие // Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2021. 150 с.

30. Годовалов А.П., Антонян А.А., Горбунова Е.А. Особенности микрофлоры толстокишечного биотопа, колонизированного *S. aureus* и *C. albicans* // ЭиКГ. 2018. Т. 153, № 5. С. 61-65.

31. ГОСТ Р 52249-2009 Национальный стандарт Российской Федерации. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP). – М.: Стандартинформ, 2010. – 138 с.

32. Государственная фармакопея Российской Федерации, XII издание, часть 1 // М.: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. 696 с.

33. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: Медицина. 2018. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14 (дата обращения: 16.03.2026).

34. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Москва: Медицина. 2023. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15 (дата обращения: 16.03.2026).

35. Гурьев А.С., Шалатова О.Ю., Русанова Е.В. и др. Когерентная

флуктуационная нефелометрия в клинической микробиологии // Инфекция и иммунитет. 2019. №2. С. 385-392.

36. Гюлазян Н.М., Белая О.Ф., Малов В.А. и др. Липополисахариды/эндотоксины грамотрицательных бактерий: роль в развитии интоксикации // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. №2. С. 11-16.

37. Давидович Н.В., Кукалевская Н.Н., Башилова Е.Н. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. №6. Т. 65, № 6. С. 387-393.

38. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е. и др. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник Московского Университета. 2002. № 3. С. 20-24.

39. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты // М.: Наука, 2009. 245 с.

40. Дмитриева Н.Б., Кукушкин Г.В. Антибиотики, общие сведения. Антибиотики, нарушающие синтез клеточной стенки и целостность цитоплазматической мебраны бактерий // ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 2025. 20 с.

41. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Григорьевская З.В. Сравнительный анализ активности гликопептидов и линезолида в отношении нозокомиальных штаммов грамположительных микроорганизмов, выделенных от онкологических пациентов // Сибирский онкологический журнал. 2021. №5. С. 93-99.

42. Домотенко Л.В., Косилова И.С., Шепелин А.П. Отечественный агар Мюллера-Хинтон: соответствие современным требованиям // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 409-416.

43. Другов Ю.С., Зенкевич И.Г., Родин А.А. Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды, почвы и биосред: практическое руководство // М.: Издательство «Лаборатория знаний», 2015. 596 с.

44. Дювенжи Е.В., Неволина Е.Д., Мартьянов С.В. и др. Бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* 209P и *Kytococcus schroeteri* H01:

дуалистическая роль китококков и изменения клеточной адгезии в присутствии натрийуретического пептида А-типа // Микробиология. 2022. Т. 91, № 5. С. 597-612.

45. Елизарова Т.Е., Плетенева Т.В. Оценка подлинности лекарственных субстанций и готовых лекарственных средств методом спектрофотометрии ближнего диапазона // Образовательный вестник «Сознание». 2007. Т. 9, № 7. С. 263-267.

46. Есаулов А.С., Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л. Общая микробиология: учебное пособие / Пенза: Пензенский государственный университет, 2015. 96 с.

47. Жильцов И.В., Моисеев Д.В., Семенов В.М. и др. Распад бета-лактамных антибиотиков под воздействием нативной сыворотки крови и человеческого сывороточного альбумина // Проблемы здоровья и экологии. 2011. №3 (29). С. 31-35.

48. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов для детекции токсичных веществ // Химическая физика. 2012. Т. 31, № 10. С. 15-20.

49. Землянко О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. 2018. Т. 16, №3. С. 4-16.

50. Зубарева В.Д., Соколова О.В., Безбородова Н.А. и др. Молекулярные механизмы и генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам у микроорганизмов (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2022. Т. 57, №2. С. 237-256.

51. Иванова А.Ю., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Разработка и оценка качества отечественной питательной среды для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* // Бактериология. 2022. Т. 7, № 1. С. 18-24.

52. Игнатенко А.В., Аль-Хаммаш Н.М. Анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов *E. coli* // Труды Белорусского государственного технологического университета. 2012. №4. С. 173-175.

53. Казюлин А.Н. Лечение неосложненных инфекций мочевыводящих путей. Место препаратов нитрофуранового ряда в современных условиях // Лечащий врач. 2017. №2. С. 1-7.

54. Касимова А.Р., Божкова С.А., Туфанова О.С. и др. Выбор антибиотиков для лечения ортопедической инфекции, вызванной грамположительными возбудителями, по результатам 12-летнего наблюдения. Часть 1: пенициллины, цефалоспорины, гликопептиды, оксазолидиноны, фузидиевая кислота, рифампицин // Травматология и ортопедия России. 2025. Т. 31, № 2. С. 5-17.

55. Кацев А.М. Кинетические исследования взаимодействия бактериальных липополисахаридов с полимиксином биолюминесцентным методом // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. 2014. Т. 27(66), № 4. С. 100-108.

56. Кацев А.М., Макемсон Д. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. 2006. Т. 19, № 4. С. 111-116.

57. Кацев А.М., Сафронюк С.Л. и др. Оценка применимости биолюминесцентного анализа при определении активности лекарственных препаратов // Ветеринарна біотехнологія. 2013. № 22(22). С. 188-195.

58. Кацев А.М., Сафронюк С.Л., Османова С.Я. и др. 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.

59. Кацев А.М., Сафронюк С.Л., Османова С.Я. и др. 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.

60. Кацев А.М., Шандровская А.С., Абдураманова Э.Р. Оптимизация выбора органических растворителей для проведения скринигового биотестирования лекарственных веществ // Запорожский медицинский журнал.

2011. Т. 13, № 1. С. 83-86.

61. Кораблева А.А., Юдина Е.В., Зиганшиной Л.Е. Антибиотикопрофилактика инфекций области хирургического вмешательства: учебное пособие // Казань: Казанский университет, 2014. 88 с.

62. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для студентов мед. вузов // СПб.: Издательство «СпецЛит», 2012. 760 с.

63. Костенко А.Н. Применение производной спектрофотометрии в анализе лекарственных препаратов // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2019. Т. 9, № 2. С. 82-88.

64. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16-25.

65. Котова В.Ю., Рыженкова К.В., Манухов И.В. и др. Индуцируемые специфические lux-биосенсоры для детекции антибиотиков: конструирование и основные характеристики // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50, № 1. С. 112-117.

66. Кривицкая А.В., Хренова М.Г. Механизм реакции ингибирования пенициллинсвязывающих белков цефтриаксоном // Российский университет дружбы народов. 2023. С. 97-98.

67. Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Филогенетическое разнообразие и биологические свойства уропатогенных штаммов *Escherichia coli* // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. №3. С. 23.

68. Кукес В.Г., Сычев Д.А. и др. Клиническая фармакология: учебник – 6-е изд. // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 1024 с.

69. Кулапина Е.Г., Баринова О.В., Кулапина О.И. и др. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах (обзор) // Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54, № 9-10. С. 53-60.

70. Кулешова С.И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского

применения. 2015. Т. 3. С. 13-17.

71. Лавренчук Л.С., Ермошин А.А. Микробиология: практикум // Екатеринбург: Издательство Уральского Университета, 2019. 107 с.

72. Лазарева Н.Б., Реброва Е.В., Рязанова А.Ю. и др. Макролиды: современная позиция в пульмонологической практике // Практическая пульмонология. 2019. №1. С. 66-75.

73. Ларькина М.С., Кадырова Т.В. Стандартизация лекарственных средств: практикум по фармацевтической химии // Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2016. 83 с.

74. Лепехина Е.В., Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Действие стрептомицина на бактерии *E. coli*, мутантные по тиоловым редокс-системам, при температурных стрессах // Вестник ПНИПУ. 2015. № 4. С. 64-72.

75. Литвинов И., Пискарева А., Ингинова К. Особенности фармакодинамики аминогликозидов // Успехи современного естествознания. 2014. № 6. С. 104-105.

76. Литусов Н.В. Морфология и структура бактерий. Иллюстрированное учебное пособие // Екатеринбург: Уральский государственный медицинский университет, 2012. 50 с.

77. Лобанова Е.Г., Чекалина Н.Д. Современные аспекты фармакологии и клинического применения аминогликозидов // Оториноларингология и пульмонология. 2021. URL: https://www.rlsnet.ru/library/articles/otorinolaringologiya-i-pulmonalogiya/sovremennye-aspekty-farmakologii-i-kliniceskogo-primeneniya-aminoglikozidov-76 (дата обращения: 22.07.2026).

78. Лукьянов С.В. Рациональный выбор цефалоспоринов при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний // Тихоокеанский медицинский журнал. 2006. №1. С. 11-13.

79. Лукьянова Е.М. Нефротоксичность антибиотиков у новорожденных // Педиатрическая фармакология. 2003. Т. 1, № 4. С. 33-41.

80. Мажитова М.В., Старикова А.А., Уранова В.В. Методы определения антибиотиков как компонентов фармацевтических субстанций и лекарственных

форм, биологических жидкостей и объектов окружающей среды // Прикаспийский вестник медицины и фармации. 2025. №2. С. 6-15.

81. Малыгина И.Ю., Кацев А.М. Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей // Экология моря. 2003. Т. 64. С.18-23.

82. Манухов И.В., Котова В.Ю., Мальдов Д.Г. и др. Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *Escherichia coli* растительными экстрактами: роль гидроперекисей и эффект синергизма при совместном действии с цис платиной // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 590-597.

83. Мартыканова Д.С., Поздеев О.К., Вершинина В.И. и др.Производные нитрофурана в коррекции кишечной микрофлоры детей с дисбактериозами // Казанский медицинский журнал. 2005. Т. 86, №6. С. 501-503.

84. Мелешко А.А., Афиногенова А.Г., Афиногенов Г.Е. и др. Антибактериальные неорганические агенты: эффективность использования многокомпонентных систем // Инфекция и иммунитет. 2020. Т.10, №4. С. 639-654.

85. Меликова А.Я. Применение методов турбидиметрии и нефелометрии в биомедицине // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. 2023. №2 (70). С. 64-70.

86. Миклис Н.И., Адаменко Г.В., Бурак И.И. Микробиологическая эффективность спиртосодержащих лекарственных средств для профилактической антисептики // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2019. Т. 18, №6. С. 30-36.

87. Миронов А.Ю., Крапивина И.В., Мудрак Д.Е. и др. Молекулярные механизмы резистентности к β-лактамам патогенов внутрибольничных инфекций // Клиническая лабораторная диагностика. 2012. № 1. С. 39-43.

88. Михайлова Н.И., Лукашов Р.И. Влияние температуры на степень протекания гидролиза амоксициллина тригидрата // III Международная научно-практическая конференция. Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы. 2024. С. 144-147.

89. Моисеева И.Я., Родина О.П., Ктикова И.Н. Основы клинической фармакологии противомикробных средств // Пенза: Пенз. гос.ун-т, 2004. 72 с.

90. МУК 4.2.1890-04 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

91. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Общая микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений // М.: Академия, 2007. 220 с.

92. Неугодова Н.П., Рябцева М.С., Сапожникова Г.А. Основные требования к биологическим показателям при оценке качества лекарственных средств. Возможности валидации биологических методов контроля // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2016. № 3. С. 3-8.

93. Никитина Н.Г., Борисов А.Г., Хаханина Т.И. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа: учебник и практикум для академического бакалавриата // М.: Издательство Юрайт, 2018. 394 с.

94. Ниязов Р.Р., Васильев А.Н., Гавришина Е.В. и др. Качество лекарственных препаратов: связь нормативной документации со спецификацией, регистрационным досье, фармакопеей и GMP // Ремедиум. 2017. № 4. С. 64-71.

95. Новиков В.Е. Фармакология хинолонов и фторхинолонов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2008. №3. С. 57-61.

96. Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: [Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4]. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 975 с.

97. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам // М.: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2015. с. 162.

98. Оркина Т.Н. Химия. Химический и физико-химический анализ: учебное пособие // СПб.: Издательство Политехнического университета, 2012. 45 с.

99. 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.

100. 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.

101. 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.

102. 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.

103. 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.

104. 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.

105. 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.

106. 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.

107. Охапкина В.Ю., Пяткова Н.В., Федотов А.К. Метод ускоренной оценки эффективности антибактериальных препаратов при экспериментальном бруцеллезе // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. №2. С. 79-82.

108. Падейская Е.Н. Аминогликозиды – антимикробные препараты широкого спектра действия: значение в терапии бактериальных инфекций на современном этапе // Consilium Medicum. 2006. Т. 8, № 1. С. 24-34.

109. Панин Н.В., Гуранда Д.Ф., Шаповалова И.В. и др. Пенициллинацилаза: ретроспектива изучения кинетики и термодинамики практически значимых реакций // Вестник Московского университета. 2023. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/penitsillinatsilaza-retrospektiva-izucheniyakinetiki-i-termodinamiki-prakticheski-znachimyh-reaktsiy (дата обращения: 20.04.2024).

110. Перепанова Т.С. Нитрофураны в урологической практике: все ли они одинаковые и почему мы возвращаемся к ним сегодня? // Экспериментальная и клиническая урология. 2018. № 3. С. 91-97.

111. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04. ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04. Токсикологические методы контроля. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных

вод, водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» // М.: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, 2004. URL: https://ohranatruda.ru/upload/iblock/99f/4293837368.pdf (дата обращения: 20.04.2024).

112. Полищук А.В., Карасева Э.Т., Карасев В.Е. Антимикробная активность и фототоксичность фторхинолонов при УФ-облучении // Вестник ДВО РАН. 2006. №6. С. 111-114.

113. Поляк М.С. Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии // СПб.: Анатолия, 2012. 256 с.

114. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии // СПб.: Издательство «ЭЛБИ-СПБ», 2008. 352 с.

115. Прунтова О.В., Сахно О.Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии // Владимирский государственный университет. 2005. 76 с.

116. Регистр лекарственных средств России РЛС // М.: Регистр Лекарственных Средств России, 2026. URL: www.rlsnet.ru (дата обращения: 15.03.2026).

117. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 4. С. 348-354.

118. Родичева Э.К., Кузнецов А.М., Медведева С.Е. Биолюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга // Вестник Оренбургского государственного университета. 2004. № 5. С. 96-100.

119. Рудаков О.Б., Востров И.А. Спутник хроматографиста // Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.

120. Рягузов А.И. Нефелометрия и турбидиметрия в количественном анализе // Вестник российских университетов. 1996. №2. С. 138-141.

121. Саканян Е.И., Шемерянкина Т.Б., Бармин А.В. и др.

Фармацевтические субстанции. Требования Государственной фармакопеи к их стандартизации // Антибиотики и химиотерапия. 2017. № 5-6. С. 63-67.

122. Салий Е.А., Гончарук А.Ю., Гетало О.В. и др. Разработка и оценка лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций на основе доксициклина // Вестник фармации. 2021. № 3(93). С. 53-63.

123. Самолюк В.В. Оценка активности лекарственных препаратов с помощью биотестов на основе новых морских люминесцентных бактерий, выделенных из акваторий Азовского и Черного морей // Издательство Типография «Ариал». 2019. С. 175-177.

124. Сафронюк С.Л. Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов: дис. канд. фармацевт. наук: 3.4.2/Сафронюк Сергей Леонидович. – Самара, 2022. – 180 с.

125. Сафронюк С.Л., Гавриченко Ю.Ю., Кацев А.М. и др. Оценка применимости природных люминесцентных бактерий, выделенных из Азовского и Черного морей, для определения антимикробной активности антибиотиков // Аспирантский вестник Поволжья. 2020. № 5-6. С. 175-183.

126. Сафронюк С.Л., Гавриченко Ю.Ю., Кацев А.М. Использование биолюминесцентных бактерий для оценки антибиотических эффектов лекарственных препаратов // Воронеж: Вестник Воронежского государственного университета, 2018. № 1. С. 194-203.

127. Сафронюк С.Л., Гавриченко Ю.Ю., Кацев А.М. Применимость рекомбинантных lux-биосенсоров для выявления некоторых механизмов антибактериальной активности направленно синтезированных производных 2-((2-оксо-3-фенил-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-С]хиназолин-6-ил)тио)уксусной кислоты // Биофармацевтический журнал. 2020. Т. 12, № 5. С. 26-32.

128. Сафронюк С.Л., Кацев А.М. Новые подходы к изучению биологической активности лекарственных веществ с использованием природных и генно-инженерных биолюминесцентных бактерий // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2017. №. 1. С. 502-507.

129. Сафронюк С.Л., Кацев А.М. Новые подходы к оценке взаимосвязи строения и специфической активности веществ на примере производных 1,2,4-триазинохиназолин-2-онов // Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского. 2019. С. 126-131.

130. Сафронюк С.Л., Крамарь Т.В., Назаренко М.В. Оценка влияния заместителей в гетерофункциональных производных 1,2,4-триазинохиназолинтиоуксусной кислоты на биолюминесценцию бактерий // Вестник Томского государственного университета. 2016. № 4(6). С. 39-49.

131. Селизарова Н.О. Антибиотики, нарушающие синтез макромолекул // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2003. Т. 1, № 1. С. 71-79.

132. Семенова Е.Н., Кулешова С.И., Лутцева А.И. и др. Турбидиметрический метод в определении биологической активности антибиотиков группы аминогликозидов // Фармация. 2019. № 68(5). С. 44-50.

133. Сидоренко С.В. Фторхинолоны: свойства и клиническое применение // Трудный пациент. 2011. №5. С. 21-27.

134. Сидоренко С.В., Колупаев В.Е. Антибиотикограмма: Диско-диффузионный метод. Интерпретация результатов // Русский медицинский сервер. 2024. URL: https://rusmedserv.com/microbiology/standard/article_205.html (дата обращения: 15.03.2026).

135. 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.

136. 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.

137. Стецюк О.У., Решедько Г.К. Сравнение результатов определения

чувствительности к антибиотикам грамотрицательных аэробных бактерий диско-диффузионным методом на среде АГВ и агаре Мюллера-Хинтон // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004. № 2. С. 155-167.

138. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия // Руководство для врачей. 2007. URL: http://www.antibiotic.ru/books/mach/mac0112.shtml (дата обращения: 15.03.2026).

139. Супотницкий М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011. Т. 42, № 2. С. 4-13.

140. Сухорукова М.В. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам: что стоит за результатом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013. Т. 15, № 3. С. 219-229.

141. Тапальский Д.В., Бильский И.А. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех // КМАХ. 2018. Т. 20, №1. С. 62-67.

142. Тер-Аветисьянц И.А., Мирошниченко П.В., Хатхакумов С.С. и др. Влияние гентамицина на факторы резистентности иммунного организма // Евразийский Союз Ученых. 2016. № 3-5(24). С.143-146.

143. Устинова М.Н., Филиппова К.А. Окислительная деструкция тетрациклинов // Известия Саратовского университета. 2025. Т. 25, № 1. С. 23-33.

144. Фаращук Н.Ф., Цюман Ю.П. Современные, наиболее употребляемые лабораторные методы исследования антибиотиков // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2012. № 4(11). С. 58-63.

145. Фомин А.Н., Хомов Ю.А. Валидационная оценка методики определения доксициклина в моче спектрофотометрическим методом после электрофоретического выделения // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 3. URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=6159 (дата обращения: 15.08.2026).

146. Ходош Э.М., Ефремова О.А., Ефименко Е.В. Антибиотикотерапия и макролиды: фрагменты понимания // Актуальные проблемы медицины. 2016.

№12 (233). С. 27-33.

147. Хосева Е.Н., Морозова Т.Е. Организация контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств на государственном уровне за рубежом и в России // Качественная клиническая практика. 2013. № 2. С. 53-58.

148. Шкурат М.А., Покудина И.О., Батталов Д.В. Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам // Живые и биокосные системы. 2014. № 10. 10 с.

149. Шубникова Е.В., Вельц Н.Ю. Ототоксичность аминогликозидов: современные представления // Антибиотики и химиотерапия. 2022. Т. 67, №11-12. С. 79-90.

150. Ямпольский И.В., Царькова А.С., Дубинный М.А. и др. Биолюминесценция: возрождение // Природа. 2014. № 7(1187). С. 10-16.

151. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // Российский химический журнал. 2003. Т. 47, № 1. С. 64-79.

152. Aaron S.E., Tosheska-Trajkovska K., Cekovska S. et al. Establishment of an EC_{50} database of pesticides using a *Vibrio fischeri* bioluminescence method // Luminescence. 2019. Vol. 34, № 5. P. 508-511.

153. Aguirre-Martínez G.V., Owuor M.A., Garrido-Perez C. et al. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs // Chemosphere. 2015. Vol. 120. P. 75-85.

154. Akpaka P.E., Kissoon S., Wilson C. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Bermuda // PLoS One. 2017. Vol. 12, № 3. P. 0171317.

155. Ali A.H. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review // Annals of Advances in Chemistry. 2022. Vol. 6, № 1. P. 10-20.

156. Ali Ahmed S.M. New spectrophotometric method for determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations // Arabian Journal of Chemistry. 2015.

Vol. 8. P. 233-239.

157. Arsene M.M.J., Podoprigora I., Volina E.G. Prolonged Exposure to Antimicrobials Induces Changes in Susceptibility to Antibiotics, Biofilm Formation and Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* // Journal of Pharmaceutical Research International. 2021. Vol. 33, № 34B. P. 140-151.

158. Auger S., Ramarao N., Faille C. et al. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group // Applied and Environmental Microbiology. 2009. Vol. 75, № 20. P. 6616-6618.

159. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review // Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis. 2016. Vol. 6, № 2. P. 71-79.

160. Barth P.T., Richards H., Datta N. Copy number of coexisting plasmids in *Escherichia coli* K-12 // Journal of Bacteriology. 1978. Vol. 135. P. 760-765.

161. Basu O.D., Dorner S. Potential Aquatic Health Impacts of Selected Dechlorination Chemicals // Water Quality Research Journal of Canada. 2010. Vol. 45, № 3. P. 353-363.

162. Ben-David A., Davidson C.E. Estimation method for serial dilution experiments // Journal of Microbiological Methods. 2014. Vol. 107. P. 214-221.

163. Ben-Israel O., Ben-Israel H., Ulitzur S. Identification and quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying lux genes fused to stress promoters // Applied and Environmental Microbiology. 1998. Vol. 64, № 11. P. 4346-4352.

164. Bentley R., Bennett J.W. What Is an Antibiotic? Revisited // Advances in Applied Microbiology. 2003. P. 303-331.

165. Bereda G. Clinical Pharmacology of Ampicillin // Journal of Pharmaceutical Research & Reports. 2022. URL: https://www.researchgate.net/publication/362686222_Clinical_pharmacology_of_Ampicillin (date of access: 15.03.2026).

166. Berglind R., Leffler P., Sjöström M. Interactions between pH, potassium, calcium, bromide, and phenol and their effects on the bioluminescence of *Vibrio fischeri* // Journal of Toxicology and Environmental Health. 2010. Vol. 73, № 16.

P. 1102-1112.

167. Bhargav H.S., Shastri S.D., Poornav S.P. Measurement of the Zone of Inhibition of an Antibiotic // 6th International Advanced Computing Conference. 2016. P. 409-414.

168. Blázquez J., Rodríguez-Beltrán J., Matic I. Antibiotic-induced genetic variation: how it arises and how it can be prevented // Annual Review of Microbiology. 2018. Vol. 72. P. 209-230.

169. Blum F. High performance liquid chromatography // British Journal of Hospital Medicine. 2014. Vol. 75, № 2. P. 18-21.

170. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. The management and exploitation of naturally lightemitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial // Analytica Chimica Acta. 2016. Vol. 934. P. 22-35.

171. Bonev B., Hooper J., Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008. Vol. 61, № 6. P. 1295-1301.

172. Borriss R., Danchin A., Harwood C.R. et al. *Bacillus subtilis,* the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement // Microbial Biotechnology. 2018. Vol. 11, № 1. P. 3-17.

173. Bulich A.A., Isenberg D.L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity // ISA Transactions. 1981. Vol. 20, № 1. P. 29-33.

174. Cai L. Thin Layer Chromatography // Current Protocols Essential Laboratory Techniques. 2014. Vol. 8, № 1. P. 6.3.1-6.3.18.

175. Chayani N., Tiwari S., Sarangi G. et al. Role of azithromycin against clinical isolates of family *Enterobacteriaceae*: A comparison of its minimum inhibitory concentration by three different methods // Indian Journal of Medical Microbiology. 2009. Vol. 27, № 2. P. 107-110.

176. Chen L., Qi J., Chang Y.-X. et al. Identification and determination of the major constituents in Traditional Chinese Medicinal formula danggui-Shaoyao-San by HPLC-dAd-ESI-MS/MS // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009. Vol. 50, № 2. P. 127-137.

177. Cheng S.-C., Huang M.-Z., Shiea J. Thin layer chromatography/mass spectrometry // Journal of Chromatography A. 2011. Vol. 1218, № 19. P. 2700-2711.

178. Christensen D.G., Tepavčević J., Visick K.L. Genetic Manipulation of *Vibrio fischeri* // Current Protocols in Microbiology. 2020. Vol. 59, № 1. P. 115.

179. Christodoulou M.C., Palacios J.C.O., Hesami G. et al. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals // Antioxidants (Basel). 2022. Vol. 11, № 11. P. 2213.

180. Cohen D., Swift G. Laboratories and regulator misled over antibiotic susceptibility test discs // British Medical Journal. 2013. Vol. 346.

181. Cooney S., O'Brien S., Iversen C. et al. Bacteria: Other Pathogenic *Enterobacteriaceae – Enterobacter* and Other Genera // Encyclopedia of Food Safety. 2013. P. 433-441.

182. Dadi M., Yasir M. Spectroscopy and Spectrophotometry: Principles and Applications for Colorimetric and Related Other Analysis // Colorimetry. 2022. URL: https://www.intechopen.com/chapters/79874 (date of access: 16.03.2026).

183. Dafale N.A., Semwal U.P., Rajput R.K. et al. Selection of appropriate analytical tools to determine the potency, microbial bioactivity and antibiotic resistances // Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016. Vol. 6, № 4. P. 207-213.

184. Dafopoulou K., Zarkotou O., Dimitroulia E. et al. Reply to «Reliability of Gradient Diffusion Methods for Detection of Acquired Colistin Resistance» // Antimicrob Agents Chemother. 2016. Vol. 60, № 7. P. 4424-4425.

185. Dai Y., Chen D., Wang G. et al. Kinetic modeling and analysis of dynamic bioluminescence imaging of substrates administered by intraperitoneal injection // Quant Imaging Med Surg. 2020. Vol. 10, № 2. P. 389-396.

186. Daoudi Y., Daoudi S., Bennacer S. et al. Effect of culture media on the agar diffusion method for testing antibacterial activity against *Escherichia coli* "HO25" // Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes. 2017. Vol. 10, № 2. P. 157-165.

187. Dean, C.B., Nielsen J.D. Generalized linear mixed models: a review and some extensions // Lifetime Data Analysis. 2007. № 13. P. 497-512.

188. Deng Z., Lin Z., Zou X. et al. Model of hormesis and its toxicity

mechanism based on quorum sensing: a case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum* // Environmental Science & Technology. 2012. Vol. 46, № 14. P. 7746-7754.

189. Desrosiers M., Bendouah Z., Barbeau J. Effectiveness of topical antibiotics on *Staphylococcus aureus* biofilm *in vitro* // American Journal of Rhinology. 2007. Vol. 21, № 2. P. 149-153.

190. Dettmer-Wilde K., Engewald W. Practical Gas Chromatography // A Comprehensive Reference. 2014. 902 p.

191. Do T.K.T., Schmid M., Phanse M. et al. Development of the first universal mixture for use in system suitability tests for High-Performance Thin Layer Chromatography // Journal of Chromatography A. 2021. Vol. 1638. P. 461830.

192. Doherty F.V. A Review of the Microtox ® Toxicity Test System for Assessing the Toxicity of Sediments and Soils // Water Quality Research Journal of Canada. 2001. Vol. 36, № 3. P. 475-518.

193. Edwards J.S., Palsson B.O. The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000. Vol. 97, № 10. P. 5528-5533.

194. Etebu E., Arikekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives // International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research. 2016. Vol. 4. P. 90-101.

195. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 11th Edition // Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2025. 4546 p.

196. Fagade O.E., Ezeamagu C.O., Oyelade A.A. et al. Comparative Study of Antibiotic Resistance of Staphylococcus Species Isolated from Clinical and Environmental Samples // AU Journal of Technology. 2010. Vol. 13, № 3. P. 165-169.

197. Fakhre N., Qader H.A. Spectrophotometric determination of amoxiciline // Chemistry. Medicine. 2015. URL: https://www.researchgate.net/publication/283507547_Spectrophotometric_determination_of_amoxiciline (date of access 16.03.2026).

198. Farré M., Barceló D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis // Trends in Analytical Chemistry. 2003. Vol. 22. P. 299-310.

199. Ferenczi-Fodor K., Végh Z., Renger B. Thin-layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals // Trends in Analytical Chemistry. 2006. P. 778-789.

200. Ferreira G.L.S., Bezerra L.M.D., Ribeiro I.L.A. et al. Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents // Brazilian Journal of Biology. 2018. Vol. 78, № 4. P. 691-696.

201. Filimon M.N., Borozan A.B., Popescu R. Testing the sensitivity of *Staphylococcus aureus* antibiotics // Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie. 2009. № 2. P. 70-73.

202. Finberg R.W., Moellering R.C., Tally F.P. The importance of bactericidal drugs: Future directions in infectious disease // Clinical Infectious Diseases. 2004. Vol. 39, № 9. P. 1314-1320.

203. Furtado G.L., Medeiros A.A. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of Proteus mirabilis to chloramphenicol: significance of the intermediate category // Journal of Clinical Microbiology. 1980. Vol. 12, № 4. P. 550-553.

204. Glupczynski Y., Huang T.-D., Berhin C. et al. *In vitro* activity of temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae* from Belgian intensive care units // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2007. Vol. 26, № 11. P. 777-783.

205. Goossens H. Susceptibility of multi-drug-resistant Pseudomonas aeruginosa in intensive care units: Results from the European MYSTIC study group // Clinical microbiology and infection. 2003. Vol. 9, № 9. P. 980-983.

206. Guan H., Luo X., Chang X. et al. Identification of the Chemical Constituents of an Anti-Arthritic Chinese Medicine Wen Luo Yin by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry // Molecules. 2019. Vol. 24, № 2. P. 233.

207. Han C.S., Xie G., Challacombe J.F. et al. Pathogenomic sequence Analysis

of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis* // Journal of Bacteriology. 2006. Vol. 188, № 9. P. 3382-3390.

208. Hastings J.W., Johnson C.H. Bioluminescence and Chemiluminescence // Methods in Enzymology. 2003. Vol. 360. P. 75-104.

209. Hastings J.W., Nealson K.H. Bacterial bioluminescence // Annual Review of Microbiology. 1977. Vol. 31. P. 549-595.

210. Hema-Ouangraoua S., Tranchot-Diallo J., Zongo I. et al. Impact of mass administration of azithromycin as a preventive treatment on the prevalence and resistance of nasopharyngeal carriage of *Staphylococcus aureus* // PLoS One. 2021. Vol. 16, № 10. P. e0257190.

211. Heyden Y.V., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J. et al. Guidance for robustness/ruggedness test in methid validation // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2001. Vol. 24, № 5-6. P. 723-753.

212. Histidine USP43-NF38: United States Pharmacopeia and National Formulary // U.S. Pharmacopeial Convention. 2020. Vol. 43, № 6. 2206 p.

213. Hölzl G., Dörmann P. Thin-Layer Chromatography // Methods in Molecular Biology. 2021. Vol. 2295. P. 29-41.

214. Hombach M., Zbinden R., Böttger E.C. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader // BMC Microbiology. 2013. Vol. 13. P. 225.

215. Huang X.Z., Frye J.G., Chahine M.A. et al. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 7. P. e40360.

216. Hussain, S.Z., Maqbool K., Naseer B. High performance thin layer chromatography: Principle, working and applications // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2019. Vol. 4, № 3. P. 83-88.

217. Huwyler T., Lenggenhager L., Abbas M. et al. Cefepime plasma concentrations and clinical toxicity: a retrospective cohort study // Clinical Microbiology and Infection. 2017. Vol. 23, № 7. P. 454-459.

218. Iram W., Anjum T., Iqbal M. et al. Structural Analysis and Biological

Toxicity of Aflatoxins B1 and B2 Degradation Products Following Detoxification by Ocimum basilicum and Cassia fistula Aqueous Extracts // Frontiers in Microbiology. 2016. Vol. 7. P. 1105.

219. Jawhara S., Mordon S. *In vivo* imaging of bioluminescent *Escherichia coli* in a cutaneous wound infection model for evaluation of an antibiotic therapy // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004. Vol. 48, № 9. P. 3436-3441.

220. Jia K., Ionescu R.E. Measurement of Bacterial Bioluminescence Intensity and Spectrum: Current Physical Techniques and Principles // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2016. Vol. 154. P. 19-45.

221. Jiang L., Lin Z., Hu X. et al. Toxicity prediction of antibiotics on luminescent bacteria, *Photobacterium phosphoreum*, based on their quantitative structure-activity relationship models // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2010. Vol. 85, № 6. P. 550-555.

222. Johnson B.T. Microtox® Acute Toxicity Test // Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. 2005. P. 69-105.

223. Johnson B.T. Microtox® Toxicity Test System – New Developments and Applications // Microscale Testing in Aquatic Toxicology. 2018. P. 201-218.

224. Jonasson E., Matuschek E., Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2020. Vol. 75, № 4. P. 968-978.

225. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices // Clinical Infectious Diseases. 2009. Vol. 49, № 11. P. 1749-1755.

226. Jung Y., Coronel-Aguilera C., Doh I.-J. et al. Design and application of a portable luminometer for bioluminescence detection // Applied Optics. 2020. Vol. 59, № 3. P. 801-810.

227. Kaiser K.L. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // Environmental Health Perspectives. 1998. Vol. 106. P. 583-591.

228. Kamal A.H., El-Malla S.F., Hammad S.F. A review on UV spectrophotometric methods for simultaneous multicomponent analysis // European journal of pharmaceutical and medical research. 2016. Vol. 3, № 2. P. 348-360.

229. Katzung B., Trevor A. Basic and Clinical Pharmacology – 15th edition // Medical. 2020. 1761 p.

230. Kelesidis T., Falagas M.E. Substandard/Counterfeit Antimicrobial drugs // Clinical Microbiology Reviews. 2015. Vol. 28, № 2. P. 443-464.

231. Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing // Diagnostics (Basel). 2019. Vol. 9, № 2. P. 49.

232. Kim C., Ryu H.-D., Chung E.G. et al. A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry // Journal of Environmental Management. 2018. Vol. 217. P. 629-645.

233. King T., Dykes G., Kristianti R. Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds // Journal of AOAC International. 2008. Vol. 91, № 6. P. 1423-1429.

234. Kirillova M.A., Esimbekova E., Ranjan R. et al. Bioluminescent System of Luminous Bacteria for Detection of Microbial Contamination // Journal of Siberian Federal University Biology. 2018. Vol. 11, № 3. P. 174-180.

235. Klein E.Y., Impalli I., Poleon S. Global trends in antibiotic consumption during 2016-2023 and future projections through 2030 // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2024. Vol. 121, № 49. P. e2411919121.

236. Kong I.C., Kim J.-Y., Lee S.-H. et al. Application of the Recombinant Bioluminescence Bacterium on the Toxicity Assessment of the Sole Chemicals and Soil Samples // Journal of Korean Society of Environmental Engineers. 2012. Vol. 34, № 2. P. 136-142.

237. Kowalska-Krochmal B., Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance // Pathogens. 2021. Vol. 10, № 2. P. 165.

238. Kulapina E.G., Barinova O.V., Kulapina O.I. et al. Modern methods of antibiotic determination in biological samples and drugs (Review) // Antibiotiki i Khimioterapiya. 2009. Vol. 54, № 9. P. 53-60.

239. Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E. Analysis of river water by bioluminescent biotests // Luminescence. 1999. Vol. 14, № 5. P. 263-265.

240. Laure N.N., Dawan J., Ahn J. Effects of Incubation Time and Inoculation Level on the Stabilities of Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics against *Salmonella* Typhimurium // Antibiotics (Basel). 2021. Vol. 10 № 8. P. 1019.

241. Lebel P., Gagnon J., Furtos A. A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products // Journal of Chromatography A. 2014. Vol. 1343. P. 143-151.

242. Li D., Fan D., Li S. Chromatographic Separation with On-Line (Bio)Assay, a Rapid Technique for Screening Active Compounds from Chinese Medicines // Quality Control of Chinese Medicines. 2024. P. 33-60.

243. Li J., Xie S., Ahmed S. et al. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors // Frontiers in Pharmacology. 2017. Vol. 8. P. 364.

244. Li M., Wei D., Du Y. Acute toxicity evaluation for quinolone antibiotics and their chlorination disinfection processes // Journal of Environmental Sciences. 2014. Vol. 26, № 9. P. 1837-1842.

245. Li Y., He X., Zhu W. et al. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2022. Vol. 414, № 1. P. 75-83.

246. Liang Y.-Z., Xie P.-S., Chan K. Chromatographic fingerprinting and metabolomics for quality control of TCM // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2010. Vol. 13, № 10. P. 943-953.

247. Lorenzo V.D. Recombinant bacteria for environmental release: what went wrong and what we have learnt from it // Clinical Microbiology and Infection. 2009. Vol. 1. P. 63-65.

248. Lungu N.C., Alexandroaei M., Sandu I. Study of the Penicillin Dissipation

in Aqueous Solution of Penicillinase with Attenuated Activity // Revista de Chimie. 2013. Vol. 62, № 8. P. 787-791.

249. Martini S., Haddock S.H.D. Quantification of bioluminescence from the surface to the deep sea demonstrates its predominance as an ecological trait // Scientific Reports. 2017. Vol. 7, № 1. P. 45750.

250. Mechanism of Action of Tetracyclines. Animations // Antibiotics. 2011. URL: https://pharmaxchange.info/2011/05/mechanism-of-action-of-tetracyclines/ (date of access: 16.03.2026).

251. Medvedovici A., Bacalum E., David V. Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques // Biomedical Chromatography. 2018. Vol. 32, № 1. P. e4137.

252. Menz J., Schneider M., Kümmerer K. Toxicity testing with luminescent bacteria--characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects // Chemosphere. 2013. Vol. 93, № 6. P. 990-996.

253. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 8.0. 2018. URL: http://www.eucast.org/ (date of access: 16.03.2026).

254. Morley R., Minceva M. Operating mode and parameter selection in liquid-liquid chromatography // Journal of Chromatography A. 2020. Vol. 1617. P. 460479.

255. Muhammad S., Han S., Xie X. Overview of online two-dimensional liquid chromatography based on cell membrane chromatography for screening target components from traditional Chinese medicines // Journal of Separation Science. 2016. Vol. 40, № 1. P. 299-313.

256. Muneeswaran T., Kalyanaraman N., Vennila T. et al. Rapid assessment of heavy metal toxicity using bioluminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* strain GoMGm1 // Environmental Monitoring and Assessment. 2021. Vol. 3, № 109. P. 193.

257. Najjar N.H.E., Touffet A., Deborde M. et al. Levofloxacin oxidation by ozone and hydroxyl radicals: kinetic study, transformation products and toxicity //

Chemosphere. 2013. Vol. 93, № 4. P. 604-611.

258. Ncube N.S., Afolayan A.J., Okoh A.I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends // African Journal of Biotechnology. 2008. Vol. 7, № 12. P. 1797-1806.

259. Neyestani Z., Khademi F., Teimourpour R. et al. Prevalence and mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients, healthy carriers, and wastewaters in Iran // BMC Microbiology. 2023. URL: https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-023-02940-8 (date of access: 16.03.2026).

260. Niemirycz E., Nichthauser J., Staniszewska M. et al. The Microtox® biological test: Application in toxicity evaluation of surface waters and sediments in Poland // Oceanological and Hydrobiological Studies. 2007. Vol. 36, № 4. P. 151-163.

261. Nijs A., Cartuyvels R., Mewis A. et al. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory // Journal of Clinical Microbiology. 2003. Vol. 41. P. 3627-3630.

262. Oliveira A., Maniero M., Rodrigues-Silva C. et al. Antimicrobial activity and acute toxicity of ozonated lomefloxacin solution // Environmental Science and Pollution Research. 2017. Vol. 24, № 7. P. 6252-6260.

263. Orszulik S.T. A simplified and accurate approach to agar diffusion antibiotic assay // Journal of Microbiological Methods. 2022. Vol. 200. P. 106538.

264. Ortlieb N., Klenk E., Kulik A. et al. Development of an agar-plug cultivation system for bioactivity assays of actinomycete strain collections // PLoS One. 2021. Vol. 16, № 11. P. 0258934.

265. Othman M., Loh H.S., Wiart C. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts // Journal of Microbiological Methods. 2011. Vol. 84, № 2. P. 161-166.

266. Ozçelik B., Kaynak F., Abbasoğlu U. Evaluation of susceptibility testing by comparison of broth microdilution and disk agar diffusion tests in *Staphylococci* // Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004. Vol. 1, № 2. P. 77-86.

267. Pal M., Berhanu G., Megersa L. et al. Epidemiology, Pathogenicity,

Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of Staphylococcus aureus: A Comprehensive Review // American Journal of Public Health Research. 2020. Vol. 8, № 1. P. 14-21.

268. Park H.-W., Choi J.-W., Joo K.-K. et al. Estimating Fluor Emission Spectra Using digital Image Analysis Compared to Spectrophotometer Measurements // Sensors (Basel). 2023. Vol. 23, № 9. P. 4291.

269. Park S., Choi K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems // Ecotoxicology. 2008. Vol. 17, № 6. P. 526-538.

270. Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals // Environment International. 2006. Vol. 32, № 2. P. 265-268.

271. Patil M., Luo C., Petruk G. et al. Real-time evaluation of antibacterial efficacy using bioluminescent assays for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* // Frontiers in Microbiology. 2025. Vol. 16. P. 1569217.

272. Paul S.I., Rahman M.M., Salam M.A. et al. Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin’s island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile Aeromonas septicemia in Labeo rohita // Aquaculture. 2021. P. 545.

273. Pedahzur R., Polyak B., Marks R.S. et al. Water toxicity detection by a panel of stress-responsive luminescent bacteria // Journal of Applied Toxicology. 2004. Vol. 24, № 5. P. 343-348.

274. Perin L.S., Moraes G.V., Galeazzo G.A. et al. Bioluminescent Dinoflagellates as a Bioassay for Toxicity Assessment // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, № 21. P. 13012.

275. Perlman D. Antimicrobial agents and chemotherapy // American Society for Microbiology. 1982. Vol. 22, № 3. P. 386-390.

276. Pfaller M.A., Andes D., Diekema D.J. et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and Candida: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods // Drug Resistance Updates. 2010. Vol. 13, № 6. P. 180-195.

277. Piñeiro L., Idigoras P., Caba I.D.L. et al. Tratamiento antibiótico dirigido en infecciones por *Mycoplasma genitalium*: análisis de mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas // Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2019. Vol. 37, № 6. P. 394-397.

278. Polanski J. Sajewicz M., Knas M. et al. Temperature effect with molecular rotors in thin-layer chromatography // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2013. № 2. P. 106-113.

279. Popov D. Unresolved issues of antibiotic therapy of infections caused by *Staphylococcus aureus* // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2020. P. 189-195.

280. Preuss C.V., Kalava A., King K.C. Prescription of Controlled Substances: Benefits and Risks // In Treasure Island. 2022. URL: https://web.archive.org/web/20250826091040/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537318/ (date of access: 15.03.2026).

281. Ren S., Frymier P.D. The use of a genetically engineered pseudomonas species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent // Water Environment Research. 2003. Vol. 75, № 1. P. 21-29.

282. Ritchie J.M., Cresser M., Cotter-Howells J. Toxicological response of a bioluminescent microbial assay to Zn, Pb and Cu in artifical soil solution: relationship with total metal concentrations and free ion activities // Environmental Pollution. 2001. Vol. 114. P. 129-136.

283. Rodicheva E.K., Kuznetsov A.M., Tyulkova N.A. et al. Bioluminescent Bioassays Based on Luminous Bacteria // Journal of Siberian Federal University. 2009. Vol. 2, № 4. P. 418-452.

284. Rodríguez-Angeles G. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli* // Salud Publica de Mexico. 2002. Vol. 44, № 3. P. 464-475.

285. Ruan J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition) Volume 5 and the study of Actinomycetes systematic in China // Acta microbiologica

Sinica. 2013. Vol. 53, № 6. P. 521-530.

286. Ruiz M.J., Lopez-Jaramillo L., Redondo M.J. et al. Toxicity assessment of pesticides using the Microtox test: application to environmental samples // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1997. Vol. 59, № 4. P.619-625.

287. Sacré P.Y., Deconinck E., Chiap P. et al. Development and validation of a UHPLC-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines // Journal of Chromatography A. 2011. Vol. 1218. P. 6439-6447.

288. Sajewicz M., Kowalska T., Sherma J. Sample Preparation for Thin Layer Chromatography // Advances in Chromatography. 2017. Vol. 53. P. 301-329.

289. Salvador J.-P., Adrian J., Galve R. et al. Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples // Comprehensive Analytical Chemistry. 2007. Vol. 50. P. 279-334.

290. Samanidou V.F. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): The Workhorse in the Analytical Laboratory // Journal of Chromatographic Science. 2015. Vol. 1, № 1. P. 1-2.

291. Sandegren L., Andersson D.I. Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance // Nature Reviews Microbiology. 2009. Vol. 7. P. 578-588.

292. Santiago M., Strobel S. Thin layer chromatography // Methods in Enzymology. 2013. Vol. 533. P. 303-324.

293. Sazykin I., Chernyshenko E., Azhogina T. et al. Assessment of ecotoxicological parameters of commercial pesticides using whole-cell bacterial lux-biosensors, bacterial biofilms, and the level of rif mutagenesis // Environmental Science and Pollution Research. 2025. Vol. 32. P. 18248-18259.

294. Sherma J. Review of advances in the thin layer chromatography of pesticides: 2010-2012 // Journal of Environmental Science and Health. 2013. Vol. 48, № 6. P. 417-430.

295. Shoemaker L.H., Hettmansperger T.P. Robust estimates and tests for the one- and two-sample scale models // Biometrika. 1982. Vol. 69. P. 47-54.

296. Simon L., Fremaux C., Cenatiempo Y. et al. Luminescent method for the detection of antibacterial activities // Applied Microbiology and Biotechnology. 2001. Vol. 57, № 5-6. P. 757-763.

297. Smaill F. Antibiotic susceptibility and resistance testing: an overview // Canadian Journal of Gastroenterology. 2000. Vol. 14, № 10. P. 871-875.

298. Spina-Cruz M., Maniero M.G., Caianelo M. et al. Evaluation of residual antimicrobial activity and acute toxicity during the degradation of gatifloxacin by ozonation // Water Science & Technology. 2021. Vol 84, № 1. P. 225.

299. Spina-Cruz M., Maniero M.G., Guimarães J.R. Advanced oxidation processes on doxycycline degradation: monitoring of antimicrobial activity and toxicity // Environmental Science and Pollution Research. 2018. Vol. 26. P. 1-16.

300. Spragg R.A. IR Spectrometers. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 2nd Ed. // Academic Press. 2010. P. 1199-1209.

301. Strakhovskaia M.G., Parkhomenko I.M., Rumbal' I.V. et al. Photoquenching of the bioluminescence of the genetically engineered *Escherichia coli* TG1 (pXen7) strain in the presence of photodithazine // Mikrobiologiia. 2002. Vol. 71, № 3. P. 345-348.

302. Su Y., Liu C., Fang H. et al. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine // Microbial Cell Factories. 2020. Vol. 19, № 1. P. 173.

303. Sun H., Yao Z., Wang D. et al. A deep insight into the toxic mechanism for sulfonamides based on bacterial cell-cell communication // Environment International. 2019. Vol. 129. P. 185-193.

304. Syal K., Mo M., Yu H. et al. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests // Theranostics. 2017. Vol. 7, № 7. P. 1795-1805.

305. Tanet L., Martini S., Casalot L. et al. Reviews and syntheses: Bacterial bioluminescence – ecology and impact in the biological carbon pump // Biogeosciences. 2020. Vol. 17. P. 3757-3778.

306. Tawfeek C.E., Khattab S., Elmaraghy N. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a spectrum of less investigated

uncertainties // BMC Infectious Diseases. 2024. Vol. 24. P. 1218.

307. Tian X.L., Song Z.Q., Suo B.J. et al. Comparison of Epsilometer test and agar dilution method in detecting the sensitivity of *Helicobacter pylori* to metronidazole // Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2023. Vol. 55, № 5. P. 934-938.

308. Tiwari G., Tiwari R. Bioanalytical method validation: An updated review // Pharmaceutical Methods. 2010. Vol. 1, № 1. P. 25-38.

309. Tiwari S., Talreja S. Thin Layer Chromatography (TLC) VS. Paper Chromatography: A Review // Acta Scientific Pharmaceutical Sciences. 2022. Vol. 6, № 9. P. 5-9.

310. Trott D., Dawson J.J.C., Killham K.S. et al. Comparative evaluation of a bioluminescent bacterial assay in terrestrial ecotoxicity testing // Journal of Environmental Monitoring. 2007. Vol. 9. P. 44-50.

311. Turlej-Rogacka A., Xavier B.B., Janssens L. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2018. Vol. 37, № 2. P. 345-353.

312. Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity // Environmental Toxicology and Chemistry. 2002. Vol. 17, № 3. P. 291-296.

313. Visser B.J., Vries S.G., Bache E.B. et al. The diagnostic accuracy of the hand-held Raman spectrometer for the identification of anti-malarial drugs // Malaria Journal. 2016. Vol. 15. P. 160.

314. Voet D., Voet J.G. Biochemistry – 4th edition // John Wiley & Sons. 2011. 1512 p.

315. Vollmer A.C., Dyk T.K.V. Stress responsive bacteria biosensors as environmental monitors // Advances in Microbial Physiology. 2004. Vol. 49. P. 131-174.

316. Wang L., Zheng H., Long Y. et al. Rapid determination of the toxicity of quantum dots with luminous bacteria // Journal of Hazardous Materials. 2010. Vol. 177, № 1-3. P. 1134-1137.

317. Wang W., Shi C., Yan Y. et al. Eco-toxicological bioassay of atmospheric

fine particulate matter (PM2.5) with *Photobacterium phosphoreum* T3 // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2016. Vol. 133. P. 226-234.

318. Wang X., Chi H., Li Q. et al. Influence of Antibiotic Pressure on Five Plasmid-based Bioluminescent Gram-negative Bacterial Strains // Molecular Imaging and Biology. 2018. Vol. 20, № 1. P. 21-26.

319. Wen X., Nobakht M.S., Yang Y. et al. Tetracyclines resistance in Mycoplasma and Ureaplasma urogenital isolates derived from human: a systematic review and meta-analysis // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2023. Vol. 22, № 1. P. 83.

320. WHO Model List of Essential Medicines, 20th List. 2017. URL: https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML2017.pdf?ua=1 (date of access: 15.03.2026).

321. Wu H., Moser C., Wang H.-Z. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections // International Journal of Oral Science. 2015. Vol. 7, № 1. P. 1-7.

322. Yao Z., Wang D., Wu X. et al. Hormetic mechanism of sulfonamides on *Aliivibrio fischeri* luminescence based on a bacterial cell-cell communication // Chemosphere. 2019. Vol. 215. P. 793-799.

323. Yehia M.R., Smolyarova T.E., Shabanov A.V. Adaptation of a Bacterial Bioluminescent Assay to Monitor Bioeffects of Gold Nanoparticles // Bioengineering (Basel). 2022. Vol. 9, № 2. P. 61.

324. Zhang Z., Pan Z., Fan L. et al. Comparative Metabolomics Reveals Changes in the Metabolic Pathways of Ampicillin- and Gentamicin-Resistant *Staphylococcus aureus* // Journal of Proteome Research. 2024. Vol. 23, № 10. P. 4480-4494.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Результаты статистической обработки полученных результатов.

Таблица 1. Результаты статистической обработки данных изменения интенсивности свечения *P. leiognathi* Sh1 под действием испытуемых концентраций антибиотиков.

С, мкг / мл	$x_{БЛИ}$, %	S^2	S	δ	Δx	T	P, %	ε
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Азитромицина дигидрат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
0,05	37,93	3,958	1,989	39,578	0,041			4,496
0,1	22,59	1,754	1,324	17,538	0,027			2,993
0,5	5,39	0,765	0,875	7,655	0,018			1,977
1	1,59	1,419	1,191	14,189	0,024			2,692
Амикацина сульфат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	72,86	4,052	2,013	40,522	0,041			4,549
2	64,28	3,549	1,884	35,488	0,038			4,257
4	43,75	3,617	1,902	36,172	0,039			4,298
5	20,60	3,789	1,947	37,890	0,040			4,399
10	1,49	1,025	1,012	10,246	0,021			2,288
Ампициллин натрия								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	29,71	3,375	1,837	33,749	0,037			4,152
2	18,75	3,473	1,864	34,730	0,038			4,212
4	6,18	1,508	1,228	15,080	0,025			2,775
5	2,25	0,512	0,715	5,115	0,015			1,616
Ванкомицин								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	51,59	3,652	1,911	36,522	0,039			4,319
2	47,37	4,081	2,020	40,805	0,041			4,565
4	30,39	2,011	1,418	20,105	0,029			3,205

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	28,41	1,590	1,261	15,898	0,026			2,850
10	12,14	0,838	0,915	8,376	0,019			2,068
Гентамицина сульфат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	72,89	4,121	2,030	41,208	0,041			4,588
2	64,44	4,139	2,035	41,393	0,041			4,598
4	52,69	3,849	1,962	38,494	0,040			4,434
5	40,57	4,413	2,101	44,126	0,043			4,747
Доксициклина гидрохлорид								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	29,69	4,565	2,136	45,646	0,044			4,828
2	18,55	3,789	1,947	37,889	0,040			4,399
4	6,30	1,601	1,265	16,007	0,026			2,859
5	2,28	2,670	1,634	26,696	0,033			3,693
Канамицина сульфат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	81,31	4,140	2,035	41,396	0,041			4,598
2	73,11	4,179	2,044	41,788	0,042			4,620
4	53,59	3,701	1,924	37,010	0,039			4,348
5	40,37	3,290	1,814	32,904	0,037			4,100
10	17,20	1,660	1,288	16,602	0,026			2,912
Кларитромицин								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	57,19	1,242	1,114	12,418	0,023			2,518
2	33,34	4,176	2,044	41,762	0,042			4,618
4	18,14	1,209	1,099	12,088	0,022			2,485
5	11,56	0,349	0,591	3,491	0,012			1,335
10	4,58	1,629	1,276	16,285	0,026			2,884
Левофлоксацина гемигидрат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	39,57	0,702	0,838	7,024	0,017			1,894
2	23,71	0,573	0,757	5,727	0,015			1,710

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	6,90	1,366	1,169	13,656	0,024			2,641
5	5,89	0,258	0,508	2,584	0,010			1,149
Линкомицина гидрохлорид моногидрат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	91,54	0,036	0,190	0,361	0,004			0,429
2	86,00	0,450	0,671	4,497	0,014			1,516
4	76,41	0,088	0,297	0,882	0,006			0,671
5	67,13	0,553	0,744	5,533	0,015			1,681
10	28,42	0,018	0,133	0,178	0,003			0,301
Меропенема тригидрат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
0,0001	96,05	2,978	1,726	29,778	0,035			3,900
0,0005	95,51	4,798	2,190	47,979	0,045			4,950
0,001	88,36	2,692	1,641	26,915	0,033			3,708
0,005	45,98	3,988	1,997	39,878	0,041			4,513
0,01	10,67	3,437	1,854	34,369	0,038			4,190
Налидиксовая кислота								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
0,01	96,06	4,292	2,072	42,916	0,042			4,682
0,05	45,77	2,941	1,715	29,406	0,035			3,875
0,1	30,36	3,618	1,902	36,178	0,039			4,299
0,5	12,59	1,727	1,314	17,273	0,027			2,970
1	2,42	3,768	1,941	37,682	0,040			4,387
Стрептомицина сульфат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	46,62	2,730	1,652	27,303	0,034			3,734
2	22,42	2,239	1,496	22,388	0,031			3,382
4	8,90	1,653	1,286	16,535	0,026			2,906
5	5,67	0,666	0,816	6,656	0,017			1,844
Тетрациклина гидрохлорид								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
0,01	73,24	4,514	2,125	45,138	0,043			4,802

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,05	60,91	4,251	2,062	42,508	0,042			4,660
0,1	43,89	4,572	2,138	45,722	0,044			4,832
0,5	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000			0,000
Фуразолидон								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
0,0001	77,70	4,836	2,199	48,363	0,045			4,970
0,0005	61,51	2,988	1,729	29,882	0,035			3,907
0,001	35,79	3,292	1,814	32,923	0,037			4,101
0,005	18,55	3,651	1,911	36,512	0,039			4,318
0,01	5,68	0,217	0,466	2,171	0,010			1,053
Фурациллин								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	87,26	0,063	0,251	0,629	0,005			0,567
2	72,30	2,091	1,446	20,907	0,029			3,268
4	24,70	0,011	0,104	0,108	0,002			0,235
5	10,99	0,005	0,073	0,054	0,001			0,166
Хлорамфеникол								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	93,80	0,275	0,525	2,752	0,011			1,186
2	7,74	0,016	0,126	0,158	0,003			0,284
4	0,11	0,012	0,110	0,121	0,002			0,248
Цефазолин натрия								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0
1	81,33	4,615	2,148	46,151	0,044			4,855
2	73,15	4,553	2,134	45,532	0,044			4,822
4	53,63	2,876	1,696	28,761	0,035			3,833
5	40,36	4,075	2,019	40,748	0,041			4,562
10	17,22	0,732	0,856	7,323	0,017			1,934
Цефепима дигидрохлорид моногидрат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0
1	57,18	4,865	2,206	48,654	0,045			4,985
2	33,29	3,928	1,982	39,284	0,040			4,479

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	18,11	2,260	1,503	22,602	0,031			3,398
5	11,83	3,863	1,965	38,629	0,040			4,442
10	4,58	1,629	1,276	16,285	0,026			2,884
Цефотаксим натрия								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	99,57	0,013	0,114	0,130	0,002			0,257
2	96,84	0,027	0,165	0,271	0,003			0,372
4	62,51	0,017	0,129	0,167	0,003			0,292
5	21,73	0,011	0,104	0,109	0,002			0,236
10	4,93	0,006	0,075	0,056	0,002			0,169
Цефтазидима пентагидрат								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	83,33	0,035	0,186	0,347	0,004			0,421
2	19,74	0,014	0,120	0,145	0,002			0,272
4	2,08	0,015	0,121	0,147	0,002			0,274
5	1,36	0,015	0,121	0,146	0,002			0,274
Цефтриаксон натрия								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	39,61	3,228	1,797	32,276	0,037			4,060
2	23,71	3,214	1,793	32,140	0,037			4,052
4	6,89	0,638	0,799	6,384	0,016			1,806
5	5,87	0,543	0,737	5,430	0,015			1,665
Цефуроксим натрия								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	86,17	4,327	2,080	43,270	0,042			4,701
2	55,99	4,176	2,043	41,756	0,042			4,618
4	35,60	3,760	1,939	37,599	0,040			4,382
5	25,31	1,940	1,393	19,400	0,028			3,148
10	9,87	3,650	1,911	36,504	0,039			4,318
Ципрофлоксацин								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
0,0001	86,06	3,431	1,852	34,311	0,038			4,186

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0005	70,91	4,039	2,010	40,387	0,041			4,542
0,001	55,58	3,026	1,740	30,261	0,035			3,931
0,005	33,32	2,714	1,647	27,142	0,034			3,723
0,01	18,70	3,323	1,823	33,234	0,037			4,120
Эритромицин								
0	100,00	0,000	0,000	0,000	0,000	2,26	95	0,000
1	86,83	0,447	0,668	4,467	0,014			1,510
2	75,63	0,071	0,267	0,710	0,005			0,602
4	71,39	0,104	0,323	1,044	0,007			0,730
5	70,73	0,058	0,241	0,579	0,005			0,544
10	14,18	0,002	0,048	0,023	0,001			0,108

Примечание: C – концентрация, $x_{БЛИ}$ – среднее значение БЛИ, S^2 – дисперсия, S – стандартное отклонение, δ – квадратичное отклонение, Δx – полуширина доверительного интервала, t – Т-критерий Стьюдента, P – доверительная вероятность (уровень значимости), ε – относительная ошибка результата единичного определения.

Приложение 2. Проект общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа».

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

Настоящая фармакопейная статья распространяется на способ определения антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа путем измерения интенсивности свечения бактерий.

Общие положения

Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств основано на измерении снижения интенсивности люминесценции *Photobacterium leiognathi* Sh1 (*P. leiognathi* Sh1), связанной с угнетением роста микроорганизмов, под действием концентраций испытуемых веществ. Активность веществ оценивают путем расчета 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. Значения испытуемых концентраций субстанций должны соответствовать БЛИ стандартного образца.

Антимикробная активность антибиотиков и других противомикробных средств выражается в мкг на единицу объема субстанции.

При определении антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств по измерению изменения люминесценции используют стандартные образцы, активность которых подтверждена международными биологическими и химическими стандартами. Антимикробную активность стандартных образцов (СО), не имеющих аналогов в международной коллекции стандартов, рассчитывают также на основании показателей качества, установленных физико-химическими методами. Стандартные образцы антибиотиков и других противомикробных средств хранятся и используются в соответствии с рекомендациями,

указанными на этикетке стандартного образца.

Методика испытания

Измерение изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции проводят с использованием приборов, оснащенным фотоприёмником, который регистрирует световой сигнал, испускаемый бактериями, и преобразует интенсивность света в цифровой формат – люминометров. Подготовку прибора к работе проводят согласно инструкции по эксплуатации.

Основные растворы стандартных и испытуемых образцов (ИО) готовят в стерильных условия с применением заранее подготовленных растворителей, концентрация которых должна составлять 10 ± 0,0001 мг / мл. Полученный раствор перемешивают с использованием мешалок в течении 30 сек, для порошкообразных образцов – до полного растворения. Затем из них готовят рабочие, испытуемые и стандартные растворы. Рабочие растворы СО и ИО готовят путем добавления воды очищенной и натрия хлорида требуемых концентраций, с учетом указанных в настоящем проекте фармакопейной статье и их соответствия осмотического давления получаемого раствора 3 % натрия хлориду.

Все растворы, используемые в анализе, должны быть стерильными. Стерилизация основных растворов осуществляется фильтрованием через стерильный фильтр с размером пор не более 0,22 мкм. Стерильность готовых растворов должна быть подтверждена соответствующими тестами.

В кюветы люминометра вносят приготовленные растворы антибиотиков или других противомикробных средств с конечными концентрациями в пробе, с учетом объема бактериальной суспензии, равными испытуемым. В образцы стандартных и испытуемых растворов добавляют бактериальной суспензии до конечной концентрации клеток 5×10^6 клеток / мл в инокуляте и $2{,}5 \times 10^5$ клеток / мл непосредственно в пробе с субстанцией. Общий объем проб составляет 1000 мкл. Контрольный

образец включает объемы бактериальной суспензии и раствора натрия хлорида. Перед внесением кювет в прибор растворы перемешивают вручную или с помощью соответствующего прибора, для поддержания равномерного распределения бактериальных клеток в пробе.

Интенсивность люминесценции оценивают через 15, 30 мин (экспресс-анализ подлинности противомикробных субстанций) или 18 часов (количественное определение) не менее чем в 3 повторах для каждого образца. Измерение интенсивности свечения тест-бактерий под действием антибиотиков и других противомикробных средств регистрируют с помощью люминометров.

Расчет антимикробной активности испытуемых образцов по стандартной кривой может быть проведен путем непосредственного расчета с использованием уравнения графической прямой или вычисления коэффициента корреляции Пирсона (*r*).

Таблица 1 – Условия определения антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств биолюминесцентным анализом.

Наименование субстанции	Концентрация основного раствора, мг / мл	Концентрация субстанции, ингибирующая 50 % люминесценции, мкг / мл	Рекомендуемый диапазон концентраций, мкг / мл
Азитромицина дигидрат	10	± 0,04	0,05 – 1
Амикацина сульфат	10	± 3,38	1 – 10
Ампициллин натрия	10	± 0,99	1 – 5
Ванкомицин	10	± 1,62	1 – 20
Гентамицина сульфат	10	± 4,00	1 – 20
Доксициклина гидрохлорид	10	± 0,99	1 – 10
Канамицина сульфат	10	± 4,20	1 – 20
Кларитромицин	10	± 1,40	1 – 10

Продолжение таблицы 1

Левофлоксацина гемигидрат	10	± 1,12	1 – 5
Линкомицина гидрохлорид моногидрат	10	± 7,26	1 – 20
Меропенема тригидрат	10	± 0,005	0,005 – 1
Налидиксовая кислота	10	± 0,05	0,01 – 1
Стрептомицина сульфат	10	± 1,16	1 – 10
Тетрациклина гидрохлорид	10	± 0,08	0,01 – 0,5
Фуразолидон	10	± 0,0007	0,005 – 0,5
Фурациллин	10	± 2,87	1 – 10
Хлорамфеникол	10	± 1,37	1 – 5
Цефазолин натрия	10	± 4,20	1 – 20
Цефепима дигидрохлорид моногидрат	10	± 1,40	1 – 10
Цефотаксим натрия	10	± 4,10	1 – 20
Цефтазидима пентагидрат	10	± 1,44	1 – 10
Цефтриаксон натрия	10	± 1,12	1 – 10
Цефуроксим натрия	10	± 2,92	1 – 10
Ципрофлоксацин	10	± 0,003	0,005 – 0,5
Эритромицин	10	± 5,26	1 – 20

Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств путем непосредственного расчета с использованием уравнения графической прямой

Для проведения испытания готовят растворы стандартного и испытуемого образцов. Концентрации растворов должны быть близки к контрольным концентрациям растворов стандартных образцов, указанных в таблице 1.

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в кюветы люминометра. Для обеспечения статистической достоверности результатов рекомендуется готовить растворы испытуемого образца в трех повторах, непосредственно перед измерением.

Расчет активности и дисперсионный анализ по стандартной кривой,

путем непосредственного расчета с использованием уравнения графической прямой, осуществляют в соответствии со статьей ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Результаты измерений представляют в виде биолюминесцентного индекса, измеряемого в процентах (БЛИ, %) и вычисляемого по формуле: БЛИ = $I_i/I_0 \times 100$ %, где где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в опытной пробе, I_0 – интенсивность свечения бактерий в контроле.

Взаимосвязь между БЛИ и концентрациями антибиотиков или других противомикробных средств должна быть представлена в виде линейной или экспоненциальной зависимости, аналогичной стандартным образцам, в виде, во всем диапазоне исследованных концентрациях.

Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств путем вычисления коэффициента корреляции Пирсона (*r*)

Для проведения испытания готовят растворы стандартного и испытуемого образцов. Концентрации растворов должны быть близки к контрольным концентрациям растворов стандартных образцов, указанных в таблице 1.

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в кюветы люминометра. Для обеспечения статистической достоверности результатов рекомендуется готовить растворы испытуемого образца в трех повторах. Непосредственно перед измерением вносят бактериальную суспензию.

Результаты измерений представляют в виде биолюминесцентного индекса, измеряемого в процентах (БЛИ, %) и вычисляемого по формуле: БЛИ = $I_i/I_0 \times 100$ %, где где I_i – интенсивность люминесценции бактерий в опытной пробе, I_0 – интенсивность свечения бактерий в контроле.

Взаимосвязь между БЛИ стандартного и испытуемого образцов

антибиотиков или других противомикробных средств доказывают путем расчета *r* по формуле:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_n - \bar{x})(y_n - \bar{y})}{n\sigma_x\sigma_y},$$

где n — число статистических наблюдений, x и y — случайные переменные.

Значения коэффициента корреляции всегда расположены в диапазоне от -1 до 1 и интерпретируются следующим образом: если коэффициент корреляции близок к 1, то между переменными наблюдается положительная корреляция.

Расчет антимикробной активности испытуемого образца путем непосредственного расчета с использованием графического метода

Пример. Определение антимикробной активности по измерению изменению интенсивности биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием рабочих концентраций гентамицина сульфата. Антибиотик оказывал влияние в диапазоне концентраций через 18 часов от 1 до 10 мкг / мл. Для испытуемого образца значения БЛИ составили от 100 до 1,5 ± 1,3 %, а для стандартного образца – от 100 до 2,3 % (Таблица 2).

Таблица 2 – Значения интенсивности люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием гентамицина сульфата через 18 часов.

	Исследуемый образец		Стандартный образец	
Концентрация, мкг / мл	I_iср	БЛИ, %	I_i	БЛИ, %
0	132,3 ± 3,3	100 ± 0,0	128	100
1	96,4 ± 3,1	72,9 ± 3,0	96	75
2	85,2 ± 2,6	64,4 ± 2,5	85	66,4
4	77,6 ± 3,0	58,7 ± 2,6	78	60,9
5	53,7 ± 3,5	40,6 ± 2,1	54	42,2
10	2,0 ± 1,8	1,5 ± 1,3	3	2,3

Линейные зависимости между концентрациями испытуемого и стандартного образцов антибиотиков и величинами зон задержки роста показаны на рисунке 1.

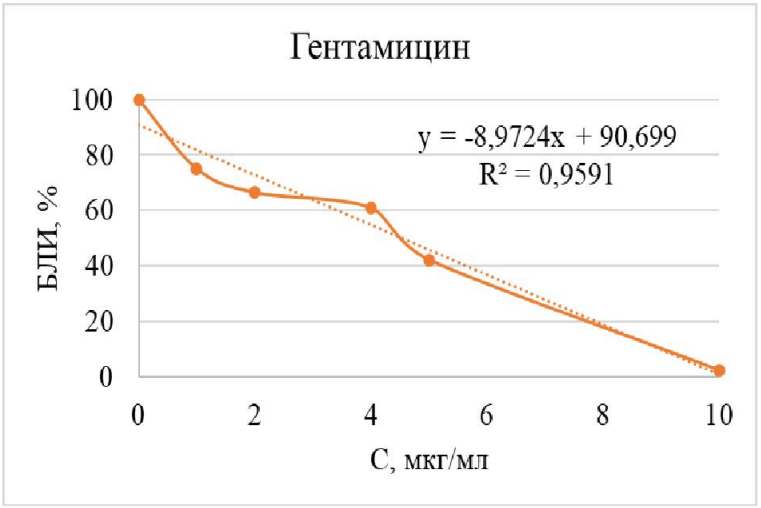


Рисунок 1 – Градуировочная зависимость БЛИ от концентраций для стандартного образца гентамицина сульфата.

Полученное математическое уравнение для зависимости БЛИ от концентраций позволяет определять содержание антибиотика в пробе по величине отклика аналитического сигнала, являющегося «х» в уравнении. Если для линейного уравнения $y = -8{,}9724 \times x + 90{,}699$ интенсивность свечения в % опытного образца составляет 50 в сравнении с контролем, то концентрация антибиотика будет составлять около 4,54 мкг / мл.

Расчет антимикробной активности испытуемого образца путем вычисления коэффициента корреляции Пирсона (*r*)

Пример. Определение антимикробной активности по измерению изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием рабочих концентраций гентамицина сульфата. Антибиотик оказывал влияние в диапазоне концентраций через 18 часов от 1 до 10 мкг / мл. Для испытуемого образца значения БЛИ составили от 100 до 1,5 %, а для стандартного образца – от 100 до 2,3 % (Таблица 3).

Таблица 3 – Значения интенсивности люминесценции тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 под действием гентамицина сульфата через 18 часов.

	Исследуемый образец		Стандартный образец	
Концентрация, мкг / мл	I_iср	БЛИ, %	I_i	БЛИ, %
0	132,3 ± 3,3	100 ± 0,0	128	100
1	96,4 ± 3,1	72,9 ± 3,0	96	75
2	85,2 ± 2,6	64,4 ± 2,5	85	66,4
4	77,6 ± 3,0	58,7 ± 2,6	78	60,9
5	53,7 ± 3,5	40,6 ± 2,1	54	42,2
10	2,0 ± 1,8	1,5 ± 1,3	3	2,3

Наличие сходимости значений доказывают в результате расчета коэффициента корреляции Пирсона. Для гентамицина сульфата *r* составил 0,99, что говорит о высокой степени сходимости результатов и подтверждает антимикробные свойства и качество испытуемого образца.

Условия культивирования биолюминесцентного тест-штамма, используемого для определения антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств

Для определения антимикробной активности тест-микробы высевают в бульон, затем через 16 - 18 ч инкубации при температуре 25 ^{0}С. После культивирования оценивают морфологические свойства выращенных микроорганизмов на поверхности агара. Природные штаммы биолюминесцентных бактерий *P. leiognathi* Sh1 должны представлять собой слизистой консистенцией клетки круглой формой, диаметр которых составляет 1,3 мм.

По окончании инкубации наличие роста микроорганизмов определяют визуально по помутнению питательной среды в проходящем свете или наличию роста в виде осадка. Помимо этого, показателем служит также наличие видимого в темноте свечения в сине-зеленой области света, возникающего за счет протекающей ферментативной реакции,

катализируемой люциферазой. Одной из важнейших характеристик при их идентификации природного люминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 являются значения оптической плотности (0,61 ± 0,05) и удельного свечения ($8{,}09 \times 10^{-5}$ мВ / кл).

Для культивирования биолюминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 используется жидкая питательная среда (бульон), состав которой должен соответствовать требованиям, изложенным в данной фармакопейной статье проекта.

Ночную культуру тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 выращивают в жидкой питательной среде при оптимальных условиях, указанных в данной фармакопейной статье проекта.

3% раствор натрия хлорида (NaCl) готовят с применением в воде очищенной, соответствующий требованиям Фармакопеи. Раствор должен быть стерилизован.

В асептических условиях отбирают необходимый объем ночной культуры.

Проводят разбавление ночной культуры 3% раствором натрия хлорида до достижения конечной концентрации клеток микроорганизмов 5×10^6 клеток / мл в инокуляте. Контроль концентрации клеток осуществляют посредством микроскопии или спектрофотометрически, используя предварительно построенную калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации клеток.

Условия культивирования, включая температуру, аэрацию, освещенность и другие параметры, должны соответствовать требованиям, изложенным в данной фармакопейной статье проекта. Бактериальная суспензия используется немедленно после приготовления. Хранение разведенной бактериальной суспензии не допускается.

Питательные среды и растворители

Таблица 4 – Состав жидкой питательной среды.

Компонент	Количество на 1 литр
Натрия хлорид (NaCl)	30,0 г
Натрия гидрофосфат (Na_2HPO_4)	7,0 г
Калия дигидрофосфат (KH_2PO_4)	1,0 г
Аммония гидрофосфат ($(NH_4)_2HPO_4$)	0,5 г
Магния сульфат ($MgSO_4$)	0,1 г
Дрожжевой экстракт	0,5 г
Пептон	5,0 г
Глицерин	3,0 мл
Вода очищенная (*Aqua purificata*)	до 1 литра

В мерном сосуде вместимостью 1 литр растворяют последовательно: натрия хлорид, натрия гидрофосфат, калия дигидрофосфат, аммония гидрофосфат, магния сульфат, дрожжевой экстракт и пептон в воде для инъекций (около 900 мл) при перемешивании до полного растворения каждого компонента. Добавляют глицерин. Доводят объем раствора водой для инъекций до 1 литра и тщательно перемешивают. Контролируют pH среды и доводят до значения 7,2 ± 0,2 с использованием растворов натрия гидроксида или кислоты хлористоводородной, если необходимо. Полученный раствор фильтруют через фильтр с порами 0,22 мкм. Стерилизуют автоклавированием при температуре (120 ± 1) ^{0}C в течение (15 ± 1) минут. После стерилизации проводят контроль качества.

Хранение:

В герметично закрытых стерильных контейнерах при температуре от 2 ^{0}C до 8 ^{0}C от 1 до 3-х месяцев.

Таблица 5 – Состав агаризованной (твердой) питательной среды.

Компонент	Количество на 1 литр
Натрия хлорид (NaCl)	30,0 г
Натрия гидрофосфат (Na_2HPO_4)	7,0 г
Калия дигидрофосфат (KH_2PO_4)	1,0 г
Аммония гидрофосфат ($(NH_4)_2HPO_4$)	0,5 г

Продолжение таблицы 5

Магния сульфат ($MgSO_4$)	0,1 г
Дрожжевой экстракт	0,5 г
Пептон	5,0 г
Агар-агар	15,0 г
Глицерин	3,0 мл
Вода очищенная (Aqua purificata)	до 1 литра

В мерном сосуде вместимостью 1 литр растворяют последовательно: натрия хлорид, натрия гидрофосфат, калия дигидрофосфат, аммония гидрофосфат, магния сульфат, дрожжевой экстракт, пептон и агар-агар в воде для инъекций (около 900 мл) при перемешивании. Добавляют глицерин. Нагревают смесь на водяной бане или с использованием мешалки с подогревом при периодическом перемешивании до полного расплавления агара. Доводят объем раствора водой для инъекций до 1 литра и тщательно перемешивают. Контролируют pH среды и доводят до значения 7,2 ± 0,2 с использованием растворов натрия гидроксида или кислоты хлористоводородной, если необходимо.

Стерилизуют автоклавированием при температуре (120 ± 1) ^{0}C в течение (15 ± 1) минут. После стерилизации охлаждают среду до температуры (50 ± 5) ^{0}C и разливают в стерильные чашки Петри. Дают среде застыть в течение не менее 2 часов. После застывания проводят контроль качества.

Хранение:

В герметично закрытых стерильных чашках Петри при температуре от 4 ^{0}C до 10 ^{0}C не более 3-х недель.

В качестве растворителей для приготовления основных растворов используют:

– Вода очищенная, соответствующая требованиям Фармакопейной статьи «Вода для инъекций» или «Вода очищенная».

– Диметилсульфоксид (ДМСО), квалификации «для синтеза» или

соответствующая требованиям Фармакопейной статьи «Диметилсульфоксид».

В качестве растворителя для разведения основных растворов используют:

– Раствор натрия хлорида 3 %, приготовленный на воде очищенной и стерилизованный.

Хранение культур биолюминесцентных тест-микроорганизмов.

Условия хранения:

Тест-штаммы микроорганизмов, предназначенные для использования в контроле качества, следует хранить в герметично закрытых чашках Петри на соответствующих плотных питательных средах, обеспечивающих поддержание жизнеспособности и типичных характеристик штамма.

Температурный режим:

Температура хранения должна поддерживаться в пределах от 4 ^{0}C до 10 ^{0}C.

Срок хранения:

Максимальный срок хранения тест-штаммов в указанных условиях составляет 14 суток. Превышение установленного срока хранения может привести к изменению свойств штамма и искажению результатов контроля.

Пересев:

По истечении 14 суток, а также при появлении признаков ухудшения состояния культуры (изменение морфологии колоний, снижение жизнеспособности), необходимо произвести пересев штамма на свежую питательную среду.

Рекомендуемые условия:

Кратковременное хранение: Рекомендуется поддерживать жизнеспособность тест-штаммов путем регулярного пересева на свежую питательную среду каждые две недели.

Долговременное хранение: Для обеспечения сохранности генетических

и фенотипических характеристик тест-штаммов рекомендуется создание специальных коллекций (музеев) микроорганизмов, обеспечивающих хранение в условиях криоконсервации или лиофилизации с периодическим восстановлением культур (не реже одного раза в год) для проверки их соответствия исходным характеристикам.

Проректор по научной деятельности,
доктор технических наук, профессор Н. В. Любомирский

Заведующий кафедрой медицинской и
фармацевтической химии,
доктор биологических наук, профессор А. М. Кацев

Ассистент кафедры медицинской и
фармацевтической химии С. Я. Османова

Приложение 3. Патент «Способ оценки антимикробной активности веществ».



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2838567

СПОСОБ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ

Патентообладатель: *Османова Селина Ягьяевна (RU)*

Авторы: *Османова Селина Ягьяевна (RU), Сафронюк Сергей Леонидович (RU), Кацев Андрей Моисеевич (RU)*

Заявка № **2024111496**
Приоритет изобретения **25 апреля 2024 г.**
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **21 апреля 2025 г.**
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **25 апреля 2044 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов

Приложение 4. Патент «Способ оценки антимикробных свойств извлечений, полученных из растений семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) и выделенных из них биологически активных веществ».



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2867877

СПОСОБ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ИЗВЛЕЧЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ЯСНОТКОВЫЕ (LAMIACEAE) И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Патентообладатель: ***Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского" (RU)***

Авторы: ***Сафронюк Сергей Леонидович (RU), Кияев Амет-Хан Бекирович (RU), Османова Селина Ягьяевна (RU), Литвинюк Дарья Александровна (RU), Муединова Эльзара Сейрановна (RU)***

Заявка № **2025133783**
Приоритет изобретения **02 декабря 2025 г.**
Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **11 августа 2026 г.**
Срок действия исключительного права на изобретение истекает **02 декабря 2045 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 00a570e4f7add8d531b4b8818e75f29506
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 04.09.2025 по 28.11.2026

Ю.С. Зубов

Приложение 5. Акты внедрения.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ
И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И. Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»)
Институт биохимических технологий,
экологии и фармации

проспект Академика Вернадского, 4,
г. Симферополь, 295007
Тел.: +7(3652) 54-50-36; факс: 54-52-46
E-mail: cf_university@mail.ru
http://www.cfuv.ru/

№ _____

На № _____от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
Института биохимических технологий,
экологии и фармации
ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»,
доктор химических наук, профессор

Институт биохимических технологий, экологии и фармации

_____ А.Н. Гусев
«___» _____ 2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Название предложения для внедрения:** результаты кандидатской диссертации Османовой Селины Ягьяевны на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа» по специальности 3.4.2. – фармацевтическая химия, фармакогнозия.
2. **Учреждение, в котором проводится разработка, адрес, ФИО авторов:** Институт биохимических технологий, экологии и фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», кафедра медицинской и фармацевтической химии (г. Симферополь, бульвар Ленина 5/7), доцент кафедры Сафронюк С.Л., ассистент Османова С.Я.
3. **Источники информации:**

1) Диссертационная работа Османовой С.Я. на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа».

2) Османова, С.Я. Сравнение метода диффузии в агар и биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.Х.Б. Кияев, А.М. Кацев // Вестник Смоленской государственной медицинской академии, 2024. – Т. 23, № 1. – С. 248-254.

3) Патент RU 2838567 C1. Способ оценки антимикробной активности веществ / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев. – № 2838567; заявл. 25.04.2024; опубл. 21.04.2025. – Москва: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2025.

4. **Базовое учреждение, в котором проводилось внедрение:** кафедра медицинской и фармацевтической химии Института биохимических технологий, экологии и фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (протокол № 10 от 27.11.2025 г.).

5. **Включено:** результаты диссертационной работы включены в научно-исследовательскую и учебную деятельность кафедры медицинской и фармацевтической химии, используются в курсе обучения студентов специальности 33.01.05 Фармация, в том числе входят в теоретический и практический раздел дисциплины «Фармацевтическая химия», а также в программу научно-исследовательской работы студентов (НИРС).

6. **Результаты исследования:** разработана и апробирована методика оценки качества антибиотиков, создан проект фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа», который используется в учебном процессе как пример разработки нормативной документации и перспективного направления стандартизации фармацевтического анализа.

7. **Сроки внедрения:** с 2026 г.

8. **Замечания и предложения организации, в котором проводилось внедрение:** существенных замечаний нет.

9. **Ответственный за внедрение:** заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии, д.б.н., профессор Кацев А.М.

Заведующий кафедрой медицинской и
фармацевтической химии,
д.б.н., профессор _____ Кацев А.М.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ
И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И. Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»)
Институт биохимических технологий,
экологии и фармации

проспект Академика Вернадского, 4,
г. Симферополь, 295007
Тел.: +7(3652) 54-50-36; факс: 54-52-46
E-mail: cf_university@mail.ru
http://www.cfuv.ru/

_____№ _____

На № _____от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
Института биохимических технологий,
экологии и фармации
ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»,
доктор химических наук, профессор

_____ А.Н. Гусев
«__» _____ 2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Название предложения для внедрения:** результаты кандидатской диссертации Османовой Селины Ягьяевны на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа» по специальности 3.4.2. – фармацевтическая химия, фармакогнозия.
2. **Учреждение, в котором проводится разработка, адрес, ФИО авторов:** Институт биохимических технологий, экологии и фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», кафедра фармации (г. Симферополь, бульвар Ленина 5/7), и.о. заведующего кафедрой фармации Сафронюк С.Л., ассистент Османова С.Я.
3. **Источники информации:**

1) Диссертационная работа Османовой С.Я. на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа».

2) Османова, С.Я. Сравнение метода диффузии в агар и биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.Х.Б. Кияев, А.М. Кацев // Вестник Смоленской государственной медицинской академии, 2024. – Т. 23, № 1. – С. 248-254.

3) Патент RU 2838567 C1. Способ оценки антимикробной активности веществ / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев. – № 2838567; заявл. 25.04.2024; опубл. 21.04.2025. – Москва: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2025.

4. **Базовое учреждение, в котором проводилось внедрение:** кафедра фармации Института биохимических технологий, экологии и фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (протокол заседания кафедры № 9 от 07.11.2025 г.).
5. **Включено:** результаты диссертационной работы включены в научно-исследовательскую и учебную деятельность кафедры фармации, используются в курсе обучения студентов специальности 33.01.05 Фармация, в том числе входят в теоретический и

практический раздел дисциплин «Фармацевтическая технология (аптечная технология лекарств)» «Фармакогнозия» и др., а также в программу научно-исследовательской работы студентов (НИРС).

6. **Результаты исследования:** разработана и апробирована методика оценки качества антибиотиков, создан проект фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа», который используется в учебном процессе как пример разработки нормативной документации и перспективного направления стандартизации фармацевтического анализа.

7. **Сроки внедрения:** с 2026 г.

8. **Замечания и предложения организации, в котором проводилось внедрение:** существенных замечаний нет.

9. **Ответственный за внедрение:** и.о. заведующего кафедрой фармации, к.ф.н., доцент Сафронюк С.Л.

И.о. заведующего кафедрой фармации,
к.ф.н., доцент _____ Сафронюк С.Л.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ
И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И. Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»)
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт им. С.И. Георгиевского

проспект Академика Вернадского, 4,
г. Симферополь, 295007
Тел.: +7(3652) 54-50-36; факс: 54-52-46
E-mail: cf_university@mail.ru
http://www.cfuv.ru/

_____№ _____

На № _____от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Первый заместитель директора
по учебно-методической работе
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт им. С.И. Георгиевского
ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»,
доктор медицинских наук, профессор

_____ С.А. Кутя
«___» _____ 2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации *Османовой Селины Ягьяевны* на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа» по специальности 3.4.2. – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Комиссия в составе *доктора медицинских наук, профессора Сатаевой Татьяны Павловны, кандидата медицинских наук, доцента Логадырь Татьяны Алексеевны* и *кандидата биологических наук, доцента Кирсановой Марины Александровны* подтверждает использование результатов, полученных *Османовой Селины Ягьяевны* в ходе работы над кандидатской диссертацией «*Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа*», в курсе обучения студентов специальностей 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия и 31.05.03 Стоматология на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Зав. кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии,
д.м.н., профессор *Сатаева Т.П.*

Доцент кафедры микробиологии,
вирусологии и иммунологии,
к.м.н., доцент *Логадырь Т.А.*

Доцент кафедры микробиологии,
вирусологии и иммунологии,
к.б.н., доцент *Кирсанова М.А.*

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И.Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.Вернадского»)
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт
им. С.И.Георгиевского

бульвар Ленина, 5/7,
г. Симферополь, 295051
Тел.:+7(3652) 554-555;
E-mail: mi-office@cfuv.ru
http://www.ma.cfuv.ru/

«УТВЕРЖДАЮ»
Первый заместитель директора
по учебно-методической работе
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт
им. С.И. Георгиевского
ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»,
доктор медицинских наук, профессор

_____ С.А. Кутя
2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Название предложения для внедрения:** результаты кандидатской диссертации Османовой Селины Ягьяевны на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа» по специальности 3.4.2. – фармацевтическая химия, фармакогнозия.
2. **Учреждение, в котором проводится разработка, адрес, ФИО авторов:** Институт биохимических технологий, экологии и фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», кафедра медицинской и фармацевтической химии (г. Симферополь, бульвар Ленина 5/7), доцент кафедры Сафронюк С.Л., ассистент Османова С.Я.
3. **Источники информации:**

1) Диссертационная работа Османовой С.Я. на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа».

2) Османова, С.Я. Сравнение метода диффузии в агар и биолюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.Х.Б. Кияев, А.М. Кацев // Вестник Смоленской государственной медицинской академии, 2024. – Т. 23, № 1. – С. 248-254.

3) Патент RU 2838567 C1. Способ оценки антимикробной активности веществ / С.Я. Османова, С.Л. Сафронюк, А.М. Кацев. – № 2838567; заявл. 25.04.2024; опубл. 21.04.2025. — Москва: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2025.

4. **Базовое учреждение, в котором проводилось внедрение:** кафедра базисной и клинической фармакологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (протокол № 4 от 01.04.2026 г.).
5. **Включено:** результаты диссертационной работы включены в учебную деятельность кафедры базисной и клинической фармакологии, используются в курсе обучения студентов 3 курса специальности 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия и 31.05.03 Стоматология.
6. **Результаты исследования:** разработана и апробирована методика оценки качества антибиотиков, создан проект фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков методом биолюминесцентного анализа».

7. **Сроки внедрения:** с 2026 г.

8. **Замечания и предложения организации, в котором проводилось внедрение:** существенных замечаний нет.

9. **Ответственный за внедрение:** заведующий кафедрой базисной и клинической фармакологии, д.м.н., профессор Фомочкина И.И.

Зав. кафедрой базисной и
клинической фармакологии,
д.м.н., профессор Фомочкина И.И.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ
И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.И. Вернадского»
(ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»)
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт им. С.И. Георгиевского

проспект Академика Вернадского, 4,
г. Симферополь, 295007
Тел.: +7(3652) 54-50-36; факс: 54-52-46
E-mail: cf_university@mail.ru
http://www.cfuv.ru/

№ _____

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель директора по научной
и инновационной деятельности
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт им. С.И. Георгиевского
ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского

_____ Е.А. Захарьян
«___» _____ 2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации *Османовой Селины Ягьяевны* на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа» по специальности 3.4.2. — фармацевтическая химия, фармакогнозия в работу Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Комиссия в составе *доктора медицинских наук, доцента Зяблицкой Евгении Юрьевны, кандидата биологических наук, доцента Макалиш Татьяны Павловны* и *доктора медицинских наук, доцента Голубинской Елены Петровны* подтверждает использование результатов, полученных *Османовой Селины Ягьяевны* в ходе работы над кандидатской диссертацией «*Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа*», в работе Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ).

Заведующая ЦНИЛ,
ведущий научный сотрудник,
руководитель научных и
клинических проектов ЦНИЛ
д.м.н., доцент *Зяблицкая Е.Ю.*

Ведущий научный сотрудник
к.б.н., доцент *Макалиш Т.П.*

Ведущий научный сотрудник
д.м.н., доцент *Голубинская Е.П.*