

**Изучение антибактериального воздействия
комбинированного препарата, содержащего
ципрофлоксацин и вориконазол, на
грамположительные и грамотрицательные
бактерии *in vitro***

Р.С. Матевосян, А.В. Топчян

*Кафедра технологии лекарств ЕГМУ им. М. Гераци
0025, Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: вориконазол, ципрофлоксацина гидрохлорид, отит, МИК, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*

Воспалительные заболевания наружного и среднего уха, вызванные отитами, получают все большую распространенность в оториноларингологии. Заболеваниям присуща полиэтиологичность (наличие сочетанной бактериально-грибковой инфекции), что затрудняет проведение эффективного лечения и в то же время обуславливает необходимость в разработке современных комбинированных препаратов. Основными разновидностями бактерий, встречающихся при отитах наружного и среднего уха, являются *Pseudomonas aeruginosa* – 50%, *Staphylococcus aureus* – 10%, *Staphylococcus epidermidis* – 10%, *Escherichia coli* – 15% [3,4,6].

Проведение системной терапии сопровождается, как правило, побочными реакциями и имеет невысокую эффективность. Наличие лекарственных препаратов в форме кремов и мазей, в состав которых входят аминогликозидные антибиотики, значительно ограничивает их применение, вследствие выраженного ототоксического эффекта. Одной из рациональных для ЛОР практики лекарственных форм являются капли – более эффективные и безопасные в применении [2]. С учетом вышеуказанного нами был разработан новый комбинированный препарат ОТО-FLU™ для лечения отитов, и в частности отомикоза, в форме ушных капель для местного применения.

Комбинированный препарат был разработан на принципе сочетания антибактериального соединения широкого спектра действия – ципрофлоксацина гидрохлорида с противогрибковым веществом широкого спектра действия – вориконазолом, а также противовоспалительного, анальгезирующего агента и других вспомогательных веществ.

Ципрофлоксацин — один из наиболее эффективных фторхинолонов (рисунок) — нашёл широкое применение в клинической практике [1,7]. Фармакологическое действие его — противомикробное средство широкого спектра бактерицидного действия. Высокоактивен в отношении большинства грамотрицательных бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*. Активен в отношении *Staphylococcus spp.*, некоторых штаммов *Enterococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Legionella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Mycobacterium spp.* Ципрофлоксацин активен в отношении бактерий, продуцирующих бета-лактамазы [5,7].

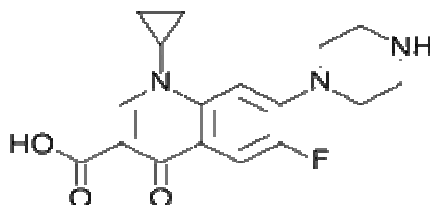


Рисунок. Ципрофлоксацин (*Ciprofloxacinum*), 1-циклопропил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-ил-хинолин-карбоновая кислота

Целью настоящей работы являлось проведение комплексных микробиологических исследований по изучению антибактериальной активности комбинированного препарата ОТО-FLU™, содержащего ципрофлоксацина гидрохлорид и вориконазол к музейным штаммам бактерий рода *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Материал и методы

В работе были использованы фармакологический стандарт ципрофлоксацина гидрохлорида (код C2190000, метод Eur. Ph., 01/2008:51200), комбинированный препарат ОТО-FLU™, а также специально приготовленные контроль и плацебо, состав которых представлен в табл. 1.

В работе были использованы следующие микроорганизмы: стандартные штаммы бактерий рода *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538, *Escherichia coli* ATCC – 8739, *Bacillus subtilis* ATCC – 6633 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC – 9027, которые были получены из Американской коллекции типовых культур. Минимальную ингибирующую концентрацию определили с помощью метода серийных разведений [4,8]. Обработка и статистический анализ данных осуществлялся с использованием программы Prism версия 6.

Таблица 1

Состав контроля и плацебо, использованных в исследовании

Препарат	Плацебо №1	Плацебо №2	Плацебо №3	Плацебо №4	Плацебо №5
Ципрофлоксацина гидрохлорид	-	+	+	-	-
Вориконазол	+	-	+	-	-
Противовоспалительное средство	+	+	-	-	+
Анастезирующее средство	+	+	+	+	+
Вспомогательные вещества	+	+	+	+	+

Примечание. «-» – отсутствие компонента; «+» – присутствие компонента

Результаты и обсуждение

Нами проводились исследования отдельно на бактериях (исследовались 4 штамма стандартных культур: *S. aureus* ATCC – 6538; *E. coli* ATCC – 8739; *B. subtilis* ATCC – 6633; *P. aeruginosa* ATCC – 9027), поскольку в составе препарата ОТО-FLU™ присутствует антибактериальный ингредиент ципрофлоксацина гидрохлорид. Исследование проводилось в несколько этапов.

Определялись минимальные ингибирующие (подавляющие) концентрации (МИК или МПК) «эталоны» – стандартного препарата ципрофлоксацина (стандарт ципрофлоксацина гидрохлорида) по отношению к указанным штаммам бактерий. Данные, полученные на этом этапе, нами были приняты в качестве максимальной эффективности антибактериального действия ципрофлоксацина соответственно для сравнения с эффективностью действия комбинированного препарата и плацебо. МИК плацебо №1, 2, 3, 4 и 5 по отношению к указанным штаммам бактерий были приняты в качестве минимальной эффективности антибактериального действия соответствующих составов плацебо для сравнения с эффективностью действия комбинированного препарата и стандарта ципрофлоксацина. В ходе проведения исследований данного этапа было также определено влияние разных компонентов комбинированного препарата на МИК для каждого штамма в отдельности.

В табл. 2 представлены результаты изучения антибактериальной активности комбинированного препарата ОТО-FLU™, стандарта ципрофлоксацина гидрохлорида и соответствующих плацебо на грамположительные и грамотрицательные бактерии рода *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* и *P. aeruginosa*.

Таблица 2

Антибактериальная активность МИК (мкг/мл) стандарта ципрофлоксацина гидрохлорида, плацебо и комбинированного препарата по отношению к штаммам бактерий

Препарат	МИК (мкг/мл) к исследуемым штаммам			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ОТО-FLU™ (n=6)	0.5	0,0546±0,0078 P≥0.05	0.0729 ±0.0103 P≥0.05	0.25
Стандарт (n=6)	0.5	0.0351±0,0068 P≥0.05	0.0625	0.5±0,137 P≥0.05
Плацебо №2 (n=6)	0.583±0,08 P≥0.05	0.0351±0,0068 P≥0.05	0.0729 ±0.0103 P≥0.05	0.5±0,137 P≥0.05
Плацебо №3 (n=6)	0.5	0,0468	0.0729 ±0.0103 P≥0.05	0.5

Примечание. n – количество независимых экспериментов; P – достоверность средних значений при сопоставлении сравнительных пар исследуемых образцов с комбинированным препаратом ОТО-FLU™

Как следует из данных, представленных в табл. 2, МИК стандарта ципрофлоксацина по отношению к *S. aureus* составила 0.5 мкг/мл. Схожие результаты были получены для комбинированного препарата ОТО-FLU™ и плацебо, содержащего антибактериальный агент, – ципрофлоксацина гидрохлорид и противогрибковый агент – вориконазол. Однако для плацебо №3, содержащего лишь антибактериальный компонент, МИК составила 0.583±0.08 мкг/мл, что достоверно не отличается как от МИК стандарта, так и от комбинированного препарата ОТО-FLU™.

МИК стандарта ципрофлоксацина по отношению к *E. coli* составила 0.0351±0,0068 мкг/мл. Схожие результаты были получены для плацебо с антибактериальным компонентом. Для комбинированного препарата ОТО-FLU™ результат составил 0.0546±0.0078 мкг/мл. Однако для плацебо с антибактериальным и противогрибковым компонентом МИК составила 0.0468 мкг/мл. Следовательно, разница была статистически не достоверна.

МИК стандарта ципрофлоксацина гидрохлорида по отношению к *B. subtilis* составила 0.0625 мкг/мл. Для комбинированного препарата ОТО-FLU™ МИК составила 0.0729 ±0.0103 мкг/мл, что достоверно не отличается от МИК стандарта. Схожие результаты были получены для плацебо

с антибактериальным и противогрибковым компонентом, а также для плацебо с антибактериальным агентом.

МИК стандарта ципрофлоксацина по отношению к *P. aeruginosa* составила 0.5 ± 0.137 мкг/мл. Одинаковые результаты были получены также для плацебо, содержащего антибактериальный агент ципрофлоксацина гидрохлорид. Для комбинированного препарата ОТО-FLU™ МИК составила 0.25 мкг/мл, а для плацебо с антибактериальным и противогрибковым компонентами – 0.5 мкг/мл.

У плацебо №4 и 5 рост бактерий наблюдался с первой пробирки, из-за отсутствия в них антибактериальных агентов.

В табл. 3 представлены результаты изучения характера антибактериальной активности комбинированного препарата ОТО-FLU™, стандарта ципрофлоксацина гидрохлорида и соответствующих плацебо по отношению к музейным штаммам бактерий.

Для выявления характера антибактериальной активности препаратов мы проводили подсчет колониеобразующих единиц в инокулюме бактериальной суспензии до и после добавления исследуемых препаратов.

Данные табл. 3 представляют КОЕ в виде разницы $\log_{10}$ между инокулюмом и добавлением исследуемых препаратов в концентрациях МИК (см. табл.2). Бактерицидным эффектом считали результат, где разница между $\log_{10}$ инокулюма и МИК препаратов будет ≥ 1 , а при $0 \leq \Delta \log_{10} \leq 1$ будет считаться бактериостатическим эффектом.

Таблица 3

Характер антибактериальной эффективности препарата ОТО-FLU™ и контроля (плацебо №2,3)*

Препарат	$\Delta \log_{10}$ КОЕ/мл для исследуемых штаммов			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ОТО-FLU™ (n=6)	0.53 P<0.0001	1.03 P<0.0001	1.4 P<0.0001	1,15 P<0.05
Стандарт (n=6)	0.142 P $\geq$ 0.05	2.69 P<0.05	0.58 P<0.05	1,35 P<0.05
Плацебо №2 (n=6)	0.13 P $\geq$ 0.05	1.67 P<0.05	0.22 P<0.05	1,02 P<0.05
Плацебо №3 (n=6)	0.43 P<0.05	1.0 P<0.05	1,75 P<0.05	0,75 P<0.05

* $\Delta \log_{10} = \log_{10}(\text{посев}) - \log_{10}(\text{МИК})$

Как следует из представленных данных, по отношению к *S. aureus* комбинированный препарат ОТО-FLU™ и плацебо №3 проявили достоверный бактериостатический эффект (P<0.05), в то время как стандарт

ципрофлоксацина гидрохлорида и плацебо №2 не проявляли такого эффекта. По отношению к *E. coli* комбинированный препарат ОТО-FLU™, стандарт ципрофлоксацина, а также плацебо №2,3 проявили достоверный бактерицидный эффект ($P<0.05$). Из представленных данных следует, что по отношению к *B. subtilis* комбинированный препарат ОТО-FLU™ и плацебо №3 проявили достоверный бактерицидный эффект ($P<0.05$), в то время как стандарт ципрофлоксацина и плацебо №2 проявили достоверный бактериостатический эффект ($P<0.05$). Схожие результаты по отношению к *P. aeruginosa* были получены для комбинированного препарата ОТО-FLU™, стандарта ципрофлоксацина и плацебо №2, которые проявили достоверный бактерицидный эффект ($P<0.05$). При этом плацебо №3, который не содержит противовоспалительного вещества, проявил лишь достоверный бактериостатический эффект ($P<0.05$).

Таким образом, результаты исследования показали, что разработанный нами комбинированный препарат ОТО-FLU™, в состав которого входят антибактериальное соединение – ципрофлоксацина гидрохлорид, противогрибковое соединение – вориконазол, а также противовоспалительный и анальгезирующий агент, проявляет выраженную антибактериальную активность по отношению к исследованным грамположительным и грамотрицательным бактериальным культурам. Следует отметить также, что в отличие от стандартного препарата ципрофлоксацина гидрохлорида, комбинированный препарат ОТО-FLU™ проявил бактерицидную активность по отношению к *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и бактериостатическую активность по отношению к *Staphylococcus aureus* с высокой достоверностью.

Поступила 13.03.14

**Ցիպրոֆլոքսացին և վորիկոնազոլ պարունակող համակցված
պատրաստուկի հակաբակտերիալ ազդեցության
ուսումնասիրությունը գրամդրական և գրամբացասական
բակտերիաների վրա *in vitro***

Ռ.Ս. Մաթևոսյան, Հ.Վ. Թովյան

Աշխատանքի նպատակն էր բարդ մանրէաբանական ուսումնասիրությունների անցկացումը *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* բակտերիաների տեսակների թանգարանային շտամների հանդեպ համակցված պատրաստուկ ОТО-FLU™ -ի, որը պարունակում է ցիպրոֆլոքսացին և վորիկոնազոլ, հակաբակտերիալ ակտիվության հետազոտման նպատակով: Իրական-

նացվել են համեմատական ուսումնասիրություններ՝ օգտագործելով ցիպրոֆլոքսացին հիդրոքլորիդի դեղագրքային գործող ստանդարտ, ինչպես նաև ստուգիչ պլացեբո օրինակներ, որոնք պարունակում են հակաբորբոքային, անզգայնացնող և օժանդակ նյութեր: Բոլոր օրինակների և ստանդարտի համար որոշվել են նվազագույն արգելակող կոնցենտրացիաները (ՆԱԿ), ինչպես նաև ուսումնասիրվել է նշված պատրաստուկների հակամանրէային գործունեության բնույթը տիպիկ միկրոօրգանիզմների ամերիկյան հավաքածուի *S.aureus* ATCC – 6538, *E.coli* ATCC – 8739, *B.subtilis* ATCC – 6633 և *P. Aeruginosa* ATCC – 9027 շտամների հանդեպ:

Ուսումնասիրության անցկացման արդյունքները ցույց տվեցին, որ մեր կողմից մշակված համակցված պատրաստուկ OTO-FLU™ -ը, որի կազմի մեջ մտնում են հակաբակտերիալ միացություն ցիպրոֆլոքսացին հիդրոքլորիդը, հակասնկային միացություն վորիկոնազոլը, ինչպես նաև հակաբորբոքային և ցավազրկող գործոն, ցուցաբերում է արտահայտված հակաբակտերիալ ակտիվություն ուսումնասիրված գրամդրական և գրամբացասական բակտերիաների կուլտուրաների հանդեպ: Հատկանշական է նաև, որ ի տարբերություն ցիպրոֆլոքսացին հիդրոքլորիդի ստանդարտ պատրաստուկի, համակցված պատրաստուկ OTO-FLU™ -ը ցուցաբերեց բակտերիոցիդ ակտիվություն *Escherichia coli*-ի, *Bacillus subtilis*-ի, *Pseudomonas aeruginosa*-ի հանդեպ և բակտերիոստատիկ ակտիվություն՝ *Staphylococcus aureus*-ի հանդեպ բարձր ճշգրտությամբ:

Study of antibacterial effect of a combined preparation containing ciprofloxacin and voriconazole on gram-positive and gram-negative bacteria *in vitro*

R.S. Matevosyan, H.V. Topchyan

The purpose of the present work was to carry out a complex microbiological research on the study of antibacterial action of a combined drug OTO-FLU™, containing ciprofloxacin and voriconazole, on museum strains of bacterial species *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*. The comparative research was conducted with use of the pharmaceutical reference standard of ciprofloxacin hydrochloride, and also control placebo samples containing anti-inflammatory, anesthetic and adjuvant substances. The minimum inhibiting concentrations (MIC) for all samples and for the standard have been defined, and also it has been investigated the character of antimicrobial action of the specified drugs in relation to strains

S. aureus ATCC - 6538, *E. coli* ATCC - 8739, *B. subtilis* ATCC - 6633 and *P. aeruginosa* ATCC-9027 from the American Type Culture Collection .

The results of our research have shown that the combined drug OTO-FLU™ developed by us, which includes antibacterial agent ciprofloxacin hydrochloride, antifungal agent voriconazole , and anti-inflammatory and analgesic agents, exhibits a pronounced antibacterial effect on the studied gram-positive and gram-negative bacterial cultures. It is also noteworthy that unlike the standard preparation ciprofloxacin hydrochloride, the combined preparation OTO-FLU™ shows bactericidal activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* with high reliability.

Литература

1. Инструкция по медицинскому применению препарата Ципробай® компании “Байер”
2. Кицера А.О., Кицера А.А. Ототоксическое действие антибиотиков. Жіночий лікар, 2008, 5, с. 40.
3. Крюков А.И., Туровский А.Б. Клиника, диагностика и лечение острого воспаления среднего и наружного уха. Лечащий врач, М., 2002, 10, с.20-24.
4. Методические указания МУК 4.2.1890-04.
5. Нифирова Г.Н., Свистушкин Н.М. Рациональное топическое этиотропное лечение воспалительных заболеваний наружного и среднего уха. Эффективность фармакотерапии. М., 2013, с. 30-36.
6. Пальчун В.Т., Магомедов М.М., Лучихин Л.А. Отоларингология: учебник, 2-е изд. М., 2011, с. 412-419.
7. Янов Ю.К., Рязанцев С.В. Этиопатогенетическая терапия острых средних отитов. Consilium medicum, 2005, 4, с. 290 - 297.
8. Priscila Gava Mazzola, Angela Faustino Jozala Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents disinfectant and/or sterilizing agents. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, vol. 45, 2, abr., p. 1-5.