

Оценка антибактериальной активности препарата бензидамина гидрохлорид

Е.В. Детушева^{1✉}, <http://orcid.org/0000-0003-3478-6534>, DetushevaEV@obolensk.org

Н.К. Фурсова¹, <http://orcid.org/0000-0001-6053-2621>, n-fursova@yandex.ru

И.В. Кукес², <http://orcid.org/0000-0003-1449-8711>, ilyakukes@gmail.com

¹ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии; 142279, Россия, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», д. 2

² Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов; 109147, Россия, Москва, ул. Малая Калитниковская, д. 2, к. 1

Резюме

Введение. При увеличении уровня приобретенной антибиотикорезистентности патогенов усложняется и замедляется лечение, особенно при инфекциях, ассоциированных с биопленками. Возрастает потребность в разработке и использовании новых антибактериальных препаратов, обладающих специфичной антимикробной активностью.

Цель – изучить антимикробное действие и динамику формирования устойчивости к бензидамина гидрохлориду у различных инфекционных возбудителей.

Материалы и методы. Для получения биопленок микроорганизмы культивировали в плоскостных культуральных планшетах. Планктонные клетки получали суспендированием и пересевом единичных колоний суточной культуры в плоскостные культуральные планшеты. Для определения антимикробной активности исследуемых препаратов готовили двукратные разведения и вносили в лунки планшета с бактериальной культурой. Динамику формирования устойчивости к бензидамина гидрохлориду изучали, пассируя культуры в жидкой питательной среде с возрастающими с двукратным шагом концентрациями антисептика. После 2–3 дней инкубации из пробирки с максимальной концентрацией препарата, в которой наблюдался бактериальный рост, бактерии пересекали в новые, с более высокими концентрациями препарата.

Результаты. Бензидамина гидрохлорид проявлял высокий уровень активности против бактерий *M. catarrhalis* и дрожжеподобных грибов *S. albicans*. Чуть меньшая активность препарата отмечена для бактерий видов *S. aureus* и *E. coli*. Бензидамина гидрохлорид обладал высоким уровнем антибактериальной активности против предварительно сформированных биопленок. Анализ динамики формирования устойчивости к бензидамина гидрохлориду у микроорганизмов различных видов показал, что возможность формирования такой устойчивости крайне мала. Процесс адаптации наблюдался лишь у *E. coli*. Исследованные штаммы видов *S. aureus*, *S. albicans* и *M. catarrhalis* не приобрели устойчивости к тестируемому препарату.

Выводы. Бензидамина гидрохлорид может быть эффективно использован против множества инфекционных возбудителей лор-инфекций, так как показаны высокий уровень его антибактериальной активности против предварительно сформированных биопленок, различных видов бактерий и дрожжеподобных грибов и крайне низкий уровень возникновения устойчивости.

Ключевые слова: бензидамина гидрохлорид, антимикробная активность, резистентность, планктонные бактерии, биопленки

Благодарности. Работа выполнена в рамках отраслевой программы НИР Роспотребнадзора.

Для цитирования: Детушева Е.В., Фурсова Н.К., Кукес И.В. Оценка антибактериальной активности препарата бензидамина гидрохлорид. *Медицинский совет.* 2022;16(8):49–55. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-49-55>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Evaluation of the antibacterial activity of the preparation benzydamine hydrochloride

Elena V. Detusheva^{1✉}, <http://orcid.org/0000-0003-3478-6534>, DetushevaEV@obolensk.org

Nadezhda K. Fursova¹, <http://orcid.org/0000-0001-6053-2621>, n-fursova@yandex.ru

Ilya V. Kukes², <http://orcid.org/0000-0003-1449-8711>, ilyakukes@gmail.com

¹ State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology; 2, Territory “Quarter A”, Obolensk, Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russia

² International Association of Clinical Pharmacologists and Pharmacists; 2, Bldg. 1, Malaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109147, Russia

Abstract

Introduction. With an increase in the level of acquired antibiotic resistance of pathogens, treatment becomes more complicated and slows down, especially in infections associated with biofilms. There is a growing need for the development and use of new antibacterial drugs with specific antimicrobial activity.

Aim. To study the antimicrobial action and the dynamics of the formation of resistance to benzydamine hydrochloride from a various infection agents.

Materials and methods. To obtain biofilms, microorganisms were cultivated in flat-bottomed culture plates. Planktonic cells were obtained by suspending and reseeded single colonies of the daily culture into flat-bottomed culture plates. To determine the antimicrobial activity of the studied preparations, two-fold dilutions were prepared and added to the wells of the plate with a bacterial culture. The dynamics of the formation of resistance to benzydamine hydrochloride was studied by passaging the cultures in a liquid nutrient medium with increasing concentrations of the antiseptic by a twofold step. After 2–3 days of incubation from a test tube with the maximum concentration of the drug, in which bacterial growth was observed, the bacteria were transferred to new ones with higher concentrations of the drug.

Results. It was shown that benzydamine hydrochloride showed a high level of activity against bacteria *M. catarrhalis* and yeast-like fungi *C. albicans*. A slightly lower activity of the drug was noted for bacteria of the species *S. aureus* and *E. coli*, however, within the limits of the therapeutic concentration of the drug in finished dosage forms. Benzydamine hydrochloride had a significantly higher level of antibacterial activity against pre-formed biofilms compared to drugs such as chlorhexidine and hexetidine. An analysis of the dynamics of the formation of resistance to the drug benzydamine hydrochloride in microorganisms of various species showed that the possibility of developing resistance to benzydamine hydrochloride is extremely small. The process of adaptation was observed only in *E. coli*. The studied strains of the species *S. aureus*, *C. albicans*, and *M. catarrhalis* did not acquire resistance to the test drug.

Conclusion. Benzydamine hydrochloride can be effectively used against a wide range of pathogens of ENT infections, as it has been shown to have a significantly higher level of antibacterial activity against pre-formed biofilms, various types of bacteria and yeast-like fungi and an extremely low level of resistance compared to other antiseptic drugs.

Keywords: benzydamine hydrochloride, antimicrobial activity, resistance, planktonic bacteria, biofilms

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the branch research program of Rospotrebnadzor.

For citation: Detusheva E.V., Fursova N.K., Kukes I.V. Evaluation of the antibacterial activity of the preparation benzydamine hydrochloride. *Meditsinskiy Sovet.* 2022;16(8):49–55. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-49-55>.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в связи с постоянно возрастающей резистентностью большинства патогенных микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания, к широко применяемым антибактериальным препаратам происходит увеличение длительности лечения пациентов с этими заболеваниями¹. Особенно затруднительно лечение инфекций, ассоциированных с биопленками [1, 2]. Патогенез многих инфекций человека, включая хронические и рецидивирующие респираторные инфекции, связан с биопленочными сообществами [3–5]. Биопленки представляют собой защитный механизм, повышающий устойчивость бактерий к воздействию агрессивных веществ [6], факторов иммунной защиты [7] и антибактериальных препаратов [8, 9], поэтому стандартное лечение способно уничтожить только планктонные клетки, не затрагивая прикрепленные формы, которые способны выживать в биопленке и размножаться, когда терапия закончена [10, 11]. Для достижения бактерицидных концентраций антибиотиков при лечении таких инфекций приходится длительно использовать большие дозы дорогостоящих препаратов, что существенно увеличивает риск возникновения различных осложнений системной антибиотикотерапии [12, 13].

Одним из путей решения этой проблемы является разработка новых препаратов, обладающих целенаправленной местной антимикробной активностью – современных антисептических препаратов. В связи с этим бензидамина гидрохлорид и препараты на его основе

могут рассматриваться как перспективные средства для лечения инфекционных заболеваний лор-органов.

Цель – определить антибактериальную активность препарата бензидамина гидрохлорид против микроорганизмов – потенциальных возбудителей инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей в планктонной форме, а также в форме биопленки; оценить возможности формирования устойчивости у микроорганизмов к бензидамина гидрохлориду при длительном применении; аналитически сравнить антибактериальную активность бензидамина гидрохлорида с широко применяемыми в медицинской практике антисептиками, такими как хлоргексидин и гексетидин, против микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей в форме биопленки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов

Референс-штаммы микроорганизмов – потенциальных возбудителей инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028 и *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238 получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk».

Антибактериальные препараты

■ Бензидамина гидрохлорид (Sigma-Aldrich Chemie, Германия) растворяли в стерильной дистиллированной воде до концентрации 16 000 мг/л, хранили в течение 14 дней при температуре +4 °С и использовали в качестве stock-раствора для приготовления серийных разведений.

¹ WHO. High Levels of Antibiotic Resistance Found Worldwide, New Data Shows. 2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>.

■ Гексэтидин – 1,3-бис(2-Этилгексил)гексагидро-5-метил-5-пиримидинамин, 2%-й раствор в этаноле – хранили при температуре +4 °С и использовали в качестве стокового раствора для приготовления серийных разведений.

■ Хлоргексидин – хлоргексидина биглюконат 20% – хранили при температуре +4 °С и использовали в качестве стокового раствора для приготовления серийных разведений.

Культивирование микроорганизмов

Для культивирования бактерий использовали бульон ГРМ (панкреатический гидролизат рыбной муки) №1 (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия) и агар Мюллера – Хинтона. Культивирование микроорганизмов проводили в течение 20–24 ч при температуре 37 °С, хранение – в 20%-м глицерине при температуре –70 °С. Видовую идентификацию бактерий проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF Biotyper.

Определение способности тестируемых штаммов бактерий к образованию биопленок

Эффективность образования бактериальных биопленок определяли при помощи метода, основанного на способности красителя кристаллического фиолетового связываться с клетками и матриксом биопленок [14]. Для получения биопленок использовали 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты, в которые засеивали по 200 мкл суточной бактериальной культуры в концентрации 10⁶ КОЕ/мл и культивировали 24 ч при температуре 37 °С. Затем из лунок планшета осторожно отбирали среду с планктонными клетками. Для удаления оставшихся планктонных клеток лунки с биопленками промывали в течение 2–3 мин стерильным буфером PBS (NaCl – 8 г, KCl – 0,2 г, Na₂HPO₄ – 1,44 г, KH₂PO₄ – 0,24 г на 1 л, pH = 7,4) в том же объеме, после чего буфер полностью удаляли пипетированием. Далее в каждую лунку вносили по 200 мкл отфильтрованного 0,1%-го раствора генциана фиолетового, инкубировали биопленки с красителем в течение 10–15 мин при комнатной температуре, после чего краситель пипетированием полностью удаляли из лунки. Несвязавшийся краситель тщательно смывали PBS-буфером, планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу и высушивали. После полного высыхания поверхности в лунки добавляли 200 мкл смеси этанола – изопропанола (1 : 1), смывали краситель с поверхности лунок, отбирали и помещали в чистые плоскодонные планшеты. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 590 нм на приборе xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer. Результаты измерений интерпретировали, сравнивая показатели OD₅₉₀ образцов с аналогичным негативного контроля (чистого растворителя без добавления красителя).

Отсутствие биопленки фиксировали при значениях OD₅₉₀ образца ≤ OD₅₉₀ контроля, слабую степень продукции биопленки – при OD₅₉₀ контроля < OD₅₉₀ образца ≤ 2 OD₅₉₀ контроля, среднюю степень продукции биопленки – при 2 OD₅₉₀ контроля < OD₅₉₀ образца ≤ 4 OD₅₉₀

контроля, высокую степень продукции биопленки – при 4 OD₅₉₀ контроля < OD₅₉₀ образца в соответствии с рекомендациями L.B. Rodrigues et al. (2010) [15]. Все эксперименты проводили в трех повторах.

Определение чувствительности планктонных клеток микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) исследуемого препарата определяли суспензионным методом (МУК 4.2.1890–04). Для этого готовили двукратные разведения бензидамина гидрохлорида (8000 – 0,5 мг/л) в питательном бульоне. Питательный бульон с соответствующей концентрацией исследуемого препарата вносили по 0,1 мл в 12 лунок в горизонтальных рядах культурального планшета. В отдельные ряды вносили бульон без препарата для контроля роста культур.

Из единичных колоний, выросших на среде ГРМ при 37 °С в течение 18 ч, готовили суспензию с оптической плотностью 0,5 по стандарту МакФарланда в стерильном физиологическом растворе, что соответствует приблизительно 1–2 × 10⁸ КОЕ/мл. Затем суспензию разводили 1 : 100, добавляя 0,2 мл суспензии в колбу, содержащую 19,8 мл бульона Мюллера – Хинтона. Концентрация микроорганизмов при этом составляла 10⁶ КОЕ/мл. По 0,1 мл исходной суспензии вносили в лунки с исследуемым препаратом и в контрольные лунки с бульоном. Конечная концентрация микроорганизма в каждой лунке составляла 5 × 10⁵ КОЕ/мл. Планшеты закрывали крышками и помещали в термостат (37 °С) на 20 ч. Наличие бактериального роста учитывали визуально (по наличию мутности в лунке). За МПК принимали минимальную концентрацию препарата, при которой рост бактерий отсутствовал через 20 ч инкубации.

Определение чувствительности биопленок микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Для получения биопленок использовали 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты, в которые засеивали по 200 мкл суточной бактериальной культуры в концентрации 10⁶ КОЕ/мл и культивировали 24 ч при температуре 37 °С. Затем из лунок планшета осторожно отбирали среду с планктонными клетками. Для удаления оставшихся планктонных клеток лунки с биопленками промывали в течение 2–3 мин стерильным буфером PBS (NaCl – 8 г, KCl – 0,2 г, Na₂HPO₄ – 1,44 г, KH₂PO₄ – 0,24 г на 1 л, pH = 7,4) в том же объеме, после чего буфер полностью удаляли пипетированием. Затем МПК исследуемого препарата определяли суспензионным методом (МУК 4.2.1890–04). Для этого готовили двукратные разведения бензидамина гидрохлорида (8000 – 0,5 мг/л) в питательном бульоне. Питательный бульон с соответствующей концентрацией исследуемого препарата вносили по 0,1 мл в 12 лунок в горизонтальных рядах культурального планшета с отмытыми биопленками. Планшеты закрывали крышками и помещали в термостат (37 °С) на 20 ч. Наличие бактериального роста учитывали визуально (по наличию мутности в лунке). За МПК принимали минимальную концентрацию препарата, при которой рост бактерий отсутствовал через 20 ч инкубации.

Формирования устойчивости у возбудителей лор-инфекций верхних дыхательных путей к препарату бензидами-на гидрохлорид

Селекцию устойчивых к препарату бензидамина гидрохлорид вариантов микроорганизмов осуществляли путем последовательных пересевов бактериальной культуры в новые порции питательного бульона, содержащего ступенчато повышающиеся концентрации препарата, начиная с концентрации, в два раза меньшей МПК. Для этого готовили серию двукратных разведений препарата в объеме 4 мл питательного бульона и вносили в каждую пробирку по 50 мкл бактериальной культуры и инкубировали при температуре 37 °С. После 2–3 дней инкубации из пробирки с максимальной концентрацией препарата, в которой наблюдался бактериальный рост, отбирали порцию 50 мкл и пересевали в новую серию пробирок с более высокими концентрациями препарата бензидамина гидрохлорид. Процесс селекции продолжали до момента, когда прекращалось увеличение значения МПК для данной культуры в течение 6 пересевов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ величин относительных показателей плотности биопленок, сформированных бактериями использованных штаммов в лунках культуральных планшетов, позволил определить, что штамм *E. coli* ATCC 25922 обладал высокой степенью образования биопленок, штаммы *S. aureus* ATCC 43300 и *C. albicans* ATCC 90028 – средней степенью образования биопленок, а штамм *M. catarrhalis* ATCC 25238 обладал низким потенциалом образования биопленки (табл. 1).

В ходе исследования было показано, что бензидамина гидрохлорид обладает антибактериальной активностью против планктонных клеток тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922 в концентрации 500 мг/л, *S. aureus* ATCC 43300 в концентрации 250 мг/л, *C. albicans* ATCC 90028 в концентрации 125 мг/л и *M. catarrhalis* ATCC 25238 в концентрации 31 мг/л. Полученные значения МПК для исследуемых видов микроорганизмов были использованы для селекции устойчивости микроорганизмов к бензидамина гидрохлориду.

Кроме того, для бензидамина гидрохлорида, а также антисептических препаратов на основе хлоргексидина и гексэтидина были определены МПК для биопленочных форм тестируемых микроорганизмов (табл. 2). Было показано, что для штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 и *C. albicans* ATCC 90028, образующих биопленки высокой и средней степени плотности, МПК бензидамина гидрохлорида были выше, чем для планктонных форм этих видов микроорганизмов. У штамма *M. catarrhalis* ATCC 25238 МПК бензидамина гидрохлорида для планктонной и биопленочной формы клеток были одинаковы, что связано с низким уровнем биопленкообразования. Для препаратов на основе хлоргексидина и гексэтидина показатели МПК для биопленочных форм тест-штаммов показаны в табл. 2.

По результатам селективного отбора было показано, что для штамма *S. aureus* ATCC 25923 в условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций бензидамина гидрохлорида (125–16 000 мг/л) в течение 34 суток (10 пассажей) не было получено варианта штамма, отличающегося значительным уровнем устойчивости. МПК полученного штамма увеличилась в 2 раза относительно исходной и составила 500 мг/л.

Для штамма *E. coli* ATCC 25922 в условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций бензидамина гидрохлорида (250–16 000 мг/л) в течение 34 суток (10 пассажей) был получен вариант штамма, отличающийся повышенным уровнем устойчивости к бензидамина гидрохлориду. МПК полученного штамма увеличилась в 4 раза относительно исходной и составила 2000 мг/л.

В условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций бензидамина гидрохлорида (63–16 000 мг/л) штамм *C. albicans* ATCC 90028 в течение 34 суток (10 пассажей) не приобрел устойчивости к тестируемому препарату. МПК исследуемого штамма не изменилась и составила 125 мг/л.

Штамм *M. catarrhalis* ATCC 25238 в условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций бензидамина гидрохлорида (16–16 000 мг/л) в течение 21 дня (7 пассажей) не приобрел устойчивости к тестируемому препарату. МПК исследуемого штамма не изменилась и составила 31 мг/л.

● **Таблица 1.** Степень биопленкообразования бактериями тест-штаммов

● **Table 1.** Degree of biofilm forming ability of bacteria of test strains

Штаммы	OD ₅₉₀	Степень образования биопленки
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,372 ± 0,011	высокая
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	0,241 ± 0,008	средняя
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,227 ± 0,005	средняя
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	0,152 ± 0,006	слабая

● **Таблица 2.** Антибактериальная активность бензидамина гидрохлорида по сравнению с широко применяемыми в медицинской практике антисептическими препаратами против бактерий различных видов, находящихся в форме биопленки

● **Table 2.** Antibacterial activity of benzydamine hydrochloride vs antiseptics commonly used in health care against various types of bacteria forming a biofilm

Штамм	Минимальная подавляющая концентрация, мг/л		
	Бензидамина гидрохлорид	Хлоргексидин	Гексэтидин
<i>E. coli</i> ATCC 25922	512	6000	2000
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1280	13000	2000
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	160	500	> 500
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	31	16	125

ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с тем что важную роль в патогенезе инфекций играет способность бактерий формировать биопленки на поверхности слизистых оболочек, оценку антибактериальной активности микроорганизмов необходимо проводить именно на биопленочных формах микроорганизмов. В ходе исследования было показано, что бензидамина гидрохлорид обладает высоким уровнем антибактериальной активности против как планктонных клеток, так и биопленок тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922 (500 и 512 мг/л), *S. aureus* ATCC 43300 (250 и 1280 мг/л), *C. albicans* ATCC 90028 (125 и 160 мг/л) и *M. catarrhalis* ATCC 25238 (31 мг/л).

Длительное применение, а также использование антибактериальных препаратов в сублетальных концентрациях способно привести к тому, что устойчивые линии получают преимущество над чувствительными и вытесняют их из популяции, приводя к значительному повышению резистентности микроорганизмов к применяемым лекарственным и антисептическим средствам.

В условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций бензидамина гидрохлорида при культивировании штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* и *M. catarrhalis* было определено, что исследуемый препарат обладает низким потенциалом для формирования устойчивости у тестируемых видов микроорганизмов при длительном и многократном применении препарата.

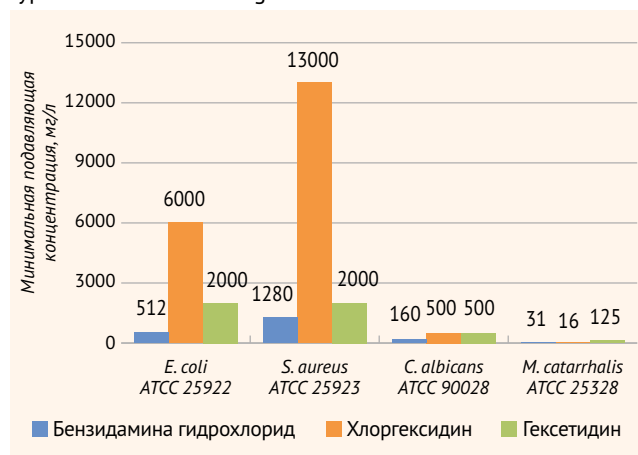
В ходе исследования было проведено аналитическое сравнение антибактериальной активности бензидамина гидрохлорида с широко применяемыми в медицинской практике антисептиками, такими как хлоргексидин и гексэтидин. Сравнение проводилось с результатами, полученными в данном исследовании, а также в ранее проведенных нами исследованиях [16–19]. Было показано, что бензидамина гидрохлорид обладает значительно более высоким уровнем антибактериальной активности против бактерий различных видов против предварительно сформированных биопленок по сравнению с хлоргексидином и гексэтидином (табл. 2). Также в ранее проведенных исследованиях была показана крайне низкая антибактериальная активность препарата бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония хлорида моногидрат против планктонных и биопленочных форм бактерий различных видов [16] по сравнению с уровнем антибактериальной активности бензидамина гидрохлорида, показанной в данной работе.

Кроме того, как было показано в настоящем исследовании, возможность формирования устойчивости к бензидамину гидрохлориду крайне мала, в то время как к другим антисептическим препаратам, таким как хлоргексидин [20–22], бензалкония хлорид [20, 23] и гексэтидин [24], отмечается крайне высокая вероятность формирования селективной устойчивости как при использовании сублетальных концентраций препаратов [25], так и при длительном совместном культивировании бактерий в присутствии антибактериального агента, т. е. по модели многократного применения [26, 27].

Для большей наглядности антибактериального действия бензидамина гидрохлорида по сравнению с широко

● **Рисунок.** Антибактериальная активность бензидамина гидрохлорида по сравнению с широко применяемыми в медицинской практике антисептическими препаратами против бактерий различных видов, находящихся в форме биопленки

● **Figure.** Antibacterial activity of benzydamine hydrochloride vs antiseptics commonly used in health care against various types of bacteria forming a biofilm



ко применяемыми в медицинской практике антисептическими препаратами против бактерий различных видов, находящихся в форме биопленки, результаты можно представить в виде диаграммы (рис.).

ВЫВОДЫ

Проведено исследование антибактериальной активности препарата бензидамина гидрохлорида против различных возбудителей инфекций человека из разных таксономических групп. Показано, что бензидамина гидрохлорид проявлял высокий уровень активности против бактерий *M. catarrhalis* и дрожжеподобных грибов *C. albicans*. Чуть меньшая активность препарата отмечена для бактерий видов *S. aureus* и *E. coli*, однако в пределах терапевтической концентрации препарата в готовых лекарственных формах.

Анализ динамики формирования устойчивости к препарату бензидамина гидрохлорид у микроорганизмов различных видов показал, что процесс адаптации наблюдался лишь у штамма *E. coli* ATCC 25922. Штаммы *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 90028 и *M. catarrhalis* ATCC 25238 не приобрели устойчивости к тестируемому препарату бензидамина гидрохлорид при многократном применении.

Было показано, что бензидамина гидрохлорид обладает значительно более высоким уровнем антибактериальной активности против бактерий и грибов различных видов против предварительно сформированных биопленок по сравнению с такими препаратами, как хлоргексидин и гексэтидин.

Также в ранее проведенных нами исследованиях была показана крайне низкая антибактериальная активность препарата бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония хлорида моногидрат против планктонных и биопленочных форм бактерий различных видов по сравнению с уровнем антибактериальной активности бензидамина гидрохлорида, показанной в данной работе.

Кроме того, как было показано в настоящем исследовании, возможность формирования устойчивости к бензидамина гидрохлориду крайне мала, в то время как к антисептическим препаратам, таким как хлоргексидин, бензалкония хлорид и гексэтидин, такая вероятность крайне высока как при использовании сублетальных концентраций препаратов, так и при длительном совместном культивировании бактерий в присутствии антибактериального агента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что бензидамина гидрохлорид проявлял высокий уровень активности против различных видов бактерий и дрожжеподобных грибов. Кроме того, было определено, что бензидамина гидрохлорид обладает значительно более высоким уровнем антибактериальной активности против предварительно сформированных биопленок по сравнению с такими препаратами, как хлоргексидин и гексэтидин, на основании результатов предыдущих работ.

Анализ динамики формирования устойчивости к препарату бензидамина гидрохлорид у микроорганизмов различных видов показал, что возможность формирования устойчивости к нему незначительна в сравнении с аналогичными параметрами у таких антисептических препаратов, как хлоргексидин, бензалкония хлорид и гексэтидин. У этих препаратов риск формирования устойчивости крайне высок как при использовании сублетальных концентраций препаратов, так и при длительном совместном культивировании бактерий в присутствии антибактериального агента.

Таким образом, на основании полученных данных выбор препарата на основе бензидамина имеет целесообразность в назначении как против различных бактериальных патогенов, относящихся к грамположительной и грамотрицательной флоре, так и против грибковых патогенов *Candida spp.*



Поступила / Received 02.04.2022
Поступила после рецензирования / Revised 16.04.2022
Принята в печать / Accepted 16.04.2022

Список литературы / References

- Vestby L.K., Grønseth T., Simm R., Nesse L.L. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(2):59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>.
- Gloag E.S., Fabbri S., Wozniak D.J., Stoodley P. Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. *Biofilm*. 2019;2:100017. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100017>.
- Hamilos D.L. Biofilm Formations in Pediatric Respiratory Tract Infection: Part 1: Biofilm Structure, Role of Innate Immunity in Protection Against and Response to Biofilm, Methods of Biofilm Detection, Pediatric Respiratory Tract Diseases Associated with Mucosal Biofilm Formation. *Curr Infect Dis Rep*. 2019;21(2):6. <https://doi.org/10.1007/s11908-019-0658-9>.
- Filardo S., Di Pietro M., Tranquilli G., Sessa R. Biofilm in genital ecosystem: a potential risk factor for Chlamydia trachomatis infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2019;1672109. <https://doi.org/10.1155/2019/1672109>.
- Silva V., Almeida L., Gaio V., Cerca N., Manageiro V., Caniça M. et al. Biofilm Formation of Multidrug-Resistant MRSA Strains Isolated from Different Types of Human Infections. *Pathogens*. 2021;10(8):970. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080970>.
- Verderosa A.D., Totsika M., Fairfull-Smith K.E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem*. 2019;7:824. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>.
- Camproccia D., Mirzaei R., Montanaro L., Arciola C.R. Hijacking of immune defences by biofilms: a multifactor strategy. *Biofouling*. 2019;35:1055–1074. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1689964>.
- Folliero V., Franci G., Dell'Annunziata F., Giugliano R., Foglia F., Sperlongano R. et al. Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Production among Clinical Strain Isolated from Medical Devices. *Int J Microbiol*. 2021;9033278. <https://doi.org/10.1155/2021/9033278>.
- Uruén C., Chopou-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C., Arenas J. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics (Basel)*. 2020;10(1):3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>.
- Rao H., Choo S., Rajeswari Mahalingam S.R., Adisuri D.S., Madhavan P., Md Akim A., Chong P.P. Approaches for Mitigating Microbial Biofilm-Related Drug Resistance: A Focus on Micro- and Nanotechnologies. *Molecules*. 2021;26(7):1870. <https://doi.org/10.3390/molecules26071870>.
- Idrees M., Sawant S., Karodia N., Rahman A. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(14):7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>.
- Verderosa A.D., Totsika M., Fairfull-Smith K.E. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Front Chem*. 2019;7:824. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>.
- Goodwine J., Gil J., Doiron A., Valdes J., Solis M., Higa A. et al. Pyruvate-depleting conditions induce biofilm dispersion and enhance the efficacy of antibiotics in killing biofilms in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2019;9(1):3763. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40378-z>.
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998;28(3):449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>.
- Rodrigues L.B., Dos Santos L.R., Tagliari V.Z., Rizzo N.N., Trenhago G., de Oliveira A.P. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol*. 2010;41(4):1082–1085. <https://doi.org/10.1590/s1517-838220100004000029>.
- Детушева Е.В., Ершова О.Н., Фурсова Н.К. Чувствительность планктонных культур и биопленок грамотрицательных бактерий к коммерческим препаратам дезинфектантов и антисептиков. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66(7):438–447. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-438-447>.
- Детушева Е.В., Родина В.Б., Слукин П.В., Чугунов В.А., Ершова О.Н., Александрова И.А. и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015;17(1):57–66. Режим доступа: <https://cmac-journal.ru/publication/2015/1/cmac-2015-t17-n1-p057/>. Detusheva E.V., Rodin V.B., Slukin P.V., Chugunov V.A., Ershova O.N., Aleksandrova I.A. et al. Sensitivity of nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Proteus mirabilis* to chlorhexidine-based antiseptic. *Klinicheskaja Mikrobiologija i Antimikrobnaja Khimioterapija*. 2015;17(1):57–66. (In Russ.) Available at: <https://cmac-journal.ru/publication/2015/1/cmac-2015-t17-n1-p057/>.
- Слукин П.В., Фурсова Н.К., Брико Н.И. Антибактериальная активность бензидамина гидрохлорида против клинических изолятов бактерий, выделенных от людей в России и Испании. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(6):11–18. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-11-18>. Slukin P.V., Fursova N.K., Briko N.I. Antibacterial Activity of Benzydamine Hydrochloride against Clinical Isolates of Bacteria, isolated from people in Russia and Spain. *Epidemiologija i Vaktsinoprofilaktika*. 2018;17(6):11–18. (In Russ.) <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-11-18>.
- Слукин П.В., Фурсова Н.К., Кукес И.В., Брико Н.И. Оценка способности бензидамина гидрохлорида подавлять планктонные клетки, а также растущие и зрелые биопленки клинически значимых микроорганизмов. *Фарматека*. 2021;28(1):102–107. <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2021.1.102-107>. Slukin P.V., Fursova N.K., Kukes I.V., Briko N.I. Evaluation of the ability of benzydamine hydrochloride to suppress planktonic cells, as well as growing and mature biofilms of clinically significant microorganisms. *Farmateka*. 2021;28(1):102–107. (In Russ.) <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2021.1.102-107>.
- Горемыкина Е.А., Слукин П.В., Фурсова Н.К. Чувствительность клинических штаммов *Candida spp.* к фунгицидным и антисептическим препаратам. В: Зайцева Н.Н. (ред.). *Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной*. Н. Новгород: Медиа; 2021. 420 с. Режим доступа: <https://www.nniem.ru/file/sobytya/100let/sbornik-100-let-blohinoy.pdf>. Goremykina E.A., Slukin P.V., Fursova N.K. *Candida spp.* Clinical strains sensitivity to fungicidal and antiseptic preparations. In: Zaitseva N.N. (ed.). *Epidemiological surveillance of current infections: new threats and challenges: Collection of scientific works of the All-Russian scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 100th anniversary of Academician I.N. Blokhina*. Nizhnyy Novgorod: Media; 2021. 420 p. (In Russ.) Available at: <https://www.nniem.ru/file/sobytya/100let/sbornik-100-let-blohinoy.pdf>.

21. Braga T.M., Pomba C., Lopes M.F.S. High-level vancomycin resistant *Enterococcus faecium* related to humans and pigs found in dust from pig breeding facilities. *Vet Microbiol.* 2013;161(3–4):344–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.034>.
22. Akinkunmi E.O., Lamikanra A. Susceptibility of community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from faeces to antiseptics. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6(4):317–323. <https://doi.org/10.3855/jidc.1609>.
23. Valenzuela A.S., Benomar N., Abriouel H., Cañamero M.M., López R.L., Gálvez A. Biocide and copper tolerance in enterococci from different sources. *J Food Prot.* 2013;76(10):1806–1809. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-13-124>.
24. Fazlara A., Ekhtelat M. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *Am Eurasian J Agric Environ Sci.* 2012;12(1):23–29. Available at: [https://www.idosi.org/aejaes/jaes12\(1\)12/4.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes12(1)12/4.pdf).
25. Nasr A.M., Mostafa M.S., Arnaout H.H., Elshimy A.A.A. The effect of exposure to sub-inhibitory concentrations of hypochlorite and quaternary ammonium compounds on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Infect Control.* 2018;46(7):e57–e63. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.04.201>.
26. Masadeh M.M., Gharaibeh S.F., Alzoubi K.H., Al-Azzam S.I., Obeidat W.M. Antimicrobial activity of common mouthwash solutions on multidrug-resistance bacterial biofilms. *J Clin Med Res.* 2013;5(5):389–394. <https://doi.org/10.4021/jocmr1535w>.
27. Rozman U., Pušnik M., Kmetec S., Duh D., Šostar Turk S. Reduced Susceptibility and Increased Resistance of Bacteria against Disinfectants: A Systematic Review. *Microorganisms.* 2021;9(12):2550. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122550>.

Информация об авторах:

Детушева Елена Владимировна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии; 142279, Россия, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 2; DetushevaEV@obolensk.org

Фурсова Надежда Константиновна, к.б.н., заведующая лабораторией антимикробных препаратов, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии; 142279, Россия, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24; n-fursova@yandex.ru

Кукес Илья Владимирович, к.м.н., лауреат гранта Президента РФ, врач – клинический фармаколог, врач-иммунолог, руководитель научно-клинического отдела, Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов; 109147, Россия, Москва, ул. Малая Калитниковская, д. 2, к. 1; ilyakukes@gmail.com

Information about the authors:

Elena V. Detusheva, Cand. Sci. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Preparations, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology; 2, Territory "Quarter A", Obolensk, Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russia; DetushevaEV@obolensk.org

Nadezhda K. Fursova, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Antimicrobial Preparations, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology; 2, Territory "Quarter A", Obolensk, Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russia; n-fursova@yandex.ru

Ilya V. Kukes, Cand. Sci. (Med.), Laureate of the Grant of the President of the Russian Federation, Clinical Pharmacologist, Immunologist, Head of the Scientific and Clinical Department, International Association of Clinical Pharmacologists and Pharmacists; 2, Bldg. 1, Malaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109147, Russia; ilyakukes@gmail.com