

NOWE SYNTETYCZNE I NATURALNE ANTYMYKOTYKI W KONTEKŚCIE TERAPII DERMATOMYKOZ

Sebastian Gnat^{1,*}, Dominik Łagowski¹, Aneta Nowakiewicz¹, Mariusz Dyląg²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Mykologii i Genetyki

Wpłynęło w wrześniu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Paradoksalnie, pomimo postępu w medycynie obserwuje się rosnącą z każdym rokiem prevalencję infekcji grzybiczych. Na początku trzeciego tysiąclecia możliwości terapeutyczne wciąż są bardzo ograniczone. Obecnie w klinicznym użyciu znajduje się zaledwie osiem klas związków przeciwgrzybiczych, z których tylko cztery mają zastosowanie w terapii dermatomykoz. Trwające od drugiej połowy XX wieku intensywne poszukiwania „świętego Graala” terapii przeciwgrzybiczej napotykać na poważne przeszkody wynikające z eukariotycznego modelu budowy komórki grzyba. W niniejszej pracy w syntetyczny sposób zostały opisane nowe grupy związków chemicznych pochodzenia głównie naturalnego, które ze względu na przejawianą przez nie aktywność przeciwgrzybiczą, w tym wobec patogennych gatunków dermatofitów, mogą stanowić nowe opcje terapeutyczne. Spośród związków budzących obecnie duże zainteresowanie na uwagę zasługują związki z grupy terpenoidów, alkaloidów, saponin, flawonoidów i olejków eterycznych. Wiele z tych związków znajduje się w fazie badań klinicznych jako potencjalne leki przeciwgrzybicze, podczas gdy inne są na etapie badań przedklinicznych. Przyszłe badania powinny być skupione na próbie określenia możliwości aplikacyjnych danych substancji w implementacji do rutynowego stosowania oraz ich skuteczności, toksyczności i powodowanych działań niepożądanych.

1. Wprowadzenie. 2. Ogólna charakterystyka dermatofitów w aspekcie terapeutycznym. 3. Nowe syntetyczne preparaty o działaniu przeciwgrzybiczym. 4. Naturalne preparaty przeciwgrzybicze. 4.1. Terpenoidy i olejki eteryczne. 4.2. Alkaloidy. 4.3. Flawonoidy. 4.4. Saponiny. 4.5. Inne związki chemiczne 5. Podsumowanie

CLINICALLY USED AND POTENTIAL ANTIMYCOTICS IN THE CONTEXT OF THERAPY OF DERMATOMYCOSES

Abstract: Paradoxically, despite the progress in medicine, the prevalence of fungal infections is increasing from year to year. At the beginning of the third millennium, practical therapeutic options are still very limited. Currently, only eight classes of antifungal compounds are in clinical use, only four of which are used in the treatment of dermatomycoses. The intense search for the “Holy Grail” of antifungal therapy that has been going on since the second half of the 20th century faces serious obstacles arising from the eukaryotic model of fungal cell structure. In this paper, new groups of chemical compounds of mainly natural origin have been synthetically described, which due to their interesting antifungal activity, including pathogenic species of dermatophytes, may constitute new therapeutic options. Among compounds currently arousing great interest, compounds from the group of terpenoids, alkaloids, saponins, flavonoids and essential oils deserve attention. Many of these compounds are in clinical trials as potential antifungal agents, while others are in preclinical studies. Future research should focus on attempting to determine the applicability of the given substances in implementation for routine use and their effectiveness, toxicity and side effects.

1. Introduction. 2. General characteristics of dermatophytes in the therapeutic aspect. 3. New synthetic preparations with antifungal activity. 4. Natural antifungal preparations. 4.1. Terpenoids and essential oils. 4.2. Alkaloids. 4.3. Flavonoids. 4.4. Saponins. 4.5. Other chemical compounds 5. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, dermatomykozy, antymykotyki, produkty naturalne, spektrum działania

Key words: dermatophytes, dermatomycoses, antimycotics, natural products, spectrum of activity

1. Wprowadzenie

Dermatofity to w ogromnej większości grzyby chrobotwórcze o wysokim powinowactwie do silnie skratynizowanych struktur, takich jak paznokcie, skóra (naskórek) i włosy, które powodują zakażenia powierzch-

chowne znane jako dermatomykozy lub grzybice powierzchowne [33]. W języku angielskim jednostki chorobowe powodowane przez dermatofity określane są terminami dermatomycoses lub superficial mycoses [21]. Rosnąca częstość występowania zakażeń grzybiczych u ludzi, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną

* Autor korespondencyjny: Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

odpornością, powoduje, że choroby te, a zwłaszcza inwazyjne infekcje grzybicze stają się ogólnosiowym problemem zdrowia publicznego [32]. Rokowania w przebiegu dermatomykoz mogą być różne, a obraz kliniczny choroby w dużym stopniu zależny jest od statusu immunologicznego gospodarza i może przyjmować postać od ograniczonych zmian skórnych do głębszych infekcji podskórnych, jak w przypadku *kerion Celsi*, które przy braku lub niewłaściwym leczeniu mogą pozostawić trwałe zmiany [68]. Chociaż dermatofity są częstymi czynnikami etiologicznymi grzybiczych infekcji powierzchniowych, należy również nadmienić, że grzyby z rodzaju *Candida* i *Malassezia* znacznie częściej odpowiadają za tego typu infekcje [32, 33, 36].

W pierwszych dziesięcioleciach XX wieku pojawiły się pierwsze obawy związane z narastającą prewalencją infekcji grzybiczych u ludzi, której powodów upatrywano w różnych czynnikach środowiskowych i antropopresji. W konsekwencji zostały podjęte pierwsze próby terapeutyczne ukierunkowane na leczenie tych infekcji [90]. Stosowane wówczas leki przeciwgrzybicze ograniczone były do środków nieswoistych, takich jak jodek, rtęć, kwasy benzoesowe i salicylowe, pochodne fenolu, kwas undecylenowy, fiolet metylowy, pochodne sulfonamidów i inne czynniki, w większości szkodliwe dla ludzi, m. in. oparte na preparatach bromu, nadmanganianu potasu i oleju terpentynowego w mieszaninie z oliwą z oliwek [37, 51].

Od tamtego czasu zainteresowanie kliniczną terapią przeciwgrzybiczą stopniowo wzrasta, aczkolwiek tempo opracowywania leków przeciwgrzybiczych wciąż jest bardzo wolne. Problemy związane z poszukiwaniem nowych skutecznych leków przeciwgrzybiczych wynikają przede wszystkim z wielkiego podobieństwa komórek grzybów do komórek zwierzęcych, a więc również prezentujących eukariotyczny model budowy [72]. Można to zobrazować chociażby przykładem echinokandyn, które chociaż odkryte na początku lat 70. XX wieku, znacznie później zostały wprowadzone do praktyki klinicznej, a ich opis uwzględniono w dodatku do farmakopei przeciwgrzybiczej, dopiero na początku XXI wieku [81]. Ponadto, od ponad 20 lat do praktyki klinicznej w terapii kryptokokowego zapalenia opon mózgowych, jednej z najważniejszych przyczyn zgonów związanych z chorobami zakaźnymi u pacjentów z AIDS, nie wprowadzono żadnych nowych leków [49]. W rzeczywistości obecna terapia tzw. „złotym standardem” opiera się na stosowaniu kombinacji dwóch leków, tj. amfoterycyny B i 5-flucytozyny, które w użyciu klinicznym są już od 50 lat [49]. W zasadzie niewielka liczba leków i wolne tempo rozwoju nowych farmaceutyków przeciwgrzybiczych nie byłyby problemem, gdyby obecnie stosowane terapie były wysoce skuteczne. Niestety, wskaźniki dotyczące występowania działań niepożądanych i oporności w leczeniu infekcji

grzybiczych wahają się od 20% do 100%, w zależności od organizmu i stanu odporności gospodarza [10]. Oczywistym jest, że tempo rozwoju nowych leków i strategii przeciwgrzybiczych musi wzrosnąć, aby zaspokoić obecne i przyszłe potrzeby.

Inny problem wynikający z powszechnego stosowania leków przeciwgrzybiczych związany jest z nakładającymi się mechanizmami ich działania i tożsamymi celami komórkowymi, co może przyczyniać się do powstawania fenotypów oporności wielolekowej (MDR, Multi-Drug Resistance) obserwowanych wśród coraz większej liczby patogennych grzybów [62]. Zarówno oporność kliniczna, jak również mikrobiologiczna może skutkować niepowodzeniem terapii. Z definicji, oporność kliniczna jest niepowodzeniem w eradykacji infekcji nawet przy podawaniu leków wykazujących aktywność *in vitro*, podczas gdy oporność mikrobiologiczna oparta jest na różnych mechanizmach molekularnych indukowanych w komórkach grzybów w celu przewyciężenia inhibicyjnego działania leków przeciwgrzybiczych [42]. W komórce grzyba może dojść do aktywacji kilku takich mechanizmów, które mogą funkcjonować niezależnie od siebie lub jako wypadkowa dwóch lub większej ilości takich mechanizmów [18, 63, 77]. Z drugiej strony, pacjenci często zaniedbują i rezygnują z leczenia ze względu na konieczność długotrwałego stosowania leków i występowanie związanego z tym działania niepożądanego [63]. Wszystko to skłania mikrobiologów do poszukiwania nowych preparatów przeciwgrzybiczych o wysokiej skuteczności i łatwej dostępności.

Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu piśmiennictwa traktującego o różnych nowatorskich metodach leczenia grzybic powierzchniowych opartych o chemioterapeutyki, antybiotyki przeciwgrzybicze i substancje pochodzenia naturalnego. Ponadto, w niniejszej pracy opisane są zalety i ograniczenia oraz mechanizmy działania tych antymykotyków.

2. Ogólna charakterystyka dermatofitów w aspekcie terapeutycznym

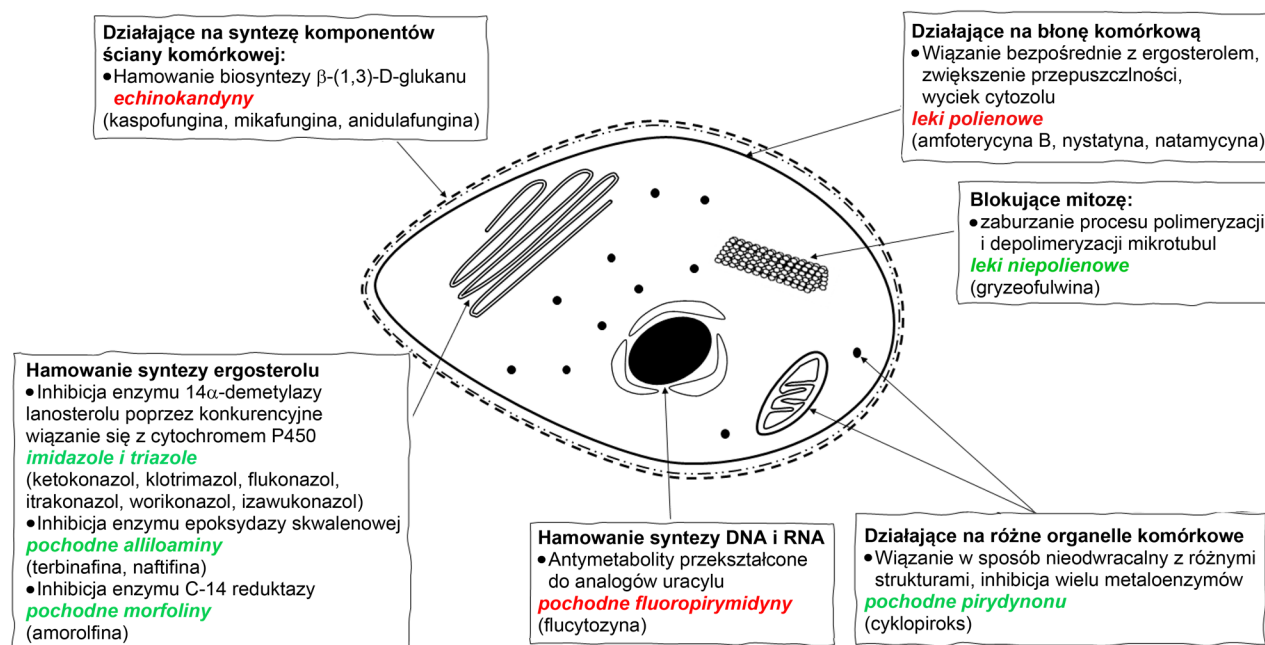
Termin dermatofity, chociaż wprowadzony głównie ze względów praktycznych i nie mający wartości taksonomicznej, skupia gatunki należące do rzędu *Onygenales*. Ogromna większość z nich stanowi patogeny ludzi oraz zwierząt i posiada zdolność rozkładu keratyny w celu pozyskania składników odżywczych [32]. Sekrecja szerokiego spektrum enzymów litycznych, takich jak lipazy, proteazy i keratynazy, przez strzępki tych grzybów, stanowi najlepiej przebadany czynnik wirulencji, umożliwiający pierwotną kolonizację i utrzymanie się tych patogenów w tkankach gospodarza [28, 59]. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że

enzymy te posiadają wysoką specyficzność substratów, która zarazem definiuje spektrum gospodarzy preferowanych przez poszczególne gatunki dermatofitów [28, 29]. Jednocześnie uwolnione enzymy pełnią rolę antygenów indukujących i modelujących stan zapalny towarzyszący przede wszystkim infekcjom powodowanym przez gatunki zoofilne [59].

Duże różnice między gatunkami dermatofitów można wskazać w odniesieniu do ich naturalnego środowiska występowania. Dotychczas, trzy szerokie grupy ekologiczne dermatofitów zostały opisane: antropofilne, zoofilne i geofilne [33]. Gatunki antropofilne naturalnie kolonizują wytwory naskórka człowieka, przenosząc się między gospodarzami i powodując przewlekłe, ale łagodnie przebiegające infekcje, często osiągające rozmiary epidemii [22, 33]. Transmisja zakażenia na zwierzęta tymi gatunkami była notowana, ale sporadycznie i jest uznawana za wyjątkową [33]. Gatunki zoofilne bytują na zwierzętach, ich przenoszenie na ludzi jest możliwe i częste, a odbywa się zwykle poprzez rezerwuary, którymi mogą być same zwierzęta, ich sierść lub przedmioty, z którymi miały styczność [27, 30, 31, 58]. Dermatofity zoofilne diagnozowane u zwierząt, odpowiedzialne są za infekcje objawowe, ale niejednokrotnie bytują również bezobjawowo, czyniąc zwierzę nosicielem i w tym przypadku mogą stać się źródłem epidemii [59]. Naturalnym miejscem bytowania dermatofitów geofilnych jest gleba, często wokół nor i jam określonych ssaków lądowych [32]. Ta grupa grzybów może być przenoszona przez zwierzęta mechanicznie na powłokach zewnętrznych [32, 59], imitując bezobjawowe nosicielstwo, stąd różnica między dermatofitami geofilnymi i zoofilnymi nie zawsze jest ostra [33].

Ekologiczny podział dermatofitów jest ważny, ponieważ występowanie zróżnicowanych objawów klinicznych związane jest z odpowiedzią immunologiczną gospodarza na infekcję różnymi gatunkami grzybów. Gatunki antropofilne są związane z przewlekłymi zakażeniami i z niższym naciekiem komórkowym w skórze niż w przypadku gatunków zoofilnych [40]. W pierwszych stadiach zakażenia dermatofity kolonizują skórę i stymulują keratynocyty do wytwarzania cytokin, które pośredniczą w odpowiedzi zapalnej i akumulacji leukocytów, głównie neutrofilów, w zakażonej tkance [32, 40, 61]. Dermatofity są początkowo rozpoznawane przez receptory wrodzonych komórek odpornościowych gospodarza, takich jak makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne, które indukują aktywację odpowiedzi adaptacyjnej w celu zwalczania zakażenia. Modele infekcji *in vitro* i *in vivo* wykazały, że gatunki antropofilne (przede wszystkim *Trichophyton tonsurans*) indukują keratynocyty do wydzielania ograniczonego spektrum cytokin, głównie IL-8, IL-6 i IL-1 β . Z kolei, zoofilny gatunek *Arthroderma benhamiae* indukuje szersze spektrum cytokin, takich jak IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-2, IL-15, TGF- β , przyczyniając się do zwiększenia liczby komórek zapalnych w miejscu zakażenia, które są odpowiedzialne za eliminowanie komórek grzybów, regenerację i przebudowę tkanek [32, 35].

Pomimo dostępności przynajmniej kilku klas leków przeciwgrzybiczych przeznaczonych do użytku klinicznego, stanowią one ograniczone spektrum w kontekście dostępnych dla nich celów komórkowych (Ryc. 1). Należy jednak zaznaczyć, że aż cztery z ośmiu klas obecnie dostępnych leków przeciwgrzybiczych tj.



Ryc. 1. Obecnie stosowane antybiotki i ich cele komórkowe

polieny, azole, alliloaminy i pochodne morfoliny działają na poziomie błony komórkowej [26, 60, 72]. Dodatkowo, pierwsze z wymienionych, chociaż jako leki grzybobójcze cechujące się nieporównywalnie wyższą aktywnością przeciwgrzybiczą w porównaniu z pozostałymi, nie znalazły do tej pory zastosowania w terapii dermatomykoz [26, 54, 60, 72]. Z kolei pochodne azolowe, w tym imidazole i triazole pomimo najszerszego spektrum działania jako leki o właściwościach grzybostatycznych są obarczone zjawiskiem często narastającej na nie tzw. oporności nabytej, niejednokrotnie opisywanej w literaturze [12, 88]. Ponadto, leki azolowe wchodzi w interakcje z innymi lekami, co stwarza niejednokrotnie duże problemy w odniesieniu do pewnych grup pacjentów [60]. W kontekście penetracji zainfekowanych, silnie skeratynizowanych tkanek leki azolowe nie są równocenne. W praktyce klinicznej przejawia się to znacznie częstszym stosowaniem preparatów zawierających itraconazol niż tych posiadających w składzie flukonazol, z uwagi na lepsze właściwości lipofilne pierwszego z wymienionych [4, 60]. W odróżnieniu od leków azolowych, alliloaminy i pochodne morfoliny wykazują wobec komórek grzybów, w tym dermatofitów, wysoką aktywność grzybobójczą [60, 82] i nie towarzyszy im powszechne dla azoli zjawisko narastania oporności [12, 88]. Uważa się, że jest to wynikiem blokowania przez te leki szlaku biosyntezy ergosterolu na wcześniejszych etapach w przeciwieństwie do leków azolowych [1, 60, 72], jak również brakiem zaangażowania białek błonowych z rodziny ABC transporterów w proces detoksyfikacji komórki grzyba z tych toksycznych związków [12, 88]. Należy też zaznaczyć, że pochodne morfoliny, z których największym zastosowaniem cieszy się amorolfina, mają jak do tej pory zastosowanie jedynie miejscowe, co ogranicza ich możliwości terapeutyczne [43]. Z pozostałych dostępnych obecnie leków przeciwgrzybiczych na uwagę zasługuje jeszcze gryzeofulwina, jako jeden z najstarszych leków przeciwgrzybiczych przejawiających wysoką skuteczność w terapii dermatomykoz [34]. Należy jednak zauważyć, że lek ten w wielu krajach został już wycofany z użycia [26]. Podobnie jak amorolfina wysoką skutecznością i zastosowaniem jedynie miejscowym charakteryzuje się cyklopiroks [60], którego mechanizm działania jest złożony i jak do tej pory opisany w znikomym stopniu [53, 60]. Pozostałe ze znajdujących się w klinicznym użyciu leków tj. echinokandyny [20] i pochodne fluoropirymidyny [89] nie znalazły jak do tej pory zastosowania w terapii zakażeń powodowanych przez dermatofity [20]. W kontekście powyższych rozważań popartych literaturą nie trudno zauważyć, że możliwości terapii infekcji powodowanych przez dermatofity są bardzo ograniczone i wskazują na nagłą potrzebę poszukiwania nowych skutecznych i bezpiecznych w użyciu antymykotyków.

3. Nowe syntetyczne preparaty o działaniu przeciwgrzybiczym

Rosnąca liczba szczepów grzybów lekoopornych, w tym wielolekoopornych stanowi poważne zagrożenie dla obecnych i przyszłych terapii przeciwgrzybiczych, niejednokrotnie ratujących życie. Pomimo postępów w zakresie profilaktyki, diagnostyki i terapii, inwazyjne infekcje grzybicze powodowane przez szczepy odporne nadal powodują znaczną śmiertelność u pacjentów z upośledzoną odpornością, co podkreśla pilną potrzebę opracowania nowych leków przeciwgrzybiczych [41, 83]. Odkrywanie nowych leków do wykorzystania w terapii przeciwgrzybiczej jest skomplikowane przynajmniej z dwóch powodów. Po pierwsze, większość infekcji grzybiczych dotyka ludzi z upośledzoną funkcją immunologiczną, a zatem ci pacjenci są bardziej uzależnieni od skuteczności leku przeciwgrzybiczego niż pacjenci z prawidłową odpornością. Po drugie, opracowanie skutecznych i zarazem cechujących się wysokim profilem bezpieczeństwa leków przeciwgrzybiczych jest wyzwaniem, ponieważ wiele podstawowych procesów biologicznych jest wysoce konserwatywnych między grzybami i ludźmi [81]. W konsekwencji identyfikacja związków chemicznych zabijających patogen i jednocześnie oszczędzających gospodarza jest bardzo trudna. Pomimo wielu przeszkód, istnieją jednak możliwości rozwoju nowatorskich terapii. Ostatnie postępy w zrozumieniu cyklu życiowego grzybów, genomiki funkcjonalnej, proteomiki i mapowania genów otwierają możliwości w identyfikacji nowych celów komórkowych dla potencjalnych leków przeciwgrzybiczych, które mogłyby wzmocnić arsenał dostępnych środków przeciwgrzybiczych (Tabela I).

Obecnie leki syntetyczne o działaniu przeciwgrzybiczym są w trakcie badań naukowych lub w badaniach przedklinicznych i/lub klinicznych. Leki te wykazują działanie wobec nowych celów komórkowych, będąc inhibitorami odmiennych niż dotychczas opisywane szlaków metabolicznych, m.in. cyklu glioksylanowego, biosyntezy pirymidyn i hemu, szlaku cytochromu P450, metabolizmu żelaza, wraz ze szlakami przekazywania sygnału, takimi jak kinaza aktywowana mitogenem (MAP) i szlaku kalcyneuryny [62]. Niektóre z nich są aktywne wobec czynników transkrypcyjnych bądź stanowią inhibitory blokujące syntezę DNA poprzez inhibicję deacetylazy histonowej, przy czym te ostatnie z wymienionych wpisują się już w terapię epigenetyczną [64].

Większość cząsteczek chemicznych rozważanych w kontekście potencjalnych leków przeciwgrzybiczych została oceniona pod kątem skuteczności przeciwko grzybom odpowiedzialnym za infekcje ogólnoustrojowe i zagrażające życiu. Wśród czynników etiologicznych powodujących zagrażające życiu infekcje

Tabela I
Potencjalne antypykotyki, syntetyczne i o pochodzeniu naturalnym

Typ preparatu	Związek chemiczny	Pochodzenie	Piśmiennictwo
Preparaty syntetyczne	VT-1161	–	[25, 84]
	AR-12	–	[48, 50]
Preparaty naturalne	Terpenoidy i olejki eteryczne	<i>Lavender angustifolia</i> Mill.	[73]
		<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor.	[79]
		<i>Vernonanthura tweedieana</i> (Baker) H. Rob.	[74]
	Alkaloidy	<i>Solanum tuberosum</i> L.	[47]
		<i>Tabernaemontana catharinensis</i> Mill.	[65]
	Flawonoidy	<i>Inula viscosa</i> Ait.	[11]
		<i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	[6]
	Saponiny	<i>Medicago sativa</i> L.	[38]
		<i>Maesa lanceolata</i> Forsk.	[86]
		<i>Hedera colchica</i> K.	[66]

badania biologicznej aktywności większości nowych związków przeprowadzono na szczepach grzybów z gatunków *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. i *Aspergillus fumigatus* [64, 77]. W nielicznych tylko badaniach *in vitro* oceniano wpływ tych leków na dermatofity. Jednym z takich przykładów może być preparat oznaczony symbolem VT-1161, który obecnie znajduje się w fazie badań klinicznych jako potencjalne alternatywne rozwiązanie w terapii grzybicy paznokci [25, 84]. Lek ten podobnie jak pochodne azolowe hamuje obecną w komórkach grzybów 14- α -demetylazę lanosterolu (CYP51). Wykazano jego wysoką skuteczność *in vitro* wobec komórek takich gatunków dermatofitów jak *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Epidermophyton floccosum* [25]. VT-1161 został zaprojektowany w ten sposób, aby zapewnić selektywną inhibicję wspomnianego enzymu obecnego w komórkach grzybów, przy jednoczesnym braku powinowactwa do homologów tego białka występujących w komórkach ludzkich. Ponadto, w trakcie badań przedklinicznych wykazano, że pojedyncze dawki doustne preparatu podawane *in vivo* śwince morskiej prowadziły do utrzymania się w osoczu, przez co najmniej 48 h, stężeń aktywnego związku wyższych od tych oznaczonych jako wartości MIC (minimal inhibitory concentration) skuteczne *in vitro*. W oparciu o te rezultaty Garvey i wsp. [25] postawili hipotezę, że VT-1161 wykazuje znaczącą skuteczność zarówno *in vivo*, jak również *in vitro* w terapii zakażeń powodowanych przez *T. mentagrophytes*. Zostało to wykazane na eksperymentalnym modelu świnki morskiej zakażonej tym właśnie szczepem grzyba, która raz dziennie miała aplikowany doustnie preparat VT-1161. W późniejszych badaniach klinicznych mających na celu opracowanie schematów dawkowania doustnego, VT-1161 rzeczywiście wykazywał bardzo wysoką skuteczność, co przejawiało się szybkim ustępowaniem objawów chorobowych u zaka-

żonej świnki morskiej. Co więcej, VT-1161 miał wysokie i długotrwanie utrzymujące się stężenie nie tylko w osoczu, ale także w skórze i włosach, a więc tkankach sprzyjających rozwojowi dermatofitu. Biorąc powyższe pod uwagę, przewiduje się, że związek VT-1161 wykaże również znaczącą skuteczność w leczeniu innych zakażeń dermatofitowych u ludzi, takich jak grzybica stóp i paznokci [25].

Innym preparatem o szerokim spektrum działania jest związek oznaczony jako AR-12, będący pochodną celekoksybu stanowiącego skuteczny inhibitor cyklo-oksigenazy 2 (Cox2). Kushawa i wsp. [50] wykazali również jego wysoką skuteczność wobec *T. rubrum*, jednego z najczęściej izolowanych dermatofitów z przypadków dermatomykoz u ludzi. Wspomniani badacze stwierdzili, że związek ten jako lek przeciwnowotworowy pierwszego zastosowania blokujący syntezę acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) i znajdujący się obecnie w trakcie badań klinicznych w terapii chłoniaków i guzów litych, mógłby znaleźć zastosowanie w zwalczaniu infekcji dermatofitowych jako lek drugiego wyboru. Dalsze analizy wykazały, że związek AR-12 wykazuje działanie przeciwgrzybicze obejmujące szerokie spektrum gatunków, w tym oprócz dermatofitów takie gatunki drożdżaków jak: *Candida albicans*, non-albicans *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans*, pleśnie, np. *Fusarium* spp., *Mucor* spp. i grzyby dimorficzne (*Blastomyces* spp., *Histoplasma* spp. i *Coccidioides* spp.) [48, 50]. Ponadto, w kontekście możliwej w przyszłości terapii związek AR-12 wykazuje dobrą penetrację w ludzkiej płytce paznokciowej, przez co jest uznawany za obiecujący w terapii tej jednostki chorobowej [50]. Dodatkowo, dekspantenol i PEG 400 (politlenek etylenu) okazały się środkami zwiększającymi zdolność penetracji związku AR-12 [50]. Wysoce prawdopodobne jest, że obydwa wspomniane związki poprawiają penetrację AR-12 poprzez zwiększanie

rozpuszczalności leku w filamentach keratyny, które ulegają wydajniejszej hydratacji, gdy wspomniane związki są obecne w płytce paznokciowej [50].

4. Naturalne preparaty przeciwgrzybicze

Różnorodność gatunkowa królestwa roślin jest nie do końca oszacowana, a spośród znanych gatunków roślin przez ludzi wykorzystywanych jest mniej niż 10% [9]. Niepodważalny jest jednak pogląd, że rośliny mogą służyć jako źródło związków leczniczych, także o właściwościach przeciwgrzybiczych. Ponadto, te naturalne związki pochodzenia roślinnego stanowią źródło danych o aktywnych przeciwdrobnoustrojowych molekułach, które mogą być wykorzystywane bezpośrednio lub funkcjonować jako prekursorzy do rozwoju nowych, skuteczniejszych cząsteczek [2, 19, 70]. W literaturze naukowej przedstawiane są liczne doniesienia dotyczące roślin leczniczych i związków chemicznych z nich pozyskiwanych, takich jak metabolity wtórne, związki fenolowe, olejki eteryczne i ekstrakty, w aspekcie ich trwałości, przyswajalności i aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Przy ustalaniu, czy produkt naturalny jest użytecznym lekiem przeciwczybnym, brane są pod uwagę następujące parametry: (1) możliwość zastosowania rozpuszczalnika pozbawionego aktywności przeciwgrzybiczej, szczególnie dla związków o słabej rozpuszczalności; (2) możliwość wyznaczenia wartości stężeń hamujących wzrost i proliferację grzybów (MIC) za pomocą metod referencyjnych (protokoły: M27-A3, M38-A i M2-A8) opracowanych przez CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute); (3) możliwość standaryzacji inokulum zgodnie z protokołami opracowanymi przez CLSI; (4) możliwość stosowania szczepów referencyjnych rekomendowanych w protokołach CLSI; (5) możliwość stosowania syntetycznego leku jako kontroli; oraz (6) możliwie krótki czas inkubacji gwarantujący szybkie uzyskanie wyników [70]. Obecnie stosowana strategia badania roślinnych związków o właściwościach przeciwgrzybiczych zakłada dwa etapy: pierwszy z nich stanowi badanie przesiewowe surowego ekstraktu roślinnego, a następnie wykonuje się testy ukierunkowane na identyfikację cząsteczek odpowiedzialnych za aktywność przeciwgrzybiczą [57, 65, 70].

Omawiane związki o potencjale leczniczym pełnią w roślinach różnorodne funkcje, m.in. zapachowe (terpenoidy), pigmentacyjne (chinony i taniny) oraz smakowe (terpenoidowa kapsaicyna z papryki chili) [2]. Jednocześnie, w wielu przypadkach substancje te służą jako środki obrony roślin przed fitopatogennymi mikroorganizmami, owadami i roślinożercami [9]. Związki te zostały zbadane również pod kątem mechanizmów

działania komórkowego. Stwierdzono, że kumaryny wykazują działanie immunoregulacyjne wobec makrofagów, podczas gdy chinony wiążą się z adhezynami i polipeptydami ściany komórkowej, upośledzając ich funkcję [2, 61]. Z kolei saponiny działają poprzez rozrywanie błon komórkowych zawierających sterole, co prowadzi do utraty turgoru i w krótkim czasie do śmierci komórki [2, 44]. Podobnie jak w przypadku kumaryny działanie immunoregulacyjne wykazano też dla kwasu cynamonowego, który aktywuje przede wszystkim monocyty [17]. Z kolei rosnące zainteresowanie kurkumą i izokwercytną wynika z interesującego, aczkolwiek niespecyficznego mechanizmu działania przejawiającego się w uszkodzeniu błon komórkowych [52, 91]. O wiele ciekawszą opcję stanowi kwas kawowy ze względu na wyższą specyficzność i hamowanie jednego z kluczowych dla patogennych grzybów enzymu szlaku glioksylanowego, liazy izocytrynianowej [15]. Różnorodne działania fitochemiczne określone *in vitro* skłoniło do zbadania potencjału przeciwgrzybiczego tych związków, także w stosunku do dermatofitów.

4.1. Terpenoidy i olejki eteryczne

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących przeciwgrzybiczego działania terpenoidów pochodzenia naturalnego. Związki te występują w olejkach eterycznych z szerokiej gamy ziół aromatycznych, wykazują dużą różnorodność strukturalną i wysoki potencjał przeciwbakteryjny [2]. Jednym z przykładów terpenoidów jest linalol (3,7-Dimetylo-1,6-oktadien-3-ol), będący alkoholem monoterpennym szeroko stosowanym w przemyśle perfumeryjnym, kosmetycznym i spożywczym [3]. Linalol przejawia zróżnicowaną aktywność biologiczną, w tym: działanie przeciwbakteryjne [46], przeciwłękowe [56], obniżające poziom cholesterolu [16] i przeciwdrgawkowe [85]. Ponadto Peana i wsp. [76] stwierdzili, że linalol jest głównym składnikiem chemicznym olejku eterycznego otrzymywanego z lawendy (*Lavender angustifolia* Mill.), który wykazuje działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne u zwierząt. Dane z piśmiennictwa pozwalają wnioskować również o przeciwgrzybiczej aktywności linalolu [39]. Obecność tego związku została wykazana w olejkach eterycznych innych roślin o znanej już aktywności przeciwgrzybiczej, takich jak *Ocimum sanctum* L. [45] i *Ocimum basilicum* L. [67].

Mechanizm działania terpenoidów ściśle związany jest z ich lipofilną naturą i wchodzeniem w interakcje z błoną komórkową grzybów [2]. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błony, zaburzenia funkcji białek błonowych i oddychania komórkowego [45]. Cardoso i wsp. [67] udowadniają ponadto, że przeciwgrzybicze działanie linalolu związane jest z hamowaniem biosyntezy ergosterolu, ważnego sterolu

zaangażowanego w modulację przepływu elektrolitów przez błonę komórkową grzybów. Wyniki te potwierdza Oliveira Lima i wsp. [73], którzy na podstawie swoich badań wyrażają pogląd, że terpeny wpływają na integralność i funkcję błony plazmatycznej, a zatem są zdolne do hamowania wzrostu i wywoływania znaczących zmian morfologicznych w komórkach grzybów.

Ostatnio też de Oliveira Lima i wsp. [73] dokonali oceny przeciwgrzybiczego działania linalolu wobec izolatów klinicznych *T. rubrum* pozyskanych ze skóry i paznokci pacjentów z dermatomykozą wywołaną przez wspomniany czynnik etiologiczny. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było stwierdzenie, że linalol jest w stanie hamować inicjację tworzenia grzybni *T. rubrum* w miejscu zakażenia, wykazując prawdopodobnie, zahamowanie adhezji dermatofitów do tkanek gospodarza i „kielkowanie” konidiów, poprzedzające tworzenie strzępek i właściwą penetrację. Hamowanie blastokonidiogenezy i tworzenia strzępek oraz tzw. „germ tubes” przez linalol zostało już wcześniej opisane dla *C. albicans* [39]. Wydaje się, że ten mechanizm przeciwgrzybiczego działania jest uniwersalny w przypadku tego związku i pozwala skutecznie zahamować wzrost grzyba już w początkowych etapach rozwoju infekcji grzybiczej. Dalsze badania aktywności linalolu w późniejszych stadiach rozwoju grzybni wykazały, że związek ten uszkadza błonę komórkową *T. rubrum* i powoduje uwalnianie składników komórkowych do środowiska zewnętrznego [73]. Ponadto, zaobserwowane zostały istotne zmiany morfologiczne w odniesieniu do grzybni *T. rubrum*, w szczególności dotyczące tworzenia chlamydospor, indukowane obecnością w środowisku wzrostu grzyba linalolu [73].

Podobne wyniki dotyczące zmian na poziomie morfologii grzybni w trakcie wzrostu *T. rubrum* odnotowali Perreira i wsp. [74] jako skutek działania olejku eterycznego *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. Ta roślina lecznicza jest pospolitym ziołem uprawianym w Indiach i Brazylii, wykorzystywanym przez ludność jako środek odstrasżający owady, przeciwgrzybiczy i roztoczbójczy [75]. Olejki eteryczne z liści *C. winterianus* zawierają ponad 80 różnych składników, wśród których jako główne wymienia się terpenoidy – cytronelal, citronelol i geraniol [7].

Obserwacje grzybni *T. rubrum* ATCC 1683 w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 400x po ekspozycji na olejek eteryczny *C. winterianus* ujawniły istotne skrócenie i rozszerzenie strzępek, utratę ich pigmentacji i obecność wakuoli, które to cechy nie zostały odnotowane w warunkach optymalnych dla wzrostu dermatofita [74]. Interesujące jest, że te zmiany morfologiczne były niezależne od stężenia olejku. Natomiast nie zostały odnotowane zaburzenia struktury konidiów, chociaż ich wytwarzanie było znacznie ograniczone w obecności każdego ze stężeń preparatu. Przeciwnie,

liczba wytwarzanych chlamydospor wzrastała proporcjonalnie do stężenia olejku. Oprócz działania na dermatofity, olejek eteryczny *C. winterianus* posiada również działanie hamujące wzrost grzybów pleśniowych, m.in. *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* i *Penicillium digitatum* [74].

Dane piśmiennicze dostarczają informacji także o terpenoidzie (6-cynamoiloksy-1-hydroksyeudesm-4-en-3-on) pozyskanym z rośliny *Vernonanthura Tweediana* (Baker) H. Rob., dla którego wykazano silne właściwości przeciwgrzybicze wobec *T. mentagrophytes* [79]. Uzyskane przez Portillo i wsp. [79] wartości MIC i MFC dla tego seskwiterpenu skuteczne wobec komórek izolatów klinicznych *T. mentagrophytes* były identyczne i wynosiły 4,0 µg/ml, co pozwala stwierdzić, że związek ten wykazuje przy tym stężeniu działanie nie tylko grzybobostaticzne, ale przede wszystkim grzybobójcze.

4.2. Alkaloidy

Heterocykliczne związki azotu nazywane są alkaloidami. Pierwszym medycznie użytecznym alkaloidem była morfina, wyizolowana w 1805 roku z maku lekarskiego *Papaver somniferum* L. [2, 23]. Większość alkaloidów izolowanych jest z różnych gatunków roślin psiankowatych z rodzaju *Solanum* L. [2].

Aktywność przeciwgrzybicza została udowodniona dla pochodnych alkaloidów – glikoalkaloidów. Głównym sposobem przeciwgrzybiczego działania glikoalkaloidów jest zaburzenie integralności błon komórkowych poprzez wiązanie z grupami 3-β-hydroksysterolu, powodujące wzrost przepuszczalności błony, tworzenie porów, a w konsekwencji rozpad i utratę integralności komórek [2, 62]. Jednymi z szerzej przebadanych związków z tej grupy o wysokiej toksyczności wobec komórek dermatofitów, w tym *T. rubrum* są solamargina i solasonina [78]. Ponadto dla alkaloidu MMV (12-metoksy-4-metylovoachalotyna), uzyskanego z *Tabernaemontana catharinensis* Mill. również wykazano aktywność przeciwgrzybiczą wobec *T. rubrum* [65].

Inny mechanizm działania został opisany dla glikoalkaloidów występujących w ziemniakach (*Solanum tuberosum* L.), przede wszystkim dla α-solaniny, której skuteczność została wykazana w stosunku do *T. rubrum* [47]. Działanie przeciwgrzybicze tego związku wynika z inhibicji konidiogenezy i wzrostu strzępek [2, 62]. Komoto i wsp. [47] wykazali, że α-solanina powoduje obniżenie poziomu ekspresji genów z cyklu glioksylanowego, zaangażowanych w proces biosyntezy ergosterolu oraz genów kodujących proteazy, co zaobserwowano w komórkach *T. rubrum* hodowanych jednocześnie z linią komórkową keratynocytów. Wymienione geny ulegają zwiększonej ekspresji szczególnie w pierwszych etapach rozwoju infekcji dermatofitowej. Ponadto, dane literaturowe wskazują, że wspomniane

już glikoalkaloidy mogą hamować biosyntezę pewnych podstawowych metabolitów istotnych dla funkcjonowania komórki grzyba. Związki te mogą też działać jako antymetabolity, co przejawia się wyraźnymi zmianami w morfologii poszczególnych komórek grzyba, które przekładają się na deformacje strzępek grzybni [24].

4.3. Flawonoidy

Flawonoidy są strukturami fenolowymi zawierającymi jedną grupę karbonylową, występującymi naturalnie w roślinach [2]. Flawonoidy są gromadzone głównie w wakuolach komórek owoców (zwłaszcza cytrusowych), warzyw (np. pomidorów, papryki), a także roślin strączkowych, herbaty i ziół. Najwięcej tych substancji zawiera zewnętrzna tkanka (potocznie nazywana skórka) liści, kwiatów i owoców [11]. Cafarchia i wsp. [11] wykazali, że flawonoidy pochodzące z *Inula viscose* Ait., rośliny występującej pospolicie w regionie Morza Śródziemnego, mają znaczącą aktywność przeciwgrzybiczą wobec dermatofitów, nawet przy niskich stężeniach. Na ten fakt może mieć wpływ również wysoka zawartość seskwiterpenu (karboksyeudesmadienu), związku z grupy terpenoidów, w ekstraktach z liści tej rośliny i synergistyczne działanie przynajmniej tych dwóch substancji w olejku eterycznym [11]. Zatem aktywność przeciwgrzybicza flawonoidów wytwarzanych przez *I. viscose*, w tym wobec komórek patogennych dermatofitów wymaga dalszych wnikliwych badań.

Specyficzną grupę flawonoidów stanowią chalkony (1,3-diarilo-2-propen-1-on), będące flawonoidami o otwartym łańcuchu [6]. Chalkony stanowią szeroko rozpowszechnione naturalne związki, które są przedmiotem coraz większego zainteresowania ze względu na zróżnicowane spektrum aktywności farmakologicznej [71]. Związki te są uważane za interesujące i obiecujące jako prekursorzy nowych leków przeciwgrzybiczych. Ich proste struktury chemiczne pozwalają na ich syntezę w bezpieczny i niedrogi sposób [69]. Wykazano, że związki te wywierają znaczną aktywność przeciwgrzybiczą, zwłaszcza przeciwko dermatofitom [71]. Większość chalkonów hamuje biosyntezę istotnych komponentów ściany komórkowej grzybów [8], ale istnieją dowody na to, że chalkony blokują również syntazę kwasów tłuszczowych (FAS, fatty acid synthase) w komórkach drożdży i prątków [6]. Bitencourt i wsp. [6] zaobserwowali, że hamowanie syntezy kwasów tłuszczowych i ergosterolu w komórkach *T. rubrum* przez kwercetynę i trans-chalkon prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji odpowiednich genów przez obydwie flawonoidy. Dalsze badania na modelu komórek *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, że kwercetyna i trans-chalkon hamują aktywność enzymatyczną FAS. Kwercetyna chociaż wykazywała *in vitro* lepszą aktywność inhibicyjną wobec samego enzymu, przejawiała słabszą aktywność

przeciwgrzybiczą w porównaniu z trans-chalkonem. Uzyskane przez Bitencourt i wsp. [6] wyniki sugerują, że przeciwgrzybicza aktywność trans-chalkonu może być związana z występowaniem dodatkowych (poza FAS) celów komórkowych dla tego związku, najprawdopodobniej na szlaku syntezy ergosterolu. Pełna ocena sposobu działania kwercetyny i trans-chalkonu wymaga analizy dodatkowych genów i wykonania uzupełniających testów, które mogłyby wykazać interferencję hamowania FAS z homeostazą kwasów tłuszczowych w komórkach *T. rubrum*. Być może odpowiedź na to pytanie dostarczą prowadzone przez zespół Bitencourt badania, w których stosuje się suplementacje podłoży hodowlanych egzogennymi kwasami tłuszczowymi w obecności kwercetyny i trans-chalkonu.

Badania nad aktywnością przeciwgrzybiczą innego związku z grupy chalkonów – lico-chalkonu, potwierdza sugestie zespołu Bitencourt [6] wskazującą na możliwą represję szlaku syntezy ergosterolu jako dodatkowego mechanizmu działania związków z tej grupy. Cantelli i wsp. [13] wykorzystali układ hodowli *T. rubrum* z ludzkimi keratynocytami, symulujący naturalną infekcję, do określenia poziomu ekspresji genów *ERG1*, *ERG6* i *ERG11*, które są krytyczne dla syntezy ergosterolu. W swoich badaniach wykazali, że dodawanie do hodowli lico-chalkonu znacząco obniża stopień ekspresji tych genów. Ponadto związek ten wyraźnie spowalniał rozwój strzępek podczas interakcji *T. rubrum* z linią komórkową keratynocytów i znacząco hamował aktywność liazy izocytrynianowej [13].

4.4. Saponiny

Saponiny są metabolitami wtórnymi występującymi w tkankach wielu gatunków roślin. Pod względem chemicznym składają się z aglikonu – saponogeniny (saponenol) i glikonu – sacharydu (cukru) [80]. Związki te przechowywane są w komórkach roślinnych jako nieaktywne prekursorzy, które mogą zostać przekształcane enzymatycznie w biologicznie aktywne antybiotyki [2, 44]. Nazwa saponiny wywodzi się od łacińskiego słowa „*sapo*”, oznaczającego mydło, co związane jest z właściwościami do tworzenia piany w kontakcie tych substancji z wodą [80]. Saponiny stanowią naturalne źródło substratów do syntezy leków steroidowych oraz hormonów (progesteronu oraz pochodnych kortyzonu) [80]. Rośliny zawierające saponiny od dawna były stosowane również w ziołolecznictwie i medycynie ludowej jako surowce przeciwgrzybicze, przeciwzapalne, przeciw-wirusowe, cytotoksyczne i wykrztuśne. W chwili obecnej znajdują zastosowanie w branży kosmetycznej do produkcji toników, maseczek czy też szamponów [86].

Wykazano, że bogate w saponiny ekstrakty *Medicago sativa* L. posiadają działanie przeciwgrzybicze w stosunku do dermatofitów. Houghton i wsp. [38] prze-

badali aktywność saponin wyizolowanych z korzeni i części nadziemnych *M. sativa* L., *Medicago murex* L., *Medicago arabica* L. i *Medicago hybrida* L. w stosunku do dermatofitów *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton interdigitale* i *T. tonsurans*. Wszystkie badane saponiny działały inhibicyjnie na wzrost wszystkich trzech badanych gatunków dermatofitów, przy czym *T. tonsurans* okazał się grzybem najbardziej wrażliwym na działanie tych związków. Ponadto, saponiny ekstrahowane z korzeni *M. murex* L. i *M. hybrida* L. były skuteczniejsze niż związki uzyskane z części nadziemnych tych roślin. Nie ma jednak wystarczającej wiedzy dotyczącej składu chemicznego tych ekstraktów, która mogłaby wyjaśnić zaobserwowane różnice w aktywności przeciwrzybiczej.

Saponiny wyizolowane z afrykańskiej rośliny *Maesa lanceolata* Forssk. wykazują działanie przeciwrzybicze wobec *E. floccosum*, *T. rubrum* i *Microsporum canis* [86]. Ponadto, działanie tych naturalnych związków jest wprost proporcjonalne do stosowanego stężenia. Istotnym problemem jest jednak brak wiedzy na temat składu chemicznego ekstraktów *M. lanceolata*.

Mshvildadze i wsp. [66] przeprowadzili badania celem oceny aktywności przeciwrzybiczej ośmiu saponin wyizolowanych z liści bluszczu (*Hedera colchica* K.). Hederagenina, należąca do saponin triterpenowych, wykazywała najwyższą aktywność przeciwrzybiczą spośród ośmiu saponin wyizolowanych z bluszczu. Zaobserwowano również, że liczba, rodzaj oraz sekwencja podjednostek wchodzących w skład łańcucha węglowodanowego saponin mają znaczący wpływ na aktywność przeciwrzybiczą. Podobne wyniki uzyskali Biały i wsp. [5], których badania wykazały, że części nadziemne *M. arabica* L. zawierają jedną z najbardziej aktywnych saponin – hederageninę, a także inne podobne związki aktywne. Niemniej jednak, ograniczona wiedza na temat właściwości chemicznych saponin i mechanizmów ich działania przeciwrzybiczego wciąż stanowi istotne ograniczenie w ich leczniczym stosowaniu na obecnym etapie badań.

4.5. Inne związki chemiczne

Wachlarz aktywnych przeciwrzybiczo związków pochodzenia roślinnego nie ogranicza się tylko do kilku wymienionych powyżej klas. Wiele gatunków roślin produkuje substancje, których nie da się jednoznacznie sklasyfikować, a ich właściwości przeciwrzybicze zostały już udowodnione.

Eter naftowy i dichlorometanowe ekstrakty owoców i części nadziemnych rośliny *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) wykazują umiarkowane działanie przeciwrzybicze wobec komórek *C. albicans*, *S. cerevisiae* i *C. neoformans* (wartości MIC w zakresie: 62,5–250 µg/ml) i bardzo silną aktywność biologiczną wobec komórek

dermatofitów z takich gatunków jak: *N. gypsea*, *T. rubrum* i *T. mentagrophytes* (wartości MIC w zakresie: 8–16 µg/ml) [87]. Svetaz i wsp. [87] przeprowadzając frakcjonowanie aktywnych ekstraktów tej rośliny przy użyciu bioautografii wyizolowali również związki o strukturze chemicznej zbliżonej do flawonoidów – 2', 4'-dihydroksy-3'-metoksychalkon i 2', 4'-dihydroksy-3'-metoksychalkon. Aktywność przeciwrzybicza może zatem być wypadkową działania kilku związków chemicznych obecnych w ekstrakcie *Z. punctata*.

5. Podsumowanie

Praktycznie każdy z obecnie dostępnych leków przeciwrzybiczych może być toksyczny, a wszystko zależy od wielkości dawki i czasu ekspozycji. Ta wciąż żywa w farmakologii i wielu dziedzinach ściśle związanych z medycyną teza, chociaż sformułowana przez Paracelsusa w XV wieku, nieustannie podlega bardziej lub mniej trafnym interpretacjom [14].

Warto podkreślić, że aż do połowy XX wieku w terapii grzybic stosowano szereg różnych substancji, zwykle nieaktywnych lub w znikomym stopniu wykazujących aktywność przeciwrzybiczą. Do szczególnie często wówczas stosowanych należały: produkty destylacji ropy naftowej, jodek potasu, związki zawierające brom, nadmanganian potasu czy olej z terpentyną [1]. Dopiero odkrycie w 1955 roku amfoterycyny B przez Gold i wsp. [21] oraz jej dopuszczenie przez organizację FDA (Food and Drug Administration) do klinicznego stosowania wraz z wprowadzeniem na rynek gryzeofulwiny i klotrimazolu w 1958 roku rozpoczęło erę leków przeciwrzybiczych [1]. Trwające od tamtej pory poszukiwania „świętego Graala” terapii przeciwrzybiczej [14] jak dotychczas nie przyniosły zadowalających rezultatów. Obecnie w leczeniu infekcji grzybiczych dysponujemy zaledwie ośmioma klasami leków przeciwrzybiczych, spośród których tylko cztery znalazły zastosowanie w terapii infekcji powodowanych przez dermatofity [60, 88]. Problem opracowania wzorcowego związku przeciwrzybiczego, chociaż z pewnością można traktować jako wyidealizowany, pozostaje wciąż otwarty, a wśród najczęściej wymienianych w literaturze przedmiotu [14, 55] pożądanych cech takiej substancji znajdują się:

- szerokie spektrum przeciwrzybiczego działania również wobec szczepów (gatunków) opornych na obecnie stosowane leki;
- wyrafinowany i wysoce specyficzny dla komórki grzyba mechanizm działania uniemożliwiający powstanie mechanizmów oporności nabytej;
- możliwość szerokiej i zróżnicowanej aplikacji;
- wysoka aktywność grzybobójcza (nie tylko grzybobostaticzna);

- brak toksyczności w stosunku do komórek ssaków;
- brak ryzyka wystąpienia interakcji z innymi lekami stosowanymi jednocześnie;
- niskie koszty terapii pozwalające na stosowanie u potencjalnych pacjentów.

Na przełomie ostatnich trzech dekad gdy problem lekooporności grzybów patogennych nieustannie narasta koniecznością jest poszukiwanie nowych potencjalnych antymykotyków lub związków wykazujących synergistyczne działanie z obecnie znanymi i klinicznie stosowanymi lekami przeciwgrzybiczymi. Problem związany z poszukiwaniem nowych leków przeciwgrzybiczych wynika przede wszystkim z faktu, że komórka grzyba jako komórka eukariotyczna wykazuje stosunkowo duże podobieństwo do komórek ssaków [14, 55].

Identyfikacja związków chemicznych mogących stanowić prototypy do opracowania nowych leków przeciwgrzybiczych, szczególnie w aspekcie terapii dermatomykoz, stanowi obecne wyzwanie mikrobiologów. Szereg związków o działaniu przeciwgrzybiczym zaproponowanych do tej pory, zwłaszcza pochodzenia naturalnego, zostało przetestowanych pod kątem ich aktywności wyłącznie *in vitro*. Aktywność preparatu *in vivo* i *in vitro* może być jednak różna. Przyszłe badania powinny być skupione na próbie określenia możliwości aplikacyjnych danych substancji oraz ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania.

5. Piśmiennictwo

1. Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A.B.T.: Clinical Mycology. Elsevier, Edinburgh, 2009
2. Arif T., Bhosale J.D., Kumar N., Mandal T.K., Bendre R.S., Lavekar G.S., Dabur R.: Natural products – antifungal agents derived from plants. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **11**, 621–638 (2009)
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 446–475 (2008)
4. Beule K. De, Gestel J. Van: Pharmacology of itraconazole. *Drugs* **61 Suppl 1**, 27–37 (2001)
5. Bialy Z., Jurzysta M., Mella M., Tava A.: Triterpene saponins from aerial parts of *Medicago arabica* L. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1095–1099 (2004)
6. Bitencourt T.A., Komoto T.T., Massaroto B.G., Miranda C.E.S., Belebony R.O., Marins M., Fachin A.L.: Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**, 229 (2013)
7. Blank A.F., Costa A.G., Arrigoni-Blank M.D.F., Cavalcanti S.C.H., Alves P.B., Innecco R., Ehlert P.A.D., Sousa I.F. De: Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Brazilian J. Pharmacogn.* **17**, 557–564 (2007)
8. Boeck P., Leal P.C., Yunes R.A., Filho V.C., Lopez S., Sortino M., Escalante A., Furlan R.L.E., Zacchino S.: Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **338**, 87–95 (2005)
9. Borris R.P.: Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* **51**, 29–38 (1996)
10. Brown G.D., Denning D.W., Levitz S.M.: Tackling Human Fungal Infections. *Science*, **336**, 647 (2012)
11. Cafarchia C., Laurentis N. De, Milillo M.A., Losacco V., Puccini V.: Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parasitologia*, **44**, 153–156 (2002)
12. Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Baret P.V., Keniya M.V., Tanabe K., Niimi M., Goffeau A., Monk B.C.: Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 291–321 (2009)
13. Cantelli B.A.M., Bitencourt T.A., Komoto T.T., Belebony R.O., Marins M., Fachin A.L.: Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. *Biomed. Pharmacother.* **96**, 1389–1394 (2017)
14. Chapman S.W., Sullivan D.C., Cleary J.D.: In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **119**, 197–216 (2008)
15. Cheah H.L., Lim V., Sandai D.: Inhibitors of the Glyoxylate Cycle Enzyme ICL1 in *Candida albicans* for Potential Use as Antifungal Agents. *PLoS One*, **9**, e95951 (2014)
16. Cho S.Y., Jun H. jin, Lee J.H., Jia Y., Kim K.H., Lee S.J.: Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2- and ubiquitin-dependent mechanisms. *FEBS Lett.* **585**, 3289–3296 (2011)
17. Conti B.J., Bufalo M.C., Golim M. de A., Bankova V., Sforcin J.M.: Cinnamic Acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, 109864 (2013)
18. Cowen L.E.: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 187–198 (2008)
19. Danielewski M., Książczyńska D., Szelańska A.: Non-antibiotic use of antibiotics. *Post. Mikrobiol.* **57**, 301–312 (2018)
20. Denning D.W.: Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 889–891 (2002)
21. Donovick R., Gold W., Pagano J.E., Stout H.A.: Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Annu.* **3**, 579–86 (1956)
22. Dworecka-Kaszak B., Dąbrowska I.: Dermatophytes: new taxonomy and differentiation methods. Review of current state of knowledge about mechanisms of pathogenesis and pathogen-host interaction. *Med. Weter.* **73**, 613–617 (2017)
23. Facchini P.J., Johnson A.G., Poupart J., Luca V. de: Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiol.* **111**, 687–697 (1996)
24. Fewell A.M., Roddick J.G.: Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. *Mycol. Res.* **101**, 597–603 (1997)
25. Garvey E.P., Hoekstra W.J., Moore W.R., Schotzinger R.J., Long L., Ghannoum M.A.: VT-1161 dosed once daily or once weekly exhibits potent efficacy in treatment of dermatophytosis in a guinea pig model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1992–1997 (2015)
26. Ghannoum M.A., Rice L.B.: Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 501–517 (1999)
27. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zięba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
28. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermato-

- phyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
29. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: The host range of dermatophytes, it is at all possible? Phenotypic evaluation of the keratinolytic activity of *Trichophyton verrucosum* clinical isolates. *Mycoses*, **62**, 274–283 (2019)
 30. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: *Tinea corporis* by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953 (2018)
 31. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zięba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180 (2019)
 32. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.* **68**, 823–836 (2019)
 33. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. *Post. Mikrobiol.* **58**, 49–58 (2019)
 34. Gull K., Trinci A.P.: Griseofulvin inhibits fungal mitosis. *Nature*, **244**, 292–294 (1973)
 35. Hau C.S., Tada Y., Kanda N., Watanabe S.: Immunoresponses in dermatomycoses. *J. Dermatol.* **42**, 236–244 (2015)
 36. Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2–15 (2008)
 37. Hopkins J.G., Hillegas A.B.: Dermatophytosis at an infantry post; incidence and characteristics of infections by three species of fungi. *J. Invest. Dermatol.* **8**, 291–316 (1947)
 38. Houghton P., Patel N., Jurzysta M., Biely Z., Cheung C.: Antidermatophyte activity of medicago extracts and contained saponins and their structure-activity relationships. *Phytother. Res.* **20**, 1061–1066 (2006)
 39. Hsu C.C., Lai W.L., Chuang K.C., Lee M.H., Tsai Y.C.: The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **51**, 473–482 (2013)
 40. Hube B., Hay R., Brasch J., Veraldi S., Schaller M.: Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. *J. Mycol. Med.* **25**, e44–58 (2015)
 41. Jerez Puebla L.E.: Fungal Infections in Immunosuppressed Patients. w: Immunodeficiency. red.: InTech, 2012,
 42. Kanafani Z.A., Perfect J.R.: Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 120–128 (2008)
 43. Kerkenaar A.: Inhibition of the sterol $\Delta 14$ -reductase and $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerase in fungi. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 59 LP – 61 (1990)
 44. Keukens E.A., Vrije T. de, Boom C. van den, Waard P. de, Plasman H.H., Thiel F., Chupin V., Jongen W.M., Kruijff B. de: Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* **1240**, 216–228 (1995)
 45. Khan A., Ahmad A., Manzoor N., Khan L.A.: Antifungal activities of *Ocimum sanctum* essential oil and its lead molecules. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 345–349 (2010)
 46. Klein G., Ruben C., Upmann M.: Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Curr. Microbiol.* **67**, 200–208 (2013)
 47. Komoto T.T., Silva G., Bitencourt T., Cestari B.A., Marins M., Fachin A.L.: Evaluation of antifungal and cytotoxic activity of trans-Chalcone and α -Solanine. *BMC Proc.* **8**, P36–P36 (2014)
 48. Koselny K., Green J., DiDone L., Halterman J.P., Fothergill A.W., Wiederhold N.P., Patterson T.F., Cushion M.T., Rappleye C., Wellington M., Krysan D.J.: The celecoxib derivative ar-12 has broad-spectrum antifungal activity *in vitro* and improves the activity of fluconazole in a murine model of *Cryptococcosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 7115–7127 (2016)
 49. Krysan D.J.: Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. *Fungal Genet. Biol.* **78**, 93–98 (2015)
 50. Kushwaha A.S., Sharma P., Shivakumar H.N., Rappleye C., Zukiwski A., Proniuk S., Murthy S.N.: Trans-ungual Delivery of AR-12, a Novel Antifungal Drug. *AAPS PharmSciTech* **18**, 2702–2705 (2017)
 51. Lamb J.H., Rebell G., Jones P.E., Morgan R.J., Knox J.M.: Combined therapy in histoplasmosis and coccidioidomycosis: Methyltestosterone and Meth-Dia-Mer-Sulfonamides. *JAMA Dermatology* **70**, 695–712 (1954)
 52. Lee W., Lee D.G.: An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. *IUBMB Life* **66**, 780–785 (2014)
 53. Leem S.H., Park J.E., Kim I.S., Chae J.Y., Sugino A., Sunwoo Y.: The possible mechanism of action of ciclopirox olamine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells*, **15**, 55–61 (2003)
 54. Lemke A., Kiderlen A.F., Kayser O.: Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 151–162 (2005)
 55. Lewis R.E.: Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin. Proc.* **86**, 805–817 (2011)
 56. Linck V.M., Silva A.L. da, Figueiro M., Caramao E.B., Moreno P.R.H., Elisabetsky E.: Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, **17**, 679–683 (2010)
 57. Liu H., Li J., Zhao W., Bao L., Song X., Xia Y., Wang X., Zhang C., Wang X., Yao X., Li M.: Fatty acid synthase inhibitors from *Geum japonicum* Thunb. var. chinense. *Chem. Biodivers.* **6**, 402–410 (2009)
 58. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report). *Zoonoses Public Health*, **66**, 982–989 (2019)
 59. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections. *Post. Mikrobiol.* **58**, 165–176 (2019)
 60. Macura A.B., Pawlik B.: Zarys mikologii lekarskiej. [w:] Zarys mikologii lekarskiej. red.: E. Baran. Volumes, Wrocław 1998, 648
 61. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia*, **182**, 215–227 (2017)
 62. Martinez-Rossi N.M., Bitencourt T.A., Peres N.T.A., Lang E.A.S., Gomes E. V, Quaresimin N.R., Martins M.P., Lopes L., Rossi A.: Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. *Front. Microbiol.* **9**, 1108 (2018)
 63. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*, **166**, 369–383 (2008)
 64. McCarthy M.W., Kontoyiannis D.P., Cornely O.A., Perfect J.R., Walsh T.J.: Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. *J. Infect. Dis.* **216**, S474–S483 (2017)
 65. Medeiros M.R.F., Prado L.A. de M., Fernandes V.C., Figueiredo S.S., Coppede J., Martins J., Fiori G.M.L., Martinez-Rossi N.M., Belebony R.O., Contini S.H.T., Pereira P.S., Fachin A.L.: Antimicrobial activities of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*. *Nat. Prod. Commun.* **6**, 193–196 (2011)
 66. Mshvildadze V., Favel A., Delmas F., Elias R., Faure R., Decanosidze G., Kemertelidze E., Balansard G.: Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Pharmazie*, **55**, 325–326 (2000)
 67. N.R. Cardoso N., S. Alviano C., Blank A., Teresa V. Romanos M., Fonseca B., Rozental S., Rodrigues I., Alviano D.: Synergism

- effect of the essential oil from *Ocimum basilicum* var. *maria bonita* and its major components with fluconazole and its influence on ergosterol biosynthesis. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2016**, 1–12 (2016)
68. Nakagawa H., Nishihara M., Nakamura T.: Kerion and tinea capitis. *IDCases* **14**, e00418–e00418 (2018)
 69. Narender T., Papi Reddy K.: A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron Lett.* **48**, 3177–3180 (2007)
 70. Negri M., Salci T.P., Shinobu-Mesquita C.S., Capoci I.R.G., Svidzinski T.I.E., Kioshima E.S.: Early state research on antifungal natural products. *Molecules*, **19**, 2925–2956 (2014)
 71. Nowakowska Z.: A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* **42**, 125–137 (2007)
 72. Odds F., Brown A., Gow N.: Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**, 272–279 (2003)
 73. Oliveira Lima M.I. de, Araujo de Medeiros A.C., Souza Silva K.V., Cardoso G.N., Oliveira Lima E. de, Oliveira Pereira F. de: Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *J. Mycol. Med.* **27**, 195–202 (2017)
 74. Oliveira Pereira F. de, Alves Wanderley P., Cavalcanti Viana F.A., Baltazar de Lima R., Barbosa de Sousa F., Oliveira Lima E. de: Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon Winterianus* Jowitt Ex Bor. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 233–242 (2011)
 75. Pandey A., Rai M.: Antimycotic potential in some naturally occurring essential oils. w: Plant-derived antimycotics: Current trends and future prospects. red.: M. k. Rai, D. Mares. Haworth Press, London 2003, s. 344–345
 76. Peana A.T., Marzocco S., Popolo A., Pinto A.: (–)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci.* **78**, 719–723 (2006)
 77. Pianalto K.M., Alspaugh J.A.: New horizons in antifungal therapy. *J. Fungi* **2**, 26 (2016)
 78. Pinto C.L., Uchoa D.E.D.A., Silveira E.R., Deusdênia O., Pessoa L.: Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. *Quim. Nov. Fac. Ciências da Saúde, Univ. Brasília* **34**, 284–288 (2011)
 79. Portillo A., Vila R., Freixa B., Adzet T., Canigual S.: Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **76**, 93–98 (2001)
 80. Prus A.: Pharmacological activities of saponins. *Postępy Fitoter.* 200–204 (2003)
 81. Roemer T., Krysan D.J.: Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, (2014)
 82. Ryder N.S., Mieth H.: Allylamine antifungal drugs. *Curr. Top. Med. Mycol.* **4**, 158–188 (1992)
 83. Safdar A., Bannister T.W., Safdar Z.: The predictors of outcome in immunocompetent patients with hematogenous candidiasis. *Int. J. Infect. Dis.* **8**, 180–186 (2004)
 84. Schell W.A., Jones A.M., Borroto-Esoda K., Alexander B.D.: Antifungal activity of scy-078 and standard antifungal agents against 178 clinical isolates of resistant and susceptible *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017)
 85. Sousa D.P. de, Nobrega F.F.F., Santos C.C.M.P., Almeida R.N. de: Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 1847–1851 (2010)
 86. Stefanowicz-Hajduk J., Ochocka R.: Steroidal saponins – occurrence, characteristic and application in therapeutics. *Postępy Fitoter.* 36–40 (2006)
 87. Svetaz L., Aguero M.B., Alvarez S., Luna L., Feresin G., Derita M., Tapia A., Zacchino S.: Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. *Planta Med.* **73**, 1074–1080 (2007)
 88. Vandeputte P., Ferrari S., Coste A.: Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.* **2012**, 713687 (2012)
 89. Waldorf A.R., Polak A.: Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 79–85 (1983)
 90. Wieder L.M.: Fungistatic and fungicidal effects of two wood-preserving chemicals on human dermatophytes: ortho (2-chlorophenyl) phenol sodium and tetrachlorophenol sodium. *JAMA Dermatology* **31**, 644–657 (1935)
 91. Yun J., Lee H., Ko H.J., Woo E.R., Lee D.G.: Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1848**, 695–701 (2015)