

# Encimi vključeni v biosintezo glivnega melanina - potencialne tarče za razvoj novih antimikotikov

## Enzymes involved in fungal melanin biosynthesis - potential targets for the development of new antimicotic drugs

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan

**Povzetek:** Dematozne ali temno pigmentirane glive so vzrok za številne infekcije predvsem pri ljudeh z oslabiljenim imunskim sistemom. V celični steni vseh temno pigmentiranih gliv je prisoten melanin, ki je tako najverjetneje odgovoren za njihovo patogenost. Dokazano je, da melanin ščiti glivne celice, hkrati pa je povezan z njihovo virulenco. Infekcije, ki jih povzročajo dematozne glive, so feohifomikoze, kromoblastomikoze in micetomi. Kljub kombiniranemu zdravljenju z antimikotiki še vedno predstavljajo velik zdravstveni problem z visoko stopnjo umrljivosti. V članku predstavljamo biosintezno pot 1,8-dihidroksinaftalen melanina, vključno z encimi, ki katalizirajo posamezne reakcije. Ker sinteza melanina po 1,8-dihidroksinaftalenski poti v gostiteljevem organizmu ne poteka, so encimi v njegovi biosintetski poti zanimive tarče pri razvoju novih antimikotičnih učinkovin s selektivnim delovanjem.

**Ključne besede:** pigmentirane glive, 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melanin, mikoze, antimikotiki

**Abstract:** Dematiaceous or dark-pigmented fungi are responsible for many infections, and especially in immunocompromised patients. These fungi contain melanin in their cell walls that protects them from environmental stresses and is considered to be an important virulence factor. Infections caused by dematiaceous fungi include phaeohyphomycosis, chromoblastomycosis and mycetoma. Despite combined antimicrobial therapies, these infections can still result in high overall mortality rates and represent an important health issue. We present here the 1,8-dihydroxynaphthalene melanin biosynthetic pathway and the enzymes involved. As 1,8-dihydroxynaphthalene melanin appears only in fungi, the enzymes involved in its biosynthesis represent interesting targets for the development of new selective antimicrobials.

**Key words:** dematiaceous fungi, 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin, mycosis, antimicrobial drugs

### 1 Uvod

V zadnjih letih se pojavlja vedno več glivičnih infekcij, ki so posledica razvoja rezistence na antimikotične učinkovine, vedno več pa je tudi novih vrst patogenih gliv, ki so se razvile iz nepatogenih. Poznamo številne dejavnike, ki vodijo do infekcij z glivami:

- razširjena uporaba antibiotikov s širokim spektrom delovanja, ki zavirajo normalno prisotne nepatogene bakterije v telesu, na račun katerih se potem razvijejo glive,
- uporaba imunosupresivnih učinkovin in kemoterapevtikov,
- povečano število bolnikov okuženih z virusom HIV (1).

Te infekcije so posledica slabše telesne odpornosti in se le redko pojavijo pri zdravih posameznikih. Zdravimo jih z antimikotičnimi učinkovinami, ki pa imajo poleg neželenih učinkov in razvoja rezistence, tudi nekatere druge slabosti. Slabo prehajajo v tarčna tkiva in imajo ozek antimikotični spekter delovanja (2). Zato se pojavlja potreba po razvoju novih antimikotičnih učinkovin z novimi prijemališči delovanja in s selektivnim delovanjem na glivne celice, ki ne bi

povzročale stranskih učinkov v gostiteljevem organizmu. V članku predstavljamo glivni 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melanin in encime vključene v njegovo biosintezo kot zanimiva tarčna mesta za razvoj novih antimikotikov.

### 2 Infekcije, ki jih povzročajo temno pigmentirane glive

Številne glive, ki povzročajo infekcije pri ljudeh in živalih, uvrščamo v skupino temno pigmentiranih gliv. Zanje je značilna prisotnost melanina v celični steni, zato so njihove spore in hife značilno temne barve (3). Črno pigmentirane glive le redko povzročajo bolezni pri zdravih ljudeh, so pa vzrok za številne življenjsko nevarne infekcije pri ljudeh z oslabiljenim imunskim sistemom. Čeprav natančen mehanizem njihove patogenosti ni popolnoma znan, domnevajo, da je virulentni dejavnik melanin (4).

V razvoj bolezni pri človeku naj bi bilo vpletenih več kot 100 vrst iz 60 rodov dematoznih gliv. Nahajajo se v prsti in so razširjene povsod po svetu (5). V telo jih vnesemo predvsem z dihanjem ali skozi odprte rane. Povzročajo lahko površinske in globoke lokalne infekcije, diseminirano feohifomikozo, alergijske bolezni, pljučnico, možganski ogojnek, itd. (4).

Infekcije, ki jih povzročajo pigmentirane filamentozne glive, razdelimo v tri skupine: kromoblastomikoze, micetome in feohifomikoze. Kromoblastomikoze povzročajo glive, ki tvorijo sklerotična telesa v tkivu in so značilne predvsem za tropske predele (5). V večini primerov so vzrok zanje glive iz petih vrst: *Fonsecaea compactum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carionii* in *Rhinocladiella aquaspersa*. Zdravljenje običajno zahteva kirurško odstranitev okuženega predela ter antimikotično terapijo (6). Micetomi so okužbe globokih tkiv, običajno spodnjih ekstremitet, ki jih označujejo podkožne otekline, vnetja, drenaža sinusov in prisotnost mikotičnih granul (5). Povzročajo jih lahko glive (eumicetomi) ali pa filamentozne bakterije (aktinomicitomi), ki se nahajajo v prsti in vstopijo v gostiteljski organizem skozi poškodbe na koži (7). Eumicetomi so kronične, granulomatozne, podkožne vnetne bolezni, ki zahtevajo agresivno kirurško zdravljenje v kombinaciji z antimikotiki. Ob neustreznem zdravljenju lahko privedejo do deformacij in amputacij prizadetih predelov ali celo do smrti (7). Vse ostale klinične sindrome uvrščamo med feohifomikoze (4).

Najpogostejše infekcije, ki jih povzročajo dematozne glive, so površinske infekcije in so povezane z manjšimi poškodbami kože. Čeprav le redko ogrožajo življenje, lahko v določenih primerih privedejo do smrti. Pri tem je odločilno mesto okužbe in odziv na protiglivo terapijo (4). Diseminirana feohifomikozo je razmeroma redka bolezen, ki jo povzročajo dematozne glive, vendar pa število infekcij zadnja leta narašča. V preglednem članku Revankarja in sodelavcev (5) je povzetih 72 primerov diseminiranih feohifomikoz, ki so se pojavile v letih od 1966 do 2001. Najpogostejši vzroki zanje so bili oslabilen imunski sistem, rakava obolenja, nevtropenija povezana s kemoterapijo, transplantacija kostnega mozga in drugih organov ter okužba z virusom HIV. Vendar pa je bila med njimi približno četrtina infekcij pri ljudeh z zdravim imunskim sistemom. Za bolezen so značilni izpuščaji in razjede na koži, povišana telesna temperatura, kronične bolezni dihal in centralnega živčnega sistema, gastrointestinalni simptomi in sepsa. Povprečna smrtnost je bila 79 %, in sicer 84 % pri ljudeh z oslabilnim in 65 % pri ljudeh z zdravim imunskim sistemom. Ugotovljena je bila tudi slaba odzivnost na amfotericin B in ostala antimikotična zdravila, prav tako pa tudi kombinirano zdravljenje ni pripomoglo k večjemu preživetju. Večina opisanih primerov je iz Severne Amerike in Evrope (5).

Pomemben oftalmološki problem, predvsem v tropskih predelih, predstavlja glivni keratitis. Približno polovica primerov je povezanih s predhodnimi poškodbami na očesu, posebej dovzetni pa naj bi bili posamezniki s sladkorno boleznijo, predhodnimi operacijami na očesu ter uporabniki kontaktnih leč. Kljub zdravljenju s peroralnimi in lokalnimi antimikotiki se številnim bolnikom ob koncu zdravljenja vid ne povrne v prvotno stanje (4). Med alergijskimi boleznimi so

najpogostejše glivni sinusitis in alergijske bronhopulmonalne mikoze (4).

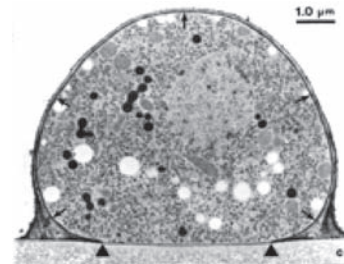
Čeprav prihaja do opisanih okužb najpogosteje pri bolnikih z oslabilnim obrambnim mehanizmom – predvsem zaradi okužbe z virusom HIV in kemoterapije, pa je primarna feohifomikozo centralnega živčnega sistema izjema. Med 101 opisanim primerom jih je več kot polovica pri ljudeh z zdravim imunskim sistemom in brez dejavnikov tveganja za glivne infekcije (8). Bolezen se največkrat kaže kot možganski ogojnek s spremljajočim glavobolom in nevrološkimi motnjami, je redka, vendar pogosto smrtna (4). Opisani primeri kažejo, da za številne infekcije s pigmentiranimi glivami še vedno ni primerne terapije. V prihodnje bodo potrebne dodatne preiskave in spremljanje teh infekcij, predvsem z namenom, da bi poiskali nove možnosti za zdravljenje in preizkusili nova prijemališča zdravilnih učinkovin.

### 3 Vloga melanina v glivnih celicah

V glivah imajo melanini zaščitno vlogo, delujejo pa tudi kot virulentni dejavniki. Ščitijo jih pred stresnimi dejavniki iz okolja ter gostiteljev obrambnim mehanizmom in s tem omogočijo njihovo preživetje (9, 10).

#### 3.1 Zaščitna vloga melanina

Ker se nahajajo melanini v glivni celični steni, delujejo kot nekakšen oklep na površini celice in jo varujejo pred zunanjimi vplivi. V primerjavi z nemelaniziranimi so melanizirane vrste gliv veliko



Slika 1: Prečni prerez apresorija divjega tipa *Magnaporthe grisea*. Melaninski sloj, ki obkroža celico, je prekinjen na mestu stika z gostiteljevo površino (med ▲), kar omogoči nastanek pore skozi katero lahko iz glive prehajajo večje molekule. (Ponatisnjeno z dovoljenjem Annual Review of Microbiology, Volume 50, ©1996 by Annual Reviews, [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)).

Figure 1: Cross-section of an appressorium of wild-type *Magnaporthe grisea*. The melanin layer surrounds the cell except for an area in contact with the host surface (between ▲), comprising the appressorium pore where the larger molecules can pass from the fungus. (Reprinted, with permission, from the Annual Review of Microbiology, Volume 50, ©1996 by Annual Reviews, [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org))

odpornejše na UV, X ali gama žarke, toploto in nizke temperature (9). Na pomembno vlogo melanina pri zaščiti pred sevanjem kaže tudi dejstvo, da je bil eden izmed reaktorjev v Černobilu kontaminiran s črnimi glivami (11). Pigmenti pa varujejo celice tudi pred hidrolitičnimi encimi kot so hitinaze, celuloze,  $\beta$ -1,3- in  $\beta$ -1,6-glukanaze in na ta način zavarujejo glivno celično steno pred razgradnjo (9). Predvidevamo, da melanin ščiti pigmentirane celice in tkivo, ki jih obkroža, tudi z adsorpcijo potencialno nevarnih substanc (številnih zdravnih učinkovin in drugih kemikalij, kot so organski amini, kovinski ioni, policiklični aromati), ki se potem počasi sproščajo v netoksičnih koncentracijah (12). To naj bi bil tudi vzrok za odpornost pigmentiranih gliv na antimikotično terapijo. Inkubacija amfotericina B in kaspofungina z melaninom je značilno zmanjšala njuno protiglivo delovanje na *Cryptococcus neoformans*, kar kaže na to, da je lahko melanizacija vzrok za težave pri zdravljenju kriptokoknih okužb (11, 13). Vendar pa adsorpcija učinkovin ni edini vzrok za odpornost na protimikrobno terapijo, saj inkubacija melanina z itraconazolom, flukonazolom in flucitozinom ni vplivala na njihovo protimikrobno delovanje. Kaže, da manjše molekule lahko prehajajo med zrnci melanina v glivni celični steni, medtem ko sta amfotericin B in kaspofungin prevelika (11).

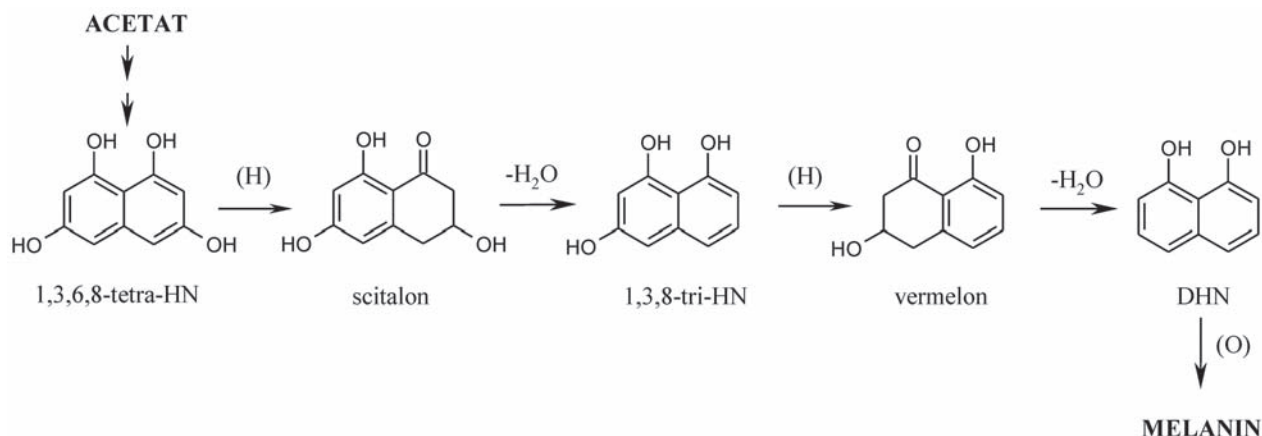
Ko gliva vstopi v gostitelja, je izpostavljena njegovemu imunskemu sistemu, aktiviranim makrofagom in reaktivnim kisikovim in dušikovim radikalom, ki se sproščajo med oksidativnim stresom. Le-ti naj bi imeli fungicidno in fungistatično delovanje (14, 15). Melanin ščiti glive pred oksidativnim stresom in fagocitozo (16). Melanizirani konidiji glive *Sporothrix schenckii* na primer so bolj odporni na kisikove in dušikove radikale ter monocite in makrofage kot nemelanizirani (17). Tudi glivo *Cryptococcus neoformans* melanin varuje pred oksidirajočimi dejavniki, ki jih sprošča obrambni mehanizem in hkrati zavira s protitelesi posredovano fagocitozo (18, 19). Zaradi svojih elektrokemičnih lastnosti pa melanini ne delujejo le kot lovilci prostih radikalov, ampak tudi kot ionski izmenjevalci, ki vežejo železove ione in s tem preprečijo njihovo sodelovanje v t.i. Fentonovi reakciji, kjer nastane iz superoksidnega radikala in vodikovega peroksida izjemno

reaktiven hidroksilni radikal (16). Melanini naj bi delovali tudi podobno kot superoksid dizmutaza in s tem še dodatno omejili oksidativni stres (16). Mehanizem odpornosti na fagocitozo še ni popolnoma pojasnjen, vendar pa naj bi bila osnova za rezistenco negativen naboj na površini celic. Ker so melanini negativno nabiti polimeri, njihova prisotnost v celični steni spremeni naboj na površini glivnih celic in s tem prepreči fagocitozo (11, 20).

### 3.2 Melanin kot virulentni dejavnik

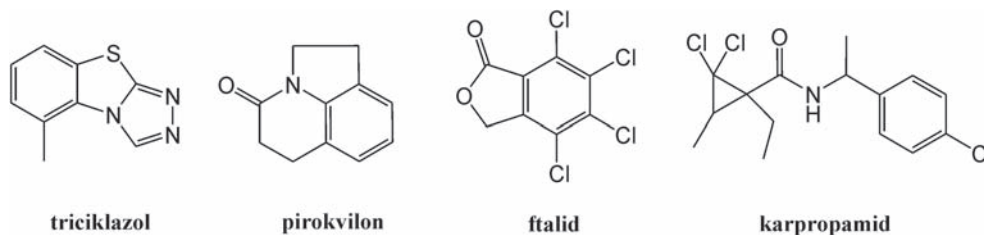
Sposobnost gliv, da sintetizirajo melanin, je povezana tudi s prilagajanjem na parazitizem in virulenco. Številne za rastline patogene glive tvorijo melanizirane konidije ali apresorije – specializirane organe, ki sodelujejo pri adheziji na površino celice in penetraciji hif v gostiteljevo tkivo (slika 1) (16). Za nekatere rastlinske patogene je tvorba apresorijev nujna za njihovo invazijo v gostiteljeve celice (9). Apresorijske celice razvijejo zelo visoko rigidnost in mehansko odpornost. Njihov osmotski tlak lahko naraste na 8 MPa. Sila s katero deluje *Magnaporthe grisea* na rastlinsko celično steno doseže na apikalni strani apresorija  $8 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ , pri *Colletotrichum graminicola* pa celo  $17 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ , kar je približno toliko, kot če bi človeško dlan obremenili z osmimi tonami (16, 21). Tako visok osmotski tlak je dosežen zaradi izredno visoke koncentracije glicerola v apresoriju, ki je posledica velike zamreženosti celične stene in celične membrane (16). Melanin naj bi v celični steni zmanjšal velikost por pod 1 nm, zaradi tega lahko skozi prehaja samo voda, večje molekule pa ne – to omogoči influks vode, ko se v apresoriju naberejo osmotsko aktivni topljenci (21). Hkrati pa se z melaninom poveča tudi mehanska odpornost celične stene.

Apresorij se prilepi na kutikulo na površini gostitelja in vanjo naredi vdrtino, kar omogoča hifi penetracijo v gostiteljsko celico (9). Pri tem ima prisotnost melanina pomembno vlogo. Dokazano je bilo, da albino mutanti *Colletotrichum lagenarium*, ki nimajo gena za poliketidno sintazo (PKS, prvi encim pri biosintezi DHN melanina), v nasprotju z divjim tipom, niso bili sposobni inficirati listov kumaric in penetrirati skozi njihovo celulozno steno. Ta sposobnost pa se je



Slika 2: Biosinteza melanina po 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melaninski poti v *Verticillium dahliae*, *Magnaporthe grisea* in *Curvularia lunata* (1,3,6,8-tetra-HN: 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen; 1,3,8-tri-HN: 1,3,8-trihidroksinaftalen)

Figure 2: 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*, *Magnaporthe grisea* and *Curvularia lunata* (1,3,6,8-tetra-HN: 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene; 1,3,8-tri-HN: 1,3,8-trihydroxynaphthalene)



Slika 3: Komercialno dostopni fungicidi, ki inhibirajo biosintezo DHN-melanina  
Figure 3: Commercial fungicides that inhibit DHN-melanin biosynthesis

ponovno vzpostavila po transfekciji z genom za PKS iz *Alternaria alternata*. Čeprav so bile takšne glive potem slabše infektivne, verjetno zaradi nižje vsebnosti melanina kot pri nemutiranih, je ta poskus potrdil pomembno vlogo melanina za parazitske lastnosti gliv (16). Albino mutanti *Pyricularia oryzae* tudi tvorijo apresorije, ki se prilepijo na kutikulo, vendar pa hife ne morejo penetrirati v gostiteljevo celico. Podobno so ugotovili tudi ob uporabi inhibitorjev sinteze melanina, kjer je prišlo do tvorbe hialinskih konidijev in apresorijev, ki so se prilepili na gostiteljevo celico, vendar pa hife niso mogle penetrirati (9). Poškodovano rastlinsko tkivo lahko inficirajo glive z melaniziranimi kot tudi nemelaniziranimi konidiji, kar kaže na to, da melanin olajša penetracijo v rastlinsko tkivo, ne vpliva pa na kasnejši razrast gliv (9). K rigidnosti apresorijev poleg melanina pripomorejo tudi hitin in drugi polimeri v glivni celični steni. V prisotnosti inhibitorja sinteze hitina apresoriji *Colletotrichum graminicola* niso dovolj rigidni, da bi razvili ustrezno visok tlak in zato počijo (21). Pri ljudeh in živalih pa je virulentnost melaniziranih gliv povezana z zaščitno vlogo melanina, ki zmanjša občutljivost na gostiteljev obrambni mehanizem in modificira imunski odziv (11).

## 4 Melanin

Melanini so negativno nabiti, hidrofobni pigmenti visokih molekularnih mas, ki nastajajo z oksidativno polimerizacijo fenolnih in/ali indolnih komponent in so navadno vezani s proteini, v nekaterih primerih pa tudi z ogljikovimi hidrati. Običajno so rjavi ali črni, čeprav obstajajo tudi melanini drugih barv (18, 22). Najdemo jih pri ljudeh, živalih, rastlinah in mikroorganizmih, kjer opravljajo številne funkcije, čeprav za rast in razvoj glivnih in drugih celic niso nujno potrebni (9, 22). Kljub razširjenosti melaninov pa je zaradi kompleksne polimerne zgradbe le malo znanega o njihovi kemijski strukturi (11). V splošnem lahko vse tipe prokariontskih in evkariontskih melaninov razdelimo v tri skupine (16):

- eumelanini: črni ali rjavi pigmenti, ki nastajajo z oksidacijo tirozina ali fenilalanina v o-dihidroksifenilalanin (DOPA) in dopakinon, ki v nadaljnjih stopnjah ciklizirata v 5,6-dihidroksiindol (DHI) ali 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilno kislino (DHICA). Eumelanini so heterogene makromolekule DHI in DHICA (16, 23).
- feomelanini: rumeno-rdeči melanini, ki nastajajo podobno kot eumelanini, vendar pa se na DOPO direktno ali s pomočjo glutatona pripne cistein. Nastala cisteinil-DOPA nato polimerizira do različnih derivatov benzotiazinov (16, 23).
- alomelanini: heterogena skupina polimerov, ki nastanejo z oksidacijo in polimerizacijo di- ter tetrahidroksinaftalena v pentaketidni poti. Pri tem nastanejo številni pigmenti kot so DHN melanini, homogentinska

kislina,  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroksibenzen, kateholi ter 4-hidroksifenil-octna kislina. Alomelanini ne vsebujejo dušika (16).

Pri človeku in živalih nastaja melanin iz tirozina s pomočjo encima tirozinaze. Pri tem lahko nastanejo melanini iz skupine eumelaninov ali feomelaninov (24).

### 4.1 Sinteza melanina v glivnih celicah

Za razliko od živali, kjer poteka sinteza melanina v melanocitih, glive sintetizirajo melanine v citoplazmi, od koder se prenesejo v celično steno ali pa izločijo kot ekstracelularni polimeri (22). V številnih glivah in drugih mikroorganizmih nastaja melanin iz tirozina preko 3,4-dihidroksifenilalanina (DOPA), v *Bazidiomicetah* (prostotrosonice) preko  $\gamma$ -glutaminil-3,4-dihidroksibenzena (GDBH) ali kateholov in pri *Askomicetah* (odprtotrosonice) in sorodnih *Deuteromicetah* preko 1,8-dihidroksinaftalena (DHN) (22).

Čeprav obstaja več različnih tipov glivnih melaninov, številne temno rjavo in črno melanizirane glive, ki so patogene za rastline in/ali človeka, sintetizirajo pigmente iz acetata po 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melaninski poti (9).

Sinteza melanina se začne s poliketidno-sintazo, ki v večstopenski reakciji pretvori acetat v 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen (slika 2), le-tega pa tetrahidroksinaftalen-reduktaza reducira do scitalona. Scitalon scitalon-dehidrataza pretvori v 1,3,8-trihidroksinaftalen, čemur sledi redukcija do vermehona s trihidroksinaftalen-reduktazo. Z odcepom vode s pomočjo vermehona-dehidrataze nastane iz vermehona 1,8-dihidroksinaftalen (22). Sledi končna stopnja sinteze melanina - oksidacija 1,8-dihidroksinaftalena v melanin, ki naj bi jo kataliziral encim lakaza, vendar pa sam mehanizem polimerizacije še ni pojasnjen (25).

Poznane so številne za človeka patogene glive, ki sintetizirajo melanin po poliketidni poti: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium carionii*, *Curvularia lunata*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala dermatidis*, *Fonsecaea compacta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Hendersonula toruloidii*, *Phaeoanellomyces werneckii*, *Phialophora richardsiae*, *Phialophora verrucosa*, *Sporothrix schenckii*, *Wangiella dermatidis* in *Xylohypha bantiana* (10, 17, 26).

### 4.2 Inhibicija biosinteze melanina

*Magnaporthe grisea* (anamorf *Pyricularia oryzae*) in *Bipolaris oryzae* sta znani povzročiteljici rje na rižu. Ker predstavlja omenjena bolezen velik ekonomski problem, so bile v preteklosti opravljene številne raziskave, ki so ugotovljale mehanizem nastanka te bolezni ter iskale

možne rešitve, ki bi zmanjšale njene razsežnosti. Za virulentnost teh gliv naj bi bil odgovoren melanin, ki ga sintetizirajo po 1,8-dihidroksinaftalenski poti (DHN-melanin) (27, 28, 29). Pri sintezi melanina po 1,8-dihidroksinaftalenski poti sodelujejo 4 encimi: poliketidna-sintaza, 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen-reduktaza, 1,3,8-trihidroksinaftalen-reduktaza (THNR) in scitalon-dehidrataza (22). Encimi, ki sodelujejo pri sintezi glivnega melanina, so zanimive tarče za razvoj novih antimikotičnih učinkovin, saj biosinteza DHN-melanina v gostiteljevih (rastlinskih oz. živalskih) celicah ne poteka in bi na ta način dosegli njihovo selektivnost.

Najbolj raziskani tarči v biosintetski poti melanina sta THNR in scitalon-dehidrataza, ki sodelujeta v dveh zaporednih reakcijah. Poznani so trije komercialno dostopni inhibitorji THNR – triciklazol, pirokvilon in ftalid (slika 3), v uporabi pa je tudi karpropamid, inhibitor scitalon-dehidrataze (22, 30).

Vsi naštetih inhibitorji se uporabljajo kot fungicidi, na tržišču pa še vedno ni nobenega antimikotika. Triciklazol z inhibicijo sinteze melanina stanjša celično steno v glivnih apresorijskih celicah in s tem prepreči penetracijo v gostitelja, ko pa se enkrat penetracija začne, je učinkovitost triciklazola nižja. Inhibitorjem sinteze melanina zato pravimo tudi "antipenetranti".

## 5 Sklep

Potreba po novih protiglivnih učinkovinah se pojavlja predvsem zaradi razvoja rezistence na trenutno dostopne antimikotične učinkovine in zaradi njihovih številnih neželenih učinkov. Pojavlja se vedno več novih vrst patogenih gliv, ki so odporne tudi na kombinirano antimikotično zdravljenje. Zaradi naraščanja glivičnih infekcij so raziskave usmerjene v razvoj novih protiglivnih učinkovin vse bolj pomembne. Išče mo predvsem učinkovine z novim prijemališčem delovanja in selektivnim učinkom. Med njimi so tudi inhibitorji sinteze melanina.

## 6 Literatura

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. In: Pharmacology. 5<sup>th</sup> Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003; 666-671.
2. Gubina M, Ihan A. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002; 457-499.
3. <http://microbiology.mtsinai.on.ca/mig/defungi/index.shtml> (maj 2007)
4. Revankar SG. Therapy of infections caused by dematiaceous fungi. Expert Rev Anti Infect Therapy 2005; 3 (4): 601-612.
5. Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA et al. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin Infect Dis 2002; 34: 467-476.
6. Milam CP, Fenske NA. Chromoblastomycosis. Dermatol Clin 1989; 7 (2): 219-225.
7. Fahal AH. Mycetoma: a thorn in the flesh. Trans R Soc Trop Med Hyg 2004; 98 (1): 3-11.
8. Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. Clin Infect Dis 2004; 38: 206-216.
9. Polak A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. Mycoses 1989; 33 (5): 215-224.
10. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev 2000; 13 (4): 708-717.
11. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (11): 3519-3528.
12. Larsson BS. Interaction between chemicals and melanin. Pigment Cell Res 1993; 6 (3): 127-133.
13. Wang Y, Casadevall A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38 (11): 2648-2650.
14. Yoshida K, Akaike T, Doi T et al. Pronounced enhancement of \*NO-dependent antimicrobial action by an \*NO-oxidizing agent, imidazoleoxyl N-oxide. Infect Immun 1993; 61 (8): 3552-3555.
15. Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. Infect Immun 1991; 59 (7): 2291-2296.
16. Plonka PM, Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. Acta Biochim Pol 2006; 53 (3): 429-443.
17. Martinez RR, Wheeler M, Plata AG et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. Infect Immun 2000; 68 (6): 3696-3703.
18. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol 2000; 3: 354-358.
19. Brakhage AA, Langfelder K, Wanner G et al. Pigment biosynthesis and virulence. Contrib Microbiol 1999; 2: 205-215.
20. Walter H, Graham LL, Krob EJ, Hill M. Correlation between phagocytic and membrane surface properties reflected by partitioning of human peripheral blood monocytes in two-polymer aqueous phases. Biochim Biophys Acta 1980; 602 (2): 309-322.
21. Deising HB, Werner S, Wernitz M. The role of fungal appressoria in plant infection. Micr Infect 2000; 2: 1631-1641.
22. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Ann Rev Phytopathol 1986; 24: 411-451.
23. Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. Pigment Cell Res 2006; 19: 572-594.
24. Westerhof W. The discovery of the human melanocyte. Pigment Cell Res 2006; 19 (3): 183-193.
25. Butler MJ, Day AW. Fungal melanins: a review. Can J Microbiol 1998; 44: 1115-1136.
26. Lanišnik Rižner T, Wheeler MH. Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). Can J Microbiol 2003; 49: 110-119.
27. Thompson JE, Basarab GS, Andersson A et al. Trihydroxynaphthalene reductase from *Magnaporthe grisea*: Realization of an active center inhibitor and elucidation of the kinetic mechanism. Biochemistry 1997; 36: 1852-1860.
28. Kihara J, Moriwaki A, Ito M et al. Expression of *THR1*, a 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase gene involved in melanin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, is enhanced by near-ultraviolet radiation. Pigment Cell Res 2004; 17: 15-23.
29. Jordan DB, Basarab GS, Liao DI et al. Structure-based design of inhibitors of the rice blast fungal enzyme trihydroxynaphthalene reductase. J Mol Graph Model 2001; 19: 434-447.
30. Kurahashi Y, Sakawa S, Kinbara T et al. Biological activity of carpropamid (KTU 3616): A new fungicide for rice blast disease. Nipp Noy Gakka 1997; 22 (2): 108-112.