

DOI: 10.26693/jmbs06.01.184

УДК 616. 314 – 002 - 089: 615. 281. 9

Чистякова Г. Г., Скороход Г. А., Походенько-Чудакова И. О.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРГЕКСИДИНА БИГЛЮКОНАТА ПО ОТНОШЕНИЮ К БИОПЛЕНОЧНЫМ МОНОКУЛЬТУРАМ

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь

ip-c@yandex.ru

На фоне высокого процента заболеваемости кариесом растет распространенность его осложнений – пульпита, апикального периодонтита. Зубы с осложненным кариесом могут быть причиной возникновения одонтогенных воспалительных процессов челюстно-лицевой области. Они, являясь очагами хронической инфекции и интоксикации, оказывают неблагоприятное влияние на организм в целом. В связи с изложенным, очевидно, что определение оптимальной концентрации хлоргексидина биглюконата и экспозиции его воздействия на дентин коронковой части зуба при кариозном поражении последнего на текущий момент весьма актуально.

Цель исследования – оценить антимикробную активность хлоргексидина в различных концентрациях в отношении монокультур биопленки сформированных на шлифах образцов зубов и в П-образных 96-луночных пластиковых планшетах.

В качестве модели использовали *S. aureus*, относящийся к наиболее мощным возбудителям, образующим биопленки. Оценку антимикробной активности хлоргексидина биглюконата проводили на биопленочных культурах *S. aureus* и *E. coli*, сформированных на образцах зубов и в полистироловых пластиковых планшетах по фактору редукции.

Результаты показали, что 2,0 % раствор хлоргексидина биглюконата обладает высоким уровнем антибактериальной активности в отношении планшетных биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli*. При его воздействии на планшетные биопленочные культуры *S. aureus* и *E. coli* в течение 30 и 60 секунд имеется достоверная разница ($p=0,02$). Имеются достоверные различия по эффекту чувствительности одновидовых биопленочных культур образцов зубов к воздействию указанного антисептика ($p=0,007$). Уровень его антибактериальной активности в отношении планшетных биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli* значимо выше, чем у биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli* образцов зубов ($p < 0,05$).

Результаты обосновывают их применению в клинике, что будет способствовать уменьшению числа осложнений и повышению уровня оказания стоматологической помощи.

Ключевые слова: кариес, хлоргексидин биглюконат, антимикробная активность, биопленки.

Введение. На фоне высокого процента заболеваемости кариесом растет распространенность его осложнений – пульпита, апикального периодонтита [1, 2]. Зубы с осложненным кариесом могут быть причиной возникновения одонтогенных воспалительных процессов челюстно-лицевой области. Они, являясь очагами хронической инфекции и интоксикации, оказывают неблагоприятное влияние на организм в целом [3, 4]. Несмотря на достигнутые успехи при лечении и профилактике неосложненного кариеса, доля его осложнений сохраняет высокие значения (35% от общего числа стоматологических заболеваний Ю. М. Максимовский 2005; А. В. Митронин 2011). В Республике Беларусь данный показатель составляет 39 % в структуре стоматологической патологии (П. А. Леус, 2014). Наиболее частой причиной осложнений лечения кариеса является неполное удаление инфицированного дентина. Однако наряду с этим в специальной литературе встречается информация о том, что после препарирования глубокой кариозной полости зуба его твердые ткани остаются инфицированными (А. А. Бритова, 2007). В данной ситуации очевидна острая необходимость эффективных и доступных для врача-стоматолога антисептических средств. В связи с широким распространением заболеваний пульпы и периодонта лечение кариеса глубоких полостей приобретает особое значение в современной стоматологии, успех которого во многом зависит от эффективности воздействия на микробный фактор [5]. Стафилококки общепризнаны наиболее значимыми микроорганизмами, вызывающими у человека заболевания, ассоциированные с биопленками. Этот статус обусловлен их высокой встречаемостью в составе резидентной микрофлоры полости рта и в полимикробном пейзаже кариозной полости [6].

Матрикс биопленки, состоящий из воды, внеклеточных полимерных веществ – экзополисахаридов, протеинов, липидов, нуклеиновых и тейхоевых кислот, обладает сильными сорбционными свойствами и является биохимически активной системой, в которой происходят

разнообразные химические реакции, в том числе накапливаются ферменты, приводящие к разрушению и нейтрализации антимикробных лекарственных средств (ЛС). Таким образом, матрикс защищает микробные клетки в составе биопленки от физических и химических воздействий. По данным специальной литературы, многовидовые биопленки значительно более устойчивы к антибактериальной терапии и дезинфекции, чем одновидовые [7, 8, 9]. Ряд исследователей указывает что, одним из наиболее вероятных механизмов повышения устойчивости микроорганизмов в составе многовидовой биопленки является изменение состава экзополисахаридного матрикса, определяемого видом бактерий и условиями окружающей среды, обеспечивающими наилучшую защиту от антимикробных ЛС [8, 10, 11]. На современном уровне особое внимание уделяется препаратам и их минимальной подавляющей концентрации (МПК), обладающей как антимикробными свойствами, так и способностью эффективно разрушать и удалять поливидовые биопленки с поверхности твердых тканей зубов [8, 12, 13].

Хлоргексидин (ХГ) – антисептическое средство, активное в отношении вегетативных форм грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, грибов рода *Candida*, липофильных вирусов, золотистого стафилококка, пародонтопатогенных микроорганизмов. В зависимости от используемой концентрации проявляет бактериостатическое или бактерицидное действие. Может использоваться в разных концентрациях от 0,01 % до 5 % в виде водных или спиртовых растворов. Действие хлоргексидина основано на способности находиться в длительном контакте с отрицательно заряженными бактериями (сам он обладает сильно выраженным положительным зарядом), что приводит к разрыву клеточной мембраны, которая под влиянием препарата оказывается не способной поддерживать осмотический баланс [14, 15]. Хлоргексидин широко используется в стоматологической практике для обработки, как коронкового, так и корневого дентина. Однако имеются данные о том, что дентин и дентинные компоненты, включая коллаген, значительно снижают его антимикробное действие, вплоть до полного ингибирования [16, 17]. Результаты ряда исследователей свидетельствуют о том, что уровень антимикробной активности хлоргексидина прямо пропорционален его концентрации, с его уменьшением которой зона задержки роста микроорганизмов уменьшается [16]. В немногочисленных публикациях отмечено, что значимых различий антимикробного воздействия 0,5 % и 1 % растворов хлоргексидина на *S. aureus* и *E. coli* по зоне задержки роста не установлено [18]. В связи с изложенным выше материалом,

очевидно, что определение оптимальной концентрации хлоргексидина биглюконата и экспозиции воздействия на дентин коронковой части зуба при кариозном поражении последнего на текущий момент весьма актуально [19, 20, 21].

Цель исследования – оценить антимикробную активность хлоргексидина (суспензионным и контактными методом) в различных его концентрациях в отношении монокультур биопленки сформированных на шлифах образцов зубов и в П-образных 96-луночных пластиковых планшетах.

Материал и методы исследования. Исследования антимикробной активности хлоргексидина биглюконата проведены на базе научно-исследовательской части учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет». В данной работе в качестве модели был использован один из актуальных для современной медицины возбудителей – золотистый стафилококк, который относится к наиболее мощным возбудителям, образующим биопленки. Объектами для исследования служили референтные штаммы *S. aureus* ATCC 6538 и *E. coli* ATCC 11229. Рабочие растворы хлоргексидина готовили путем разведения базового 2,0 % раствора.

Оценку антимикробной активности ХГ проводили на биопленочных культурах *S. aureus* и *E. coli*, сформированных на образцах зубов и в полистироловых пластиковых планшетах. Биопленочные бактериальные культуры формировали в П-образных лунках стерильных одноразовых 96-луночных пластиковых планшетах. В качестве тест-культур использовали эталонные штаммы *S. aureus* и *E. coli*. Суспензии эталонных 24 часовых тест-культур, выращенные на скошенном агаре, готовили смывом, осуществляемым физиологическим раствором с последующей стандартизацией по McFarland до $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Стандартизованные бактериальные суспензии разводили в триптиказо-соевом бульоне (ТСБ) в соотношении 1/10 и вносили по 200,0 мкл в 12 лунок вертикального ряда планшета. Последние закрывали крышками и помещали в термостат при 37°C на 48 часов для формирования биопленочных культур. После извлечения из термостата из всех лунок удаляли суспензионную культуру бактерий, сохраняя биопленочную, сформированную на их поверхности. Затем, в лунки вносили по 250,0 мкл хлоргексидина в концентрациях 0,05 %; 0,5 %; и 2,0 % (по три лунки для каждой). Оставшиеся 3 лунки данного ряда использовали в качестве контроля интактной биопленочной культуры. Через 1 минуту хлоргексидин из лунок удаляли, поверхность планшета (для предотвращения высыхания биопленочной культуры) плотно покрывали пленкой, закрывали крышкой и помещали в термостат при 37 °C на 1 час.

По истечении указанного времени планшеты извлекали из термостата, во все опытные и контрольные лунки данного ряда, и в последующие ряды вносили по 200,0 мкл ТСБ. В опытных и контрольных лунках выполняли механическое ресуспендирование биопленочных культур с их дальнейшими 10-ти кратными разведениями в ТСБ последующих рядов лунок. Полученные разведения высевали на чашки с селективными средами (желточно-солевого агара (ЖСА) – для стафилококка и среды Левина – для кишечной палочки) для определения числа жизнеспособных клеток в биопленочных культурах опытных и контрольных лунок [22, 23].

Антимикробную активность оценивали по фактору редукции (RF) – определяемому по разнице количества десятичных логарифмов КОЕ/мл в опыте по сравнению с контролем [22, 24].

Для формирования биопленочных культур шлифы образцов зубов помещали в пробирки с суспензиями тест-культур *S. aureus* и *E. coli* в концентрации $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл, приготовленными на ТСБ и выдерживали в термостате при 37 °С в течение 2 суток. После извлечения из термостата образцов со сформированной биопленочной культурой в течение 1 минуты их подвергали воздействию различных концентраций ХГ путем внесения 1,0 мл 0,05%, 0,5% и 2,0% его растворов. После этого каждый из образцов переносили в отдельную стерильную чашку Петри с удалением избытка ХГ стерильным ватным тампоном и дальнейшим высушиванием образцов в закрытой чашке в термостате при 37 °С в течение 1 часа. Затем образцы переносили из чашек в пробирки с 1,0 мл ТСБ и выдерживали в термостате при 37 °С в течение суток. После извлечения из термостата, для ресуспендирования биопленочных культур пробирки с образцами встряхивали на шуттель-аппарате, с последующим высевам ТСБ в объеме 100,0 мкл на чашки с плотной питательной средой для определения наличия жизнеспособных бактерий.

Для оценки возможного высвобождения ХГ из зубной ткани, в ТСБ с образцами, дополнительно вносили по 100,0 мкл суспензии тест-культур *S. aureus* и *E. coli* в объеме 100,0 мкл в концентрации $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл и тщательно перемешивали. После инкубации в термостате в течение 24 часов, с целью установления наличия пролонгированного действия, по 100,0 мкл ТСБ высевали на плотные питательные среды для определения наличия жизнеспособных бактерий. Количество КОЕ/мл рассчитывали по формуле:

$$\text{КОЕ/мл} = n \cdot \text{ФДП} \cdot \text{ФР},$$

где n – число колоний на чашке с определенным разведением; ФДП – фактор посевной дозы (посевная доза 100 мкл – 0,1 мл); ФР – фактор разведения (10^n) [22].

Для качественной оценки жизнеспособных особей в биопленке, смоделированной на поверхности твердых тканей зубов, после воздействия 0,2 % раствора хлоргексидина биглюконата шлифы образцов высушивали и помещали на среды чашек Петри для стафилококка – на ЖСА, для кишечной палочки – на среды Левина с последующей инкубацией в термостате в течение суток. Фактор редукции для каждого опыта рассчитывали, как разность логарифмов числа жизнеспособных бактерий (КОЕ/мл) смывной жидкости. Средние значения и 95% доверительные интервалы оценивали на основе модели смешанных эффектов [25]. Частные сравнения (по группам и временным точкам) проводили на основании полученных моделей поведения фактора редукции с помощью t-критерия с аппроксимацией степеней свободы по Саттервейту. Все расчеты выполняли в статистическом пакете R, версия 3.6. Результаты анализа считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [26].

Результаты исследования и их обсуждение. В количественном суспензионном методе для биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli*, сформированных в П-образных лунках стерильных одноразовых 96-луночных пластиковых планшетах определены КОЕ/мл и факторы редукции (RF) числа биопленочных микробов в опыте по сравнению с контролем. Для антисептика хлоргексидина испытаны 0,05 %; 0,5 %; и 2,0 % концентрации при экспозиции 60 секунд. Результаты определения числа жизнеспособных бактерий (КОЕ/мл) в смывной жидкости интактной биопленки и после воздействия различных концентраций хлоргексидина на биопленочные культуры *S. aureus* и *E. coli* представлены в **таблицах 1-4**.

Таблица 1 – Количество жизнеспособных бактерий (КОЕ/мл смывной жидкости) интактной и подвергнутой воздействию различных концентраций хлоргексидина биопленочной культуры *S. aureus*

Серии исследования	Интактная культура	Воздействие ХГ		
		0,05% ХГ	0,5 % ХГ	2,0 % ХГ
1	$1,1 \times 10^9$	$8,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^2$
2	$1,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	$9,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^2$
3	$9,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$6,0 \times 10^2$
4	$1,7 \times 10^9$	$1,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3$
5	$1,3 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^3$
6	$8,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$
7	$3,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$
8	$2,2 \times 10^9$	$2,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^6$	$9,0 \times 10^2$
9	$1,9 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	$2,7 \times 10^6$	$8,5 \times 10^2$

Таблиця 2 – Количество жизнеспособных бактерий (lgКОЕ/мл смывной жидкости) интактной и подвергнутой воздействию различных концентраций хлоргексидина биопленочной культуры *S. aureus*

Исследование	Интактная культура	Воздействие ХГ		
		0,05% ХГ	0,5 % ХГ	2,0 % ХГ
1	9,04	7,90	5,85	2,54
2	9,08	8,20	5,95	2,65
3	8,98	8,00	6,18	2,78
4	9,23	8,28	6,04	3,11
5	9,11	8,20	6,28	3,32
6	8,93	8,08	6,08	3,20
7	9,56	8,23	6,32	3,00
8	9,34	8,45	6,26	2,95
9	9,28	8,48	6,43	2,93

Таблиця 3 – Количество жизнеспособных бактерий (КОЕ/мл смывной жидкости) интактной и подвергнутой воздействию различных концентраций хлоргексидина биопленочной культуры *E. coli*

Серии исследования	Интактная культура	Воздействие ХГ		
		0,05% ХГ	0,5 % ХГ	2,0 % ХГ
1	$2,8 \times 10^8$	$3,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^4$	$\leq 5,0 \times 10^1$
2	$4,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$	$\leq 5,0 \times 10^1$
3	$2,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^4$	$\leq 5,0 \times 10^1$
4	$2,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^3$	$\leq 5,0 \times 10^1$
5	$1,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	$9,0 \times 10^3$	$\leq 5,0 \times 10^1$
6	$1,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^6$	$7,5 \times 10^3$	$\leq 5,0 \times 10^1$
7	$5,5 \times 10^7$	$9,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$\leq 5,0 \times 10^1$
8	$8,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$3,1 \times 10^4$	$\leq 5,0 \times 10^1$
9	$9,5 \times 10^7$	$9,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$\leq 5,0 \times 10^1$

Таблиця 4 – Количество жизнеспособных бактерий (lgКОЕ/мл смывной жидкости) интактной и подвергнутой воздействию различных концентраций хлоргексидина биопленочной культуры *E. coli*

Исследование	Интактная культура	Воздействие ХГ		
		0,05% ХГ	0,5 % ХГ	2,0 % ХГ
1	8,45	6,58	4,11	$\leq 1,7$
2	8,66	6,41	4,38	
3	8,40	6,18	4,41	
4	8,34	6,04	3,78	
5	8,26	6,30	3,95	
6	8,08	6,26	3,88	
7	7,74	5,98	4,32	
8	7,93	6,08	4,49	
9	7,98	5,95	4,28	

Интерпретируя результаты исследования, представленные в **таблицах 1, 2, 3 и 4** выявлено снижение логарифмического числа по интенсив-

ности деления культур биопленки в зависимости от концентрации хлоргексидина биглюканата. Наиболее устойчивой к воздействию антисептика оказалась культура биопленки *S. aureus*. Однако с увеличением концентрации антисептика фаза деления клеток снижалось. При концентрации хлоргексидина 2,0 % прирост клеток принял стационарную фазу, логарифмическое число составило $\lg 2,9 \text{ КОЕ/мл}$.

При сравнении антимикробной активности хлоргексидина от его рабочей концентрации в отношении биопленочных культур установлены различные значения $\lg \text{КОЕ/мл}$. Для биопленочной культуры *E. coli* при воздействии 0,05 % и 0,5 % ХГ зарегистрировано значение $\lg 6,2 \text{ КОЕ/мл}$ и $\lg 4,2 \text{ КОЕ/мл}$. С увеличением концентрации возрастала депрессия деления клеток у культуры *E. coli*. После воздействия 2,0 % раствором хлоргексидина биглюканата рост культуры биопленки не отмечали. Снижение количества жизнеспособных бактерий КОЕ/мл смывов подвергнутой воздействию различных концентраций хлоргексидина биопленочной культуры *S. aureus* и *E. coli* иллюстрирует **рисунок 1**.

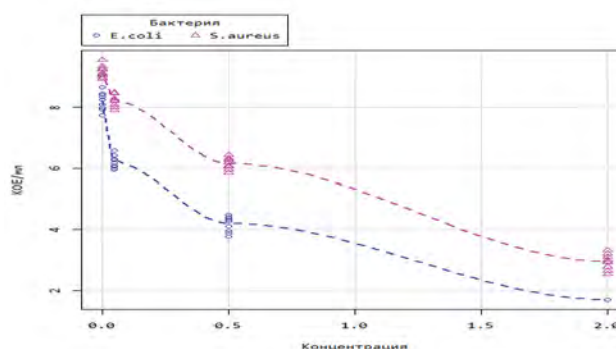


Рис. 1. Гистограмма зависимости логарифма КОЕ/мл от концентрации антисептика

Полученные результаты антимикробной активности исследованного антисептика в отношении планшетных биопленочных культур свидетельствует о различных значениях коэффициента редукции в зависимости от его концентрации. Высокую антимикробную активность проявил ХГ в 2,0 % концентрации по отношению культурам биопленки *S. aureus* и *E. coli*, фактор редукции составил 6,23 и 6,5, соответственно.

Менее выраженной антимикробной активностью характеризовался ХГ в рабочей концентрации 0,5 % по отношению культурам биопленки *S. aureus* и *E. coli*, для которой фактор редукции был 3,02 и 4,02, соответственно. Самой наименьшей антимикробной активностью характеризовался ХГ в рабочей концентрации 0,05 % по отношению к биопленочным культурам *S. aureus* и *E. coli*, для которой установлен фактор редукции 0,97 и 2,01, соответственно (**рис. 2**).

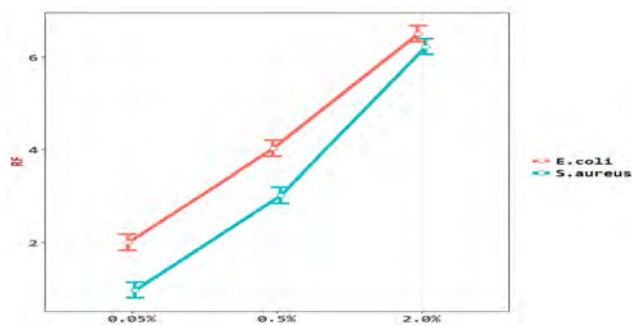


Рис. 2. Результаты антимикробной активности хлоргексидина различной концентрации на биопленочные культуры по фактору редукции

Результаты определения числа жизнеспособных бактерий (КОЕ/мл) в смывной жидкости интактной биопленки и после воздействия 2,0 % концентрации хлоргексидина в течение 30 секунд на биопленочные культуры *S. aureus* и *E. coli* представлены в **таблицах 5 и 6**.

Таблица 5 – Количество жизнеспособных бактерий (КОЕ/мл смывной жидкости) интактной и подвергнутой воздействию ХГ в концентрации 2,0 % с экспозицией 30 секунд планшетной биопленочной культуры *S. aureus*

Серии исследования	Интактная культура	Воздействие, ХГ 2,0%-30 сек	Lg КОЕ/мл инт. культ.	Lg КОЕ/мл Воздейст. ХГ 2,0%-30 сек	RF
1	1,5x10 ⁹	8,5x10 ³	9,2	3,9	5,2
2	2,0x10 ⁹	2,5x10 ³	9,3	3,4	5,9
3	6,0x10 ⁹	6,0x10 ³	9,8	3,8	6,0
4	1,1x10 ⁹	3,5x10 ²	9,0	2,5	6,5
5	7,5x10 ⁸	4,5x10 ³	8,9	3,7	5,2
6	9,5x10 ⁸	5,5x10 ³	9,0	3,7	5,2
7	5,5x10 ⁹	8,0x10 ³	9,7	3,9	5,8
8	3,5x10 ⁹	1,0x10 ³	9,5	3,0	6,5
9	7,0x10 ⁸	2,0x10 ³	8,8	3,3	5,5

Представленные **таблицы 5 и 6** иллюстрируют результаты антимикробной активности протестированного антисептика в отношении планшетных биопленочных культур при экспозиции 30 секунд. В ходе анализа результатов исследования было установлено, что ХГ в 2,0 % концентрации проявил высокую антимикробную активность по отношению культурам биопленки *S. aureus* и *E. coli*, фактор редукции составил 5,8 и 6,4, соответственно ($p < 0,001$).

В ходе анализа результатов исследования было установлено, что ХГ в концентрации 2,0 % проявил высокую антимикробную активность по отношению культурам биопленки *S. aureus* и *E. coli*, фактор редукции которых представлен в **таблице 7**.

Таблица 6 – Количество жизнеспособных бактерий (КОЕ/мл смывной жидкости) интактной и подвергнутой воздействию ХГ в концентрации 2,0 % с экспозицией 30 секунд планшетной биопленочной культуры *E. coli*

Серии исследования	Интактная культура	Воздействие, ХГ 2,0%-30 сек	Lg КОЕ/мл инт. культ.	Lg КОЕ/мл Воздейст. ХГ 2,0%-30 сек	RF
1	1,7x10 ⁸	≤5,0x10 ¹	8,2	1,7	6,5
2	1,1x10 ⁸		8,0	1,7	6,3
3	7,0x10 ⁷		7,8	1,7	6,1
4	9,5x10 ⁷		8,0	1,7	6,3
5	1,4x10 ⁸		8,1	1,7	6,4
6	2,0x10 ⁸		8,3	1,7	6,6
7	6,5x10 ⁷		7,8	1,7	6,1
8	1,6x10 ⁸		8,2	1,7	6,5
9	1,9x10 ⁸		8,3	1,7	6,6

Таблица 7 – Результаты антимикробной активности 2,0 % раствора хлоргексидина от экспозиции воздействия на планшетные биопленочные культуры по фактору редукции, среднее (95% ДИ)

Биопленочные культуры	Время воздействия	RF среднее, (95% ДИ)	p-value
<i>S. aureus</i>	30 секунд	5,8 (5,4–6,2)	<0,001
<i>E. coli</i>	30 секунд	6,4 (6,3–6,5)	<0,001
<i>S. aureus</i>	60 секунд	6,2 (6,0–6,5)	<0,001
<i>E. coli</i>	60 секунд	6,5 (6,3–6,7)	<0,001

При попарном сравнении воздействия 2,0 % концентрации хлоргексидина биглюконата на планшетные биопленочные культуры *S. aureus* и *E. coli* с экспозицией 30 и 60 секунд установлены статистически значимые различия ($p = 0,02$).

Результаты определения числа жизнеспособных клеток интактной культуры биопленки *S. aureus* и *E. coli*, культивированной на образцах зубов (контроль) и после воздействия различной концентрации хлоргексидина биглюконата в течение 60 секунд представлены в **таблицах 8 и 9**.

Из **таблиц 8 и 9** следует, что интактные культуры биопленки имеют высокое логарифмическое число, которое носит стационарный характер и свидетельствует о высоком уровне жизнеспособных клеток. Результаты определения количества жизнеспособных особей биопленочных культур образцов зубов в смывах после воздействия различных концентраций хлоргексидина показывают, что антисептик характеризуется определенным уровнем антимикробной активности, находящимся в прямой зависимости от концентрации.

Выявлено снижение логарифмического числа интенсивности деления биопленочных культур

Таблиця 8 – Результати определения количества жизнеспособных микроорганизмов (КОЕ/мл) интактной культуры биопленки (контроль) в 1 мл смывов биопленки и после воздействия различной концентрации хлоргексидина

Концентрация ХГ (%)	S. aureus			Концентрация ХГ (%)	E. coli		
	1	2	3		1	2	3
контроль	1,3x10 ⁸	1,3x10 ⁸	1,3x10 ⁸	контроль	1,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸
0,05	1,3x10 ⁶	1,7x10 ⁶	3,3x10 ⁵	0,05	5,0x10 ⁶	3,5x10 ⁶	1,4x10 ⁶
0,2	6,0x10 ⁵	9,0x10 ⁵	8,0x10 ⁴	0,2	3,5x10 ⁵	1,1x10 ⁵	8,0x10 ⁵
0,5	2,9x10 ⁵	1,3x10 ⁴	3,3x10 ⁴	0,5	2,9x10 ⁴	8,0x10 ⁴	4,3x10 ⁵
2,0	8,0x10 ²	1,6x10 ²	5,0x10 ²	2,0	9,0x10 ²	1,0x10 ³	2,6x10 ³

Таблиця 9 – Результаты определения количества жизнеспособных микроорганизмов (lgКОЕ/мл) в смывах биопленки после воздействия различных концентраций хлоргексидина

Концентрация ХГ (%)	S. aureus			Концентрация ХГ (%)	E. coli		
	Lg	Lg	Lg		Lg	Lg	Lg
	КОЕ/мл	КОЕ/мл	КОЕ/мл		КОЕ/мл	КОЕ/мл	КОЕ/мл
контроль	8,11	8,11	8,11	контроль	8,04	8,04	8,04
0,05	6,11	6,23	5,52	0,05	5,70	6,54	6,15
0,2	5,78	5,95	4,90	0,2	5,54	5,04	4,90
0,5	5,46	4,11	4,52	0,5	4,46	4,90	5,63
2,0	2,90	2,20	2,70	2,0	2,95	3,00	3,41

S. aureus и *E. coli* в зависимости от концентрации хлоргексидина биглюконата. Наибольшая депрессия деления клеток зарегистрирована у культуры *S. aureus*. При воздействии 2,0 % раствором хлоргексидина биглюконата установлено среднее значение lg2,6КОЕ/мл, дальнейший рост культуры биопленки не отмечали. Наиболее устойчивой к воздействию антисептика оказалась культура биопленки *E. coli* логарифмическое число составило lg3,12КОЕ/мл. Однако с увеличением концентрации антисептика фаза деления клеток снижалась. При концентрации 2,0 % прирост клеток принял стационарную фазу.

Полученные результаты антимикробной активности исследованного антисептика в отношении биопленочных культур образцов зубов свидетельствуют о различных значениях коэффициента редукции в зависимости от его концентрации. Высокую антимикробную активность проявил ХГ в 2,0 % концентрации по отношению культурам биопленки *S. aureus* и *E. coli*, фактор редукции составил 5,51 и 4,92, соответственно. Менее выраженной антимикробной активностью характеризовался ХГ в рабочей концентрации 0,5 % по отношению культурам биопленки *S. aureus* и *E. coli*, для которой фактор редукции составил 3,42 и 3,04, соответственно. Наименьшей антимикробной активностью характеризовался ХГ в рабочей концентрации 0,2 % по отношению к биопленочным культурам *S. aureus* и *E. coli*, для которой установлен фактор редукции 2,57 и 2,88, соответственно. Самой наименьшей

антимикробной активностью характеризовался ХГ в рабочей концентрации 0,05 % по отношению к биопленочным культурам *S. aureus* и *E. coli*, для которой установлен фактор редукции 2,16 и 1,58, соответственно (рис. 3).

При попарном сравнении воздействия тестируемых концентраций хлоргексидина биглюконата на биопленочные культуры образцов зубов установлены статистически значимые различия, отраженные в таблице 10.

Следующий аспект исследования

был продиктован определением антибактериальной активности 2,0 % раствора хлоргексидина биглюконата от времени его воздействия на биопленочные культуры образцов зубов.

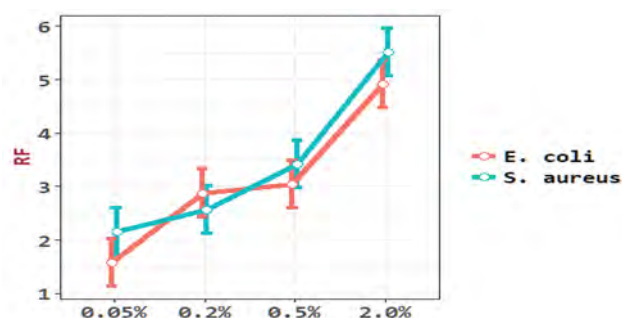


Рис. 3. Результаты антимикробной активности хлоргексидина различной концентрации на биопленочные культуры образцов зубов по фактору редукции

Таблиця 10 – Результаты попарного сравнения антимикробной активности хлоргексидина различных концентраций на биопленочные культуры образцов зубов

Пары сравниваемых концентраций хлоргексидина биглюконата		p-value
0,05%	0,20%	<0,001
0,05%	0,50%	<0,001
0,05%	2,00%	<0,001
0,20%	0,50%	0,023
0,20%	2,00%	<0,001
0,50%	2,00%	<0,001

В ходе анализа результатов исследования было установлено, что ХГ в 2,0 % концентрации проявил высокую антимикробную активность по отношению культурам биопленки *S. aureus* и *E. coli*. Результаты фактора редукции антимикробной активности протестированного антисептика в отношении указанных биопленочных культур на образцах зубов были следующими. При экспозиции 30 секунд антимикробная активность исследуемой концентрации ХГ составила 4,9 (4,8-5,1) и 4,9 (4,8-5,0), соответственно ($p < 0,001$). При экспозиции 60 секунд – 5,3 (5,1-5,5) и 5,0 (4,9-5,1), соответственно ($p < 0,001$) (рис. 4).

Однако при попарном сравнении воздействия 2,0 % концентрации хлоргексидина биглюконата на биопленочные культуры *S. aureus* и *E. coli* образцов зубов с экспозицией 30 и 60 секунд установить статистически значимые различия не представилось возможным, но была констатирована тенденция к достоверному различию ($p = 0,086$).

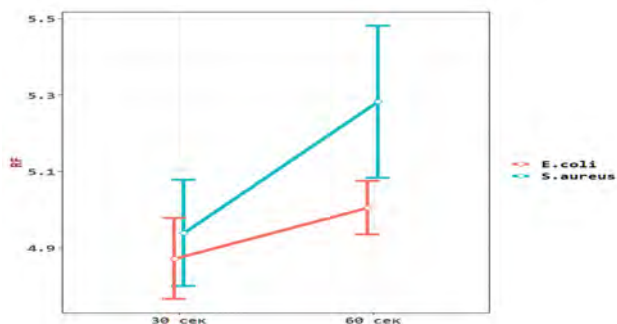


Рис. 4. Результаты антимикробной активности 2,0 % раствора хлоргексидина от времени воздействия на биопленочные культуры образцов зубов по фактору редукции

Результаты качественной оценки жизнеспособных микроорганизмов в биопленке, смоделированной на поверхности твердых тканей зубов, после воздействия 0,2 % раствором хлоргексидина биглюконата выявили зоны роста бактерий на среде ЖСА для стафилококка и на среде Левина – для кишечной палочки (рис. 5, 6).

Полученные данные иллюстрируют, что после обработки биопленочных культур на поверхности твердых тканей образцов зубов 1,0 % раствором хлоргексидина биглюконата зона роста бактерий на среде ЖСА для стафилококка не выявлена, но констатирована на средах Левина для кишечной палочки.

Таким образом, проведенное исследование антибактериальной активности хлоргексидина биглюконата в различных концентрациях и по времени экспозиции на планшетные культуры биопленки и культуры биопленки, культивированные на образцах зубов, позволило установить следующее.

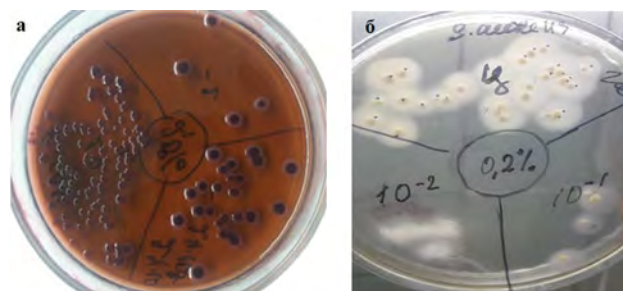


Рис. 5. Оценка антимикробной активности 0,2 % раствора хлоргексидина биглюконата к биопленочным культурам образцов зубов в 1 мл смыва:

а – количественный высев на чашечные среды Левина; б – количественный высев на чашечные среды ЖСА

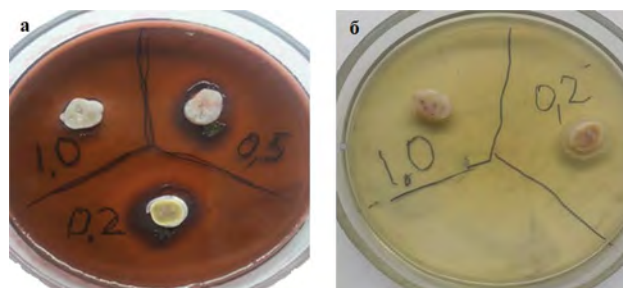


Рис. 6. Контактный метод оценки антимикробной активности раствора хлоргексидина биглюконата в различных концентрациях:

а – нанесение образцов зубов с биопленочной культурой *E. coli* после воздействия различными концентрациями хлоргексидина биглюконата на среды Левина через 24 часа; б – нанесение образцов зубов с биопленочной культурой *S. aureus* после воздействия различными концентрациями хлоргексидина биглюконата на среды ЖСА через 24 часа

Во-первых, 2,0 % раствор хлоргексидина биглюконата обладает высоким уровнем антибактериальной активности в отношении планшетных биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli* ($p < 0,001$). При воздействии 2,0 % концентрации хлоргексидина биглюконата на планшетные биопленочные культуры *S. aureus* и *E. coli* с экспозицией 30 и 60 секунд установлены статистически значимые различия ($p = 0,02$). Эти результаты согласуются со сведениями Н. А. Дмитриевой и соавт. (2013) и не противоречат сообщению Д. В. Квашиной, О. В. Ковалишеной (2018) [16, 18].

Во-вторых, при воздействии 2,0 % концентрации хлоргексидина биглюконата на биопленочные культуры образцов зубов *S. aureus* и *E. coli* с экспозицией 30 и 60 секунд статистически значимые различия не установлены ($p = 0,086$). Определены статистически значимые различия по эффекту чувствительности одновидовых биопленочных культур образцов зубов к воздействию 2,0 % раствора хлоргексидина биглюконата

($p=0,007$). Так як в соответствии с данными специальной литературы известно, что в кариозной полости одновидовых биопленочных культур не существует [27, 28], считаем, что высокий уровень антибактериальной активности можно получить при воздействии 2,0 % раствором хлоргексидина биглюконата с экспозицией от 30 до 60 секунд. Уровень антибактериальной активности 2,0 % раствор хлоргексидина биглюконата в отношении планшетных биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli* значимо выше, чем у биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli* образцов зубов ($p<0,05$). Эти данные представляют собой принципиально новые оригинальные результаты, обладающие высоким уровнем научной новизны и имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение.

Заключение. Полученные результаты дают основание заключить, что высокий уровень антибактериальной активности 2,0 % раствором хлоргексидина биглюконата можно получить при

воздействии с экспозицией 30-60 секунд. При этом данный показатель указанного антисептического раствора по отношению планшетных биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli* является достоверно более высоким, чем у биопленочных культур *S. aureus* и *E. coli* образцов зубов, что необходимо учитывать при использовании антисептической обработки кариозных полостей в условиях клиники.

Перспективы исследования. Полученные результаты дают основания для использования их в клинической практике с целью повышения эффективности лечения кариеса. Это будет способствовать уменьшению числа его осложнений и снижению показателя острой одонтогенной инфекции, что, с одной стороны, соответствует основному направлению медицины – профилактике, а, с другой стороны, повышает уровень оказания специализированной медицинской помощи населению в целом.

References

1. Glukhova EA, Mezhevnikina GS. Kliniko-laboratornoe obosnovanie jeffektivnosti jendodonticheskogo lechenija [Clinical and laboratory substantiation of efficiency endodontic treatment]. *Sci of the Young (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(2): 294-300. [Russian]. doi: 10.23888/HMJ201972294-300
2. Rôças IN, Alves FRF, Rachid CTCC, Lima KC, Assunção IV, Gomes PN, et al. Microbiome of deep dental caries lesions in teeth with symptomatic irreversible pulpitis. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0154653. doi: 10.1371/journal.pone.0154653
3. Shashmurina VR, Kupreeva IV, Devlikanova LI, Lubinskaya EV, Mishutina OL. Klinicheskij opyt terapii hronicheskogo apikal'nogo periodontita [Clinical experience of chronic apical periodontitis therapy]. *Bull of the Smolensk State Med. Academ.* 2018; 17(1): 160-6. [Russian]
4. Bagul R, Chandan S, Sane VD, Patil S, Yadav D. Comparative evaluation of C-reactive protein and WBC count in fascial space infections of odontogenic origin. *J Maxillofac Oral Surg*. 2017; 16(2): 238-42. doi: 10.1007/s12663-016-0953-z
5. Zotova AS, Konnov SV, Mikailova VA. Antispetiki dlja obrabotki kornevyh kanalov, ispol'zuemye pri pul'pitah i periodontitah: raznovidnosti i osobennosti [Antispetics for root canal treatment used for pulpitis and periodontitis: varieties and features]. *Bull of Med Internet Conf*. 2016; 6(6): 1099-100. [Russian]
6. Mashima I, Nakazawa F. Interaction between *Streptococcus* spp. and *Veillonella tobetsuensis* in the early stages of oral biofilm formation. *J Bacteriol*. 2015; 197(13): 2104-11. doi: 10.1128/JB.02512-14
7. Kabanova AA, Pohodenko-Chudakova IO, Plotnikov PV. Sposoby vozdejstvija na mikrobnye bioplenki. Sovremennoe sostojanie voprosa [Effects on microbial biofilms. Current status of the issue]. *Bull of Probl in Biology and Med*. 2015; 2(125): 20-4. [Russian]
8. Tchebotor IV, Mayanskiy AN, Mayanskiy NA. Matriks mikrobnih bioplenok [Matrix of microbial Biofilms]. *Clin Microbiol and Antimicrob Chemphther*. 2016; 18(1): 9-19. [Russian]
9. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018; 9(1): 522-54. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372
10. Borisova MI, Lazakovich DN, Sidorova NA, Savushkin AI. Bioplenkoobrazujushhaja aktivnost' i fenomen persistencii mikroorganizmov [Biofilm-forming activity and the phenomenon of microbial persistence]. *J of Biomed Technologies*. 2015; 2: 28-5. doi: 10.15393/j6.art.2015.3382
11. He J, Hwang G, Liu Y, Gao L, Kilpatrick-Liverman LT, Santarpia P, et al. L-Arginine modifies the exopolysaccharide matrix and thwarts *Streptococcus mutans* outgrowth within mixed-species oral biofilms. *J Bacteriol*. 2016; 198(19): 2651-61. doi: 10.1128/JB.00021-16
12. Andreeva SV, Bakhareva LI, Nokhrin DYU, Titova MV, Khaidarshina NE, Burmistrova AL. Chuvstvitel'nost' k antiseptikam bioplenochnyh form *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, vydelenyh iz ozhogovyh ran [Susceptibility to antiseptic preparations in biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds]. *Clin Microbiol and Antimicrob Chemphther*. 2018; 20(3): 249-56. [Russian]. doi: 10.36488/cmasc.2018.3.249-256

13. Gabe V, Zeidan M, Kacergius T, Bratchikov M, Falah M, Rayan A. Lauryl gallate activity and *Streptococcus mutans*: its effects on biofilm formation, acidogenicity and gene expression. *Molecules*. 2020; 25(16): 3685. doi: 10.3390/molecules25163685
14. Detusheva EV, Rodin VB, Slukin PV, Ershova ON, Aleksandrova IA, Kurdyumova NV, et al. Chuvstvitel'nost' nozokomial'nyh shtammov *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* k antiseptiku na osnove hlorgeksidina [Susceptibility of nosocomial *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* strains to a chlorhexidine-based antiseptic preparation]. *Clin Microbiol and Antimicrob Chemphther*. 2015; 17(1): 57-6. [Russian]
15. Dovnar HG, Rzhеuski SE. Antimicrobial activity of the gel with chlorhexidine digluconate intended for the treatment of oral candidiasis. *Vestnik VGMU*. 2017; 16(3): 91-7. [Russian]. doi: 10.22263/2312-4156.2017.3.91
16. Dmitrieva NA, Krechina E.K., Yarigina L.B., Efremova N.V. Sravnitel'noe izuchenie antimikrobnoj aktivnosti preparatov, ispol'zujushhihsja dlja antisepticheskoj obrabotki kornevyh kanalov zubov [Comparative evaluation of antimicrobial activity of root canal irrigation agents]. *Stomatology*. 2013; 92(5): 9-11. [in Russian].
17. Chandki R., Nikhil V, Kalyan SS. Comparative evaluation of substantivity of two biguanides – 0,2% polyhexanide and 2% chlorhexidine on human dentin. *J Conserv Dent*. 2020; 23(1): 46–50. doi: 10.4103/JCD.JCD_256_19
18. Kvashnina DV, Kovalishena OV. Rasprostranennost' ustojchivosti mikroorganizmov k hlorgeksidinu po dannym sistemacheskogo obzora i analiza regional'nogo monitoringa rezistentnost [Prevalence of microbial resistance to chlorhexidine: a systematic review and analysis of regional monitoring]. *Fundament and Clin Med*. 2018; 3(1): 63-71. [Russian]. doi: 10.23946/2500-0764-2018-3-1-63-71
19. Pogosjan MA. Hlorgeksidin – antiseptik, ne privodjashhij k bakteriorezistentnosti [Chlorhexidine is an antiseptic that does not lead to bacterial resistance]. *Bull of Med Internet Conf*. 2015; 5(10): 1234-5. [Russian]
20. Khryanin AA, Knorring GYu. Sovremennye predstavlenija o bioplenkah [Modern concepts of microbial biofilms]. *Farmateka*. 2020; 27(6): 34-43. [Russian]. doi: 10.18565/pharmateka.2020.6.34-42
21. Zandona F, Soini HA, Novotny MV, Santiago E, Eckert GJ, Preisser JS, et al. Apotential biofilm metabolite signature for caries activity – a pilot clinical study. *Metabolomics*. 2015; 5(1): 140. doi: 10.4172/2153-0769.1000140
22. Carev VN. *Mikrobiologija, virusologija i immunologija polosti rta: uchebnyk* [Microbiology, Virology and immunology of the oral cavity: textbook]. M: GEOTAR-Media. 2016; 576. [Russian]
23. Simonova IR, Golovin SN, Veerkina LM, Bereznjak EA, Titova SV. Metody kul'tivirovanija i izuchenija bakterial'nyh bioplenok [Methods of culturing and studying bacterial biofilms]. *Bull of Higher Stud North Caucasus Reg Natural Sci*. 2017; 193(1): 73-9. [Russian]
24. Olefir YuV, Lutseva AI, Gunar OV, Sakhno NG, Grigorieva VE. Jeksperimental'naja ocenka metodov opredele-nija antimikrobnoj aktivnosti preparatov hlорfиллпта [Experimental evaluation of the methods for determining the antimicrobial activity of chlorophyllipt]. *The Bull of the Sci Centre for Expert Evaluation of Med Products*. 2015; 4: 47-50. [Russian]
25. Stroup W.W. *Generalized linear mixed models*. CRC Press; 2013. 547 p.
26. Zubov NN, Kuvakin VI. *Metody mnogomernogo statisticheskogo analiza dannyh v medicine: uchebnoe posobie* [Methods of multidimensional statistical data analysis in medicine: textbook]. SPb: Lithografiya Print; 2017. 348 p. [Russian]
27. Ippolitov EV, Nikolaeva EN, Tsarev VN. Bioplenka polosti rta – induktory signal'nyh sistem vrozhdenного im-muniteta [Oral biofilm: inductors of congenital immunity signal pathways]. *Stomatology*. 2017; 96(4): 58-62. [Russian]. doi: 10.17116/stomat201796458-62
28. Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. Streptococcus sanguinis biofilm formation and interaction with oral patho-gens. *Future Microbiol*. 2018; 13(8): 915-32. doi: 10.2217/fmb-2018-0043

УДК 616. 314 – 002 - 089: 615. 281. 9

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ХЛОРГЕКСИДИНА БІГЛЮКОНАТА ПО ВІДНОШЕННЮ ДО БІОПЛІВКОВИХ МОНОКУЛЬТУР

Чистякова Г. Г., Скороход Г. А., Походенько-Чудакова І. О.

Резюме. На тлі високого відсотка захворюваності карієсом зростає поширеність його ускладнень – пульпіта, апікального періодонтита. Зуби з ускладненим карієсом можуть бути причиною виникнення одонтогенних запальних процесів щелепно-лицевої ділянки. Будучи вогнищами хронічної інфекції та інтоксикації, вони надають несприятливий вплив на організм в цілому. У зв'язку з викладеним, очевидно, що визначення оптимальної концентрації хлоргексидина біглюконата та експозиції вплива на дентин коронкової частини зуба при каріозному ураженні останнього на поточний момент вельми актуально.

Мета дослідження – оцінити антимікробну активність хлоргексидина в різних концентраціях щодо монокультур біоплівки, сформованих на шліфах зразків зубів та в П-образних 96-лункових пластикових планшетах.

Як модель використовували *S. aureus*, що відноситься до найбільш потужних збудників, що утворюють біоплівки. Оцінку антимікробної активності хлоргексидина біглюконата проводили на біоплівкових культурах *S. aureus* і *E. coli*, сформованих на зразках зубів і в полістиролових пластикових планшетах за фактором редукції.

Результати показали, що 2,0% розчин хлоргексидина біглюконата має високий рівень антибактеріальної активності відносно планшетних біоплівкових культур *S. aureus* і *E. coli*. При його впливі на планшетні біоплівкові культури *S. aureus* і *E. coli* протягом 30 і 60 секунд є достовірна різниця ($p=0,02$). Є достовірні відмінності по ефекту чутливості одновидових біоплівкових культур зразків зубів до впливу зазначеного антисептика ($p=0,007$). Рівень його антибактеріальної активності щодо біоплівкових культур *S. aureus* і *E. coli* значимо вище, ніж у біоплівкових культур *S. aureus* і *E. coli* зразків зубів ($p<0,05$).

Результати обґрунтовують їх застосування в клініці, що сприятиме зменшенню числа ускладнень і підвищенню рівня надання стоматологічної допомоги.

Ключові слова: карієс, хлоргексидина біглюконат, антимікробна активність, біоплівки.

UDC 616. 314 – 002 - 089: 615. 281. 9

Antibacterial Activity of Chlorhexidine Bigluconate in Relation to Biofilm Monocultures

Chistyakova G. G., Skorokhod G. A., Pohodenko-Chudakova I. O.

Abstract. On the background of a high percentage of caries incidence, the prevalence of its complications is increasing – pulpitis, apical periodontitis. Teeth with complicated caries can cause odontogenic inflammatory processes in the maxillofacial region. Being foci of chronic infection and intoxication, they have an adverse effect on the body as a whole. In connection with the above, it is obvious that determining the optimal concentration of chlorhexidine bigluconate and exposure to the dentin of the crown part of the tooth in case of carious lesion of the latter is currently very important.

The purpose of the study was to evaluate the antimicrobial activity of chlorhexidine (by suspension and contact method) in various concentrations in relation to monocultures of biofilm formed on tooth sections and in U-shaped 96-well plastic plates.

Material and methods. In this work, one of the most relevant pathogens for modern medicine was *Staphylococcus aureus*, which was one of the most powerful pathogens that form biofilms, was used as a model. The antimicrobial activity of chlorhexidine bigluconate was evaluated on *S. aureus* and *E. coli* biofilm cultures formed on dental samples and in polystyrene plastic tablets. Antimicrobial activity was evaluated by the reduction factor was determined by the difference in the number of decimal logarithms of CFU/ml in the experiment compared to the control. The obtained data was subjected to statistical processing.

Results and discussion. The study revealed that 2.0 % solution of chlorhexidine bigluconate had a high level of antibacterial activity against tablet biofilm cultures of *S. aureus* and *E. coli*. When it was exposed to *S. aureus* and *E. coli* tablet biofilm cultures with exposures of 30 and 60 seconds, statistically significant differences were found ($p=0.02$). Secondly, statistically significant differences in the effect of sensitivity of single-species biofilm cultures of dental samples to the effect of antiseptic at the specified concentration were determined ($p=0.007$). At the same time, the level of antibacterial activity of 2.0 % chlorhexidine bigluconate solution in respect of tablet biofilm cultures of *S. aureus* and *E. coli* was significantly higher than in biofilm cultures of *S. aureus* and *E. coli* of dental samples ($p<0.05$).

Conclusion. The obtained results give grounds for using them in clinical practice in order to improve the effectiveness of caries treatment which will help reduce the number of complications and on the one hand, corresponds to the main direction of medicine – prevention and on the other hand, increases the level of specialized medical care provided to the population as a whole.

Keywords: caries, chlorhexidine bigluconate, antimicrobial activity, biofilms.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 12.12.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування