

# Antimikotiki: sedanje in nove možnosti zdravljenja glivičnih okužb

## Antimycotics: current and novel strategies for treatment of fungal infections

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan

**Povzetek:** Zaradi vse pogostejših invazivnih glivičnih infekcij postaja vse bolj pomembno tudi njihovo zdravljenje. Poznamo več skupin antimikotičnih učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja, vendar njihovo uporabo velikokrat omejujejo neželeni učinki in rezistenca. Novi pristopi k zdravljenju glivičnih okužb obsegajo povečanje odmerkov učinkovin, izboljšanje njihovih farmakokinetičnih lastnosti, kombinirano antimikotično zdravljenje, izboljšanje imunske odpornosti gostitelja, največ raziskav pa je usmerjenih v razvoj novih protiglivnih učinkovin. Novi antimikotiki naj bi imeli selektiven učinek na glivne celice, majhno stopnjo rezistence, širok spekter delovanja, manjšo toksičnost ter večjo učinkovitost. Med njimi so najbolj obetavni tisti, ki vplivajo na sintezo komponent glivne celične stene, proteinov oz. na signalne poti.

**Ključne besede:** invazivne glivične okužbe, zdravljenje glivičnih okužb, antimikotiki, rezistenca, nove farmakološke tarče

**Abstract:** Antifungal treatment is becoming more and more important as the incidence of invasive fungal infections is increasing. Currently, several antimycotics with diverse mechanisms of action are available, but their usage is often limited by their adverse effects and resistance. Novel strategies for the treatment of fungal infections are as follows: high-dose therapy, modulation of the pharmacokinetic properties of the drugs, combination therapy, immune system enhancement, and the development of new antifungal agents. Ideal antimycotics would have selectivity to fungal cells, low rates of resistance, broad antifungal activity, reduced toxicity and improved efficacy. The most promising antifungals are those targeting fungal cell wall components, protein biosynthesis and signaling pathways.

**Key words:** invasive fungal infections, antifungal treatment, antimycotics, resistance, new pharmacological targets

## 1 Uvod

V zadnjih dveh desetletjih se pojavlja vedno več invazivnih glivičnih okužb, ki predstavljajo velik zdravstveni problem po celem svetu (1, 2). Do teh okužb prihaja predvsem pri ljudeh s slabšo telesno odpornostjo, ki je posledica vedno širše uporabe širokospektralnih antibiotikov, imunosupresivnih učinkovin in kemoterapevtikov, večjega števila bolnikov okuženih z virusom HIV ter prejemnikov kostnega mozga in drugih organov (3, 4). Če so bile v preteklosti vzrok za oportunistične invazivne glivične okužbe v večini glive vrst *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* in *Aspergillus fumigatus*, pa je v zadnjem času zaradi uporabe antimikotikov v preventivne namene vedno več novih vrst gliv, ki povzročajo tovrstne infekcije (1). Mednje uvrščamo predvsem ne-*albicans* vrste *Candida*, ne-*fumigatus* vrste *Aspergillus*, oportunistične kvasovkam podobne glive rodov *Trichosporum* in *Rhodotorula*, temno pigmentirane glive, zigomicete in hialinske plesni rodov *Fusarium*, *Scedosporium*, *Acremonium* in *Paecilomyces* (1, 5). Te glive so bolj odporne proti antimikotičnim učinkovinam, infekcije, ki jih povzročajo, pa so velikokrat smrtne (1).

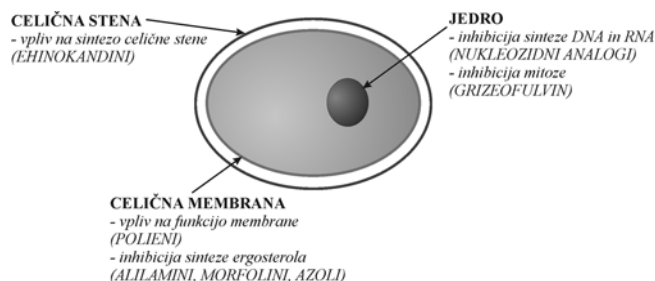
Nova diagnostična orodja, kot so določevanje komponent glivne celične stene in genomske DNA, boljše razumevanje epidemiologije in

prognostičnih dejavnikov okužb ter nove antimikotične učinkovine omogočajo boljši nadzor nad potekom invazivnih glivičnih infekcij, vendar pa je neuspela protiglivna terapija še vedno velik klinični problem (1, 2). Do neuspelega zdravljenja lahko pride zaradi napačnega prepoznavanja bolezni, razvoja rezistence patogenih gliv proti uporabljenim antimikotičnim učinkovinam, imunske pomanjkljivosti obolelih, prenizkega odmerka uporabljenih učinkovin ter njihovih neželenih učinkov oz. toksičnosti (2). Poznani so številni mehanizmi glivne rezistence: strukturne spremembe ali prekomerna tvorba prijemališč antimikotičnih učinkovin, spremembe biosintezne poti ergosterola, pretvorba/sprememba antimikotičnih učinkovin in črpanje učinkovin iz celic. Čeprav poznamo podobne mehanizme rezistence tudi pri bakterijah, obstaja med razvojem glivne in bakterijske rezistence pomembna razlika – intakne glivne celice ne privzemajo eksogene DNA, rezistenca se tako ne more razviti s horizontalnim prenosom genetskega materiala (plazmidov, virusov ali transpozonov) med vrstami. Zato obstaja tudi majhna verjetnost, da bi prišlo do nenadnega izbruha rezistence med glivami. Kljub vsemu pa je lahko široka uporaba antimikotikov in fungicidov v preventivne namene vzrok za pospešen razvoj rezistence (5).

Ločimo primarno ali intrinzično ter sekundarno ali pridobljeno rezistenco proti protiglivnim učinkovinam (4). O primarni rezistenci govorimo takrat, ko je gliva odporna na antimikotično učinkovino še preden je prišla v stik z njo, sekundarna rezistenca pa se lahko razvije po stiku glive z antimikotikom (4, 6). Čeprav poznamo več skupin antimikotičnih učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja, se zaradi njihovih neželenih učinkov ali razvoja rezistence nanje pojavlja potreba po vedno novih načinih zdravljenja invazivnih glivičnih okužb. V članku predstavljamo pregled trenutno dostopnih antimikotičnih učinkovin, njihove najpogostejše neželene učinke in mehanizme rezistence ter nove možne načine zdravljenja invazivnih glivičnih infekcij, vključno s prijemašiči učinkovin, ki so zanimiva s stališča razvoja novih protiglivnih učinkovin.

## 2 Skupine antimikotičnih učinkovin in mehanizmi njihove rezistence

Glede na izvor antimikotičnih učinkovin poznamo antimikotike naravnega izvora (antimikotični antibiotiki) in sintezne antimikotike (3). Na osnovi njihove strukture jih razdelimo v sedem razredov: poliene, alilamine, morfoline, nukleozidne analoge, azole, ehinokandine in druge (7). Ti svoj antimikotični učinek dosežejo po različnih mehanizmih – z vplivom na sintezo celične stene, ergosterola, lanosterola oz. nukleinskih kislin ali z vplivom na funkcijo celične membrane (slika 1) (3). Razvoj protiglivnih učinkovin se je začel z odobritvijo amfotericina B s strani FDA leta 1957 (7).



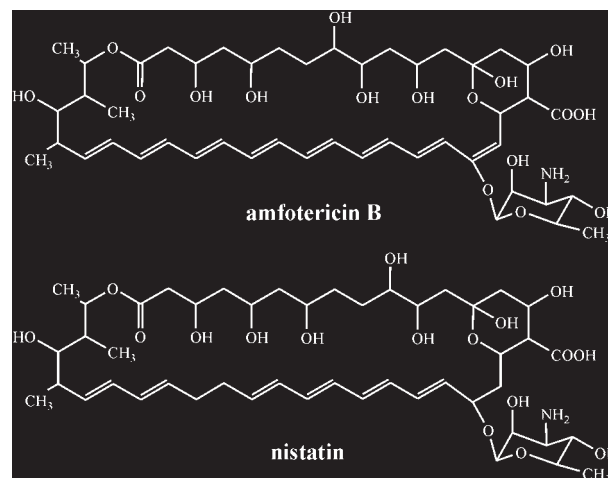
Slika 1: Mehanizmi delovanja trenutno dostopnih antimikotičnih učinkovin.

Figure 1: Mechanisms of action of currently available antimycotics.

Idealen antimikotik opisujejo naslednje lastnosti: širok antimikotični spekter, majhna možnost razvoja rezistence nanj, prilagodljive poti jemanja, malo neželenih učinkov in omejene interakcije z drugimi učinkovinami (7). Na tržišču še vedno ni nobene antimikotične učinkovine, ki bi ustrezala vsem naštetim zahtevam. Posebej pogosti pri zdravljenju glivičnih okužb z antimikotiki so neželeni učinki. Pri glivah in ljudeh (evkariontih) potekajo številni podobni celični in biokemični procesi in zato tarča delovanja antimikotikov niso le celice gliv, ampak tudi gostiteljeve celice (8). Zaradi neustreznega predpisovanja širokospektralnih antibiotikov in njihove uporabe v preventivne namene je postal hiter razvoj rezistence nanje globalni problem, ki pa ga ob uporabi širokospektralnih antimikotikov zaradi mehanizma razvoja glivne rezistence ni pričakovati v takšnem obsegu.

### 2.1 Polieni

Med polieneke antimikotike uvrščamo makrolidna antibiotika amfotericin B (AmB) in nistatin (slika 2). Njuno protiglivno delovanje temelji na interakcijah z ergosterolom v plazemski membrani. To vpliva na permeabilnost in transportne funkcije membrane – v membrani nastanejo pore, zato pride do povečane izgube intracelularnega kalija in prepuščanja številnih manjših molekul, kar vodi v celično smrt (3, 4). AmB je bil prvič izoliran leta 1955 iz *Streptomyces nodosus* iz Venezuele. Zaradi slabe topnosti v vodi je učinkovit le v intravenski obliki kot deoksiholat in ga uporabljamo za zdravljenje številnih resnih sistemskih mikoz (9). Čeprav ima AmB visoko afiniteto do glivnega ergosterola, se veže tudi na sesalske sterole (npr. holesterol), kar je po vsej verjetnosti vzrok za njegove neželene učinke (7). Zaradi visoke lipofilnosti AmB in povzročanja hude nefrotoksičnosti, ki lahko vodi do trajne okvare ledvic, so bile v devetdesetih letih razvite njegove lipidne oblike (LAMB), ki so manj nefrotoksične in imajo ohranjen širok antimikotični spekter (9, 10). Manjša toksičnost za ledvice je posledica visokih koncentracij LAMB v jetrih in vranici (pasivna ciljana dostava) in nižjih koncentracij v plazmi, ledvicah in pljučih. LAMB so v agregatni obliki in so tudi zato manj toksične od AmB-deoksiholata, ki je oligomer (9). Komercialno so dostopne tri LAMB: koloidna disperzija AmB, liposomalni AmB in lipidni kompleks AmB. Med seboj se razlikujejo po lipidni sestavi, obliki, velikosti, farmakokinetičnih lastnostih in kliničnih učinkih (10).



Slika 2: Strukturi amfotericina B in nistatina.

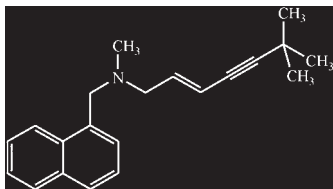
Figure 2: Structures of amphotericin B and nystatin.

Tudi nistatin je toksičen, zato ga uporabljamo le za zdravljenje lokalnih površinskih okužb (4). O rezistenci na AmB ni veliko znanega, saj se pri hitro delujočih, učinkovitih, širokospektralnih antimikotikih le-ta redko pojavi. Najverjetnejši mehanizem rezistence pri polieni so mutacije v biosintezni poti ergosterola in s tem spremenjena količina ergosterola v membranah glivnih celic (6).

### 2.2 Alilamini

Alilamini selektivno zavirajo skvalen-epoksidazo, ki sodeluje v zgodnji stopnji sinteze ergosterola (4). Inhibicija t.i. postskvalenske biosintezne poti ergosterola ima za posledico kopičenje endogenega skvalena v

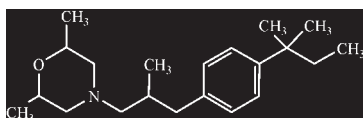
celicah, ki je toksično za organizem (3). Glavni predstavnik te skupine je terbinafin (slika 3), ki se v peroralni in topikalni obliki uporablja za zdravljenje infekcij z dermatofiti, filamentoznimi, dimorfnimi in temno pigmentiranimi glivami. Do sedaj je znanih le malo neželenih učinkov terbinafina (11). Čeprav je rezistenca nanj redka, je bilo dokazano, da imajo nekateri proti azolom rezistentni sevi s prekomerno izraženimi geni za transporterje, ki črpajo učinkovine iz celic, tudi navzkrižno rezistenco proti terbinafinu (4).



Slika 3: Struktura terbinafina.  
Figure 3: Structure of terbinafine.

### 2.3 Morfolini

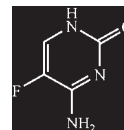
Predstavnik te skupine je strukturno poseben, lokalno delujoči antimikotik amorolfin (slika 4). V obliki laka za nohte in kreme se uporablja za zdravljenje okužb nohtov z dermatofiti, dimorfnimi, temno pigmentiranimi in filamentoznimi glivami ter nekaterimi kvasovkami (12). Njegov inhibitorski učinek temelji na preprečevanju biosinteze ergosterola z inhibicijo dveh encimov iz skupine citokromov-P450: delta-14-reduktaze in delta-7,8-izomeraze (7, 13).



Slika 4: Struktura amorolfina.  
Figure 4: Structure of amorolfine.

### 2.4 Nukleozidni analogi

Nukleozidni analog flucitozin (slika 5) vstopa v glivne celice s pomočjo citozin-permeaze in se nato s citozin-deaminazo pretvori do 5-fluorouracila, antimetabolita, ki inhibira encim timidilat-sintetazo. S tem je onemogočena sinteza DNA (3, 4). Poleg tega se 5-fluorouracil vgradi namesto uracila v glivno RNA in s tem prepreči sintezo proteinov (14). Na sesalske celice flucitozin ne deluje, saj te nimajo encima citozin-deaminaze in zato ne pride do pretvorbe v 5-fluorouracil, ki se uporablja pri terapiji rakavih obolenj (8). Vendar pa nekateri podatki kažejo, da pri kroničnem jemanju flucitozina lahko pride do povišanih serumskih koncentracij 5-fluorouracila, kar naj bi bil tudi vzrok za njegova resna neželena učinka - hepatotoksičnost in moteno delovanje kostnega mozga (14). Pri samostojni terapiji s flucitozinom se navadno razvije rezistenca, zato ga v primeru resnih okužb, kot je npr. kriptokokni meningitis, kombiniramo z amfotericinom B. Rezistenca temelji na mutacijah genov za citozin-deaminazo in uracilfosforibozil-transferazo ter na povečani sintezi pirimidinov, ki tekmujejo s 5-fluorouracilom in s tem zmanjšajo njegov antimikotični učinek (4, 14).



Slika 5: Struktura flucitozina.  
Figure 5: Structure of flucytosine.

### 2.5 Azoli

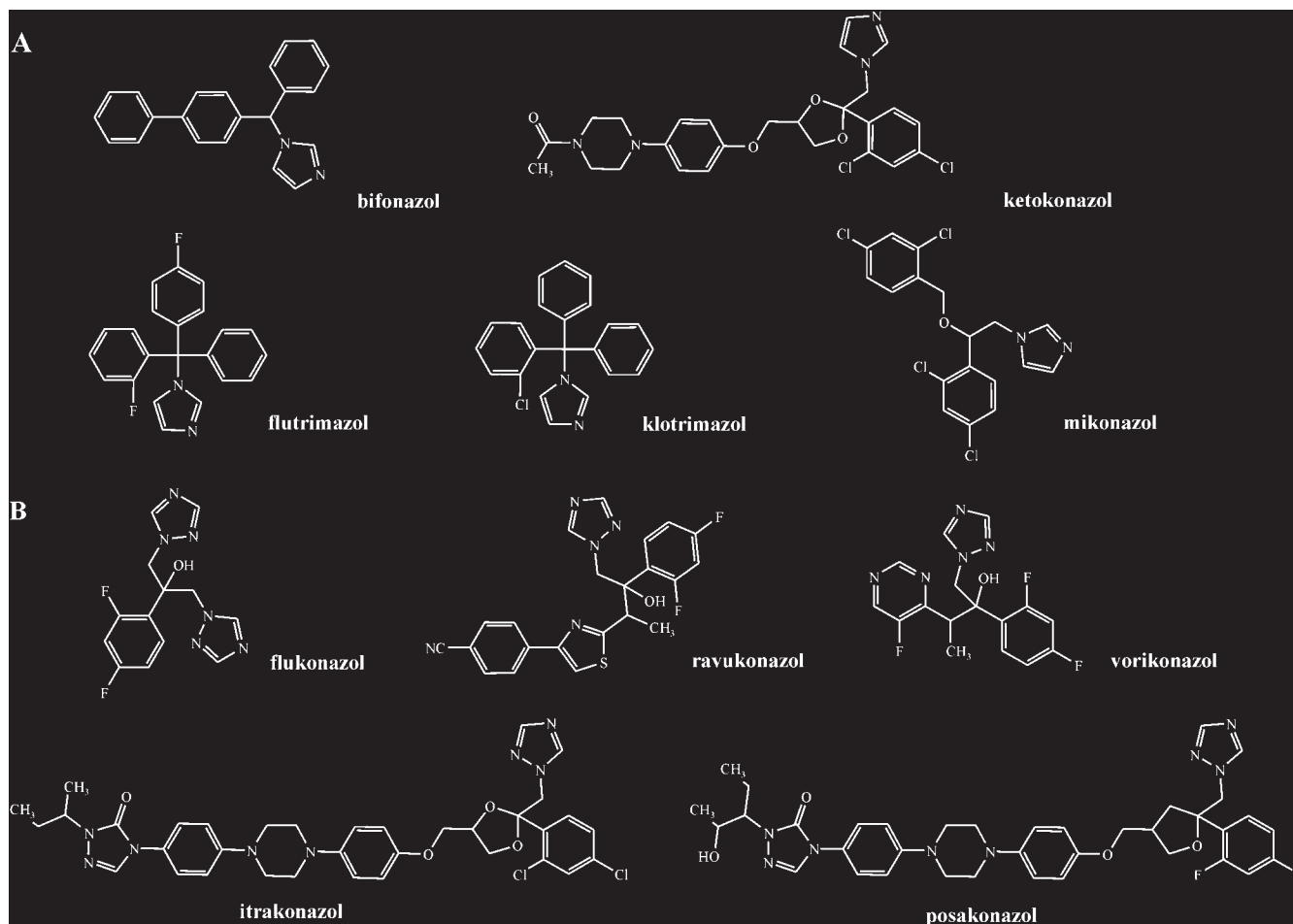
Azolni antimikotiki so skupina sinteznih fungistatičnih učinkovin s širokim spektrom delovanja (3). Razdelimo jih v dve skupini: imidazole (bifonazol, flutrimazol, ketokonazol, klotrimazol, mikonazol) in triazole (flukonazol, itrakonazol, posakonazol, ravukonazol, vorikonazol) (slika 6) (7). Z inhibicijo 14 $\alpha$ -demetilacije lanosterola zavirajo biosintezo glivnega ergosterola (4). Vežejo se na hemsko skupino lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaze in tako preprečijo oksidativno demetilacijo lanosterola v ergosterol. Zaradi pomanjkanja ergosterola je zmanjšana stabilnost glivne celične membrane, kar vpliva na prenos hranil in sintezo hitina, to pa poruši integriteto celične stene. Zaradi inhibicije sinteze ergosterola se kopičijo tudi toksični prekursorji, ki vplivajo na razvoj glivnih celic in povečajo njihovo občutljivost na gostiteljev obrambni mehanizem (5).

Neželeni učinki azolov so povezani s posameznimi učinkovinami – med drugim lahko pride do perifernih edemov, kongestivne odpovedi srca, povišanja vrednosti transaminaz, odpovedi delovanja jeter, nimajo pa nefrotoksičnih učinkov, kot je to značilno za amfotericin B (7). Zaradi boljših farmakokinetičnih lastnosti, varnosti in učinkovitosti pri zdravljenju sistemskih mikoz se za sistemsko uporabo namesto imidazolov v splošnem bolj uporabljajo triazoli. Tudi razvoj novih učinkovin poteka predvsem v smeri iskanja novih triazolnih učinkovin (7, 15).

Pri vrstah *Candida* poznamo tri osnovne mehanizme rezistence proti azolom:

- spremembe ali prekomerno izražanje lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaze,
- druge mutacije v biosintezni poti ergosterola,
- aktivno izčrpavanje učinkovin iz glivnih celic (6).

Zaradi mutacije gena *ERG11* za lanosterol-14 $\alpha$ -demetilazo se zmanjša afiniteta azolov do tega encima (4). Pomnožitve *ERG11* gena lahko privedejo do prekomernega izražanja lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaze. Do mutacij lahko pride tudi na drugih encimih (npr. *ERG3* oz.  $\alpha$ -5,6-sterol-desaturazni gen) v biosintezni poti ergosterola, ali pa nastane ergosterol po alternativni sintezni poti. Vendar pa je mutacij *ERG3* gena relativno malo, saj naj bi bile le-te zaradi posledične zmanjšane sposobnosti tvorbe hif povezane z zmanjšano virulenco gliv (5). Azoli vstopajo v glivne celice s pasivno difuzijo, iz celice pa jih izločajo transmembranske črpalke (5). Povečano izražanje ABC («ATP-binding cassette») in MR («major facilitator») transporterjev vodi do črpanja učinkovin iz celic in je povezano z rezistenco na azole (4, 7). Do pojava rezistence ne pride vedno le zaradi enega mehanizma, ampak lahko pripomore k njej sinergistični učinek večjih mehanizmov (5). Raziskave so pokazale, da so različne vrste gliv različno občutljive na azolne protiglivne učinkovine – razlike naj bi bile posledica različnih mehanizmov delovanja azolov in različnih mehanizmov rezistence proti



**Slika 6:** Strukture imidazolnih (A) in triazolnih (B) antimikotikov.  
**Figure 6:** Structures of imidazole (A) and triazole (B) antimycotics.

njim. To tudi pojasni zakaj kljub strukturalni sorodnosti azolov ne pride do navzkrižne rezistence nanje (16).

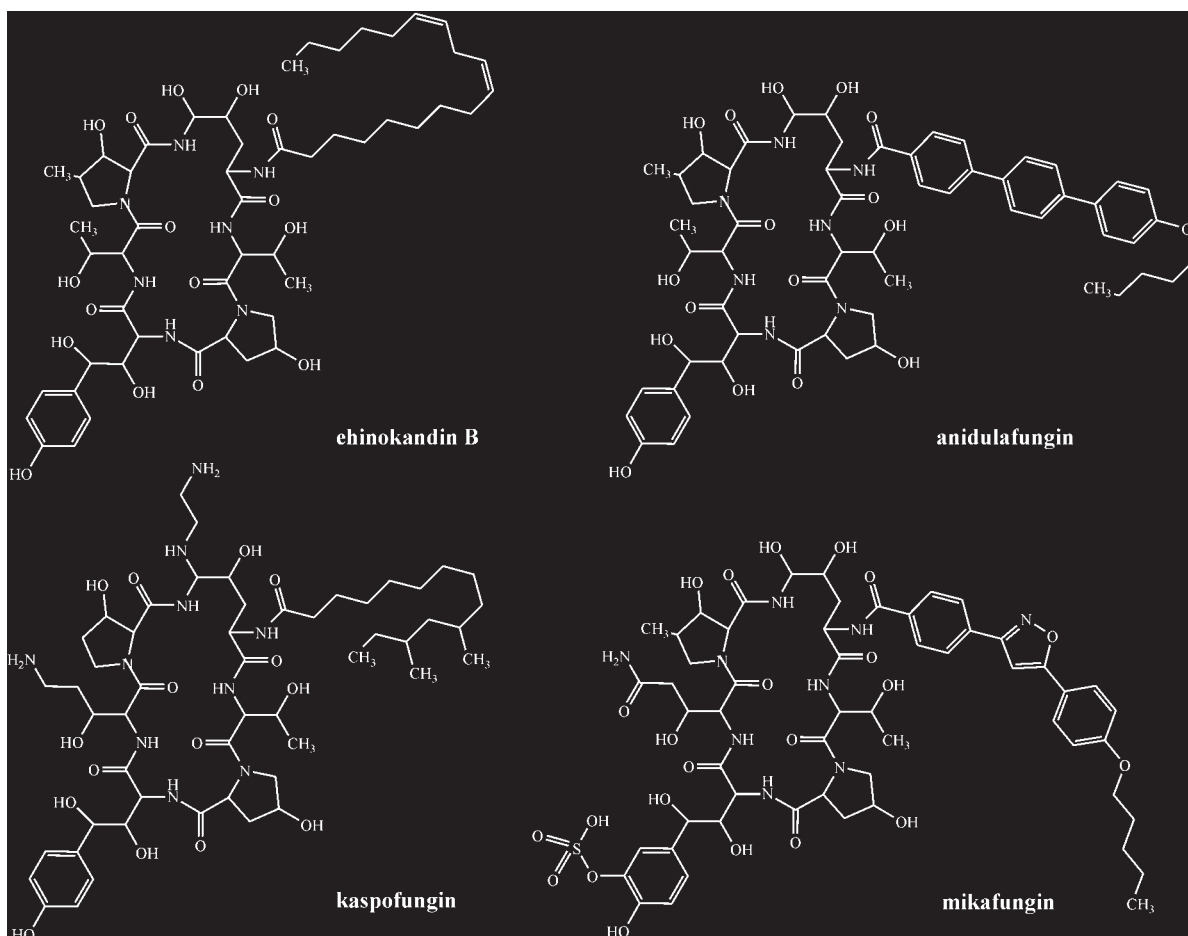
## 2.6 Ehinokandini

Ehinokandini predstavljajo nov razred protiglivnih učinkovin, ki inhibirajo 1,3- $\beta$ -glukan-sintazo (4). Z inhibicijo sinteze glukoznega polimera 1,3- $\beta$ -glukana, ki je nujen za vzdrževanje strukture glivne celične stene, celice izgubijo integriteto, kar vodi do lize. Učinkovine iz te skupine (anidulafungin, kaspofungin in mikafungin) so strukturalni analogi ehinokandina B (slika 7), naravne učinkovine, izolirane iz glive *Aspergillus nidulans* (3). Gre za polsintezne ciklične heksapeptidne učinkovine na katere je vezana lipofilna stranska veriga, ki deluje fungicidno na vrste *Candida* in fungistatično na vrste *Aspergillus* (3, 7, 17). Zaradi posebnega mehanizma delovanja so ehinokandini idealni za uporabo v kombinaciji z drugimi antimikotiki (17). V primerjavi z drugimi protiglivnimi učinkovinami so izjemno varni in le redko toksični. Ker imajo zelo nizko biološko uporabnost po peroralni aplikaciji, jih uporabljamo le kot parenteralne pripravke. S tem so povezani tudi nekateri njihovi neželeni učinki: rdečica, koprivnica, izpuščaji in

tromboflebitis na mestu injiciranja, lahko pa pride tudi do dviga nivoja jetrnih encimov (7). Rezistenca proti ehinokandinom zaradi pomanjkanja kliničnih podatkov ni bila podrobneje raziskana, vendar bi lahko bila posledica nižje afinitete do 1,3- $\beta$ -glukan-sintaze (4).

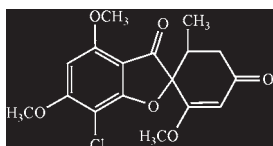
## 2.7 Drugi antimikotiki

Grizeofulvin (slika 8) je fungistatična učinkovina z ozkim spektrom delovanja, izolirana iz kultur *Penicillium griseofulvum* (3). V glivnih celicah se veže na mikrotubule in na ta način zavre celično mitozo ali sintezo nukleinskih kislin ter tako prepreči rast dermatofitov. Pri visokih odmerkih ima tudi protivnetne in vazodilatatorne učinke (18).



Slika 7: Strukture ehinokandinov.

Figure 7: Structures of echinocandins.



Slika 8: Struktura grizeofulvina.

Figure 8: Structure of griseofulvin.

### 3 Novi pristopi k zdravljenju glivičnih okužb

Zaradi vse pogostejših invazivnih glivičnih okužb, neuspelega zdravljenja, neželenih učinkov trenutno dostopnih protiglivičnih učinkovin in razvoja rezistence nanje je potreba po novih pristopih k zdravljenju glivičnih okužb vedno večja. Med obetavne nove pristope k boju proti glivičnim infekcijam uvrščamo:

- povečanje odmerkov učinkovin,

- uporaba novih dostavnih sistemov, ki izboljšajo terapevtski indeks že obstoječih protiglivičnih učinkovin,
- kombinirano antimikotično zdravljenje,
- uporaba učinkovin z vplivom na imunski sistem,
- razvoj novih antimikotičnih učinkovin (6).

Dokazano je bilo, da lahko z višjimi odmerki flukonazola dosežemo boljši terapevtski indeks učinkovine in boljše klinične rezultate (19). Prav tako lahko z visokimi odmerki LAmB dosežemo boljše rezultate kot z nelipidno obliko AmB (6). Vendar pa je uporaba večjih odmerkov antimikotičnih učinkovin omejena z njihovo toksičnostjo. Da bi učinkovina dosegla svoj farmakološki učinek, mora doseči mesto delovanja. Na farmakokinetične lastnosti učinkovine lahko vplivamo na različne načine. Absorbcijo nepolarnega, v vodi netopnega itraconazola povečamo z vgradnjo v  $\beta$ -cikloheksan, medtem ko njegova hidrofilna zunanost omogoča transport do gastrointestinalne sluznice, kjer se itraconazol absorbira,  $\beta$ -cikloheksan pa ostane v lumnu. Da bi zmanjšali toksičnost AmB in povečali njegovo peroralno biološko

uporabnost, so bile v preteklosti razvite njegove lipidne dostavne oblike, najnovejši pristop pa je vgradnja AmB v lipidne nanodelce (19).

S kombinirano protiglivično terapijo želimo povečati učinkovitost protiglivnih učinkovin ter zmanjšati možnost nastanka rezistence in neželene oz. toksične učinke (6). Dosedanji podatki kažejo, da s kombinacijo AmB in ehinokandinov dosežemo aditivni ali celo sinergistični učinek, večjo učinkovitost dosežemo tudi s kombinacijo AmB in flucitozina oz. flukonazola in flucitozina, medtem ko *in-vitro* podatki kažejo, da s kombinacijo AmB in flukonazola dosežemo antagonistični učinek (19).

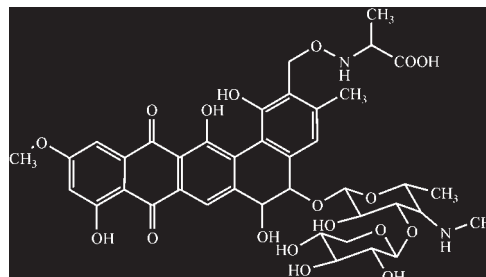
Ker so osebe z oslabljenim imunskim sistemom še posebej dovzetne za invazivne glivične infekcije, predstavlja poskus izboljšanja njihove imunske odpornosti zanimiv pristop k zdravljenju teh infekcij (7). *In-vitro* raziskave in raziskave na živalih so pokazale, da bi imunska odpornost proti patogenim glivam lahko povečali s komercialno dostopnimi rekombinantnimi človeškimi citokini: granulocitne (G-CSF), granulocitne-makrofagne (GM-CSF) in makrofagne (M-CSF) kolonije stimulirajočimi faktorji, pa tudi z eksogenimi interleukini (IL)-1, 12 in 15, interferonom (IF)- $\gamma$  in tumor nekrotizirajočim faktorjem (TNF)- $\alpha$  (19). Dokazano je bilo, da jemanje rekombinantnih G-CSF in GM-CSF skrajša trajanje nevtropenije, jemanje G-CSF, M-CSF in GM-CSF pa izboljša fagocitne lastnosti nevtrofilcev, monocitov in makrofagov. Ena izmed možnosti za izboljšanje gostiteljeve imunske odpornosti je tudi uporaba cepiv. Poskusi razvoja cepiv z živimi oz. oslabljenimi glivami ter ekstrakti celične stene ali citoplazme se niso izkazali za uspešne, zato so raziskave usmerjene v odkrivanje antigenov v glivnih celicah, ki izzovejo imunski odgovor pri gostitelju ter v iskanje primernih pomožnih snovi. Eksperimentalni in klinični podatki kažejo, da naj bi bili pri zdravljenju glivičnih infekcij z vplivom na gostiteljev imunski sistem učinkoviti le v kombinaciji z antimikotičnimi učinkovinami. Prednosti takšnega zdravljenja so širši antimikotični spekter, minimalni toksični neželeni učinki in nezmožnost razvoja rezistence. Glavni slabosti pa sta vnetje, ki ga izzove in v primeru cepiv, pogoj, da mora imeti gostitelj zdrav, normalno delujoč imunski sistem (20).

Čeprav poznamo številne antimikotične učinkovine z raznolikimi mehanizmi delovanja, obstaja še vedno veliko potencialnih prijemališč za razvoj novih protiglivnih učinkovin. Raziskave so osredotočene v razvoj učinkovin, ki bi delovale po principu selektivne toksičnosti in bi bile bolj učinkovite od že dostopnih. Da bi z načrtovanjem novih učinkovin dosegli selektivno toksičnost, mora njihovo delovanje temeljiti na strukturnih in biokemičnih razlikah med glivnimi in gostiteljskimi celicami (7).

Glivna celična stena ima kljub svoji trdnosti dinamično strukturo. Zaradi njene pomembne vloge v številnih bioloških procesih predstavljajo njene komponente zanimiva tarčna mesta za selektivno ciljanje s specifičnimi protitelesi ali učinkovinami, ki bi vplivale na rast gliv (21). Potencialna prijemališča antimikotičnih učinkovin v glivni celični steni so: specifični encimi, melanini, manozidi, hitin, proteini toplotnega šoka, glikosfingolipidi, histonom podobni proteini, prehodni antigeni, integrinom podobni proteini, idr. (19, 21).

V celični steni številnih temno-rjavo in črno pigmentiranih gliv je prisoten 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melanin, ki deluje kot oklep na površini glivne celice in jo varuje pred stresnimi dejavniki iz okolja in gostiteljevim obrambnim mehanizmom, hkrati pa je odgovoren tudi za

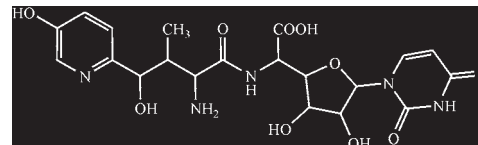
virulenco gliv. Ker sinteza melanina po 1,8-dihidroksinaftalenski poti v gostiteljevem organizmu ne poteka, so encimi v njegovi biosintezni poti zanimive tarče antimikotičnih učinkovin s selektivnim delovanjem (22). Tarča protiglivnih učinkovin so lahko tudi manozidi – nanje se vežejo pradimicini (slika 9), nastane ternarni kompleks D-manozid-pradimicin-kalcij, kar poruši integriteto glivne celične stene (19, 23).



Slika 9: Struktura pradimicina A.

Figure 9: Structure of pradimicin A.

Za vzdrževanje integritete glivne celične stene je pomemben tudi hitin, ki ga v vretenčarskih celicah ni. Nikomicini (slika 10) so učinkovine, ki inhibirajo sintezo hitina, a žal njihovo uporabo omejujejo majhna permeabilnost, različna občutljivost različnih vrst gliv nanje in spremenljivi odzivi živalskih modelov nanje (24).



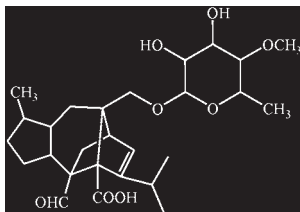
Slika 10: Struktura nikomicina Z.

Figure 10: Structure of nikkomycin Z.

Nekateri proteini toplotnega šoka (Hsp60, Hsp70, Hsp90 in Hsp150) se nahajajo v glivnih celičnih stenah in imajo pomembno vlogo pri razvoju glivnih celic (21). Izražajo se kot odgovor na stres in ščitijo celice pred njegovimi škodljivimi učinki (25). Efungumab je človeško rekombinantno monoklonsko protiteleso proti Hsp90, ki ima protiglivično aktivnost in v kombinaciji z AmB oz. kaspofunginom deluje sinergistično (25, 26). Pasivno zdravljenje s protitelesi v kombinaciji z AmB ima zelo dobre možnosti za uspeh, saj je sinergistični učinek dosežen na dva načina – uporaba dveh učinkovin z različnimi prijemališčema delovanja, poleg tega pa AmB poveča prepustnost glivnih celic in s tem olajša dostop efungumabu do intracelularnih Hsp90. Poleg proteinov toplotnega šoka so za razvoj terapevtsko uporabnih protiglivnih protiteles zanimivi tudi antigeni, kot so adhezini na površini celic, manoproteini toplotnega šoka in drugi (25). V glivnih celicah se nahajajo tudi številni glikozilceramidi, ki imajo pomembno vlogo pri rasti celic, znotrajceličnem signaliziranju, razvrščanju proteinov, adheziji in apoptozi. Ker se struktura glikozilceramidov med sesalci in glivami razlikuje, predstavljajo zanimivo tarčno mesto za delovanje protimikrobnih učinkovin s selektivnim učinkom (21).

Prijemališče nekaterih novih protiglivnih učinkovin je zaviranje sinteze proteinov. Elongacijski faktor 2 (EF2) je protein, ki sodeluje pri

premikanju ribosoma vzdolž mRNA med sintezo proteinov (27). Nanj se vežejo sordarini (slika 11), tetraciklične diterpenske učinkovine, ki stabilizirajo kompleks ribosom/EF2, in tako ustavijo podaljševanje novonastajajoče proteinske verige (27, 28). Čeprav je glivni EF2 visoko homologen z EF2 drugih evkariontov, se sordarini vežejo le na glivni EF2 (27).



Slika 11: Struktura sordarina.

Figure 11: Structure of sordarin.

Zanimivo je, da so lahko filamentozne glive same vir protiglivnih učinkovin, ki so del njihovega obrambnega sistema pred ostalimi glivami v okolju s katerimi se bojujejo za hrano (29). Poleg že omenjenih ehinokandinov, nikomicinov in sordarinov v to skupino med drugim uvrščamo tudi protiglivni protein (AFP), ki ga izloča *Aspergillus giganteus* (20, 29). AFP je majhen, bazičen, s cisteini bogat protein, ki ima v mikromolarnih koncentracijah izjemno dobro aktivnost proti filamentoznim glivam, na bakterijske, rastlinske in sesalske celice pa nima vpliva. AFP in homologni protiglivni proteini iz filamentoznih gliv se vežejo na plazemsko membrano in povzročijo lizo celic (29). Nekateri med njimi zavirajo rast celic z vplivom na signalizacijske kaskade ali pa inhibirajo sintezo glivne celične stene s tvorbo reaktivnih kisikovih radikalov oz. depolimerizacijo aktinskega citoskeleta (20, 29). Za AFP je bilo dokazano, da inhibira tudi sintezo hitina (29).

Pomembno vlogo pri odzivu glivnih celic na stres imajo signalne molekule. V signalizacijskih kaskadah pri odgovoru na oksidativni stres in pri rezistenci proti antimikotičnim učinkovinom sodelujejo oksidoreduktaze, glutation-peroksidaze, sfingozin-kinaze, fosfolipid-flipaze, kalcinevrin, (cAMP)-protein-kinazna A (PKA), protein-kinazna C (PKC) in MAP-kinazna signalna pot, idr. Učinkovine, ki bi delovale na posamezne komponente signalizacijskih kaskad in preprečile odgovor na stres oz. razvoj rezistence, so še ena izmed mnogih možnosti pri spopadanju z glivičnimi infekcijami (30).

## 4 Sklep

Kljub širokemu naboru antimikotičnih učinkovin z raznolikimi mehanizmi delovanja njihovo uporabo pogosto omejujejo neželeni učinki ali rezistenca. Za zdravljenje invazivnih glivičnih okužb zato poleg uveljavljenih metod uvajamo tudi številne nove. Med njimi je največ raziskav usmerjenih v izboljšanje imunske odpornosti gostitelja ter v razvoj protiglivnih učinkovin z novimi prijemališči delovanja, ki so izbrana na osnovi strukturnih in biokemičnih razlik med glivnimi in gostiteljevimi celicami. Največjo možnost potencialnih prijemališč predstavljajo komponente glivne celične stene ter encimi, ki sodelujejo v njihovi biosintezi: sintezo melaninov in s tem virulentnost gliv inhibirajo spojine z delovanjem na specifične encime, ki sodelujejo pri njihovi sintezi, medtem ko se pradimicini vežejo na manozide, nikomicini pa na hitin in tako porušijo integriteto celične stene.

Delovanje efungumaba, človeškega rekombinantnega protitelesa, temelji na interakcijah s proteinom toplotnega šoka Hsp90 in posledičnim preprečevanjem odgovora na stres. Sordarini z vezavo na glivni elongacijski faktor 2 preprečijo sintezo glivnih proteinov. Obetavna prijemališča novih protiglivnih učinkovin so tudi signalne molekule, ki sodelujejo pri odgovoru na stres in pri rezistenci. Naštetihi je le nekaj možnosti, ki dokazujejo, da se razvoju novih antimikotičnih učinkovin posveča veliko pozornosti. Nekatere ideje so še v povojih, medtem ko so druge že dale obetavne predklinične rezultate. Vendar pa je pot do novih učinkovin zelo dolga, saj ugodni *in-vitro* učinki ne vodijo vedno tudi do enakih *in-vivo* in kliničnih rezultatov.

## 5 Literatura

- Ching-Cheng L, Che-Kim T, Yu-Tsung H et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections. *J Infect Chemother* 2008; 14: 77-85.
- Nucci M, Perfect JR. When primary antifungal therapy fails. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1426-1433.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Antifungal drugs. In: *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003: 666-671.
- Rogers TR. Antifungal drug resistance: does it matter? *Int J Infect Dis* 2002; 6: S47-S53.
- Hof H. Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 327-334.
- Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135-1144.
- Chapman SW, Sullivan DC, Cleary JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2008; 119: 197-216.
- Matos T. Značilnosti patogenih gliv. In: Gubina M, Ihan A. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002: 457-468.
- Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP et al. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci* 2008; 97 (7): 2405-2425.
- Herbrecht R, Natarajan-Ame S, Nivoix Y, Letscher-Bru V. The lipid formulations of amphotericin B. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4 (8): 1277-1287.
- Balfour JA, Faulds D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs* 1992; 43 (2): 259-284.
- Haria M, Bryson HM. Amorolfine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of onychomycosis and other superficial fungal infections. *Drugs* 1995; 49 (1): 103-120.
- Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindos G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* 2006; 19 (2): 130-139.
- Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46 (2): 171-179.
- Bennett JE. Antifungal agents. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2006: 1225-1240.
- Gupta AK, Tomas E. New antifungal agents. *Dermatol Clin* 2003; 21 (3): 565-576.
- Kauffman CA, Carver PL. Update on echinocandin antifungals. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29 (2): 211-219.
- Develoux M. Griseofulvin. *Ann Dermatol Venereol* 2001; 128 (12): 1317-1325.
- Neely MN, Ghannoum MA. The exciting future of antifungal therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 897-914.
- Hamad M. Antifungal immunotherapy and immunomodulation: a double-hitter approach to deal with invasive fungal infections. *Scand J Immunol* 2008; 67: 533-543.
- Nimrichter L, Rodriguez ML, Rodriguez EG et al. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect* 2005; 7: 789-798.

22. Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J. Encimi vključeni v biosintezo glivnega melanina – potencialne tarče za razvoj novih antimikotikov. *Farm Vestn* 2008; 59 (1): 21-25.
23. Walsh TJ, Giri N. Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16 (1): 93-97.
24. Ruiz-Herrera J, San-Blas G. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr drug Targets Infect Disord* 2003; 3 (1): 77-91.
25. Matthews RC, Burnie JP. Recombinant antibodies: a natural partner in combinatorial antifungal therapy. *Vaccine* 2004; 22: 865-871.
26. Hodgetts S, Nooney L, Al-Akeel R et al. Efungumab and caspofungin: pre-clinical data supporting synergy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61 (5): 1132-1139.
27. Justice M, Hsu MJ, Tse B et al. Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *J Biol Chem* 1998; 273 (6): 3148-3151.
28. Liang H. Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action. *Beilstein J Org Chem* 2008; 4 (31): doi: 10.3762/bjoc.4.31.
29. Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 78: 17-28.
30. Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signalling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* 2008; 7 (5): 747-764.