

Перспективы и особенности применения метода турбидиметрического анализа для определения антимикробной активности пептидов и антибиотиков гликопептидного ряда (систематический обзор предметного поля)

Д.А. Шахова^{1,2}, М.С. Каночкина^{1,3}

¹ Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия

² «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Общество с ограниченной ответственностью «Микробные нутриенты иммунокорректоры», Москва, Россия

Корреспонденция:

Каночкина Мария Сергеевна,
Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ),
125080, Россия, г. Москва,
Волоколамское шоссе, 11
E-mail: kanoch@yandex.ru

Конфликт интересов:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 24.10.2024

Поступила после

рецензирования: 27.11.2024

Принята: 30.12.2024

Copyright: © 2024 Авторы

АННОТАЦИЯ

Введение. В России антимикробные средства включены в перечень жизненно необходимых лекарственных препаратов. Количественное определение качества антибиотических препаратов является главной задачей для выпускающих предприятий, при этом биологические, диффузионные, турбидиметрические, спектроскопические и хроматографические анализы и методики нуждаются в своевременном совершенствовании и модификациях для повышения их специфичности, чувствительности и воспроизводимости.

Цель. Целью исследования является сбор теоретических данных и анализ научной литературы для обзора сектора антимикробных пептидов и антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами, в особенности антибиотиков-гликопептидов. Материалы и методы. Теоретический анализ, сравнительный анализ собранной информации, SWOT-анализ; критериальный метод анализа источников информации.

Результаты и обсуждение. Рассмотрены биологические методы анализа, их актуальность для некоторых антибиотиков, таких как гликопептиды, из-за их сложной химической структуры, что затрудняет использование методов физико-химического анализа. Произведен анализ научных публикаций на русском и иностранном (английском) языках, отражающих особенности характеристики антибиотика гликопептидного ряда — ванкомицина, его антимикробное действие, блок-схему получения и микробный синтез. При написании обзора использовались источники, опубликованные в период с 2019 по 2024 год. Поиск проводили на основании ключевых слов: «фармацевтический рынок», «антимикробные пептиды», «гликопептидные антибиотики», «ванкомицин», «метод диффузии в агар», «метод турбидиметрии». Отобрано 52 публикации, размещенных в базах данных (PubMed, Google scholar, E-library, Cyberleninka, ГФ РФ), проанализирована динамика современного фармацевтического рынка сектора антибиотиков, выделены проблемные поля, рассмотрены антибиотики, продуцируемые микроорганизмами, охарактеризован ванкомицин, описан его механизм антимикробного действия, технологическая блок-схема производства и синтез на молекулярном уровне. Рассмотрены фармакопейные методы определения антимикробной активности, а именно метод диффузии в агар и турбидиметрический метод, проведен сравнительный анализ этих методик, выявлены положительные и отрицательные стороны стандартизации и контроля активности антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

фармацевтический рынок, антимикробные пептиды, гликопептидные антибиотики, ванкомицин, метод диффузии в агар, турбидиметрия

Для цитирования: Шахова, Д. А., & Каночкина, М. С. (2024). Перспективы и особенности применения метода турбидиметрического анализа для определения антимикробной активности пептидов и антибиотиков гликопептидного ряда (систематический обзор предметного поля). *Health, Food & Biotechnology*, 6(4), 73-93. <https://doi.org/10.36107/hfb.2024.i2.s242>



<https://doi.org/10.36107/hfb.2024.i2.s242>

Prospects and Features of the Turbidimetric Analysis Method for Determining the Antimicrobial Activity of Peptides and Antibiotics of the Glycopeptide Series (Systematic Scoping Review)

Daria A. Shakhova^{1,2}, Maria S. Kanochkina^{1,3}

¹ Russian Biotechnological University (BIOTECH University), Moscow, Russia

² Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Limited Liability Company «Microbial Nutrients Immunocorrectors», Moscow, Russia

Correspondence:

Maria S. Kanochkina,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University), 11, Volokolamskoe
Highway, Moscow, 125080, Russia
E-mail kanoch@yandex.ru

Declaration of competing interest:
none declared.

Received: 29.10.2024

Received in revised form: 27.11.2024

Accepted: 30.12.2024

Copyright: © 2024 The Authors

ABSTRACT

Introduction. Antimicrobial peptides and antibiotics produced by microorganisms are the leading group in pharmaceutical production in most economically developed countries. These drugs used in the treatment of various infectious diseases are one of the broadest categories. In Russia, antimicrobial agents are included in the list of vital and essential drugs. Currently, the problem of import substitution is acute due to the current political situation, so strategies for replacing imported pharmaceutical substances with domestic ones are currently being actively developed. Quantitative determination of the quality of antibiotic drugs is the main task for enterprises producing these drugs. The methods used for these tasks, such as biological, diffusion, turbidimetric, spectroscopic and chromatographic analyzes, require timely improvement and modifications to increase their specificity, sensitivity and reproducibility, which ultimately determines the quality of the drug.

Purpose. The aim of this scientific study is to collect theoretical data and analyze the scientific literature to review the sector of antimicrobial peptides and antibiotics produced by microorganisms, especially glycopeptide antibiotics.

Materials and Methods. Theoretical analysis, comparative analysis of the collected information, SWOT analysis; critical method for analyzing information sources. Results and discussion. This study examined biological methods, their relevance for some antibiotics, such as glycopeptides, due to their complex chemical structure, which complicates the use of physicochemical analysis methods. Analysis of scientific publications in Russian and foreign (English) languages, reflecting the features of the characteristics of the glycopeptide antibiotic - vancomycin, its antimicrobial action, a block diagram of its production and microbial synthesis. When writing this review, peer-reviewed articles, patents and other sources published between 2019 and 2024, in Russian and English, were used. The search was conducted based on the following keywords: «pharmaceutical market», «antimicrobial peptides», «glycopeptide antibiotics», «vancomycin», «agar diffusion method», «turbidimetry method». As a result of the search for information sources, 50 publications posted in foreign and Russian-language databases (PubMed, Google scholar, E-library, Cyberleninka, State Pharmacopoeia of the Russian Federation) were selected.

Results. The dynamics of the modern pharmaceutical market of the antibiotic sector was analyzed, problem areas were identified, antibiotics produced by microorganisms were considered and a comparative analysis with antimicrobial peptides was carried out. The characteristics of the main group of glycopeptide antibiotics studied in this review, in particular vancomycin, are given. Its mechanism of antimicrobial action, technological block diagram of production and microbial synthesis at the molecular level are described. Pharmacopoeial methods for determining antimicrobial activity, namely the agar diffusion method and the turbidimetric method, are considered, a comparative analysis of these methods is carried out, and positive and negative aspects of standardization and control of antibiotic activity are identified.

KEYWORDS

pharmaceutical market, antimicrobial peptides, glycopeptide antibiotics, vancomycin, agar diffusion method, turbidimetry

To cite: Shakhova, D. A. & Kanochkina M. S. (2024). Prospects and features of the turbidimetric analysis method for determining the antimicrobial activity of peptides and antibiotics of the glycopeptide series (review). *Health, Food & Biotechnology*, 6(4), 73-93. <https://doi.org/10.36107/hfb.2024.i4.s242>



ВВЕДЕНИЕ

Современная отечественная фармацевтическая промышленность ежегодно претерпевает множество изменений, касающихся ухудшения уровня жизни людей из-за растущего воздействия множества факторов, влияющих на здоровье населения, в том числе стремительного развития разнообразия и устойчивости антибиотикорезистентных бактериальных штаммов (Борисенко & Солдатов, 2018) и увеличения количества фактов госпитализации и смертей по этой причине. Фармацевтическая промышленность стремится разрабатывать и производить эффективные, безопасные и высококачественные лекарственные средства, которые станут препаратами выбора при лечении патологических состояний. Именно поэтому крайне важно расширять внутренний рынок фармацевтической продукции (Близняк & Уранова, 2023), что является одной из задач государственной политики в области здравоохранения населения Российской Федерации (Марущак & Субботина, 2023), и иметь возможность четко и быстро определить эффективность действия того или иного антимикробного агента.

Анализируя текущую ситуацию на мировом и российском фармацевтических рынках, следует отметить две общие черты: во-первых, даже в условиях общей рецессии зафиксировано активное и динамичное развитие обоих рынков — темпы роста в последние годы составляют около 5–8 % в год соответственно или даже 15–16 %, как в нашей стране в 2022–2023 годах; во-вторых, эти рынки характеризуются беспрецедентно высокой конкуренцией и уровнем затрат на исследования и разработки, которые являются элементом инноваций. Необходимо отметить, что процесс импортозамещения — это основное направление развития российского фармакологического рынка (Лопатина, 2023). Рост фармацевтического рынка также поддерживается такими тенденциями, как расширение биотехнологического фармацевтического сектора, увеличение производства и потребления генерических лекарств и биосимиляров (официально признанных копий (версий) лекарств, которые практически идентичны оригинальному препарату и являются биологическими продуктами, произведенными другими компаниями) (Ботнарюк & Тимченко, 2022).

Противомикробные препараты демонстрируют собой весьма обширную область лекарственных субстанций, назначаемых для терапии бактериальных и грибковых заболеваний (Солдатов, Филатова, & Куликовская, 2019). Экономическая область лекарственных средств, а именно антибактериальных в различных странах доходит до 21 % от общего числа фармацевтического индустрии (Субботина & Несук, 2023). Наибольшая доля отечественного фармацевтического рынка готовых лекарственных средств занимают антибиотики и это

значение составляет — 75,5 % (Тарасевич & Молохова, 2019). Соответственно, точное определение эффективности антимикробных агентов является неотъемлемой частью успешной борьбы с инфекционными заболеваниями, обеспечивая клиническую и экономическую эффективность, а также устойчивость к антимикробным препаратам (Халимова & Орлов, 2024).

Таким образом, целью исследования является сбор теоретических данных и анализ научной литературы для обзора сектора антимикробных пептидов и антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами, в особенности антибиотиков-гликопептидов. Определены следующие задачи исследования:

- (1) сформулировать характеристику широко применяемого антибиотика ванкомицина с точки зрения его бактерицидного действия;
- (2) описать блок-схему производства антибиотика и выявить проблемные поля, определить пути их решения при производстве данного антибиотика;
- (3) провести сравнительный анализ фармакопейных методов определения антимикробной активности, как основного показателя эффективности ванкомицина, включая метод диффузии в агар и турбидиметрический метод, оценить релевантность их применения на антибиотиках-гликопептидах, выявить их преимущества и недостатки, предложить пути решения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

При написании данной работы использовались рецензируемые статьи, патенты и другие источники, опубликованные в период с 2019 по 2024 год, на русском и английском языке. Литература, опубликованная раньше 2019 года была использована по причине ее актуальности и/или нехватке аналогичных данных по конкретному аспекту в предметном поле. Выбранные библиографические материалы были классифицированы в соответствии с их соответствием критериям включения в аналитическое исследование: соответствие информации целям текущего научного анализа, присутствие одного или нескольких значимых терминов и временной интервал, наиболее приближенный к 2024 году.

Методы

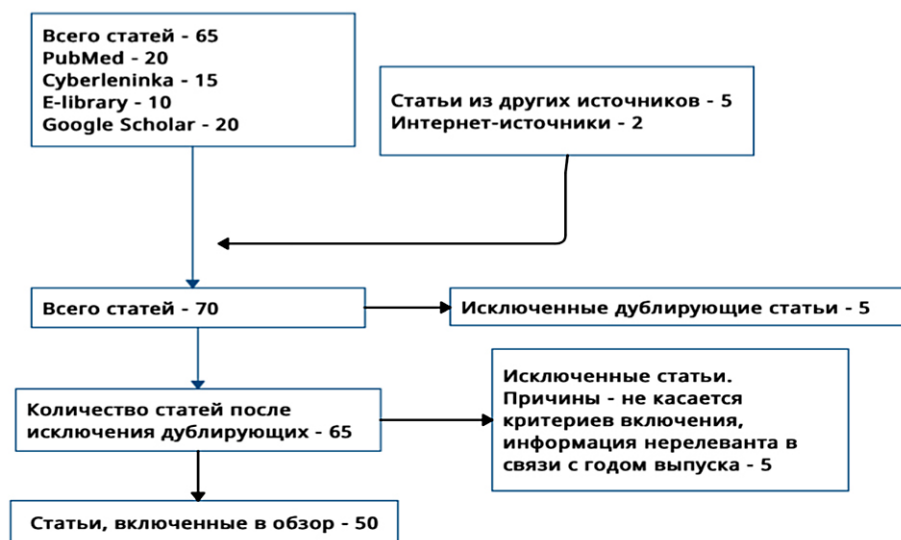
Библиографические материалы были избраны на основании их классификации и критерия «ключевые слова». Следовательно, для целенаправленного поиска в базах данных научных статей, ключевыми словами были определены: «фармацевтический рынок», «ан-

Рисунок 1

Блок-схема в соответствии с протоколом PRISMA, включающая процесс подбора библиографических источников

Figure 1

PRISMA Protocol Flow Chart Including the Process of Selecting Bibliographic Sources



тимикробные пептиды», «гликопептидные антибиотики», «ванкомицин», «метод диффузии в агар», «метод турбидиметрии». Используемые ключевые слова применялись в качестве комбинаций для поиска научных материалов в отечественных и зарубежных базах данных, таких как PubMed, Google Scholar, eLibrary и Cyberleninka. Было отобрано источников в количестве 60. После изучения авторефератов и аннотаций статей было произведено исключение материалов, которые не подходили по критериям включения. В подборку вошли 50 источников, из них 48 статей (48 % опубликованных на русском языке, 52 % – на иностранном (английском) языке) и 2 интернет-источника. В процессе подготовки обзора использовали методы обработки полученных материалов, в том числе цифровые. Основные положения настоящего обзора: антимикробные пептиды, их преимущества и механизм действия, характеристика широко применяемого антибиотика ванкомицина с точки зрения его бактерицидного действия, проблемные поля при производстве антибиотика ванкомицина, определение эффективности действующего антимикробного агента, сравнительный анализ фармакопейных методов определения антимикробной активности, как основного показателя эффективности ванкомицина, их преимущества и недостатки. Обзор предметного поля исследования включал в себя применение протокола PRISMA, в результате была составлена блок-схема (Рисунок 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробные пептиды, их преимущества и механизм действия

Ферментативный синтез антибиотиков микроорганизмами в данный момент представляет особый интерес для практического применения, поскольку позволяет подойти к решению проблемы увеличения числа устойчивых к антибиотикам агентов и падения уровня новых назначаемых антибиотиков. Поиск новых продуктивных штаммов микроорганизмов является на данный момент основным направлением. Природные антибиотики, в отличие от химически синтезированных антибиотиков, имеют более широкий охват эффективности, низкую патогенность для пациентов и обладают медленным развитием резистентности. Антимикробные пептиды имеют весьма разные и отличительные строения (Венедиктова, 2023), что позволяет им в то же время обладать вариативными ответными путями действия на клетки-мишени. Такие комбинации достигаются за счет рандомизированных комплексов «белковых» и «небелковых» аминокислот, первичных структур, продемонстрированных линейными пептидами, циклопептидами, циклодепептидами, петлями сплайсинга и непептидными вставочными участками. Несмотря на все эти преимущества данных соединений химический синтез для их получения недоступен по причине его стоимости и доле ручного труда, поэтому в качестве более удобного

го и экономически выгодного получения антимикробных пептидов является микробный синтез.

Антимикробные пептиды (АМП) — это собой класс простых пептидов, которые обычно состоят из 12÷50 аминокислотных остатков. На данный момент обнаружено более 3100 природных АМП (Luo Y & Song Y, 2021). Широко существующие в природе АМП получают из бактерий, растений, насекомых, птиц, рыб и других животных. Антимикробные пептиды оказывают воздействие не только на грамотрицательные и на грамположительные бактерии, но и на вирусы, грибы и простейших. Среди основных преимуществ можно выделить низкую инвазивность для эукариотов, устойчивую термолability, высокую растворимость, относительно низкую молекулярную массу и отсутствие устойчивости. Они также обладают антибактериальной активностью против резистентных к антибиотикам бактерий (Li X & Zuo S, 2022). Следовательно, они имеют потенциальное применение в медицине, и несколько противомикробных препаратов уже проходят клинические испытания.

Антимикробный механизм АМП был изучен, но результаты исследований неудовлетворительны, поскольку антимикробные механизмы АМП весьма разнообразны, а недавние разработки имеют технические ограничения (Luo Y & Song Y, 2021). Помимо механизма антимикробной активности, исследователи также сосредоточили внимание на противовоспалительной, противораковой и других биологических активностях.

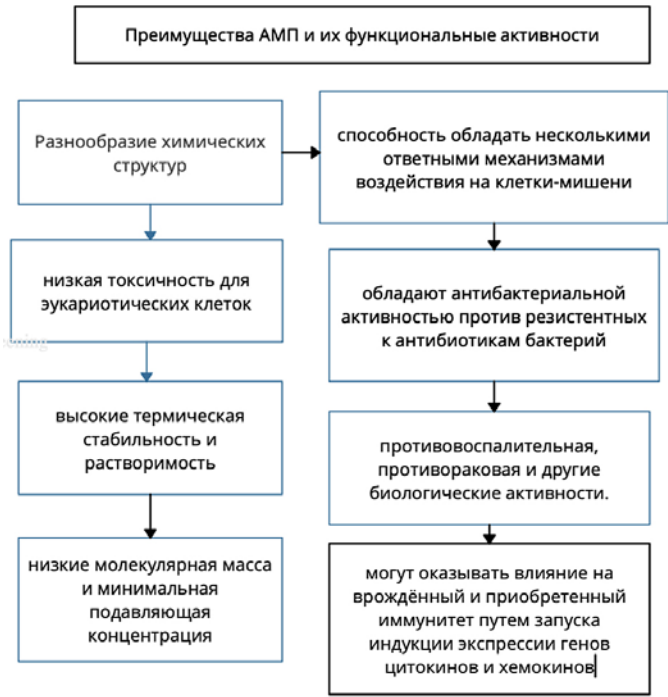
Для внутриклеточных эффектов большое исследовательское значение имеют вход в клетку и точки мишени в клетке (Luo Y & Song Y, 2021). В основном были представлены две модели порообразования: модель бочонкового типа и модель тороидальных пор; более того, существуют модель «ковра» и модель, подобная «моющему средству», без образования пор. Антимикробные пептиды имеют разнообразные варианты уничтожения бактериальных агентов, включая разрушение структуры клеточной оболочки микроорганизмов, ингибирование их метаболических процессов или разрушение жизненно важных органоидов клетки (Liu Y. et al, 2019). Внутриклеточная активность АМП разнообразна, например, связывание нуклеиновых кислот, ингибирование синтеза нуклеиновых кислот и белков и влияние на клеточный цикл. Начальное взаимодействие пептида с объектом обычно происходит за счет электростатических сил, поскольку подавляющая часть микробных поверхностей обладают отрицательно заряженными анионами. Первично, аминокислотная составляющая пептидных антибиотиков воздействует факультативными ионными свойствами: аминокислоты-носители катионов и боковые цепи вмешиваются в липидосодержащий дислой бактерий, тем самым образуя бочкообразные, ковровые и кольцевые поровые структуры в структуре

мембраны бактериальной клетки. Повреждение целостности плазматической мембраны идет из образования пор, нарушая течение внутриклеточного содержимого и трансмембранный потенциал, привести к дисфункции физиологических процессов в клетке и к дальнейшей ее гибели. Среди имеющихся механизмов действия антимикробных пептидов на микробные клетки особое внимание привлекает «ковровая модель». Исходя из этой модели, молекулы пептидов с положительным зарядом связываются с отрицательно заряженными бактериальными оболочками, образуя так называемый «молекулярный ковер». Когда антимикробные пептиды охватывают всю площадь бактерий, мембрана начинает разрушаться.

Вторично, пептидные антибиотики проникают в саму клетку и реагируют с внутриклеточными объектами. Тут молекулярное связывание занимает главную роль; к этим методам относятся торможение синтеза клеточной стенки, видоизменения плазматической мембраны, запуск клеточной программы автолиза, ингибирование синтеза нуклеиновых кислот и белков, а также ликвидация выработки необходимых ферментов и др., что влияет на рост и размножение бактерий. На настоящее время многим авторам работ в данной области еще не удалось установить корректный молекулярный механизм подавление жизнедеятельности бактерий антимикробными пептидами. Стоит подчеркнуть некоторые превосходства антимикробных пептидов, а именно высокую термостойкость, широкий спектр антимикробной активности, низкая минимально подавляющая концентрация (МПК), низкая частота возникновения резистентности и отличное ингибирование грибов, грамотрицательных и грамположительных бактерий. Пептидные антибиотики также наделены противовирусным и противопаразитарным действием, их способности распространяются также на опухолевые клетки, не повреждая здоровые клетки (Ma & Кочергин, 2019). Еще одна особенность заключается в том, что эти соединения могут оказывать воздействие на врожденный и приобретенный иммунитет, программой запуска которой является индукция экспрессии генов цитокинов и хемокинов, обладающих противовоспалительными свойствами. Это ведет к снижению локализованного воспаления и запускают процессы высвобождения численного количества макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и Т-лимфоцитов. По этой причине многие исследователи ведут поиск новых антимикробных пептидов для терапевтического применения. На Рисунке 2 представлены основные преимущества АМП и их функции.

Главным их отличительным признаком от антибиотиков является возможность антимикробных пептидов внедряться в клеточную структуру путем эндоцитоза, который подключает остановку синтеза ДНК, РНК, белков и протеолитических ферментов бактерий (Андрюков &

Рисунок 2
Преимущества АМП и их функциональные особенности
Figure 2
Advantages of AMPs and Their Functional Features



Беседнова, 2022). Следующий отличительный аспект основывается на бактерицидном эффекте пептидов, так как значительная часть антибиотиков проявляет бактериостатическое влияние. В последние десятилетия выделение значительного числа новых и действенных антимикробных пептидов, как природного, так и искусственного происхождения, становится необходимой и важной задачей в области современной биотехнологии. В современной клинической практике отдельные из указанных пептидов активно назначаются для подавления инфекционных болезней, а также непрерывно производятся отечественными фармацевтическими компаниями.

Самыми известными и эффективными антибиотиками (даптомицин, полимиксин, тейксобактин и ванкомицин) являются представители пептидов природного происхождения, при этом большинство прочих противомикробных пептидов уже успешно проходят ряд клинических и доклинических исследований. Полученный в их ходе данные показывают перспективу использования данных антибиотиков как допустимых лекарственных препаратов для терапии инфекция благодаря их высокому бактерицидному действию, структурному многообразию за счет легких молекулярных структур и охвату широкого спектра микроорганизмов. В Таблице 1 приведены некоторые АМП и их характеристики по принципу действия и происхождению.

Таблица 1
Характеристика наиболее известных АМП
Table 1
Characteristics of the Most Well-known AMPs

Наименование	Принцип действия	Продуцент	Источник
Полимиксин	Механизм действия обусловлен главным образом блокадой проницаемости цитоплазматической мембраны бактериальных клеток, что приводит к их деструкции.	<i>Bacillus polymyxa</i>	Trimble & Mlynářčík, 2016
Низин	оказывает ингибирующее действие на грам-отрицательные бациллы под действием комплексирующего агента или слияния с коротким пептидом с антиграм-отрицательной бактериальной активностью	<i>Lactococcus lactis</i>	Li & Montalban-Lopez, 2018
Бацитрацин	сдерживает синтез клеточной стенки большинства грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>DW</i>	Zhu & Wang, 2023
Грамицидин S	Запускает проницаемость мембраны микробной клетки для неорганических катионов путем выстраивания полотна каналов в билипидном фундаменте мембраны, что ведет к развитию осмотической неустойчивости клетки.	<i>Bacillus brevis</i>	Protić & Kaličanin, 2023
Ванкомицин	Затормаживает синтез клеточной стенки, понижает проницаемость цитоплазматической мембраны и синтез РНК бактерий	<i>Amycolatopsis</i> (<i>Streptomyces</i>) <i>orientalis</i>	Bruniera & Ferreira, 2015

Окончание Таблицы 1

Наименование	Принцип действия	Продуцент	Источник
Тейксобактин	ликвидирует синтез клеточной стенки, сшивая его с высококонсервированным мотивом липида II (предшественник пептидогликана) и липида III (предшественник тейхоевой кислоты клеточной стенки)	<i>Eleftheria terrae</i>	Ling & Schneider, 2015
Даптомицин	Вступает в реакцию с клеточной мембраной, приводит к ее деполяризации, что ведет к ускоренному подавлению синтеза белка, ДНК и РНК и лизису клетки	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Ned & Halana, 2024
Плексазин	работает на прямое связывание предшественника бактериальной клеточной стенки липида II.	<i>Pseudoplectania nigrella</i>	Jekhmane & Derks, 2024
Рамопланин	ликвидирует биосинтез грамположительной бактериальной клеточной стенки, останавливая преобразование липидного промежуточного I в липидное промежуточное звено II, катализируемого N-ацетилглюкозамин-трансферазой	<i>Actinomycetes spp</i>	Marschall & Cass, 2024
Колицин М	провоцирует лизис клеток путем ингибирования биосинтеза клеточной стенки путем ферментативной деградации предшественников, связанных с ундекапре-нилфосфатом	<i>Escherichia coli</i>	Barreteau & Patin, 2020

В силу своей гибкости и независимости от матричной РНК, антимикробные пептиды представляют научный интерес для разнообразных применений в области биотехнологии и медицины, а в особенности в создании новых лекарственных форм. Структуры таких нерибосомных соединений пептидов могут принимать форму линейных, замкнутых кольцевых или даже разветвленных форм кольцевых молекул. Так известно, что биосинтез данных нерибосомных пептидов часто происходит при активном участии нерибосомных специфических пептидных синтетаз (НПС) (Liu Y. et al., 2019), работа которых вовсе не связана сопряжена с информационной молекулой РНК. В частности, последние состоят из множества модульных секций, каждая из которых отвечает за включение одной определенной аминокислоты (не ограничиваясь 20 протеиногенными аминокислотами) в конечные пептидоподобные продукты. По сравнению с обычными антибиотиками биоактивные пептиды менее склонны к развитию резистентности благодаря своим уникальным механизмам действия. В отличие от раскрытия кольца β-лактамных антибиотиков, которое неэффективно, появляется все больше сведений, показывающих, что линейные антибактериальные пептиды и их аналоги превосходят в антибактериальной активности против бактериальных агентов. Пептиды линейного строения открывают новый подвид антибиотиков-кандидатов, которые отличаются от клинически используемых циклических структурируемых, таких как даптомицин, полимиксины и ванкомицин, и могут помочь обойти резистентность.

Являясь вторичными метаболитами, нерибосомальные пептиды (НРП) представляют обширный спектр

биологической активности — от антибактериальной до противоопухолевой. Чтобы разработать рабочие антимикробные препараты на базе нерибосомальных пептидов, необходимо понять механизм действия на молекулярном уровне. Касаемо темы грамотицательных микроорганизмов, НРП атакуют специфическую отрицательно заряженную внешнюю клеточную структуру. Катионы Mg^{2+} , присутствующие на поверхности данной мембраны, нейтрализуют общий отрицательный её заряд. АМП способны замещать данные ионы. Впоследствии, после этого антимикробные пептиды либо выстраивают связи с отрицательно заряженными заряженными липополисахаридными молекулами, либо разрушают данную структуру мембраны, эффективно нейтрализуя отрицательный её заряд на её поверхности, и затем внедряются в внутреннюю периплазматическую область. Пиком важного взаимодействия НРП конкретно с мембраной микроорганизма часто считается именно электростатическая сила между катионным способом АМП и непосредственно отрицательнозаряженной микробной поверхностью. Антимикробные пептиды, активно встраиваясь в центральную цитоплазматическую мембрану, существенно модифицируют свою собственную конформацию, тем образом образуя специальные каналы, которые явно нарушают структуру данной клетки. Несущие часто положительный заряд антимикробные пептиды активно вступают во взаимодействие с внутриклеточными макромолекулярными структурами анионами (ДНК и РНК) и ликвидируют микробные клетки при непосредственном попадании в цитоплазму патогенов (Ковзалов & Манаева, 2023).

Препарат проявляет синергидный эффект в комбинации с аминогликозидами против большинства штаммов *S. aureus* и др., а также против стрептококков, что особенно важно при лечении эндокардита. Основным предиктором эффективности препарата считается отношение площади под фармакокинетической кривой к минимальной подавляющей концентрации (МПК). В настоящий момент в научной литературе отсутствует консенсус относительно того, зависит ли бактерицидное действие ванкомицина от концентрации или времени экспозиции. В последние годы действительно произошло значительное развитие в области создания новых антибактериальных препаратов, что позволило улучшить лечение инфекций, вызванных устойчивыми штаммами бактерий, такими как MRSA (метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*) и VRSA (ванкомицин-резистентный *Staphylococcus aureus*). Новые препараты, такие как оритаванцин, тигециклин, цефтобипрол, телаванцин и даптомицин, продемонстрировали высокую эффективность в клинических исследованиях, являясь достойной альтернативой традиционным препаратам, таким как ванкомицин. Например, оритаванцин и телаванцин обладают уникальными механизмами действия и более длительными периодами полураспада, что позволяет улучшить удобство применения и снизить частоту инъекций. Тигециклин, благодаря своей широкому спектру действия, активен не только против MRSA, но и других устойчивых бактерий, что расширяет его клиническое применение. Даптомицин, в свою очередь, проявляет высокую бактерицидную активность против целого ряда грамположительных патогенов, включая устойчивые формы. Цефтобипрол, новый бета-лактамы антибиотик, также демонстрирует эффективность против MRSA благодаря своей способности связываться с видоизмененными пенициллин-связывающими белками, которые способствуют устойчивости бактерий. Эти препараты не только сравнимы по эффективности с ванкомицином, но и в некоторых случаях могут превосходить его за счёт более благоприятного профиля безопасности и меньшего числа побочных эффектов (Лагун & Кашина, 2021).

Проблемные поля при производстве антибиотика ванкомицина

Ключевым продуцентом антибиотика ванкомицина считается *Amycolatopsis orientalis* (Белый & Лопатухин, 2023). Однако группа российских ученых в своем патенте описали методику получения ванкомицина с помощью штамма *Amycolatopsis japonica* VKPM Ac-2182 и выбрали *Amycolatopsis orientalis*, в качестве прототипной модели. Род *Amycolatopsis* давно и активно применяется как один из наиболее результативных ресурсов продуцентов вторичных метаболитов с антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными

действиями и в наше время представляет большой интерес для поиска новых лекарств. Группа исследователей сообщает о штамме *Amycolatopsis japonica*, продуцирующем этилендиаминдигидратную кислоту, который хранится в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур. Ученым удалось выявить и инициировать новый кластер генов гликопептидов типа III в *Amycolatopsis japonica*, который кодирует ген для производства листерий ристомидина А. Этот кластер генов был выявлен и активирован в *Amycolatopsis japonica*. Путем индуцированной мутации и последующего поэтапного отбора из штаммов дикого типа из почвы был выделен штамм VAN 20–12, способный продуцировать антибиотик ванкомицин. Процесс получения ванкомицина из *Amycolatopsis japonica* поэтапно представлен на Рисунке 4.

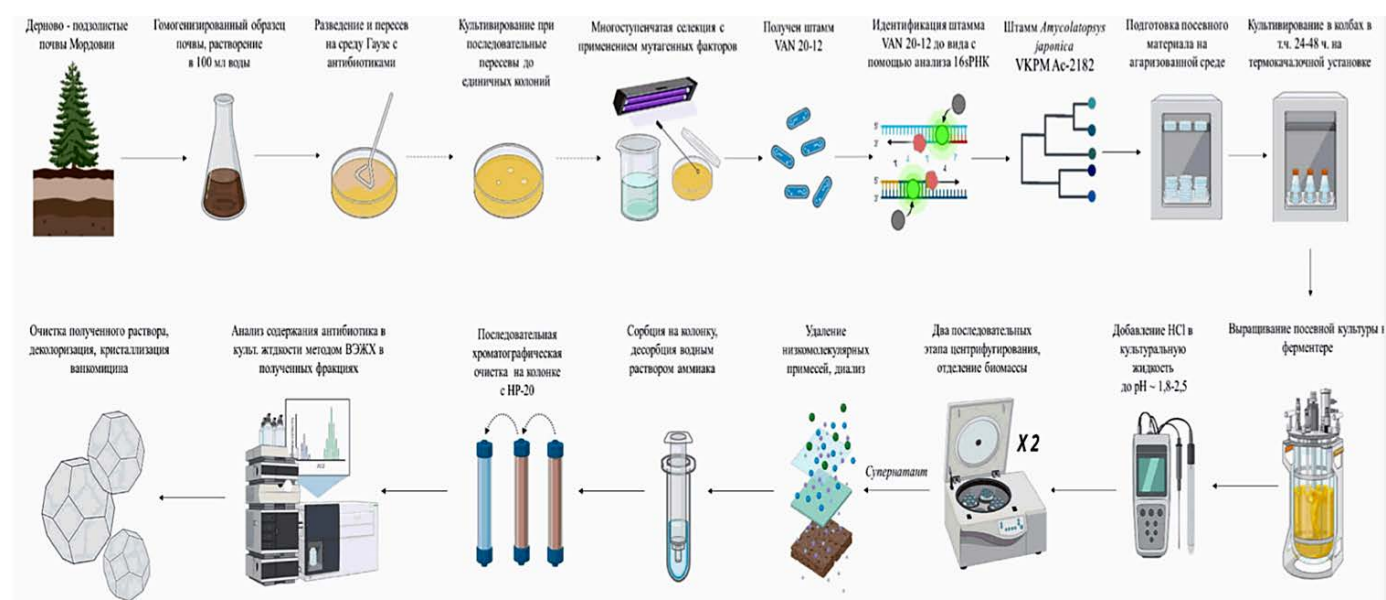
Образцом изучения был фрагмент почвы, добытый в Республике Мордовия, с которого в последствие был сделан посев дикого штамма на агаризованную среду Гаузе с добавлением антибиотиков широкого действия для устранения штаммов-ассоциантов. В ходе энергетических процедур селекции и направленных методов отбора выделили (применялось облучение УФ с длиной волны 250 нм и при температуре близкой к 0 °C) дальнейший объект работ — продуцент ванкомицина VAN 20–12. Далее исследовали устанавливали видовую принадлежность штамма с помощью ПЦР-анализа 16sPHK. Полученные секвенированные последовательности вносились в филогенетические программы — базы данных, такие как GenBank, BLAST. Анализ полученных результатов привел к тому, что исследуемый штамм VAN 20–12 был наиболее близок к штаммам вида *Amycolatopsis japonica*, исходя из последовательностей варьируемых участков генов, кодирующих 16S рPHK. Полученный штамм снова высевали на агаризованную среду и термостатировали определенное время при оптимальной для штамма температуре. Выросшую культуру переносили в жидкую питательную среду и культивировали в условиях аэрации (шейкер-инкубатор), для того чтобы следующим этапом перенести культуру в ферментер. Объем культуры составил 5÷15 % от объема среды в ферментере. Процесс ферментации проходил в стерильных аэробных условиях в течение 120÷170 ч. Выход целевого продукта ванкомицина контролировали методом ВЭЖХ. Максимальный выход ванкомицина составил 14,06 г/л на объем 15 л ферментера и 17,45 г/л на объем 100 л соответственно. В завершении культивации микроорганизма содержимое ферментера (культуральную жидкость) подкисляли хлористоводородной кислотой до показателей pH приблизительно 2,5. Следующий этап заключался в центрифугировании для очищения биомассы культуральной жидкости. С помощью диализа через полупроницаемую мембрану проводили очистку концентрата продукта и далее прогоняли его через адсорбционную

Рисунок 4

Получение ванкомицина штаммом *Amycolatopsis japonica* VAN 20-12 (Белый & Лопатухин, 2023)

Figure 4

Production of Vancomycin by *Amycolatopsis japonica* Strain VAN 20-12 (Beliy & Lopatukhin, 2023)



колонку, где производили десорбцию водным раствором аммиака. Затем в два этапа элюант вносили в колонку с гидрофобным сорбентом НР-20 и промывали деионизированной водой, и только потом элюировали колонку 50 % водным этанолом с уксусной кислотой. Следующим этапом авторы делили элюант на фракции для контроля на ВЭЖХ. Очищенные фракции фильтровали углем апиогенным и профильтровывали еще раз. Полученный раствор ванкомицина кристаллизировали с дополнительной фильтрацией.

Получаемый в настоящее время ванкомицин, имеет более чистоту — до 86 ± 2 % после одной кристаллизации, и до 90 ± 1 % после двух таких кристаллизаций. Необходимо отметить, что нынешнее крупномасштабное производство ванкомицина остается относительно ограниченным и дает максимум ($3,7 \div 7,6$ г/л) (Chen & Rao, 2024). Для достижения оптимального производства ванкомицина с использованием как традиционных, так и передовых методов было создано множество штаммов с высоким выходом ванкомицина, в том числе мутировавшие штаммы *A. orientalis* (инвентарный номер КССМ-10293), производящий ванкомицин с высоким выходом.

В достижении цели улучшение клинических параметров назначаемых АМП, в том числе ванкомицин, исследователи предлагают либо за счет повышения коэффициента их антибактериальной эффективности, либо за счет уменьшения их токсических эффектов (Bruniera

& Ferreira, 2015). Например, аналог «ванкомицина 18» был разработан для борьбы с ванкомицин-резистентными энтерококками и повышения устойчивости к нему с использованием модифицированного периферически ванкомицина, со связывающим карманом, который значительно усилил его активность, что привело к снижению значений минимальной ингибирующей концентрации с 250 мкг/мл^{-1} до $0,005\text{--}0,01 \text{ мкг/мл}^{-1}$. По сравнению с одобренным препаратом оритаванцином, в котором только одна (4-хлорбифенил — ХБФ) метильная группа добавлена в дисахарид ванкомицина, такие модификации предлагают аналогу «ванкомицина 18» большие преимущества против возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью. В совокупности эти модификации не только улучшают способность нарушать целостность клеточной мембраны, но и ингибируют синтез клеточной стенки. Интересно, что сочетание С-концевой модификации с добавлением периферического ХБФ к дисахариду в ванкомицине обеспечивает три независимых и синергических механизма действия, что значительно увеличивает затраты на приспособленность ванкомицин-резистентных энтерококков к получению новой устойчивости для борьбы с такими мощными антибактериальными препаратами (Bruniera & Ferreira, 2015).

Определение эффективности действующего антимикробного агента

Определение точной эффективности действующего антимикробного агента является критически важным по ряду научных и клинических причин:

1. Нормализация этиотропной терапии — идентификация чувствительности микроорганизмов к определенным антимикробным препаратам дает возможность врачам прописать наиболее подходящее лечение, что в свою очередь способствует быстрой эрадикации возбудителя и снижению заболеваемости и смертности от инфекционных болезней;

2. Снижение частоты антимикробной резистентности — неадекватное использование антимикробных средств, обусловленное неправильной оценкой их эффективности, может привести к селекции устойчивых штаммов микроорганизмов. Точное знание спектра активности препарата позволяет минимизировать развитие резистентности путем выбора таких терапий, которые полностью элиминируют патоген;

3. Фармакокинетика и фармакодинамика — понимание фармакокинетических и фармакодинамических характеристик антимикробного агента позволяет предсказать его концентрации в очаге инфекции и эффективность дозирования. Это особенно важно при лечении тяжёлых инфекций, где параметры, такие как минимальная подавляющая концентрация (MIC) и время превышения MIC, играют решающую роль;

4. Предотвращение побочных эффектов — недостаточно эффективные препараты могут потребовать увеличения дозировок или увеличения длительности лечения, что увеличивает риск токсичности и других побочных эффектов. Правильный выбор антимикробного агента минимизирует необходимость в таких корректировках и снижает вероятность нежелательных реакций;

5. Рациональная антимикробная политика — на уровне общественного здравоохранения знание спектра активности и точной эффективности антимикробных препаратов позволяет разрабатывать более эффективные стратегии борьбы с инфекционными заболеваниями, включая протоколы эмпирической терапии и меры по контролю распространения инфекций;

6. Клинические испытания и постмаркетинговый мониторинг — определение точной эффективности антимикробного препарата является основой для клинических испытаний, что обеспечивает его безопасность и эффективность перед широкой практической применимостью. Последующий мониторинг подкрепляет данные о его клинической эффективности в реальных условиях;

7. Экономические аспекты — использование наиболее эффективных антимикробных агентов уменьшает затраты на лечение за счёт сокращения длительности терапии, уменьшения необходимости в повторных курсах лечения и снижению затрат на лечение осложнений, вызванных неэффективной терапией.

Сравнительный анализ фармакопейных методов определения антимикробной активности, как основного показателя эффективности ванкомицина, их преимущества и недостатки

В настоящее время основные фармакопеи мира рекомендуют биологические методы для определения большинства антибиотиков (Семенова & Саканян, 2017). В Европейской, Американской, Британской и Индийской фармакопеях особое внимание уделяют двум методам — специфический турбидиметрический метод и диффузия в агаре. В отечественной фармакопее (ГФ РФ) чаще прибегают к применению диффузионного метода в микробиологических исследованиях, хотя в последней версии издания ГФ РФ XV была впервые введена ОФС (общая фармакопейная статья) по методике турбидиметрии.

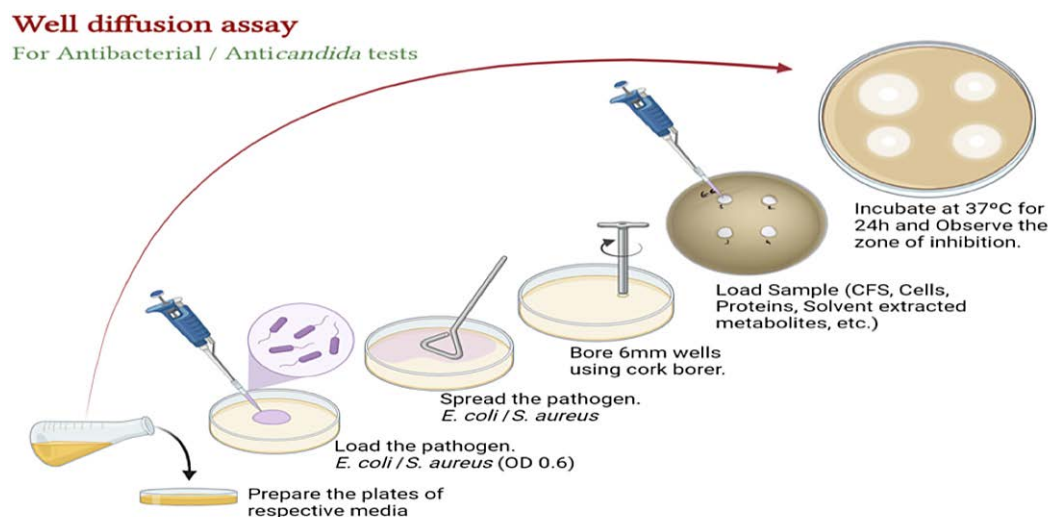
Диффузия в агар будучи фармакопейным биологическим методом анализа активности антибиотиков, суть которого заключается в проникновении лекарственных веществ антибиотиков в слои агара, а затем формирование зоны подавления, где рост тест-штаммов ограничен или в противном случае отсутствует полностью (Семенова & Кулешова, 2020). Метод демонстрирует прямую логарифмическую зависимость уровня подавления жизнедеятельности тест-микроорганизма от концентрации лекарственного средства, при этом чтобы данная зависимость прослеживалась, доза антибиотика должна быть строго в конкретных границах концентраций. Снижение эффективности антибиотиков зачастую приводит к преобразованиям, которые сложно идентифицировать современными химическими методами, такими как ВЭЖХ. Понижение активности антибиотиков является фактором, ведущим к изменениям, невидимым химическими методами анализа, в таком случае приоритетны микробиологические методы касаясь понижения активности антибиотиков. Государственная фармакопея XV издания включает ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар», описывающая детально две вариации метода и применение метода стандартной логарифмической кривой, где определён компонентный состав буферных растворов и питательных сред, которые применяются при экспертизах антибиотиков, с конкретно прописанными условиями выполнения про-

Рисунок 5

Метод диффузии в агар (Correa M. G. et al, 2020)

Figure 5

Agar Diffusion Method (Correa M. G. et al, 2020)



цедуры испытания, культивации и хранения тест-штаммов (Семенова & Кулешова, 2020). Так, например, для определения ванкомицина используется среда, г/л: пептон – 6 г, панкреатический гидролизат казеина – 4,0 г, говяжий экстракт – 1,5 г, дрожжевой экстракт – 3,0 г, глюкозы моногидрат – 1,0 г, агар-агар – 15 г, вода до 1 л, pH 8,00,1. Схематичное изображение метода предложено на Рисунке 5.

В микробиологических анализах для определения антимикробного свойства ванкомицина методом диффузии в агар *Bacillus subtilis* ATCC 6633 или *Bacillus subtilis* W23 используются в качестве эталонных микроорганизмов (El-Aziz & Fathy, 2021). Оценка антимикробной активности антибиотиков базируется на их действии по угнетения роста патогенных микроорганизмов. В данном контексте это метод позволяет оценивать размеры диаметры зон ингибирования роста различных штаммов при воздействии на них различных растворов стандартного образца антибиотика и тестируемого вещества препарата в определённых установленных дозах (Correa et al., 2020). Питательную среду, соответствующую конкретному тест-микроорганизму по его метаболическим потребностям, разливают по чашкам Петри в один или два слоя. При использовании только нижнего слоя агара микроорганизмы инокулируют в питательную среду до ее затвердевания и далее разливают в чашки Петри. Если в испытании подразумевается двухслойный вариант метода диффузии в агар, то для нижнего уровня применяют чистые питательные среды и после их застывания заливают верхним слоем агара, зараженного соответствующим

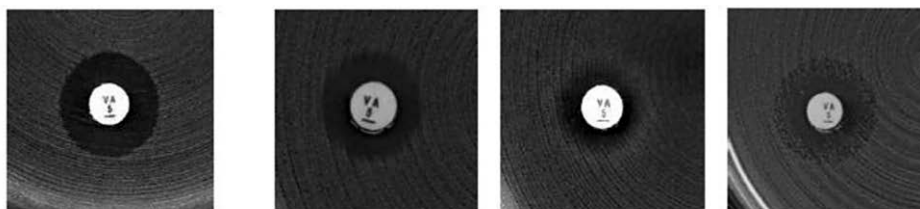
тест-микроорганизмом. Посевную дозу (плотность микробной взвеси, обеспечивающую выраженные участки угнетения) устанавливают эмпирическим путем. Доза тест-штаммов может редактироваться, исходя из лабораторных условий, и после периода культивирования должна привести к образованию зон ингибирования не менее 14 мм для минимальной подавляющей концентрации. Чтобы получить корректные результаты важно соблюдать точный температурный режим в термостате и время инкубации. Понижение объема разливаемого агара прямо пропорционально увеличению зон, следовательно повышение объема – к уменьшению диаметра зон, следовательно, площади зон могут быть изменены в зависимости от концентрации стандартного образца и тестируемого антибиотика. К примеру, для энтерококков, которые уязвимы перед ванкомицином, при диско-диффузионной вариации метода заметно образование четко выраженных изолированных краев зон угнетения роста и диаметр свыше 12 мм (Рисунок 6) (Шепелин & Домотенко, 2019). Нечетко выраженные края зоны угнетения роста или в зоне ингибирования присутствуют единичные колонии – все это свидетельствует о устойчивости к ванкомицину. Результаты должны быть оценены при проходящем свете. О восприимчивости культуры к ванкомицину можно судить только после 24 часов инкубации. Подготовка основных растворов стандартных и испытуемых образцов осуществляется с тем, чтобы разница в концентрации между ними была незначительной (Муравьева, 2022), что крайне полезно при исследовании фармакокинетических параметров антибиотиков и нахождении концентрации антибиотиков в органах животных, кровяной

Рисунок 6

Пример диско-диффузионного метода на энтерококках (Шепелин & Домотенко, 2019)

Figure 6

An Example of the Disk Diffusion Method on Enterococci (Shepelin & Domotenko, 2019)



плазме и других тканях, в виду чего активно используется в научных лабораториях благодаря своей скорости, простоте и удобстве проведения.

Для биологического анализа антибиотиков методом диффузии в агар Фармакопея США предлагает применить общепризнанный однодозный дизайн метода (5×1 схема), в то время как Британская и Бразильская фармакопеи прописывают трехдозный (3×3 схема) и двухдозный (2×2 схема) подходы (Семенова & Кулешова, 2020). В отечественной фармакопее применяются только два варианта метода: однодозный и трехдозный. Однако стоит обратить внимание, что каждый из этих экспериментальных дизайнов метода имеет свои плюсы и минусы. Например, трехдозная и двухдозная версии дизайнов применяются в исследованиях для выявления значений регрессии и параллельности кривых стандарта и образца, но их использование требует крупных затрат и временных ресурсов. С другой стороны, однодозный дизайн (5×1 схема) позволяет быстро протестировать множество образцов, однако для проведения расчетов требуется дополнительная коррекция, создавая сложности и потенциальные неточности в процедуре вычислений. Объединение преимуществ двухдозного и однодозного подходов представляет значительный научный интерес и способствует получению более достоверных результатов. Так, например, в рамках недавнего исследования для определения антимикробной активности ванкомицина был использован однодозный подход (5×1 схема), который соответствует Американской фармакопее (Heng et al., 2012).

Определение линейной зависимости и диапазона работы позволяет выявить границы концентраций антибактериального лекарственного средства, в пределах которой размер диаметра зон ингибирования тест-микроорганизмов пропорционален логарифму концентрации раствора антибиотика, и, таким образом, наблюдается параметр линейности (Семенова & Кулешова, 2019). Линейность выявляется в ограниченном диапазоне концентраций антибиотиков. Методы математической статистики широко применяются для оценки результатов,

позволяя установить четкие границы параметров доверительного интервала. Это необходимо для обеспечения точности показателей с вероятностью 95 %. В процессе анализа также учитывается относительное стандартное отклонение для проверки сходимости и воспроизводимости итоговых результатов активности. Метод дисперсионного анализа используют для подтверждения корректности и точности полученных результатов, в рамках которого требуется исполнить в районе 6 повторных контрольных процедур испытания в последовательные дни для варианта этого метода с применением стандартной логарифмической кривой. Следовательно расчет относительного стандартного отклонения оценивается как приоритетный параметр для подтверждения сходимости полученных результатов. При учете корректности изучаемых параметров повторов трёхдозным вариантом метода диффузии в агар важно знать, что фундаментальной для математической обработки значений выступает модель параллельных линий (Семенова & Кулешова, 2019).

Условия корректности модели прописаны следующим образом:

1. Взаимосвязь логарифма концентрации лекарственного средства от диаметра зон подавления демонстрируется прямая линия в охвате всех принятых концентраций;
2. Параллельность графика зависимости логарифма дозы от диаметра ингибированных зон для каждого испытуемого препарата должна соответствовать графику для стандартного образца с минимальным отклонением;
3. Для каждого тестируемого препарата и стандартного образца число разведений всегда одинаковое;
4. Между каждой последовательной дозой числовой интервал должен быть неизменным и равным.

Промежуток между линиями демонстрирует корректное значение антимикробной активности испытуемого объекта по отношению к предполагаемой активности. Действительное значение активности должно максимально приближаться к ожидаемой активности антибиотика.

Точность установления ожидаемой активности препарата по отношению к эталонному образцу прямо влияет на близость и параллельность линий, что показывает одинаковый эффект при равных дозах (Кулешова, 2015). В трехдозном варианте метода подготавливается серия разведений с приблизительно одинаковой активностью исходя из предполагаемой активности исследуемого средства и принятой активности эталонного препарата. Таким образом в Таблице 2 выявлены следующие преимущества и недостатки метода диффузии в агар.

Таблица 2
Преимущества и недостатки метода диффузии в агар
Table 2
Advantages and Disadvantages of the Agar Diffusion Method

Преимущества	Недостатки
Доступность выполнения анализа, поскольку не требуется какое-либо специальное оборудование	длительность проведения анализа, анализ по времени занимает около 16–18 часов
Точная чувствительность и селективность.	Зависимость аналитического отклика от таких свойств антибиотика, как его молекулярной массы, растворимости и т. п., которые не связаны с его активностью
Корректность и воспроизводимые результаты, которые легче интерпретировать	чувствительность тест-культур к качеству используемого агара
Способность тестировать большое количество микроорганизмов	сложность автоматизации

Другим вариантом биологического метода исследования является турбидиметрия (Олефир, 2018). Турбидиметрический анализ входит в группу оптических методов исследования (Tótolí & Salgado, 2013). На данный момент, согласно действующим нормативным документам, таким как издания Американской, Европейской, Японской и Британской Фармакопеи, турбидиметрия широко используется как ключевой метод для оценки коллоидного состава при стандартизации и контроле качества разнообразных лекарственных форм. Турбидиметрия, как современный аппаратный метод, нашла широкое применение в соответствии с российской фармакопеей для оценки прозрачности и степени мутности жидкостей. Она регулируется стандартами ОФС.1.2.1.1.0014 «Турбидиметрия» и ОФС.1.2.1.0007 «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей». Этот метод используется в анализе различных лекарственных форм, включая концентраты, суспензии, капли (включая глазные капли на водной основе) и растворы (например, растворы для инъекций) (Саканян,

2022). Недавние исследования продемонстрировали, что при надлежащей организации и использовании современных оптических приборов турбидиметрический метод может превзойти колориметрические методы и спектрофотометрию в области количественного анализа лекарственных препаратов.

В основе турбидиметрического метода измерения активности антибиотиков лежит взаимодействие между испытуемым объектом-препаратом и контрольным тест-штаммом бактерий, что в дальнейшем выражается как логарифмическая зависимость между показателем подавления роста микробной популяции и концентрацией антибиотика. Подавление роста микробов фиксируется по уровню выраженности мутности питательной среды, которая измеряется методом фотометрии после определённого периода инкубации. Установлено, что турбидиметрический метод имеет ряд особых условий к используемым тест-штаммам микроорганизмов. Подбор тест-штамма микроорганизма для количественного анализа ЛС является первоначальным этапом при выполнении метода турбидиметрии, который применяется как аналитический индикатор отклонений от нормальных показаний, например динамика роста тест-штамма. Тест-штамм должен быть наделен чувствительностью к исследуемому препарату для подтверждения достоверности и повторяемости результатов. Гомогенное и быстрое развитие в жидкой питательной среде, исключающее образование плёнок или осадков должно быть свойственно штамму микроорганизма. К примеру, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 был выбран для ванкомицина, в виду его высокой чувствительности к этому антибиотику и умеренными питательными потребностями, а также демонстрация значительно ускоренного роста в экспериментах по сравнению с *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Это связано с более длительной лаг-фазой у *Bacillus subtilis* ATCC 6633, обусловленной его биохимически низкой активностью и менее эффективным адаптивным механизмом в изменённых условиях. Кроме того, суспензии палочковидных бактерий демонстрируют двойное лучепреломление потока. Двойное лучепреломление вызывает изменение коэффициента пропускания, которое проявляется в медленном дрейфе показаний фотометра до тех пор, пока движение не прекратится. Требуемое время достаточно велико, чтобы замедлить скорость считывания результатов анализа. По этой причине формы кокков, такие как *S. aureus*, предпочтительнее палочковидных форм, таких как *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus* spp. и *Bacillus subtilis*.

Количество инокулята, или количество бактериальной взвеси, которое вводится в конкретный объем питательной среды, способен оказать видимое воздействие на результаты процедуры (Семенова & Кулешова, 2019). Например, недостаточная доза посева может привести

к увеличению времени выполнения турбидиметрического анализа. Это связано с тем, что требуется дополнительное время для достижения достаточной оптической плотности микробной популяции. Недостаточно высокая начальная концентрация клеток обусловит более длительный период инкубации, так как микроорганизму потребуется больше времени для размножения до необходимого уровня, чтобы обеспечить возможность точного измерения. Однако превышенное количество посевного материала так же способно привести к ухудшению эффективности метода в результате повышения необходимого количества антибиотика для угнетения жизнедеятельности тест-штамма микроорганизма. Следовательно, для каждого определенного препарата важно при проведении турбидиметрического анализа эмпирически определить оптимальное количество инокулята. На Рисунке 7 приведена методика выполнения турбидиметрического анализа.

При проведении турбидиметрических измерений параметр, который называется мутностью, соответствует параметру оптической плотности (Саканян, 2022). Изменение в мутности вызывает увеличение численности тест-штаммов в среде. Мутность определяет способность оптически гетерогенной среды рассеивать свет, исходя из светорассеяния, которое может быть определено либо через измерение интенсивности рассеянного

света, либо через измерение убывания интенсивности света, проходящего через эту среду. Для описания законом Бугера (или законом Бугера-Ламберта-Бера), влияние оптически гетерогенной среды на свет выражается через коэффициент поглощения τ . Этот закон показывает, как свет поглощается при прохождении через среду, и формулируется следующим образом:

$$I_x = I_0 e^{-\tau x},$$

где I_0 — интенсивность падающего света, I_x — интенсивность света после прохождения расстояния «х» в мутной среде.

Мутность является важным оптическим индикатором и способна предоставить сведения о концентрации микробных клеток в исследуемой суспензии. Если имеется стандартная калибровочная кривая, возникает возможность задействовать однократное измерение через использование спектрофотометра, что исключит необходимость затруднительного подсчета клеток непосредственно в камере, поскольку показатели мутности напрямую связаны с концентрацией клеток на относительно широком рабочем диапазоне (Саканян, 2022).

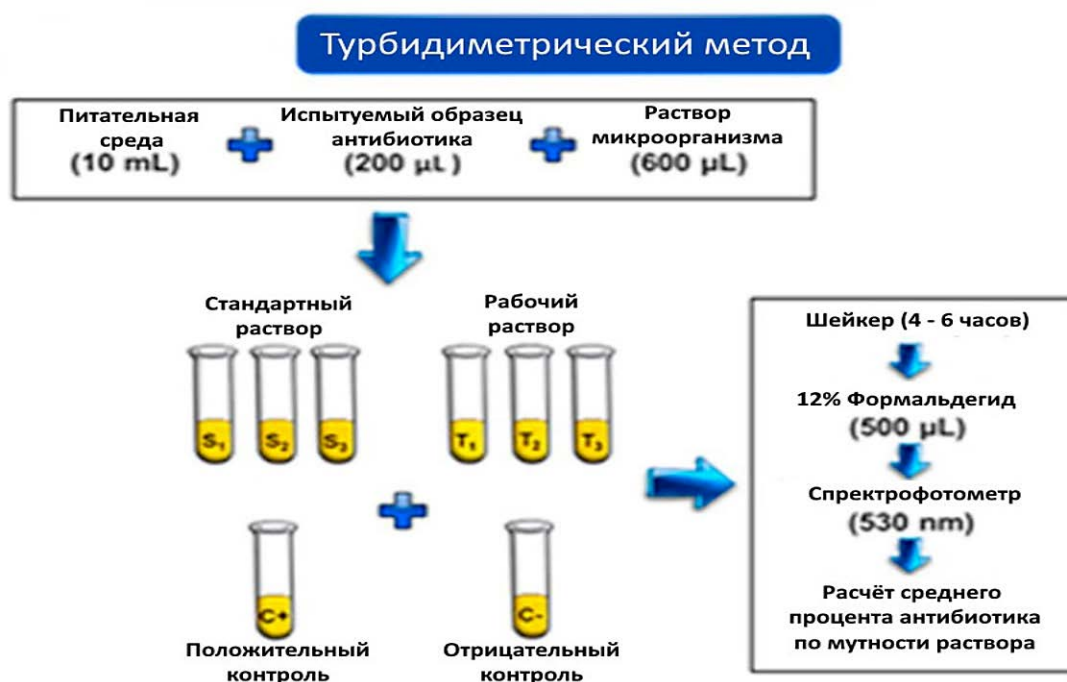
Чувствительность, оперативность и приемлемая достоверность результатов анализа являются неоспоримыми

Рисунок 7

Схема проведения турбидиметрического метода (Tótolí & Salgado, 2013)

Figure 7

Scheme of the Turbidimetric Method (Tótolí & Salgado, 2013)



преимуществами турбидиметрии. Достоинства метода также отметили Patrícia Aleixa do Nascimento в своей работе при тестировании турбидиметрического анализа на ванкомицине (Nascimento & Kogawa, 2020). По сравнению с методом диффузии в агар, метод турбидиметрии считается более экологичным, потому что он очень прост в выполнении, результаты легко оценить, а количество используемого раствора меньше. Однако главной характеристикой этого метода является сокращение времени анализа: получить доступ к результатам можно всего за 4–6 часа, в отличие от широко используемого метода диффузии в ага, который в среднем занимает около 18 часов. Аналитическая кривая была построена по проекту анализа параллельных линий 3 x 3 (3 дозы стандарта и 3 дозы образца). Рост бактерий измерялся спектрофотометрически при 530 нм. Микроорганизмы инкубировались не менее 24 часов до анализа. Количество эталонного ванкомицина (эквивалентно 5 мг чистого препарата) было точно взвешено в калиброванной колбе объемом 25 мл с деионизированной водой и ультразвуком в течение 5 минут для завершения растворения ванкомицина. После ультразвука объем колбы был закончен водой, чтобы получить окончательную концентрацию 200 µg/мл. Для приготовления раствора образца ванкомицина, количество 5,05 мг (эквивалентно 5 мг чистого препарата) лиофилизированного порошка ванкомицина для инъекций, взвешенное в калиброванную колбу объемом 25 мл с водой и ультразвуком в течение 5 минут. Для подготовки рабочих растворов соответствующие аликвоты этих стоковых растворов были взяты и переведены в колбу на 5 мл, которая была заполнена деионизированной водой для получения растворов 30, 39 и 50,7 µg/мл. Метод был выполнен с помощью микропланшетов, что значительно сокращает время эксперимента, по сравнению с эталонным методом с пробирками, где лаг-фаза по графику достигалась на 6 час инкубации. Селективность метода была выполнена путем анализа аналитических кривых, полученных для эталонных растворов ванкомицина и выборки. В пробирные трубки, содержащие 10 мл ВНИ (питательная среда), было добавлено 200 µL эталонного или образца, а также 0,6 мл стандартизированного инокулума. Трубки были помещены в шейкер-инкубатор на 4 часа. После этого периода было добавлено 0,5 мл 12 % раствора формальдегида для остановки размножения микробной культуры. По окончании эксперимента были проанализированы три аналитические кривые, которые были выполнены за три дня, и окончательная аналитическая кривая со средним показателем (Nascimento & Kogawa, 2020). Средние значения и уравнение линейной зависимости были определены с помощью линейного регрессионного анализа методом наименьших квадратов. (Саканян, 2022).

Но каждый метод имеет не только преимущества, но и ряд ограничений и недостатков (Trindade & Kogawa,

2021). Анализируя вышеизложенные данные, в Таблице 3 можно выявить недостатки и преимущества метода турбидиметрии.

Таблица 3
Преимущества и недостатки метода турбидиметрии
Table 3
Advantages and Disadvantages of the Turbidimetry Method

Преимущества	Недостатки
Высокая чувствительность даже на минимальной подавляющей концентрации	Метод неприемлем для плотно окрашенных растворов
Возможность количественного определения любых антибиотиков при условии наличия эталонного раствора изучаемого препарата: можно использовать как экспресс-метод — результат получают через 3,5–4 ч.	На результат могут повлиять и некоторые сопутствующие вещества, содержащиеся в испытуемом образце
Метод экономичен не только по расходным материалам, но и по количеству питательной среды	
Приемлемая достоверность результатов	

Однако применение этого метода в научной деятельности было ограничено из-за отсутствия и невозможности приобретения специализированного оборудования. В то же время, не малое количество научных работ посвящено исследованию и глобальному введению турбидиметрии как основного метода анализа антибактериальных препаратов, что привело к многочисленным опытам и исследованиям (Trindade & Kogawa, 2021). При должном структурировании и использовании передовых оптических устройств турбидиметрический подход может демонстрировать эффективную конкуренцию с колориметрией и спектрофотометрией в контексте количественного определения фармакологических препаратов. Преимущество турбидиметрии заключается в высокой чувствительности, скорости получения результата и достаточной точности анализа (Таблица 4).

Несомненно, метод турбидиметрии имеет огромный ряд преимуществ перед диффузией в агар и это означает необходимость его внедрения в более широкую область фармацевтического контроля качества ЛС. В данный момент метод обширно используют, как метод количественного определения антибиотиков в иностранных фармакопеех и занимает лидирующее место в применении в лабораториях за счет своих достоинств. Однако, в отечественной практике метод занимает малую

Таблица 4

Сравнительная таблица двух биологических методов исследования

Table 4

Comparative Table of Two Biological Methods in the Research

Параметр	Метод диффузии в агар	Метод турбидиметрии
Принцип	Определение зоны ингибирования роста микроорганизмов в агаре при действии антибиотика или другого вещества	Измерение изменения оптической плотности среды из-за образования мутности при росте микроорганизмов в присутствии антибиотика
Скорость выполнения	Требуется от 16 до 18 часов для видимого роста и зон ингибирования	Быстрое измерение изменений в оптической плотности, результаты могут быть получены в течение нескольких часов
Объективность	Оценка зон ингибирования требует субъективной интерпретации	Результаты турбидиметрии могут быть количественно интерпретированы
Требование к оборудованию	Требуется стерильных условий для приготовления агара и роста микроорганизмов	Требуется турбидиметр для измерения оптической плотности
Применимость	Широко используется для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам	Применим для измерения роста различных микроорганизмов и оценки их реакции на антибиотики
Точность	Оценка зон ингибирования может быть менее точной из-за субъективных факторов	Турбидиметрия обеспечивает более точные количественные измерения изменений оптической плотности
Примеры использования	Определение чувствительности бактерий к антибиотикам	Мониторинг роста бактерий и их реакции на различные концентрации антибиотиков
Простота анализа	Оценка зон роста может быть менее сложной для интерпретации	Требуется более высокой степени автоматизации и обработки данных
Требуемое количество образцов	Требуется более крупное количество агара для проведения эксперимента	Детектирование изменений в оптической плотности возможно при использовании небольшого объема образца

нишу и в более узких направлениях, таких как определение бактериальных эндотоксинов (ОФС.1.2.4.0006.15) и в иммунологических анализах для фиксации образования комплексов антиген-антитело.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена аналогия между АМП и антибиотиками на основе их общих черт и разобраны отличительные черты, которые и распределяют их по разным группам биоактивных веществ; описаны механизмы антимикробной активности АМП и гликопептидов и области их применения; дана полная характеристика ванкомицину — представителю группы гликопептидных антибиотиков, описан его механизм бактерицидного действия, полный молекулярный синтез. Проанализированы фармакопейные методы антимикробной активности: методу диффузии в агар и турбидиметрический анализ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование турбидиметрического метода в рутинной лабо-

раторной практике гораздо выгоднее, быстрее и точнее, чем метода диффузии в агар, однако этот метод пока что не имеет должной популярности в связи с ограниченностью лабораторий в необходимом оборудовании. Дальнейшие направления исследований по теме включают определение антимикробной активности ванкомицина турбидиметрическим методом, определение нормальной взаимосвязи «доза-реакция» и установку корреляции между оптической плотностью бактериальной популяции и концентрацией антибиотика, валидацию и стандартизацию данной методики для дальнейшего масштабного применения.

ВКЛАД АВТОРОВ

Шахова Д.А.: курирование данных, проведение исследования, формальный анализ, написание черновика рукописи, визуализация

Каночкина М.С.: разработка концепции, разработка методологии, административное руководство исследовательским проектом, научное руководство, написание рукописи- рецензирование и редактирование

AUTHORS CONTRIBUTION STATEMENT

Daria A. Shakhova: data curation, investigation, writing-original draft preparation, visualization

Maria S. Kanochkina: conceptualization, methodology, project administration, supervision, writing- review & editing

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

- Андрюков, Б. Г., Беседнова, Н. Н., & Запорожец, Т. С. (2022). К 80-летию создания грамицидина С: от изучения асимметрии бактериальных молекул к открытию антимикробных пептидов. *Антибиотики и химиотерапия*, 67(3–4), 85–92. <http://dx.doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-85-92>
- Andriukov, B. G., Besednova, N. N., & Zaporozhets, T. S. (2022). On the 80th anniversary of gramicidin C: from the study of the asymmetry of bacterial molecules to the discovery of antimicrobial peptides. *Antibiotics and Chemotherapy*, 67(3–4), 85–92. <http://dx.doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-85-92> (In Russ.)
- Белый, П. А., Лопатухин, Э. Ю., Заславская, К. Я., Федоров, С. В., Земсков, Д. Н., & Нигматова, Д. А. (2023). *Новый штамм – продуцент ванкомицина Amycolatopsis japonica*. Российский патент № RU2788348C1 от 17.01.2023; Бюл. № 2.
- Bely, P. A., Lopatukhin, E. Yu., Zaslavskaya, K. Ya., Fedorov, S. V., Zemskov, D. N., & Nigmatova, D. A. (2023). A new strain is a producer of vancomycin *Amycolatopsis japonica*. Russian patent №RU2788348C1 dated 17.01.2023; Byul. No. 2. (In Russ.)
- Близняк, О. В., & Уранова, В. В. (2023). Современные тенденции развития мирового фармацевтического рынка. *Тенденции развития науки и образования*, 97(9), 163–167. <http://dx.doi.org/10.18411/trnio-05-2023-517>
- Bliznyak, O. V., & Uranova, V. V. (2023). Current trends in the development of the global pharmaceutical market. *Trends in the development of science and education*, 97(9), 163–167. <http://dx.doi.org/10.18411/trnio-05-2023-517> (In Russ.)
- Ботнарчук, М. В., & Тимченко, Т. Н. (2022). Российский фармацевтический рынок: основные тренды развития и ценообразования в современных условиях. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*, 30(2), 198–206. <http://dx.doi.org/10.32687/0869-866X-2022-30-2-198-206>
- Botnariuk, M. V., & Timchenko, T. N. (2022). The Russian pharmaceutical market: the main trends of development and pricing in modern conditions. *Problems of Social Hygiene, Public Health and the History of Medicine*, 30(2), 198–206. <http://dx.doi.org/10.32687/0869-866X-2022-30-2-198-206> (In Russ.)
- Борисенко, Е. А., & Солдатова, С. Ю. (2018). Фармакологическое действие компонентов ромашки аптечной и ее использование в косметических средствах. В *Сборник материалов национальной научно-практической конференции «Биотехнология и продукты биоорганического синтеза»* (стр. 135–140).
- Borisenko, E. A., & Soldatova, S. Y. (2018). Pharmacological action of chamomile components and its use in cosmetics. In the proceedings of the national scientific and practical conference "Biotechnology and bioorganic synthesis products" (pp. 135–140). (In Russ.)
- Венедиктова, Н. В. (2023). История получения и перспективы использования природных и полусинтетических гликопептидов. *Молодая фармация-потенциал будущего*, 720–724.
- Venediktova, N. V. (2023). History of obtaining and prospects of using natural and semi-synthetic glycopeptides. *Young Pharmacy-the potential of the future*, 720–724. (In Russ.)
- Высочанская, О. Н., Кулешова, С. И., & Симонова, Е. П. (2023). Гликопептидные антибиотики: структурно-функциональные аспекты, применение в медицине и стандартизация. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*, 13(2–1), 261–270. <http://dx.doi.org/10.30895/1991-2919-2022-447>
- Vysochanskaya, O. N., Kuleshova, S. I., & Simonova, E. P. (2023). Glycopeptide antibiotics: structural and functional aspects, application in medicine and standardization. Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical devices. *Regulatory Research and Expertise of medicines*, 13(2–1), 261–270. <http://dx.doi.org/10.30895/1991-2919-2022-447> (In Russ.)
- Ковзалов, Н. С., Манаева, А. Д., & Немцева, Н. В. (2023). Нерибосомальные пептиды и их применение в современной медицине. *Международный студенческий научный вестник*, 2. <http://dx.doi.org/10.17513/msnv.21262>

- Kovzalov, N. S., Manaeva, A.D., & Nemtseva, N. V. (2023). Non-ribosomal peptides and their application in modern medicine. *International Student Scientific Bulletin*, 2. <http://dx.doi.org/10.17513/msnv.21262> (In Russ.)
- Ковтун, Н. А., Миронов, А. В., Редько, И. А., Титарова, Ю. Ю., Базарова, М. Б., & Бояринцев, В. В. (2023). Двухлетнее исследование антимикробной активности цементного спейсера с ванкомицином *in vitro*. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*, 4, 49–51. <http://dx.doi.org/10.48612/cgma/319k-u5t5-agtb>
- Kovtun, N. A., Mironov, A.V., Redko, I. A., Titarova, Yu. Y., Bazarova, M. B., & Boyarintsev, V. V. (2023). A two-year study of the antimicrobial activity of a cement spacer with vancomycin *in vitro*. *Kremlin medicine. Clinical Bulletin*, 4, 49–51. <http://dx.doi.org/10.48612/cgma/319k-u5t5-agtb> (In Russ.)
- Кулешова, С. И. (2015). Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*, 3.
- Kuleshova, S. I. (2015). Determination of antibiotic activity by diffusion into agar. *Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical devices*, 3. (In Russ.)
- Лагун, Л. В., Кашина, Н. А., & Кульвинский, Е. А. (2021). Антибактериальная активность ванкомицина в отношении метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 23(S1), 24–25.
- Lagun, L. V., Kashina, N. A., & Kulvinsky, E. A. (2021). Antibacterial activity of vancomycin against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 23(S1), 24–25. (In Russ.)
- Лопатина, П. А. (2023). Фармацевтическая промышленность в условиях нестабильности экономики и перспективы ее развития. *Экономика и бизнес: теория и практика*, 9(103). <http://dx.doi.org/10.24412/2411-0450-2023-9-130-134> (In Russ.)
- Lopatina, P. A. (2023). Pharmaceutical industry in conditions of unstable economy and prospects for its development. *Economics and Business: Theory and Practice*, 9(103). <http://dx.doi.org/10.24412/2411-0450-2023-9-130-134>
- Марущак, М. М., & Субботина, Т. Н. (2023). Влияние санкционных мер на производство лекарственных препаратов в России. *Экономика и бизнес: теория и практика*, 12–1(106). <http://dx.doi.org/10.24412/2411-0450-2023-12-1-136-138>
- Marushchak, M. M., & Subbotina, T. N. (2023). The impact of sanctions on the production of medicines in Russia. *Economics and Business: Theory and Practice*, 12–1(106). <http://dx.doi.org/10.24412/2411-0450-2023-12-1-136-138> (In Russ.)
- Цзыюань, М., & Кочергин, Н. Г. (2019). Антимикробные пептиды в терапии больных вульгарными угрями. *Российский журнал кожных и венерических болезней*, 5–6.
- Ziyuan, M., & Kochergin, N. G. (2019). Antimicrobial peptides in the treatment of patients with acne vulgaris. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 5–6. (In Russ.)
- Муравьева, В. Б., Соболева, Н. И., Махлис, О. А., Бондаренко, В. О., & Дорожкин, В. И. (2022). Сравнительная характеристика методов диффузии в агар для определения активности тилозина. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*, 1(41), 93–98. <http://dx.doi.org/10.36871/vet.san.hyg.ecol.202201011>
- Muravyeva, V. B., Soboleva, N. I., Makhlis, O. A., Bondarenko, V. O., & Dorozhkin, V. I. (2022). Comparative characteristics of agar diffusion methods for determining tylosin activity. *Russian Journal Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology*, 1(41), 93–98. <http://dx.doi.org/10.36871/vet.san.hyg.ecol.202201011> (In Russ.)
- Олефир, Ю. В. (2018). Применение турбидиметрического метода анализа для стандартизации и оценки качества антибиотиков группы аминогликозидов и лекарственных препаратов на их основе. *Антибиотики и химиотерапия*, 63(7–8), 62–66.
- Olefir, Yu. V. (2018). The use of the turbidimetric analysis method for standardization and quality assessment of antibiotics of the aminoglycoside group and drugs based on them. *Antibiotics and Chemotherapy*, 63(7–8), 62–66. (In Russ.)
- Саканян, Е. И. (2022). Турбидиметрия в стандартизации и контроле качества лекарственных средств (на примере антибиотиков группы аминогликозидов). *Автореферат на соискание степени канд. тех. наук*, 1–23.
- Sakanyan, E. I. (2022). Turbidimetry in standardization and quality control of medicines (using the example of antibiotics of the aminoglycoside group). *Abstract for the degree of Candidate of Technical Sciences*, 1–23. (In Russ.)
- Семенова, Е. Н., & Кулешова, С. И. (2019). Определение антимикробной активности гентамицина в креме для наружного применения турбидиметрическим методом. *Научный диалог: Вопросы медицины*, 15–19. <http://dx.doi.org/10.18411/sciencepublic-15-07-2019-05>
- Semenova, E. N., & Kuleshova, S. I. (2019). Determination of antimicrobial activity of gentamicin in cream for external use by turbidimetric method. *Scientific Dialogue: Questions of Medicine*, 15–19. <http://dx.doi.org/10.18411/sciencepublic-15-07-2019-05> (In Russ.)
- Семенова, Е. Н., Кулешова, С. И., & Саканян, Е. И. (2020). Разработка турбидиметрической методики количественного определения антибиотиков группы аминогликозидов в лекарственных препаратах для медицинского применения. *Антибиотики и химиотерапия*, 65(7–8), 37–41. <http://dx.doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-7-8-37-41>
- Semenova, E. N., Kuleshova, S. I., & Sakanyan, E. I. (2020). Development of a turbidimetric technique for the quantitative determination of antibiotics of the aminoglycoside group in

- medicinal products for medical use. *Antibiotics and Chemotherapy*, 65(7–8), 37–41. <http://dx.doi.org/10.37489/0235–2990–2020–65–7–8–37–41> (In Russ.)
- Семенова, Е. Н., Саканян, Е. И., & Кулешова, С. И. (2017). Сравнительная характеристика методов количественного определения, используемых при стандартизации и последующей оценке качества антибиотиков. *Вестник Российской военно-медицинской академии*, 3, 140–146.
- Semenova, E. N., Sakanyan, E. I., & Kuleshova, S. I. (2017). Comparative characteristics of quantitative determination methods used in standardization and subsequent evaluation of antibiotic quality. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 3, 140–146. (In Russ.)
- Солдатова, С.Ю., Филатова, Г.Л., & Куликовская, Т.С. (2019). Листериоз — эмерджентная инфекция с пищевым путем передачи. *Вестник Нижневартковского государственного университета*, 2, 110–117.
- Soldatova, S.Y., Filatova, G.L., & Kulikovskaya, T.S. (2019). Listeriosis is an emergent infection with foodborne transmission. *Bulletin of Nizhnevartovsk State University*, 2, 110–117. (In Russ.)
- Субботина, Т.Н., & Несук, П.И. (2023). Деятельность фармацевтических кластеров в условиях геополитического кризиса. *Экономика и бизнес: теория и практика*, 12–2 (106). <http://dx.doi.org/10.24412/2411–0450–2023–12–2–166–169>
- Subbotina, T.N., & Nesuk, P.I. (2023). The activity of pharmaceutical clusters in the context of the geopolitical crisis. *Economics and Business: Theory and Practice*, 12–2 (106). <http://dx.doi.org/10.24412/2411–0450–2023–12–2–166–169> (In Russ.)
- Тарасевич, В. Н. (2019). Антибиотики для медицинского применения на фармацевтическом рынке Российской Федерации. *Медико-фармацевтический журнал Пульс*, 21(11), 101–109. <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686–6838–2019–21–11–101–109>
- Tarasevich, V. N. (2019). Antibiotics for medical use in the pharmaceutical market of the Russian Federation. *Pulse Medical and Pharmaceutical Journal*, 21(11), 101–109. <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686–6838–2019–21–11–101–109> (In Russ.)
- Халимова, А.А., Орлов, А.С., & Таубэ, А.А. (2024). Анализ локализации производства биотехнологических лекарственных препаратов в России с учетом происхождения активных фармацевтических субстанций. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*, 14(1):53–61. <http://dx.doi.org/10.30895/1991–2919–2024–14–1–53–61>
- Halimova, A.A., Orlov, A.S., & Taube, A.A. (2024). Analysis of the localization of the production of biotechnological medicines in Russia, taking into account the origin of active pharmaceutical substances. *Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical devices. Regulatory Research and Expertise of Medicines*, 14(1):53–61. <http://dx.doi.org/10.30895/1991–2919–2024–14–1–53–61> (In Russ.)
- Шепелин, А. П., & Домотенко, Л. В. (2019). Диско-диффузионный метод для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. *Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии*, 4(1), 2–5.
- Shepelin, A. P., & Domotenko, L. V. (2019). Disco diffusion method for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. *Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 4(1), 2–5. (In Russ.)
- Эйдельштейн, М. В., Козлов, Р. С., Сухорукова, М. В., Иванчик, Н. В., Скленова, Е. Ю., Тимохова, А. В., & Дехнич, А. В. (2014). Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. *Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии*, 175–195.
- Eidelstein, M. V., Kozlov, R. S., Sukhorukova, M. V., Ivanchik, N. V., Skleenova, E. Yu., Timokhova, A.V., & Dehnich, A.V. (2014). Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. Clinical recommendations. *Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 175–195. (In Russ.)
- Alexander, H. T. & Chu, P. (1996). Abbott Laboratories, Abbott Park, IL. Process for making vancomycin. *United States Patent US 5574135*.
- Barreateau, H., Patin, D., Bouhss, A., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., & Touzé, T. (2020). CbrA Mediates Colicin M Resistance in *Escherichia coli* through Modification of Undecaprenyl-Phosphate-Linked Peptidoglycan Precursors. *Journal of Bacteriology*, 202:10.1128/jb.00436–20. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00436–20>
- Bruniera, F.R., Ferreira, F.M., Saviolli, L.R., Bacci, M.R., Feder, D., da Luz Gonçalves Pedreira, M., Sorgini Peterlini, M.A., Azzalis, L.A., Campos Junqueira, V.B., & Fonseca, F.L. (2015). The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(4):694–700.
- Chen, S., Rao, M., Jin, W., Hu, M., Chen, D., Ge, M., Mao, W., & Qian, X. (2024). Metabolomic analysis in *Amycolatopsis keratiniphila* disrupted the competing ECO0501 pathway for enhancing the accumulation of vancomycin. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10;40(10), 297. <https://doi.org/10.1007/s11274–024–04105–9>
- Correa, M. G. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: A review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11 (1), 1450–1469. <http://dx.doi.org/10.3762/bjnano.11.129>
- El-Aziz, H.A., Fathy, M.E., El-Enany, N., Aly, F.A., & Tolba, M.M. (2021). Investigation of some univariate and multivariate spectrophotometric methods for concurrent estimation of Vancomycin and Ciprofloxacin in their laboratory prepared

- mixture and application to biological fluids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 253, 119570. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2021.119570>
- Heng, W. L. (2012). From penicillin-streptomycin to amikacin-vancomycin: antibiotic decontamination of cardiovascular homografts in Singapore. *PloS one*, 7 (12). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051605>
- Jekhmene, S., Derks, M.G.N., Maity, S., Slingerland, C.J., Tehrani, K.H.M.E., Medeiros-Silva, J., Charitou, V., Ammerlaan, D., Fetz, C., Consoli, N.A., Cochrane, R.V.K., Matheson, E.J., van der Weijde, M., Elenbaas, B.O.W., Lavore, F., Cox, R., Lorent, J.H., Baldus, M., Künzler, M., Lelli, M., Cochrane, S.A., Martin, N.I., Roos, W.H., Breukink, E., & Weingarth, M. (2024). Host defence peptide plectasin targets bacterial cell wall precursor lipid II by a calcium-sensitive supramolecular mechanism. *Nature Microbiology*, 9(7), 1778–1791. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-024-01696-9>
- Jung, H.M., Kim, S.Y., Moon, H.J., Oh, D.K., & Lee, J.K. (2007). Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), 789–95. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1221-4>
- Li, Q., Montalban-Lopez, M., & Kuipers, O.P. (2018). Increasing the Antimicrobial Activity of Nisin-Based Lantibiotics against Gram-Negative Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, e00052–18. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00052-18>
- Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022). Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules*, 27(9), 2675. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092675>
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., & Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14098>
- Liu, Y., Shuangyang, D., Jianzhong, Sh., & Kui, Zhu. (2019). Nonribosomal antibacterial peptides that target multidrug-resistant bacteria. *Natural product reports*, 36 (4), 573–592. <http://dx.doi.org/10.1039/C8NP00031J>
- Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11401. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222111401>
- Teixeira da Trindade, M., Kogawa, A.C., & Nunes Salgado, H. R. (2021). Turbidimetric Method: A Multi-Vantageous Option for Assessing the Potency of Ceftriaxone Sodium in Powder for Injection. *Journal of AOAC International*, 104 (1), 204–210. <http://dx.doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa085>
- Marschall, E., Cass, R.W., Prasad, K.M., Swarbrick, J.D., McKay, A.I., Payne, J.A.E., Cryle, M.J., & Tailhades, J. (2023). Synthetic ramoplanin analogues are accessible by effective incorporation of arylglycines in solid-phase peptide synthesis. *Chemical Science*, 15(1), 195–203. <http://dx.doi.org/10.1039/d3sc01944f>
- Ned, P.B., Halana, C., Vlaming C., Kotsogianni, I., Arts, M., Willemse, J., Duan, Y., Alexander, F. M., Cochrane, St.A., Schneider, T., & Martin, N.I. (2024). A classic antibiotic reimagined: Rationally designed bacitracin variants exhibit potent activity against vancomycin-resistant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121, 29. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2315310121>
- Nicolaou, K. C., Nicolaou, K.C., Mitchell, H.J., Jain, N.F., Winssinger, N., Hughes, R., & Bando, T. (1999). Total synthesis of vancomycin. *Angewandte Chemie International Edition*, 38 (1-2), 240–244. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990115\)38:1/2](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2)
- Park, J.H., Reviello, R.E., & Loll, P.J. (2024). Crystal structure of vancomycin bound to the resistance determinant D-alanine-D-serine. *Journal from the International Union of Crystallography*, 11(2), 133–139. <http://dx.doi.org/10.1107/S2052252524000289>
- Do Nascimento, P.A., Kogawa, A.C., & Nunes Salgado, H.R. (2020). Turbidimetric Method: A New, Ecological, and Fast Way to Evaluate of Vancomycin Potency, *Journal of AOAC International*, 103 (6), 1582–1587. <http://dx.doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa068>
- Ponder, C., & Overcash, M. (2010). Cradle-to-gate life cycle inventory of vancomycin hydrochloride. *Science of the Total Environment*, 408(6), 1331–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.057>
- Protić, S., Kaličanin, N., Sencanski, M., Prodanović, O., Milicevic, J., Perovic, V., Paessler, S., Prodanović, R., & Glisic, S. (2023). In Silico and In Vitro Inhibition of SARS-CoV-2 PLpro with Gramicidin D. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1955. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24031955>
- Tótolí, E. G., & Salgado, H. R. N. (2013). Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for injectable solution. *Analytical Methods*, 5 (21), 5923–5928. <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY40847G>
- Trimble, M.J., Mlynářčík, P., Kolář, M., & Hancock, R.E. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), 025288. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025288>
- Vila, M. M. D. C., Machado de Oliveira, R., Gonçalves, M.M., & Tubino, M. (2007). Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals. *Química Nova*, 30, 395–399. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200029>
- Zhu, J., Wang, S., Wang, C., Wang, Z., Luo, G., Li, J., Zhan, Y., Cai, D., & Chen, S. (2023). Microbial synthesis of bacitracin: Recent progress, challenges, and prospects. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(2), 314–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2023.03.009>