

УДК: 616.314.17-008.1-031.81-085

Борисенко А.В., проф., д.мед.н., Маснік І.С., асп.  
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця  
Borysenko A.V., Masnik I.S.  
O.O. Bogomolets National Medical University

## Порівняльне визначення антибактеріальної активності озонованої олії ЕВГЕНОЛ

### Comparative Investigation of Antibacterial Activity of Ozonized Oil Eugenol

Адреса для кореспонденції:  
Борисенко Анатолій Васильович  
e-mail: tc@nmu.ua

**МЕТА:** Порівняльне мікробіологічне визначення антибактеріальної дії озонованої та неозонованої олій Евгенол («ВладМиВа», Росія) на стандартні штами мікроорганізмів та змішану мікрофлору кореневого каналу аеробного типу у пацієнтів із хронічним періодонтитом. **МЕТОДИ:** Для визначення чутливості мікроорганізмів до матеріалу застосували модифікацію диско-дифузійного методу. Як тест-мікроорганізми використали референтні штами *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* та змішану мікрофлору кореневих каналів пацієнтів із періодонтитом. **РЕЗУЛЬТАТИ:** Озонована олія Евгенол («ВладМиВа», Росія) показала вибіркочувальну антибактеріальну активність на аеробну мікрофлору кореневого каналу, а також тривалу дію. **ВИСНОВКИ:** Отримані мікробіологічні результати дозволяють використовувати олію Евгенол при лікуванні хронічного періодонтиту.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** озонована олія Евгенол («ВладМиВа», Росія), озонотерапія, періодонтит, мікробіологічне дослідження, антибактеріальна дія.

**PURPOSE:** To determine the microbiological comparative antibacterial activity of ozonized and non-ozonized oils Eugenol («VladMiVa», Russia) on the standard strains of microorganisms and mixed microflora (aerobic type) from root canal teeth of patients with apical periodontitis. **Methods:** To determine the sensitivity of microorganisms to the medicaments was used modification of the disk-diffusion method. As a test microorganisms were used reference strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and mixed microflora from the root canal teeth of patients with apical periodontitis. **RESULTS:** Ozonized oil Eugenol («VladMiVa», Russia) showed selective antibacterial properties on mixed microflora (aerobic type) and prolonged duration. **CONCLUSIONS:** These microbiological results allow usage this medicaments for clinical use in the treatment of chronic apical periodontitis.

**KEY words:** ozonated oil Eugenol («VladMiVa», Russia), ozone therapy, apical periodontitis, microbiological investigation, antibacterial activity.

## Вступ

Лікування верхівкового періодонтиту потребує пригнічення запального процесу, стимулювання відновлення кісткової тканини, забезпечення відновлення функцій періодонту зуба [13]. Сьогодні ефективність ендодонтичного лікування визначають такі чинники, як якісна медико-інструментальна обробка кореневих каналів, раціональне використання антибактеріальних засобів, надійна obturaція системи кореневого каналу. Мікробіологічні дослідження кореневих каналів у пацієнтів, хворих на періодонтит, виявили різну умовно-патогенну мікрофлору. Найчастіше це представники сімейств *Bacteroides*, *Fuzobacterium*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillis* тощо. Відзначили переважання анаеробних мікроорганізмів [9, 11]. Для пригнічення мікрофлори кореневого каналу у пацієнтів із періодонтитом застосовують різні антибактеріальні засоби. Ефективним є використання різних антибактеріальних паст у комбінації з іншими медикаментозними препаратами для тимчасової obturaції кореневого каналу. Із застосуванням цієї методики досягають зменшення больового відчуття, пригнічення бактеріальної мікрофлори в кореновому каналі, зменшення запального процесу в періодонті та стимуляції репаративних процесів у періапикальних тканинах [5, 18]. Найчастіше для пригнічення мікрофлори використовують олію гвоздики та її похідне Евгенол; похідні фенолу (Формокрезол, камфорофенол тощо); йодоформ, карболову кислоту, резорцин, формалін, нітрат срібла; гідроксид кальцію (Calasept, Apexdent, Metapex) тощо. Переважно ці препарати у кореневі канали вносять на ватній турунді або паперовому піні. Однак, вже через декілька годин ватна турунда стає джерелом інфекції, а отже,

антибактеріальний ефект пов'язки значно знижується [10, 16]. Ефективнішим способом є використання пластичних нетвердіючих паст на основі метронідазолу, гідроксиду кальцію тощо.

Одним із перспективних антибактеріальних препаратів, до якого не виникає звикання мікрофлори, є озон. Він у 10 разів краще розчиняється у воді, має високий окислювальний потенціал та у 1,5 раза ефективніший, ніж препарати хлору, який використовують як антимікробний агент. Крім того, озон має імуностимулювальну, знеболювальну, дезінтоксикаційну дію; активує мітохондріальне дихання, процеси метаболізму вуглеводів, білків, ліпідів тощо. У стоматології озон використовують у трьох основних формах, як озоно-кисневу суміш, озоновані розчини та озоновану олію [8, 12, 14, 15]. Озоновані олії застосовують для тимчасового заповнення кореневого каналу при лікуванні пульпіту та періодонтиту [17]. Механізм дії озону на рослинні олії полягає у взаємодії молекули озону з ненасиченими жирними кислотами та утворенням нових сполук – озонідів, що посилюють антибактеріальні властивості олій (мал. 1). Однак, механізм дії озону на евгенол невивчений. З огляду на це, насичення олій озоном має посилювати її антибактеріальні властивості. Відтак доцільно вивчити порівняльну антибактеріальну активність озонованої олії, порівняно з неозонованою, стосовно їх впливу на змішану мікрофлору кореневих каналів пацієнтів із періодонтитом. Мета роботи – порівняльне мікробіологічне визначення антибактеріальної активності озонованої та неозонованої олій Евгенол («ВладМиВа», Росія) на стандартні штами мікроорганізмів та змішану мікрофлору кореневого каналу зубів у пацієнтів із хронічним періодонтитом.

## Матеріал і методи

Для виготовлення озонованої олії використовували 25 мл евгенолу (Евгенол, («ВладМиВа», Росія), барботували (озонували) апаратом ОЗОН УМ-80 (ТзОВ «Інститут озонотерапії та медобладнання», Україна) згідно з рекомендаціями виробника протягом 60 хв. з концентрацією озону 35 мг/л і швидкістю потоку 0,5 л/хв. Для мікробіологічного дослідження виділяли і культивували змішану мікрофлору кореневого каналу пацієнтів із хронічним періодонтитом. Забирали матеріал з кореневого каналу стерильним інструментом (пульпекстрактором), поміщували у стерильну пробірку з напіврідким тіогліколевим середовищем («ФГУП ГНЦ ПМ», Росія). Пробірки інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 5 днів. Після завершення інкубації оцінювали відносну кількість мікроорганізмів за ступенем помутніння середовища. Тампони занурювали в пробірки з напіврідким тіогліколевим середовищем («ФГУП ГНЦ ПМ», Росія). Кожну серію тіогліколевого середовища поперіоду перевіряли на наявність редукуючих властивостей (на 10 мл середовища 2–3 краплі 1% розчину метиленового синього). При збереженні редукуючих властивостей середовище залишалося незабарвленим, а за відсутності – верхній шар набував синьо-зеленого кольору. За необхідності проводили регенерацію тіогліколевого середовища (кип'ятили протягом 15 хв.) для усунення залишків кисню. Надалі виділену змішану мікрофлору кореневого каналу використовували як тестштами мікроорганізмів. Для визначення антимікробної дії досліджуваних зразків олій застосували методику «колодязів», або «лунок» [1, 2, 7], – один з різновидів диско-дифузійного методу визначення чутливості мікроорганізмів [6].

Використовували стандартні тест-культури *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Культури мікроорганізмів розводили фізіологічним розчином до рівня стандарту МакФарланда. Стандартизований інкулюм вносили піпеткою на поверхню чашки Петрі з поживним середовищем (агар з 5% вмістом еритроцитів) обсягом 1–2 мл; рівномірно розподіляли; надлишок інкулюму усували піпеткою. Відкриті чашки підсушували при кімнатній температурі упродовж 10–15 хв. Після цього на однаковій віддалі від країв чашки Петрі готували лунки діаметром 6 мм. Для цього встановлювали сталеві тонкостінні циліндри (внутрішній діаметр  $6,0 \pm 0,1$  мм, висота  $10,0 \pm 0,1$  мм). Після підсушування циліндри виймали стерильним пінцетом, отримані лунки заповнювали озонованою (позначка 1) і неозонованою (позначка 2) оліями Евгенол («ВладМиВа», Росія) з використанням стандартної петлі діаметром 3 мм. Відразу після внесення чашки поміщали в термостат та інкубували при температурі 35 °C протягом 24 год. Вимірювали діаметр зони затримки росту (чутливість мікрофлори у мм) після завершення терміну інкубації та через 1 та 28 днів. Для статистичної достовірності кожен

експеримент проводили 5 разів.

Отримані результати оцінювали за такими критеріями:

- діаметр зони затримки росту 6 мм – відсутність антимікробного ефекту
- діаметр зони затримки росту 7–14 мм – незначний антимікробний ефект
- діаметр зони затримки росту 15–19 мм – помірно виражений антимікробний ефект
- діаметр зони затримки росту 20 мм та більше – високий антимікробний ефект.

Статистичний аналіз даних виконували у комп'ютерних програмах StatSoft Statistica 10 та Microsoft Office Excel 2010 за допомогою варіаційного та однофакторного дисперсійного аналізів [3, 4].

### Результати та їх обговорення

Показники зони затримки росту культур мікроорганізмів (мм) на поживному середовищі представлено у табл. 1, 2.

За результатами дослідження, озонована та неозонована олії Евгенол («ВладМиВа», Росія) мали різну антимікробну активність на тест-культури *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* та пока-

зали тривалий антибактеріальний ефект. Визначення зон затримки росту мікроорганізмів через 1 добу інкубації показало (табл. 1), що найчутливішими до дії озонованої олії були тест-штами *Candida albicans* із зоною затримки росту  $13,0 \pm 0,42$  мм та *Pseudomonas aeruginosa* із показником  $12,0 \pm 0,34$  мм. Меншу чутливість проявили штами *Staphylococcus aureus* із зоною затримки росту  $9,0 \pm 0,19$  та *Escherichia coli* –  $7,0 \pm 0,14$  мм. *Escherichia coli* чутливішими були до неозонованої олії, зона затримки росту становила  $9,0 \pm 0,44$  мм. У решті випадках кращу антибактеріальну дію ( $p < 0,05$ ) мала озонована олія. Отриманий обсяг зон затримки росту мікроорганізмів можна обґрунтувати з урахуванням того, що олії, порівняно з водними розчинами, недостатньо активно дифундують у поживні середовища.

Змішана мікрофлора кореневого каналу проявляла помірну чутливість до дії олії Евгенол. Зона затримки росту мікроорганізмів під впливом озонованої олії Евгенол становила  $11,9 \pm 0,35$  мм, неозонованої –  $11,0 \pm 0,24$  мм. Різниця статистично достовірна ( $< 0,05$ ). Через 28 днів інкубації антибактеріальна активність досліджуваних зразків олій значно зменшилася і була майже однаковою. Зокрема озонована олія Евгенол зберігала антибактеріальну

Таблиця 1. Антимікробна активність зразків олій, 1-ша доба дослідження

Зразки олій Евгенол	Зона затримки росту тест-штамів мікроорганізмів, мм			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Озонована	$12,0 \pm 0,34$	$7,0 \pm 0,14$	$9,0 \pm 0,19$	$13,0 \pm 0,42$
Неозонована	$9,0 \pm 0,44$	$9,0 \pm 0,44$	$6,0 \pm 0,14$	$15,0 \pm 0,45$
p	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$

Примітка: p – достовірність різниці показників різних зразків олій

Таблиця 2. Антимікробна активність зразків олій Евгенол, 28-ма доба дослідження

Зразки олій Евгенол	Зона затримки росту тест-штамів мікроорганізмів, мм			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Озонована	відсутня	$9,0 \pm 0,44$	$7,0 \pm 0,15$	$6,0 \pm 0,14$
Неозонована	відсутня	$6,0 \pm 0,14$	$9,0 \pm 0,45$	$6,0 \pm 0,14$
p	$> 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$> 0,05$

Примітка: p – достовірність різниці показників різних зразків олій

дію на тест-штами *Escherichia coli* (зона затримки росту мікроорганізмів  $9,0 \pm 0,44$  мм). Дія озонованої олії достовірно ( $<0,05$ ) відрізнялася від дії неозонованої олії. В інших випадках різниця антибактеріальної активності цих олій була статистично недостовірною. Змішана мікрофлора також проявила незначну чутливість до антибактеріальної дії олії Евгенол. Зона затримки росту мікроорганізмів під впливом озонованої олії становила  $8,5 \pm 0,24$  мм, неозонованої –  $7,6 \pm 0,22$  мм. Різниця була статистично досто-

вірною ( $<0,05$ ). При дослідженні антибактеріальної дії препаратів на тест-культури *Candida albicans* результати були позитивними, а найвищий показник затримки росту мікроорганізмів спостерігали через одну добу.

Проведене мікробіологічне дослідження показало, що озонована олія Евгенол («ВладМиВа», Росія) має достатню вибірку активність на аеробну мікрофлору кореневого каналу, а отже, озон негативно впливає на молекулярну структуру олії Евгенол. Однак, незважаючи на зниження ан-

тимікробної дії, її тривалість залишилася досить значною (до 3-х місяців).

## Висновки

Озонована олія Евгенол («ВладМиВа», Росія) показала вибірку антибактеріальну активність на аеробну мікрофлору кореневого каналу, а також тривалу дію. Отримані мікробіологічні результати дозволяють використовувати цей препарат при лікуванні хронічного періодонтиту, зокрема у дітей.

## Список використаної літератури

1. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: методичні рекомендації / ДФЦ МОЗ України, Протокол №9 від 30.10.2003 року.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. – Київ, 2001. – С. 371–396.
3. Минцер О.П. Методы обработки медицинской информации: учеб. пособие / О.П. Минцер, Б. Н. Угарова, В.В. Власов; 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Высшая школа, 1991. – 271 с.
4. Николаев А.И. Практическая терапевтическая стоматология / А.И. Николаев, Л.М. Цепов. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 928 с.
5. Решедько Г.К. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом / Г.К. Решедько, О.У. Стецюк // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – №4 (3). – С. 348–354.
6. Руководство по клиническим испытаниям лекарственных средств / А.В. Стефанов [и др.]; под ред. А.В. Стефанова, В.И. Мальцева, Т.К. Ефимцевой. – К.: Издательский дом «Авицена», 2001. – 425 с.
7. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone) / L.A. Sechi [at al.] // Journal Microbiol. – 2001. – Vol. 90 (2). – P. 279–284.
8. Black-pigmented Bacteroides spp. in human apical periodontitis / M. Naapasalo, H. Ranta, K. Ranta, H. Shah // In-fect Immun., 1986. – P. 149–153.
9. Claesson R. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals / R. Claesson, A. Byström, G. Sundqvist // Endod. Dent. Traumatol., 1985. – P. 170–175.
10. Detection of Porphyromonas endodontalis in infected root canals by 16s rRNA genedirected polymerase chain reaction / J.C. Machado de Oliveira [at al.] // J. Endod., 2000. – P. 729–732.
11. Filippi A. The influence of ozonized water on the epithelial wound healing process in the oral cavity / A. Filippi; International ozone association, 15-th World Congress., September, 2001. – London, UK.
12. Influence of apical overinstrumentation and overfilling on re treated root canals / G. Bergenholtz, U. Lekholm, R. Milthor, B. Engstrom // J. Endod. – 1979. – P. 310–314.
13. Modulation of cutaneous wound healing by ozone: differences between young and aged mice / Y. Lim [at al.] // Toxicol. Lett. – 2006. – P. 160.
14. Ozone and its usage in general medicine and dentistry / V. Seidler [at al.]. – A review article // Prague Medical Report. – 2008. – P. 109.
15. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short term intracanal dressing / [U. Sjögren, D. Figdor, L. Spångberg, G. Sundqvist] // Int. Endod. J. – 1991. – P. 119–125.
16. Therapeutic effect of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing / H. Kim [at al.] // Med. Science. – 2009. – P. 368.
17. Werner S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // Physiol. Rev. – 2003. – P. 835.

## REFERENCES

1. Vychennia spetsyfychnoi aktyvnosti protymikrobynykh likarskykh zasobiv. Metodychni rekomendatsii. DFTS MOZ Ukrainy, protokol №9 vid 30.10.2003 roku (in Ukrainian).
2. Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv. (2001). Metodychni rekomendatsii. Kyiv (in Ukrainian).
3. Mincer, O.P., Ugarova, B.N., & Vlasov, V.V. (1991). Metody obrabotki medicynskoj informacii. K.: Vishhaja shkola (in Russian)
4. Nikolaev, A.I., & Cepov, L.M. (2007). Prakticheskaja terapevticheskaja stomatologija. M.: MEDpress-inform (in Russian).
5. Reshed'ko, G.K., Stecyuk, O.U. (2001). Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija, 4 (3), 348–354 (in Russian).
6. Stefanova, A.V., Mal'ceva, V.I., & Efimcevoj T.K. (2001). Rukovodstvo po klinicheskim ispytanyam lekarstvennyh sredstv. K.: Izdatel'skij dom «Avicena» (in Russian).
7. Sechi, L.A. & at al. (2001). Journal Microbiol., 90 (2), 279–284 (in English).
8. Naapasalo, M., Ranta, H., Ranta, K., & Shah, H. (1986). In-fect Immun., 149–153 (in English).
9. Claesson, R., Bystrom, A., & Sundqvist, G. (1985). Endod. Dent. Traumatol., 170–175 (in English).
10. Machado de Oliveira, J.C. & et al. (2000). J. Endod., 729–732 (in English).
11. Filippi, A. (2001). The influence of ozonized water on the epithelial wound healing process in the oral cavity. International ozone association, 15-th World Congress. (September). London, UK (in English).
12. Bergenholtz, G., Lekholm, U., Milthor, R., & Engstrom, B. (1979). J. Endod., 310–314 (in English).
13. Lim, Y. & at al. (2006). Toxicol. Lett (in English).
14. Seidler, V. & at al. (2008). Ozone and its usage in general medicine and dentistry. Prague Medical Report (in English).
15. Sjogren, U., Figdor, D., Spangberg, L., Sundqvist, G. (1991). Int. Endod. J., 119–125 (in English).
16. Kim, H. & et al. (2009). Med. Science (in English).
17. Werner, S., & Grose, R. (2003). Physiol Rev. (in English).