

# Синергетическая комбинация амфотерицина В и антисептика мирамистина может быть эффективной в борьбе с лекарственно-устойчивыми изолятами грибов рода *Candida*

\*М. А. КИРСАНОВА, Ю. Л. КРИВОРУТЧЕНКО,  
О. Н. ПОСТНИКОВА, И. Б. АНДРОНОВСКАЯ

Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского, Симферополь, Россия

## Synergistic Combination of Amphotericin B and Antiseptic Miramistin May Be Effective in the Fight Against Drug-Resistant Isolates of *Candida* Fungi

\*MARINA A. KIRSANOVA, YURI L. KRIVORUTCHENKO,  
OLGA N. POSTNIKOVA, IRINA B. ANDRONOVSKAJA

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, Simferopol, Russia

### Резюме

Создание синергетических комбинаций противогрибковых и антисептических средств можно рассматривать как одну из перспективных стратегий снижения распространения лекарственной устойчивости у патогенных грибов.

**Цель.** Изучение синергетической антифунгальной активности амфотерицина В (АМВ) и антисептика мирамистина (МСТ) при их комбинированном применении для борьбы с грибами рода *Candida*, устойчивыми к лекарственным препаратам.

**Материал и методы.** Исследовали устойчивый к АМВ штамм *C. albicans* (минимальная подавляющая концентрация (МПК) 3,1 мкг/мл), чувствительный к МСТ, два изолята *C. albicans* с различной устойчивостью к МСТ и АМВ (МПК 1,6–6,3 мкг/мл) и один МСТ-устойчивый изолят *C. lusitaniae*, чувствительный к АМВ (МПК 0,4 мкг/мл). Чувствительность изолятов к АМВ и МСТ по отдельности определяли с помощью метода микроразведений в бульоне и количественного суспензионного метода определения скорости инактивации грибов, соответственно. Индивидуальную противокандидозную активность препаратов сравнивали с активностью комбинаций 0,001% МСТ с АМВ в концентрациях 10 или 50 мкг/мл с помощью определения скорости инактивации грибов.

**Результаты.** Значительное снижение роста всех изолятов, обработанных обеими комбинациями МСТ и АМВ, по сравнению с обработкой отдельными препаратами, наблюдалось в каждом изученном временном интервале (15–60 мин). В составе комбинации МСТ проявлял значительный синергизм с АМВ в сублетальной концентрации 10 мкг/мл, действуя против всех изолятов. Обработка грибов комбинацией МСТ с АМВ в концентрации 50 мкг/мл вызывала полную инактивацию всех изолятов после 30-минутной инкубации. В этих условиях АМВ проявлял антифунгальную активность, действуя отдельно.

**Заключение.** Полученные результаты предполагают возможное эффективное использование мирамистина в комбинации с амфотерицином В против изолятов грибов рода *Candida*, имеющих множественную лекарственную устойчивость.

**Ключевые слова:** *Candida spp.*; лекарственная устойчивость; антисептик; мирамистин; синергия; амфотерицин В

**Для цитирования:** Кирсанова М. А., Криворутченко Ю. Л., Постникова О. Н., Андроновская И. Б. Синергетическая комбинация амфотерицина В и антисептика мирамистина может быть эффективной в борьбе с лекарственно-устойчивыми изолятами грибов рода *Candida*. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 9–10: 25–34. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-25-34>.

### Abstract

Creation of synergistic combinations of antifungal and antiseptic agents can be considered as one of the promising strategies for reducing the spread of drug resistance in pathogenic fungi.

**Aim.** The aim of this work was to study the synergistic antifungal activity of amphotericin B (AMB) and antiseptic miramistin (MST) in their combined use to fight against drug-resistant *Candida* isolates.

**Material and methods.** One AMB-resistant *C.albicans* strain (MIC 3.1 µg/ml), sensitive to MST, two isolates of *C.albicans* with different level of resistance to MST and AMB (MIC 1.6–6.3 µg/ml), and one MST-resistant *C.lusitaniae* isolate susceptible to AMB (MIC 0.4 µg/ml) were studied. Isolates' susceptibility to AMB and MST alone was determined by broth micro-dilution method and time–kill assay, respectively. Individual anti-candida activity of test combinations of 0.001% MST with AMB in 10 or 50 µg/ml concentrations was studied using quantitative time–kill assay.

**Results.** A significant decrease in the growth of all the isolates treated with both test combinations of MST and AMB in comparison with individual medication treatment was observed at each time interval studied (15–60 minutes). As part of the combination, MST exhibited significant synergy with AMB in sublethal concentration of 10 µg/ml against all the isolates. Treatment of the fungi with a combination of MST with AMB in 50 µg/ml concentration caused complete inactivation of all the isolates after 30 minutes. Under these conditions, AMB exhibited separate antifungal activity.

**Conclusion.** These findings suggest the possible effective use of miramistin in combination with amphotericin B against multi-drug resistant isolates of the genus *Candida*.

**Keywords:** *Candida spp.*; drug resistance; antiseptic miramistin; synergy; amphotericin B

**For citation:** Kirsanova M.A., Krivorutchenko Yu.L., Postnikova O.N., Andronovskaya I.B. Synergistic combination of amphotericin b and antiseptic miramistin may be effective in the fight against drug-resistant isolates of *Candida* fungi. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 25–34. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-25-34>.

## Введение

Растущее распространение грибковых инфекций, в том числе с тяжёлым течением, определяется ростом числа лиц из групп риска, ограниченным арсеналом антифунгальных средств и развитием устойчивости микроорганизмов к противогрибковым препаратам. Грибы рода *Candida* — наиболее частая причина микозов у иммунокомпрометированных лиц. Среди них увеличивается распространение устойчивости к антисептикам и антимикотикам классов азолов, эхинокандинов и полиенов, увеличивается доля мультирезистентных изолятов грибов, устойчивых одновременно к препаратам двух и более классов [1–3].

Основными путями решения проблемы распространения резистентности к противогрибковым препаратам является скрининг, направленный на выявление новых антифунгальных веществ, к которым грибы ещё не устойчивы, а также разработка способов преодоления уже сформировавшейся лекарственной устойчивости к применяемым препаратам. Основными путями реализации второго подхода считаются проведение комбинированной химиотерапии и создание композитных противогрибковых средств, повышающих чувствительность возбудителей к отдельным компонентам композиции [4, 5]. Целью комбинированной терапии является достижение синергетического взаимодействия между двумя или большим числом лекарственных веществ, при котором станет возможным продление срока службы применяемых сегодня препаратов за счёт замедления процессов развития микробной резистентности к каждому из компонентов лекарственной смеси. Считается, что применение синергетической комбинации противомикробных средств может повысить активность отдельных препаратов, входящих в состав смеси, и снизить их токсическое действие за счёт уменьшения эф-

фективной терапевтической дозы [6]. В отношении поиска средств для комбинированной терапии микозов, вызываемых резистентными микроорганизмами, большое внимание уделяется био-плёнкам, усиливающим способность грибов к формированию лекарственной устойчивости.

В частности, было показано, что комбинация антимикотика флуконазола с производным Н (1,4-дигидропиридин-2,3,5-трикарбоксилат), являющимся промежуточным продуктом синтеза блокатора кальциевых каналов нилвадипина, более эффективно разрушает биоплёнку *Candida albicans*, чем каждое из этих веществ, взятое в индивидуальной форме (по отдельности) [7]. Комбинированное применение флуконазола и кверцетина (пищевого флавоноида с антиоксидантной активностью, подавляющего образование биоплёнок) продемонстрировало синергетический эффект в отношении биоплёнкообразующих и планктонных культур *C.albicans*, устойчивых к флуконазолу. Эффект был связан со снижением адгезивности и гидрофобности грибов, ингибированием их способности переходить из дрожжевой формы в гифальную. Комбинированная терапия этими веществами экспериментального кандидозного вульвовагинита мышей приводила к ускоренному снижению грибковой колонизации тканей и исчезновению симптомов заболевания [8].

Для лечения и профилактики грибковых поражений используются различные комбинации антисептиков, а также антисептиков и антимикотиков. Изучение комбинированного и индивидуального воздействия антисептиков хлоргексидина глюконата, цетилпиридиний хлорида и триклозана на грибы с разной чувствительностью к азолам показало, что комбинированное применение антисептиков может давать синергетический эффект в отношении *C.tropicalis* и *C.krusei*, устойчивых к флуконазолу [9, 10].

Сведения о возможности достижения синергетического эффекта при комбинированном при-

менении антисептиков и антимикотиков достаточно противоречивы. Так, сообщалось об антагонизме антисептика хлоргексидина и полиенового антимикотика нистатина, выявленном при изучении комбинированного действия препаратов на *C.albicans* ATCC 18804. При применении этих веществ в виде смеси их минимальные ингибирующие концентрации (МПК) не изменялись по сравнению с МПК каждого препарата, взятого в отдельности. Когда же нистатин и хлоргексидин вводили один после другого через разные интервалы времени, значения их МПК становились больше, чем у тех же веществ в индивидуальной форме. Комбинации этих веществ ингибировали образование биоплёнок грибами слабее, чем индивидуальные препараты. Анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии показал, что в смесях оба эти вещества интенсивно деградировали [11]. Вместе с тем сообщалось, что комбинированное применение 2% хлоргексидина глюконата и 1% антимикотика клотримазола при промывании зубных каналов, инокулированных *C.albicans*, усиливало антифунгальное действие препаратов [12].

Мирамистин (бензил диметил [3-(миристоиламино) пропил] аммоний хлорид, моногидрат) широко используется в Российской Федерации в качестве дезинфектанта и антисептика для местного применения. Этот хлорсодержащий катионный детергент, относящийся к четвертичным аммониевым соединениям, обладает широким спектром противомикробной активности. В стандартных тестах было показано, что мирамистин обладает выраженным бактерицидным эффектом в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 209p и *Escherichia coli* (CDC F-50). Было установлено, что МПК и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) мирамистина для стафилококков составляли 8 мкг/мл и 16 мкг/мл, а для кишечной палочки — 32 и 128 мкг/мл, соответственно. В суспензионном тесте мирамистин снижал концентрацию жизнеспособных клеток *S.aureus* на 6 log<sub>10</sub>, а *E.coli* — на 4,5 log<sub>10</sub> [13]. При короткой 30-минутной инкубации *S.aureus*, *E.coli* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии антисептика мирамистин полностью подавлял активность бактерий в концентрациях 0,003, 0,0125 и 0,05%, соответственно [14]. Мирамистин демонстрировал и выраженную антифунгальную активность. Так, в экспериментах *in vitro* он одинаково эффективно подавлял рост грибов (МПК для дрожжевых грибов разных видов 1,7–3,1 мкг/мл) как устойчивых, так и чувствительных к флуконазолу и итраконазолу. В опытах *in vivo* введение мирамистина в дозе 16 мг/кг в гемоцель личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*, заражённых *C.albicans* или *Aspergillus fumigatus*, значительно увеличивало выживаемость личинок [2].

Впервые для лечения инвазивного кандидоза с использованием синергетического эффекта препаратов была применена комбинация антимикотиков амфотерицина В (АМВ) и флуцитозина. Монотерапия флуцитозином обычно приводит к быстрому развитию лекарственной устойчивости. Его комбинированное применение вместе с АМВ позволило замедлить развитие лекарственной устойчивости к флуцитозину и снизить число вызываемых им осложнений [15]. Комбинированное использование этих препаратов для лечения криптококкоза привело к увеличению частоты выздоровлений и клинических ремиссий у больных по сравнению с монотерапией амфотерицином В [16].

АМВ — полиеновый антибиотик, применяемый для лечения генерализованных микозов. Он обладает синергетическим действием на грибы рода *Candida* при комбинированном применении с полисахаридами хитозана, аспирином, лактоферрином и эфирными маслами [17–19]. В частности, было установлено, что компоненты эфирных масел цитраль и циннамальдегид из растения пальмароза (*Symbopogon martini*) могут подавлять рост антимикотико-резистентных изолятов *C.albicans*. Их ингибиторная активность (МПК<sub>50</sub> 90–100 мкг/мл) превосходила активность азолов и АМВ в отношении устойчивых к ним грибов. Исследованные эфирные масла (особенно эвгенол) проявляли значительную синергетическую активность с АМВ и флуконазолом [20]. Было установлено синергетическое взаимодействие АМВ с маслом чайного дерева. Фунгицидный эффект в отношении *C.albicans* достигался при использовании комбинации АМВ с маслом чайного дерева в концентрациях 0,25 и 0,08 мкг/мл, соответственно [21]. Синергетический антифунгальный эффект был обнаружен и при комбинировании АМВ с пептидом иммунной системы лактоферрином. Комбинированное использование рекомбинантного лактоферрина (талактоферрина) с АМВ или флуконазолом выявило синергетическое подавляющее воздействие веществ на формирование биоплёнок *C.albicans* [22].

Сравнение ингибирования роста грибов рода *Fusarium* различными антимикотиками и антисептиком хлоргексидином показало, что антифунгальный эффект АМВ по силе близок к действию хлоргексидина. При исследовании методом микроразведений и 48-часовой инкубации грибов с препаратами хлоргексидин был активен против всех изолятов в концентрации 8–32 мкг/мл. МПК амфотерицина В в этих условиях колебалась в пределах 0,5–4,0 мкг/мл [23].

Учитывая широкое применение мирамистина и амфотерицина В, сопровождающееся формированием у грибов лекарственной устойчивости, а также отсутствие сведений об их комбинированном противогрибковом действии, представ-

лялось интересным исследование совместного воздействия этих препаратов на патогенные дрожжеподобные грибы.

Цель работы — изучение синергетической антифунгальной активности АМВ и мирамистина при их комбинированном применении для борьбы с изолятами грибов рода *Candida*, имеющими устойчивость к одному из указанных веществ или к обоим препаратам.

## Материал и методы

В работе использовали штамм *C.albicans* ССМ 885, полученный в ГИСК им. Л. А. Тарасевича (г. Москва, Россия), и изоляты грибов, выделенных от больных, — *C.albicans* №71, *C.albicans* №59 и *Candida lusitanae* №69. Идентификацию грибов проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам с использованием тест-системы «Аухосолор 2» (BioRad, Франция).

Для исследований был использован мирамистин, полученный на предприятии КНВМП «ИСНА» (Киев, Украина), и антимикотик амфотерицин В (Bristol-Myers Squibb, Франция).

Чувствительность грибов к мирамистину определяли в соответствии с рекомендациями Европейского Стандарта количественного суспензионного теста по скорости инактивации грибов [24]. Для определения чувствительности грибов к мирамистину использовали инокуляты грибов с концентрацией микроорганизмов  $5 \times 10^6$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Для их получения грибы выращивали на твёрдой среде Сабуро (НПО «Микроген», Махачкала, Россия) в течение 48 ч при 28°C. Затем микробные колонии смывали с поверхности среды стерильным изотоническим раствором хлорида натрия, тщательно суспендировали и доводили до указанной конечной концентрации. Инокуляты по 1 мл вносили в 9 мл 0,01% раствора мирамистина (концентрация в препарате Окомистин) в дистиллированной воде. В контроле инокуляты в той же пропорции вносили в дистиллированную воду. Полученные смеси инкубировали в ротационном термостате при 37°C и скорости перемешивания 100 оборотов в минуту. Образцы смесей по 0,1 мл отбирали через 15, 30 и 60 мин инкубации. Их высевали на агар Сабуро и инкубировали 48 ч при 37°C, после чего подсчитывали количество выросших колоний. Выживаемость грибов после контакта с мирамистином определяли в процентах по отношению к количеству колоний в контроле, которое принимали за 100%. Устойчивыми к мирамистину считали грибы, имевшие выживаемость более 15%, 5% и 0% после 15, 30 и 60 мин инкубации, соответственно, в присутствии 0,01% антисептика.

Чувствительность грибов к амфотерицину В определяли с помощью модифицированного метода серийных разведений на среде RPMI-1640. По технике постановки он был близок методике, рекомендованной документом NCCLS M23-A (США) для определения МПК амфотерицина В и других антимикотиков в отношении дрожжеподобных грибов [25]. Для определения МПК АМВ использовали стерильные 96-луночные пластиковые планшеты (ПО «Ленмедполимер», Россия) и среду RPMI-1640 (ООО «БилоТ», Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 3% лошадиной сыворотки (ППБП, Харьков, Украина). Для получения инокулята грибов нужной концентрации их выращивали на твёрдой среде Сабуро в течение 48 ч при 28°C. Затем производили смыв культуры микроорганизмов с поверхности агаризованной среды стерильным изотоническим раствором. Полученную взвесь грибов разводили на среде RPMI-1640 до концентрации клеток  $2,5-1,5 \times 10^3$  КОЕ/мл. Этот инокулят в объёме 0,01 мл добавляли в лунки планшет, содержащие по 0,1 мл серийных двукратных разведений антимикотика в среде RPMI-1640 с сывороткой. Планшеты инкубировали 20 ч при 28°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем из

каждой лунки брали по 0,1 мл содержимого и наносили эти пробы на поверхность среды Сабуро в чашках Петри без АМВ. Далее в течение 48 ч проводили инкубацию при 28°C, после чего производили учёт роста грибов. МПК определяли как наименьшую концентрацию антимикотика, вызывавшую полное подавление роста грибов. Чувствительными к амфотерицину В считали изоляты грибов, для которых МПК была  $\leq 1,0$  мкг/мл, устойчивыми — изоляты, для которых МПК была  $\geq 2,0$  мкг/мл. Грибы, для которых значения МПК были больше 1,0 мкг/мл, но меньше 2,0 мкг/мл, считали умеренно чувствительными.

Для изучения сочетанного действия мирамистина и амфотерецина В готовили стандартные инокуляты грибов с концентрацией  $5 \times 10^6$  КОЕ/мл как описано выше. Инокуляты по 1 мл вносили в 9 мл водных растворов изучавшихся препаратов в концентрациях: мирамистина — 0,001%, АМВ — 10 мкг/мл или 50 мкг/мл. Грибы инкубировали или с указанными разведениями препаратов, взятых по отдельности, или со смесями препаратов: мирамистин 0,001% + АМВ — 10 мкг/мл или мирамистин 0,001% + АМВ — 50 мкг/мл. В контроле инокуляты в той же пропорции вносили в дистиллированную воду. Инкубацию грибов в присутствии препаратов проводили в ротационном термостате при 30°C и скорости перемешивания 100 оборотов в минуту. Через 15, 30 и 60 мин инкубации проводили отбор образцов смесей для учёта времени и степени инактивации грибов исследуемыми препаратами при их индивидуальном или комбинированном применении. Для этого образцы смесей по 10 мкл вносили в 190 мкл жидкой среды Сабуро (200-кратное разведение) в лунки стерильных 96-луночных плоскодонных пластиковых планшет. Каждый образец исследовался в трёх повторах. Далее планшеты инкубировали в планшетном спектрофотометре Мультискан FC (Thermo scientific, Финляндия) при температуре 30°C, 48 ч. Результаты учитывались по изменению оптической плотности (D) при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали инкубацию грибов только с мирамистином, только с амфотерицином В, только со стерильной водой в течение указанных выше временных интервалов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-теста Стьюдента для непарных выборок, используя комплект программ Microsoft Office Excel 5,0. Определяли средние значения и ошибки средних значений ( $M \pm m$ ). Достоверными считали различия при значениях  $p < 0,05$ .

## Результаты

Результаты исследования чувствительности к мирамистину и АМВ трёх изолятов грибов рода *Candida* и штамма *C.albicans* ССМ 885, представлены в табл. 1.

Грибы имели разную чувствительность к мирамистину и АМВ. Штамм *C.albicans* ССМ 885 был устойчив только к АМВ, изолят *C.lusitanae* №69 — только к мирамистину. Изолят *C.albicans* №71 был чувствителен к мирамистину и умеренно чувствителен к АМВ. Изолят *C.albicans* №59 был устойчив к обоим препаратам. На этих культурах грибов было изучено комбинированное действие 0,001% мирамистина и АМВ в концентрациях 10 и 50 мкг/мл.

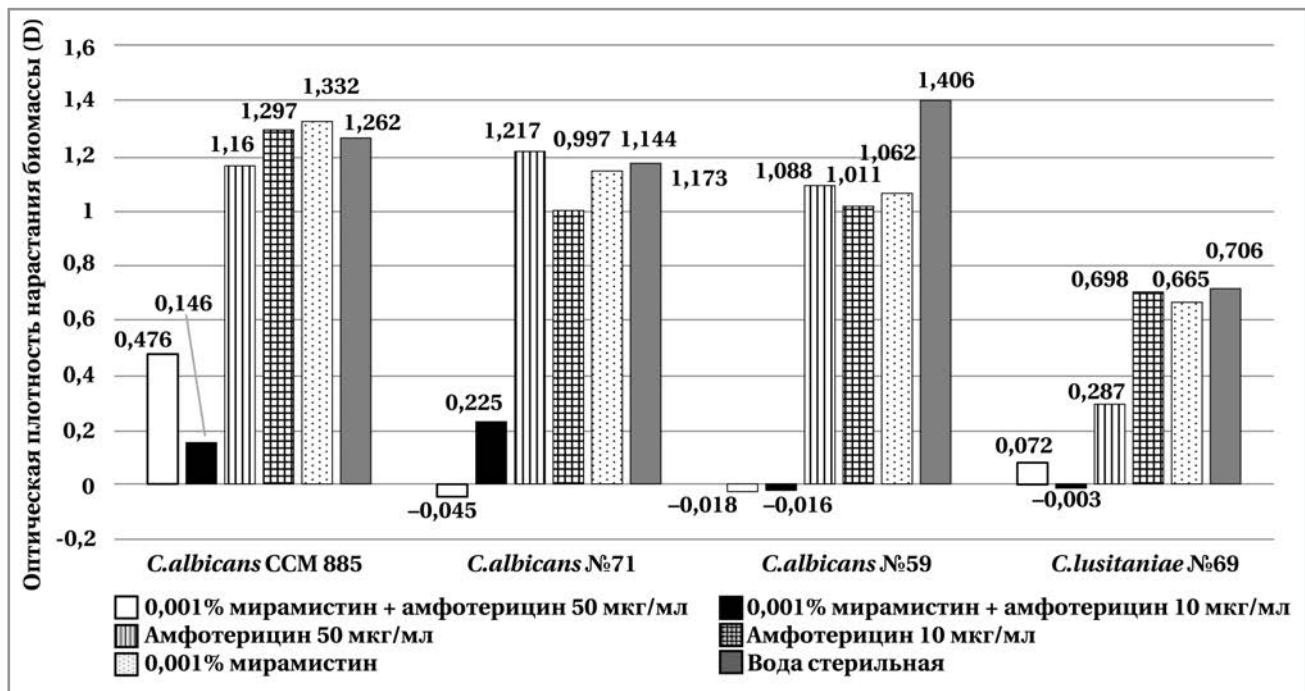
Результаты изучения индивидуального и комбинированного действия мирамистина и АМВ на дрожжеподобные грибы при 15-минутной инкубации представлены на рис. 1.

При 15-минутном комбинированном воздействии мирамистина и АМВ в обеих концентрациях

**Таблица 1. Чувствительность грибов рода *Candida* к 0,01% раствору мирамистина и амфотерицину В**  
**Table 1. Sensitivity of fungi of *Candida* genus to 0.01% solution of miramistin and amphotericin B**

Грибы	Мирамистин		Амфотерицин В	
	Выживаемость после 15, 30 и 60 мин инкубации, %		МПК, мкг/мл	
<i>C.albicans</i> CCM 885	5, 2 и 0	Ч	3,12	У
<i>C.albicans</i> №71	16, 2 и 0	Ч	1,56	УЧ
<i>C.albicans</i> №59	50, 40 и 20	У	6,25	У
<i>C.lusitaniae</i> №69	17, 14 и 6	У	0,39	Ч

**Примечание.** Ч — чувствительный; У — устойчивый; УЧ — умеренно-чувствительный.  
**Note.** Ч — sensitive; У — resistant; УЧ — moderately sensitive.



**Рис. 1. Комбинированное и индивидуальное действие мирамистина и амфотерицина В на рост дрожжеподобных грибов при инкубации в течение 15 мин.**

**Fig. 1. Combined and individual effect of miramistin and amphotericin B on the growth of yeast-like fungi during 15-minute incubation.**

происходило полное подавление роста грибов *C.albicans* №59, устойчивых к обоим препаратам по отдельности, и отсутствовало подавление роста *C.albicans* CCM885. При комбинированном использовании мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл наблюдался слабый рост (12–19% от роста в контроле с водой) чувствительных к мирамистину *C.albicans* CCM885 и *C.albicans* №71, устойчивых и умеренно чувствительных к АМВ, соответственно. При комбинированном применении препаратов подавлялся рост устойчивых к мирамистину *C.albicans* №59 и *C.lusitaniae* №69 с разной чувствительностью к АМВ. Сочетанное применение мирамистина с АМВ в концентрации 50 мкг/мл полностью подавляло рост грибов *C.albicans* №71, чувствительных к обоим веществам, и устойчивых к ним *C.albicans* №59. Наблюдался умеренный рост *C.albicans* CCM885 и слабый рост (10% от контроля) *C.lusitaniae* №69, имевших про-

тивоволожные профили индивидуальной чувствительности к препаратам. При 15-минутной инкубации каждого из грибов с каждым препаратом, взятым в отдельности, подавления роста не наблюдалось.

Результаты изучения комбинированного действия мирамистина и АМВ на исследованные грибы при инкубации в течение 30 минут представлены на рис. 2.

30-минутная инкубация при комбинированном применении мирамистина и АМВ в концентрации 50 мкг/мл приводила к полному подавлению роста всех грибов. При воздействии обоими комбинациями препаратов происходило полное подавление роста *C.albicans* №59 и изолята *C.lusitaniae* №69, устойчивого к мирамистину и чувствительного к АМВ. При комбинированном применении мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл наблюдался слабый (2% от контроля)

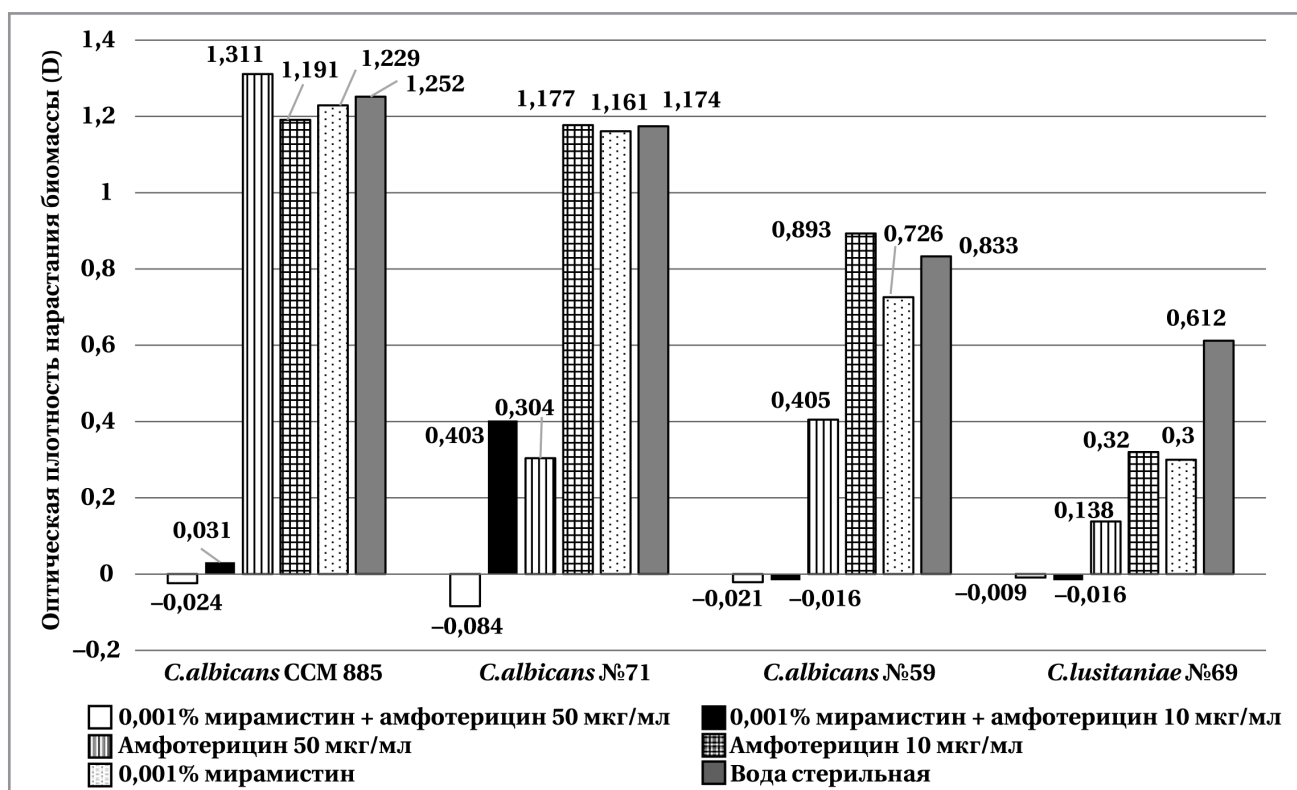


Рис. 2. Комбинированное и индивидуальное действие мирамистина и амфотерицина В на рост дрожжеподобных грибов после инкубации в течение 30 мин.

Fig. 2. Combined and individual effect of miramistin and amphotericin B on the growth of yeast-like fungi during 30-minute incubation.

или умеренный (34% от контроля) рост грибов *C.albicans* CCM885 и *C.albicans* №71, соответственно. 30-минутная инкубация грибов с индивидуальными препаратами не приводила к значимому подавлению их роста. Однако у грибов всех клинических изолятов наблюдалось 2–4-кратное снижение скорости накопления биомассы при их инкубации с АМВ в концентрации 50 мкг/мл.

Результаты изучения комбинированного действия мирамистина и АМВ на исследованные грибы при инкубации в течение 60 мин представлены на рис. 3.

После 1-часовой инкубации грибов при комбинированном применении мирамистина и АМВ в обеих концентрациях происходило полное подавление роста всех исследованных культур. При инкубации микроорганизмов в присутствии одного из препаратов — мирамистина или АМВ в концентрации 10 мкг/мл существенного подавления роста грибов не происходило. Однако инкубация грибов изолята *C.albicans* №59 в присутствии 50 мкг/мл АМВ без мирамистина приводила к полному подавлению их жизнедеятельности. Остальные культуры грибов выживали, но демонстрировали менее значительное накопление биомассы (в 2–4 раза) по сравнению с контролем при инкубации с водой.

Обобщённые данные, демонстрирующие зависимость от времени инкубации усреднённой

чувствительности грибов к 0,001% мирамистину и АМВ в обеих концентрациях при комбинированном и отдельном их применении, представлены в табл. 2.

Сравнение средних значений оптической плотности биомассы грибов, выросших после инкубации с препаратами в течение всех интервалов времени показало, что только комбинированное использование 0,001% мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл подавляло рост грибов достоверно сильнее (в 9–23 раза), чем в случаях инкубации с каждым индивидуальным препаратом. При отдельной инкубации микроорганизмов с препаратами показатели интенсивности роста грибов в опытах не отличались от показателей в контроле.

При 15-минутной инкубации и использовании АМФ в концентрации 50 мкг/мл комбинированное применение препаратов подавляло рост грибов достоверно сильнее (в 8–9 раз), чем в случаях инкубации с отдельными индивидуальными препаратами. Положение изменялось при более длительном применении АМВ в концентрации 50 мкг/мл. При 30-минутной и 1-часовой инкубации комбинированное использование препаратов по-прежнему ослабляло рост грибов сильнее, чем при изолированном применении веществ. Вместе с тем, различие в антифунгальном действии АМВ в концентрации 50 мкг/мл при его от-

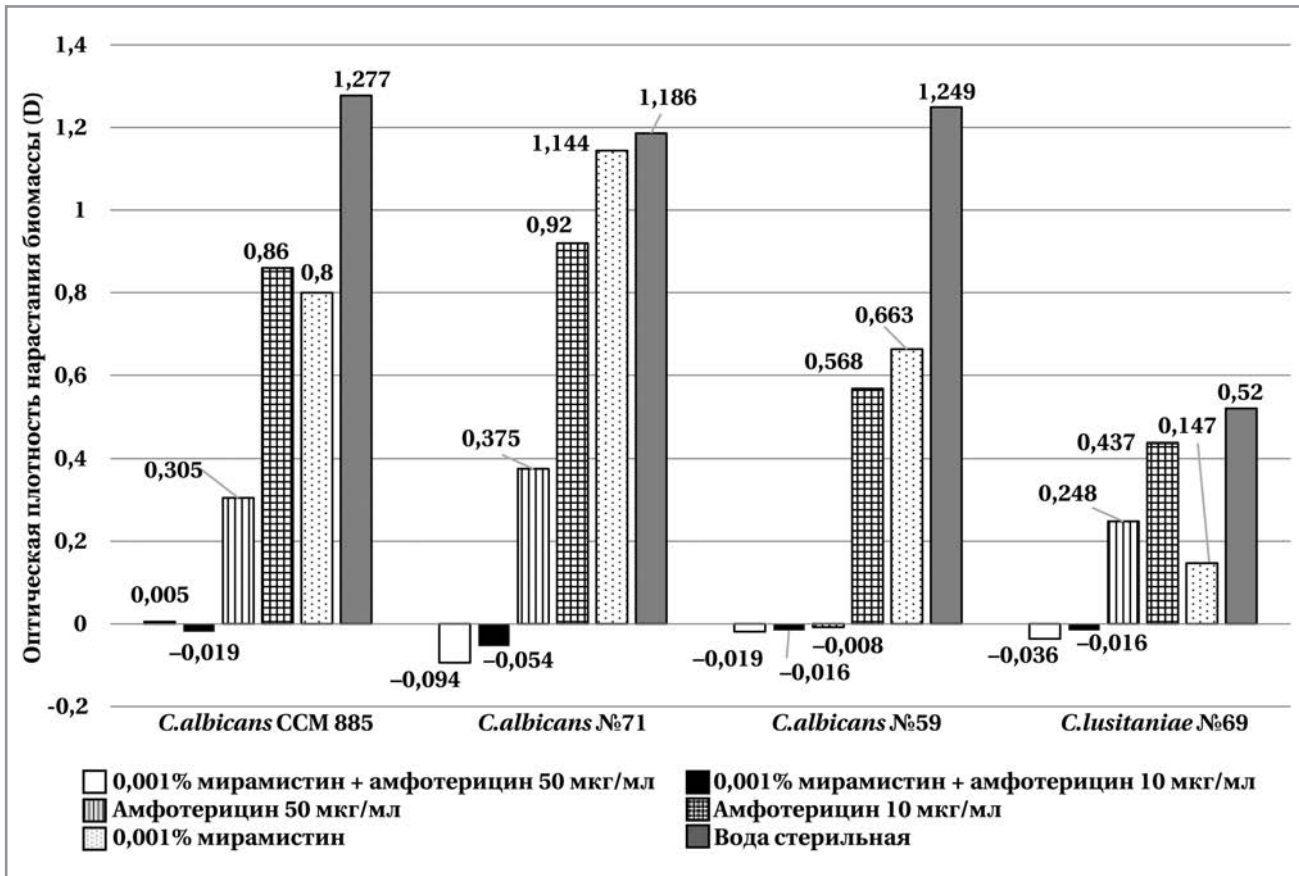


Рис. 3. Комбинированное и индивидуальное действие мирамистина и амфотерицина В на рост дрожжеподобных грибов после инкубации в течение 60 мин.

Fig. 3. Combined and individual effect of miramistin and amphotericin B on the growth of yeast-like fungi during 60-minute incubation.

Таблица 2. Зависимость комбинированного и индивидуального воздействия мирамистина и амфотерицина В на грибы рода *Candida* от времени инкубации

Table 2. Dependence of combined and individual effects of miramistin and amphotericin B on fungi of *Candida* genus on the incubation time

Время инкубации, мин	Средние значения ( $M \pm m$ ), достоверность ( $p$ )	Изменения оптической плотности (D) биомассы грибов, выросших после инкубации с препаратами					
		МСТ 0,001% + АМВ 50 мг/л	МСТ 0,001% + АМВ 10 мг/л	АМВ 50 мг/л	АМВ 10 мг/л	МСТ 0,001%	вода
15	$M \pm m$	0,12±0,12	0,09±0,06	0,94±0,22	1,00±0,12	1,05±0,14	1,14±0,15
	$p$ , вода	$p=0,002^*$	$p<0,001^*$	$p=0,48$	$p=0,51$	$p=0,69$	—
	$p$ , АМВ	$p=0,017^*$	$p<0,001^*$	—	—	—	—
	$p$ , МСТ	$p<0,001^*$	$p<0,001^*$	—	—	—	—
30	$M \pm m$	-0,03±0,02	0,10±0,10	0,54±0,26	0,89±0,20	0,87±0,22	0,97±0,15
	$p$ , вода	$p=0,007^*$	$p=0,003^*$	$p=0,205$	$p=0,782$	$p=0,731$	—
	$p$ , АМВ	$p=0,117$	$p=0,013^*$	—	—	—	—
	$p$ , МСТ	$p=0,027^*$	$p=0,020^*$	—	—	—	—
60	$M \pm m$	-0,04±0,02	-0,03±0,01	0,23±0,08	0,69±0,12	0,69±0,21	1,06±0,18
	$p$ , вода	$p=0,009^*$	$p=0,009^*$	$p=0,006^*$	$p=0,142$	$p=0,226$	—
	$p$ , АМВ	$p=0,054$	$p=0,008^*$	—	—	—	—
	$p$ , МСТ	$p=0,040^*$	$p=0,041^*$	—	—	—	—

Примечание. МСТ — мирамистин; АМВ — амфотерицин В; \* — статистически достоверные различия.

Note. МСТ — miramistin; АМВ — amphotericin B; \* — statistically significant differences.

дельном и комбинированном с мирамистином применении становилось недостоверным. В этой концентрации АМВ при 1-часовой инкубации ак-

тивно проявлял индивидуальное действие — вызывал четырёхкратное снижение накопления биомассы грибов по сравнению с контролем.

## Обсуждение

Перспективным способом противодействия формированию устойчивости грибов к антифунгальным препаратам является создание синергетических комбинаций антимикотиков и других средств. Комбинированное применение нескольких препаратов, имеющих разные механизмы действия и обладающих синергизмом, может позволить снизить терапевтические дозы и, соответственно, токсичность отдельных веществ, входящих в комбинацию [26]. Впервые синергетический эффект был достигнут при проведении комбинированной терапии инвазивных микозов флуцитозином и АМВ. Эффект проявился в снижении устойчивости грибов к флуцитозину. Лечение криптококкоза с помощью такой терапии привело к увеличению частоты выздоровлений больных по сравнению с монотерапией АМВ [15, 16]. Выбор АМВ для нашего исследования был обусловлен его способностью проявлять синергизм при комбинированном применении с другими антифунгальными препаратами и тем, что он является одним из самых мощных антимикотиков. Антифунгальный эффект АМВ близок к фунгицидному действию антисептика хлоргексидина. АМВ интенсивно подавлял жизнедеятельность грибов рода *Fusarium* (МПК 0,5–4,0 мкг/мл), *Candida* (МПК 0,25–128 мкг/мл) и других типов [20, 23]. В своём исследовании мы использовали четыре культуры грибов рода *Candida*, чувствительность которых к АМВ (МПК 0,39–6,25 мкг/мл) находилась в пределах величин, установленных другими авторами. Устойчивыми к АМВ считали грибы, для которых значения МПК были  $\geq 2,0$  мкг/мл, чувствительными — с МПК  $\leq 1,0$  мкг/мл [27]. В соответствии с этими критериями грибы штамма *C.albicans* ССМ885 и изолята *C.albicans* №59 были устойчивы к АМВ, изолята *C.lusitaniae* №69 — чувствительны, а изолята *C.albicans* №71 — умеренно чувствительны (МПК 1,56 мкг/мл).

Исследование было посвящено выяснению возможности комбинированного применения АМВ и мирамистина для подавления роста грибов рода *Candida*, имеющих устойчивость к одному или обоим препаратам одновременно. На момент проведения исследований не было ясно, можно ли достичь синергетического антифунгального эффекта при комбинированном применении полиеновых антибиотиков и антисептиков, относящихся к катионным четвертичным аммониевым соединениям, к которым принадлежит мирамистин. Против этого свидетельствовали данные E. Scheibler и соавт. [11], выявивших антагонизм между полиеновым антибиотиком нистатином и катионным антисептиком хлоргексидином при изучении их комбинированного действия на грибы *C.albicans* ATCC 18804.

Для оценки антифунгального действия мирамистина в настоящей работе использовалась модифицированная методика, основанная на определении скорости инактивации грибов антисептиком в среде, не содержащей органических соединений [24]. Альтернативные способы определения воздействия антисептиков на микроорганизмы базируются на определении МПК препарата при длительной 48-часовой инкубации грибов в присутствии антисептика в среде [2, 10]. На наш взгляд, в условиях реального практического применения препарата в лечебных целях столь длительное поддержание стабильной концентрации антисептика в инфицированных средах человеческого тела является маловероятным. Поэтому было решено оценивать действие мирамистина на грибы по скорости их инактивации в воде при инкубации микроорганизмов в присутствии антисептика в пределах не более одного часа. Ранее такой подход был реализован С. Fromm-Dornieden и соавт. [14], для исследования инактивации мирамистином бактерий *S.aureus*, *E.coli* и *Paeruginosa* при 30-минутной инкубации микроорганизмов с антисептиком.

В нашей работе определение действия препаратов по скорости инактивации грибов использовали для решения двух задач: для определения устойчивости грибов к мирамистину и для выявления синергетического антифунгального действия мирамистина и АМВ. Для решения первой задачи устойчивыми к мирамистину считали грибы, имевшие выживаемость более 15, 5 и 0% после 15, 30 и 60 мин инкубации, соответственно, в присутствии 0,01% раствора мирамистина. В соответствии с этими критериями устойчивыми к антисептику были два изолята (*C.albicans* №59, *C.lusitaniae* №69), а остальные два — чувствительными. Для решения второй задачи мирамистин брали в сублетальной 0,001% концентрации, которая была в три раза меньше минимальной бактерицидной концентрации антисептика для *S.aureus*, проявившего при 30-минутной инкубации наибольшую чувствительность к препарату [14]. При этом полагали, что в случае существенного подавления жизнедеятельности грибов комбинациями мирамистина и АМВ, взятыми в сублетальных концентрациях, говорить можно будет не о простой суммации эффектов этих препаратов, а об их синергетическом действии.

Полученные результаты показали, что при комбинированном применении мирамистина и АМВ не наблюдалось того антагонистического взаимодействия катионных детергентов и полиеновых антибиотиков, которое было описано другими авторами (E. Scheibler и соавт. [11]) по результатам изучения сочетанного действия хлоргексидина и нистатина на *C.albicans*. Напротив, при комбинированном применении 0,001% ми-



раמיстина и АМВ в концентрациях 10 и 50 мкг/мл происходило угнетение роста всех изученных грибов. В случаях комбинированного использования мирамистина и АМВ в концентрации 50 мкг/мл в течение 15 мин полностью подавлялась жизнеспособность половины культур, а через 30 и более минут — всех исследованных грибов. При этом препараты, взятые отдельно (за исключением 50 мкг/мл АМВ), не подавляли роста микроорганизмов. Только АМВ в концентрации 50 мкг/мл инактивировал *C.albicans* №59 при 60-минутной инкубации. Неожиданным оказалось то, что этот изолят, устойчивый к мирамистину и АМВ в индивидуальной форме, оказался более чувствительным к их комбинированному действию, чем другие грибы, устойчивые только к одному из препаратов. В отличие от других грибов жизнеспособность *C.albicans* №59 подавлялась полностью уже при 15-минутном комбинированном действии мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл. При 30-минутном комбинированном действии, если АМВ брали в концентрации 10 мкг/мл, происходило полное подавление роста трёх культур грибов. Выживали только грибы изолята *C.albicans* №71, чувствительные к каждому отдельному препарату. Таким образом, наиболее устойчивыми к комбинированному воздействию мирамистина и АМВ оказались грибы рода *Candida*, чувствительные к обоим препаратам при их раздельном применении, а наиболее чувствительными — грибы, устойчивые к препаратам при их раздельном применении.

## Литература/References

1. Ахапкина И.Г., Глушакова А.М., Родионова Е.Н., Качалкин А.В. Эффективность антифунгальных препаратов в отношении грибов рода *Candida*, выделенных в Московском регионе. Антибиотики и химиотер. 2020; 65 (3–4): 16–22. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-16-22>. [Akhapkina I.G., Glushakova A.M., Rodionova E.N., Kachalkin A.V. The Effectiveness of antifungal agents against yeasts of *Candida* genus isolated in Moscow Region. Antibiotiki i khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2020; 65 (3–4): 16–22. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-16-22>. [in Russian]]
2. Osmanov A., Wise A., Denning D.W. *In vitro* and *in vivo* efficacy of miramistin against drug-resistant fungi. J. Med. Microbiol. 2019; 68 (7): 1047–1052. doi: 10.1099/jjmm.0.001007.
3. Farmakiotis D., Kontoyiannis D.P. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. Int J Antimicrob Agents. 2017; 50: 318–324. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.019.
4. Van Dijk P., Sjollem J., Cammue B.P.A., Lagrou K., Berman J., d'Enfert C. et al. Methodologies for *in vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. Microbial Cell. 2018; 5 (7): 300–326. doi: 10.15698/mic2018.07.638.
5. Thevissen K. How promising are combinatorial drug strategies in combating *Candida albicans* biofilms? Future Med Chem. 2016; 8: 1383–1385. doi: 10.4155/fmc-2016-0127.
6. Hill J.A., Cowen L.E. Using combination therapy to thwart drug resistance. Future Microbiol. 2015; 10 (11): 1719–26. doi: 10.2217/fmb.15.68
7. Jezikova Z., Pagac T., Viglas J., Pfeiferova B., Soltys K., Bujdakova H., et al. Synergy over monotherapy. Curr Microbiol. 2019; 76 (6): 673–677. doi: 10.1007/s00284-019-01678-9.
8. Gao M., Wang H., Zhu L. Quercetin assists fluconazole to inhibit biofilm formations of fluconazole-resistant *Candida albicans* in *in vitro* and *in*

Сопоставление средних значений оптической плотности грибов, выросших после контакта с препаратами, показало, что комбинированное использование 0,001% мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл при всех сроках инкубации приводило к значительному достоверному подавлению роста грибов. Каждый отдельный препарат в указанных концентрациях не ингибировал их роста. Это, по нашему мнению, свидетельствовало о том, что данная комбинация мирамистина и АМВ обладает синергетической антифунгальной активностью в отношении устойчивых к отдельным препаратам грибов, которая существенно превосходит простую сумму эффектов этих веществ. Однако при 30–60-минутной инкубации грибов с АМВ в концентрации 50 мкг/мл этот полиен проявлял свою индивидуальную активность: различия в антифунгальном действии АМВ при его отдельном и комбинированном с мирамистином применении становились недостоверными.

Таким образом, комбинированное действие 0,001% мирамистина и амфотерицина В на устойчивые к указанным препаратам грибы рода *Candida* демонстрирует синергетический антифунгальный эффект препаратов, если АМВ используется в концентрации 10 мкг/мл. В случае использования комбинации препаратов с концентрацией АМВ 50 мкг/мл, при которой проявляется его собственный антифунгальный эффект, нельзя исключить того, что противогрибковое действие такой смеси может сводиться к простой сумме эффектов её отдельных компонентов.

10. *vivo* antifungal managements of vulvovaginal candidiasis. Cell Physiol Biochem. 2016; 40 (3–4): 727–724. doi: 10.1159/000453134.
9. Fathilah A.R., Himratul-Aznita W.H., Fatheen A.R.N., Suriani K.R. The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. J Dent. 2012; 40 (7): 609–615. doi: 10.1016/j.jdent.2012.04.003.
10. Reginato C.F., Bandeira L.A., Zanette R.A., Santurio J.M., Alves S.H., Danesi C.C. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against *Candida dubliniensis* before and after *in vitro* fluconazole exposure. Rev Soc Bras Med Trop. 2017; 50 (1): 75–79. doi: 10.1590/0037-8682-0461-2016.
11. Scheibler E., da Silva R.M., Leite C.E., Campos M.M., Figueiredo M.A., Salum E.G. et al. Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of *Candida albicans*. Arch Oral Biol. 2018; 89: 70–76. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.02.009.
12. Chandra S.S., Miglani R., Srinivasan M.R., Indira R. Antifungal efficacy of 5.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA with and without an antifungal agent. J Endod. 2010; 36 (4): 675–678. doi: 10.1016/j.joen.2010.01.015.
13. Agafonova M.N., Kazakova R.R., Lubina A.P., Zeldi M.I., Nikitina E.V., Balakin K.V. et al. Antibacterial activity profile of miramistin in *in vitro* and *in vivo* models. Microb Pathog. 2020; 142: 104072. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104072.
14. Fromm-Dornieden C., Rembe J.D., Schafer N., Bohm J., Stuermer E.K. Cetylpyridinium chloride and miramistin as antiseptic substances in chronic wound management — prospects and limitations. J Med Microbiol. 2015; 64 (Pt 4): 407–414. doi: 10.1099/jmm.0/000034.
15. Hatipoglu N., Hatipoglu H. Combination antifungal therapy for invasive fungal infections in children and adults. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2013; 11 (5): 523–535. doi: 10.1586/eri.13.29.
16. Baddley J.M., Poppas P.G. Antifungal combination therapy. Drugs 2005; 65: 1461–1480. doi: 10.2165/00003495-200565110-00002.
17. Felipe L.O., Junior W.F.D.S., Araujo K.C., Fabrino D.L. Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia—natural products that show promise in can-

- didiasis treatment. *Braz.J.Microbiol.* 2018; 49 (2): 212–219. doi: 10.1016/j.bjm.2017.05.008.
18. Zhou Y., Wang G., Li Y., Liu Y., Song Y., Zheng W. et al. *In vitro* interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C.parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (6): 3250–3260. doi: 10.1128/AAC.06082-11.
  19. You J.L., Du L., King J.B., Hall B.E., Cichewicz R.H. Small-molecule suppressors of *Candida albicans* biofilm formation synergistically enhance the antifungal activity of amphotericin B against clinical *Candida* isolates. *ACS Chem Biol.* 2013; 8 (4): 840–848. doi: 10.1021/cb400009f.
  20. Khan M.S.A., Malik A., Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2012; 50 (1): 33–34. doi: 10.3109/13693786.2011.582890.
  21. Di Vito M., Mattarelli P., Modesto M., Girolamo A., Ballardini M., Tamburro A. et al. *In vitro* activity of tea tree oil vaginal suppositories against *Candida* spp. and probiotic vaginal microbiota. *Phytother Res.* 2015; 29 (10): 1628–1633. doi: 10.1002/ptr.5422.
  22. Venkatesh M., Rong L., Raad I., Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 936–944. doi: 10.1099/jmm.0.009761-0.
  23. Oliveira dos Santos C., Kalwijck E., van der Lee H.A., Tehupeiry-Kooreman M.C., Al-Hatmi A.M.S., Matayan E. et al. *In vitro* activity of chlorhexidine compared with seven antifungal agents against 98 *Fusarium* isolates recovered from fungal keratitis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (8): e02669–18. doi: 10.1128/AAC.02669-18.
  24. Brady A., Loughlin R., Gilpin D., Kearney P., Tunney M. *In vitro* activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of methicillin-resistant and — sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. *J Med Microbiol.* 2006; 55 (Pt 10): 1375–1380. doi: 10.1099/jmm.0.46558-0.
  25. Pfaller M.A., Bale M., Buschelman B., Lancaster M., Espinel-Ingroff A., Rex J.H. et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth microdilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (5): 1104–1107. doi: 10.1128/JCM.33.5.1104-1107.1995.
  26. Cui J., Ren B., Tong Y., Dai H., Zhang L. Synergistic combinations of anti-fungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence* 2015; 6(4): 362–371. doi: 10.1080/21505594.2015.1039885
  27. Yang Y.L., Li S.Y., Cheng H.H., Lo H.J. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 99–103. doi: 10.1186/1471-2334-5-99.

## Информация об авторах

*Кирсанова Марина Александровна* — к. б. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID: 0000-0001-5559-005

*Криворутченко Юрий Леонидович* — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID:0000-0003-1380-983X

*Постникова Ольга Николаевна* — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID: 0000-0003-2113-4107

*Андроновская Ирина Борисовна* — к. б. н., доцент; доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID: 0000-0001-9053-1785

## About the authors

*Marina A. Kirsanova* — Ph. D. in Biology, Associate Professor at the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0001-5559-005

*Yuri L. Krivorutchenko* — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0003-1380-983X

*Olga N. Postnikova* — Senior Lecturer of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0003-2113-4107

*Irina B. Andronovskaja* — Ph. D. in Biology, Associate Professor; Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0001-9053-1785