

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА ТА БІОЛОГІЯ

DOI 10.31718/2077-1096.21.1.85

УДК 616.314.11/18-085-74:615.326./451.3:547.477:615.28

Бублій Т.Д., Ганчо О.В., Костиренко О.П.

АНТИСЕПТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦИТРАТНОГО БУФЕРУ

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

*Антисептичні властивості ендодонтичних матеріалів можуть бути корисні для здійснення мікробного контролю в системі кореневих каналів. Мета роботи – вивчити чутливість еталонних штамів мікроорганізмів до цитратного буферу та його комбінації з антибіотиком «Амоксиклав». Для вирішення поставленої мети використовували музейні штами *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990, *E. faecalis* ATCC 29212, *M. lysodeicticus* ATCC 4698 та *C. albicans* ATCC10231. Чутливість стандартних штамів мікроорганізмів до препаратів вивчали диско-дифузійним методом, для контролю використовували хлоргексидин біглюконат 0,05%. В ході нашого дослідження встановлено, що цитратний буфер має високу антибактеріальну активність. Комбінація цитратного буферу з антибіотиком збільшувала чутливість усіх еталонних штамів. Штам *E. coli* ATCC 25922 мав слабку чутливість до цитратного буферу, але його комбінування з антибіотиком збільшувало антибактеріальну дію у 2,3 рази ($p < 0,05$). Простежувалось послідовне приростання в середньому на 5 мм чутливості ентерококу до дослідних речовин в напрямку хлоргексидин – цитратний буфер – цитратний буфер + «Амоксиклав». При порівнянні отриманих результатів за умов використання цитратного буферу, його комбінації з антибіотиком та хлоргексидином в якості контролю, звертає увагу менша активність останнього до штамів представників транзитної та нормальної мікрофлори порожнини рота, якими є *E. coli* ATCC 25922 та *M. lysodeicticus* ATCC 4698 і, навпаки, більш виражена активність дослідних композицій до штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів – стафілококів, ентерококів та дріжджеподібних грибів, що вказує на перевагу цитратного буферу та його комбінації з антибіотиком за умов їх використання при лікуванні ускладненого карієсу.*

Ключові слова: антисептичні властивості, диско-дифузійний метод, цитратний буфер.

Робота є фрагментом комплексної науково-дослідної теми кафедри терапевтичної стоматології Української медичної стоматологічної академії: «Механізми впливу хвороботворних факторів на стоматологічний статус осіб із соматичною патологією, шляхи їх корекції та блокування» (державний реєстраційний № 0115U001138).

Вступ

Мікроби і їх токсини є головним чинником у розвитку інфекційних верхівкових періодонтитів. При лікуванні кореневих каналів, незважаючи на те, що в розпорядженні лікаря є сучасні ендодонтичні інструменти та високоефективні антисептики, після механічної і медикаментозної обробки каналу все одно залишається резидуальна мікрофлора. Тому знищення мікрофлори, що засіває кореневі канали зубів і тканини навколо верхівкової ділянки є одним з основних завдань при лікуванні періодонтиту. Антисептичні властивості ендодонтичних матеріалів можуть бути корисні для здійснення мікробного контролю в системі кореневих каналів. Причому внутрішньо-канальні силери повинні забезпечувати довготривалу герметичність кореневого каналу, перешкоджати як виходу резидуальної мікрофлори з дентинних каналців у періодонт, так і заносу мікрофлори в канал через апікальну або гирлову частину каналу [1]. Останнім часом були зроблені спроби створення матеріалів для канальних пломб, що не подразнюють періодонт, мають

виражену антибактеріальну дію та стимулюють репаративні процеси в періодонті.

Мета роботи

Вивчити чутливість еталонних штамів мікроорганізмів до цитратного буферу та його комбінації з антибіотиком «Амоксиклав».

Матеріал і методи

Для вирішення поставленої мети використовували музейні штами *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990, *E. faecalis* ATCC 29212, *M. lysodeicticus* ATCC 4698 та *C. albicans* ATCC10231, одержані з ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» (м. Київ). Із зазначених штамів готували добові культури на скошеному поживному агарі МПА або агарі Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна) інокулюючи яких доводили до 0,5 за Мак-Фарландом. Чутливість стандартних штамів мікроорганізмів до препаратів вивчали диско-дифузійним методом (Кірбі-Бауера) відповідно до наказу МОЗ України за №167 від 05.04.2007 р. «Про затвердження

методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів», який спирається на стандарти EUCAST та CLSI (раніше NCCLS) [2, 3]. Дослідження за допомогою диско-дифузійного методу проводились у стандартних чашках Петрі з використанням поживного середовища – агар Мюллера-Хінтона (HiMedia Laboratories Pvt Ltd. India). Для дослідження використана екстемпорально виготовлена за прописом антибактеріальна композиція [4]. Дослідні речовини наносили на чисті стерильні паперові диски (HiMedia Laboratories Pvt Ltd. India) в кількості 10 мкл / диск. На поверхню поживного середовища нашаровували мікробний інокулюм, концентрація якого становила $1,5 \times 10^8$ КУО/мл, та за допомогою стерильного пінцету проводили аплікацію дисків, просочених різними композиціями. Після 24 годин інкубації при 37°C чашки Петрі досліджували та вимірювали діаметри зон інгібування росту мікроорганізмів за до-

помогою штангенциркуля. Для контролю визначали чутливість музейних штамів до хлоргексидину біглюконату 0,05% (Хлоргексидин-Віола, Віола ФФ ЗАТ, Запоріжжя, Україна, р/н UA/14616/01/01). Для виявлення статистичної достовірності результатів дослідження проводили 5 разів.

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних пакетів програм «STATISTICA+» та «Microsoft Excel 2010». Наявність відмінностей між досліджуваними показниками оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Результати вважали достовірними при значеннях $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати виявлення чутливості еталонних штамів мікроорганізмів до цитратного буферу та його комбінації з антибіотиком «Амоксиклав» представлені в таблиці 1.

Таблиця 1.

Зони затримки росту еталонних штамів при дії цитратного буферу та його комбінації з антибіотиком, $M \pm m$ (n=5)

Музейний штам	Діаметр зони затримки росту, мм		
	Хлоргексидину біглюконат 0,05%	Цитратний буфер	Комбінація цитратного буферу з антибіотиком (10 мкл /диск)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20,6±0,3	13,2±0,5*	30,8±0,7**
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	23,3±0,9	28,0 ±0,4*	38,2±0,5**
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	12,3±2,1	26,4±0,2*	35,1±0,7**
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	14,6±1,1	20,4±0,4*	25,4±0,2**
<i>M. lysodeicticus</i> ATCC 4698	21,4±0,5	13,6±0,7*	24,0±0,5**
<i>C. albicans</i> ATCC10231	14,2±2,5	19,2±0,4*	28,8±1,0**

* - $p < 0,05$ у порівнянні з зоною затримки росту тест-культури мікроорганізму навколо дисків з хлоргексидином $p < 0,05$.

** - $p < 0,05$ у порівнянні з зоною затримки росту тест-культури мікроорганізму навколо дисків з цитратним буфером $p < 0,05$.

В ході нашого дослідження встановлено, що цитратний буфер має високу антибактеріальну активність зокрема по відношенню до музейних штамів *S. aureus* ATCC 25923 та *S. epidermidis* ATCC 14990. Зони затримки росту стафілококів навколо даного матеріалу коливались у межах 26,4-28мм, що відповідало високому антибактеріальному ефекту. Досліджувана композиція демонструвала середню фунгіцидну активність, затримуючи ріст *Candida albicans* на 19,2±0,4мм. Зони затримки росту навколо штамів *E. coli* ATCC 25922 та *M. lysodeicticus* ATCC 4698 були 13,2±0,5 та 13,6±0,7, що відповідало низької чутливості музейних штамів кишкової палички та мікрококів до цитратного буферу.

Мікрофлора зубів при хронічних періодонтитах складається з полімікробної спільноти з грампозитивних і грамнегативних паличок і коків, які є факультативними та строгими анаеробами. *E. faecalis* і *Candida albicans* часто виявляються при верхівкових періодонтитах [5].

Таким чином, цитратний буфер має виражені антисептичні властивості по відношенню до більшості видів мікроорганізмів, що зустрічаються в корневих каналах.

Запропонована нами композиція на основі цитратного буферу має гарні ізолюючі властивості, низькотоксична, має високу клінічну ефекти-

вність[6]. Вона не має аналогів, тому що складові цитратного буфера не використовувались в якості силера, а тільки в якості ірриганта. Лимонна кислота має довгу історію використання при зрошенні корневих каналів [7,8]. Останніми дослідженнями підтверджена її ефективність та антисептичні властивості [5]. Включення 6% лимонної кислоти і ендоактиватора в якості допоміжних засобів для зрошення молочних зубів корисно для досягнення кращої якості obturaції [7]. Однак, протимікробні властивості запропонованої нами композиції для obturaції корневих каналів ще не вивчені. Аналізуючи одержані нами результати слід відмітити, що, хоча тест-культури *S. aureus* ATCC 25923, високочутливі до цитратного буферу та *E. coli* ATCC 25922, які навпаки, виявилися слабо чутливими до даної сполуки, широко використовуються при дослідженні антимікробних властивостей різних нових фармакологічних антисептичних засобів, але особливу увагу ми приділили іншим мікроорганізмам, які найбільш часто зустрічаються у резидентної мікрофлорі ротової порожнини. Так, еталонний штам непатогенного представника нормальної мікрофлори порожнини рота *M. lysodeicticus* ATCC 4698, як і представник транзитної мікрофлори, яким є кишкова паличка, також виявився слабо чутливим до буферу, ви-

готовленого на основі лимонної кислоти. Тобто найбільша протимікробна дія буферу стосувалася патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, які найбільш часто зустрічаються при хронічних періодонтитах. Привертає увагу також, що чутливість грампозитивних стафілококів до цитратного буферу в цілому виявилася більшою, ніж грамнегативних паличок, що можна пояснити різницею у будові клітинної стінки цих категорій бактерій та наявністю у грамнегативних мікроорганізмів ліпопротеїдів та ліпополісахаридів у зовнішній мембрані, які створюють бар'єр для проникнення дослідних сполук.

Комбінація цитратного буферу з антибіотиком збільшувала чутливість усіх еталонних штамів (табл. 1). У всіх досліджуваних групах мікроорганізмів зони затримки росту були більше, ніж 25 мм, що відповідало високому рівню чутливості еталонних штамів до дослідної композиції. Особливо зросла чутливість *E. coli* ATCC 25922 до запропонованої комбінації, яка збільшилась у 2,3 рази ($p < 0,05$). Виявлена здатність «Амоксиклаву» підвищувати чутливість мікроорганізмів до цитратного буферу може стати основою для розробки фармацевтичних композицій з цими компонентами, насамперед для зовнішнього застосування, в яких посилена антимікробна дія буде розвиватись за умов збереження низької токсичності.

Ми обрали хлоргексидин в якості позитивного контролю, тому що він досить широко використовується в ендодонтії в якості зрошувальної речовини або внутріканального лікарського засобу. Він володіє широким спектром антимікробної активності, субстантивний, тобто має залишкову бактерицидну дію, більш низько цитотоксичний в порівнянні з гіпохлоритом натрію (NaOCl) [9]. При цьому демонструє клінічну ефективність, особливо у випадках відкритої верхівки, резорбції або перфорації кореня або у випадках алергії, пов'язаної з відбілюючими розчинами та рекомендований як альтернатива NaOCl [10]. Тобто, після ірригації кореневих каналів розчином хлоргексидину залишаються мікроорганізми, що можуть спричинити запалення в періодонті. Наступним етапом ендодонтичного лікування є обтурація і саме на антисептичні властивості силера покладається вся надія для здійснення мікробного контролю в системі кореневих каналів.

При порівнянні отриманих результатів за умов використання цитратного буферу, його комбінації з антибіотиком та хлоргексидином в якості контролю, звертає увагу більша активність останнього до штамів представників транзиторної та нормальної мікрофлори порожнини рота, якими є *E. coli* ATCC 25922 та *M. lysodeicticus* ATCC 4698 і, навпаки, більш виражена активність дослідних композицій до штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів – стафілококів, ентерококів та дріжджеподібних грибів, що вказує на перевагу цитратного буферу та його комбінації з антибіотиком за

умов їх використання при лікуванні ускладненого карієсу.

Висновки

1. Музейний штам епідермального стафілококу виявив високу чутливість до цитратного буферу, яка вдвічі ($p < 0,05$) перевищувала цей показник по відношенню до 0,05% хлоргексидину біглюконату та значно збільшилась під впливом антибіотика.

2. Еталонний штам *S. aureus* ATCC 25923 також був високо чутливим до цитратного буферу та до його запропонованої комбінації з антибіотиком.

3. Штам *E. coli* ATCC 25922 мав помірну чутливість до цитратного буферу, але його комбінування з антибіотиком збільшувало антибактеріальну дію у 2,3 рази ($p < 0,05$).

4. Просліджувалось послідовне приростання в середньому на 5 мм чутливості ентерококу до дослідних речовин в напрямку хлоргексидин – цитратний буфер – цитратний буфер + «Амоксиклав».

5. Подібна картина спостерігалась по відношенню до еталонного штаму *S. albicans* ATCC10231, що свідчить про синергічну фунгіцидну дію антибіотика з цитратним буфером.

6. Еталонний штам непатогенного представника нормальної мікрофлори ротової порожнини *M. lysodeicticus* ATCC 4698 виявився слабо чутливим до цитратного буферу на відміну від 0,05% хлоргексидину біглюконату, що характеризує дослідну речовину як більш активну по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у порівнянні зі стабілізуючими колонізаційну резистентність організму людини бактеріями.

Перспективи подальших досліджень пов'язані із визначенням мінімальної інгібуючої рід еталонних штамів мікроорганізмів та мінімальної бактерицидної концентрації дослідних композицій.

Література

1. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, Rodrigues Lima A, Marciano M, Affonso de Almeida JF, De-Jesus Soares A, Zaia AA, Ferraz C, Gomes BP Microbiological Investigation in Teeth with Persistent/Secondary Endodontic Infection in Different Stages of Root Canal Retreatment. Eur Endod J. 2020 Dec;5(3):219-225.
2. Determination of microorganisms susceptibility to antibacterial preparations (Guidelines MUK 4.2.1890-04). In: Electronic foundation of legal and normative-technical documentation. 2004 Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200038583>
3. Determination of susceptibility to antimicrobial preparations. Clinical guidelines. Version 2018-03. 2018 Available from: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018>.
4. Bublil TD, Kostyrenko OP, Parfonova VS, Higher State Educational Institution "Ukrainian Medical Stomatological Academy", assignee. Method for impregnating dentin of the root canal of the tooth. Patent Ukraine №107843. 2016 June 24. (Ukrainian).
5. Scelza F, Zaccaro, Piero Viviane Scelza, Pantaleo, Pereira Mário. Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology 2004, Oct 01:499-503
6. Bublil TD, Kostyrenko OP, Higher State Educational Institution "Ukrainian Medical Stomatological Academy", assignee. Method for conservative treatment of pulpitis. Ukraine patent 135815. 2019 July 25. (Ukrainian).

7. Neetu Jain, Shalini Garg, Harjoy Khatria Impact of 6% citric acid and endoactivator as irrigation adjuncts on obturation quality and pulpctomy outcome in primary teeth Pediatric Dental Journal 18 June 2019.
8. Nogo-Živanović D, Kanjevac T, Bjelović L, Ristić V, Tanasković I. The effect of final irrigation with MTAD, QMix, and EDTA on smear layer removal and mineral content of root canal dentin. Microsc Res Tech. 2019 Jun;82(6):923-930.
9. Machado R, Garcia LDFR, da Silva Neto UX, Cruz Filho AMD, Silva RG, Vansan LP. Evaluation of 17% EDTA and 10% citric acid in smear layer removal and tubular dentin sealer penetration. Microsc Res Tech. 2018 Mar;81(3):275-282.
10. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. Braz Dent J. 2013;24(2):89-102.

Реферат

АНТИСЕПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦИТРАТНОГО БУФЕРА

Бублий Т.Д., Ганчо О.В., Костиренко А.П.

Ключевые слова: антисептические свойства, диско-диффузионный метод, цитратный буфер.

Антисептические свойства эндодонтических материалов могут быть полезны для осуществления микробного контроля в системе корневых каналов.

Цель работы – изучить чувствительность эталонных штаммов микроорганизмов к цитратному буфера и его комбинации с антибиотиком «Амоксиклав». Для решения поставленной цели использовали музейные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990, *E. faecalis* ATCC 29212, *M. lysodeicticus* ATCC 4698 и *C. albicans* ATCC10231. Чувствительность стандартных штаммов микроорганизмов к препаратам изучали диско-диффузионным методом, для контроля использовали хлоргексидина биглюконат 0,05%. В ходе нашего исследования установлено, что цитратный буфер имеет высокую антибактериальную активность. Комбинация цитратного буфера с антибиотиком увеличивала чувствительность всех эталонных штаммов. Штамм *E. coli* ATCC 25922 имел слабую чувствительность к цитратному буферу, но его комбинация с антибиотиком увеличивала антибактериальное действие в 2,3 раза ($p < 0,05$). Прослеживалось последовательное увеличение чувствительности энтерококков к исследуемым веществ в направлении хлоргексидин – цитратный буфер – цитратный буфер + «Амоксиклав». При сравнении полученных результатов с использованием цитратного буфера, его комбинации с антибиотиком и хлоргексидином в качестве контроля, обращает внимание меньшая активность последнего к штаммам представителей транзитной и нормальной микрофлоры полости рта, такими как *E. coli* ATCC 25922 и *M. lysodeicticus* ATCC 4698 и, наоборот, более выраженная активность исследуемых композиций в отношении к патогенным и условно-патогенным штаммам микроорганизмов: стафилококкам, энтерококкам и дрожжеподобным грибам, что указывает на превосходство цитратного буфера и его комбинации с антибиотиком при лечении осложненного кариеса.

Summary

ANTISEPTIC PROPERTIES OF CITRATE BUFFER

Bubly T.D., Gancho O.V., Kostirenko A.P.

Key words: antiseptic properties, disco-diffusion method, citrate buffer.

The antiseptic properties of endodontic materials are used for microbial control in root canals. Decrease in microflora is known as one of key demands for root canal therapy. The aim of this work is to study the sensitivity of reference strains of microorganisms to citrate buffer and its combination with the antibiotic «Amoxiclav». We used the museum strains of *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990, *E. faecalis* ATCC 29212, *M. lysodeicus* ATCC 4698 and *C. albicans* ATCC10231 to solve this task. The disk-diffusion method for assessing the sensitivity of standard strains of microorganisms was used. We used chlorhexidine digluconate 0.05% as a control. Citrate buffer has high antibacterial activity. The combination of citrate buffer with antibiotic increases the sensitivity of all reference strains. *E. coli* ATCC 25922 demonstrates a moderate sensitivity to citrate buffer. This combination with an antibiotic increases the antibacterial effect in 2.3 times ($p < 0.05$). The sensitivity of enterococci increases towards the direction of chlorhexidine – citrate buffer – citrate buffer + «Amoxiclav». When comparing the results obtained using citrate buffer, its combination with antibiotic and chlorhexidine as a control, we should stress on the lower activity of chlorhexidine to strains of transient and normal oral microflora, which are *E. coli* ATCC 25922 and *M. lysodeisticus* ATCC 4698. On the contrary, we have revealed more pronounced action of experimental compositions against strains of pathogenic and opportunistic microorganisms, staphylococci, enterococci and yeast-like fungi that points out the advantage of citrate buffer and its combination with antibiotic «Amoxiclav» in terms of their use in the treatment of complicated caries.