

MECHANIZMY POWSTAWANIA OPORNOŚCI DERMATOFITÓW NA SUBSTANCJE PRZECIWRZYBICZE

Dominik Łagowski, Sebastian Gnat*, Aneta Nowakiewicz

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

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w marcu 2020 r.

Streszczenie: Dermatofity to grzyby chorobotwórcze, które mają wysokie powinowactwo do keratyny obecnej w paznokciach, skórze i włosach, powodujące zakażenia powierzchniowe znane jako grzybice skórne lub dermatomykozy. Rokowania w przebiegu dermatomykozy mogą być różne, a obraz kliniczny choroby w dużym stopniu zależy od statusu immunologicznego gospodarza i może mieć postać od ograniczonych zakażeń skórnych lub podskórnych do infekcji inwazyjnych, rozsianych i zagrażających życiu. W pierwszych dziesięcioleciach XX wieku pojawiły się pierwsze obawy związane z narastającą prevalencją infekcji grzybiczych u ludzi, której powodów upatrywano w różnych czynnikach środowiskowych i rozwoju cywilizacyjnym. W konsekwencji zostały podjęte pierwsze próby terapeutyczne ukierunkowane na leczenie tych infekcji. Obecnie lekarze mają do dyspozycji przynajmniej kilka różnych grup leków przeciwgrzybiczych. Niemniej jednak nakładające się mechanizmy działania tych substancji i przerywanie terapii przez pacjentów mogą być przyczyną pojawiania się szczepów wykazujących oporność, także wielolekową. Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu literatury traktującej o mechanizmach powstawania oporności wobec substancji przeciwgrzybiczych przez dermatofity. W drodze ewolucji grzyby te wytworzyły złożone układy odpowiedzi immunologicznej obejmujące elementy systemu sygnalizacji środowisko-komórka, reakcje na stresory jak i tolerancje na szkodliwe substancje chemiczne. Ekspozycja dermatofitów na lek przeciwgrzybiczy, uszkodzenie ich ściany komórkowej, zaburzenia osmolarności środowiska i pojawienie się w nim reaktywnych form tlenu stanowią bodźce, które mogą być aktywatorami szlaków sygnałowych, mających na celu przeciwdziałanie skutkom nagłego stresu komórkowego. Większość z mechanizmów molekularnych leżących u podstaw odpowiedzi na te stresory stanowi również mechanizm tolerancji i oporności na substancje przeciwgrzybicze. Poznanie tych mechanizmów może w przyszłości doprowadzić do opracowania nowych chemioterapeutyków, które stanowią będą kluczową strategię w leczeniu opornych na obecnie dostępne leki przeciwgrzybicze szczepów dermatofitów.

1. Wprowadzenie. 2. Obecnie stosowane leki przeciwgrzybicze. 3. Ekspozycja patogenu na lek, reakcja na stres i adaptacja. 4. Mechanizmy wyrzutu leku z komórki. 5. Mechanizmy detoksyfikacji leków. 6. Transkrypcyjna modulacja genów szlaków sygnałowych. 7. Rola białek szoku cieplnego w lekooporności. 8. Mutacje w genach docelowych enzymów wpływające na lekooporność. 9. Elementy strukturalne komórki wpływające na lekooporność. 10. Podsumowanie

MECHANISMS OF DERMATOPHYTE RESISTANCE TO ANTIFUNGAL SUBSTANCES

Abstract: Dermatophytes are pathogenic fungi with high affinity for keratinised structures present in nails, skin, and hair causing superficial infections known as skin mycoses or dermatomycoses. The disease is characterised by variable prognosis. Its clinical picture is largely dependent on the immune status of the host and can range from local skin or subcutaneous infections to invasive, disseminated, and life-threatening infections. In the first decades of the 20th century, the first concerns were raised about the growing prevalence of fungal infections in humans, which was ascribed to various environmental factors and anthropopressure. Consequently, the first therapeutic attempts were made to treat these infections. At present, at least several different groups of antifungal drugs are available for medical treatment. Nevertheless, the overlapping mechanisms of action of these substances and discontinuation of therapy by patients may contribute to the emergence of resistance of strains, including multi-drug resistance. The aim of this study is to review the literature focused on the mechanisms of resistance developed by dermatophytes to antifungal substances. Through evolution, these fungi have developed complex cellular response systems comprising elements of the environment-cell signalling system, responses to stressors, and tolerance to harmful chemical substances. Such stimuli as exposure of dermatophytes to an antifungal drug, damage to their cell wall, and disturbances in the osmolality of the environment with generation of reactive oxygen species can be activators of signalling pathways targeted at mitigation of the effects of sudden cellular stress. A majority of molecular mechanisms underlying the response to these stressors also constitute a mechanism of tolerance and resistance to antifungal substances. In the future, elucidation of these mechanisms may lead to development of new chemotherapeutics that will become a key strategy in the treatment of dermatophyte strains exhibiting resistance to currently available antifungal drugs.

1. Introduction. 2. Current antifungal drugs. 3. Exposure of the pathogen to drugs, stress response, and adaptation. 4. Mechanisms of drug efflux from the cell. 5. Mechanisms of drug detoxification. 6. Transcriptional modulation of signalling pathway genes. 7. Role of heat shock proteins in drug resistance. 8. Mutations in target enzyme genes inducing drug resistance. 9. Structural elements of the cell contributing to drug resistance. 10. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, substancje przeciwgrzybicze, lekooporność

Key words: dermatophytes, antifungal substances, drug resistance

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

1. Wprowadzenie

Dermatofity to grupa blisko spokrewnionych gatunków grzybów z rodziny *Arthrodermataceae*, które mają zdolność inwazji zrogowaciałych struktur u ludzi i zwierząt oraz wywoływania infekcji powierzchniowych. Dermatofity są grzybami chorobotwórczymi, które czerpią substancje odżywcze z keratyny znajdującej się w wytworach naskórka [34]. Wydzielają one szerokie i zróżnicowane spektrum enzymów litycznych, takich jak lipazy i proteazy, a zwłaszcza keratynazy, które umożliwiają im kolonizację i utrzymanie się w *stratum corneum* gospodarza [63, 72]. Dermatofitozy dotyczą każdego roku miliony ludzi i zwierząt [35]. Chociaż ten stan chorobowy nie jest uważany za zagrażający życiu, obniża jego jakość i nakłada na pacjentów oraz hodowców znaczne koszty leczenia. Status immunologiczny gospodarza stanowi główny czynnik predylekcyjny przebiegu infekcji dermatofitowych i pozwala określić czy choroba będzie ograniczona wyłącznie do zmian powierzchniowych, czy ewentualnie istnieje możliwość przyjęcia formy rozsianej bądź głębokiej [50]. W zdecydowanej większości przypadków infekcje te dotyczą jednak zarówno pacjentów z prawidłową, jak i z obniżoną odpornością [52]. Grzyby z rodzaju *Candida* i *Malassezia*, oprócz dermatofitów, mogą być również czynnikami etiologicznymi infekcji powierzchniowych [41].

Do dyspozycji dermatologów i lekarzy weterynarii znajduje się szeroki wachlarz dostępnych leków przeciwgrzybiczych. Podczas gdy stosowanie miejscowego środka przeciwgrzybiczego jest zwykle wystarczające do wyeliminowania dermatofitu i wyleczenia większości przypadków infekcji o charakterze antropofilnym, znacznych trudności nastroją dermatofitozy zoofilne u ludzi, szczególnie *tinea capitis* i *tinea unguium*, często wymagające wprowadzenia leczenia ogólnoustrojowego [65]. Z kolei dermatofitozy u zwierząt, zwłaszcza hodowlanych, bywają lekceważone przez hodowców, a nieleczone stanowią źródło patogenów mogących ulegać transmisjom międzyosobniczym [51, 52]. Ważną cechą substancji stosowanych w leczeniu grzybic powierzchniowych jest możliwość łatwej penetracji przez te leki do *stratum corneum* i utrzymywanie się w nim w stałym stężeniu przez cały okres trwania terapii [49].

Celem niniejszej pracy jest przegląd literatury naukowej traktującej o różnych mechanizmach powstawania oporności na poziomie molekularnym i fenotypowym wobec substancji przeciwgrzybiczych przez dermatofity.

2. Obecnie stosowane leki przeciwgrzybicze

Pomimo dostępności przynajmniej kilku grup leków przeciwgrzybiczych przeznaczonych do użytku klinicznego, działają one na ograniczoną liczbę celów komór-

kowych, tj. blokują syntezę błony komórkowej, ściany komórkowej, kwasów nukleinowych i proces podziału komórek (Tabela I). Lekarze mają obecnie do dyspozycji w szczególności cztery klasy leków przeciwgrzybiczych: (1) imidazole i triazole (ketokonazol, klotrimazol, flukonazol, itraconazol, worykonazol, pozakonazol, izawukonazol), które hamują enzymatyczną 14- α -demetylazę sterolu i zatrzymują biosyntezę ergosterolu; (2) leki polienowe (amfoterycyna B, nystatyna, natamycyna), które wiążą się z ergosterolem, doprowadzając do wzrostu przepuszczalności błony komórkowej; (3) echinokandyny (kaspofungina, mikafungina, anidulafungina), które hamują biosyntezę β -(1-3)-D-glukanu, jednego z głównych składników ściany komórkowej grzybów; i (4) pochodne allyloaminy (terbinafina, naftifina), których mechanizm działania polega na hamowaniu w błonie komórkowej grzyba syntezy ergosterolu na etapie epoksydacji skwalenu [57]. Rzadziej stosowanymi lekami są: (1) gryzeofulwina, która zaburza syntezę chityny i zakłóca tworzenie mikrotubul, upośledzając wzrost grzybów i podział komórek; (2) pirymidynowy analog 5-fluorocytozyny, hamujący syntezę DNA i RNA, co prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych i defektów syntezy białek; (3) oleamina cyklopiroksowa, działająca, jako inhibitor syntezy białek i zwiększająca przepuszczalność błony komórkowej dla aminokwasów, peptydów i potasu w efekcie nieodwracalnego wiązania z różnymi strukturami i organellami komórki [57]. Niestety, w wielu przypadkach środki te mają właściwości toksyczne dla ludzi, wykazują duże interakcje lekowe i/lub nie są wystarczająco aktywne w zwalczaniu infekcji, ponieważ grzyby stały się na nie odporne.

Nakładające się mechanizmy działania powszechnie stosowanych substancji przeciwgrzybiczych mogą przyczyniać się do pojawiania się szczepów wykazujących oporność wielolekową (multidrug resistance, MDR). Co więcej, pacjenci często zaniedbują leczenie bądź rezygnują z niego ze względu na konieczność długotrwałego stosowania i związane z tym działania niepożądane [60, 72], a to z kolei również może skutkować powstawaniem szczepów opornych. Z kolei oporność kliniczna i/lub mikrobiologiczna może spowodować niepowodzenie leczenia, skutkujące przewlekłością choroby bądź jej nawrotami. Dotychczas opisano przynajmniej kilka różnych mechanizmów powstawania oporności lekowej u dermatofitów (Rycina 1).

3. Ekspozycja patogenu na lek, reakcja na stres i adaptacja

Odpowiednia reakcja na lek przeciwgrzybiczy i stres komórkowy nim wywołany są mechanizmem umożliwiającym przetrwanie dermatofitów [13]. W drodze ewolucji grzyby te wytworzyły złożone układy odpo-

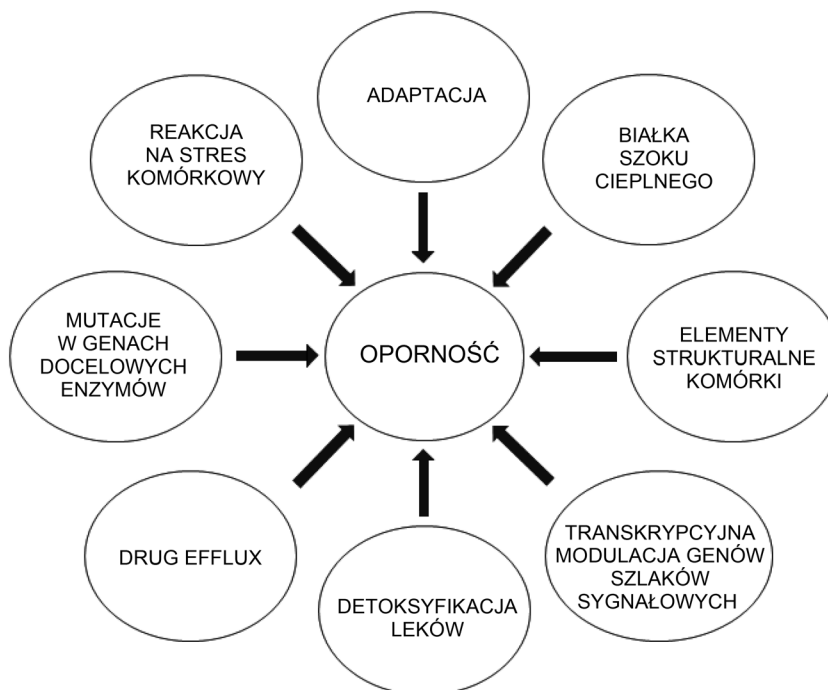
Tabela I
Popularnie stosowane leki przeciwgrzybicze i mechanizmy ich działania

Grupa substancji	Przedstawiciele	Mechanizm działania
Azole	Flukonazol, Ketokonazol, Itrakonazol, Worikonazol, Posakonazol, Isawukonazol, Klotrimazol, Mikonazol, Ekonazol, Lulikonazol, Lanokonazol, Efinakonzol, Sertakonazol, Oxi-konazol, Eberkonazol, Fentikonazol, Bifonazol	Wiązanie z układem cytochromu P-450, co prowadzi do hamowania hydroksylacji i demetylacji prekursorów ergosterolu. W wyniku zahamowania demetylasy lanosterolu w miejscu ergosterolu podstawiane są zmetylowane sterole
Echinokandyny	Anidulafungina, Kaspofungina, Mikafungina	Zaburzenie biosyntezy ściany komórkowej grzyba przez blokadę aktywności syntetazy 1,3-β-D-glukanu, enzymu odpowiedzialnego za syntezę glukanu
Polieny	Nystatyna, Natamycyna, Amfoterycyna B	Wiązanie ergosterolu zawartego w błonie komórkowej; zaburzenie integralności błony komórkowej, zwiększenie jej przepuszczalności dla jonów potasu i aminocukrów
Fluorowane pochodne pirymidyny	Flucytozyna	Po konwersji do czynnych metabolitów, zahamowanie syntezy kwasów nukleinowych poprzez inhibicję syntetazy tymidylanowej i/lub włączanie się do grzybowego RNA zamiast kwasu urydylowego
Pochodne heterocykliczne benzofuranu	Gryzeofulwina	Zaburzenie tworzenie mikrotubul i powstawania wrzeciona podziałowego
Alliloaminy	Terbinafina, Butenafina, Naftifina	Hamowanie aktywności epoksydazy skwalenowej, wewnątrzkomórkowa kumulacja lanosterolu
Pochodne pirydynonu	Cyclopiroks	Chelatacja trójwartościowych kationów metali; hamowanie enzymów zależnych od jonów metali – katalazy, peroksydazy; hamowanie enzymów biorących udział w mitochondrialnych procesach transportu elektronów i produkcji energii
Pochodne fenyłomorfoliny	Amorolfina	Hamowanie reduktazy C-14 i izomerazy C8 w szlaku syntezy ergosterolu
Tiokarbaminiany	Tolnaftat	Hamowanie epoksydazy skwalenowej
Inne	Kwas undekainowy	Hamowanie szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych u dermatofitów; w przypadku <i>C. albicans</i> zaburzenie morfogenezy
	Tawaborol	Inhibicja leucyl-t-RNA syntetazy
	Me1111	Inhibicja dehydrogenazy bursztynianowej

wiedzi immunologicznej obejmujące elementy systemu sygnalizacji środowisko-komórka, reakcje na stresory jak i oporność na substancje przeciwgrzybicze [13]. Ekspozycja dermatofitów na lek przeciwgrzybiczy, uszkodzenie ich ściany komórkowej, zaburzenia osmolarności środowiska wzrostu i pojawienie się w nim reaktywnych form tlenu stanowią bodźce, które mogą być aktywatorami szlaków sygnałowych, mających na celu przeciwdziałanie skutkom nagłego stresu komórkowego [42]. Główne szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w tolerancję i oporność na środki przeciwgrzybicze są regulowane przez białko szoku cieplnego Hsp90, które kontroluje stabilność i aktywację kluczowych regulatorów odpowiedzi na stres, takich jak kalcyneuryna i kinaza MAP (mitogen-activated protein) w układzie integralności ściany komórkowej [14, 75].

Wśród grzybów chorobotwórczych większość znanych mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tolerancji i oporności na substancje przeciwgrzybicze została wyjaśniona w przypadku grzybów z rodzaju

Candida, *Cryptococcus* i *Aspergillus*, natomiast w przypadku dermatofitów jest bardzo słabo poznana. Niektóre dermatofity, szczególnie dobrze mechanizm ten został opisany dla *Trichophyton interdigitale* i *Trichophyton rubrum*, w wyniku ekspozycji na substancje przeciwgrzybicze w dawkach zbliżonych do wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) modulują poziomy ekspresji genów związanych z różnymi procesami metabolicznymi, takimi jak transport białek, metabolizm lipidów, transdukcja szlaków sygnałowych czy modyfikacja potranslacyjna białek [62, 68, 71, 75]. Dodatkowo, u *T. interdigitale* wykazano, że geny kodujące elementy podlegające transpozycji ulegają zwiększonej ekspresji po ekspozycji grzyba na różne substancje przeciwgrzybicze [68, 71]. Z kolei transpozony mogą wpływać dodatnio na ekspresję genów odpowiedzialnych za odpowiedź na stres środowiskowy [26]. Podobne reakcje zostały opisane dla *Schizosaccharomyces pombe*, u których to grzybów odnotowano preferencyjną integrację retrotranspozonu Tf1 z promotorami



Ryc. 1. Czynniki wpływające na występowanie lekooporności u dermatofitów

genów odpowiedzi na stres, w konsekwencji doprowadzającą do zwiększenia ich ekspresji [26].

Mechanizmy regulacyjne biorące udział w odpowiedzi na stres są złożone i obejmują również molekularny poziom komórki grzyba. W przypadku ekspozycji *T. rubrum* na kwas undekanowy obserwowana jest wzmożona aktywność procesów obejmujących pre-RNA, regulujących ekspresję genów kodujących fosfoglukomutazę, która bierze udział w glukoneogenezie i biosyntezie ściany komórkowej [62]. Enzym ten działa w kooperacji z dehydrogenazą monofosforanu inozyny, która odgrywa kluczową rolę w dostarczaniu guaniny do komórek [62]. Zauważono, że powtarzająca się ekspozycja *T. rubrum* na leki przeciwgrzybicze w stężeniach zbliżonych do MIC, w modelu *in vitro*, może prowadzić do selekcji szczepów zdolnych do przeżycia przy wyższych stężeniach leków przeciwgrzybiczych. Usunięcie ze środowiska dermatofitu danej substancji powodowała po pewnym czasie odzyskanie wrażliwości [31].

Szczepy dermatofitów, które są w stanie przeżyć w wyższych stężeniach leków przeciwgrzybiczych można określić jako tolerancyjne, czyli zdolne do przetrwania przejściowej ekspozycji lub jako odporne, które w sposób trwały nabyły, najczęściej w drodze mutacji, zdolności przeżywania w obecności w środowisku substancji niekorzystnych [17]. U grzybów z rodzaju *Candida* i *Aspergillus* białko szoku cieplnego Hsp90 ma zdolność do zwiększania tolerancji na leki poprzez stabilizację kluczowych regulatorów odpowiedzi na stres komórkowy i innych elementów wrażliwych w wielu szlakach sygnalizacyjnych [75]. Obecność środków przeciwgrzybiczych w środowisku wzrostu grzybów

i stres jaki wywołują, wymusza szybkie zmiany adaptacyjne, które obejmują modulację ekspresji genów w syntezie wielu białek jako jeden z głównych mechanizmów służących do przetrwania w niesprzyjającym środowisku i niwelowaniu negatywnych skutków stresu komórkowego [73, 75, 97]. Istotne znaczenie tych genów jakie posiadają w przeżyciu grzybów w warunkach stresowych sugeruje, że można je uznać za potencjalne cele w poszukiwaniu nowych substancji o działaniu przeciwgrzybiczym.

4. Mechanizmy wyrzutu leku z komórki

Działanie pomp wyrzutowych (efflux pump) polega na aktywnym wypompowywaniu z komórki grzyba różnych substancji, m.in. leków przeciwgrzybiczych, substancji czynnych preparatów dezynfekcyjnych itp. [9, 20]. W rezultacie tej aktywności dochodzi do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia tych substancji, czego skutkiem jest ograniczenie ich działania bójczego [20, 74]. Pompy molekularne wymieniane są w literaturze naukowej jako jedna z głównych przyczyn niepowodzenia w terapii przeciwgrzybiczej. Czynne usuwanie szkodliwych względem grzyba substancji z wnętrza komórki prowadzi do stopniowego i niespecyficznego wzrostu oporności na leki poprzez zmniejszenie oczekiwanego efektu *in vivo*. Stanowi też jedną z kluczowych strategii wykorzystywaną przez dermatofity do przetrwania w niekorzystnym środowisku jak i uzyskania oporności na substancje, które się w nim pojawiają [9, 86].

Zdolność do modyfikacji ekspresji pomp wyrzutowych przyczynia się w sposób pośredni do zwiększenia patogenności dermatofitów, ułatwiając im kolonizację tkanek gospodarzy [12, 86]. Oporność wielolekowa wynika w dużej mierze ze zwiększonej ekspresji genów należących do nadrodziny kaset wiążących ATP, a przede wszystkim transporterów ABC, które to występują zarówno u prokariotów, jak i eukariotów [20]. Białka te zawierają dwa odrębne regiony: wysoce konserwatywną domenę wiążącą nukleotydy i zmienną domenę transbłonową. Transportery ABC aktywnie przenoszą wiele różnych pod względem strukturalnym i chemicznym związków przez błony komórkowe poprzez wiązanie i hydrolizę ATP, zmniejszając w ten sposób ich kumulację w komórce [12, 20]. Produkty genów należących do tej nadrodziny można podzielić na kilka podrodziny, tj. PDR (pleiotropic drug resistance), MDR (multidrug resistance), MRP (multidrug resistance associated protein), RL1 (RNase L Inhibitor 1), YEF3 (yeast elongation factor 3) oraz ALDP (adrenoleukodystrophy protein) [16]. Na podstawie dostępnych sekwencji genowych różnych gatunków dermatofitów stwierdzono, że te transportery stanowią jednorodną grupę o niskiej różnorodności genetycznej, tylko z nielicznymi wyjątkami wśród dermatofitów [8]. Analiza siedmiu gatunków dermatofitów (*Microsporium canis*, *Trichophyton equinum*, *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*) wykazała, że geny transporterów ABC występują w genomie przynajmniej w kilku powtórzeniach [29]. Dodatkowo, geny transporterów ABC współdziałają z pozostałymi genami w taki sam sposób, pomimo fenotypowej i adaptacyjnej wyjątkowości każdego gatunku dermatofitu [29].

Aktywne usuwanie metabolitów przez pompy typu efflux jako możliwego mechanizmu oporności zostało szczególnie dobrze zbadane u *T. interdigitale* oznaczonego jako H6 (szczep pierwotnie zidentyfikowany jako *T. rubrum*). Fachin i wsp. [22] wysnuli hipotezę, że za zaobserwowaną oporność na gryzeofulwinę i tiokonazol u tego szczepu dermatofitu odpowiedzialny jest mechanizm wyrzutu substancji z komórki. Interesujące jest, że u tego szczepu zauważona została zwiększona transkrypcja genów *mdr1* i *mdr2* po ekspozycji na różne substancje o działaniu przeciwgrzybiczym [9, 23, 68]. W późniejszych badaniach wykazano, że zakłócenie funkcjonowania genu *mdr2* uczyniło mutantą bardziej wrażliwym na terbinafinę, ale nie na inne testowane preparaty (itrazonazol, bromek etydyiny, 4NQO, ketokonazol, gryzeofulwinę, flukonazol, cykloheksymid, tiokonazol, akryflawinę, benomyl, imazil), przez co została odrzucona hipoteza modulacyjnej roli tego genu na podatność na leki wysnuta w pierwszym etapie badań zespołu Ana Fachin [23]. Inne wyniki badań wykazały, że po ekspozycji na środki przeciwgrzybicze

obserwowana jest wzmożona ekspresja genu *mdr4* [61]. Aktywność produktu tego genu w pośredni sposób zależy od aktywności transportera ABC, co sugeruje istnienie interakcji sieciowej w odniesieniu do mechanizmu MDR, a także współzależności w aktywnym usuwaniu substancji z komórki grzyba różnych transporterów należących do omawianej nadrodziny [61, 94]. Należy uwzględnić fakt, że jednoczesne działania różnych transporterów ABC, których profile substratowe zachodzą na siebie, umożliwiają komórce grzyba szybkie usunięcie niepożądanego i/lub szkodliwej substancji [32].

Badania poziomu ekspresji genów *pdr1*, *mdr2* i *mdr4* w trakcie eksponowania czterech gatunków dermatofitów sklasyfikowanych w rodzaju *Trichophyton*, tj. *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* i *T. tonsurans* na różne warunki środowiskowe nie wykazały zależności filogenetycznej ani funkcjonalnej między nimi [29, 61]. Zauważono jednak, że u tych gatunków badane geny wydają się działać synergicznie, co pozwala stwierdzić, że brak działania jednego genu *mdr* może być kompensowane przez inne geny z tej grupy [29, 60, 61].

Ze względu na kluczową rolę pomp wyrzutowych w nabywaniu lekooporności u dermatofitów, zastosowanie inhibitorów lub modulatorów transporterów ABC do blokowania i odwracania odpowiedzi MDR stanowi potencjalnie alternatywną metodę w zwiększaniu skuteczności terapii przeciwgrzybiczej [32, 44, 86]. Dotychczas opracowano kilka związków, między innymi izonitryl, enniatyna, milbemycyna, ibuprofen i inhibitor kalcyneuryny FK506, które wykazują właściwości modulujące MDR poprzez synergistyczne działanie z substancjami przeciwgrzybiczymi [44]. Związki te wykazują skuteczne działanie blokujące aktywność pomp wyrzutowych u opornego na terbinafinę szczepu *Microsporium canis* [44, 48]. Należy jednak wziąć pod uwagę, że w zależności od warunków środowiskowych interakcje gospodarz – patogen, a także zależności między grzybami zasiedlającymi tę samą niszę ekologiczną, ekspresja genów transporterów ABC, a tym samym ich aktywność, będzie podlegała modulowaniu [61]. Dodatkowo, transportery ABC nie stanowią homogennej grupy genetycznej [44, 61]. Co więcej, wiele podobieństw między komórkami grzybowymi i ludzkimi stanowi wyzwanie terapeutyczne ze względu na ograniczony wybór leków przeciwgrzybiczych i ich toksyczny wpływ nie tylko dla grzyba, ale i dla gospodarza [60]. Idealny lek wpływający na modulowanie genów MDR musi zatem być zdolny do uwrażliwiania komórek grzyba na dostępne środki przeciwgrzybicze, jednocześnie nie wpływając na komórki gospodarza [32, 44]. Wysoce prawdopodobne jest, że w przyszłości wykorzystanie modulatorów genów MDR będzie stanowić kluczową strategię w leczeniu opornych na obecnie dostępne leki przeciwgrzybicze szczepów dermatofitów.

5. Mechanizmy detoksyfikacji leków

W trakcie ekspozycji dermatofitów na stężenia leków zbliżone do hamujących wzrost i namnażanie zauważono, że zwiększona jest ekspresja genów odpowiedzialnych za detoksykację komórkową. Persinoti i wsp. [73] wykazali na podstawie analizy sekwencji RNA szczepu *T. rubrum* eksponowanego na akryflawinę, że geny zaangażowane w detoksykację komórkową ulegały wzmożonej regulacji pozytywnej, a w szczególności dotyczyło to genów kodujących katalazy, enzymy chroniące komórkę przed stresem oksydacyjnym i reaktywnymi formami tlenu. Zwiększona ekspresja genów katalazy może stanowić mechanizm kompensacyjny w celu utrzymania stałego poziomu tego enzymu wewnątrz komórki, chroniąc ją w ten sposób przed negatywnymi skutkami działania leku. Ponadto, analiza sekwencji RNA w celu określenia ekspresji genów *T. rubrum* poddanego działaniu kwasu undecylenowego również wykazała regulację pozytywną kilku genów kodujących enzymy antyoksydacyjne [58]. W odpowiedzi na kwas undecylenowy, oprócz zwiększonej aktywności katalazy, wzmożeniu ekspresji ulegały także enzymy takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza, transferaza glutationowa i peroksydaza glutationowa, co prowadziło do enzymatycznej detoksykacji oksydacyjnej komórek grzybowych [62]. Podobnych obserwacji dokonano w przypadku szczepów *Candida* spp. wykazujących oporność na amfoterycynę B, gdzie zauważono zwiększoną aktywność katalazy [70].

Zdolność dermatofitów do zwiększonej sekrecji egzoenzymów można powiązać z patogennością tych grzybów i ich reakcją na stres komórkowy, a tym samym z mechanizmami detoksykacji. Brasch i wsp. [5] zaobserwowali *in vitro*, że w zależności od składu pożywki, na której wzrastał *T. rubrum*, zmieniał się również zakres wydzielanych przez dermatofit enzymów, m.in. esteraz. Ponadto, profil elektroforetyczny esteraz wydzielanych przez *T. rubrum* podlegał rekonfiguracji i wykazywał pojawienie się nowych izoform w zależności od tego, czy do jego środowiska była dodana gryzeofulwina czy też tiokonazol w stężeniach zbliżonych do hamujących [21]. Te dodatkowe formy esteraz mogą bezpośrednio uczestniczyć w detoksykacji lub mogą obejmować niespecyficzną odpowiedź komórkową na stres prowadzącą do tolerancji na lek. Udział esteraz w detoksykacji prowadzącej do oporności na leki został już opisany u innych mikroorganizmów, np. u bakterii [40, 77]. Nadekspresję genów kodujących niektóre grupy enzymów, stwierdzono również u kilku szczepów dermatofitów wykazujących oporność na leki z grupy azoli, co można uznać za mechanizm kompensacyjny w momencie zahamowania syntezy ergosterolu. W przypadku *Candida albicans* nadekspresja genu *erg11* następuje poprzez

duplikację lewego ramienia chromosomu 5 [15, 79]. *Cryptococcus neoformans* natomiast dostosowuje się do wysokich stężeń flukonazolu przez tworzenie disomii chromosomu 1 w wyniku czego dochodzi do podwojenia dwóch genów: *erg11*, którego produkt jest celem dla flukonazolu oraz gen *afr1*, którego produkt jest uznawany za transporter dla substancji o charakterze azoli [88]. Podobnie u szczepów *Aspergillus fumigatus* opornych na terbinafinę występują dodatkowe kopie genu epoksydazy skwalenowej [56]. Sugerowane jest ponadto, że dodatkowe kopie genu 1-monooksygenazy salicylanowej (*salA*) są przyczyną oporności na terbinafinę u *Aspergillus nidulans* [56]. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że rozszczepienie pierścienia naftalenowego obecnego w strukturze terbinafiny jest przyczyną jej inaktywacji [37]. Santos i wsp. [81] opisali szczep *T. rubrum* oporny na terbinafinę, który uzyskali poprzez wprowadzenie do genomu tego dermatofitu wielu kopii genu *salA*. Szczep ten wykazywał podwyższoną ekspresję genu *salA* i jednocześnie zwiększoną oporność na terbinafinę w porównaniu ze szczepem dzikim, a zatem udało się wykazać, że gen ten odgrywa rolę w oporności i odpowiedzi na terbinafinę u dermatofitów. Interesujące jest, że ten sam mutant oporny na terbinafinę, po kilku pasażach na pożywkę bez terbinafiny tracił cechę oporności na ten lek. Co więcej, szczep dziki *T. rubrum* reagował na ekspozycję na terbinafinę zwiększeniem ekspresji genu *salA* [81]. Na podstawie uzyskanych wyników zespół Hemelin Santos wysnuł hipotezę, że dodatkowe kopie tego genu mogą wywoływać oporność na leki przeciwgrzybicze.

W przeciwieństwie do bakterii, u których mechanizmy oporności na antybiotyki poprzez degradację tych związków są dość dobrze poznanym zagadnieniem, tak w przypadku grzybów i ich oporności na środki przeciwgrzybicze poprzez inaktywację lub degradację mechanizmy te wymagają dalszych szczegółowych badań [60]. Biorąc pod uwagę, że grzyby wydzielają dużą liczbę enzymów [33], prawdopodobne jest, że podobne mechanizmy powodujące oporność lub tolerancję na leki przeciwgrzybicze mogą być częste. Ujawnienie enzymów grzybowych pełniących tę rolę może być zatem przydatne do opracowania ich inhibitorów, które można zastosować samodzielnie lub w połączeniu z konwencjonalną terapią.

6. Transkrypcyjna modulacja genów szlaków sygnałowych

Profilowanie ekspresji genów w całym genomie stało się jednym ze standardów w opracowywaniu nowych leków przez przemysł farmaceutyczny i zwiększyło ogólne zrozumienie dotyczące mechanizmów działania różnych substancji i ich efektów terapeutycznych.

Liczne badania wykazały istnienie różnych szlaków regulacyjnych i metabolicznych niezbędnych do rozwoju oporności na leki przeciwgrzybicze [80]. Biorąc pod uwagę naturę komórkowych systemów reakcji na stres i to, że niektóre białka komórkowe powiązane z tymi mechanizmami są fosforylowane, kinazy białkowe mogą stanowić potencjalny cel terapii przeciwgrzybiczej [30]. Wiadomo, że fosforylacja białek wyzwała kilka szlaków transdukcji sygnałów zaangażowanych w przekazywanie bodźców komórkowych, dlatego też wielu badaczy próbowało określić wpływ różnych substancji przeciwgrzybiczych na komórki grzybów poprzez zbadanie ekspresji różnego typu kinaz, jako potencjalnego mechanizmu oporności.

Dzięki zastosowaniu techniki hybrydyzacji udało się ustalić, że u szczepu *T. rubrum* ekspozycji na działanie ketokonazolu i amfoterycyny B dochodziło do obniżenia ekspresji czterech genów kinaz, z których dwa były to geny kodujące kinazy MAP (MpkA i STE7), należące do dwóch oddzielnych szlaków odpowiedzi na stres komórkowy [96]. Doniesienia naukowe wskazują również obniżoną ekspresję, w odpowiedzi na amfoterycynę B, genu kinazy serynowo/treoninowej (*sps1*) [28, 92, 96]. Natomiast *T. rubrum* hodowany *in vitro* w obecności terbinafiny wykazywał zwiększenie ekspresji genu *sps1* przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji dwóch fosforylowanych elementów genetycznych biorących udział w regulacji kaskady kinaz MAP [96, 97]. Ponadto, analiza transkrypcji genów *T. rubrum* w odpowiedzi na związki PHS11A i PH11B, będące inhibitorami syntezy kwasów tłuszczowych, wykazała znaczący spadek ekspresji aż czterech genów kinaz: *pkaC*, *ssp1* i *sln1*, które są związane ze szlakami przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego oraz kinazy dihydroksyacetonowej (produkt genu *dak2*), związanej z transportem i metabolizmem węglowodanów, a tylko jeden gen związany z kinazami – *bck1* uległ wzmożonej ekspresji w tych warunkach [97]. Dodatkowo, związek PH11B wzmacniał ekspresję genu kinazy zależnej od pirofosforanu – fosfofrukto-1-kinazy (*pfk1*) i gen heksokinazy (*glk1*), które są związane z transportem węglowodanów [95]. Z kolei regulacja genu *mpkA* kinazy MAP po ekspozycji na amfoterycynę B polegała na zmniejszeniu ekspresji, a przy ekspozycji na itrakonazol na jej zwiększeniu [19]. Inny mechanizm odpowiedzi na obecność w środowisku amfoterycyny B, która łączy się z ergosterolem a w konsekwencji zaburza strukturę błony plazmatycznej grzyba, polegał na aktywacji szlaku integralności ściany komórkowej i rekompensatę utraty ciągłości okrywy komórkowej [19, 96].

Zastosowanie techniki supresyjnej hybrydyzacji odejmującej (SSH) pozwoliło wykazać zwiększony poziom ekspresji genu kinazy NIMA (*nima1*) po ekspozycji *T. rubrum* na flukonazol, gryzeofulwinę i terbinafinę. Natomiast stosowanie acyklowiru, terbinafiny

i kwasu undecylenowego pozostawało bez wpływu na poziom ekspresji genu *nima1* [68]. Ponadto, gen ten ulegał zwiększonej ekspresji w niskim pH i obecności keratyny jako jedynej źródła węgla [68, 71]. Rodzina kinaz NIMA pełni kluczową rolę w cyklu komórkowym, a w szczególności na etapie przejścia komórki z fazy G2 do M. Doniesienia naukowe podają, że geny związane z kinazą NIMA (zwłaszcza *nek11L* i *nek11S*) związane są z replikacją DNA oraz odpowiedzią na stres komórkowy wywołany przez uszkodzenie komórki lub inne niespecyficzne czynniki chemiczne [66, 68, 71]. Innych wniosków dostarczyły doświadczenia z wykorzystaniem techniki hybrydyzacji northern (northern blot). W jednym z badań, w którym *T. rubrum* hodowany był w środowisku z obecnością akryflawiny, za pomocą tej techniki wykazano zwiększenie poziomu transkrypcji genu kodującego kinazę ryboflawiny [84]. Enzym ten jest niezbędnym elementem w szlaku biosyntezy flawiny, kluczowego związku dla szeregu procesów biologicznych, w tym metabolizmu lipidów, białek i węglowodanów [82, 84].

Z kolei zastosowanie sekwencjonowania RNA, pozwoliło ocenić poziom ekspresji genów kodujących szlak kinaz u *T. rubrum* w kolejnych odstępach czasu po ekspozycji na leki przeciwgrzybicze. Udowodnione zostało, że trzy godziny po ekspozycji na akryflawinę poziom ekspresji kinazy fosfosiarczanu adenozyliny i kinazy homoserynowej wzrastał, natomiast kinazy białkowej oraz kinazy pirydoksynowej obniżał się. Wydłużenie czasu ekspozycji na akryflawinę do 12 godzin powodowało wzrost ekspresji genu kinazy białkowej *cmgc/srpk*, a po 24 godzinach ekspozycji jedynie poziom ekspresji genów kodujących szlak sygnałowy zależny od wapnia/kalmoduliny wzrastał [73]. Persinoti i wsp. [73] na podstawie tych wyników badań sugerują, że akryflawina, prawdopodobnie w znaczący sposób, wpływa na poziomy ekspresji genów tego ostatniego szlaku sygnałowego u *T. rubrum*. Z kolei Huang i wsp. [45] wykazali, że po 24 godzinach ekspozycji na akryflawinę wyraźnie obniżył się poziom ekspresji genów kodujących atypową kinazę białkową ABC1, odpowiedzialną za regulację syntezy chinonu w komórkach *T. rubrum*. Innych wniosków dostarczają analizy zastosowania kwasu undecylenowego na *T. rubrum*. Stwierdzono, że subletalne dawki tej substancji powodowały wzrost poziomu ekspresji genów kinazy białkowej urydyna/cytydyna (produkt genu *uck*), kinazy białkowej STE7 (produkt genu *ste7*) oraz kinazy defosfo-CoA (produkt genu *dpck*) niezależnie od czasu ekspozycji [62, 91]. Ponadto, kwas undecylenowy powodował obniżenie poziomu ekspresji genu nukleozydowej kinazy difosforanowej już po 3 godzinach ekspozycji, a wydłużenie tego czasu do 12 godzin skutkowało obniżeniem poziomu ekspresji genów kodujących dwie odrębne kinazy serynowo/treoninowe: kinazę difosforanów

nukleozydów oraz kinazę białkową AGC/RSK [58, 62]. Interesujące jest, że 12-godzinna ekspozycja na kwas undecylenowy powodowała całkowite zahamowanie genów kodujących kinazę białkową AGC/RSK zależną od cAMP, kinazę białkową 1 (PKA) zależną od cGMP, kinazę białkową PKG i kinazę białkową C [69, 73]. Ostatnia z wymienionych kinaz odgrywa ważną rolę w syntezie białek [69]. Wyniki te wydają się być wyraźnie odmienne od siebie, wskazują jednak na zasadniczy udział zmian poziomów ekspresji genów kinaz i szlaków sygnałowych w odpowiedzi na obecność substancji leczniczej w środowisku wzrostu dermatofitu. Prawdopodobnie omawiane mechanizmy nie są uniwersalne dla wszystkich leków przeciwgrzybiczych i wymagają dalszych szczegółowych badań naukowych.

7. Rola białek szoku cieplnego w lekooporności

Białka szoku cieplnego (Hsp) stanowią grupę białek opiekuńczych obecnych we wszystkich badanych do tej pory organizmach [34, 90]. Uczestniczą w różnych procesach komórkowych, m.in. w transkrypcji, translacji, modyfikacjach potranslacyjnych, składaniu białek, czy też ich grupowaniu i rozgrupowywaniu [90]. Gwałtowna zmiana temperatury czy pH, albo ekspozycja komórki na niektóre substancje chemiczne może być czynnikiem, który powoduje indukcję białek szoku cieplnego i wyzwolenie odpowiedzi na stres jakim zaczyna być poddawana komórka [87, 90]. Białka te, w zależności od ich funkcji i masy cząsteczkowej można przypisać do jednej z sześciu rodzin: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 i małe Hsp; u grzybów dominującymi białkami opiekuńczymi są Hsp20–40, Hsp70 i Hsp90 [90]. Zazwyczaj geny *hsp* są aktywowane przez czynnik transkrypcji szoku cieplnego (HSF) [54, 90]. To białko w warunkach stresowych jest fosforylowane i trimeryzowane, wiąże się z regionami promotorowymi genów *hsp* i indukuje ich transkrypcję [1]. Zależność między ekspresją genów *hsp* a stresem wywołanym przez leki przeciwgrzybicze udało się wykazać zarówno u drożdży jak i grzybów strzępkowych [90]. W przypadku dermatofitów ekspozycja na subletalne dawki różnych leków przeciwgrzybiczych powoduje modulację kilku genów *hsp*; w odpowiedzi na terbinafinę, acyklowir i związek PHS11A dochodzi do wzmożonej ekspresji genów kodujących białka należące głównie do rodziny Hsp70 a w przypadku odpowiedzi na itrakonazol i amfoterycynę B – do rodziny małych Hsp [47, 59]. Białka Hsp70 występują w postaci monomerów i współpracują z rodziną ko-chaperonów Hsp40, podczas gdy małe Hsp tworzą kompleksy oligomeryczne, które wiążą się z denaturowanymi białkami [83].

W odpowiedzi na terbinafinę i acyklowir u *T. rubrum* dochodzi do wzmożonej ekspresji genu kodu-

jącego Hsp90, czynnika transkrypcyjnego Hsf1 oraz czynnika regulującego funkcję Hsp90 i biorącego udział w dojrzewaniu kinaz – Cdc37 [47, 83]. W przypadku *T. interdigitale* oraz *T. rubrum*, które były poddawane zmianom temperatury dochodziło do zwiększonej ekspresji czynników transkrypcyjnych Hsf1 oraz PacC [47]. U szczepu *T. interdigitale* z nieaktywnym genem PacC, transkrypcja genu *hsf1* była zdecydowanie różna w porównaniu z innymi genami *hsp* [58]. Martinez-Rossi i wsp. [59] wysnuli na tej podstawie wniosek, że występuje powiązanie między PacC i białkiem Hsf1 a poziomem białek Hsp, co pośrednio moduluje odpowiedź komórki grzyba na stres związany z obecnością substancji leczniczej w środowisku. Natomiast w przypadku *T. rubrum* narażonego na działanie kwasu undecylenowego, nie wykazano, aby doszło do wzmożonej ekspresji genów białek Hsp. Przypuszczalnie, istnieją inne strategie radzenia sobie z czynnikiem szkodliwym, którymi mogą być m. in. aktywacja szlaków związanych z metabolizmem lipidów czy elementów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz alternatywnego modelu składania genów (w oryginale splicing) [62].

Białko Hsp90, jedno z najbardziej konserwatywnych białek z rodziny Hsp, jest funkcjonalnie powiązane z szeroką gamą innych białek w komórce, a jego działanie polega na kontrolowaniu składania białek do aktywnych konformacji [54]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, Hsp90 oddziałuje z około 10% wszystkich białek [55]. Białko Hsp90 tworzy złożoną sieć z kalcyneuryną i innymi białkami komórkowymi, które koordynują kompensacyjne mechanizmy naprawcze, pełniąc decydującą rolę w wielu procesach wewnątrzkomórkowych, w tym w zmianach morfogenetycznych, adaptacji do stresu i oporności na substancje przeciwgrzybicze [14, 87]. U *C. albicans* i *S. cerevisiae*, białko Hsp90 może być odpowiedzialne za oporność na związki azolowe oraz przypuszcza się, że w sposób pośredni wpływa na wykształcenie oporności na echinokandyny [14, 87]. Mechanizm tego zjawiska polega na aktywacji fosfatazy kalcyneuryny przez Hsp90 w warunkach stresowych [13, 87]. Niemniej jednak lokalizacja komórkowa białka Hsp90 jest inna u różnych grup i gatunków grzybów chorobotwórczych, a tym samym funkcje jakie przyjmuje wobec czynników szkodliwych są odmienne. U *Cryptococcus neoformans* białko Hsp90 zlokalizowane jest głównie na powierzchni komórki, co przekłada się na naturalną oporność na inhibitory ściany komórkowej [10], natomiast w przypadku *A. fumigatus* występuje ono głównie w cytozolu, a dopiero w momencie działania substancji leczniczych, które doprowadzają do uszkodzenia ściany komórkowej, zaczyna gromadzić się w obszarach przegród strzępek i samej ścianie komórkowej [53].

Pomimo stosunkowo dobrze poznanych mechanizmów dotyczących roli białka Hsp90 w odpowiedzi

na substancje przeciwgrzybicze u grzybów drożdżopodobnych i niektórych pleśni, niewiele wiadomo na temat interakcji wewnątrzkomórkowych i biologicznej roli tych białek u dermatofitów. Zahamowanie *in vitro* funkcjonowania białka Hsp90 u *T. rubrum* powodowało zwiększoną wrażliwość na mykafunginę i itraconazol, poprawiając skuteczność tych środków w terapii przeciwgrzybiczej [27, 58]. Dodatkowo, hamowanie aktywności białka Hsp90 upośledzało wzrost *in vitro* grzybów hodowanych na pożywce z fragmentami ludzkich paznokci i modulowało ekspresję innych genów *hsp*, a także genu *pacC* [4, 27]. Czynniki transkrypcyjny PacC zaangażowany jest w patogenność dermatofitów, co sugeruje, że białko Hsp90 odgrywa istotną rolę zarówno w patogenności, jak i podatności na leki u *T. rubrum* [4, 27, 47]. Zaobserwowany związek między hamowaniem aktywności białka Hsp90 a zwiększoną podatnością na niektóre środki przeciwgrzybicze u *T. rubrum* sprawia, że to białko opiekuńcze może zostać wykorzystane jako nowy cel terapii, a hamowanie jego aktywności jako potencjalna strategia leczenia dermatofitoz [47]. Dotychczas wykazano, że inhibitory i przeciwciała anty-Hsp90, takie jak radicolol, geldanamycyna i analogi tego związku, wiążą się z regionem N-końcowym białka Hsp90 w miejscu wiązania ATP i prowadzą do jego inaktywacji [36, 46].

8. Mutacje w genach docelowych enzymów wpływające na lekooporność

Opisanych jest wiele przykładów związanych z mutacjami w genach kodujących enzymy związane z syntezą ergosterolu i elementów ściany komórkowej, które spowodowały wystąpienie oporności na środki przeciwgrzybicze związane z tymi elementami. Azole hamują aktywność 14- α demetylazy lanosterolu przez wiązanie azotu w pierścieniu azolowym z atomem żelaza grupy hemowej białka [98]. Mutacje w genie *erg11*, który koduje 14- α demetylazę lanosterolu, często stwierdza się w izolatach klinicznych *C. albicans* wykazujących oporność na azole. Mutacje te nie wpływają na funkcję enzymu i często towarzyszy im utrata heterozygotyczności, co jeszcze zwiększa oporność na te leki przeciwgrzybicze [85]. Ponadto, mutacje w genie *erg11* mają różny wpływ na zmiany powinowactwa leków azolowych do elementów docelowych [64]. Niektóre mutacje osłabiają bądź zrywają wiązanie wodorowe między lekiem a docelowym białkiem, zmniejszając tym samym powinowactwo leków triazolowych o krótkich „ogonach” (np. worikonazol, flukonazol), ale już nie tych o długich „ogonach” [78]. Można więc stwierdzić, że w zależności od typu mutacji, oporność może wystąpić na wszystkie leki azolowe, albo tylko na pojedynczych przedstawicieli tej grupy [58, 85].

Ważnym enzymem docelowym leków przeciwgrzybiczych jest epoksydaza skwalenowa, która uczestniczy w szlaku biosyntezy ergosterolu poprzez katalizowanie epoksydacji skwalenu do 2–3-oksoskwalenu [58]. Terbinafina, która jest aktualnie najpopularniejszym lekiem stosowanym przy leczeniu dermatofitoz, hamuje aktywność epoksydazy skwalenowej, prowadząc do wyczerpania ergosterolu i akumulacji skwalenu [25]. Mutacje w genie kodującym epoksydazę skwalenową prowadzą do zmian strukturalnych w strukturze enzymu i zmniejszenia wiązania terbinafiny z białkiem bez powodowania zaburzeń w biosyntezie ergosterolu [60]. Dotychczas opisano kilka izolatów klinicznych *T. rubrum* opornych na terbinafinę, a tylko dwa z nich wykazały mutacje związane z tym genem [60]. Warty zauważenia jest fakt, że oba izolaty były odporne na wszystkie badane inhibitory epoksydazy skwalenowej, a molekularnie wykazano, że mutacje w genie znajdowały się w tym samym regionie, w którym zidentyfikowano je u szczepów *S. cerevisiae* opornych na terbinafinę [58, 60]. Ponadto, wykazano, że ekspresja genu epoksydazy skwalenowej niosącej mutację, objawiającą się podstawieniami pojedynczych aminokwasów w białku, u *C. albicans* zmniejszała podatność na inhibitory tego enzymu [58]. Podobnie, pojedyncze mutacje punktowe zmieniające sekwencje aminokwasów w białku u *A. nidulans* i *A. fumigatus* były związane z opornością na terbinafinę u tych szczepów [67, 76].

W badaniu, w którym oceniono 2056 izolatów *T. rubrum* i *T. interdigitale* pod kątem oporności na terbinafinę, stwierdzono, że tylko 17 z nich, mniej niż 1%, było opornych na ten lek [93]. Po analizie sekwencji genu epoksydazy skwalenowej wykryte zostały punktowe mutacje w czterech *loci*, które prawdopodobnie mogły być odpowiedzialne za oporność [93]. Ten sam układ mutacji wprowadzony doświadczalnie do dermatofitu modelowego *Arthoderma vanbreuseghemii*, objawił się powstaniem szczepów mniej podatnych na terbinafinę [93]. Co więcej, analiza poziomu ekspresji genów nie ujawniła żadnych innych istotnych różnic między mutantami a szczepami dzikimi, co wskazuje, że zwiększona odporność na tę substancję spowodowana była tymi czterema mutacjami [93].

Rosnąca oporność na azole u niektórych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* sprawiła, że echinokandyny stały się terapią pierwszego rzutu w przypadkach inwazyjnej kandydozy. Ta klasa leków hamuje podjednostkę fks syntazy glukanu [89]. U szczepów *C. glabrata*, które wykazywały oporność na terbinafinę, zidentyfikowane zostały mutacje znajdujące się w genach kodujących podjednostki fks1 i fks2 enzymu, podczas gdy u innych gatunków rodzaju *Candida* mutacje wykazywano tylko w genie podjednostki fks1 [43]. Ten mechanizm opisano również u opornych na echinokandyny szczepów *A. fumigatus* [58]. Ponadto, zmniejszona wrażliwość

na te leki gatunków klasyfikowanych w kompleksach *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* wiąże się z występowaniem polimorfizmu podjednostki *fxs1*, chociaż znaczenie kliniczne tego zjawiska nie jest pewne, ponieważ grzyby te są często skutecznie leczone echinokandynami [43, 89]. Poza konsekwencjami mutacji w genie kodującym podjednostkę *fxs1* syntazy glukanu, które skutkują występowaniem oporności na echinokandyne, nie są znane skutki jakie niosą mutacje w podjednostkach *fxs2* i *fxs3* [89]. Chociaż oporność na echinokandyne u *S. cerevisiae* wynika z mutacji w genie kodującym podjednostkę *fxs2*, to eksperymentalna delecja zarówno genu *fxs2*, jak i *fxs3* u tego gatunku spowodowała lepszy wzrost *in vitro* w wyniku ekspozycji na kaspofunginy [89]. Wykazano również, że podjednostki *fxs2* i *fxs3* u *C. albicans* działają jako regulatory dla podjednostki *fxs1* syntazy glukanu [89]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały również, że anidulafungina ma silne działanie przeciwko dermatofitom *in vitro*, ale jej znaczenie w użytku klinicznym nie zostało jeszcze ustalone [3, 18]. Brak badań skuteczności echinokandyne *in vivo* ogranicza zatem ich zastosowanie w leczeniu dermatofitoz, co może leżeć u podstaw braku opisanych dotychczas opornych na te leki szczepów dermatofitów.

9. Elementy strukturalne komórki wpływające na lekooporność

Oprócz mechanizmów obejmujących stres i modyfikację miejsca działania dla substancji przeciwgrzybiczej także inne czynniki, takie jak struktura komórki grzyba czy organizacja komórkowa, mogą wpływać na oporność i tolerancję na lek [24]. Przykładem takiej formy strukturalnej odpowiedzialnej za oporność jest zdolność do wytwarzania biofilmu. Struktury te składają się ze złożonych, powiązanych między sobą i mających kontakt ze środowiskiem populacji komórek, osadzonych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Obecnie biofilmy uważane są za najbardziej rozpowszechnione formy wzrostu drobnoustrojów [75]. Biofilmy odpowiedzialne są za zakażenia szerokim spektrum drobnoustrojów prokariotycznych i eukariotycznych u ludzi i zwierząt, często związanych ze zwiększoną trudnością w leczeniu przeciwgrzybiczym. Czynniki, które przyczyniają się do wysokiej nieprzepuszczalności biofilmu dla wielu substancji leczniczych, wynikają przede wszystkim z jego złożonej struktury, obecności macierzy pozakomórkowej, heterogenności metabolicznej populacji zasiedlających i zwiększonego poziomu ekspresji genów związanych z pompami wypływowymi u organizmów, które go tworzą [75]. Macierz, która otacza populację drobnoustrojów zasiedlających biofilm działa jako bariera fizyczna, chroniąc te drobnoustroje przed lekami i odpowiadając immunologiczną gospodarza oraz tworząc

subpopulację zdolną tolerować wyższe stężenia leków [24, 75]. Ze względu na powiązanie oporności lekowej z dermatofitozami, sugerowane jest, że biofilmy mogą działać jako źródła trwałej infekcji i oporności przeciwgrzybiczej np. w onychomycozach [7, 39]. Wykazano także zdolność dermatofitów do tworzenia biofilmów w modelu z wykorzystaniem pożywki z ludzkimi paznokciami jako źródłem substancji odżywczych [6].

Artrokonidia, które powstają w wyniku fragmentacji strzępek i są głównym elementem transmisyjnym dermatofitów, uważane są za jeden z kluczowych elementów strukturalnych wpływających na oporność grzybów tej grupy [38]. Wynika to z faktu, że zarodniki te wykazują znacznie większą oporność na leki przeciwgrzybicze niż mikro- i makrokonidia, czy też same strzępki [2, 11]. Przekłada się to na sposób określania lekooporności u dermatofitów, gdzie w badaniu stężeń hamujących wzrost (MIC) z wykorzystaniem standardu opisanego przez CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) bądź EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) należy użyć spłukanej z powierzchni kultury dermatofitu zawiesiny konidów, a nie mycelium.

10. Podsumowanie

Dermatofity stanowią jedną z najczęstszych przyczyn infekcji grzybiczych na świecie, pomimo tego badania nad wprowadzaniem nowych standardów leczenia są opóźnione w porównaniu z innymi grupami grzybów, zwłaszcza wywołującymi zakażenia układowe. Co więcej, narastająca oporność na leki przeciwgrzybicze u dermatofitów w znaczny sposób wyprzedza badania nad nowymi celami terapii. W tym artykule zostały omówione najważniejsze molekularne mechanizmy powstawania oporności lekowej u dermatofitów, tj. mechanizmy wypływu leków z komórki, ich detoksyfikacji, transkrypcyjnej modulacji genów szlaków sygnałowych i powstawania mutacji w genach enzymów docelowych dla substancji przeciwgrzybiczych. Dodatkowo, scharakteryzowana została reakcja dermatofitów na stres komórkowy wywołany działaniem leku przeciwgrzybiczego, rola białek szoku cieplnego i elementów strukturalnych komórki na powstawanie oporności i tolerancji na leki.

Ponadto, należy mieć również na uwadze, że substancje przeciwgrzybicze stosowane przeciwko dermatofitom muszą przede wszystkim z łatwością przenikać do skeratynizowanych struktur powierzchniowych i utrzymywać się w nich wystarczająco długo, aby osiągnąć efekt terapeutyczny. Niestety, aktualny arsenał środków leczniczych odznacza się słabą zdolnością do penetracji takich struktur, co może pośrednio przekładać się na lekotolerancję i lekooporność u dermatofitów,

w wyniku ekspozycji na subletalne stężenia leków. Brakuje również badań na temat korelacji między stężeniami hamującymi wzrost określanymi w badaniu *in vitro*, a realną wartością uzyskiwaną *in vivo* podcz terapii. Dane naukowe bądź z badań pojedynczych przypadków, nawet dotyczące samych dermatofitów, nie oferują wiele klinicytom w zakresie schematów skutecznego leczenia pacjentów, ponieważ kliniczne wartości stężeń terapeutycznych leków dla dermatofitów nie zostały jak dotąd opisane. Podczas gdy dostępne schematy leczenia przeciwgrzybiczego, tj. stosowanie różnych klas leków, bądź preparatów działających miejscowo i ogólnoustrojowo lub kombinacji tych metod są często przepisywane w przypadku dermatofitoz, praktyka ta nie ma poparcia w badaniach klinicznych [38]. Co najważniejsze, nie prowadzone są badania wśród pacjentów, u których terapia przeciwgrzybicza nie powiodła się, natomiast większość danych pochodzi z badań laboratoryjnych, prowadzonych na dermatofitach hodowanych w kontrolowanych warunkach. Kolejnym ważnym aspektem wpływającym na lekooporność dermatofitów jest fakt, że dermatomykozy są często leczone samodzielnie, bez konsultacji z lekarzem, a dopiero wówczas gdy brak jest efektów, pacjent decyduje się zasięgnąć porady specjalisty.

Piśmiennictwo

- Akerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L.: Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 545–555 (2010)
- Arrese J.E., Pierard-Franchimont C., Pierard G.E.: A plea to bridge the gap between antifungals and the management of onychomycosis. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 281–284 (2001)
- Badali H., Mohammadi R., Mashedi O., de Hoog G.S., Meis J.F.: In vitro susceptibility patterns of clinically important *Trichophyton* and *Epidermophyton* species against nine antifungal drugs. *Mycoses*, **58**, 303–307 (2015)
- Bignell E., Negrete-Urtasun S., Calcagno A.M., Haynes K., Arst H.N.J., Rogers T.: The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol. Microbiol.* **55**, 1072–1084 (2005)
- Brasch J., Martins B.S., Christophers E.: Enzyme release by *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. *Mycoses*, **34**, 365–368 (1991)
- Brilhante R.S.N., Rocha M.F.G. i wsp.: Quantitative and structural analyses of the *in vitro* and *ex vivo* biofilm-forming ability of dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **66**, 1045–1052 (2017)
- Burkhardt C.N., Burkhardt C.G., Gupta A.K.: Dermatophytoma: Recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. *J. Am. Acad. Dermatol.* **47**, 629–631 (2002)
- Burmester A., Shelest E., Glöckner G., Heddergott C., Schindler S., Staib P., Heide A., Felder M., Petzold A., Szafranski K., Feuermann M., Pedruzzi I., Priebe S., Groth M., Winkler R., i wsp.: Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biol.* **12**, R7 (2011)
- Cervellati E.P., Fachin A.L., Ferreira-Nozawa M.S., Martinez-Rossi N.M.: Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **44**, 141–147 (2006)
- Chatterjee S., Tatu U.: Heat shock protein 90 localizes to the surface and augments virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005836 (2017)
- Coelho L.M., Aquino-Ferreira R., Maffei C.M.L., Martinez-Rossi N.M.: In vitro antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 758–761 (2008)
- Coleman J.J., Mylonakis E.: Efflux in fungi: la piece de resistance. *PLoS Pathog.* **5**, e1000486 (2009)
- Cowen L.E.: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 187–198 (2008)
- Cowen L.E.: Hsp90 Orchestrates Stress Response Signaling Governing Fungal Drug Resistance. *PLoS Pathog.* **5**, e1000471 (2009)
- Cowen L.E., Sanglard D., Howard S.J., Rogers P.D., Perlin D.S.: Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a019752–a019752 (2014)
- Decottignies A., Goffeau A.: Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* **15**, 137–145 (1997)
- Delarze E., Sanglard D.: Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist. Updat.* **23**, 12–19 (2015)
- Deng S., Ansari S., Ilkit M., Rafati H., Hedayati M.T., Taghizadeh-Armaki M., Nasrollahi-Omran A., Tolooe A., Zhan P., Liao W., van der Lee H.A., Verweij P.E., Seyedmousavi S.: In vitro antifungal susceptibility profiles of 12 antifungal drugs against 55 *Trichophyton schoenleinii* isolates from tinea capitis favosa patients in Iran, Turkey, and China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017)
- Diao Y., Zhao R., Deng X., Leng W., Peng J., Jin Q.: Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. *Med. Mycol.* **47**, 237–247 (2009)
- El-Awady R., Saleh E., Hashim A., Soliman N., Dallah A., Elraheed A., Elakraa G.: The role of eukaryotic and prokaryotic abc transporter family in failure of chemotherapy. *Front. Pharmacol.* **7**, 535 (2016)
- Fachin A.L., Contel E.P., Martinez-Rossi N.M.: Effect of sub-MICs of antimycotics on expression of intracellular esterase of *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **39**, 129–133 (2001)
- Fachin A.L., Maffei C.M., Martinez-Rossi N.M.: In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. Mutant of *Trichophyton rubrum* resistant to griseofulvin and tioconazole. *Mycopathologia*, **135**, 141–143 (1996)
- Fachin A., Ferreira-Nozawa M., Maccheroni W., Martinez-Rossi N.: Role of the ABC transporter TRUMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1093–1099 (2006)
- Fanning S., Mitchell A.P.: Fungal biofilms. *PLoS Pathog.* **8**, e1002585 (2012)
- Favre B., Ryder N.S.: Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 443–447 (1996)
- Feng G., Leem Y.E., Levin H.L.: Transposon integration enhances expression of stress response genes. *Nucleic Acids Res.* **41**, 775–789 (2013)
- Ferreira-Nozawa M.S., Silveira H.C.S., Ono C.J., Fachin A.L., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Med. Mycol.* **44**, 641–645 (2006)

28. Friesen H., Lunz R., Doyle S., Segall J.: Mutation of the SPS1-encoded protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in transcription and morphology during spore formation. *Genes Dev.* **8**, 2162–2175 (1994)
29. Gadzalski M., Ciesielska A., Staczek P.: Bioinformatic survey of ABC transporters in dermatophytes. *Gene*, **576**, 466–475 (2016)
30. Garaizar J., Brena S., Bikandi J., Rementeria A., Ponton J.: Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **6**, 987–998 (2006)
31. Ghelardi E., Celandroni F., Gueye S.A., Salvetti S., Senesi S., Bulgheroni A., Mailland F.: Potential of ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2825–2829 (2014)
32. Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., Sarkadi B.: The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv.* **1**, 27–42 (2004)
33. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
34. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.* **68**, 823–836 (2019)
35. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. *Adv. Microbiol.* **58**, 49–58 (2019)
36. Gong Y., Li T., Yu C., Sun S.: *Candida albicans* heat shock proteins and hsp90-associated signaling pathways as potential antifungal targets. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 520 (2017)
37. Graminha M.A.S., Rocha E.M.F., Prade R.A., Martinez-Rossi N.M.: Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3530–3535 (2004)
38. Gupta A.K., Kohli Y.: In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *Br. J. Dermatol.* **149**, 296–305 (2003)
39. Gupta C., Das S., Ramachandran V.G., Saha R., Bhattacharya S.N., Dar S.A., Atri D.: Possible role of trichophytin antigen in inducing impaired immunological clearance of fungus in onychomycosis. *Mycopathologia*, **181**, 247–251 (2016)
40. Harms N., Ras J., Reijnders W.N., van Spanning R.J., Stouthamer A.H.: S-formylglutathione hydrolase of *Paracoccus denitrificans* is homologous to human esterase D: a universal pathway for formaldehyde detoxification? *J. Bacteriol.* **178**, 6296–6299 (1996)
41. Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2–15 (2008)
42. Hayes B.M.E., Anderson M.A., Traven A., van der Weerden N.L., Bleackley M.R.: Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2651–2666 (2014)
43. Healey K.R., Perlín D.S.: Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*. *J. fungi (Basel, Switzerland)* **4**, 105 (2018)
44. Holmes A.R., Cardno T.S., Strouse J.J., Ivnitski-Steele I., Keniya M.V., Lackovic K., Monk B.C., Sklar L.A., Cannon R.D.: Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. *Future Med. Chem.* **8**, 1485–1501 (2016)
45. Huang H., Yang M., Su Y., Qu L., Deng X.W.: *Arabidopsis* atypical kinases ABC1K1 and ABC1K3 act oppositely to cope with photodamage under red light. *Mol. Plant* **8**, 1122–1124 (2015)
46. Huang X., Yi J., Yin S., Li M., Ye C., Lai W., Chen J.: *Trichophyton rubrum* conidia modulate the expression and transport of Toll-like receptor 2 in HaCaT cell. *Microb. Pathog.* **83–84**, 1–5 (2015)
47. Jacob T.R., Peres N.T.A., Martins M.P., Lang E.A.S., Sanches P.R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Heat shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for the development of novel drugs against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Front. Microbiol.* **6**, 1241 (2015)
48. Kano R., Hsiao Y.H., Han H.S., Chen C., Hasegawa A., Kamata H.: Resistance mechanism in a terbinafine-resistant strain of *Microsporium canis*. *Mycopathologia*, **183**, 623–627 (2018)
49. Khurana A., Sardana K., Chowdhary A.: Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet. Biol.* **132**, 103255 (2019)
50. Kohler J.R., Hube B., Puccia R., Casadevall A., Perfect J.R.: Fungi that infect humans. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017)
51. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report). *Zoonoses Public Health* **66**, 982–989 (2019)
52. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections. **58**, 165–176 (2019)
53. Lamoth F., Juvvadi P.R., Fortwendel J.R., Steinbach W.J.: Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell, Adv. Microbiol.* **11**, 1324–1332 (2012)
54. Leach M.D., Budge S., Walker L., Munro C., Cowen L.E., Brown A.J.P.: Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. *PLoS Pathog.* **8**, e1003069 (2012)
55. Leach M.D., Klipp E., Cowen L.E., Brown A.J.P.: Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 693–704 (2012)
56. Liu W., May G.S., Lionakis M.S., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P.: Extra copies of the *Aspergillus fumigatus* squalene epoxidase gene confer resistance to terbinafine: genetic approach to studying gene dose-dependent resistance to antifungals in *A. fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2490–2496 (2004)
57. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia*, **182**, 215–227 (2017)
58. Martinez-Rossi N.M., Bitencourt T.A., Peres N.T.A., Lang E.A.S., Gomes E. V., Quaresimin N.R., Martins M.P., Lopes L., Rossi A.: Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. *Front. Microbiol.* **9**, 1108 (2018)
59. Martinez-Rossi N.M., Jacob T.R., Sanches P.R., Peres N.T.A., Lang E.A.S., Martins M.P., Rossi A.: Heat shock proteins in dermatophytes: current advances and perspectives. *Curr. Genomics* **17**, 99–111 (2016)
60. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*, **166**, 369–383 (2008)
61. Martins M.P., Franceschini A.C.C., Jacob T.R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **65**, 605–610 (2016)
62. Mendes N.S., Bitencourt T.A., Sanches P.R., Silva-Rocha R., Martinez-Rossi N.M., Rossi A.: Transcriptome-wide survey of gene expression changes and alternative splicing in *Trichophyton rubrum* in response to undecanoic acid. *Sci. Rep.* **8**, 2520 (2018)
63. Monod M.: Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*, **166**, 285–294 (2008)

64. Morio F, Loge C., Besse B., Hennequin C., Le Pape P.: Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**, 373–384 (2010)
65. Nenoff P., Verma S., Vasani R., Burmester A., Hipler U.C., Wittig F., Krüger C., Nenoff K., Wiegand C., Saraswat A., Madhu R., Panda S., Das A., Kura M., Jain A., i wsp.: The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*-A molecular study. *Mycoses*, (2018)
66. Noguchi K., Fukazawa H., Murakami Y., Uehara Y.: Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J. Biol. Chem.* **277**, 39655–39665 (2002)
67. Osborne C.S., Leitner I., Favre B., Ryder N.S.: Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2840–2844 (2005)
68. Piao F.G., Segato F., Cursino-Santos J.R., Peres N.T.A., Martinez-Rossi N.M.: Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol. Lett.* **271**, 180–186 (2007)
69. Pearce L.R., Komander D., Alessi D.R.: The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 9–22 (2010)
70. Peman J., Canton E., Espinel-Ingroff A.: Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**, 453–460 (2009)
71. Peres N.T., Sanches P.R., Falco J.P., Silveira H.C., Paião F.G., Maranhão F.C., Gras D.E., Segato F., Cazzaniga R.A., Mazucato M., Cursino-Santos J.R., Aquino-Ferreira R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol.* **10**, 39 (2010)
72. Peres N.T. de A., Maranhão F.C.A., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An. Bras. Dermatol.* **85**, 657–667 (2010)
73. Persinoti G.F., de Aguiar Peres N.T., Jacob T.R., Rossi A., Vencio R.Z., Martinez-Rossi N.M.: RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. *BMC Genomics*, **15 Suppl 7**, S1 (2014)
74. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672–693 (2000)
75. Robbins N., Caplan T., Cowen L.E.: Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 753–775 (2017)
76. Rocha E.M.F., Gardiner R.E., Park S., Martinez-Rossi N.M., Perlin D.S.: A Phe389Leu substitution in *ergA* confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2533–2536 (2006)
77. Rooker S., Guillemaud T., Berge J., Pasteur N., Raymond M.: Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity (Edinb.)* **77 (Pt 5)**, 555–561 (1996)
78. Sagatova A.A., Keniya M. V., Wilson R.K., Sabherwal M., Tyn dall J.D.A., Monk B.C.: Triazole resistance mediated by mutations of a conserved active site tyrosine in fungal lanosterol 14 α -demethylase. *Sci. Rep.* **6**, 26213 (2016)
79. Sanglard D.: Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front. Med.* **3**, 11 (2016)
80. Sanglard D., Coste A., Ferrari S.: Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1029–1050 (2009)
81. Santos H.L., Lang E.A.S., Segato F., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Terbinafine resistance conferred by multiple copies of the salicylate 1-monooxygenase gene in *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **56**, 378–381 (2018)
82. Santos M.A., Jimenez A., Revuelta J.L.: Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 28618–28624 (2000)
83. Schopf F.H., Biebl M.M., Buchner J.: The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 345–360 (2017)
84. Segato F., Nozawa S.R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Overexpression of genes coding for proline oxidase, riboflavin kinase, cytochrome c oxidase and an MFS transporter induced by acriflavin in *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **46**, 135–139 (2008)
85. Selmecki A., Forche A., Berman J.: Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **9**, 991–1008 (2010)
86. Sharma M., Prasad R.: The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4834–4843 (2011)
87. Singh S.D., Robbins N., Zaas A.K., Schell W.A., Perfect J.R., Cowen L.E.: Hsp90 Governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathog.* **5**, e1000532 (2009)
88. Sionov E., Lee H., Chang Y.C., Kwon-Chung K.J.: *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog.* **6**, e1000848 (2010)
89. Suwannakorn S., Wakabayashi H., Kordalewska M., Perlin D.S., Rustchenko E.: FKS2 and FKS3 genes of opportunistic human pathogen *Candida albicans* influence echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018)
90. Tiwari S., Thakur R., Shankar J.: Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. *Biotechnol. Res. Int.* **2015**, 132635 (2015)
91. Wadler C., Cronan J.E.: Dephospho-CoA kinase provides a rapid and sensitive radiochemical assay for coenzyme A and its thioesters. *Anal. Biochem.* **368**, 17–23 (2007)
92. Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L.: Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143–180 (1999)
93. Yamada T., Maeda M., Alshahni M.M., Tanaka R., Yaguchi T., Bontems O., Salamin K., Fratti M., Monod M.: Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017)
94. Yibmantasiri P., Bircham P.W., Maass D.R., Bellows D.S., Atkinson P.H.: Networks of genes modulating the pleiotropic drug response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* **10**, 128–137 (2014)
95. Yu L., Zhang W., Liu T., Wang X., Peng J., Li S., Jin Q.: Global gene expression of *Trichophyton rubrum* in response to PH11B, a novel fatty acid synthase inhibitor. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2346–2352 (2007)
96. Yu L., Zhang W., Wang L., Yang J., Liu T., Peng J., Leng W., Chen L., Li R., Jin Q.: Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 144–153 (2007)
97. Zhang W., Yu L., Leng W., Wang X., Wang L., Deng X., Yang J., Liu T., Peng J., Wang J., Li S., Jin Q.: cDNA microarray analysis of the expression profiles of *Trichophyton rubrum* in response to novel synthetic fatty acid synthase inhibitor PHS11A. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 1252–1261 (2007)
98. Zonios D.I., Bennett J.E.: Update on azole antifungals. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **29**, 198–210 (2008)