

Monika Staniszewska<sup>1\*</sup>, Małgorzata Bondaryk<sup>1</sup>, Marzena Kowalska<sup>2</sup>,  
Urszula Magda<sup>2</sup>, Martyna Łuka<sup>3</sup>, Zbigniew Ochal<sup>3</sup>, Wiesław Kurzątkowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samodzielna Pracownia Promieniowców i Grzybów Niedoskonałych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego  
Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa

<sup>2</sup>Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Nowoursynowska 166, 02-787, Warszawa, Polska

<sup>3</sup>Politechnika Warszawska, Plac Politechniki 1, 00-661 Warszawa, Polska

Wpłynęło w lutym 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Epidemiologia kandydoz. 3. Czynniki zjadliwości *Candida albicans*. 3.1. Adhezja. 3.2. Proteazy aspartyłowe. 3.3. Pleomorfizm. 4. Leczenie zakażeń o etiologii *Candida* spp. 5. Nowe trendy w poszukiwaniu antymikotyków. 6. Podsumowanie

#### Pathogenesis and treatment of fungal infections by *Candida* spp.

**Abstract:** *Candida albicans* normally exists as harmless commensal inhabiting mucosal surfaces of healthy individuals. Yet, this opportunistic pathogen in immunocompromised hosts causes superficial or invasive life threatening infections with high mortality rate. The incidence of candidiasis appeared to have several predisposing factors such as immunosuppressant or steroids treatments, long-term catheterization, invasive medical procedures, treatment with broad-spectrum antibiotic, destruction of skin by deep skin burns, local disorders of the gastrointestinal tract, diabetes mellitus, premature very low birth weight infants, immunologically compromised individuals, spread of HIV infection. This serious problem causes a need for better understanding of *C. albicans* virulence and antifungal treatment. This review features characterization of chosen virulence factors i.e.: adhesion, pleomorphism and enzymatic activity. Currently natural antifungal substances as well as synthetic derivatives are used at broad scale in candidiasis treatment. Recently, an increase of resistance to antifungal agents commonly used in fungal infection management has been observed. This world-scale problem generated a need for a search for novel antifungals.

1. Introduction. 2. Epidemiology of candidiasis. 3. Virulence factors of *Candida albicans*. 3.1. Adhesion. 3.2. Secreted aspartyl proteases. 3.3. Pleomorphism. 4. Candidiasis management. 5. New trends in the search for novel antifungal agents. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** antymikotyki, *Candida* spp., czynniki wirulencji, infekcje grzybicze

**Key words:** antimycotics, *Candida* spp., fungal infections, virulence factors

## 1. Wprowadzenie

*Candida albicans* wchodzi w skład mikroflory błon śluzowych przewodu pokarmowego, oddechowego, moczowo-płciowego oraz skóry nie wywołując objawów chorobowych u około 50–70% populacji ludzkiej [54, 78]. U pacjentów z zaburzeniami immunologicznymi ten oportunistyczny patogen powoduje infekcje o charakterze zarówno powierzchniowym jak i układowym [78]. Przyczyną rozwoju zakażeń wywołanych przez *C. albicans* jest: upośledzenie funkcji układu immunologicznego oraz zakłócenie równowagi w składzie mikroflory organizmu ludzkiego [54, 59, 77, 78]. Wśród wielu czynników predysponujących do rozwoju kandydozy należy wymienić: immunosupresję, leczenie steroidami, długotrwałą kaniulację naczyń, inwazyjne procedury medyczne, długotrwałe leczenie antybiotykami o szerokim spektrum przeciwbakteryjnym, uszkodzenie skóry w wyniku oparzeń, zaburzenia funkcji przewodu pokarmowego, cukrzycę, wagę wcześniaków poniżej 2000 g, obniżoną odpor-

ność immunologiczną, zakażenie HIV [78]. Trudności związane z leczeniem pacjentów z zakażeniami o etiologii *C. albicans* zmuszają do dokładniejszego poznania czynników zjadliwości tego mikroorganizmu, interakcji patogen – gospodarz, oraz poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych [77]. Mechanizm rozwoju kandydoz (patogeneza), oprócz układu immunologicznego gospodarza zależy od czynników wirulencji grzyba umożliwiających kolonizację i inwazję tkanek, a także unikanie reakcji immunologicznej gospodarza. Do czynników wirulencji *C. albicans* zalicza się: złożoność budowy ściany komórkowej, adhezję, pleomorfizm, aktywność enzymatyczną, mimikrę molekularną, zmienność fenotypową [44, 54]. Wysoka częstość występowania kandydoz i wysoka śmiertelność u chorych z immunosupresją (30–70%) spowodowały dążenie do opracowania czułych i swoistych metod diagnostycznych i odpowiednich strategii leczenia kandydoz. Diagnostyka zakażeń grzybiczych opiera się na badaniach mikroskopowych, posiewach mikrobiologicznych i identyfikacji wyhodowanych gatunków

\* Autor korespondencyjny: Samodzielna Pracownia Promieniowców i Grzybów Niedoskonałych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel.: +48 22 54 21 228, faks: + 48 22 849 74 84, e-mail: mstaniszewska@pzh.gov.pl

grzybów, badaniach serologicznych (wykrywanie antygenów i przeciwciał) oraz molekularnych [31, 61]. U chorych z upośledzeniem odpowiedzi immunologicznej rozpoznanie zakażeń grzybiczych przysparza wiele trudności [91]. Przebieg kliniczny jest skąpo-objawowy, w fazie początkowej często ograniczony do gorączki, co powoduje trudności w rozpoznaniu zakażenia grzybiczego na podstawie obrazu klinicznego [89]. Utrzymanie się stanu gorączkowego u chorych z neutropenią, długotrwale leczonych antybiotykami, powinno nasuwać podejrzenie zakażenia grzybiczego [8]. W około 10% przypadków zakażenia grzybicze przebiegają bez gorączki, a u około 10% chorych rozwija się wstrząs septyczny [8]. Materiał do badań mikologicznych należy uzyskiwać w zależności od objawów klinicznych i lokalizacji zakażenia. W większości grzybic inwazyjnych należy pobrać do badania krew, płwocinę, mocz, wymazy z odpowiednich okolic ciała, wycinki tkanek, popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe, płyn mózgowo-rdzeniowy lub inny materiał. Próbkę do badań należy kolekcjonować w jałowych warunkach, aby nie dopuścić do przypadkowej kontaminacji materiału, co daje fałszywie dodatnie wyniki. U chorych ze znacznego stopnia małopłytkowością pobranie właściwego materiału do badania często nie jest możliwe [8]. Interpretując wyniki badań mikrobiologicznych, należy skorelować je z obecnością objawów klinicznych. Jednocześnie mimo istniejącego zakażenia grzybiczego z posiewów często nie udaje się uzyskać hodowli grzybów. Szacuje się, że dodatnie posiewy uzyskuje się tylko u 25–50% chorych z potwierdzoną grzybicą [24, 31]. Hodowle badanego materiału na obecność grzybów prowadzi się na specjalnych podłożach do kilku tygodni (w przypadku szczepów *Candida* do 2–4 dni). Identyfikacji grzybów dokonuje się w preparatach mikroskopowych z hodowli oraz przez ocenę ich właściwości biochemicznych. Kolejnym etapem badania jest ocena lekowrażliwości wyhodowanych patogenów przy użyciu komercyjnych testów [8]. Interpretując wyniki badań mikrobiologicznych, należy pamiętać o wszechobecności grzybów w środowisku i możliwości zanieczyszczenia badanego materiału (wyniki fałszywie dodatnie).

Obecność grzyba można również wykazać w badaniu histopatologicznym wycinka tkankowego czy bioptatu. Pozytywny wynik preparatu bezpośredniego z materiału klinicznego jest jedynym pewnym rozpoznaniem grzybicy [91]. Międzynarodowy konsensus dotyczący kryteriów diagnostycznych grzybic u pacjentów z nowotworami i biorców szpiku (opracowany przez członków Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer – EORTC/IFCG i Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases – MSG/NIAID) uwzględnia takie pojęcia jak: „potwierdzone”, „prawdopodobne” oraz „moż-

liwe” inwazyjne zakażenie grzybami [100]. Terminy te podkreślają znaczenie pewności rozpoznania grzybic narządowych, które jest możliwe do ustalenia jedynie po uwzględnieniu czterech kryteriów diagnostycznych, a mianowicie: obecności czynników ryzyka, manifestacji klinicznej zakażenia, wyników badań mikologicznych oraz wyników badań histopatologicznych i/lub cytologicznych. Pacjentami dużego ryzyka są osoby, u których:

- liczba granulocytów jest mniejsza niż 500 neutrofilii/mm<sup>3</sup> krwi, co najmniej od 10 dni niezależnie od czynników ją wywołujących;
- utrzymuje się gorączka powyżej 38°C trwająca dłużej niż 96 godzin pomimo stosowania szeroko-widmowej antybiotykoterapii;
- zastosowano leki immunosupresyjne obecnie lub w ciągu 30 dni poprzedzających;
- wcześniej podejrzewano zakażenia grzybicze (przy poprzednich epizodach neutropenii lub zakażeni HIV);
- stosowano kortykosteroidy dłużej niż 3 tygodnie w okresie poprzednich 60 dni;
- występują objawy choroby „przeszczep przeciwko gospodarzowi”.

Kryteria kliniczne, mikologiczne i histopatologiczne rozpoznania grzybic narządowych obejmują wszystkie objawy i wyniki badań diagnostycznych [100], w tym:

- kliniczne objawy uogólnionego zakażenia, rozsiane zmiany skórne, nacieki zapalne w układzie oddechowym, moczowym, w ośrodkowym układzie nerwowym lub w innych narządach, potwierdzone w badaniach obrazowych (badania komputerowe, zdjęcia radiologiczne lub ultrasonograficzne);
- dodatnie wyniki posiewów z krwi lub wydzielin (płwocina, mocz, kał i inne), wykrycie grzybni w badaniu mikroskopowym pobranego materiału (płwocina, płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz i inne), wykrycie antygenów powierzchniowych grzybów metodą ELISA, lub identyfikacja genotypu znanych gatunków;
- diagnostyka histopatologiczna i cytologiczna oparta potwierdzeniem obecności morfologicznych cech grzybów (komórki, spory lub strzępki) w tkankach lub narządach, pobranych drogą biopsji aspiracyjnej lub biopsji otwartej.

Obecnie medycyna nie dysponuje idealnym antymikotykiem, dlatego też w wielu ośrodkach na świecie prowadzone są intensywne badania dążące do odkrycia skutecznych związków skierowanych przeciw różnorodnym determinantom zjadliwości *Candida*. Celem niniejszej pracy była charakterystyka głównych czynników wirulencji *Candida* spp. i mechanizmów działania leków stosowanych w leczeniu grzybic, jak również przedstawiono nowe kierunki w poszukiwaniu antymikotyków.

## 2. Epidemiologia kandydoz

Najczęstszym czynnikiem etiologicznym kandydoz jest *C. albicans* (50–70% przypadków), w mniejszym zakresie gatunki takie jak *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* i *C. tropicalis*. Kandydozy dzielą się na powierzchniowe i układowe. Powierzchniowe zakażenia dotyczą skóry i paznokci oraz błon śluzowych jamy ustnej i gardła (oropharyngeal candidiasis, OPC), przełyku, jelit, pochwy (vulvovaginal candidiasis, VVC) [4, 67]. Przewlekła powierzchniowa kandydoza skóry i błon śluzowych (*chronic mucocutaneous candidiasis*), paznokci, gardła i przełyku nawraca często bez tendencji do rozwoju rozsianej kandydozy [64]. Przewlekła kandydoza skóry i błon śluzowych (*chronic mucocutaneous candidiasis*) związana jest z występowaniem wielu współistniejących schorzeń tj., zaburzeń hormonalnych, hematologicznych, ale także innych infekcji (grzybiczych, wirusowych i bakteryjnych), nowotworów oraz nieprawidłowości funkcjonowania układu pokarmowego. Przewlekła grzybica skóry dotyczy głównie kobiet z zaburzeniami endokrynologicznymi i zaburzeniami odporności. Na kończynach dolnych i pośladkach stwierdza się wówczas sinoczerwone ogniska z otrębiastym złuszczeniem. Dotychczas wiele kwestii pozostaje niewyjaśnionych w kontekście tej choroby. Wiadomo, że na jej rozwój mają wpływ zaburzenia odpowiedzi komórkowej układu immunologicznego. Choroba jest bardzo rzadka i niemal zawsze powodowana przez *C. albicans* z tendencją do postaci rozsianej (wynikającej z zaburzonej odpowiedzi immunologicznej). Przewlekła kandydoza płytki paznokciowej najczęściej dotyczy stóp i może przechodzić w postać rozsianą z tendencją do pojawienia się na dłoniach w wyniku przeniesienia z pierwotnego miejsca zakażenia [62, 64].

*Candida albicans* jest ponad 85% odpowiedzialna za rozwój kandydozy pochwy i sromu u kobiet [29, 36–37]. Zakażenia pochwy dotyczą ok. 75% wszystkich kobiet w okresie ciąży [75]. U około 5–10% kobiet rozwija się nawracająca postać kandydozy pochwy (recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC). Obecnie istnieją dwie teorie na wyjaśnienie nawracającego zapalenia pochwy u kobiet. Jedną z nich jest częste zasiedlanie pochwy przez *C. albicans*, wskutek ponownych zakażeń lub też w wyniku niedoleczenia poprzedniej kandydozy. Reinfekcja dotyczy sytuacji, gdy komórki *Candida*, po całkowitym usunięciu z pochwy są ponownie wprowadzane, na drodze aktu seksualnego lub transmisji z przewodu pokarmowego. Inna teoria głosi, że ponowne wprowadzanie komórek *Candida* do pochwy wiąże się z naturalnym mechanizmem obronnym gospodarza. W rzeczywistości, przeważa pogląd, że *Candida* nigdy nie ulega całkowitemu eliminowaniu z pochwy. Powodem tego może być częstsze używanie środków grzybobójczych niż grzybobój-

czych w leczeniu kandydoz [28]. Choroba najczęściej objawia się białą, serowatą wydzieliną oraz świądem sromu i pochwy. Czynniki predysponującymi do VVC są: cukrzyca, stosowanie antybiotyków, przyjmowanie doustnych środków antykoncepcyjnych, ciąża i terapia hormonalna. Powierzchniowe kandydozy choć występują z dużą częstotliwością, nie są śmiertelne. Kliniczne symptomy VVC występują, gdy liczba komórek przekracza  $10^5$  jednostek tworzących kolonie na mililitr płynów pochwowych (jtk/ml). VVC mogą być klasyfikowane jako sporadyczne oraz nawracające (skomplikowane i nie-). Klasyfikacja ta opiera się na odpowiedzi na leczenie przeciwgrzybiczne. Nieskomplikowane VVC dotyczą infekcji sporadycznych podatnych na wszelkie formy terapii przeciwgrzybiczej. W leczeniu skomplikowanych VVC brane są pod uwagę czynniki wpływające na gospodarza, mikroorganizmy i farmakoterapię. Głównym czynnikiem etiologicznym zapaleń pochwy jest *C. albicans* (w ponad 90%). Inne gatunki *Candida* wywołujące te infekcje to *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* [4, 64, 78].

Do rozwoju systemowej kandydozy dochodzi na drodze inwazji grzyba do krwi i rozsiewu do narządów i tkanek. Układowe kandydozy mają częściej charakter endogenny, gdzie źródłem zakażenia jest własna flora *Candida* spp. [38]. Według danych literaturowych [38, 59], szczepy *Candida* spp. zajmują czwarte miejsce wśród patogenów wywołujących zakażenia u pacjentów przebywających na oddziałach intensywnej terapii. Liczba przypadków kandydemii w Europie (0,5 epizodu na 10.000 pacjento-dni – inaczej osobodni tj., liczba infekcji na 10.000 pacjento-dni, czyli liczba hospitalizowanych chorych pomnożona przez liczbę dni spędzonych w szpitalu) jest znacznie niższa niż w Stanach Zjednoczonych (2 epizody na 10.000 pacjento-dni), ale proporcje te w ostatnich latach ulegają zmianie z powodu wzrostu przypadków kandydemii w Europie [38]. *Candida albicans* jest odpowiedzialna za 59% wszystkich kandydemii występujących u pacjentów w czasie hospitalizacji (w tym za 79,4% kandydemii na oddziałach intensywnej terapii i 37,5% kandydemii u pacjentów hematologicznych) oraz 55% infekcji krwiopochodnych [23, 69]. *Candida albicans* w około 49–55% przypadków jest przyczyną kandydozy inwazyjnej oraz rozsianej zarówno w Stanach Zjednoczonych jak i w Europie [38]. Do czynników sprzyjających rozwojowi rozsianej kandydozy należy zaliczyć: nowotwory (26%), zabiegi chirurgiczne w obrębie jamy brzusznej (14%), cukrzycę (13%) oraz HIV (10%) [38]. Ponadto, przyczyną kandydozy uogólnionej może być rozsiew *Candida* z układu moczowo-płciowego [35].

Pomimo, że *C. albicans* pozostaje nadal główną przyczyną kandydoz, to na przestrzeni ostatnich lat liczba infekcji powodowanych przez inne gatunki znacząco wzrosła. Wśród nich szczególne znaczenie

epidemiologiczne mają *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* oraz *C. tropicalis*. Są one często izolowane z błon śluzowych jamy ustnej, przewodu pokarmowego i moczowo-płciowego wraz z *C. albicans* i mogą wywoływać różnorodne zakażenia – od powierzchniowych schorzeń po ciężkie i zagrażające życiu grzybice układowe [4]. Mimo braku zdolności do produkcji strzępek oraz niskiej produkcji proteinaz *C. glabrata* jest zaraz po *C. albicans* najczęstszą przyczyną kandydoz [4, 59]. Z kolei *C. tropicalis* występuje najczęściej u chorych na białaczkę. W odróżnieniu od dwóch powyższych gatunków *C. parapsilosis* jest uważana za mniej zjadliwy patogen ze względu na słabszą adhezję i penetrację endotelium [14, 25, 93]. Stosunkowo mniejsza zjadliwość *C. parapsilosis* nie wpływa na częstotliwość występowania zakażeń i objawia się lżejszym przebiegiem choroby [16]. Według badań przeprowadzonych przez C l e r i e w' a i wsp. [16] rozwój układowej kandydozy następuje u 9% chorych noworodków z zakażeniem o etiologii *C. parapsilosis*, a w przypadku zakażeń o etiologii *C. albicans* infekcje układowe rozwijają się u 36% chorych w tej grupie wiekowej.

Mimo tego wykazano, że niektóre szczepy *C. parapsilosis* są zdolne do rozwijania strzępek, produkują biofilmy o zwiększonej masie. Biofilm *C. parapsilosis* wykazuje wyraźne nagromadzenie blastospor zorganizowanych w nieregularne skupiska oraz otoczony jest mniejszą ilością macierzy zewnątrzkomórkowej (łatwiejszy do eradykacji za pomocą konwencjonalnej terapii przeciwgrzybiczej), w porównaniu do biofilmu *C. albicans*, stanowiącego barierę dla przenikania związków przeciwgrzybiczych [51]. *Candida parapsilosis* wywołuje kandydozy towarzyszące długotrwałemu cewnikowaniu lub stosowaniu urządzeń protetycznych [12].

### 3. Czynniki zjadliwości *Candida albicans*

#### 3.1. Adhezja

Adhezja *Candida* spp. do komórek gospodarza stanowi etap poprzedzający kolonizację, penetrację tkanek oraz tworzenie biofilmu. Zjawisko adhezji polega na interakcji ligand-receptor [44, 57]. Przypuszcza się, że napięcie powierzchniowe, oddziaływanie elektrostatyczne, siły van der Waalsa oraz wiązania kowalencyjne i wodorowe mogą odgrywać rolę w początkowym etapie adhezji [44]. Adhezja *C. albicans* pod względem chemicznym ma charakter oddziaływań białko–białko lub białko–cukier, chociaż dopuszcza się możliwość istnienia również innych rodzajów wiązań [57].

Czynnikiem biorącym udział w adhezji są biocząsteczki nazywane adhezynami, które stymulują przyleganie *Candida* spp. do komórek gospodarza. Choć adhezyny klasyfikuje się jako polisacharydy, glikopro-

teiny i lipidy [44, 50], to wszystkie posiadają wspólne cechy, takie jak: występowanie białkowego peptydu sygnałowego na N-końcu oraz C-terminalnego miejsca, wiążącego w błonie moduł GPI (glikozylofosfatydilinozytolowy) [50]. Wiązanie ligandu odbywa się przez koniec aminowy-adhezyjny, ponieważ u większości adhezyn w odcinku C-końcowym zachodzi proces glikozylacji, który poszerza strukturę cząsteczki białka [12, 50]. Nie podlegający glikozylacji odcinek N-końcowy białka wystaje do środowiska zewnątrzkomórkowego (kontaktuje się z powierzchnią komórki gospodarza) [12, 50]. Dotąd zidentyfikowano kilka genów kodujących adhezyny, wśród których najlepiej opisano *HWPI* oraz rodzinę genów *ALS* [44]. *Hwp1p* służy jako substrat dla transglutaminazy w trakcie zakotwiczenia komórek *C. albicans* do nabłonka gospodarza. Mutanty pozbawione *HWPI* charakteryzują się obniżoną zjadliwością, gdyż nie są zdolne trwale przylegać do komórek nabłonkowych [34, 74]. Do rodziny *ALS* należy osiem genów (*ALS1-ALS7* oraz *ALS9*), wśród których do najlepiej opisanych należy *ALS3* [47]. Ekspresja *ALS3* zachodzi podczas morfogenezy i jest regulowana na poziomie transkrypcyjnym, a mutanty charakteryzują się zmniejszoną adhezynnością [2, 47]. Badania [34, 57] wykazały, że na zjawisko adhezji mają wpływ liczne czynniki środowiskowe takie jak temperatura, pH, stężenie cukrów, rodzaj komórek gospodarza. Wymienione elementy oddziałują na przebieg reakcji adhezyna – receptor, indukują morfogenezę, a także ekspresję białek fazowo-specyficznych [57]. Najnowsze doniesienia wskazują, że ładunek powierzchniowy oraz hydrofobowość komórek grzyba zwiększa adhezynność [22]. Niektóre gatunki *Candida* spp. wchodzi w interakcje z bakteriami bytującymi w jamie ustnej takimi jak: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., oraz *Fusobacterium* spp., tworząc wielogatunkowy biofilm. Międzygatunkowe interakcje ułatwiają *Candida* spp. bytowanie w zróżnicowanej mikroflorze jamy ustnej [53]. Ostatnie badania przeprowadzone przez L i n i w' a i wsp. [45] dowodzą, że dwugatunkowy biofilm *C. albicans* i *S. aureus* tworzący się na powierzchni wyrobów medycznych może być źródłem zakażenia i prowadzić do rozwoju rozsianej kandydozy. Nieszkodliwa kolonizacja jamy ustnej przez *Candida* dotyka większej części populacji, jednak istnieją czynniki, które sprzyjają chorobowemu namnażaniu się grzybów. Należą do nich cukrzyca (jak we wszystkich odmianach kandydozy), a także palenie papierosów czy noszenie protez zębowych jako czynniki oddziałujące w miejscu zakażenia [21, 27, 75].

#### 3.2. Proteazy aspartylowe

*Candida albicans* wytwarza szeroką gamę enzymów hydrolitycznych, wśród których lipazy, fosfolipazy oraz proteazy aspartylowe (*Sap*) odgrywają rolę w patogene-

zie [4, 54, 79, 82, 83, 84]. Enzymy te ułatwiają adhezję i kolonizację błon śluzowych, a także umożliwiają penetrację tkanek oraz trawienie komórek odpornościowych i przeciwciał [54, 82]. Wśród nich, na szczególną uwagę zasługują proteazy aspartylowe, gdyż ekspresja Sap wiąże się z tworzeniem strzępek prawdziwych, adhezją oraz zmiennością fenotypową [82]. Izoenzymy Sap są kodowane przez rodzinę dziesięciu genów (*SAP1-10*) [54]. Poszczególne izoenzymy różnią się budową i ładunkiem elektrostatycznym, optimum pH oraz preferencjami substratowymi [54, 79, 82, 83]. Podobnie jak inne proteazy, Sap katalizują hydrolizę wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami hydrofobowymi, jednak mogą również hydrolizować wiązania z resztami polarnymi, takimi jak histydyna czy lizyna [54]. Do substratów izoenzymów Sap należą między innymi: kolagen, kreatyna, mucyna, fibronektyna, hemoglobina, albumina, immunoglobulina A, laktoferyna i laktopeoksydaza czy  $\alpha$ -makroglobulina. Ze względu na specyficzność substratową izoenzymy Sap zostały podzielone na trzy grupy: (I) Sap7 i Sap10; (II) Sap4-6; (III) Sap1-3, Sap8, Sap9. Przy czym, w odróżnieniu od pozostałych izoenzymów Sap7 i Sap10 wykazują wysoką specyficzność substratową [5].

W literaturze jest wiele doniesień świadczących o hydrolitycznej roli Sap w patogenezie zakażeń o etiologii *C. albicans*, co wyjaśniono poniżej [54–55, 68, 79, 84]. Przy czym, funkcja poszczególnych enzymów zależy od etapu i rodzaju infekcji. Ekspresja genów *SAP1-3* zachodzi głównie w blastokonidiach, a kodowane przez nie izoenzymy Sap1-3 biorą udział w zakażeniach powierzchniowych (kandydoza jamy ustnej oraz pochwy) [54, 79]. Natomiast ekspresja *SAP4-6* jest ściśle związana z wytwarzaniem strzępek prawdziwych. Izoenzymy Sap4-6 odgrywają rolę w rozwoju infekcji systemowych oraz biorą udział w unikaniu odpowiedzi immunologicznej [79, 82, 83]. Jak dotąd w literaturze wciąż brakuje wystarczających danych dotyczących roli Sap7 oraz Sap8 w patogenezie *C. albicans*. Według doniesień T a y l o r a i wsp. [90] indukcję Sap7 obserwowano podczas kandydemii w modelu mysim. Natomiast nie obserwowano indukcji Sap7 podczas kandydozy pochwy stosując ten sam model badawczy [90]. Z kolei, Sap8 odgrywa rolę w tworzeniu biofilmów [63]. Ponadto, nasze badania własne [88] wskazują na rolę *SAP7* i *SAP8* w zakażeniach krwi. Dowiedliśmy również zależności pomiędzy procesem morfogenezy (tworzeniem strzępek prawdziwych) i ekspresją genu *SAP9* w surowicy ludzkiej [88].

W odróżnieniu od pozostałych izoenzymów, Sap9 i Sap10 są zakotwiczone w błonie lub ścianie komórkowej grzyba za pomocą glikozylofosfatydylinozytowego (GPI) ogonka [3]. Izoenzymy Sap9-10 są związane z zachowaniem integralności błony i ściany komórkowej, adhezją i podziałami komórkowymi [3, 82].

Geny kodujące Sap zidentyfikowano u innych gatunków z rodzaju *Candida*. Jedynie w przypadku *C. parapsilosis* produkcja Sap wiązała się z wirulencją tego mikroorganizmu. W komórkach *C. tropicalis* wykazano obecność czterech izoenzymów Sap (Sap1-4), spośród nich najwyższy poziom ekspresji w warunkach *in vitro* wykazywał gen *SAP1* (nie odgrywa znaczącej roli w wirulencji *C. tropicalis*). Dowiedziono [95–97], że poziom transkrypcji trzech pozostałych genów (*SAP2-4*) jest wykrywalny tylko za pomocą czulej reakcji RT-PCR. *Candida dubliniensis* uważana za gatunek najbardziej podobny do *C. albicans* pod względem adhezji oraz aktywności enzymatycznej, posiada siedem proteaz aspartylowych Sap1-7 [32], które umożliwiają hydrolizę i penetrację tkanek gospodarza.

### 3.3. Pleomorfizm

Kolejną cechą zjadliwości *C. albicans* jest zdolność do tworzenia czterech form morfologicznych: blastokonidiów, form *germ tube*, pseudostrzępek oraz strzępek prawdziwych. Zjawisko to określane jest jako pleomorfizm [76, 78, 81, 87]. Wśród *Candida* spp. jedynie *C. albicans* oraz *C. dubliniensis* są zdolne do wytworzenia strzępek prawdziwych [44]. Pleomorfizm jest uważany za kluczowy czynnik zjadliwości *C. albicans* od kiedy wykazano, że mutanty pozbawione regulatorów morfogenezy zdolne do wzrostu jedynie w formie blastokonidialnej ( $\Delta$ *cph1*/ $\Delta$ *efg1*) lub wyłącznie w formie micelialnej ( $\Delta$ *tup1*) tracą właściwości chorobotwórcze [48]. Każdy z czterech morfotypów pełni inną rolę w procesie patogenezy. Blastokonidia pozwalają na kolonizację tkanek gospodarza i są związane z wczesną fazą zakażenia. Wczesnemu obrzękowi towarzyszy wzrost ekspresji genów *SAP1* i *SAP2* [68, 72, 81]. Natomiast wydłużające się strzępki prawdziwe wywierają ciśnienie na tkanki gospodarza, co w połączeniu z sekrecją enzymów hydrolitycznych (Sap4-6), umożliwia aktywną penetrację w głąb tkanek gospodarza [68, 92]. Przejście z jednej formy morfologicznej do drugiej jest regulowane przez kompleksowy program transkrypcyjny. Moduluje on morfologię i ekspresję wielu genów, związanych ze wzrostem w formie strzępek, kodujących białka powierzchniowe (*ALS3*, *HWPI*), proteazy (*SAP4-6*) lub enzymy detoksykacji takie jak dysmutaza ponadtlenkowa [34, 44, 54, 80]. Poszczególne morfotypy różnią się strukturą ściany komórkowej. Najnowsze badania wykazały, że zawartość węglowodanów w ścianie komórkowej grzyba zależy od morfogenezy, czynników środowiskowych oraz specyficzności szczepowej. W komórkach strzępek stwierdzono kilkakrotnie wyższą zawartość mannozy niż w komórkach drożdżakowych [85–86]. Liczni autorzy [48, 79, 87] wykazali wpływ czynników środowiskowych

na indukcję strzępek, takich jak: temperatura powyżej 35°C, pH powyżej 6.5, niskie stężenie tlenu oraz standardowe podłoża wzrostowe dla drożdży (YEPD, Sabouraud [71]) z dodatkiem proliny, alkoholu oraz surowicy. W ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań stały się czynniki transkrypcyjne, regulujące morfogenezę, Efg1, Cph1, Tup1 [11, 46, 48]. Pozytywną regulację morfogenezy zapewniają m.in. Efg1 i Cph1, które promują morfologię strzępkową. Za negatywną regulację odpowiada ekspresja genów kodujących regulatory tłumiące filamentację, tj. Tup1, Hsl1 i Hsl7. Wyciszenie genów kodujących regulatory morfogenezy w różnym stopniu zaburza zdolność *C. albicans* do filamentacji. Mutanty *C. albicans* pozbawione genu *CPH1* są zdolne do tworzenia strzępek prawdziwych w odpowiedzi na surowicę (jeden z czynników indukujących morfogenezę). Jednak strzępki mutantu  $\Delta cph1$  są krótsze w porównaniu do strzępek szczepu dzikiego, a sam proces zachodzi z mniejszą efektywnością [87]. Efg1 jest kluczowym regulatorem morfogenezy w surowicy ludzkiej. Wykazano, że mutanty *C. albicans* pozbawione genu *EFG1* są silnie upośledzone pod kątem morfogenezy [48, 87]. Natomiast delecja zarówno *EFG1* jak i *CPH1* uniemożliwia tworzenie strzępek prawdziwych pod wpływem surowicy, a mutanty są zdolne jedynie do tworzenia pseudostrzępek [48, 87]. Z kolei utrata Tup1 powoduje uwięzienie komórek w formie strzępek [11, 99]. Wykazano również, że utrata innych negatywnych regulatorów morfogenezy (białek Hsl1 i Hsl7) prowadzi do hiperfilamentacji [30].

#### 4. Leczenie zakażeń o etiologii *Candida* spp.

Grzyby z rodzaju *Candida* są wiodącymi czynnikami etiologicznymi oportunistycznych infekcji u chorych z zaburzeniami odporności. Mimo to liczba skutecznych antymikotyków dostępnych w lecznictwie jest wciąż ograniczona [13, 54]. Wśród powszechnie stosowanych antymikotyków można wyróżnić następujące klasy: polieny, alliloaminy, fluorowe pochodne pirymidyny, echinokandyny oraz azole [13, 15]. Mechanizmy działania antymikotyków, wskazania oraz przeciwwskazania przedstawiono w Tabeli I. Polieny należą do najstarszej grupy leków przeciwgrzybiczych, są to naturalne związki produkowane przez *Streptomyces* spp. na drodze fermentacji. Należące do polienów nystatyna, natamycyna oraz amfoterycyna B (AMB) są powszechnie stosowane w leczeniu grzybic [9]. Polieny wykazują toksyczne działanie względem komórek gospodarza, ponieważ wiążą się ze sterolami błon komórkowych ssaków [13]. Amfoterycyna B (dezoksyholan) jest najczęściej stosowanym polieniem w leczeniu kandydoz [4, 13]. Czynnikiem ograniczającym użycie AMB jest oporność wśród szczepów z gatunku *C. lusitanae*

i *C. guilliermondi*. Oporność tych gatunków zależy od zmian w składzie lipidów błony komórkowej (zmniejszonej lub zwiększonej zawartości ergosterolu) [9, 15, 17]. Pomimo znacznego postępu w poszukiwaniu coraz to nowych leków przeciwgrzybiczych, AMB pozostaje lekiem z wyboru w kandydozach układowych i innych zakażeń grzybiczych, ze względu na szerokie spektrum przeciwgrzybicze (obejmujące *Candida* spp., *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucor* spp., *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliense*, *Penicillium marneffe*) [49]. Mimo szerokiego spektrum działania, AMB charakteryzuje się wysokim stopniem rozprzestrzeniania w tkankach, długim okresem półtrwania oraz znaczącą toksycznością [9]. Mechanizm toksycznego działania amfoterycyny B nie został dokładnie poznany, uważa się że polega on na aktywacji cytokin wraz z sekrecjonowaniem TNF $\alpha$  przez pobudzone makrofagi [6]. Pojawiające się nowe alternatywne formy AMB mają na celu polepszenie jej właściwości farmakologicznych i obniżenie cytotoxyczności. Obecnie prowadzone są badania nad zastosowaniem nano-cząstek jako nośników AMB, rozpoznawanych przez układ immunologiczny jako obce, fagocytowane przez makrofagi i uwalniane stopniowo, co zmniejsza niepożądane działanie toksyczne [52].

Azole (mniej toksyczne od AMB), szybko stały się lekami powszechnie używanymi w zwalczaniu grzybic powierzchniowych i układowych. Azole wykazują działanie grzybobójcze w stosunku do *Aspergillus* spp. oraz grzybobójcze w stosunku do *Candida* spp. [66]. Do najskuteczniejszych azoli, stosowanych w leczeniu inwazyjnych grzybic należą: flukonazol (FLC), itraconazol (ITR), posakonazol (POS) oraz vorikonazol (VTR) [24]. Azole są zwykle lekami pierwszego wyboru w profilaktyce i leczeniu grzybic. Jednak ich grzybobójcze działanie przeciw *Candida* spp. przyczyniło się do selekcji w kierunku szczepów opornych na azole [66]. Oporność *Candida* spp. na azole może wynikać z mutacji punktowych w genie kodującym demetylazę lanosterolu (*ERG11*), nadmierną ekspresję *ERG11*, zmniejszone pobieranie azoli ze środowiska, wyrzut azoli z komórki grzyba za pomocą pomp białkowych, mutacje w genie *ERG3* (kodującego dysmutazę) umożliwiające tolerancję zmetylowanych steroli, tworzenie biofilmu, pobieranie cholesterolu gospodarza w warunkach niedoboru lub braku ergosterolu [9].

Kolejną grupę antymikotyków stanowią alliloaminy. Należąca do tej grupy leków terbinafina jest używana głównie w przypadku grzybic powierzchniowych [4]. Do efektów ubocznych stosowania alliloamin należy swędzenie, pieczenie oraz zaczerwienienia, występujące zaledwie u 2–3% pacjentów [9]. Z kolei do echinokandyn zalicza się syntetyczne pochodne naturalnych lipopeptydów produkowanych przez *Aspergillus*

Tabela I  
Leczenie zakażeń o etiologii *Candida* spp. Mechanizmy działania leków, wskazania oraz przeciwwskazania\*

Antymikotyki	Mechanizm działania	Wskazania	Przeciwwskazania**
<b>Polieny</b>			
<b>Amfoterycyna B (AMB)</b>	Wiązanie ergosterolu zawartego w błonie komórkowej <i>Candida</i> spp. Zaburzenie integralności błony komórkowej, zwiększenia jej przepuszczalności dla jonów potasu i aminocukrów, co prowadzi do śmierci komórki grzyba	1) gorączka neutropeniczna 2) inwazyjna kandydoza 3) inne grzybice układowe	1) niewydolność nerek 2) ciężkie uszkodzenia wątroby 3) hypokalcemia 4) nerkowa kwasica cewkowa (RTA) 5) zaburzenie funkcji nerek w połączeniu z hipokalemią
<b>Nystatyna</b>		1) leczenie miejscowe grzybic skóry 2) grzybice pochwy 3) grzybice błony śluzowej przewodu pokarmowego	Brak przeciwwskazań
<b>Natamycyna</b>		1) miejscowe leczenie kandydoz pochwy 2) miejscowe leczenie grzybic wywołanych przez grzyby filamentujące	Brak przeciwwskazań
<b>Alliloaminy</b>			
<b>Terbinafina</b>	Zaburzenie syntezy ergosterolu przez hamowanie epoksydazy skwalenowej. Kumulacja skwalenu w komórce grzyba zwiększa przepuszczalność błony komórkowej i prowadzi do śmierci grzyba	1) grzybice skóry, paznokci i włosów 2) w terapii skojarzonej z flukonazolem w leczeniu grzybic jamy ustnej i gardła 3) infekcje o etiologii <i>C. parapsilosis</i> oraz <i>C. albicans</i>	1) podawanie ryfampicyny oraz cyklosporyny
<b>Azole</b>			
<b>Flukonazol (FLC)</b>	Wiążą się z układem cytochromu P-450 hamując hydroksylację i demetylację prekursorów ergosterolu. W wyniku zahamowania demetylasy lanosterolu w miejscu ergosterolu powstają zmetylowane sterole, co w efekcie prowadzi do destabilizacji błony komórkowej <i>Candida</i> spp.	1) kandydoza błon śluzowych 2) kandydoza układu moczowego 3) kandydoza układowa 4) profilaktyka zakażeń grzybiczych u osób z immunosupresją 5) kandydoza o etiologii <i>C. parapsilosis</i>	1) podawanie ryfampicyny, cyklosporyny lub antykoagulantów 2) zaburzenie czynności wątroby
<b>Itrakonazol (ITR)</b>		1) oporność na FLC 2) gorączka neutropeniczna	dysfunkcja komór serca
<b>Posakonazol (POS)</b>		1) kandydoza jamy ustnej i gardła 2) profilaktyka chorych poddawanych intensywnej terapii immunosupresyjnej	podawanie fenytoiny, ryfabutyliny, cymetydyny, takrolimusu, astemizolu, pimozydu, chinidyny oraz lowastatyny
<b>Worikonazol (VRC)</b>		1) inwazyjne kandydozy 2) oporność na FLC 3) kandydoza o etiologii <i>C. krusei</i>	podawanie cyklosporyny, metadonu, takrolimusu i warfaryny
<b>Echinokandyny</b>			
<b>Kaspofungina (CAS)</b>	Zaburzenie biosyntezy ściany komórkowej grzyba przez blokadę aktywności syntetazy 1,3-beta-D-glukanu, enzymu odpowiedzialnego za syntezę glukanu	1) kandydozy jamy ustnej i gardła 2) oporność na azole 3) gorączka neutropeniczna	podawanie cyklosporyny, takrolimusu, ryfampicyny, newirapiny i karbamazepiny
<b>mikafungina (MFG)</b>		1) inwazyjna kandydoza 2) oporność na azole 3) kandydoza o etiologii <i>C. parapsilosis</i> 4) kandydoza przełyku 5) profilaktyka chorych po przeszczepie szpiku	Brak przeciwwskazań
<b>Anidulafungina (ANI)</b>		inwazyjna kandydoza	neutropenia
<b>Fluorowane pochodne pirymidyny 5-FC</b>			
<b>Flucytozyna</b>	Inhibicja kwasów nukleinowych grzyba, zaburzenie syntezy białek i śmierć komórki	1) grzybice układowe (w terapii skojarzonej z AMB)	1) okres ciąży i karmienia piersią 2) niewydolność nerek

\* Opracowano na podstawie [4, 8, 9, 13, 15, 20, 24], \*\* Inne niż nadwrażliwość na dany antymikotyki

*rugulovalvus*, *Zalerion arboricola*, *Papularia sphaerosperma* [9]. W leczeniu stosowana jest anidulafungina (ANI), kaspofungina (CAS) i mikafungina (MFG) [4, 13]. Echinokandyny są grzybobójcze w stosunku do *C. albicans*, grzybostatyczne w stosunku do *Aspergillus* spp. oraz wykazują wysoką aktywność przeciw *Pneumocystis carinii* [9]. Skutki uboczne przyjmowania echinokandyn występują niezwykle rzadko. Należy do nich ból głowy, wysypka, gorączka, toksyczny wpływ na wątrobę, zapalenie żył, wyrzut histaminy oraz hemoliza [4, 19]. W zwalczaniu grzybic stosuje się również fluorowane pochodne pirymidyny. Flucytozyna (5-fluorocytozyna, 5-FC) jest fluorowaną pochodną cytozyny powszechnie stosowaną w leczeniu kandydoz. Ten inhibitor kwasów nukleinowych charakteryzuje się wąskim spektrum przeciwrzybicznym [9]. W warunkach *in vitro* oporność na flucytozynę zaobserwowano u 3–10% izolatów *C. albicans*. Natomiast w trakcie terapii flucytozyną około 30% izolatów nabywa oporności na ten antymikotyki [9, 24]. Ze względu na łatwą selekcję szczepów opornych flucytozyna nie jest stosowana w profilaktyce kandydoz. Terapia skojarzona z AMB ma na celu zapobieganie temu zjawisku. W terapii skojarzonej z AMB, flucytozyna znajduje zastosowanie przede wszystkim w zakażeniach układowych z fungemią i zajęciem ośrodkowego układu nerwowego [4, 9, 20].

## 5. Nowe trendy w poszukiwaniu antymikotyków

Wzrastająca oporność wśród *Candida* spp. na dostępne antymikotyki, stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Z najnowszych badań wynika, że spośród szczepów *C. albicans* opornych na FLC, jedynie 28% pozostaje wrażliwych na VRC [60]. Z kolei, choć CAS oraz AMB pozostają skuteczne *in vitro* wobec wszystkich gatunków z rodzaju *Candida*, to prowadzone w ostatnich latach badania wskazują na gatunkowo-specyficzny wzrost oporności na te antymikotyki [43, 58]. Ponadto, ekspozycja *C. albicans* na antymikotyki stymuluje zjadliwość grzyba. W odpowiedzi na stymulant patogen zwiększa swoją zdolność do przeżycia poprzez nadprodukcję enzymów hydrolitycznych oraz podwyższoną adhezję, dodatkowo uszkadzając tkanki gospodarza [56]. Zwiększona ekspresja *SAP* u *C. albicans* pod wpływem leków została opisana dla głównych grup antymikotyków stosowanych w leczeniu grzybic układowych: azoli (FLC) [18, 94], polienów (AMB) [39] oraz echinokandyn (CAS) [65]. Stwarza to potrzebę poszukiwania nowych związków o działaniu antymikotycznym.

Według najnowszych doniesień [73] nowo syntetyzowane związki przeciwrzybiczne ukierunkowane są głównie na czynniki wirulencji *Candida*. Wśród nich na uwagę zasługują oksymy, obejmujące tzw.

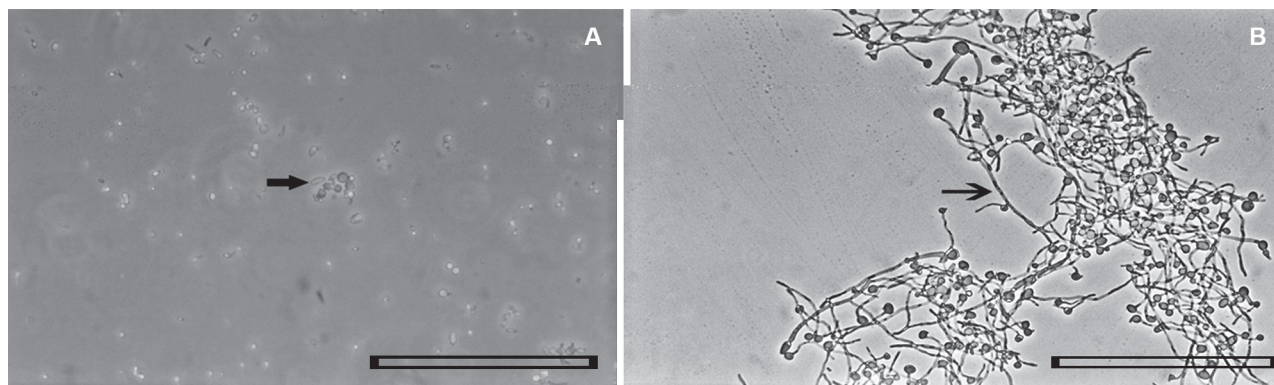
aldoksymy lub ketoksymy w zależności od podstawnika R. Pomimo, że wykazują one wyższe minimalne stężenie hamujące w porównaniu do azoli, to skutecznie hamują produkcję proteazy aspartylowej i fosfolipazy (w ponad 50%). Z kolei estry oksymowe wykazują znacznie niższe wartości w porównaniu do flukonazolu, jednak ich wpływ na czynniki wirulencji *C. albicans* nie został jeszcze poznany [7]. Zatem, oksymy mogą stanowić, dobrą podstawę do rozwoju nowej grupy związków, skutecznych wobec czynników wirulencji *Candida* spp.

Wykazano również, że naturalne bogate w tryptofan peptydy wykazują aktywność przeciw *Candida* spp. [41]. Peptydy liniowe bogate w tryptofan, są to związki chemiczne połączone wiązaniem peptydowym zawierające co najmniej 2 reszty aminokwasowe, składające się z pojedynczego łańcucha peptydowego z podstawnikami zawierające 20–50% tryptofanu. Wśród nich, na szczególną uwagę zasługuje indolicydyna, która jest najmniejszym znanym liniowym bogatym w tryptofan peptydem o działaniu antybakteryjnym oraz antymikotycznym. Ten naturalny 13-amionokwasowy peptyd w 39% składa się z tryptofanu i występuje w neutrofilach bydlęcych. Indolicydyna charakteryzuje się szerokim spektrum działania, wykazuje aktywność przeciw grzybom, pierwotniakom, Gram-pozytywnym oraz Gram-negatywnym bakteriom. Ponadto, wykazuje cytotoksyczność wobec limfocytów T oraz lizuje czerwone krwinki. Grzybobójcze właściwości indolicydyny wynikają z bezpośrednich oddziaływań tego peptydu z warstwami lipidowymi błony komórkowej grzyba, które zaburzają integralność błony komórkowej. Interakcje te są zależne od obecności jonów  $\text{Na}^+$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  w środowisku [26, 42].

Nowych substancji o działaniu antymikotycznym poszukuje się również wśród alkaloidów, ekstraktów z kory, olejków oraz terpenoidów [1]. Ku m a r i wsp. [40] wykazali znaczące aktywności olejku kokosowego, olejku z trawy cytrynowej, olejku migdałowego oraz olejku z goździków przeciw szczepom *Candida* wyizolowanych z krwi. Niskie wartości przeciw *C. albicans* wykazuje również olejek z macierzanki tymianek [1, 33]. Z kolei, naturalny alkaloid tetradryna (TET), wytwarzany przez *Stephania tetrandra* (Menispermaceae), hamuje morfogenezę, ekspresję adhezyn Als3 i Hwp1 oraz działa synergicznie z ketokonazolem wzmacniając jego aktywność [97, 98].

Nasze dotychczasowe badania dowiodły, że pochodne sulfonowe wykazują znaczącą aktywność przeciw-*Candida* (dane niepublikowane). Związki te wykazują aktywność wobec wielu kluczowych czynników wirulencji *C. albicans*. Wśród podstawników halogenowych pierścienia fenyłowego znalazły się: fluor, chlor oraz brom, które jak uprzednio wykazano zwiększają aktywność przeciwrzybiczną pochodnych sulfonowych [10].





Rys. 1. Wpływ pochodnych sulfonowych na morfogenezę *Candida albicans*.

Mikroskop kontrastowo-fazowy (Carl Zeiss Jena, Niemcy). (A) blastokonidia *C. albicans* (strzałka) po 18 godzinowym traktowaniu pochodną sulfonową w stężeniu 16 µg/ml. Zahamowanie procesu morfogenezy w podłożu hodowlanym RPMI. (B) nie traktowane blastokonidia *C. albicans*, po 18 godzinnej inkubacji w podłożu RPMI z dodatkiem rozcieńczalnika DMSO (0,09%), tworzą obfite strzępki prawdziwe (strzałka otwarta). Bar 100 µm.

Dowiedliśmy, że spośród przetestowanych podstawników chlor najefektywniej zwiększała aktywność przeciwgrzybiczną sulfonów. Ustaliliśmy, że mechanizm działania sulfonów polega min. na hamowaniu aktywności czynników transkrypcyjnych *EFG1* oraz *CPH1*, a co za tym idzie, tworzenia inwazyjnych form strzępek prawdziwych – hyphae (Rys. 1). Istota działania tych związków zależy od aromatycznego sześciocłonowego pierścienia połączonego z grupą sulfonową, ponadto dodatkowe modyfikacje pierścienia wpływają na zwiększenie aktywności sulfonów. Niektóre z badanych przez nas związków z grupy sulfonów trihalogenometylofenylowych wykazują znaczącą aktywność przeciwgrzybiczną (MIC < 4 µg/ml) w porównaniu do opisanych w literaturze [70] nowo syntetyzowanych związków posiadających aktywność przeciw *C. albicans*.

## 6. Podsumowanie

Mimo postępów w medycynie, kandydozy wciąż stanowią poważny problem kliniczny o wymiarze światowym. Grzyby z rodzaju *Candida* posiadają szereg czynników zjadliwości pozwalających na kolonizację, penetrację tkanek i rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza. Do głównych czynników wirulencji *Candida* spp. należy adhezja, tworzenie biofilmu, pleomorfizm oraz aktywność enzymatyczna. Konsekwencją nadużywania antymikotyków jest pojawienie się selekcji w kierunku szczepów opornych *C. albicans* oraz zwiększenie częstotliwości występowania kandydoz, których czynnikiem etiologicznym są inne gatunki należące do *Candida* spp. wykazujące wysoką lub całkowitą oporność na stosowane antymikotyki. Stwarza to potrzebę poszukiwania nowych skutecznych, związków chemicznych o szerokim działaniu przeciwgrzybicznym. Właśnie dlatego tak ważne jest dokładne poznanie budowy, chorobotwórczości oraz czynników

zjadliwości *Candida* spp., co pozwoli w przyszłości na znalezienie skutecznych antymikotyków ukierunkowanych na czynniki wirulencji.

## Podziękowania

Praca jest finansowana z funduszu projektu badawczego Nr DEC-2011/03/D/NZ7/06198 uzyskanego w ramach konkursu SONATA Narodowego Centrum Nauki.

## Piśmiennictwo

1. Abad M.J., Ansuategui M., Bermejo P.: Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC*, **7**, 116–147 (2007)
2. Agrimón S., A.J.P. Brown i wsp.: Developmental regulation of an adhesion gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **6**, 682–692 (2007) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
3. Albrecht A., B. Hube i wsp.: Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* **281**, 688–694 (2006) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
4. Anaisie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A.: Clinical mycology. Philadelphia, Churchill Livingstone, New York, 2003
5. Aoki W., Kitahara N., Miura N., Morisaka H., Yamamoto Y., Kuroda K., Ueda M.: Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *J. Biochem.* **150**, 431–438 (2011)
6. Arning M., Kliche K.O., Heer-Sonderhof A.H., Wehmeier A.: Infusion-related toxicity of three different amphotericin B formulations and its relation to cytokine plasma levels. *Mycoses*, **38**, 459–465 (1995)
7. Attia M.I., Zakaria A.S., Almutairi M.S., Ghoneim S.W.: *In vitro* anti-*Candida* activity of certain new 3-(1H-imidazol-1-yl)propan-1-one oxime esters. *Molecules*, **18**, 12208–12221 (2013)
8. Biliński P., Seferyńska I., Warzocha K.: Diagnosis and treatment of fungal infections in oncohematology. *Onkol. Prak. Klin.* **4**, 15–24 (2008)
9. Bondaryk M., Kurzątkowski W., Staniszevska M.: Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Post. Derm. Alergol.* **30**, 293–301 (2013)

10. Borys K.M., Korzyński M.D., Ochal Z.: A simple and efficient synthesis of trihalomethyl and dihalomethyl aryl sulfones. *Tetrahedron. Lett.* **53**, 6606–6610 (2012)
11. Braun B.R., Johnson A.D.: *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, **155**, 57–67 (2000)
12. Calderone R.A.: Taxonomy and biology of *Candida* (w) *Candida* and Candidiasis, red. R.A. Calderone, ASM Press, Waszyngton, 2002, s. 15–17.
13. 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)
14. Chamilos G., Lionakis M.S., Lewis R.E., Lopez-Ribot J.L., Saville S.P., Albert N.D., Halder G., Kontoyiannis D.P.: *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *J. Infect. Dis.* **193**, 1014–1022 (2006)
15. Ciok-Pater E., Bielucha A., Szabelska M., Gospodarek E.: Mechanizmy oporności drożdży na stosowane leki przeciwgrzybicze. *Mikol. Lek.* **15**, 49–53 (2008)
16. Clerihew L., Lamagni T.L., Brocklehurst P., McGuire W.: *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* **92**, F127–F129 (2007)
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing standard M27-A2, 2<sup>nd</sup> ed., red. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2002, s. 1–29.
18. Costa C.R., Jesuino R.S., de Aguiño Lemos J., de Fátima Lisboa Fernandes O., Hasimoto e Souza L.K., Passos X.S., do Rosário Rodrigues Silva M.: Effects of antifungal agents in Sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia*, **169**, 91–98 (2010)
19. Denning D.W.: Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, **362**, 1142–1151 (2003)
20. Dzierżanowska D., Dzierżanowska-Fangrat K.: Przewodnik terapii inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Alfa-medica Press, Bielsko-Biała, 2012
21. Elahi S., Clancy R., Pang G.: A therapeutic vaccine for mucosal candidiasis. *Vaccine*, **19**, 2516–2521 (2001)
22. Emira N., Mejdí S., Dorra K., Amina B., Eulogio V.: Comparison of the adhesion ability of *Candida albicans* strains to biotic and abiotic surfaces. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 977–985 (2011)
23. Enoch D.A., Ludlam H.A., Brown N.: Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* **55**, 809–818 (2006)
24. Espinel-Ingroff A.: Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**, 101–106 (2008)
25. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Anidulafungin: Rationale for the clinical breakpoints, version 2.0, 2013. <http://www.eucast.org>.
26. Falla T.J., Karunaratne D.N., Hancock R.E.W.: Mode of action of the antimicrobial peptide Indolicidin. *J. Biol. Chem.* **271**, 19298–19303 (1996)
27. Farah C, Ashman R.B., Challacombe S.J.: Oral candidosis. *Clin. Dermatol.* **18**, 553–562 (2000)
28. Fidel P.L., Sobel J.D.: Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 335–348 (1996)
29. Fischer G., Brandford J.: Vulvovaginal candidiasis in postmenopausal women: the role of hormone replacement therapy. *J. Low Genit. Tract Dis.* **15**, 263–267 (2011)
30. Franzke S., Calderone R.A., Schaller K.: Isolation of avirulent clones of *Candida albicans* with reduced ability to recognize the CR2 ligand C3d. *Infect. Immun.* **61**, 2662–2669 (1993)
31. Garczewska B., Kamińska W., Dzierżanowska D.: Phenotype and genotype characterization of *Candida albicans* strains isolated from patients hospitalized at the Children's Memorial Health Institute". *Med. Dośw. Mikrobiol.* **60**, 231–241 (2008)
32. Gilfillan G.D., Sullivan D.J., Haynes K., Parkinson T., Coleman D.C., Gow N.A.R.: *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology*, **144**, 829–838 (1998)
33. Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L., Portugal H.: Antifungal effects of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res.* **18**, 990–995 (2004)
34. Hiller E., Zavrel M., Hauser N., Sohn K., Burger-Kentischer A., Lemuth K., Rupp S.: Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host – Focus on the function of cell wall proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 384–389 (2011)
35. Huang Y.C., Li C.C., Lin T.Y., Lien R.I., Chou Y.H., Wu J.L., Hsueh C.: Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**, 819–822 (1998)
36. Jombol G.T.A., Opajobi S.O., Egah D.Z., Banat E.B., Denen Akaa P.: Symptomatic vulvovaginal candidiasis and genital colonization by *Candida* species in Nigeria. *J. Public Health Epidemiol.* **2**, 147–151
37. Kennedy M.A., Sobel J.D.: Vulvovaginal candidiasis caused by non-*albicans* *Candida* species: new insights. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **12**, 465–470 (2010)
38. Kullberg B.J., Filler S.G.: Candidemia. (w) *Candida* and candidiasis, red. R.A. Calderone, ASM Press, Washington, 2002, s. 327–340
39. Kumar R., Shukla P.K.: Amphotericin B resistance Leads to enhanced proteinase activity and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. *Fungal Biol.* **114**, 189–197 (2010)
40. Kumar A., Thakur S., Thakur V.C., Kumar A., Patil S., Vohra M.P.: Antifungal activity of some natural essential oils against *Candida* species isolated from blood stream infection. *JKIMSU*, **1**, 61–66 (2012)
41. Lee D.G., Kim P.I., Park Y., Woo E.R., Choi J.S., Choi C.H., Hahm K.S.: Design of novel peptide analogs with potent fungicidal activity, based on PMAP-23 antimicrobial peptide isolated from porcine myeloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 231–238 (2002)
42. Lee D.G., Kim H.K., Kim S.A., Park Y., Park S.C., Jang S.H., Halm K.S.: Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 305–310 (2003)
43. Li F, Wu L., Cao B., Hang Y., Li X., Liu Y.: Surveillance of the prevalence, antibiotic susceptibility, and genotyping characterization of invasive candidiasis in a teaching hospital in China between 2006 to 2011. *BMC Infect. Dis.* **13**, 353. doi:10.1186/1471-2334-13-353 (2013)
44. Lim C.S.Y., Rosli R., Seow H.F., Chong P.P.: *Candida* and invasive candidiasis: back to basis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 21–31 (2012)
45. Lin Y.J., Alkad L., Vogel F., Koppa S., Nevarez L., Auguste F., Seymour J., Syed A., Christoph K., Loomis J.S.: Interactions between *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* within mixed species biofilms. *BIOS*, **84**, 30–39 (2013)
46. Liu H., Köhler J., Fink G.: Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science*, **266**, 1723–1726 (1994)
47. Liu Y., Filler S.G.: *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot. Cell*, **10**, 168–173 (2011)

48. Lo H.J., Köhler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G.R.: Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, **90**, 939–949 (1997)
49. Miceli M.H., Chandrasekar P.: Safety and efficacy of liposomal amphotericin B for the empirical therapy of invasive fungal infections in immunocompromised patients. *Infect. Drug. Resist.* **5**, 9–16 (2012)
50. Mnichowska M., Giedrys-Kalemba S.: Funkcjonalne, strukturalne i molekularne spojrzenie na adhezję *Candida* spp. *Mikol. Lek.* **11**, 309–316 (2004)
51. Modrzewska B., Kurnatowski P.: Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. *Ann. Parasitol.* **59**, 57–66 (2013)
52. Mora-Duarte J., Betts R., Rotstein C., Colombo A.L., Thompson-Moya L., Smietana J., Lupinacci R., Sable C., Kartsonis N., Pefect J.: Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 2020–2029 (2002)
53. Morales D.K., Hogan D.A.: *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.* **6**, e1000886. doi:10.1371/journal.ppat.1000886 (2010)
54. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B.: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 400–428 (2003)
55. Naglik J.R., B. Hube i wsp.: Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*, **154**, 3266–3280 (2008) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
56. Navarathna D.H.M.L.P., Hornby J.M., Hoerrmann N., Parkhurst A.M., Duhamel G.E., Nickerson K.W.: Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 1156–1159 (2005)
57. Nawrot U., Karpiewska A.: Patogeneza zakażeń wywołanych przez *Candida albicans*. *Mikol. Lek.* **9**, 137–143 (2002)
58. Papon N., Courdavault V., Clastre M., Bennett R.J.: Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog.* **9**, e1003550. doi:10.1371/journal.ppat.1003550 (2013)
59. Pfaller M.A., Diekema D.J.: Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163 (2007)
60. Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., Newell V.A., Ellis D., Tullio V., Rodloff A., Fu W., Ling T.A., the Global Antifungal Surveillance Group: Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1366–1377 (2010)
61. Przyjałkowski W.: Zakażenia grzybicze ośrodkowego układu nerwowego. (w) Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia, red. D. Dzierżanowska, α-medica Press, Bielsko Biala, 2006, s. 154–165
62. Puel A., J.L. Casanova i wsp.: Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*, **332**, 65–68 (2011) (cytowana praca jest dziełem 24 autorów)
63. Ramage G., Coco B., Sherry L., Bagg J., Lappin D.F.: *In vitro* *Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with *in vivo* denture stomatitis severity. *Mycopathol.* **174**, 11–19 (2012)
64. Raška M., Běláková J., Křupka M., Weigl E.: Candidiasis – do we need to fight or to tolerate the *Candida* fungus? *Folia Microbiol.* **52**, 297–312 (2007)
65. Ripeau J.S., Aumont F., Belhumeur P., Ostrosky-Zeichner L., Rex J.H., de Repentigny L.: Effect of the echinocandin caspofungin on expression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3096–3100 (2002)
66. Robbins N., Uppuluri P., Nett J., Rajendran R., Ramage G., Lopez-Ribot J.L., Andes D., Cowen L.E.: Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathog.* **7**, e1002257. doi:10.1371/journal.ppat.1002257 (2011)
67. Ruhnke M.: Skin and mucous membrane infections. (w) *Candida and candidiasis*, red. R.A. Calderone, ASM Press, Washington, 2002, s. 307–325
68. Schaller M., Schackert C., Korting H.C., Januschke E., Hube B.: Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 712–717 (2000)
69. Schelenz S.: Management of candidiasis in the intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, i31–i34 (2008)
70. Sheng C., W. Zhang i wsp.: Design, synthesis and antifungal activity of isosteric analogues of benzoheterocyclic N-myristoyl-transferase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 3531–3540 (2010) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
71. Sherman F.: Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3–41 (2002)
72. Soll D.R.: *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica*, **81**, 101–110 (2002)
73. Souza L.C., Campa A.: Pharmacological parameters of intravenously administered amphotericin B in rats: comparison of the conventional formulation with amphotericin B associated with a triglyceride-rich emulsion. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 77–84 (1999)
74. Staab J.E., Bradway S.D., Fidel P.L., Sundstrom P.: Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*, **283**, 1535–1538 (1999)
75. Staniszevska M.: Search for *Candida albicans* virulence factors. Ph.D. thesis, NIPH-NIH, Warsaw (2009)
76. Staniszevska M., Bondaryk M., Kurzątkowski W.: Morphotypes of *Candida albicans*. Phase-contrast microscopy. *Mikol. Lek.* **18**, 5–10 (2011)
77. Staniszevska M., Rabczenko D., Kurzątkowski W.: Discrimination between the enzymatic activities of *Candida albicans* pleomorphic forms determined using the api<sup>®</sup>Zym test. *Mycoses*, **54**, e744–e750 (2011)
78. Staniszevska M., Bondaryk M., Piłat J., Siennicka K., Madga U., Kurzątkowski W.: Czynniki zjadliwości *Candida albicans*. *Przegl. Epidemiol.* **66**, 629–633 (2012)
79. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Kurek A., Orłowski J., Schaller M., Kurzątkowski W.: *In vitro* study of secreted aspartyl proteinases Sap1 to Sap3 and Sap4 to Sap6 expression in *Candida albicans* pleomorphic forms. *Pol. J. Microbiol.* **61**, 247–256 (2012)
80. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Kurzątkowski W.: Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Pol. J. Microbiol.* **61**, 129–135 (2012)
81. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Kurzątkowski W.: *Candida albicans* morphotypes. Scanning electron microscopy. *Candida albicans* morphologies. *Mikol. Lek.* **19**, 53–56 (2012)
82. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Piłat J., Schaller M., Kurzątkowski W.: Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I. Substrate specificity of aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis. *Post. Mikrobiol.* **51**, 127–135 (2012)
83. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Piłat J., Schaller M., Kurzątkowski W.: Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part II. Expression of SAP1-10 aspartic proteinase during *Candida albicans* infections *in vivo*. *Post. Mikrobiol.* **51**, 137–142 (2012)

84. Staniszevska M., Bondaryk M., Malewski T., Kurzątkowski W.: The *in vitro* expression of *SAP6* gene in *Candida albicans* morphogenesis mutants under human serum influence. *Biologia*, **68**, 803–807 (2013)
85. Staniszevska M., Bondaryk M., Rabczenko D., Smoleńska-Sym G., Kurzątkowski W.: Cell wall carbohydrates content of pathogenic *Candida albicans* strain morphological forms. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **65**, 119–128 (2013)
86. Staniszevska M., Bondaryk M., Rabczenko D., Smoleńska-Sym G., Kurzątkowski W.: The cell wall mannose content of *Candida albicans* morphological forms. *Mikol. Lek.* **20**, 5–8 (2013)
87. Staniszevska M., Bondaryk M., Swoboda-Kopeć E., Sienicka K., Sygitowicz G., Kurzątkowski W.: *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz. J. Microbiol.* **44**, 813–821 (2013)
88. Staniszevska M., Bondaryk M., Malewski T., Kurzątkowski W.: Quantitative expression of *Candida albicans* aspartyl proteinase genes *SAP7*, *SAP8*, *SAP9*, *SAP10* in human serum *in vitro*. *Pol. J. Microbiol.* **63**, 15–20 (2014)
89. Stradomska T.J.: Wykrywanie metabolitów w diagnostyce grzybic układowych. (w) *Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia*, red. D. Dzierżanowski, α-medica press, Bielsko-Biała, 2006, s. 71–78
90. Taylor B.N., Hannemann H., Sehnal M., Bieseimer A., Schweizer A., Rölinghoff M., Schröppel K.: Induction of *SAP7* correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. *Infect. Immun.* **73**, 7061–7063 (2005)
91. Warzocha K., Seferyńska I.: *Zakażenia grzybicze w hematologii*. (w) *Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia*, red. D. Dzierżanowska, α-medica Press, Bielsko Biała, 2006, s. 137–153
92. Wächtler B., Citiulo F., Jablonowski N., Förster S., Dalle F., Schaller M., Wilson D., Hube B.: *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One*, **7**, e36952. doi:10.1371/journal.pone.0036952 (2012)
93. Weems J.J.: *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 756–766 (1992)
94. Wu T., Wright K., Hurst S.F., Morrisom C.J.: Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1200–1208 (2000)
95. Yang Y.L.: Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **36**, 223–228 (2003)
96. Zaugg C., Borg-von Zepelin M., Reichard U., Sanglard D., Monod M.: Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect. Immun.* **69**, 405–412 (2001)
97. Zhang H., Wang K., Zhang G., Ho H.I., Gao A.: Synergic anti-candidal activity of tetrandrine on ketoconazole: an experimental study. *Planta. Med.* **76**, 53 (2010)
98. Zhao L.X., Li D.D., Hu D.D., Hu G.H., Yan L., Wang Y., Jiang Y.Y.: Effect of tetrandrine against *Candida albicans* biofilms. *PLoS ONE*, **8**, e79671. doi:10.1371/journal.pone.0079671 (2013)
99. Zhao R., Lockhart S.R., Daniels K., Soll D.R.: Roles of *TUP1* in switching, phase maintenance, and phase-specific gene expression in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **3**, 353–365 (2002)
100. Zielińska E.: Kontrowersje dotyczące optymalnej profilaktyki i leczenia zakażeń grzybami w stanach obniżonej oporności. *Przegl. Epidemiol.* **57**, 299–307 (2003)