

# Ocena wrażliwości grzybów drożdżopodobnych izolowanych w stomatopatiach protetycznych na wybrane, naturalne preparaty o działaniu przeciwgrzybiczym

## Laboratory evaluation of fungi susceptibility, isolated in denture stomatitis, to selected, natural antifungal preparations

Marta Jaworska-Zaremba<sup>1</sup>, Elżbieta Mierzińska-Nastalska<sup>1</sup>, Ewa Swoboda-Kopec<sup>2</sup>, Justyna Gierkowska<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra Protetyki Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Kierownik: prof. dr hab. E. Mierzińska-Nastalska

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Kierownik: prof. dr hab. G. Młynarczyk

<sup>3</sup> Zakład Mikrobiologii CSK  
Kierownik: prof. dr hab. M. Łuczak

---

---

### HASŁA INDEKSOWE:

stomatopatia protetyczna, *Candida albicans*, leczenie przeciwgrzybicze

---

---

---

---

### KEY WORDS:

denture stomatitis, *Candida albicans*, antifungal therapy

---

---

### Streszczenie

**Wstęp.** Stomatopatie protetyczne powikłane infekcją grzybiczą są istotnym problemem zdrowotnym, ponieważ zakażenie drożdżakami towarzyszy znaczącej liczbie pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne. Liczne trudności związane z leczeniem zakażeń grzybiczych w tej grupie chorych wynikają bądź ze wzrastającej oporności grzybów na poszczególne antymikotyki, jak też z ich toksyczności, działań niepożądanych lub wysokich kosztów leczenia. Niepowodzenia terapii przeciwgrzybiczej, a także częste reinfekcje skłaniają do poszukiwania nowych, skutecznych preparatów o działaniu przeciwgrzybiczym.

**Cel pracy.** Ocena wrażliwości *in vitro* szczepów grzybów drożdżopodobnych, uzyskanych z wymazów bezpośrednich z błony śluzowej jamy ustnej podłoża protetycznego pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne, na wybrane naturalne preparaty o działaniu przeciwgrzybiczym: Citrosept (Cintamanii), Citrotravel (Cintamanii).

**Material i metody.** Badaniami objęto grupę 93 pacjentów z objawami stomatopatii protetycznej, od

### Summary

**Introduction.** *Candida*-associated denture stomatitis constitutes very important health problem, because fungal infections are related to patients who use prosthetic restorations. Increasing resistance of fungi as well as toxicity of antifungals and high costs of treatment, have an influence on many difficulties in denture stomatitis treatment. Due to large number of failures in treatment of *Candida*-associated denture stomatitis and also their recurrent character, it is crucial to search the new, effective antimycotic preparations.

**Aim of the study.** The aim of this work was estimation of *in vitro* susceptibility of yeast-like fungal strains, obtained from direct mucosa swabs taken from oral cavities of patients using prosthetic restorations, to the chosen natural preparations having antifungal effect: Citrosept (Cintamanii), Citrotravel (Cintamanii).

**Materials and methods.** The researches covered a group of 93 patients with the clinical symptoms of denture stomatitis. Mycological tests were performed with the method of direct swab taken from oral mucosa. In the next part of the research cultured strains were

których pobierano wymazy bezpośrednio z błony śluzowej jamy ustnej w kierunku hodowli grzybów drożdżopodobnych. Dokonano identyfikacji wyhodowanych szczepów przy użyciu podłoża Chromagar Candida (BioRad) i automatycznego testu ID32 C (bioMérieux). Oceny lekowrażliwości szczepów na preparaty dokonano metodą wielokrotnych rozcieńczeń preparatów w podłożu stałym RPMI 1640 plus MOPS z dodatkiem 2% glukozy i 1,5% Bacto agaru (Plate Dilution Method). Zastosowano układy kontrolne.

**Wyniki.** Z wymazów bezpośrednich pobranych z powierzchni błony śluzowej jamy ustnej 93 pacjentów uzyskano w hodowli od 84,95% osób wzrost 99 szczepów grzybów drożdżopodobnych, przy czym w największym odsetku występowały gatunki *Candida albicans*, *Candida tropicalis* i *Candida glabrata*. Preparaty Citrosept i Citrotravel wykazały dużą aktywność w stosunku do wyhodowanych szczepów. Najbardziej wrażliwe na działanie obu preparatów były szczepy z gatunku *C.glabrata* i *C.albicans*, dla których otrzymano najniższe wartości stężeń hamujących.

**Wnioski.** Obecność szczepów grzybów drożdżopodobnych stwierdzono w 84,95% przypadków, co w praktyce klinicznej oznacza konieczność prowadzenia kontrolnych badań mikologicznych u pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne. Preparaty naturalne Citrosept i Citrotravel wykazały w badaniach *in vitro* dużą aktywność przeciwgrzybiczą wobec większości badanych drożdżaków, co skłania do rozważenia zastosowania ekstraktów naturalnych w leczeniu zakażeń grzybiczych błony śluzowej jamy ustnej u użytkowników protez.

identified. Evaluation of susceptibility of all isolates to: Citrotravel, Citrosept, tea tree oil was performed according to the serial dilution method of preparations on solid medium RPMI 1640 plus MOPS with the addition of 2 % of glucose and 1.5 % of Bacto agar. Control systems were used.

**Results.** On the basis of performed laboratory mycological tests, the growth of 99 species of yeast-like fungi was diagnosed at 84.95% among 93 patients, from who oral mucosa swabs samples were collected. The most commonly cultured species were *C.albicans*, *C.tropicalis* and *C.glabrata*. Citrosept and Citrotravel have showed high activity in relation to cultured strains, especially to *C.albicans* and *C.glabrata* species.

**Conclusions.** Control mycological tests should be provided in patients using prosthetic restorations. Citrosept and Citrotravel have showed high activity in relation to the most cultured strains. The usage of natural extracts could be consider in denture stomatitis treatment.

## Wstęp

Stomatopatie protetyczne powikłane infekcją grzybiczą są schorzeniem szeroko rozpowszechnionych w populacji pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne. Pomimo ogromnego postępu w medycynie, jak również niejednokrotnie w związku z nim, obserwuje się wzrost częstości występowania zakażeń grzybiczych, włączając zakażenia błony śluzowej jamy ustnej u osób użytkujących uzupełnienia protetyczne (1, 2). Infekcje te stanowią istotny problem zdrowotny, ponieważ zakażenie drożdżakami towarzyszy 60-100% przypadków stomatopatii protetycznych (3). Szczególną rolę w

powstawaniu tego schorzenia przypisuje się grzybom drożdżopodobnym zasiedlającym jamę ustną, głównie z rodzaju *Candida*. Spośród wielu gatunków rodzaju *Candida* największe znaczenie w etiopatogenezie stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą mają szczepy *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, rzadziej *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii* (4, 5). Należy jednak podkreślić, że rozwój zakażenia grzybiczego zależy w dużej mierze od stanu immunologicznego gospodarza, stopnia patogenności szczepu i warunków panujących we wrotach zakażenia. Zmniejszone wydzielanie śliny zawierającej lizozym, leukoplakia, nowotwory jamy ustnej, dysplazja nabłonka

błony śluzowej jamy ustnej lub przerwanie jego ciągłości, radioterapia w obrębie głowy i szyi, palenie tytoniu, niedobory żywieniowe, a także obecność węglowodanów w diecie, przy jednoczesnym użytkowaniu uzupełnień protetycznych mogą bezpośrednio przyczynić się do rozwoju stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą. Grupę dużego ryzyka występowania zakażenia manifestującego się przewlekłą, nawracającą i niejednokrotnie oporną na powszechnie stosowane chemioterapeutyki kandydozą stanowią chorzy z osłabioną odpornością, po przebytej chemio- i radioterapii, a także poddani leczeniu immunosupresyjnemu lub przewlekłej antybiotykoterapii. W grupie pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne, obecność kilku czynników zagrożenia zakażeniem grzybiczym jednocześnie, powoduje wzrost częstości występowania stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybami drożdżopodobnymi. Fakt ten ma duże znaczenie ze względu na możliwość przejścia zakażenia w postać kandydozy narządowej, stwarzając w konsekwencji ryzyko zagrożenia fungemią (6).

Leczenie stomatopatii, w zależności od stopnia zaawansowania schorzenia, a także obecności chorób współtowarzyszących obejmuje postępowanie protetyczne, chirurgiczne, farmakologiczne i protetyczno-farmakologiczne. W terapii farmakologicznej najczęściej stosowanymi preparatami są antymikotyki z grupy polienów (nystatyna, natamycyna), azoli (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol, flukonazol) i pochodne pirymidyny (5-fluorocytozyna). Zaleca się je w postaci miejscowo działających roztworów, maści, kremów i proszków (7).

Poważnym problemem w ostatnich latach staje się narastająca oporność grzybów na powszechnie stosowane leki przeciwgrzybicze. Rozróżnia się oporność pierwotną, kiedy mikroorganizm wykazuje oporność przed ekspozycją na dany lek, a także oporność wtórną po zastosowaniu leczenia farmakologicznego. Nie bez znaczenia pozostaje również zwiększona zdolność biofilmu do obrony patogenów przed mechanizmami odpornościowymi gospodarza, a także fenotyp niektórych gatunków *Candida* (multi-drug resistant phenotype) (8). Leczenie immunosupresyjne, antybiotykoterapia, długotrwałe podawanie leków przeciwgrzybiczych

mają duży wpływ na selekcję szczepów opornych i nawrotowy charakter zakażeń. Narastająca oporność grzybów na powszechnie stosowane w praktyce klinicznej antymikotyki jest uzależniona w dużym stopniu od mechanizmu działania leku. Azole, polieny i allylaminy działają przez hamowanie syntezy błony komórkowej grzybów lub bezpośrednie oddziaływanie ze składnikami błony komórkowej. Echinokandyny blokują syntezę glukanu w ścianie komórkowej grzybów, a 5-fluorocytozyna syntezę kwasów nukleinowych. Zwiększona dostępność leków, niejednokrotnie ich nadużywanie, z dużym prawdopodobieństwem spowoduje w niedalekiej przyszłości wzrost liczby szczepów opornych wśród różnych, także obecnie wrażliwych gatunków grzybów (9).

Niepowodzenia w leczeniu stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą, a także częste reinfekcje, szczególnie w grupie pacjentów poddanych leczeniu immunosupresyjnemu, z zastosowaniem chemio- i radioterapii skłaniają do poszukiwania nowych, skutecznych leków przeciwgrzybiczych. Liczne trudności związane z leczeniem pacjentów z zakażeniami grzybiczymi, wynikające bądź ze wzrastającej oporności grzybów na poszczególne antymikotyki, jak też z ich toksyczności, działań niepożądanych lub wysokich kosztów leczenia skłaniają do poszukiwania nowych leków, w tym preparatów naturalnych o działaniu przeciwgrzybiczym.

## Cel pracy

Celem pracy była laboratoryjna ocena wrażliwości *in vitro* szczepów grzybów drożdżopodobnych, uzyskanych z wymazów bezpośrednich z błony śluzowej jamy ustnej podłoża protetycznego pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne, na wybrane naturalne preparaty o działaniu przeciwgrzybiczym: Citrosept (Cintamanii) oraz Citrotravel (Cintamanii).

## Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 93 pacjentów Katedry Protetyki Stomatologicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Grupę tę stanowili pacjenci, u których stwierdzono w badaniu klinicznym

objawy stomatopatii protetycznej, użytkujący stałe i ruchome uzupełnienia protetyczne, w tym również osoby poddane rehabilitacji protetycznej z zastosowaniem wszczepów śródkostnych.

Pacjentów poddano badaniom mikologicznym metodą wymazu bezpośredniego z powierzchni błony śluzowej jamy ustnej w obszarze kontaktu z dośluzówkową powierzchnią uzupełnienia protetycznego. Następnie, w Pracowni Mikologicznej dokonano posiewu na stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem gentamycyny i chloramfenikolu (Oxoid). Płytki inkubowano w temperaturze 30° C przez 48 h. Obecność wzrostu kolonii grzybów oceniano po 24 i 48 h. Do dalszych badań laboratoryjnych uzyskano z hodowli 99 szczepów grzybów drożdżopodobnych. Dokonano analizy cech morfologicznych wyizolowanych szczepów, jednocześnie przeprowadzając ich identyfikację przy użyciu podłoża Chromagar Candida (BioRad) i automatycznego testu ID32 C (BioMérieux).

Na każdym etapie badania lekowrażliwości do zaszczepienia podłoży przygotowywano zawiesiny komórek grzybów w 0,85% NaCl o gęstości 1 wg skali Mc Farlanda. Określono wrażliwość wyhodowanych szczepów, a także szczepów wzorcowych *C.albicans* ATCC 14053, *C.tropicalis* ATCC 13803 i *C.glabrata* ATCC 90030 w stosunku do preparatów: Citrotravel (Cintamanii) i Citrosept (Cintamanii). Oceny lekowrażliwości szczepów na preparaty dokonano metodą wielokrotnych rozcieńczeń preparatów w podłożu stałym RPMI 1640 plus MOPS z dodatkiem 2% glukozy i 1,5% Bacto agaru (*Plate Dilution Method*).

W pierwszym etapie badania lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych wykonano próbę pilotażową w celu określenia przedziału stężeń dla badanych preparatów, przy których następuje zahamowanie wzrostu szczepów. Do próby wybrano losowo 25 izolatów, a także przygotowano 8 różnych stężeń badanych preparatów w przedziale 0,25 - 260 mg na litr pożywki (mg/l) dla Citroseptu i Citrotravelu. Stosując metodę badawczą opisaną poniżej dla wszystkich badanych 99 szczepów obliczono, że ponad 95% spośród wybranych 25 izolatów poddanych badaniu pilotażowemu jest hamowana przez preparaty w następujących stężeniach: Citrosept 7,5; 15; 30; 60; 120; 240 mg/l i Citrotravel 1,87; 3,75; 7,5; 15; 30; 60 mg/l. Określone w próbie

pilotażowej stężenia preparatów zastosowano w dalszej części badania.

Bezpośrednio przed doświadczeniem preparaty rozcieńczano, zgodnie z zaleceniami producenta lub opierając się na kryteriach NCCLS (10) w jałowej wodzie destylowanej. Do przygotowanych podłoży wprowadzano wcześniej rozcieńczone badane preparaty, uzyskując dla każdego z nich stężenia określone w próbie pilotażowej. Tak przygotowane podłoża z Citroseptem i Citrotravelem rozlewano do płytek Petriego, po 20ml w każdej. Następnie, przygotowane wcześniej zawiesiny kolejnych 20 szczepów o gęstości 1 w skali Mc Farlanda наносzono po zastygnięciu podłoży. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 h, a następnie odczytywano minimalne stężenie hamujące (*Minimal Inhibitory Concentration, MIC*) wzrost drożdżaków po 24 h. Minimalne stężenie hamujące (MIC) zostało zdefiniowane jako najniższe stężenie preparatu, przy którym następuje zahamowanie wzrostu szczepów grzybów drożdżopodobnych. W następnej kolejności dokonano analizy aktywności wszystkich preparatów obliczając MIC<sub>50</sub> oraz MIC<sub>90</sub> dla badanych gatunków grzybów drożdżopodobnych, dla których liczba szczepów w badaniu była  $\geq 2$  oraz określono zakres stężeń hamujących (MIC range). Dla szczepów w liczbie  $< 2$  MIC<sub>50</sub> równał się MIC<sub>90</sub>. Jako MIC<sub>50</sub> przyjęto takie stężenie danego preparatu, przy którym zostaje zahamowany wzrost 50% badanych szczepów. Analogicznie, jako MIC<sub>90</sub> uznano takie stężenie danego preparatu, przy którym zostaje zahamowany wzrost 90% badanych szczepów.

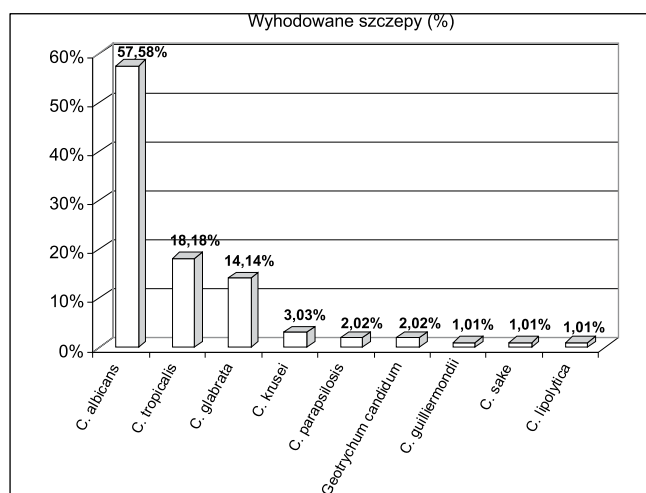
W badaniu lekowrażliwości szczepów grzybów drożdżopodobnych oraz szczepów wzorcowych zastosowano dwa układy kontrolne. Pierwszy stanowiły płytki z podłożem RPMI 1640 plus MOPS z dodatkiem 2% glukozy i 1,5% Bacto agaru niezawierające badanych preparatów, drugi – płytki z podłożami zawierającymi stosowane w badaniu rozpuszczalniki: jałową wodę destylowaną w stężeniu niehamującym wzrostu grzybów.

## Wyniki

Z wymazów bezpośrednich pobranych z powierzchni błony śluzowej jamy ustnej 93 pacjentów uzyskano w hodowli od 84,95% osób wzrost

99 szczepów grzybów drożdżopodobnych, przy czym w największym odsetku występowały gatunki *Candida albicans*, *Candida tropicalis* i *Candida glabrata*, odpowiednio: 57,58%, 18,18% i 14,14% (ryc 1).

Wyniki badań wrażliwości 99 szczepów grzybów drożdżopodobnych oraz szczepów wzorcowych na preparat roślinny Citrosept zebrano w tabelach I i II. Wskazują one, że najbardziej wrażliwe na działanie preparatu były w kolejności szczepy z gatunku *C.glabrata* i *C.albicans*, dla których otrzymano najniższe wartości stężeń hamujących. Spośród 14 badanych izolatów *C.glabrata* wzrost 57,14% był hamowany w zakresie 7,5-15 mg/l, kolejnych 35,71% w zakresie 30-60 mg/l, a tylko 7,14% szczepów wymagało do zahamowania wzrostu stężenia 120 mg/l (MIC<sub>50</sub> 15 mg/l, MIC<sub>90</sub> 60mg/l, MIC range 7,5-120 mg/l). Podobną wrażliwość na najniższe badane stężenia Citroseptu wykazywały szczepy *C.albicans*. Wzrost 21 izolatów był hamowany w zakresie 7,5-15 mg/l, kolejnych 25 szczepów i następnym 10 było wrażliwych odpowiednio na stężenia 30-60 mg/l i 120-240 mg/l, a 1 szczep *C.albicans* nie był hamowany w zakresie badanych stężeń (MIC<sub>50</sub> 30 mg/l, MIC<sub>90</sub> 120 mg/l, MIC range 7,5-240 mg/l). Wysoką aktywność wykazał preparat w stosunku do szczepów z gatunku *C.tropicalis*. Spośród 18 badanych izolatów wzrost 55,56%



Ryc.1. Podział wyhodowanych i zidentyfikowanych 99 szczepów grzybów drożdżopodobnych (%).

był hamowany przez stężenia 15-30 mg/l, pozostałe 44,44% szczepów było wrażliwych na minimalne stężenia hamujące (MIC) w zakresie 60-240 mg/l (MIC<sub>50</sub> 30 mg/l, MIC<sub>90</sub> 240 mg/l). Aktywność preparatu Citrosept w stosunku do nielicznych szczepów z gatunku *C.parapsilosis*, *c.guilliermondii*, *C.sake*, *C.lipolytica*, *C.krusei*, *Geotrychum candidum* była zróżnicowana i mieściła się w przedziale minimalnych stężeń hamujących 15-240 mg/l.

Badania lekowrażliwości przeprowadzone dla ekstraktu z grejpffruta o nazwie handlowej

T a b e l a I. Zakres minimalnego stężenia hamującego wzrost badanych szczepów (MIC range), MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> dla Citroseptu

Grzyby drożdżopodobne	Liczba szczepów	Minimalne stężenie hamujące MIC mg /l (Minimal Inhibitory Concentration)		
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>Range</sub>
<i>C. albicans</i>	57	30	120	7,5-240
<i>C. tropicalis</i>	18	30	240	15-1240
<i>C. glabrata</i>	14	15	60	7,5-120
<i>C. krusei</i>	3	60	60	15-60
<i>C. parapsilosis</i>	2	30	240	30-240
<i>Geotrychum candidum</i>	2	15	120	15-120
<i>C. guilliermondii</i>	1	60	60	—
<i>C. sake</i>	1	15	15	—
<i>C. lipolytica</i>	1	15	15	—

Tabela II. Minimalne stężenia hamujące (MIC) wzrost badanych szczepów oraz szczepów wzorcowych dla Citroseptu

Liczba szczepów grzybów		Minimalne stężenie hamujące (MIC) mg/l					
		7,5	15	30	60	120	≥240
<i>C. albicans</i>	57	6 10,53%	15 26,32%	11 19,30%	14 24,56%	6 10,53%	5 8,77%
<i>C. tropicalis</i>	18	– –	4 22,22%	6 33,33%	2 11,11%	2 11,11%	4 22,22%
<i>C. glabrata</i>	14	4 28,57%	4 28,57%	1 7,14%	4 28,57%	1 7,14%	– –
<i>C. krusei</i>	3	– –	1 33,33%	– –	2 33,33%	– –	– –
<i>C. parapsilosis</i>	2	– –	– –	1 50,00%	– –	– –	1 50,00%
<i>Geotrychum candidum</i>	2	– –	1 50,00%	– –	– –	1 50,00%	– –
<i>C. guilliermondii</i>	1	– –	– –	– –	1 100,00%	– –	– –
<i>C. sake</i>	1	– –	1 100,00%	– –	– –	– –	– –
<i>C. lipolytica</i>	1	– –	1 100,00%	– –	– –	– –	– –
<i>C. albicans ATCC 14053</i>	1	– –	– –	– –	1 100,00%	– –	– –
<i>C. glabrata ATCC 90030</i>	1	– –	1 100,00%	– –	– –	– –	– –
<i>C. tropicalis ATCC 13803</i>	1			1 100,00%			

Citrotravel wskazują na dużą aktywność tego preparatu w stosunku do badanych grzybów drożdżopodobnych (tab. III, tab. IV). Spośród 57 szczepów *C. albicans* ponad połowa (61,40%) była hamowana przez bardzo niskie wartości stężeń hamujących w zakresie 1,87-3,75 mg/l. Kolejnych 18 izolatów było wrażliwych na stężenia 7,5 oraz 15 mg/l, a tylko 3 szczepy były hamowane przez stężenie 60 mg/l (MIC<sub>50</sub> 3,75 mg/l, MIC<sub>90</sub> 15 mg/l, MIC range 1,87-60 mg/l). W jednym przypadku izolatu *C. albicans* nie uzyskano hamowania w zakresie badanych stężeń. Porównywalnie niskie wartości stężeń hamujących otrzymano dla gatunku *C. glabrata*. Dla 9 spośród 14 badanych szczepów minimalne stężenie hamujące wynosiło 1,87 mg/l, wzrost kolejnych 3 był hamowany w stężeniu 7,5 mg/l, a pozostałe 2 izolaty były wrażliwe na stężenie 30

mg/l (MIC<sub>50</sub> 1,87 mg/l, MIC<sub>90</sub> 30 mg/l, MIC range 1,87-30 mg/l). Wysoką aktywność Citrotravelu zaobserwowano również w stosunku do szczepów *C. tropicalis*. Wrażliwość nielicznych szczepów z gatunku *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. sake*, *C. lipolytica*, *C. krusei*, *Geotrychum candidum* na preparat Citrotravel była zróżnicowana i mieściła się w przedziale minimalnych stężeń hamujących 1,87-30 mg/l.

Przeprowadzona analiza porównawcza lekowrażliwości wszystkich badanych grzybów wykazała wysoki odsetek szczepów wrażliwych na Citrotravel (94,95%) oraz Citrosept (56,57%) w niskich stężeniach hamujących (<60 mg/l). Wyniki badań dotyczące zastosowanych układów kontrolnych nie wykazały hamowania wzrostu grzybów drożdżopodobnych.

Tabela III. Zakres minimalnego stężenia hamującego wzrost badanych szczepów (MIC range), MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> dla Citrotravelu

Grzyby drożdżopodobne	Liczba szczepów	Minimalne stężenie hamujące MIC mg /l (Minimal Inhibitory Concentration)		
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>Range</sub>
<i>C. albicans</i>	57	3,75	15	1,87-60
<i>C. tropicalis</i>	18	3,75	30	1,87-60
<i>C. glabrata</i>	14	1,87	30	1,87-30
<i>C. krusei</i>	3	3,75	7,5	1,87-7,5
<i>C. parapsilosis</i>	2	1,87	30	1,87-30
<i>Geotrychum candidum</i>	2	3,75	30	3,75-30
<i>C. guilliermondii</i>	1	7,5	7,5	–
<i>C. sake</i>	1	1,87	1,87	–
<i>C. lipolytica</i>	1	1,87	1,87	–

Tabela IV. Minimalne stężenia hamujące (MIC) wzrost badanych szczepów oraz szczepów wzorcowych dla Citrotravelu

Liczba szczepów grzybów		Minimalne stężenie hamujące (MIC) mg/l					
		1,87	3,75	7,5	15	30	≥60
<i>C. albicans</i>	57	17 29,82%	18 31,58%	12 21,05%	6 10,53%	– –	4 7,02%
<i>C. tropicalis</i>	18	5 27,78%	5 27,78%	5 27,78%	1 5,56%	1 5,56%	1 5,56%
<i>C. glabrata</i>	14	9 64,29%	– –	3 21,43%	– –	2 14,29%	– –
<i>C. krusei</i>	3	1 33,33%	1 33,33%	1 33,33%	– –	– –	– –
<i>C. parapsilosis</i>	2	1 50,00%	– –	– –	– –	1 50,00%	– –
<i>Geotrychum candidum</i>	2	– –	1 50,00%	– –	– –	1 50,00%	– –
<i>C. guilliermondii</i>	1	– –	– –	1 100,00%	– –	– –	– –
<i>C. sake</i>	1	1 100,00%	– –	– –	– –	– –	– –
<i>C. lipolytica</i>	1	1 100,00%	– –	– –	– –	– –	– –
<i>C. albicans ATCC 14053</i>	1	– –	1 100,00%	– –	– –	– –	– –
<i>C. glabrata ATCC 90030</i>	1	1 100,00%	– –	– –	– –	– –	– –
<i>C. tropicalis ATCC 13803</i>	1	– –	– –	1 100,00%	– –	– –	– –

## Dyskusja

Leczenie stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą, co podkreśla większość autorów prac, ale także lekarzy klinicystów zajmujących się tym zagadnieniem, stwarza coraz więcej trudności, po pierwsze w osiągnięciu sukcesu terapeutycznego, a następnie w zapobieganiu reinfekcjom. Pomimo obecności na rynku szerokiego wachlarza leków przeciwgrzybiczych coraz bardziej niepokojąca staje się obecność szczepów grzybów drożdżopodobnych, w tym *Candida albicans* opornych na poszczególne leki lub całe grupy antymykotyków (11,12).

Preparaty pochodzenia roślinnego charakteryzują się niską toksycznością i stosunkowo niewysokimi kosztami terapii. Do tej grupy należą preparaty zawierające w swoim składzie ekstrakt z grejpfruta. W 1980 r. amerykański immunolog *Jacob Harich* jako pierwszy zwrócił uwagę na interesujące właściwości ekstraktu z nasion grejpfruta (*Citrus paradisi*), co w następstwie spowodowało szeroko zakrojone badania oraz próby wykorzystania wyciągu nie tylko w medycynie, ale także w innych dziedzinach, w tym m.in. w rolnictwie, leśnictwie, przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Ekstrakt dzięki zdolności do wychwytywania wolnych rodników nadtlenkowych wykazuje właściwości przeciwutleniające, reguluje procesy metaboliczne, pobudza produkcję przeciwciał oraz posiada właściwości uszczelniające naczynia krwionośne. W dobie nieustannej walki z chorobami nowotworowymi, szczególnie cenne są potwierdzone właściwości przeciwmutagenne, cytotoksyczne i przeciwnowotworowe flawonoidów obecnych w ekstrakcie z grejpfruta. Ponadto występująca w wyciągu naringina, naringenina, czy tangeretyna dzięki swojej strukturze polifenolowej są silnymi przeciwutleniaczami i korzystnie wpływają na metabolizm komórkowy (13). *Castillo* i wsp. (14) w badaniach *in vivo* wykazali, że procyanidyny, obecne w ziarnach grejpfruta wywierają efekt antyoksydacyjny i radioochronny przeciwko uszkodzeniom chromosomów promieniami X.

Prowadzone przez innych autorów badania wykazały, że ekstrakt z nasion grejpfruta działa przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo i przeciwgrzybiczo, co stwarza możliwości wykorzystania go zarówno

w profilaktyce, jak i w leczeniu różnych zakażeń. Mechanizm działania ekstraktu na mikroorganizmy polega najprawdopodobniej na zaburzeniu procesów oddychania wewnątrzkomórkowego. Aktywne czynniki wyciągu powodują uszkodzenie struktur błony i ściany komórkowej oraz zahamowanie syntezy aminokwasów. Jednocześnie następuje upośledzenie metabolizmu wewnątrzkomórkowego i w efekcie finalnym śmierć mikroorganizmu. Wyniki dotychczasowych doświadczeń wskazują na wysoką aktywność wyciągu z grejpfruta wobec bakterii tlenowych i beztlenowych (15,16). Bardzo sporadycznie pojawiają się dane w piśmiennictwie na temat działania ekstraktu na grzyby drożdżopodobne. Zachęcające wyniki otrzymali w swoich badaniach *Krajewska-Kułak* i wsp. (17). Badając aktywność Citroseptu w stosunku do 50 szczepów *C.albicans* wykazali wysoką aktywność preparatu, oceniając wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost drożdżaków (MIC) na podłożu Sabourauda i YNB. Zaobserwowali również różnice we wrażliwości badanych szczepów w zależności od użytego podłoża. Podobnie *Kędzia* (18,19) analizując wpływ Citroseptu na grzyby drożdżopodobne, wyizolowane z zakażeń dróg oddechowych oraz jamy ustnej, wykazała jego dużą aktywność wobec badanych szczepów. Najbardziej wrażliwe na działanie preparatu były szczepy *C. krusei* i *C. tropicalis*.

W badaniach własnych wykorzystano 33% ekstrakt z grejpfruta w wodnym roztworze gliceryny roślinnej (Citrosept i Citrotravel), standaryzowany na zawartość naringeniny. Chemiczny skład preparatów opiera się głównie na związkach flawonoidowych, m.in. na flawonolach, flawanonach, flawonach oraz wit C, B1, PP, naturalnie występujących w wyciągu z grejpfruta. Różnica między preparatami dotyczy składu chemicznego, a mianowicie występowania w Citrotravelu czwartorzędowych związków amonowych, nieobecnych w Citrosepcie.

W przeprowadzonych badaniach ocena skuteczności preparatów Citrosept i Citrotravel, dokonana na podstawie wartości minimalnych stężeń hamujących (MIC, MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, MIC range) wykazała ich aktywność wobec szczepów grzybów drożdżopodobnych. Najniższe wartości stężeń hamujących Citroseptu i Citrotravelu otrzymano dla szczepów z gatunku *C.glabrata* i *C.albicans*. Preparaty wykazały także wysoką aktywność wobec pozostałych,



badanych gatunków grzybów. Na uwagę zasługuje fakt, że *C. krusei* i *C. glabrata*, które często wykazują wysoką oporność na leki przeciwgrzybicze, były wrażliwe na niskie stężenia ekstraktów wynoszące od 1,87-60 mg/l.

Uzyskane wyniki są bardzo zachęcające dla obu preparatów, gdyż wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost badanych drożdżaków są porównywalne, a w przypadku Citrotravelu niższe w porównaniu z powszechnie stosowanymi lekami przeciwgrzybiczymi.

W przeprowadzonym badaniu wykazano potrzebę dalszych prac badawczych nad skutecznością nowych preparatów, w tym także roślinnych. Ze względu na wysoką aktywność Citroseptu i Citrotravelu w stosunku do grzybów drożdżopodobnych, wskazane jest prowadzenie dalszych prac badawczych, w tym także badań *in vivo*. Przedstawione wyniki dają nadzieję na możliwość klinicznego wykorzystania preparatów pochodzenia naturalnego w leczeniu stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą.

## Wnioski

1. Na podstawie hodowli z wymazów pobranych z powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, stwierdzono obecność szczepów grzybów drożdżopodobnych w 84,95% przypadków, co w praktyce klinicznej oznacza konieczność prowadzenia kontrolnych badań mikologicznych u pacjentów użytkujących uzupełnienia protetyczne.
2. Preparaty naturalne Citrosept i Citrotravel wykazały w badaniach *in vitro* dużą aktywność przeciwgrzybiczą wobec większości badanych gatunków grzybów drożdżopodobnych. W obliczu narastającej oporności na dotychczas stosowane antymikotyki skłania to, do rozważenia zastosowania ekstraktów naturalnych w leczeniu zakażeń grzybiczych błony śluzowej jamy ustnej u użytkowników protez.

## Piśmiennictwo

1. *Spiechowicz E., Mierzwińska-Nastalska E.*: Grzybice jamy ustnej. Med. Tour. Press. Int., Warszawa 1998.

2. *Shulman J.D., Rivera-Hidalgo F., Beach M.M.*: Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J. Oral Pathol. Med.*, 2005, 34, 340-346.
3. *Vanden Abbeele A., De Meel H., Ahariz M., Peeraundin J.P., Beyer I., Courtois P.*: Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*, 2008, 26, 14-21.
4. *Grimoud A.M., Marty N., Bocquet H., Andrieu S., Lodter J.P., Chabanon G.*: Colonization of the oral cavity by *Candida species*: risk factors in long-term geriatric care. *J. Oral Sci.*, 2003, 45, 51-55.
5. *Kurnatowska J., Kurnatowski P.*: Niektóre postacie grzybic jamy ustnej, *Mikol. Lek.*, 2008, 15, 29-32.
6. *Szymankiewicz M., Kowalewski J.*: Zakażenia wywołane przez grzyby *Candida*. Czynniki predysponujące. *Mikol. Lek.*, 2005, 12, 3, 189-192.
7. *Mierzwińska-Nastalska E.*: Leczenie infekcji grzybiczej błony śluzowej jamy ustnej u użytkowników uzupełnień protetycznych. *Czas. Stomatol.*, 1999, LII, 10, 685-691.
8. *Ramage G., Bachman S., Patterson T.F., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L.*: Investigation of multidrug efflux pumps in relations to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 49, 973-980.
9. *Ciok-Pater E., Białucha A.*: Mechanizmy oporności drożdży na stosowane leki przeciwgrzybicze. *Mikol. Lek.*, 2008, 15, 49-53.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
11. *Lukaszuk C., Krajewska-Kulak E., Niczyporuk W., Krawczuk-Rybak M., Wojtukiewicz M.*: Pięcioletnia obserwacja lekowrażliwości szczepów grzybów drożdżopodobnych u pacjentów onkologicznych. *Mikol. Lek.*, 2000, 7, 209-215.
12. *Kontoyiannis D.P., Lewis R.E.*: Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, 2002, 359, 1135-1144.
13. *Sharamon S., Baginski B.J.*: Lecznicza siła ekstraktu z grejpfruta. Oficyna Wydawnicza „MH”, Warszawa, 1998.
14. *Castillo J. i wsp.*: Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-ray of flavan-3-ols

- (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agric. Food. Chem.*, 2000, 48, 1738-1745.
15. *En-Qin X.* et al.: Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, 11, 2, 622-646.
16. *Kędzia A.*: Działanie Citroseptu na bakterie beztlenowe występujące w zakażeniach dróg oddechowych. *Postępy Fitoterapii*, 2000, 3, 11-14.
17. *Krajewska-Kulak E., Łukaszuk C., Lewko J., Niczyporuk W., Winter G.*: Ocena wpływu ekstraktu z grejpfruta na wzrost grzybów drożdżopodobnych z gatunku *Candida albicans*. *Doniesienie wstępne. Mikol. Lek.*, 2001, 8, 2, 91-95.
18. *Kędzia A.*: Działanie Citroseptu (Cintamanii) na grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* wyizolowane z zakażeń dróg oddechowych. *Mikol. Lek.*, 2001, 8, 2, 97-100.
19. *Kędzia A.*: Aktywność Citroseptu (Cintamanii) wobec grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych z zakażeń jamy ustnej. *Postępy Fitoterapii*, 2005, 1, 2-6.

Zaakceptowano do druku: 12.01.2012 r.

Adres autorów : 02-006 Warszawa, ul. Nowogrodzka 59.

© Zarząd Główny PTS 2012.