

# Оценка бактерицидной активности грамицидина С в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* при однократном и многократном воздействии

\*А. В. ГУРОВ<sup>1,2</sup>, К. Е. БОРОВКОВА<sup>3</sup>, К. Л. КРЫШЕНЬ<sup>3</sup>,  
Л. Р. НИКИФОРОВА<sup>3</sup>, Ю. В. САЛМОВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

<sup>3</sup> АО «НПО «Дом Фармации», г. п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

## Evaluation of the Bactericidal Activity of Gramicidin S Against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates with Single and Multiple Exposure

\*ALEXANDER V. GUROV<sup>1,2</sup>, KRISTINA E. BOROVKOVA<sup>3</sup>, KIRILL L. KRYSHEN<sup>3</sup>,  
LIA R. NIKIFOROVA<sup>3</sup>, JULIA V. SALMOVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Sverzhovsky Research Clinical Institute of Otorhinolaryngology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> RMC «Home of Pharmacy», Kuzmolovsky, Leningrad region, Russia

### Резюме

**Актуальность.** Боль в горле инфекционно-воспалительного генеза является одной из наиболее распространенных причин обращения за медицинской помощью и поводом для назначения антимикробных препаратов. С учетом высокой значимости проблемы распространения микробной устойчивости к системным этиотропным препаратам, применение антимикробных пептидов (АМП) для топической терапии может являться перспективным решением благодаря особенностям механизма действия АМП.

**Цель исследования** — оценка формирования устойчивости к АМП грамицидина С (ГС) в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, включая штаммы, резистентные к антимикробным препаратам, в ходе многократного воздействия, приближенного к применению в клинической практике.

**Материал и методы.** Исследуемый объект — АМП ГС. Тестовые микроорганизмы — эталонные штаммы *S. pneumoniae* (ATCC 6303), *S. aureus* (ATCC 6538-Р) и по 10 штаммов клинических изолятов каждого вида микроорганизма, включая резистентные к антимикробным препаратам (в т. ч. MRSA). На первом этапе методом микроразведений в планшетах оценивали антимикробную активность ГС по оценке величины минимальной подавляющей и минимальной бактерицидной концентраций (МПК и МБК, соответственно). На втором этапе с использованием эталонных штаммов и по 4 клинических изолята каждого микроорганизма, включая устойчивые к антимикробным препаратам, формировали резистентность двумя способами параллельно (с жидкими и плотными средами) на протяжении 7 последовательных пассажей за 7 сут с ГС в концентрациях равных 0,5 и 1,0 МПК. Оценивали количество выживших микроорганизмов и определяли МПК и МБК на каждом пассаже.

**Результаты.** На первом этапе МПК ГС в отношении *S. pneumoniae* составила для 5 штаммов — 8 мкг/мл, для 5 штаммов — 16 мкг/мл, для одного — 4 мкг/мл. В отношении 10 из 11 штаммов *S. aureus*, включая MRSA, МПК ГС составила 4 мкг/мл (для 1 штамма — 8 мкг/мл). Для 4 штаммов *S. pneumoniae* МБК ГС была равна МПК (16 мкг/мл), для 7 штаммов МБК была выше МПК в 4–8 раз и в основном составила 32 мкг/мл (для 1 штамма — 64 мкг/мл). МБК в отношении 6 штаммов *S. aureus* была равна МПК (4 мкг/мл), для 5 оставшихся штаммов МБК была выше МПК в 2–8 раз, но не превышала 64 мкг/мл. На втором этапе при многократном воздействии ГС установлено, что оцениваемые величины МПК и МБК на протяжении 7 пассажей сохранились на прежнем уровне у всех штаммов, включая резистентные к антибиотикам в жидких и на плотных средах.

**Выводы.** Грамицидин С продемонстрировал высокую бактерицидную активность в отношении эталонных штаммов и клинических изолятов ведущих патогенных микроорганизмов *S. pneumoniae* и *S. aureus*, включая штаммы, устойчивые к системным антимикробным препаратам, при этом МПК и МБК не превышали концентраций, создаваемых при применении в клинической практике. В ходе многократного воздействия (7 пассажей за 7 сут) не было выявлено признаков формирования устойчивости тестовых штаммов патогенов, включая

© Коллектив авторов, 2022

\*Адрес для корреспонденции: Загородное шоссе, д. 18А, стр. 2, Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского Департамента здравоохранения города Москвы, г. Москва, Россия, 117152.  
E-mail: alex9999@inbox.ru

© Team of Authors, 2022

\*Correspondence to: 18A, p. 2, Zagorodnoye shosse, Moscow, 117152 Russia. E-mail: alex9999@inbox.ru

устойчивые к системным антимикробным препаратам из групп бета-лактамов, макролидов, фторхинолонов, тетрациклинов, аминогликозидов и др.

**Ключевые слова:** грамицидин С; нерибосомальные антимикробные пептиды; бактерицидное действие; антибиотикорезистентность; тонзиллофарингит

**Для цитирования:** Гуров А.В., Боровкова К.Е., Крышень К.Л., Никифорова Л.Р., Салмова Ю.В. Оценка бактерицидной активности грамицидина С в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* при однократном и многократном воздействии. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 8–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-18>.

## Abstract

**Background.** Sore throat of infectious and inflammatory origin is one of the most common reasons for the prescription of antimicrobial drugs. The use of antimicrobial peptides (AMPs) for topical therapy may be a promising solution, due to the peculiarities of AMPs' mechanism of action, taking into account the high importance of microbial resistance spread problem in relation to systemic etiotropic drugs.

**The aim of the study** was to assess the formation of resistance to AMP Gramicidin S (GS) of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, including strains resistant to antimicrobial drugs during repeated exposure, in the setting close to their actual use in clinical practice.

**Materials and methods.** The object under study is AMP GS. The test microorganisms are reference strains of *S. pneumoniae* (ATCC 6303), *S. aureus* (ATCC 6538-P), and 10 strains of clinical isolates of each type of microorganisms, types with antimicrobial resistance (including MRSA). At the first stage, the antimicrobial activity of GS was evaluated by the method of microdilutions in plates by estimating the value of the minimum inhibitory and the minimum bactericidal concentrations (MIC and MBC, respectively). At the second stage, using reference strains and 4 clinical isolates of each microorganism, including types with antimicrobial resistance, resistance was formed in two ways simultaneously (with liquid and solid media) for 7 consecutive passages over 7 days with GS at concentrations equal to 0.5 and 1.0 MIC. The number of surviving microorganisms was estimated and the MIC and MBC were determined at each passage.

**Results.** At the first stage, the MIC of GS in relation to *S. pneumoniae* was 8 µg/ml for 5 strains, 16 µg/ml for 5 strains, and 4 µg/ml for one. For 10 out of 11 strains of *S. aureus*, including MRSA, the MIC of GS was 4 µg/ml (for 1 strain — 8 µg/ml). For 4 strains of *S. pneumoniae*, MBC of GS was equal to MIC (16 µg/ml), for 7 strains MBC was 4–8 times higher than MIC, and mostly amounted to 32 µg/ml (for 1 strain — 64 µg/ml). MBC for 6 strains of *S. aureus* was equal to MIC (4 µg/ml), for the 5 remaining strains MBC was 2–8 times higher than MIC, but did not exceed 64 µg/ml. At the second stage, it was found that the estimated values of GS MIC and MBC with repeated exposure to GS remained at the same level for 7 passages in all strains, including those resistant to antibiotics in liquid and solid media.

**Conclusions.** Gramicidin S demonstrated high bactericidal activity against reference strains and clinical isolates of leading pathogenic microorganisms *S. pneumoniae* and *S. aureus*, including strains resistant to systemic antimicrobial drugs, while MIC and MBC did not exceed concentrations contained in single doses of drugs used in clinical practice. During repeated exposure (7 passages in 7 days), there were no signs of the formation of resistance of test strains of pathogens, including those resistant to systemic antimicrobial medicines from the groups of beta-lactams, macrolides, fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides, etc.

**Keywords:** Gramicidin S, nonribosomal antimicrobial peptides, bactericidal action, antibiotic resistance, tonsillopharyngitis

**For citation:** Gurov A.V., Borovkova K.E., Kryshen K.L., Nikiforova L.R., Salmova Yu.V. Evaluation of the bactericidal activity of gramicidin S against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* clinical isolates with single and multiple (course) exposure. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 7–8: 8–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-18>.

Одной из самых распространённых причин обращения взрослого и детского населения за амбулаторной медицинской помощью (к оториноларингологу, терапевту, педиатру и врачу общей практики) являются инфекционно-воспалительные заболевания ротоглотки (острый фарингит, острый тонзиллит, тонзиллофарингит, а также обострения указанных заболеваний) [1].

Несмотря на разнообразие клинических форм очаговой инфекции глотки, одна из ведущих ролей в терапии данных состояний отводится местным (топическим) препаратам, направленным в первую очередь на быструю и полную эрадикацию возбудителя, а также решающим задачи купирования воспалительного и болевого синдрома. Наибольшая эффективность при применении топических препаратов достигается благодаря комбинированному воздействию непосредственно в очаге воспаления [2].

Внедрение в микробиологическую практику молекулярных методов и, прежде всего секвенирования, позволило существенно расширить представления о микробиоте дыхательных путей и возбудителях респираторных инфекций. Данные методы меняют представления об этиологии заболеваний, которые ранее подразделялись на преимущественно вирусные или бактериальные. В целом, результаты исследований, выполненных с помощью наиболее современных методов, хотя и повышают значимость вирусов в этиологии острых инфекций дыхательных путей, подтверждают, что ведущую роль среди бактерий играют традиционные патогены, а также указывают на значимость вирусно-бактериальных ассоциаций. Определяясь с составом эмпирической терапии, и в первую очередь, выбирая препараты с этиотропной активностью, необхо-

димо руководствоваться принципом «разумной минимальной достаточности» [3].

За последние десятилетия распространённость устойчивости бактериальных возбудителей инфекций к антимикробным средствам достигла уровня одной из наиболее серьёзных угроз для здоровья человечества [4]. Несмотря на то, что описано значительное разнообразие биохимических механизмов её реализации, принципиально значимыми являются две основные группы генетических механизмов формирования резистентности: мутации в собственном геноме и приобретение генов резистентности в результате горизонтального переноса. Кроме формирования резистентности, у бактерий есть и другие механизмы противодействия антимикробным средствам, например, персистенность, при которой формируется значительное снижение метаболической активности микроорганизма. Оценивая перспективы преодоления резистентности и других механизмов формирования устойчивости, следует признать, что с эволюционной точки зрения создание средств, воздействующих на возбудителя инфекции при полном отсутствии риска формирования резистентности, крайне маловероятно. Более реалистичный подход – это разработка препаратов, действующих одновременно на несколько мишеней [5].

В этой связи, антимикробные пептиды (АМП) в последнее время рассматриваются в качестве перспективных средств для лечения инфекционных заболеваний. Например, применение веществ из группы грамицидинов одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для использования против инфекций, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями [6].

Грамицидин С (ГС) является нерибосомальным циклическим декапептидом бактериального происхождения с выраженным многонаправленным бактерицидным действием в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий и некоторых дрожжевых грибов. ГС активен против планктонных форм микроорганизмов, включая клетки-персистеры, и биоплёнок [6–12].

В период сентября–декабря 2021 г. специалистами АО «НПО «Дом фармации» по инициативе компании «Валента Фарм» было осуществлено комплексное исследование, посвящённое оценке противомикробной активности ГС, а также оценке формирования резистентности у ряда патогенов

в условиях многократного воздействия в различных концентрациях в отношении ГС, который входит в состав группы топических лекарственных препаратов для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний глотки, выпускаемой в Российской Федерации фармацевтической компанией «Валента Фарм»<sup>1</sup>.

*Цель исследования* — оценка формирования устойчивости к ГС ведущих бактериальных возбудителей респираторных инфекций при многократном повторном воздействии.

Для достижения указанной цели определяли минимальные подавляющие и минимальные бактерицидные концентрации (МПК и МБК, соответственно) ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* при однократном воздействии, выявляли выжившие микроорганизмы при многократном воздействии исследуемого объекта и определяли МПК и МБК ГС в отношении выживших микроорганизмов.

## Материал и методы

*Изучение антимикробной активности грамицидина С в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* при однократном воздействии*

В качестве исследуемого объекта использовали грамицидин С гидрохлорид (активная фармацевтическая субстанция, «Biotika a.s.», Словакия, серия № 1907107, срок годности: до 07.2023). С учётом цели исследования в качестве тест-системы для исходного определения МПК и МБК использовались грамположительные микроорганизмы из рабочей коллекции музея лаборатории микробиологии АО «НПО «Дом фармации» (по одному эталонному штамму *S.pneumoniae* и *S.aureus* — ATCC 6303 и ATCC 6538-Р, соответственно), а также по 10 штаммов клинических изолятов каждого микроорганизма с охарактеризованной устойчивостью к антибактериальным препаратам различной степени широты из коллекции ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России (табл. 1).

### *Определение МПК*

МПК ГС определяли методом серийных разведений в бульоне Mueller–Hinton (Sigma, США), а для штаммов *S.pneumoniae* инокулюм разводили в бульоне Mueller–Hinton с добавлением лизированной лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) [13, 14]. Контролировали окончательную концентрацию количества клеток в лунках планшета с учётом разведения исследуемым объектом в диапазоне от  $2 \times 10^5$  КОЕ/мл до  $8 \times 10^5$  КОЕ/мл. Результаты с планшетов учитывали визуально в проходящем свете при условии, что контрольные лунки подтвердили правильность поставленного эксперимента. МПК тестируемого объекта соответствовала лунка с наименьшей концентрацией тестируемого объекта без признаков видимого роста тест-микроорганизмов (прозрачный бульон) [13].

### *Определение МБК*

МБК ГС определяли путём высевов со всех лунок, в которых не обнаруживалось видимого роста бактерий на плотной питательной среде Mueller–Hinton agar (Merck KGaA, Германия), а для штаммов *S.pneumoniae* высевы были сделаны на Mueller–Hinton agar с добавлением дефибрированной бараньей крови с окончательной концентра-

<sup>1</sup> Граммидин, спрей для местного применения — РУ № ЛП-004460; Граммидин детский, таблетки для рассасывания — РУ № ЛП-002179; Граммидин детский, спрей для местного применения — РУ № ЛП-004699; Граммидин нео, таблетки для рассасывания — РУ № ЛСР-010598/08; Граммидин с анестетиком, спрей для местного применения — РУ № ЛП-005219; Граммидин с анестетиком нео, таблетки для рассасывания — РУ № ЛСР-005119/08.

Таблица 1. Штаммы микроорганизмов, использовавшихся в качестве тест-систем

Table 1. Strains of microorganisms used as test systems

Серотип	Номер изолята	Возраст источника, лет / Год выделения	Материал	Диагноз	Резистентность в отношении:	Дополнительные свойства
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						
ATCC 6303*	—	—	—	—	—	—
23F	2*	9 лет	Мкр	Хронический бронхит	—	—
3	24	16 лет	Пбп	Острый, средний отит	—	—
18ABCF	29*	2 года	Мрг	Носитель	—	—
14	61*	4 года	Мрг	Носитель	—	—
19F	109	7 лет	Мнг	ОРЗ	—	—
12ABF/44/46	247	5,6 лет	Мнг	Носитель	—	—
6ABCD	277	4,9 года	Мнг	Носитель	—	—
4	711/58*	37 лет	Кровь	Сепсис, пневмония	2, 4	—
1	1356	10,3 года	Мкр	Пневмония	—	—
11AD	3184	1 год	Мкр	Носитель	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>						
ATCC 6538-P*	—	—	—	—	—	—
—	74	2012 г.	Ро	—	1, 2, 4, 5, 7, 9	MRSA, mecA, SCCmec IA, Agr II, MLST 228, spa t041
—	77	2012 г.	Ро	—	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9	MRSA, mecA, SCCmec IVce, Agr I, MLST 8, spa t008
—	85	2012 г.	Ро	—	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec III-ccrC, Agr I, MLST 239, spa t631
—	134	2013 г.	Ро	—	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec IV, Agr IV, PVL-S +, MLST 121, spa t308
—	135	2013 г.	Ро	—	1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec III-ccrC, Agr I, MLST 239, spa t037
—	176*	2014 г.	Кровь	—	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec IIImer, Agr I, tsst-1 +, MLST 239, spa t037
—	299*	2015 г.	Пвж	—	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9	MRSA, mecA, SCCmec IA, Agr II, MLST 228, spa t041
—	402	2016 г.	Ро	—	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec IVA, Agr I, MLST 398, spa t011
—	758*	2019 г.	Мнг	Носитель	1, 2	MRSA, mecA, SCCmec IVce, Agr I, tsst-1 +, MLST 22, spa t223
—	952*	2019 г.	Мнг	Носитель	—	MSSA, отр, SCCmec IV, Agr IV, PVL-S +, MLST 121, spa t2524

**Примечание.** \* — штаммы, используемые на этапе оценки развития резистентности в отношении ГС при многократном воздействии. Сокращения: мкр — мокрота; пбп — пунктат барабанной полости; мрг — мазок из ротоглотки; мнг — мазок из носоглотки; ро — раневое отделяемое; пвж — промывные воды желудка; 1 — цефокситин; 2 — оксациллин; 3 — хлорамфеникол; 4 — эритромицин; 5 — клиндамицин; 6 — рифампицин; 7 — гентамицин; 8 — мупироцин; 9 — моксифлоксацин; 10 — тетрациклин. MRSA — метициллинорезистентные штаммы *S.aureus* (methicillin-resistant *S.aureus*). MSSA — метициллиночувствительные штаммы *S.aureus* (methicillin sensitive *S.aureus*).

**Note.** \* — strains used at the stage of assessing the development of resistance to Gramicidin S with multiple exposure. Мкр — sputum; пбп — puncture sample from the tympanic cavity; мрг — smear from the oropharynx; мнг — smear from the nasopharynx; ро — wound discharge; пвж — gastric lavage; 1 — ceftiofur; 2 — oxacillin; 3 — chloramphenicol; 4 — erythromycin; 5 — clindamycin; 6 — rifampicin; 7 — gentamicin; 8 — mupirocin; 9 — moxifloxacin; 10 — tetracycline; MRSA — methicillin-resistant *S.aureus*. MSSA — methicillin-sensitive *S.aureus*.

цией 5,0% (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) [15]. Результаты учитывали, визуально оценивая рост бактериальных штаммов на питательной среде. МБК тестируемого объекта соответствовала чашка Петри с наименьшей концентрацией тестируемого объекта и с полным отсутствием роста тест-микроорганизмов [15–19]. С учётом того, что исходная посевная доза находилась в диапазоне  $2-8 \times 10^5$  КОЕ/мл, а предел обнаружения роста бактерий при использовании метода визуального контроля составляет примерно  $10^1$  КОЕ/мл, в случае выявления отсутствия роста регистрировалось уменьшение концентрации присутствующих бактерий не менее, чем на 99,9% (3 log) [16, 18, 19].

#### Изучение формирования устойчивости штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* в отношении Грамицидина С при многократном воздействии

В качестве тестовых систем использовали эталонные штаммы и по 4 клинических изолята *S.pneumoniae* и *S.aureus* (см. табл. 1). Для селекции устойчивости исследуемые микроорганизмы пассировали на жидких (Mueller-Hinton бульон, (Sigma, США) и плотных (Mueller-Hinton agar, Merck KGaA, Германия) питательных средах, содержащих ГС в концентрациях 0,5 и 1,0 МПК. Для *S.pneumoniae* к среде добавляли дефибрированную баранью кровь (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) до окончательной концентрации 5,0%. Осуществляли 7 пересевов с ин-



тервалом 24 ч с целью оценки многократного воздействия ГС на микроорганизмы в форме суспензии клеток и в колониях.

На каждом пассаже контролировали конечную посевную дозу клеток, которая была выше, чем в первом этапе –  $1 \times 10^8$  микробных клеток на чашку Петри и пробирку, для обеспечения дальнейших пересевов на среды и постановки теста на определения МПК.

В ходе исследования определяли количество выживших микроорганизмов в каждом пассаже, далее у выживших микроорганизмов определяли МПК и МБК в отношении ГС методами, описанными выше. Полученные значения МПК и МБК выживших микроорганизмов сравнивали с их начальными значениями, установленными в ходе выполнения первых этапов исследования.

Определение МПК проводили, используя диапазон конечных концентраций ГС от 256 мкг/мл до концентрации, равной МПК, выявленной для каждого штамма на первом этапе исследования. Для определения МПК использовали все штаммы, выжившие на чашках Петри с 1,0 МПК ГС (только 1-й пассаж, в остальных пассажах роста не наблюдали) и 0,5 МПК (для всех пассажей), а также все штаммы, выжившие в пробирках с 1,0 МПК ГС (для всех пассажей) и 0,5 МПК (для удобства использовали только штаммы с 7-го пассажа, поскольку в отличие от эксперимента на плотных средах, во всех пробирках с концентрацией исследуемого объекта, равной 1,0 МПК, отмечался рост микроорганизмов). Для определения МБК использовали высевы со всех лунок, в которых не обнаружено видимого роста бактерий.

Полученные результаты анализировали с использованием методов описательной статистики.

## Результаты

### Определение МПК и МБК

Контроль посевной дозы подтвердил необходимое количество клеток, вносимых в лунки планшетов в диапазоне от  $2 \times 10^5$  КОЕ/мл до  $8 \times 10^5$  КОЕ/мл. Результаты оценки МПК и МБК ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus*, включая метициллинорезистентные штаммы, представлены в табл. 2.

В ходе исследования было установлено, что ГС обладает бактериостатическим (останавливает рост культуры) и бактерицидным (вызывает полную гибель бактериальных клеток) действием. В отношении штаммов *S.pneumoniae* (2 серотип 23F, 24 серотип 3, 29 серотип 18ABCF, 247 серотип 12ABF/44/46,) — 4 штамма из 11, а также в отношении *S.aureus* (ATCC 6538-P, 135, 176, 402, 758, 952) — 6 из 11 штаммов — МПК и МБК не различались между собой и составляли 16 мкг/мл и 4 мкг/мл для первого и второго микроорганизма, соответственно. В отношении 6 штаммов *S.pneumoniae* и 3 штаммов *S.aureus* МБК не превышала МПК более, чем в 4 раза. Полученные результаты показали высокую бактерицидную активность ГС в отношении данных штаммов.

### Изучение формирования устойчивости штаммов *S.aureus* и *S.pneumoniae* в отношении грамицидина С на фоне многократного воздействия

#### Оценка выживших микроорганизмов

После 1-го пассажа наблюдали рост у всех штаммов *S.aureus* и *S.pneumoniae* на чашках Петри

с концентрациями ГС, равными 0,5 МПК. В концентрациях, равных 1,0 МПК, рост единичных колоний на чашках Петри наблюдали для штаммов микроорганизмов, для которых МБК было в 4–8 раз большей, чем МПК. У штаммов, для которых было установлено, что значения МПК и МБК равны, рост на чашках Петри с концентрациями ГС, равными МПК, отсутствовал.

После 2-го пассажа и далее, на протяжении всего семидневного цикла, наблюдали рост у всех штаммов *S.aureus* и *S.pneumoniae* на чашках Петри с концентрациями 0,5 МПК. При этом количество выживших микроорганизмов увеличивалось после первого пассажа и составляло в диапазоне от 10 до 500 КОЕ, после седьмого пассажа рост составлял более 1000 КОЕ. На чашках Петри с концентрациями ГС, равными 1,0 МПК, не наблюдали роста у всех штаммов микроорганизмов, в том числе у штаммов, выживших после 1-го пассажа. Отсутствие роста во 2-м пассаже может свидетельствовать о том, что ослабленные единичные колонии в условиях стресса (пересев на среду с антибиотиком) не смогли приспособиться к данным условиям.

Таким образом, за семь циклов пассажей на чашках Петри было получено 38 штаммов *S.pneumoniae* и 36 штаммов *S.aureus*.

Параллельно с чашками Петри ставили пробирки с ГС в тех же концентрациях. После 1-го пассажа в пробирках с концентрацией 0,5 МПК ГС наблюдали помутнение среды, как и в пробирках с контролем роста микроорганизма. Для количественного учёта роста микроорганизмов из всех пробирок делали высевы на чашки Петри. При высеве на чашки Петри был обнаружен обильный рост микроорганизмов из пробирок с концентрациями равными 0,5 и 1,0 МПК. Таким образом, за семь циклов пассажей из пробирок было получено 70 штаммов *S.pneumoniae* и 70 штаммов *S.aureus*.

### Результаты по определению МПК и МБК у выживших микроорганизмов на фоне многократного воздействия грамицидином С

После инкубации в термостате чашек Петри контроль посевной дозы подтвердил необходимое количество клеток, вносимых в лунки планшетов в диапазоне от  $2 \times 10^5$  КОЕ/мл до  $8 \times 10^5$  КОЕ/мл [13].

МПК ГС в отношении выживших штаммов *S.pneumoniae* ATCC 6303 составила 4 мкг/мл, в отношении выживших штаммов *S.pneumoniae* 61 серотип 14 составила 8 мкг/мл. МПК ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* 2 серотип 23F, *S.pneumoniae* 29 серотип 18ABCF и *S.pneumoniae* 711/58 серотип 4 составила 16 мкг/мл. МПК ГС в отношении выживших штаммов *S.aureus* ATCC 6538-P, *S.aureus* 758, *S.aureus* 176 и *S.aureus* 952 составила 4 мкг/мл. В отношении выживших штаммов *S.aureus* 299, МПК ГС составила 8 мкг/мл.

МБК ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* 2 серотип 23F, *S.pneumoniae* 29 серотип 18ABCF со-

**Таблица 2.** Количество клеток в лунках планшетов при определении МПК и результаты оценки противомикробной оценки ГС, по данным первого этапа исследования

**Table 2.** The number of cells in the plates' wells when determining the MIC and the results of the evaluation of the antimicrobial assessment of Gramicidin C according to the first stage of the study

Штаммы/серотипы/ изоляты микроорганизмов	Посевная доза, КОЕ/мл	МПК ГС, мкг/мл (бактериостатическое действие)	МБК ГС, мкг/мл (бактерицидное действие)	МБК/МПК кратность
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
ATCC 6303*	5,8×10 <sup>5</sup>	4	32	8
5 штаммов: 61 серотип 14*, 109 серотип 19F, 277 серотип 6ABCD, 1356 серотип 1, 3184 серотип 11AD	4,3×10 <sup>5</sup> –6,5×10 <sup>5</sup>	8	32	4
4 штамма: 2 серотип 23F*, 24 серотип 3, 29 серотип 18ABCF*, 247 серотип 12ABF/44/46	4,9×10 <sup>5</sup> –6,7×10 <sup>5</sup>	16	16	1
711/58 серотип 4*	6,1×10 <sup>5</sup>	16	64	4
<i>Staphylococcus aureus</i>				
6 штаммов: ATCC 6538-P*, 135, 176*, 402, 758*, 952*	4,7×10 <sup>5</sup> –7,1×10 <sup>5</sup>	4	4	1
77	6,6×10 <sup>5</sup>	4	8	2
2 штамма: 74, 134	7,1×10 <sup>5</sup> –7,5×10 <sup>5</sup>	4	16	4
85	6,9×10 <sup>5</sup>	4	32	8
299*	4,2×10 <sup>5</sup>	8	64	8

**Примечание.** \* — штаммы, используемые на этапе оценки развития резистентности в отношении ГС при многократном воздействии.

**Note.** \* — strains used at the stage of assessing the development of resistance to Gramicidin S with multiple exposure.

ставила 16 мкг/мл, в отношении штаммов ATCC 6303 и 61 серотип 14 МБК составила 32 мкг/мл, в отношении штамма 711/58 серотип 4 — 64 мкг/мл. МБК ГС в отношении выживших штаммов *S. aureus* ATCC 6538-P, 176, 758 и 952 составила 4 мкг/мл. В отношении штаммов *S. aureus* 299 МБК ГС составила 64 мкг/мл.

Таким образом, МПК и МБК в отношении выживших в процессе многократного воздействия ГС (7 пассажей за 7 сут в подавляющих и субподавляющих концентрациях) штаммов *S. pneumoniae* и *S. aureus* как в жидких, так и на плотных средах сохранялись на исходных уровнях на всём протяжении исследования (во всех пассажах).

## Обсуждение

В условиях растущей настороженности в связи с распространением устойчивости бактериальных возбудителей инфекций к классическим системным антибиотикам и противомикробным средствам, антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются в качестве многообещающих средств для лечения инфекционных заболеваний, в том числе, в формах для топического применения. Особое значение данная перспектива приобретает в отношении лечения респираторной патологии, в частности, заболеваний, сопровождающихся болью в горле [20].

Среди грамположительных патогенов наибольшую угрозу представляет *S. aureus*, включённый в

группу основных нозокомиальных условно-патогенных микроорганизмов (группа ESKAPE), характеризующихся широким распространением штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и высокой клинической значимостью [21].

В отличие от линейных грамицидинов (А, В, С и D, как смесь А–С), открытых в 1939 г. в США Рене Дюбо (René Jules Dubos) в составе противомикробных полипептидов, продуцируемых бактерией *Aneurinibacillus migulanus* (прежнее название — *Bacillus brevis*) [22], циклический декапептид грамицидин С (gramicidin S) был выделен Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой из *Aneurinibacillus migulanus* и описан в сороковых годах 20-го века [23, 24]. Симметричная структура молекулы, синтезируемой нерибосомальным путём, представляет собой дважды повторяющуюся последовательность из пяти аминокислот (4 — «канонические» протеиногенные — L-валин, L-лейцин, D-фенилаланин, L-пролин и 1 — неканоническая — L-орнитин), расположенных антипараллельно и образующих жёсткое кольцо. Пептид обладает амфифильностью за счёт содержания катионной и гидрофобной частей. Физико-химические и фармакологические свойства, а также бактерицидные механизмы действия ГС в настоящее время детально изучены и подтверждены в ходе большого числа исследований [25–54].

Высокая стабильность молекулы в совокупности с наличием неканонической аминокислоты

позволяет ГС сохранять бактерицидное действие в широком диапазоне pH и избегать протеолитической дегградации обычными протеазами [25, 31].

Основным способом реализации противобактериального действия ГС является нарушение строения и функции липидного бислоя плазматической мембраны бактерий, вплоть до образования значительных дефектов в высокой концентрации. Данной активности соответствует изменение потенциала и текучести мембраны клетки, а также массивный выход  $K^+$  через цитоплазматическую мембрану, причём, как у грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов [26]. Кроме того, ГС вызывает кластеризацию и отщепление мембранных белков, нарушая процессы клеточного дыхания (фосфолипидсинтазы PlsX, MurG, цитохрома C), синтеза фосфолипидов и пептидогликана, а также процессов деления (MinD и DivIVA) [9, 10, 27–29].

Механизм действия ГС по целому ряду аспектов — влияние на биосинтез и на целостность клеточной мембраны, изменение мембранного потенциала, делокализация белка MinD-GFP, активация быстрой потери калия, индукция белков-маркёров мембранного стресса LiaH и TrmB — схож с низином (бактериоцин, продуцируемый стрептококками группы N, такими как *Lactobacillus lactis*) [30].

Дополнительно показано, что ГС способен проникать в клетки грамположительных энтерококков, и в частности *S.aureus*, непосредственно через плазматическую мембрану (т.е. без использования механизмов эндоцитоза) с последующим связыванием некоторых нуклеотидов и аденозинфосфатов [10, 31–33]. В МПК на бактериальную клетку приходится около  $1,3 \times 10^6$  молекул ГС, что достаточно, чтобы покрыть поверхность клетки. Показано, что в концентрации, соответствующей МПК, протопласты *B.subtilis* связывали около 80% молекул ГС от количества молекул, связанных с интактными клетками, что указывает на то, что большая часть добавленного пептида связывается с внутренней мембраной бактерий, а не с клеточной стенкой [6]. При этом поглощение ГС во всех случаях увеличивает проницаемость клеток и протопластов и ингибирует поглощение аминокислот или глюкозы. Ключевой мишенью действия ГС в этом случае может быть алармон prGpp, который инициирует и регулирует образование биоплёнок [34, 35]. Эта особенность действия ГС, по всей видимости, обеспечивает его способность эффективно ингибировать бактериальную стрессовую реакцию и препятствовать формированию биоплёнок.

Крайне высокая протеолитическая стабильность, а также множественные механизмы бактерицидного действия, очевидно, лежат в основе отсутствия случаев регистрации у микроорганиз-

мов приобретённой резистентности в отношении ГС. В настоящее время в клинической практике практически отсутствуют указания на выявление резистентных к ГС штаммов патогенных микроорганизмов [9, 31, 36, 37].

Следует отметить, что полученные в лабораторных условиях в ходе целенаправленного эксперимента с применением искусственной индукции штаммы *S.aureus* 209P со сниженной чувствительностью к ГС сохраняли чувствительность к другим антибактериальным препаратам, но обладали пониженной на 30% дыхательной активностью. У данных штаммов по сравнению с чувствительными штаммами была на 25–30% ниже активность эндогенных ДФИ-редуктаз и НАДФ-дегидрогеназ мембран. Скорость транспорта аминокислот в клетки со сниженной чувствительностью к тестируемому веществу была значительно ниже скорости транспорта аминокислот в клетки чувствительного штамма. Это подтверждает точку зрения, что приобретение бактериями устойчивости к антимикробным пептидам требует больших затрат энергии или существенных изменений в липидном бислое, что делает развитие устойчивости неблагоприятным для дальнейшего выживания и сохранения высокой вирулентности [36, 38, 39].

Согласно данным, опубликованным за последние 40 лет, показана высокая бактерицидная активность ГС в отношении грамотрицательных бактерий, включая *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и др., с МПК в диапазоне 4–64 мкг/мл. Более активен ГС в отношении грамположительных микроорганизмов: *B.subtilis*, а также патогенные *S.aureus*, включая MRSA и другие резистентные штаммы, энтерококки (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), листерии и др. [40–54]. МПК ГС в отношении *S.aureus*, начиная с 1981 г., стабильно сохраняется на уровне, не превышающем 8 мкг/мл. По данным S. Derbal и соавт. [47], ГС подавляет рост в отношении стрептококков (*Streptococcus pyogenes* штамм 5448 и *Streptococcus agalactiae* штамм COH1) в концентрации <10 мкг/мл. Данные о МПК/МБК ГС в отношении пневмококков в доступной литературе найти не удалось.

В проведённом нами исследовании МПК ГС в отношении *S.aureus* не превышала 8 мкг/мл, в том числе у клинических изолятов, характеризующихся множественной резистентностью в отношении нескольких групп классических антимикробных препаратов для системного действия (MRSA штаммы 74, 77, 85, 134, 135, 176, 299, 402), что позволяет в очередной раз сделать вывод об отсутствии устойчивости данного микроорганизма к ГС.

Исследование показало, что различие между МБК и МПК ГС в отношении тестовых микроорга-



низмов не превышало 8 раз, причём, в отношении 4 из 11 исследованных штаммов *S.pneumoniae* и в отношении 6 из 11 исследованных штаммов *S.aureus* для достижения полного бактерицидного эффекта не требовалось повышать МПК, а в отношении 10 штаммов *S.pneumoniae* и 9 штаммов *S.aureus* МБК не превышала МПК более, чем в 4 раза, что также отражает высокий противомикробный потенциал бактерицидного уровня ГС.

В ходе многократного курсового воздействия ГС — 7 пассажей за 7 сут (в клинической практике лекарственные препараты, содержащие ГС, применяются в течение 7 дней в разовой дозе 1600–3200 мкг по 3–4 раза в сутки), было выявлено, что при ежедневном воздействии ГС на тестовые микроорганизмы в концентрациях, равных 1,0 МПК, ряд штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* прекращал рост на плотных средах даже после 1-го пассажа, для чего параллельно осуществлялись эксперименты с концентрацией, равной 0,5 МПК. Согласно полученным результатам, при многократном воздействии ГС на культуры тестовых микроорганизмов, включая резистентный к оксациллину и эритромицину штамм пневмококка, а также MRSA и MSSA штаммы золотистого стафилококка, в концентрациях, равных МПК, а также в субподавляющих концентрациях (0,5 МПК) не было получено ни одного резистентного штамма на всём протяжении эксперимента (на чашках Петри и в пробирках). Представленные результаты подтверждают опубликованные данные многочисленных исследований, что антимикробный пептид ГС, благодаря своему механизму действия, обладает выраженной бактерицидной активностью в отношении основных возбудителей респираторных инфекций (*S.pneumoniae* и *S.aureus*), в том числе, обладающих устойчивостью к широко применяемым системным антибиотикам и противомикробным средствам. В условиях многократного ежедневного воздействия ГС не было выявлено признаков формирования резистентности у тестовых микроорганизмов.

Отдельно следует остановиться на результатах оценки антимикробной активности ГС, полученных при изучении формирования устойчивости на жидких и плотных средах. Известно, что в планктонном состоянии в суспензионных культурах клетки микроорганизма характеризуются большой площадью контакта с окружающей средой, в том числе, в отношении веществ с антимикробной активностью. В то же время, бактерии в колониях, выращенных на плотных средах, находятся в тесном контакте между собой, что существенно снижает суммарную площадь контакта клеток с окружающей средой. По мере роста колонии отдельные клетки начинают дифференцироваться по целому ряду характеристик. Так, бактерии, расположенные в разных зонах коло-

нии (центр и периферия), могут различаться по спектру экспрессируемых генов и по своей метаболической активности (явление фазовой диссоциаций бактерий), при этом в некоторых зонах индуцируется формирование покоящихся форм микроорганизмов. С учётом этого часть бактериальных клеток в колонии может обладать существенно более высокой устойчивостью к веществам с антимикробной активностью [55]. В проведённом исследовании МПК и МБК ГС в отношении тестовых микроорганизмов не различались в экспериментах, проведённых на жидких и плотных средах. Это также позволяет подтвердить высокую степень бактерицидной активности ГС в отношении микроорганизмов, которым свойственно быстрое созревание колоний и формирование биоплёнок. Проведённое исследование позволяет также наметить направления для дальнейших исследований: в настоящем исследовании в качестве тестовых использовались только два микроорганизма, хотя и относящихся к группе ведущих по значимости патогенов. Кроме того, данное исследование не позволило охватить вопросы воздействия ГС на биоплёнки.

## Выводы

1. МПК грамицидина С в отношении штаммов *S.pneumoniae* находилась в диапазоне от 4 до 16 мкг/мл, а в отношении штаммов *S.aureus* была определена в диапазоне от 4 до 8 мкг/мл и не различалась в отношении MSSA и MRSA штаммов.

2. МБК грамицидина С находилась в диапазонах 16–64 мкг/мл и 4–64 мкг/мл в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus*, соответственно, и в подавляющем большинстве наблюдений не превышала МПК более, чем 4 раза, что характеризует грамицидин С как вещество с выраженным бактерицидным действием.

3. В течение семидневного цикла пассажей микроорганизмов с подавляющими и субподавляющими концентрациями грамицидина С величины МПК и МБК не изменялись по сравнению с исходным уровнем в течение всего исследования.

4. Клинические изоляты микроорганизмов, обладающие множественной устойчивостью к широко применяемым в клинической практике системным антибиотикам и противомикробным средствам (группы бета-лактамов, макролидов, респираторных фторхинолонов, тетрациклинов, аминогликозидов и др.), также как и эталонные штаммы, не отличались по чувствительности к грамицидину С при однократном воздействии и не приобретали резистентность при многократном применении.

5. Грамицидин С проявляет одинаково высокую антимикробную активность при много-



кратном воздействии на культуры штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus*, выращиваемые на жидких и на плотных средах, что свидетельствует о способности грамицидина С оказывать бактерицидное действие на организованные колонии патогенов, обладающих факторами повышенной устойчивости к действию классических системных антибактериальных средств.

6. Таким образом, последовательный пересев микроорганизмов на протяжении 7 дней в средах, содержащих грамицидин С, не приводит к изменению величин МПК и МБК по сравнению с исходными значениями на всём протяжении многократного воздействия, что свидетельствует об отсутствии признаков формирования устойчивости при рекомендованном в клинической практике применении.

### Дополнительная информация

**Участие авторов.** Гуров А. В. — интерпретация результатов, написание и редактирование

### Литература/References

1. Крюков А.И., Гуров А.В., Юшкина М.А., Изотова Г.Н. Особенности клинического течения воспалительных заболеваний ротоглотки различной этиологии и возможности местной терапии. Вестник оториноларингологии. 2019; 84 (5): 68–72. <https://doi.org/10.17116/otorino20198405168>. [Kryukov A.I., Gurov A.V., Yushkina M.A., Izotova G.N. Peculiarities of clinical course of inflammatory diseases of the oropharynx of various etiologies and possibilities of local therapy. Vestnik Otorinolaringologii. 2019; 84 (5): 68–72 <https://doi.org/10.17116/otorino20198405168>. (in Russian).]
2. Гуров А. В., Мужичкова А.В., Юшкина М.А. Комплексный подход к лечению воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей. Лечебное дело. 2021; 3: 23–29. <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12356>. [Gurov A. V., Muzhichkova A.V., YUshkina M.A. Kompleksnyj podhod k lecheniyu vospalitel'nyh zaboolevanij verhnih dyhatel'nyh putej. Lechebnoe Delo. 2021; 3: 23–29. <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12356>. (in Russian)]
3. Сидоренко С.В., Дронов И.А. Место амоксициллина в лечении острых инфекций дыхательных путей у детей: диалог микробиолога и клинического фармаколога. Рос вестн перинатол и педиатр. 2020; 65 (3): 169–176. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-3-169-176>. [Sidorenko S.V., Dronov I.A. Amoxicillin in the treatment of acute respiratory infections in children: a dialogue between a microbiologist and a clinical pharmacologist. Ros Vestn Perinatol i Pediatr. 2020; 65 (3): 169–176. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-3-169-176>. (in Russian)]
4. Устойчивость к антибиотикам. Информационный бюллетень ВОЗ. 5 февраля 2018 г. (Электронный ресурс). URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (дата обращения: 13.08.2022). [Resistance to antibiotics. WHO Newsletter. February 5, 2018. Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (Accessed date: 13.08.2022) (in Russian)]
5. Сидоренко С. В. Антимикробная резистентность: механизмы и пути преодоления. Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии: сборник тезисов докладов шестой междисциплинарной конференции, Нижний Новгород, 27–30 сентября 2020 года / Под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. М.: Издательство Перо, 2020; 95. [Sidorenko S. V. Antimikrobnaya rezistentnost': mekhanizmy i puti preodoleniya. Molekulyarnye i biologicheskie aspekty himii, farmacevtiki i farmakologii: sbornik tezisov dokladov shestoj mezhdisciplinarnoj konferencii, Nizhnij Novgorod, 27–30 sentyabrya 2020 goda. / Eds: K.V. Kudryavceva i E.M. Paninoy. Moscow: Izdatel'stvo Pero, 2020; 95. (in Russian)]
6. Bin Hafeez A., Jiang X., Bergen P.J., Zhu Y. Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. Int J Mol Sci. 2021 Oct 28; 22 (21): 11691. doi: 10.3390/ijms22111691.
7. Prenner E.J., Lewis R.N., McElhaney R.N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 15; 1462 (1–2): 201–21. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00207-2.
8. Rodríguez A.A., Otero-González A., Ghattas M., Ständker L. Discovery, optimization, and clinical application of natural antimicrobial peptides. Biomedicines. 2021 Oct 3; 9 (10): 1381. doi: 10.3390/biomedicines9101381.
9. Ghoreishi F.S., Roghanian R., Emtiazi G. Novel chronic wound healing by anti-biofilm peptides and protease. Adv Pharm Bull. 2022 May; 12 (3): 424–436. doi: 10.34172/apb.2022.047.
10. Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J.A., Siersma T., Aisenbrey C.H.M., Zaitseva E., Laubscher W.E., van Rensburg W., Behrends J.C., Bechinger B., Hamoen L.W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. mBio. 2018 Oct 9; 9 (5): e00802–18. doi: 10.1128/mBio.00802-18.
11. Berditsch M., Lux H., Babii O., Afonin S., Ulrich A.S. Therapeutic potential of gramicidin S in the treatment of root canal infections. Pharmaceuticals (Basel). 2016 Sep 7; 9 (3): 56. doi: 10.3390/ph9030056
12. Hale S.J.M., Wagner Mackenzie B., Lux C.A., Biswas K., Kim R., Douglas R.G. Topical antibiofilm agents with potential utility in the treatment of chronic rhinosinusitis: a narrative review. Front Pharmacol. 2022 Jun 13; 13: 840323. doi: 10.3389/fphar.2022.840323.
13. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни. Доступ: <http://docs.cntd.ru/document/1200083430> (дата обращения: 03.08.2022 г.) [ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Klinicheskie laboratornye issledovaniya i diagnosticheskie test-sistemy *in vitro*. Issledovanie chuvstvitel'nosti infekcionnyh agentov i ocenka funktsional'nyh harakteristik izdelij dlya issledovaniya chuvstvitel'nosti k antimikrobnym sredstvam. CHast' 1. Referentnyj metod laboratornogo issledovaniya aktivnosti antimikrobnnyh agentov protiv bystrorastushchih aerobnyh bakterij, vyzyvayushchih infekcionnye bolezni. — Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200083430> (Accessed: 03.08.2022) (in Russian)]
14. Рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам Версия 2021-01». Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии — Доступ: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (дата обращения: 03.08.2022 г.) [Rekomendacii «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam Versiya 2021-01». Mezhhregional'naya associaciya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoy himioterapii Available at: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (Accessed: 03.08.2022) (in Russian)].
15. Parvekar P, Palaskar J, Metgud S., Maria R., Dutta S. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. Biomater Investig Dent. 2020 Jul 23; 7 (1): 105–109. doi: 10.1080/26415275.2020.1796674.
16. Rodríguez-Melcón C., Alonso-Calleja C., García-Fernández C., Carballo J., Capita R. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (Biocides

- and Antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology* (Basel). 2021 Dec 29; 11 (1): 46. doi: 10.3390/biology11010046.
17. Knapp L., Amézquita A., McClure P., Stewart S., Maillard J.Y. Development of a protocol for predicting bacterial resistance to microbicides. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Apr; 81 (8): 2652–2659. doi: 10.1128/AEM.03843-14.
  18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. CLSI documents M26-A. ISBN 1-56238-384-1. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087, USA.
  19. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect*. 2000 Sep; 6 (9): 503–508. doi: 10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x.
  20. Essack S., Bell J., Burgoyne D.S., Duerden M., Shephard A. Topical (local) antibiotics for respiratory infections with sore throat: an antibiotic stewardship perspective. *J Clin Pharm Ther*. 2019 Dec; 44 (6): 829–837. doi: 10.1111/jcpt.13012.
  21. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Mar; 11 (3): 297–308. doi: 10.1586/eri.13.12.
  22. Dubos R.J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: i. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *J Exp Med*. 1939 Jun 30; 70 (1): 1–10. doi: 10.1084/jem.70.1.1.
  23. Gause G.F., Brazhnikova M.G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*. 1944; 154: 703. doi: 10.1038/154703a0.
  24. Gause G.F., Brazhnikova M.G. Gramicidin S Origin and mode of action. *Lancet*. 1944; 244: 715–716.
  25. Betzel C., Rachev R., Dolashka P., Genov N. Actinomycins as proteinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Jan 15; 1161 (1): 47–51. doi: 10.1016/0167-4838(93)90194-v.
  26. Katsu T., Kobayashi H., Hirota T., Fujita Y., Sato K., Nagai U. Structure-activity relationship of gramicidin S analogues on membrane permeability. *Biochim Biophys Acta*. 1987 May 29; 899 (2): 159–170. doi: 10.1016/0005-2736(87)90396-8.
  27. Afonin S., Glaser R.W., Sachse C., Salgado J., Wadhvani P., Ulrich A.S. (19)F NMR screening of unrelated antimicrobial peptides shows that membrane interactions are largely governed by lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep; 1838 (9): 2260–2268. doi: 10.1016/j.bbmem.2014.03.017.
  28. Zhang L., Rozek A., Hancock R.E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21; 276 (38): 35714–35722. doi: 10.1074/jbc.M104925200.
  29. Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J., Ardakani M.F., Gerthsen D., Ulrich A.S. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug; 54 (8): 3132–3142. doi: 10.1128/AAC.00124-10.
  30. Wenzel M., Kohl B., Münch D., Raatschen N., Albada H.B., Hamoen L., Metzler-Nolte N., Sahl H.G., Bandow J.E. Proteomic response of *Bacillus subtilis* to lantibiotics reflects differences in interaction with the cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov; 56 (11): 5749–5757. doi: 10.1128/AAC.01380-12.
  31. Berditsch M., Afonin S., Reuster J., Lux H., Schkolnik K., Babii O., Radchenko D.S., Abdullah I., William N., Middel V., Strähle U., Nelson A., Valko K., Ulrich A.S. Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and enterococci. *Sci Rep*. 2019 Nov 29; 9 (1): 17938. doi: 10.1038/s41598-019-54212-z.
  32. Krauss E.M., Chan S.I. Complexation and phase transfer of nucleotides by gramicidin S. *Biochemistry*. 1983 Aug 30; 22 (18): 4280–4291. doi: 10.1021/bi00287a019.
  33. Krauss E.M., Chan S.I. Complexation and phase transfer of nucleic acids by gramicidin S. *Biochemistry*. 1984 Jan 3; 23 (1): 73–77. doi: 10.1021/bi00296a012.
  34. de la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Haney E.E., Straus S.K., Hancock R.E. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog*. 2014 May 22; 10 (5): e1004152. doi: 10.1371/journal.ppat.1004152.
  35. Cortay J.C., Cozzone A.J. Accumulation of guanosine tetraphosphate induced by polymyxin and gramicidin in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Feb 22; 755 (3): 467–473. doi: 10.1016/0304-4165(83)90251-9.
  36. Kuppasamy R., Willcox M., Black D.S., Kumar N. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials. *Antibiotics* (Basel). 2019 Apr 18; 8 (2): 44. doi: 10.3390/antibiotics802004460.
  37. Berditsch M., Afonin S., Vladimirova T., Wadhvani P., Ulrich A.S. Antimicrobial peptides can enhance the risk of persistent infections. *Front Immunol*. 2012 Aug 1; 3: 222. doi: 10.3389/fimmu.2012.00222.
  38. Yeung A.T., Gellatly S.L., Hancock R.E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol. Life Sci*. 2011; 68: 2161–2176. doi: 10.1007/s00018-011-0710-x.
  39. Yang Q., Li M., Spiller O.B., Andrey D.O., Hinchliffe P., Li H., MacLean C., Niumsop P., Powell L., Pritchard M., et al. Balancing mcr-1 expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nat. Commun*. 2017; 8: 2054. doi: 10.1038/s41467-017-02149-0.
  40. Hu C., Wen Q., Huang S., Xie S., Fang Y., Jin Y., Campagne R., Alezra V., Miclet E., Zhu J., Wan Y. Gramicidin-S-Inspired cyclopeptidomimetics as potent membrane-active bactericidal agents with therapeutic potential. *ChemMedChem*. 2021 Jan 19; 16 (2): 368–376. doi: 10.1002/cmdc.202000568.
  41. Rathman B.M., Allen J.L., Shaw L.N., Del Valle J.R. Synthesis and biological evaluation of backbone-aminated analogues of gramicidin S. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020 Aug 1; 30 (15): 127283. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127283.
  42. Guan Q., Chen K., Chen Q., Hu J., Cheng K., Hu C., Zhu J., Jin Y., Miclet E., Alezra V., Wan Y. Development of Therapeutic Gramicidin S Analogues Bearing Plastic  $\beta,\gamma$ -Diamino Acids. *ChemMedChem*. 2020 Jun 17; 15 (12): 1089–1100. doi: 10.1002/cmdc.202000097.
  43. Yamamura H., Isshiki K., Fujita Y., Kato H., Katsu T., Masuda K., Osawa K., Miyagawa A. Gramicidin S-inspired antimicrobial cyclodextrin to disrupt gram-negative and gram-positive bacterial membranes. *Medchemcomm*. 2019 Jul 17; 10 (8): 1432–1437. doi: 10.1039/c9md00229d.
  44. Guan Q., Huang S., Jin Y., Campagne R., Alezra V., Wan Y. Recent advances in the exploration of therapeutic analogues of gramicidin S, an old but still potent antimicrobial peptide. *J Med Chem*. 2019 Sep 12; 62 (17): 7603–7617. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00156.
  45. Swierstra J., Kapoerchan V., Knijnenburg A., van Belkum A., Overhand M. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 May; 35 (5): 763–769. doi: 10.1007/s10096-016-2595-y.
  46. Tamaki M., Takanashi K., Harada T., Fujinuma K., Shindo M., Kimura M., Uchida Y. Novel cycloundecapeptides related to gramicidin S with both high antibiotic activity and low hemolytic activity. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2011; 59 (12): 1481–1484. doi: 10.1248/cpb.59.1481.
  47. Derbal S., Hensler M., Fang W., Nizet V., Ghedira K., Nefzi A. On resin amino acid side chain attachment strategy for the head to tail synthesis of new glutamine containing gramicidin-S analogs and their antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Oct 1; 20 (19): 5701–5704. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.015.
  48. Solanas C., de la Torre B.G., Fernández-Reyes M., Santiveri C.M., Jiménez M.A., Rivas L., Jiménez A.L., Andreu D., Cativiela C. Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by D-phenylalanine analogues at the beta-turn. *J Med Chem*. 2009 Feb 12; 52 (3): 664–674. doi: 10.1021/jm800886n.
  49. Jelokhani-Niaraki M., Hodges R.S., Meissner J.E., Hassenstein U.E., Wheaton L. Interaction of gramicidin S and its aromatic amino-acid analog with phospholipid membranes. *Biophys J*. 2008 Oct; 95 (7): 3306–3321. doi: 10.1529/biophysj.108.137471.
  50. Kawai M., Yamamura H., Tanaka R., Umemoto H., Ohmizo C., Higuchi S., Katsu T. Proline residue-modified polycationic analogs of gramicidin S with high antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and low hemolytic activity. *J Pept Res*. 2005 Jan; 65 (1): 98–104. doi: 10.1111/j.1399-3011.2004.00204.x.
  51. Kondejewski L.H., Farmer S.W., Wishart D.S., Kay C.M., Hancock R.E., Hodges R.S. Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. *J Biol Chem*. 1996 Oct 11; 271 (41): 25261–25268. doi: 10.1074/jbc.271.41.25261.
  52. Soejima Y., Hashiguchi A., Izumiya N. Syntheses and antibacterial activities of gramicidin S analogs containing L-ornithine in place of L-valine. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1994 May; 58 (5): 826–829. doi: 10.1271/bbb.58.826.
  53. Ando S., Aoyagi H., Shinagawa S., Nishino N., Waki M., Kato T., Izumiya N. [4,4'-D-diaminopropionic acid]gramicidin S: a synthetic gramicidin S analog with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. *FEBS Lett*. 1983 Sep 5; 161 (1): 89–92. doi: 10.1016/0014-5793(83)80736-4.
  54. Yonezawa H., Kaneda M., Tominaga N., Higashi S., Izumiya N. Adsorption of <sup>14</sup>C-labeled gramicidin S on cell of bacteria. *J Biochem*. 1981 Oct; 90 (4): 1087–1091. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133560.
  55. Derbal S., Hensler M., Fang W., Nizet V., Ghedira K., Nefzi A. On resin amino acid side chain attachment strategy for the head to tail synthesis of new glutamine containing gramicidin-S analogs and their antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Oct 1; 20 (19): 5701–5704. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.015.
  56. Габидова А.Э., Галынкин В.А. Основные начала возникновения резистентности в биосфере. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017; 3–1: 92–102. Доступ: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407> (дата обращения: 16.08.2022) (Gabidova A.E., Galynkin V.A. Osnovnye nachala vozniknoveniya rezistentnosti v biosfere. Mezhdunarodnyj Zhurnal Prikladnyh i Fundamental'nyh Issledovaniy. 2017; 3–1: 92–102 Available at: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407> (Accessed: 16.08.2022) (in Russian))

## Информация об авторах

*Гуров Александр Владимирович* — д. м. н., профессор, кафедра оториноларингологии лечебного факультета, кафедра микробиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова; Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского. Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9811-8397

*Боровкова Кристина Евгеньевна* — руководитель лаборатории микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0003-1571-6549

*Крышень Кирилл Леонидович* — к. б. н., руководитель отдела токсикологии и микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0003-1451-7716; eLibrary SPIN: 5650-2840

*Никифорова Лия Ринатовна* — научный сотрудник лаборатории микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0001-8710-2023

*Салмова Юлия Владимировна* — научный сотрудник лаборатории микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0001-9891-8634

## About the authors

*Alexander V. Gurov* — D. Sc. in medicine, Professor, Pirogov Russian National Research Medical University; Sverzhovsky Scientific and Research Otolaryngology Clinical Institute, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9811-8397

*Kristina E. Borovkova* — Head of the Laboratory of Microbiology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0003-1571-6549

*Kirill L. Kryshen* — Ph. D. in biology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0003-1451-7716. eLibrary SPIN: 5650-2840

*Lia R. Nikiforova* — Researcher at the Laboratory of Microbiology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0001-8710-2023

*Julia V. Salmova* — Researcher at the Laboratory of Microbiology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0001-9891-8634