

## АНОТАЦІЯ

Огієнко ТЮ. Мікробіологічне обґрунтування нових засобів на основі лікарських рослин для лікування кандидозу слизової оболонки ротової порожнини. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття доктора філософії у галузі знань 22 «Охорона здоров'я», за спеціальністю 221- Стоматологія.

Підготовка здійснювалась у Івано-Франківському національному медичному університеті, МОЗ України, Івано-Франківськ, 2023 рік.

Захист відбудеться у разовій спеціалізованій вченій раді Івано-Франківського національного медичного університету.

Дисертаційна робота полягає в експериментальному мікробіологічному обґрунтуванні створення нових протигрибкових засобів для стоматологічної практики на основі вивчення антифунгальної активності екстрактів лікарських рослин флори України та пряно-ароматичних рослин, а також синергізму протимікробної дії екстрагованих комплексів біологічно активних речовин із Флуконазолом відносно сучасних азолорезистентних штамів грибів роду *Candida*, виділених від пацієнтів із кандидозом слизової оболонки ротової порожнини.

Об'єктами дослідження відповідно до визначеної мети та поставлених завдань служили 209 екстрактів лікарських та пряно-ароматичних рослин та 76 клінічних штамів дріжджоподібних грибів роду *Candida*, виділених від пацієнтів із кандидозом слизової оболонки ротової порожнини.

Використано мікробіологічні методи дослідження: мікроскопія, виділення чистих культур дріжджоподібних грибів роду *Candida*, ідентифікація культур кандид за біохімічними властивостями; визначення чутливості штамів *Candida* до протигрибкових антибіотиків та синтетичних антимікотиків; встановлення мінімальних фунгістатичних і фунгіцидних концентрацій протигрибкових препаратів і антисептиків; визначення протигрибкової активності рослинних екстрактів та їх мінімальних фунгістатичних і фунгіцидних концентрацій, виявлення синергізму протигрибкової дії екстрактів лікарських рослин із Флуконазолом. Статистичну обробку даних здійснювали методами варіаційної

статистики за допомогою t-критерію Стьюдента, кореляційного та однофакторного дисперсійного аналізу із використанням комп'ютерної програми UTHSCSA ImageTool 2.0 та Microsoft Excel 365.

Уточнено наукові дані про видовий склад грибів роду *Candida*, які виявляються в даний час на слизовій оболонки ротової порожнини стоматологічних пацієнтів (без ортопедичних конструкцій та у носіїв знімних ортопедичних конструкцій) з кандидозом слизової оболонки ротової порожнини на фоні супутньої соматичної патології, зокрема, вторинного синдрому Шегрена.

При мікробіологічному дослідженні мазків із слизової оболонки ротової порожнини (ясен та язика) стоматологічних пацієнтів без ортопедичних конструкцій та у носіїв знімних ортопедичних конструкцій з кандидозом слизової оболонки ротової порожнини на фоні супутньої соматичної патології, в тому числі із вторинним синдромом Шегрена (в основному на фоні ревматоїдного артриту) виділено та ідентифіковано 76 штамів грибів роду *Candida*. Встановлено, що на сьогоднішній день серед усіх ізолятів кандид, які виділяються від пацієнтів із кандидозом слизової оболонки ротової порожнини на фоні супутньої соматичної патології, беззаперечно переважають штами *C. albicans* –  $72,5 \pm 0,88$  %. На фоні супутнього вторинного синдрому Шегрена *C. albicans* зберігає за собою чільну позицію, хоч на достовірно нижчому рівні ( $56,0 \pm 1,98$  %,  $p < 0,01$ ). Серед видів *Candida non-albicans* переважають *C. lusitaniae* ( $16,0 \pm 1,47$  %) і *C. kefyr* ( $12,0 \pm 1,30$  %). Окремі види дріжджоподібних грибів, зокрема *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*, *Cryptococcus laurentii*, виявлені на слизовій оболонці ротової порожнини у пацієнтів із синдромом Шегрена вперше. Масивність колонізації кандидами слизової оболонки язика пацієнтів ( $3,95 \pm 0,45$  lg КУО/мл) на фоні супутнього синдрому Шегрена є вищою, порівняно з колонізацією ясен ( $1,48 \pm 0,46$  lg КУО/мл,  $p < 0,01$ ).

Клінічні штами *Candida spp.*, виділені від стоматологічних пацієнтів із кандидозом СОРП, перевірено на чутливість до протигрибкових препаратів, які є доступними сьогодні в Україні. Тестування виконано класичним диско-дифузійним тестом, за допомогою системи АТВ FUNGUS 3 (bioMerieux, Франція), також мікрометодом серійних розведень. Інтерпретацію результатів

проводили відповідно до критеріїв EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), Version 10.0, 2020-02-04.

На основі лабораторних досліджень встановлено, що сучасні клінічні штами кандид, виділені від пацієнтів із кандидозом слизової оболонки ротової порожнини, як правило, характеризуються полірезистентністю до полієнів та синтетичних антимікотиків (імідазолів, тріазолів, аліламінів, Флуцитозину): від 85,4 % до 92,6 % ізолятів володіють резистентністю до препаратів як мінімум 3 різних хімічних груп. Резистентність до Флуконазолу (за даними тесту серійних розведень) проявляють  $76,2 \pm 1,1$  % штамів *C. albicans* і  $70,6 \pm 1,3$  % штамів *Candida non-albicans*. Чутливі до Флуконазолу штами *Candida non-albicans* здебільшого були ідентифіковані як *C. lipolytica* і *C. lusitaniae*.

Ізоляти *Candida albicans* характеризуються вищими середніми значеннями фунгістатичних і фунгіцидних концентрацій Флуконазолу, порівняно з ізолятами *Candida non-albicans*. Встановлено, що при кандидозі ротової порожнини  $61,9 \pm 1,2$  % ізолятів *Candida albicans* і  $58,8 \pm 1,5$  % ізолятів *Candida non-albicans* характеризуються низьким рівнем резистентності до Флуконазолу (MIC 4-50 мкг/мл). Для  $23,8 \pm 1,1$  % клінічних ізолятів *C. albicans* і  $17,6 \pm 1,1$  % штамів *Candida non-albicans* властивий високий рівень резистентності до Флуконазолу (MIC  $\geq 100$  мкг/мл).

Сучасні клінічні штами кандид від стоматологічних пацієнтів (як азолочутливі, так і азолорезистентні) проявляють достатню чутливість до антисептичних засобів Декасану і Хлоргексидину, яка реєструється при діапазоні розведень антисептиків від 1:40 до 1:160. Антикандидозна активність офіційного фітозасобу Стоматофіт значно поступається антисептикам, а у препарату Ротокан взагалі відсутня.

Враховуючи високий рівень резистентності сучасних клінічних штамів кандид, виділених від стоматологічних пацієнтів із кандидозом слизової оболонки ротової порожнини, до класичних протигрибкових антибіотиків та синтетичних антимікотиків, виконано первинний скринінг 166 водно-етанольних екстрактів із різних частин (квітів, листків, трави, коренів, плодів) лікарських рослин флори України та пряно-ароматичних рослин на

антифунгальну активність. В цілому пряму протигрибкову активність відносно штаму *C. albicans* проявили 108 екстрактів із 166 досліджених ( $65,1 \pm 0,29$  %), з них 30 екстрактів ( $18,1 \pm 0,23$  %) виявились високоактивними (діаметри зон затримки росту  $>10$  мм). Протигрибкову активність відносно штаму *C. tropicalis* проявили лише 60 екстрактів із 166 досліджених ( $36,1 \pm 0,29$  %), з них високоактивними були 11 екстрактів ( $6,6 \pm 0,15$  %).

Відносно основного збудника кандидозу слизової оболонки ротової порожнини *C. albicans* протигрибкова дія у 17 із 166 протестованих ( $10,2 \pm 0,18$  %) екстрактів лікарських рослин на 90 % етанолі проявляється на рівні антисептичного засобу Декасан і ще у 29 екстрактів ( $17,5 \pm 0,23$  %) достовірно ( $p < 0,01$ ) переважає активність офіціального фітозасобу Стоматофіт. Відносно *C. tropicalis* у 25 рослинних екстрактів ( $15,1 \pm 0,22$  %) протигрибкова дія була вищою, ніж у Стоматофіту, але поступалася активності антисептиків – як Хлоргесидину, так і Декасану.

Встановлено високу протимікробну активність відносно азолорезистентних штамів *C. albicans* і *Candida non-albicans* орального походження екстрактів ряду лікарських рослин (кореневищ тирлича жовтого і тирлича ластівневого, лепехи звичайної, коренів перстача прямостоячого, ранника вузлуватого, листків софори японської, квітів бузини чорної, первоцвіту весняного, трави деревію звичайного, вербени лікарської, хвоща польового, подорожника карликового), а також пряно-ароматичних рослин (трави чебрецю повзучого, плодів коріандру посівного та перцю гострого, кори коричника цейлонського, кореневищ куркуми довгої та імбиря лікарського), сировина яких є фармакопейною в Україні (ДФУ 2.6). Крім того, підтверджено високу фунгіцидну і фунгістатичну дію стосовно клінічних ізолятів *C. albicans* і *C. non-albicans* від стоматологічних пацієнтів екстрактів листків лавра благородного, плодів мускатника духмяного, трави буркуна білого, родовика лікарського і герані темної, кореневищ купини кільчастої, трави і коренів париля звичайного, квітів глоду одноматочкового у розведеннях до 1:640, що обґрунтовує принципову можливість їх застосування для місцевого лікування кандидозних уражень слизової оболонки ротової порожнини.

Рідкий екстракт кореневищ тирличу ваточникового (*Gentiana asclepiadea* L.), виготовлений на 40 % етанолі характеризується вираженою фунгістатичною (у розведеннях 1:320 – 1:640) і фунгіцидною (у розведеннях 1:40 – 1:160) активністю відносно оральних ізолятів *Candida non-albicans*, проявляє фунгістатичну (у розведеннях 1:40 – 1:320) дію стосовно *C. albicans*, у зв'язку з чим може бути рекомендований для місцевого лікування кандидозу слизової оболонки ротової порожнини.

Біологічно активні сполуки лікарських рослин флори України володіють здатністю підвищувати чутливість клінічних штамів кандид до Флуконазолу. Достовірно підтверджено дозозалежний синергізм антифунгальної дії з Флуконазолом для 37 екстрактів із 166 досліджених ( $22,3 \pm 0,25$  %) відносно *C. tropicalis* та 5 екстрактів ( $3,0 \pm 0,10$  %) відносно *C. albicans*. Таким чином, уперше продемонстровано, що у штамів кандид низький рівень резистентності до Флуконазолу (який забезпечується ефлюксом механізмом, як у тест-штаму *C. tropicalis*) у більшій мірі піддається модифікації біологічно активними сполуками лікарських рослин, ніж високий рівень резистентності (у тест-штаму *C. albicans*). Здатністю підвищувати чутливість до Флуконазолу обох тест-штамів володіли екстракти фармакопейних лікарських рослин – квітів календули лікарської, трави і коренів париля звичайного, трави чебрецю звичайного, а також нефармакопейних рослин – квітів рудбекії роздільнолистої, листків горіха волоського, слані ксанторії постінної. Результати проведених досліджень теоретично обґрунтовують новий стратегічний напрямок подолання азолорезистентності кандид – комбіноване застосування Флуконазолу з модифікаторами резистентності природного (рослинного) походження.

Проведені мікробіологічні дослідження обґрунтовують необхідність подальших більш глибоких фармакогностичних, фармакологічних та токсикологічних досліджень водно-етанольних екстрактів ряду нефармакопейних рослин (трави полину звичайного і полину боже дерево, жовтцю їдкою, горлянки повзучої, жабрію звичайного), які володіють високою антикандидозною активністю (на рівні антисептичних засобів Декасан і Хлоргексидин) та здатністю зменшувати резистентність кандид до Флуконазолу.

Виконано мікробіологічне обґрунтування перспективності і доцільності використання рідкого екстракту кореневищ тирличу ваточникового (*Gentiana asclepiadea* L.), виготовленого на 40 % етанолі (1:1) для створення на його основі нового засобу для місцевого лікування кандидозів слизових оболонок, у тому числі ротової порожнини.

Таким чином, результати проведеного експериментального дослідження служать мікробіологічним обґрунтуванням можливості створення нових засобів на основі лікарських рослин для лікування кандидозу слизової оболонки ротової порожнини. Впровадження у клінічну практику даних засобів, а також принципу комбінованої хіміотерапії дозволить покращити ефективність лікування мікотичних уражень слизової оболонки, особливо азолорезистентними штамми кандид.

Одержані в ході дослідження результати розширюють існуючі уявлення про фармакологічні властивості офіційних і неофіційних лікарських рослин флори України, а також пряно-ароматичних рослин, дозволяють сформулювати нові покази до їх клінічного застосування.

**Ключові слова:** слизова оболонка ротової порожнини, дріжджоподібні гриби роду *Candida*, рослинні екстракти, Флуконазол, мікробіом ротової порожнини, протигрибкові препарати, грибкові захворювання порожнини рота, кандидоз, антимікробна активність, антимікробна резистентність.

## ABSTRACT

*Ohiienko TYu.* Microbiological substantiation of new means based on medicinal plants for the treatment of candidiasis of the oral mucosa. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for Doctor of Philosophy in 22 “Health care” field of knowledge with a specialization in 221 – Dentistry.

The preparation was conducted at Ivano-Frankivsk National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ivano-Frankivsk, 2023.

The defence will be held at the one-time specialized academic council of the Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk.

The dissertation consists in the experimental microbiological substantiation of the creation of new antifungal agents for dental practice based on the study of the antimicrobial activity of medicinal plants extracts from the flora of Ukraine and aromatic herbs, as well as the synergic interection of the antimicrobial action of the extracted complexes of biologically active substances with Fluconazole against modern azole-resistant strains of *Candida* fungi isolated in patients with oral mucosa candidiasis.

209 extracts of medicinal and aromatic herbs and 76 clinical strains of *Candida* yeast-like fungi isolated from patients with candidiasis served as research objects in accordance with the defined objective and tasks.

The following microbiological research methods were used: microscopy, selection of pure cultures of *Candida* yeast-like fungi, identification of *Candida* cultures by biochemical properties; determination of *Candida* strains sensitivity to antifungal antibiotics and synthetic antimycotics; determination of minimum fungistatic and fungicidal concentrations of antifungal agents and antiseptics; definition of antifungal activity of plant extracts and their minimum fungistatic and fungicidal concentrations, detection of synergic interection of medicinal plant extracts antifungal action with Fluconazole.

Statistical data processing was conducted by the methods of variational statistics using the Student's t-test, correlation and one factor analysis of variance using UTHSCSA ImageTool 2.0 and Microsoft Excel 365 computer programs.

The scientific data on the species composition of *Candida* fungi currently found on the oral mucosa of patients (without dental dentures and in the carriers of removable dental dentures) with oral mucosa candidiasis associated with the concomitant somatic pathology, in particular, secondary Sjogren's syndrome, were specified.

76 strains of *Candida* fungi were isolated and identified during the microbiological examination of swabs from the oral mucosa (gums and tongue) of the dental patients without dental dentures and the carriers of removable dental dentures with oral mucosa candidiasis associated with the concomitant somatic pathology, including secondary Sjogren's syndrome (mainly on the background of rheumatoid arthritis). *C. albicans* strains were determined to predominate undoubtedly among all

*Candida* isolates in patients with oral mucosa candidiasis associated with the concomitant somatic pathology. They constituted  $72,5 \pm 0,88$  %. *C. albicans* retained a prominent position, although at a significantly lower level, on the background of concomitant secondary Sjogren's syndrome ( $56,0 \pm 1,98$  %,  $p < 0,01$ ). *C. lusitaniae* ( $16,0 \pm 1,47$  %) and *C. kefyr* ( $12,0 \pm 1,30$  %) prevailed among *Candida non-albicans* species. Certain species of yeast-like fungi, in particular

*C. lusitaniae*, *C. lipolytica*, *Cryptococcus laurentii* were detected on the oral mucosa in patients with Sjogren's syndrome for the first time. The massiveness of *Candida* colonization of the mucous membrane of the patients' tongue ( $3,95 \pm 0,45$  lg CFU/ml) was higher on the background of concomitant Sjogren's syndrome compared to the gums colonization ( $1,48 \pm 0,46$  lg CFU/ml,  $p < 0,01$ ).

Clinical strains of *Candida spp.* isolated from patients with oral mucosa candidiasis were tested for sensitivity to antifungal drugs available today in Ukraine. Testing was performed by means of the classical Kirby-Bauer disk-diffusion method, using the ATB FUNGUS 3 system (bioMerieux, France), as well as by the two fold serial dilutions. The results were interpreted according to EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) criteria, Version 10.0, 2020-02-04.

According to laboratory studies, modern clinical strains of *Candida* isolated from the patients with oral mucosa candidiasis were found to be usually characterized by polyresistance to polyenes and synthetic antimycotics (imidazoles, triazoles, allylamines, Flucytosine): 85,4 % to 92,6 % of isolates had resistance to agents of at least 3 different chemical groups.  $76,2 \pm 1,1$  % of *C. albicans* strains and  $70,6 \pm 1,3$  % of *Candida non-albicans* strains showed resistance to Fluconazole (according to the two fold serial dilution test). Fluconazole-susceptible strains of *Candida non-albicans* were mostly identified as *C. lipolytica* and *C. lusitaniae*.

Isolates of *Candida albicans* were characterized by higher average values of fungistatic and fungicidal concentrations of Fluconazole compared to isolates of *Candida non-albicans*.  $61,9 \pm 1,2$  % of *Candida albicans* isolates and  $58,8 \pm 1,5$  % of *Candida non-albicans* isolates were characterized by a low level of resistance to Fluconazole (MIC 4-50  $\mu$ g/ml) in case of oral cavity candidiasis.  $23,8 \pm 1,1$  % of



*C. albicans* clinical isolates and  $17,6 \pm 1,1$  % of *Candida non-albicans* strains had a high level of resistance to Fluconazole ( $MIC \geq 100 \mu\text{g/ml}$ ).

Modern clinical strains of *Candida* selected from patients (both azole-sensitive and azole-resistant) showed sufficient sensitivity to antiseptic agents such as Dekasan and Chlorhexidine, which was registered in the range of antiseptic dilutions from 1:40 to 1:160. The anti-candidal activity of the officinal phytopreparation Stomatophyt was significantly inferior to antiseptics, and Rotocanum did not show any anti-candidal activity.

Primary screening for antifungal activity of 166 aqueous-ethanol extracts from various parts (flowers, leaves, herbs, roots, fruits) of the medicinal flora of Ukraine and aromatic herbs was conducted taking into account the high level of resistance of modern clinical *Candida* strains, selected from dental patients with candidiasis, to classic antifungal antibiotics and synthetic antimycotics. In general, direct antifungal activity against the *C. albicans* strain was demonstrated by 108 extracts from 166 studied ones ( $65,1 \pm 0,29$  %), 30 extracts ( $18,1 \pm 0,23$  %) were highly active (diameters of growth retardation zones  $>10$  mm). Only 60 extracts out of 166 studied ( $36,1 \pm 0,29$  %) showed antifungal activity against *C. tropicalis* strain, 11 extracts ( $6,6 \pm 0,15$  %) were highly active.

The antifungal effect of 17 out of 166 studied ( $10,2 \pm 0,18$  %) extracts of medicinal plants in 90 % ethanol was manifested at the level of Dekasan antiseptic agent and the activity of the officinal phytopreparation Stomatophyt prevailed significantly ( $p < 0,01$ ) in another 29 extracts ( $17,5 \pm 0,23$  %) regarding *C. albicans* as the main causative agent of oral mucosa candidiasis. 25 plant extracts ( $15,1 \pm 0,22$  %) had an antifungal effect regarding *C. tropicalis* higher than that of Stomatophyt, but it was inferior to the activity of antiseptics, both Chlorhexidine and Dekasan. Extracts of a number of medicinal plants (rhizomes of Yellow Gentian and Willow Gentian, Acorus Clamus, roots of Tormentil, Woodland Figwort, leaves of the Chinese Scholar Tree, flowers of Sambucus Nigra, Cowslip Paigle, herbs of Common Yarrow, European Verbena, Common Horsetail, Slender Plantain) as well as aromatic herbs (herbs of Creeping Thyme, fruits of Coriander and Hot Pepper, Ceylon cinnamon bark, Turmeric and Ginger rhizomes), the raw materials of which are pharmacopoeia in

Ukraine (SPU 2.6), showed high antimicrobial activity against azole-resistant *C. albicans* and *Candida non-albicans* strains of oral origin. In addition, a pronounced fungicidal and fungistatic effect of extracts of Bay Laurel leaves, Nutmeg Tree fruits, herbs of White Sweet Clover, Great Burnet, and Mourning Widow, *Polygonatum verticillatum* rhizomes, herbs and roots of *Agrimonia Eupatoria*, flowers of Common Hawthorn in dilutions up to 1:640 was confirmed regarding clinical isolates of *C. albicans* and *C. non-albicans* from dental patients. This justified the principle possibility of their use for local treatment of candidal lesions of oral mucosa.

The liquid extract of *Gentiana asclepiadea* L. rhizomes prepared in 40 % ethanol is characterized by pronounced fungistatic (in dilutions of 1:320 – 1:640) and fungicidal (in dilutions of 1:40 – 1:160) activity regarding *Candida non-albicans* oral isolates, has a fungistatic effect (in dilutions of 1:40 – 1:320) on *C. albicans*, therefore it can be recommended for the local treatment of oral mucosa candidiasis.

Biologically active compounds of medicinal plants of the flora of Ukraine have the ability to increase the sensitivity of *Candida* clinical strains to Fluconazole. Dose-dependent synergism of antifungal action with Fluconazole was reliably confirmed for 37 extracts out of 166 studied ( $22,3 \pm 0,25$  %) regarding *C. tropicalis* and 5 extracts ( $3,0 \pm 0,10$  %) regarding *C. albicans*. Thus, a low level of resistance to Fluconazole (provided by an efflux mechanism, as in *C. tropicalis* test strain) in *Candida* strains was demonstrated for the first time to be more susceptible to modification by biologically active compounds of medicinal plants than a high level of resistance (in *C. albicans* test strain). Extracts of pharmacopeial medicinal plants such as Pot Marigold flowers, Common Agrimony herbs and roots, Common Thyme herbs as well as non-pharmacopoeial plants such as Greenheaded Coneflower flowers, leaves of Walnut, thallus of *Xanthoria parietina* had the ability to increase both test strains sensitivity to Fluconazole. The results of the performed research theoretically substantiate a new strategic direction for overcoming *Candida* azole resistance, namely the combined use of Fluconazole with modifiers of natural (plant) origin resistance.

The conducted microbiological research substantiates the need for further more profound pharmacognostic, pharmacological and toxicological studies of aqueous-ethanol extracts of a number of non-pharmacopoeial plants (herbs of Wormwood,

Artemisia Abrotanum, Tall Crowfoot, Bugleherb, Galeopsis Tetrahit) with high anti-candidal activity (at the level of such antiseptic agents as Dekasan and Chlorhexidine) and the ability to reduce candida resistance to Fluconazole.

The future outlook and expediency of using a liquid extract of *Gentiana asclepiadea* L. rhizomes prepared in 40% ethanol (1:1) for the creation of a new agent based on it for the local treatment of candidiasis of the mucous membranes, including the oral cavity, was microbiologically substantiated.

Thus, the results of the conducted experimental research serve as a microbiological justification for the possibility of making new means based on medicinal plants for the treatment of oral mucosa candidiasis. The introduction of these agents into clinical practice, as well as the principle of combined chemotherapy, will improve the effectiveness of the treatment of the mucous membrane mycotic lesions, especially azole-resistant *Candida* strains.

The results obtained in the course of the research expand the existing ideas about the pharmacological properties of officinal and non-officinal medicinal plants of the flora of Ukraine, as well as aromatic herbs, providing an opportunity to formulate new indications for their clinical use.

**Key words:** oral mucosa, *Candida* yeast-like fungi, plant extracts, Fluconazole, microbiome of the oral cavity, antifungal drugs, fungal diseases of the oral cavity, candidiasis, antimicrobial activity, antimicrobial resistance.