

Экспериментальное исследование антимикробной и антибиопленочной активности комбинации ципрофлоксацина и тинидазола *in vitro*

Царев В.Н.¹, Ушаков Р.В.², Ипполитов Е.В.¹, Подпорин М.С.¹, Нуруев Н.Н.²

¹Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова

²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования

Резюме

Актуальность. Развитие хронического пародонтита ассоциировано с формированием микробных биопленок, поэтому исследование антибиопленочной активности препаратов позволяет расширить возможности их эффективного применения для лечения пациентов.

Цель. Определение активности антимикробных компонентов (ципрофлоксацин, тинидазол) комбинированного препарата «Цифран СТ» на планктонные и биопленочные формы патогенов по сравнению с амоксициллином/клавуланатом.

Материал и методы. Экспериментальное исследование влияния на планктонные формы патогенов выполнено с использованием методики автоматизированного культивирования *in vitro* штаммов *S. aureus* (MRSA) и *Prevotella intermedia* в биокультиваторе «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). Воздействие на микробную биопленку оценивали на трехкомпонентной модели (*S. sanguis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*) с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. При воздействии на штамм MRSA МПК «Цифрана СТ» составила 12,5/500 и 25/250 мкг/мл (соотношение ципрофлоксацина/тинидазол), в то время как для амоксициллина/клавуланата ингибирующее действие фиксировалось только в очень большой концентрации – 500 мкг/мл; при воздействии на *P. intermedia* МПК «Цифрана СТ» составила 25/250 мкг/мл, что не уступало эффекту амоксициллина/клавуланата. При сравнении воздействия исследуемых препаратов на трехкомпонентную биопленку (*S. sanguis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*) в концентрации, приближающейся к МПК, установлена деструкция мантии биопленки и частичное повреждение микробных клеток под действием «Цифрана СТ» (по данным сканирующей электронной микроскопии), в то время как амоксициллин/клавуланат не оказывал такого эффекта.

Заключение. Результаты показали преимущества «Цифрана СТ» при воздействии на штаммы, резистентные к амоксициллину, и на биопленки, как препарата выбора для комплексного лечения пациентов с хроническим пародонтитом.

Ключевые слова: хронический пародонтит, планктонные формы, биопленка, антибиопленочная активность, ципрофлоксацин, тинидазол, амоксициллин.

Для цитирования: Царев В. Н., Ушаков Р. В., Ипполитов Е. В., Подпорин М. С., Нуруев Н. Н. Экспериментальное исследование антимикробной и антибиопленочной активности комбинации ципрофлоксацина и тинидазола *in vitro*. Пародонтология. 2019;24(4):285-292. <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2019-24-4-285-292>.

Pilot study of antimicrobial and anti-biofilm activity of a combination of Ciprofloxacin and Tinidazolum *in vitro*

V.N. Tsarev¹, R.V. Ushakov², E.V. Ippolitov¹, M.S. Podporin¹, N.N. Nuruev²

¹A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry

²The State Medical Academy of Postgraduate Education
Moscow, Russian Federation

Abstract

Relevance. Development of a chronic periodontal disease is associated with forming microbial biofilms therefore the research of anti-biofilm activity of drugs allows to expand possibilities of their effective use for treatment.

Purpose. Determination of activity of antimicrobial components (ciprofloxacin, tinidazolum) the combined drug (Ciphran ST) on planktonic and biofilm forms of pathogens in comparison with amoxicillin/clavulanate.

Materials and methods. The pilot study of influence on planktonic forms of pathogens is executed with use of a technique of the automated cultivation of *in vitro* of strains of *S. aureus* (MRSA) and *P. intermedia* in a biocultivator of «Revers-Spinner RTS-1» (BioSan, Latvia). Impact on a microbial biofilm was estimated on ternary model (*S. sanguis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*) with use of the scanning electronic microscopy.



Results. At impact on a strain of MRSA MIC of ciprofloxacin/tinidazole made 12.5/500 and 25/250 mkg/ml while for the amoxicillin/clavulanate the inhibiting action was fixed only in very high concentration – 500 mkg/ml; at impact on MIC P. intermedia of ciprofloxacin/tinidazole made 25/250 mkg/ml that did not concede to effect of amoxicillin/clavulanate. When comparing impact of the studied medicines on a three-component biofilm the concentration coming to MIC established destruction of a mantle of a biofilm and partial damage of microbial cells under the influence of ciprofloxacin/tinidazole (according to the scanning electronic microscopy) while amoxicillin/clavulanate did not render such effect.

Conclusion. Results showed advantages of components (ciprofloxacin, tinidazole) the combined drug (Ciphran ST) at impact on strains resistant to amoxicillin and on biofilms as choice medicine for complex treatment of patients with a chronic periodontal disease.

Key words: chronic periodontal disease, planktonic forms, biofilm, anti-biofilm activity, ciprofloxacin, tinidazole, amoxicillin.

For citation: V.N. Tsarev, R.V. Ushakov, E.V. Ippolitov, M.S. Podporin, N.N. Nuruev. Pilot study of antimicrobial and anti-biofilm activity of a combination of Ciprofloxacin and Tinidazole in vitro. Parodontologiya.2019;24(4):285-292. (in Russ.) <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2019-24-4-285-292>.

Проблема антимикробной химиотерапии в комплексном лечении хронического пародонтита в последние годы приобретает особое значение вследствие осознания стоматологами положения о хроническом генерализованном пародонтите как инфекционном процессе, ассоциированном с формированием устойчивых микробных биопленок и растущей резистентности возбудителей к антимикробным препаратам [1-4]. В частности, в работах отечественных и зарубежных исследователей было показано, что основные пародонтопатогены – *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola* и постоянный обитатель десневой биопленки *S. sanguis* депонируют гены резистентности к метронидазолу, бета-лактамам антибиотикам, линкомицину, тетрациклину и обмениваются ими в процессе взаимодействия друг с другом в составе смешанной полимикробной биопленки [4-6].

Актуальность этого положения определяется также и тем, что пародонтопатогенные виды 1-го порядка или относящиеся к «красному и оранжевому комплексу опасности» по Socranski [7] отличаются ярко выраженной способностью не только формировать субгингивальную биопленку с участием других представителей микробиоты полости рта, повышающих «защитные» свойства биопленки от факторов гомеостаза и медикаментов, но также осуществлять инвазию внутрь клеток десневого эпителия, нейтрофилов, макрофагов и эндотелия сосудов, то есть обладают свойством внутриклеточного паразитизма [4, 5, 8]. Эти факторы не могут не влиять на выбор антимикробных химиопрепаратов (антибиотиков и антисептиков) для лечения пародонтита [1, 4, 6, 9, 10]. Способность к внутриклеточному паразитированию делает пародонтопатогены неуязвимыми для ряда антибактериальных препаратов, которые не проникают внутрь клеток организма и действуют только на поверхностно расположенные патогены, что может определять слабую эффективность проводимого пародонтологического лечения и возникновение обострений и рецидивов [1, 6].

Немаловажное значение играет и тот факт, что устойчивость ассоциации бактерий к антибиотикам, обусловленная способностью или неспособностью препарата проникать через матрикс биопленки, в 100-1000 раз выше, чем при нахождении микробов в «флоатирующем» или «планктонном» состоянии. В связи с этим встает вопрос о том, а все ли широко применя-

емые в комплексном лечении пародонтита антибактериальные препараты, как например, амоксициллин или амоксициллина/клавуланат, успешно проникают в биопленку, разрушают ее и являются эффективными в этом плане? Как показывают исследования последних лет – далеко не все, но этот вопрос требует дальнейшего изучения [4, 6, 9, 10]. И только полученные в результате этих исследований данные могут быть положены в основу пересмотра существующих клинических рекомендаций и схем антибактериальной терапии в комплексном лечении хронического пародонтита.

Цель исследования: определение активности антимикробных компонентов (ципрофлоксацин, тинидазол) комбинированного препарата «Цифран СТ» на планктонные и биопленочные формы патогенов по сравнению с амоксициллином/клавуланатом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментальном исследовании для оценки антибактериальной активности препаратов и определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) использовали биореактор (рис. 1) «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия).

Это термостатирующее устройство, где реализован инновационный тип получения микробной культуры, при котором жидкость (клетки в жидкой среде) перемешивается за счет вращения пробирки вокруг своей оси, благодаря чему происходит высокоэффективное смешивание вихревого типа. Данная система предназначена для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени [10]. Интерпретацию результатов проводили с помощью прилагаемой компьютерной программы по изменению оптической плотности (OD) при длине волны $\lambda = 850$ нм. При культивировании микроорганизмов в биореакторе использовали пробирки 50 мл с мембранным фильтром (TubeSpin®, SW).

Штаммы микроорганизмов: клинические изоляты – метициллин-резистентный штамм *Staphylococcus aureus* (MRSA) и пародонтопатогенный вид *Prevotella intermedia*, выделенные у больного хроническим пародонтитом, культивировали на среде M521 (Стафилококковый агар N110) и колумбийском кровяном агаре M 144 (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) с 5% дефибрированной кровью барана и селективной добавкой для выделения неспоровых анаэробов



Рис. 1. Система автоматизированного культивирования микроорганизмов «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия)

Fig. 1. The system of automated cultivation of microorganisms «Reverse-Spinner RTS-1» (BioSan, Latvia)

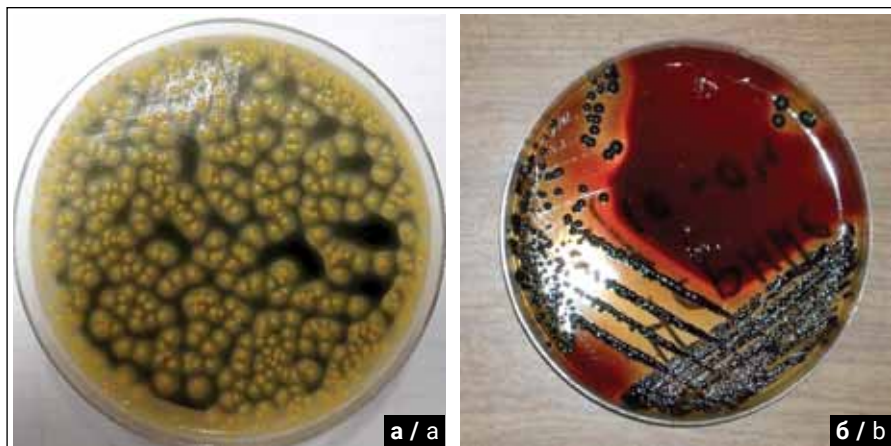


Рис. 2. Рост чистых культур *Staphylococcus aureus* на среде M521 (а) и *Prevotella intermedia* на 5% кровяном гемин-агаре на основе среды M144 (б)

Fig. 2. The growth of pure cultures of *Staphylococcus aureus* on medium M521 (a) and *Prevotella intermedia* on 5% blood hemin agar based on medium M144 (b)

(гемин, менадион) соответственно (рис. 2а, б). Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали жидкие питательные среды производства Himedia Laboratories Pvt. Limited (Индия): Brain Heart Infusion Broth (M210) – для культивирования *Staphylococcus aureus* (MRSA); Wilkins Chalgren Anaerobic Broth (M863) – для культивирования *Prevotella intermedia*.

Выбор препаратов для изучения обусловлен нашими данными по частоте применения антимикробных средств в стоматологии, полученными при анкетировании врачей-стоматологов, а именно бета-лактамов (в том числе защищенных), производных 5-нитроимидазола, фторхинолонов, а также чувствительности к ним представителей пародонтопатогенной микрофлоры [5, 6].

Для каждого эксперимента отдельно в стерильных пробирках объемом 15 мл готовили бактериальную взвесь в общем количестве 5 мл. Оптическую плотность полученной взвеси измеряли с помощью денситометра DEN-1B (BioSan, Латвия), которая для каждого эксперимента составила $0,5 \pm 0,3$ mcf ($1,5 \times 10^8$ КОЕ). В каждом эксперименте проводили культивирование в нескольких раз-

Таблица 1. Характеристика исследуемых образцов препаратов

Table 1. Characterization of the studied samples of drugs

Код образца и название препарата Sample Code and drug name	Группа, краткая характеристика Group, brief description
01 Контроль 01 Control	Рост в питательной среде Growth in the medium
02 Амоксициллин + клавуланат натрия (амоксиклав) 02 Amoxicillin + clavulanate sodium (amoxiclav)	Бета-лактамный антибиотик, бактерицидный препарат широкого спектра. Торможение роста и гибель большинства видов аэробных микроорганизмов. Beta-lactam antibiotic, a broad spectrum bactericidal drug. Inhibition of growth and death of most types of aerobic microorganisms.
03 Ципрофлоксацин 03 Ciprofloxacin	Фторхинолон 2-го поколения, бактерицидный препарат широкого спектра. Торможение роста и гибель большинства видов аэробных микроорганизмов. Fluoroquinolone 2-nd generation, a broad spectrum bactericidal drug. Inhibition of growth and death of most types of aerobic microorganisms.
04 Тинидазол 04 Tinidazole	Производное имидазола, бактерицидный препарат с противоанаэробной активностью. Торможение роста и гибель большинства анаэробных микроорганизмов. An imidazole derivative, a bactericidal drug with antianaerobic activity. Inhibition of growth and death of most anaerobic microorganisms.
05 Ципрофлоксацин + тинидазол (Цифран СТ) 05 Ciprofloxacin + Tinidazole (Cifran ST)	Комплексный препарат широкого спектра действия с противоанаэробной активностью. Торможение роста и гибель большинства видов аэробных и анаэробных микроорганизмов. A complex drug with a wide spectrum of action with antianaerobic activity. Inhibition of growth and death of most types of aerobic and anaerobic microorganisms.

ных параллелях с учетом концентрации препаратов или соотношения концентраций при их смешивании (табл. 1).

Исследование динамики роста планктонных форм микроорганизмов проводили в нескольких параллелях, что отражалось на графиках развития бактериальных популяций по изменению параметров оптической плотности, на основании которых была построена кривая. Все основные фазы роста микроорганизмов: адаптивная (лаг-фаза), экспоненциальная (лог-фаза), стационарная, отмирания, а также скорость прироста бактериальных популяций были индивидуальны для каждого вида микроорганизма.

Моделирование биопленки осуществляли согласно ранее разработанному патенту РФ [11] на основе метилполиакрилата в жидкой фазе при постоянном токе жидкости BHI (сердечно-мозговой бульон), создаваемом шей-

кером-термостатом-биореактором. Последовательную колонизацию подложки проводили *S. sanguis* (ранний колонизатор), *F. nucleatum* (промежуточный колонизатор), *P. intermedia* (поздний колонизатор – пародонтопатоген). Затем добавляли в параллелях исследуемые препараты в рабочих концентрациях: амоксициллин/клавуланат натрия, цiproфлоксацин, тинидазол, цiproфлоксацин/тинидазол. По истечении семи суток культивирования готовили препараты для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы фиксировали 10% раствором нейтрального формалина. Поверхность образцов из полиакрила изучали с использованием сканирующего электронного двулучевого микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, CIF) в режиме высокого вакуума, с предварительным напылением золотом (999) в установке SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., США).

Таблица 2. Ключевые фазы кривой роста микробных популяций метициллин-резистентного *S. aureus*
Table 2. Key phases of the growth curve of microbial populations of methicillin-resistant *S. aureus*

Код образца и название препарата Sample code and drug name	Экспоненциальная фаза (продолжительность, час) Exponential phase (duration, hour)	Стационарная фаза (пиковые значения роста, ЕД МСФ) Stationary phase (peak growth, MCF)
01 Контроль 01 Control	10 часов (с 6 до 16 часов) 10 hours (from 6 a.m. to 4 p.m.)	6,0 ± 0,3
02 Амоксициллин + клавуланат натрия (амоксиклав) 02 Amoxicillin + clavulanate sodium (amoxiclav)	10 часов (с 8 до 18 часов) 10 hours (from 8 a.m. to 6 p.m.)	4,2 ± 0,3*
03 Цiproфлоксацин 03 Ciprofloxacin	Роста нет* (МПК 12,5 мкг/мл) No growth* (MIC 12.5 µg/ml)	Роста нет* (МПК 12,5 мкг/мл) No growth* (MIC 12.5 µg/ml)
04 Тинидазол 04 Tinidazole	10 часов (с 8 до 18 часов) 10 hour (from 8 a.m. to 6 p.m.)	4,5 ± 0,3*
05 Цiproфлоксацин + тинидазол («Цифран СТ») 05 Ciprofloxacin + Tinidazole (Cifran ST)	Роста нет* (МПК 12,5/500 мкг/мл) No growth* (MIC 12.5/500 mcg/ml)	Роста нет* (МПК 12,5/500 мкг/мл) No growth* (MIC 12.5/500 mcg/ml)

Таблица 3. Ключевые фазы кривой роста анаэробных микробных популяций пародонтопатогенного вида *P. intermedia*
Table 3. Key phases of the growth curve of anaerobic microbial populations of periodontopathogenic species *P. intermedia*

Код образца и название препарата Sample code and drug name	Экспоненциальная фаза (продолжительность, час) Exponential phase (duration, hour)	Стационарная фаза (пиковые значения роста, ЕД МСФ) Stationary phase (peak growth, MCF)
01 Контроль 01 Control	18 часов (с 21 до 39 часов) 18 hours (from 21 до 39 hours)	6,2 ± 0,3
02 Амоксициллин + клавуланат натрия (амоксиклав) 02 Amoxicillin + clavulanate sodium (amoxiclav)	20 часов (с 22 до 42 часов) 20 hours (from 22 to 42 hours)	Роста нет* (МПК 25 мкг/мл) No growth * (MIC 25 µg/ml)
03 Цiproфлоксацин 03 Ciprofloxacin	Роста нет* (МПК 50 мкг/мл) No growth * (MIC 50 µg/ml)	Роста нет* (МПК 50 мкг/мл) No growth * (MIC 50 µg/ml)
04 Тинидазол 04 Tinidazole	12 часов (с 36 до 48 часов) 500 мкг/мл 12 hours (from 36 to 48 hours) 500 µg/ml	Роста нет* (МПК 1000 мкг/мл) No growth * (MPC 1000 µg/ml)
05 Цiproфлоксацин + тинидазол («Цифран СТ») 05 Ciprofloxacin + Tinidazole (Cifran ST)	Роста нет* (МПК 12,5/250 мкг/мл) No growth * (MIC 12.5/250 mg/ml)	Роста нет* (МПК 12,5/250 мкг/мл) No growth * (MIC 12.5 / 250 mg/ml)

*достоверная разница с контролем ($p < 0,05$)

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни (достоверный результат при сравнении величин $p < 0,05$) на основе компьютерной программы MS DOS Biostat 9.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При автоматизированном культивировании чистых культур микробов в биореакторе с определением МПК оценивали влияние препарата на планктонные формы тестовых штаммов. Результаты раздельного исследования компонентов комплексного препарата «Цифран СТ» и всего комплекса в отношении преимущественно аэробных тест-штаммов по сравнению с амоксициллина/клавуланатом (*S. aureus*) представлены в таблице 2.

При исследовании клинического штамма метициллин-резистентного *S. aureus* (MRSA) в контрольной пробирке наблюдался типичный рост микробов с классическими фазами кривой роста (рис. 3). Адаптивная фаза продолжалась до 6 часа эксперимента. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза была средней по продолжительности (с 6 до 10 часа) с характерной интенсивной генерацией новых популяций, при которой интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения оставались относительно постоянными (P-3). Максимальный пиковый показатель оптической плотности в окончании истинного логарифмического роста (показатель α) – $6,0 \pm 0,3$ ЕД МСФ, а общий валовый выход за весь период интенсивного развития – М-концентрация (показатель β) – $5,87 \pm 0,30$ ЕД МСФ. Временное отношение периода P-2 и P-3 – 1:1. Стационарная фаза (P-4), характеризующаяся достигнутым равновесием между вновь образующимися и отмирающими клетками, была достаточно продолжительной, со средним показателем оптической плотности – $6,09 \pm 0,30$ ЕД МСФ. Общее время культивирования – 64 часа, когда отмечена тенденция к переходу в фазу отмирания (P-5).

При использовании амоксициллина/клавуланата натрия отмечали проявление ингибирующего действия на рост бактериальных популяций только в диапазоне больших концентраций от 125 до 625 мкг/мл. По сравнению с контролем средняя продолжительность экспоненциальной фазы оставалась прежней (10 часов), но наблюдалась задержка перехода в фазу экспоненциального роста, которая увеличивалась с дозой препарата до 14 и 16 часов при

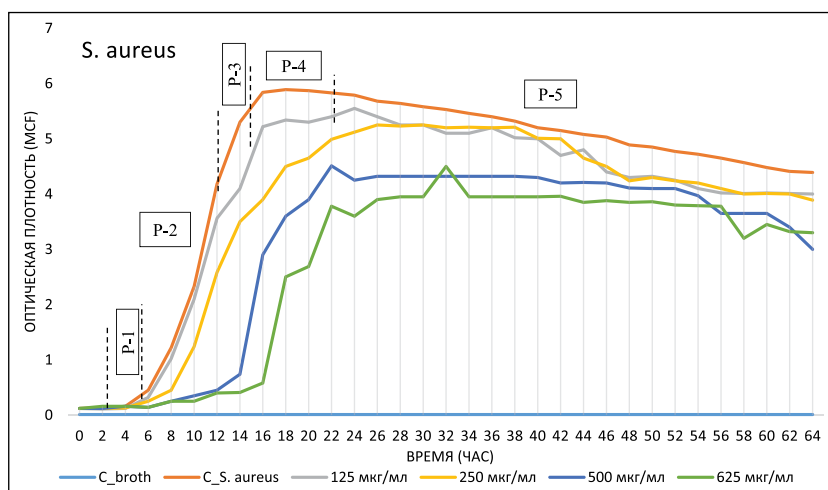


Рис. 3. Кривые роста метициллин-резистентного штамма *S. aureus* с разными концентрациями амоксициллина/клавуланата натрия

Fig. 3. Growth curves of methicillin-resistant *S. aureus* strain with different concentrations of amoxicillin/sodium clavulanate

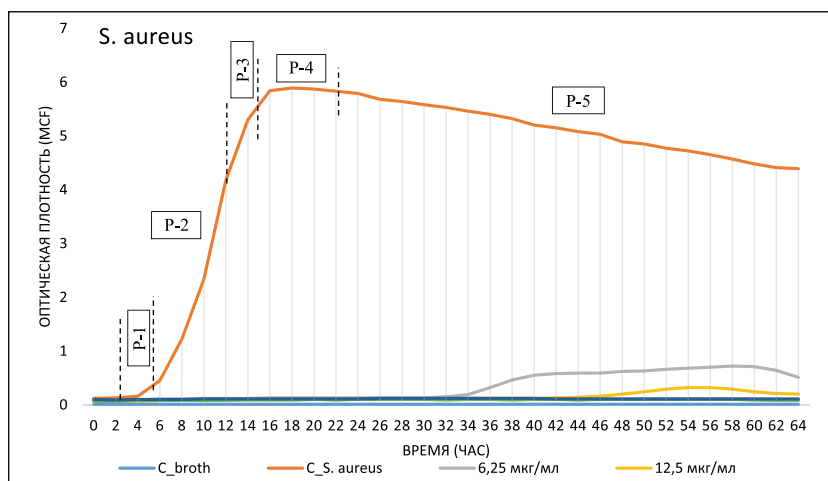


Рис. 4. Кривые роста метициллин-резистентного штамма *S. aureus* с разными концентрациями ципрофлоксацина

Fig. 4. Growth curves of methicillin-resistant *S. aureus* strain with different concentrations of ciprofloxacin

концентрациях 500 и 625 мг/мл соответственно. Пиковые значения роста в стационарной фазе составили $4,2 \pm 0,3$ ЕД МСФ, то есть были достоверно ниже, чем в контроле. При оценке концентраций до 125 мкг/мл амоксициллина/клавуланата натрия антибактериальная активность не выявлена.

При использовании ципрофлоксацина выявлено выраженное ингибирующее действие препарата на аэробные культуры (рис. 4). Так, штамм MRSA не давал роста в течение 32 часов и 48 часов при использовании концентраций 12,5 мкг/мл, а при использовании концентрации 6 мкг/мл рост был атипичным, без фазы экспоненциального роста, и заканчивался переходом в фазу отмирания к 64 часам. Роста MRSA при диапазоне от 25 мкг и выше стабильно не наблюдалось.

При использовании тинидазола только в концентрациях, близких к терапевтическим, не выявлено активности на рост бактериальных популяций, однако в высоких концентрациях отмечено ингибирующее действие, которое выражалось в отставании начала фазы экспоненциального роста (рис. 5). Продолжительность фазы экспоненциального роста оставалась 10 часов, как и в контроле, но наступала она на 2 часа позже, что прояв-

лялось при больших концентрациях препарата (табл. 3). Пиковые значения в стационарной фазе были $4,5 \pm 0,3$ ЕД МСФ.

При использовании комбинированного препарата «Цифран СТ» наблюдалось эффективное торможение роста бактериальных популяций, которое, как следует из представленного материала, обеспечивалось за счет цiproфлоксацина (рис. 6). Роста бактериальных популяций MRSA в рабочем диапазоне концентраций не наблюдалось ($12,5/500$ и $25/250$ мкг/мл).

Результаты отдельного исследования компонентов комплексного препарата Цифран СТ и всего комплекса в отношении преимущественно анаэробных тест-штаммов по сравнению с амоксициллином (*P. intermedia*) представлены в таблице 3.

При исследовании клинического штамма представителей анаэробной пародонтопатогенной флоры – *P. intermedia* (рис. 6) в контрольной пробирке наблюдался типичный рост микробов с классическими фазами кривой роста. Адаптивная фаза продолжалась до 18 часа эксперимента. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза была средней по продолжительности (с 21 до 39 часов) с характерной интенсивной генерацией новых популяций, при которой интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения оставались постоянными (P-2). Максимальный пиковый показатель оптической плотности в окончании истинного логарифмического роста (показатель α) – $5,8 \pm 0,3$ ЕД МСФ, а общий валовый выход за весь период интенсивного развития – М-концентрация (показатель β) – $6,1 \pm 0,3$ ЕД МСФ. Временное отношение периода P-2 и P-3 – 2:1. Стационарная фаза (P-4) была достаточно продолжительной, со средним показателем оптической плотности – $5,6 \pm 0,3$ ЕД МСФ. Общее время культивирования – 96 часов, когда отмечена тенденция к переходу в фазу отмирания (P-5).

При использовании амоксициллина/клавуланата в рабочих концентрациях (от 25 мкг/мл) отмечали проявление ингибирующего действия на рост бактериальных популяций с практически полным отсутствием роста штаммов.

При использовании «Цифрана СТ» в рабочих концентрациях отмечали проявление ингибирующего действия на рост бактериальных популяций с практически полным отсутствием роста штаммов при концентрации $25/250$ мкг/мл (соотношение цiproфлоксацин/тинидазол).

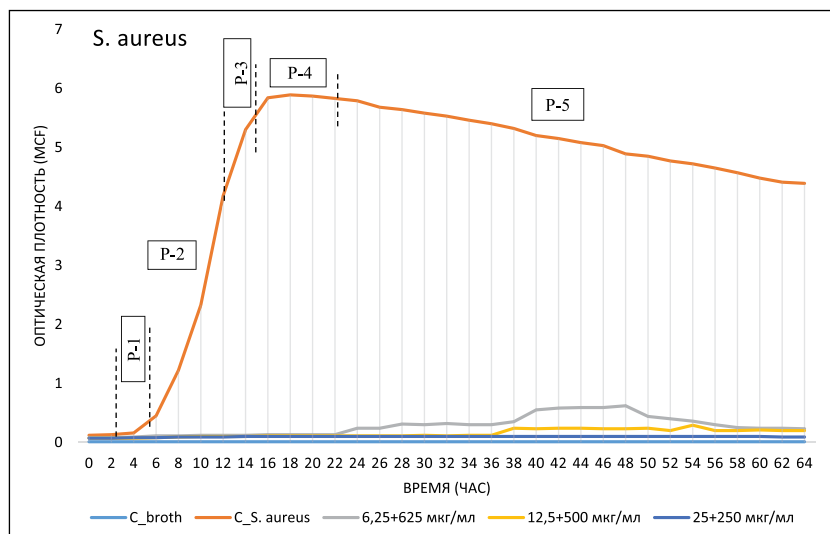


Рис. 5. Кривые роста метициллин-резистентного штамма *S. aureus* с разными концентрациями цiproфлоксацина и тинидазола

Fig. 5. Growth curves of methicillin-resistant *S. aureus* strain with different concentrations of ciprofloxacin and tinidazole

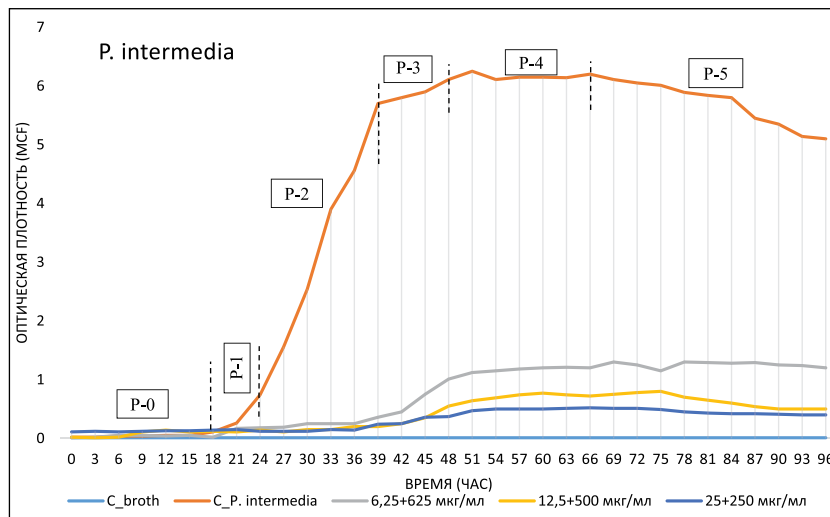


Рис. 6. Кривые роста штамма *P. intermedia* с разными концентрациями «Цифрана СТ» (цiproфлоксацин + тинидазол)

Fig. 6. Growth curves of *P. intermedia* strain with different concentrations of Cifran ST (ciprofloxacin + tinidazole)

Особого внимания заслуживает подтверждение синергичного действия компонентов комбинированного препарата, так как в обоих тестируемых концентрациях – $6,25/625$ и $12,5/500$ мкг/мл (соотношение цiproфлоксацин/тинидазол) – амплитуда кривых роста в стационарную фазу резко снижалась до $1,0 \pm 0,3$ ЕД МСФ (рис. 6).

При формировании трехкомпонентной микробной биопленки (*S. sanguis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*) с добавлением исследуемых препаратов, по данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), получены следующие результаты.

Установлено, что применение амоксициллина/клавуланата не приводило к полному устранению микробной биопленки. При проведении СЭМ (увеличение $\times 4000$) выявлено фрагментарное строение микробного консорциума (рис. 7а), а при большем увеличении (увеличение $\times 8000$) отчетливо видны преимущественно бактериоидные формы микроорганизмов с участками сохранившейся мантии (рис. 7б).

Иная картина наблюдалась нами при применении комбинации цiproфлоксацина с тинидазолом («Цифран СТ»). Как и в первом случае, сохранялись микробные клетки также бактериоидной формы, но структура биопленки не определяется (увеличение $\times 4000$, рис. 8а). При большем увеличении видно отсутствие мантии на скоплении микробных клеток, большое количество разрушенных, поврежденных бактерий в виде межклеточного детрита (увеличение $\times 8000$, рис. 8б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования по автоматизированному культивированию аэробных и анаэробных штаммов микроорганизмов и оценке их воздействия на модель смешанной микробной биопленки *in vitro* позволили уточнить МПК исследуемых препаратов и выявить определенные преимущества комбинированного препарата «Цифран СТ» перед амоксициллина/клавуланатом:

- при воздействии на метициллин-резистентный штамм *S. aureus* МПК Цифрана СТ составила 12,5/500 и 25/250 мкг/мл (соотношение цiproфлоксацин/тинидазол), в то время как для амоксициллина/клавуланата ингибирующее действие фиксировалось только в очень большой концентрации – 500 мкг/мл (причем только в виде бактериостатического эффекта);
- при воздействии на анаэробный пародонтопатогенный вид *P. intermedia* комбинированного препарата МПК составила 25/250 мкг/мл (соотношение цiproфлоксацин/тинидазол), что не уступало аналогичному эффекту амоксициллина/клавуланата (МПК 25 мкг/мл);
- при сравнении воздействия исследуемых препаратов на трех-

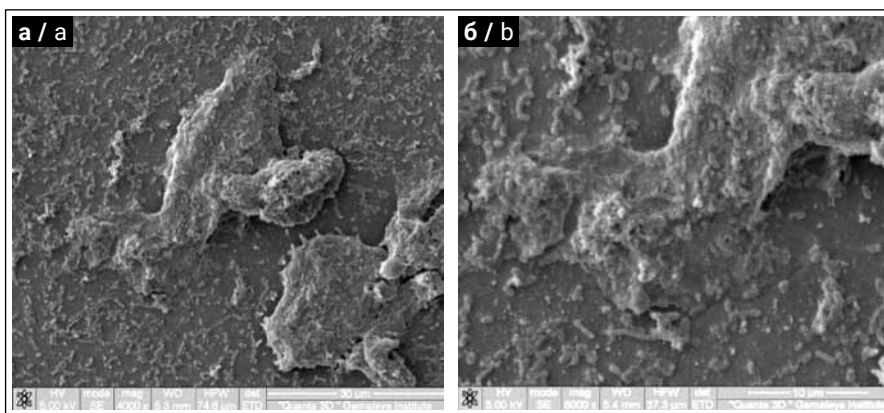


Рис. 7. Воздействие амоксициллина/клавуланата 12,5 мкг/мл при моделировании биопленки *in vitro*: фрагмент биопленки *P. intermedia* с частично сохраненной мантией. СЭМ Ув. $\times 4000$ (а) и $\times 8000$ (б)

Fig. 7. The effect of amoxicillin / clavulanate 12.5 μg / ml when simulating *in vitro* biofilm: a fragment of *P. intermedia* biofilm with a partially preserved mantle. SEM $\times 4000$ (a) and $\times 8000$ (b)

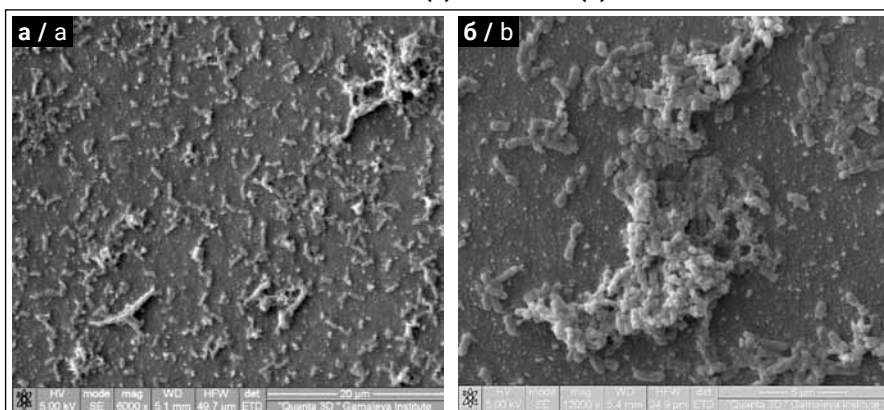


Рис. 8. Воздействие цiproфлоксацина/тинидазола 12,5/500 мкг/мл при моделировании биопленки *in vitro*: фрагмент биопленки *P. intermedia* без видимой мантии, преобладают частично деформированные планктонные формы. СЭМ Ув. $\times 8000$ (а) и $\times 12\,000$ (б)

Fig. 8. The effect of ciprofloxacin / tinidazole 12.5 / 500 μg / ml when modeling the biofilm *in vitro*: a fragment of the *P. intermedia* biofilm without a visible mantle, partially deformed plankton forms predominate. SEM $\times 8000$ (a) and $\times 12\,000$ (b)

компонентную микробную биопленку (*S. sanguis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*) в концентрации, приближающейся к МПК, установлена полная деструкция мантии биопленки и частичное повреждение микробных клеток под действием комбинации цiproфлоксацина с тинидазолом (цифран СТ), в то время как амоксициллин/клавуланат не оказывал такого эффекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Пародонтология. Национальное руководство / под ред. чл.-корр. РАН, проф. О.О. Янушевича, проф. Л.А. Дмитриевой. Москва: ГЭОТАР-Медиа. Изд. 2. 2018:752. [Parodontologija. Nacional'noe rukovodstvo / pod red. chl.-korr. RAN, prof. O.O. Janushevich, prof. L.A. Dmitriyev. Moscow: GEOTAR-Media. Izd. 2. 2018:752. (In Russ.)]. <http://www.geotar.ru/lots/NF0008226.html>.
2. M. Sanz, D. Beighton, M. A. Curtis, J. A. Cury, I. Dige, H. Dommisch, R. Ellwood, R. A. Giacaman, D. Herrera, M. C. Herzberg et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 2017;44,18:5–11. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcpe.12682>

3. Ковалевский А. М., Ушакова А. В., Ковалевский В. А., Прожерина Е. Ю. Бактериальная биопленка пародонтальных карманов: переосмысление опыта пародонтологии. Пародонтология. 2018;23,2(87):18–21. [A. M. Kovalevskiy, A. V. Ushakova, V. A. Kovalevskiy, E.Y. Progerina Bacterial biofilm of periodontal pockets: the revision of periodontology experience. Parodontologiya. 2018;23,2(87):18–21. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25636/PMP1.2018.2.3>.
4. S.K.Hake, D.H.Meyer, P.M. Fives-Taylor. Болезни пародонта / Микробиология и иммунология для стоматологов / под ред. R. J. Lamont, R. A. Burne, M. S. Lantz, D. J. LeBlank. Москва: Практическая медицина. 2010:297–339. [S. K. Hake, D. H. Meyer, P. M. Fives-Taylor. Bolezni parodonta / In: Oral microbiology and immunology. Ed. by R. J. Lamont, R. A. Burne, M. S. Lantz, D. J. LeBlank. M.: Practical medicine. 2010:297–339. (In Russ.)]. http://static-eu.insales.ru/files/1/5048/1455032/original/Микробиология_и_иммунология_для_стоматологов.pdf

5. Царев В. Н., Ипполитов Е. В., Николаева Е. Н. Распространение генетических маркеров резистентности к антибиотикам у биопленко-формирующих штаммов облигатных и факультативных анаэробов. Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2017;2:74-80. [V. N. Tsarev, E. V. Ippolitov, E. N. Nikolaeva. Distribution of genetic markers of antibiotic resistance in biofilm-forming strains of obligate and facultative anaerobes. Zh Microbiol. (Moscow). 2017;2:74-80. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-2-74-80>

6. Зуева А. О., Чувилин В. И., Подпорин М. С., Лабазанов А. А. и др. Микробиологическая оценка фторхинолонов II и III поколений для профилактики и лечения инфекционных осложнений хирургических операций. Бактериология. 2017;4(2):50–54. [A. O. Zueva, V. I. Chuvilkin, M. S. Podporin, A. A. Labazanov et al. Microbiological evaluation of II and III generation quinolones in prevention and treatment of inflammatory complication in oral surgery. Bacteriology. 2017;4(2):50–54. (In Russ.)]. <http://www.phdynasty.ru/upload/medialibrary/eab/eab7418fe42f0eae8347e20ad79db69.pdf>

7. S. S. Socransky, A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith, R. L. Kent Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25(2):134–144. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9495612>

8. N. J. Kassebaum, E. Bernabé, M. Dahiya, B. Bhandari, C. J. Murray, W. Marcenes. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: A systematic review and meta-regression. J. Dent. Res. 2014;93:1045–1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>

9. Закиров Т. В., Ворошилина Е. С., Брусницына И. В., Иощенко Е. С., Ожгихина Н. В. Оценка эффективности основных системных антибиотиков на первом этапе лечения генерализованного агрессивного пародонтита. Пародонтология. 2019;24;3:213–221. [T. V. Zakirov, E. S. Voro-

shilina, I. V. Brusnicyna, E. S. Ioshhenko, N. V. Ozhgihina. Evaluation of the effectiveness of the main systemic antibiotics at the first stage of treatment of generalized aggressive periodontitis. Parodontologiya. 2019;24;3:213–221. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2019-24-3-213-221>

10. Царев В. Н., Атрушкевич В. Г., Ипполитов Е. В., Подпорин М. С. Сравнительный анализ антимикробной активности пародонтальных антисептиков с использованием автоматизированной системы контроля роста микроорганизмов в режиме реального времени. Пародонтология. 2017;22,1(82):4–10. [V. N. Tsarev, V. G. Atrushkevich, E. V. Ippolitov, M. S. Podporin. Comparative analysis of periodontal antiseptic antimicrobial activity using the automated control of microbial growth in real-time. Periodontology. 2017;22,1(82):4–10/ (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=29233663>

11. Ипполитов Е. В., Царев В. Н., Арутюнов С. Д., Степанов А. Г., Подпорин М. С., Шишова В. Г., Малазония Т. Т. Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред in vitro. Патент на изобретение RUS 2619169 20.11.2015. [E. V. Ippolitov, V. N. Tsarev, S. D. Arutjunov, A. G. Stepanov, M. S. Podporin, V. G. Shishova, T. T. Malazonija. Method for forming of combined periodontal anaerobic bacteria biofilm under fluid conditions in vitro. Patent na izobretenie RUS 2619169 20.11.2015. (In Russ.)]. https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002619169_20170512_C1_RU/

Конфликт интересов:

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов/

Conflict of interests:

The authors declare no conflict of interests

Поступила/Article received 02.08.2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Царев Виктор Николаевич, д.м.н., профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института (НИМСИ), заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

nikola777@rambler.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Tsarev Viktor N., DSc, Professor, Director Of Scientific Research Medical-Dental Institute, chief of the department of microbiology, virology, immunology of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Yevdokimov» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Ушаков Рафаэль Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой стоматологии Российской медицинской академии непрерывного последипломного образования, Москва, Российская Федерация

rafaelu@mail.ru

ORCID: 0000-0003-4821-1758

Ushakov Rafael V., DSc, Professor, Chief of the department of dentistry, Russian Medical Academy of Continuing Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

Ипполитов Евгений Валерьевич, д.м.н., профессор, зав. отделом фундаментальных исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

ippo@bk.ru

ORCID: 0000-0003-1737-0887

Ippolitov Evgenii V., DSc, professor, Head of Fundamental Research Department, Research Institute of Medicine and Dentistry of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Yevdokimov» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

podporin.mikhail@yandex.ru

ORCID: 0000-0003-1737-0887

Podporin Mikhail S., Junior reserch associate, laboratory of Molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Yevdokimov» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Нуреев Надир Нурмагомедович, старший лаборант, кафедра стоматологии, Российской медицинской академии непрерывного последипломного образования, Москва, Российская Федерация

Nuruev001@bk.ru

ORCID: 0000-0002-4417-4788

Nuruev Nadir N., senior assistant, Department of dentistry, Russian Medical Academy of Continuing Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation