



Interakcja addycji z tendencją do synergizmu pomiędzy olejkiem eterycznym z pomarańczy *Citrus aurantium* a flukonazolem względem pleśni *Aspergillus niger*

Additive with a tendency to synergy interaction between *Citrus aurantium* essential oil and fluconazole against *Aspergillus niger*

Paula Wróblewska-Łuczka^{1,A-D,F}, Agnieszka Góralczyk^{1,B,D}, Jarogniew Łuszczki^{1,A,C-F}

¹ Zakład Medycyny Pracy, Katedra i Zakład Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Wróblewska-Łuczka P, Góralczyk A, Łuszczki J. Interakcja addycji z tendencją do synergizmu pomiędzy olejkiem eterycznym z pomarańczy *Citrus aurantium* a flukonazolem względem pleśni *Aspergillus niger*. Med Srodow. 2022; 25(1–2): 8–13. doi: 10.26444/ms/151755

■ Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. *Aspergillus niger* jest grzybem pleśniowym odgrywającym ważną rolę w rolnictwie i przemyśle spożywczym jako czynnik zakaźny roślin i zanieczyszczenie żywności. Szczepy *A. niger* mogą uwalniać mykotoksyny zagrożające zdrowiu bądź stanowić przyczynę poważnej choroby ludzi – aspergilozy. Leczenie infekcji grzybiczych wiąże się ze stosowaniem azoli, jednak coraz częściej obserwuje się lekooporność. Rozwiązaniem przełamania lekooporności mogą stać się olejki eteryczne cytrusów, które wykazują silne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Celem pracy było ukazanie połączenia działania flukonazolu oraz olejku eterycznego pomarańczy *Citrus aurantium* oraz ocena charakteru interakcji farmakodynamicznej pomiędzy nimi przeciwko *Aspergillus niger* w badaniach *in vitro*.

Materiał i metody. Doświadczenia prowadzono metodą hodowli płytkowych, osiągając strefy zahamowania wzrostu *Aspergillus niger* pod wpływem różnych dawek flukonazolu, olejku eterycznego pomarańczowego oraz kombinacji związków. Analiza izobolograficzna pozwoliła ocenić charakter interakcji pomiędzy testowanymi związkami.

Wyniki. Testowane związki hamują wzrost *A. niger* w sposób zależny od stężenia. Wartość IC_{50} flukonazolu względem *A. niger* wynosi $IC_{50} = 2,02 \pm 0,79$ mg/ml, natomiast olejku eterycznego pomarańczowego $IC_{50} = 3,78 \pm 0,48\%$. Analiza izobolograficzna wykazała, że efektem kombinacji olejku eterycznego pomarańczowego i flukonazolu w stałej proporcji dawek 1:1 jest interakcja addytywna z tendencją do synergizmu w testach hodowlanych dla *Aspergillus niger*.

Wnioski. Olejki eteryczne są naturalnymi związkami o wielkim potencjale terapeutycznym, zaś analiza izobograficzna może przyczynić się do wprowadzenia substancji naturalnych do terapii zakażeń lekoopornych.

■ Słowa kluczowe

flukonazol, *Aspergillus niger*, pleśnie, analiza izobolograficzna, olejek eteryczny pomarańczowy

■ Abstract

Introduction and Objective. *Aspergillus niger* is a mould that plays an important role in agriculture and the food industry as a plant infectious agent and food contaminant. *A. niger* strains can release mycotoxins that are harmful to health or cause the serious human disease – aspergillosis. Treatment of fungal infections is associated with the use of azoles, but drug resistance is increasingly observed. The solution to break drug resistance may be citrus essential oils, which show a strong antimicrobial effect. The aim of the study was to combine fluconazole with the essential oil of *Citrus aurantium* and to evaluate the nature of the pharmacodynamic interaction between them in *in vitro* studies against *Aspergillus niger*.

Materials and Method. The experiments were carried out using the plate culture method, assessing the zones of growth inhibition of *Aspergillus niger* under the influence of various doses of fluconazole, orange essential oil, and combinations of the compounds. Isobolographic analysis allowed assessment of the character of interactions between the tested compounds.

Results. The tested compounds inhibited growth of *A. niger* in a concentration dependent manner. The IC_{50} value of fluconazole against *A. niger* is $IC_{50} = 2.02 \pm 0.79$ mg / ml and the IC_{50} of orange essential oil = $3.78 \pm 0.48\%$. Isobolographic analysis showed that the combination of orange essential oil and fluconazole at a fixed 1: 1 dose ratio had an additive interaction with a tendency to synergism in plate tests for *Aspergillus niger*.

Conclusions. Essential oils are natural compounds with great therapeutic potential, and isobolographic analysis may contribute to the introduction of natural substances to the treatment of drug-resistant infections.

■ Key words

moulds, *Aspergillus niger*, isobolographic analysis, fluconazole, orange essential oil

WSTĘP

Aspergillus niger jest grzybem pleśniowym odgrywającym ważną rolę w rolnictwie i przemyśle spożywczym jako czynnik zakaźny roślin i zanieczyszczenie żywności. Niektóre szczepy *A. niger* są wykorzystywane w biotechnologii do produkcji enzymów czy substancji chemicznych, np. kwasu cytrynowego [1], jak również do wytwarzania związków aromatycznych, takich jak wanilina [2]. Produkty wytwarzane przez szczepy *Aspergillus niger* posiadają status GRAS (ang. *generally recognised as safe* – ogólnie uznane jako bezpieczne). Mimo szerokich zastosowań w przemyśle niektóre szczepy *A. niger* mogą wytwarzać ochratoksynę A – nefrotoksyczną mykotoksynę, bardzo niebezpieczną dla zdrowia [3], a inne – wywoływać aspergilozę. Aspergilozę najczęściej występuje u pacjentów z obniżoną odpornością (neutropenią), choć ostatnimi czasy obserwuje się ją wśród pacjentów z PO-ChP otrzymujących kortykosteroidy, osób z niewyrównaną marskością wątroby oraz wśród pacjentów znajdujących się na oddziałach intensywnej terapii, będących w stanie krytycznym [4, 5].

Zarodniki *Aspergillus* są jednymi z dominujących składników grzybów znajdujących podczas pobierania próbek powietrza. Podstawową drogą zakażenia człowieka jest wdychanie konidiów unoszących się w powietrzu, które ze względu na mały rozmiar 2–3 µm łatwo docierają do pęcherzyków płucnych. Dawniej *A. niger* był głównie wiązany z otomykozą (grzybiczą infekcją kanału słuchowego) i zakażeniami skóry. Jednak ostatnio donoszono o rosnącej częstości występowania inwazyjnych zakażeń płuc wywołanych przez tego grzyba [5, 6].

Zazwyczaj *Aspergillus* kolonizuje tkankę płucną, powodując owrzodzenia i martwicę, przy czym często infekcja ma przebieg przewlekły. Jednak w niektórych przypadkach zakażenie prowadzi do ostrej inwazyjnej aspergilozy płuc. Inwazyjna aspergiloza płuc (ang. *invasive pulmonary aspergillosis* – IPA) jest zagrażającą życiu infekcją u pacjentów z ciężkim upośledzeniem odporności, ze znaczną śmiertelnością, wynoszącą 25–50% [5–8].

Podstawą terapii infekcji grzybiczych, w tym infekcji wywołanych *Aspergillus*, są azolowe leki przeciwgrzybicze. Azole hamują zależny od cytochromu P-450 enzym, 14-alfa-demetylazę sterolu. Enzym ten jest niezbędny do konwersji lanosterolu do ergosterolu, który jest ważnym składnikiem błony komórkowej grzybów. Zakłócenie syntezy ergosterolu prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej poprzez zwiększenie jej przepuszczalności, co powoduje śmierć komórek poprzez ich lizę [9]. Lek flukonazol jest stosowany przede wszystkim w zakażeniach grzybiczych błon śluzowych i skóry, a także w ogólnoustrojowych infekcjach wywołanych przez grzyby z rodzajów m.in.: *Candida*, *Blastomyces*, *Epidermophyton* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp. Flukonazol stosuje się także w profilaktyce zakażeń grzybiczych [10, 11].

Coraz częściej obserwuje się oporność grzybów *Aspergillus* na azole [12]. W związku z nasilaniem się zjawiska lekooporności mikroorganizmów obserwuje się trend poszukiwania nowych leków, również tych pochodzenia naturalnego. Przy zwalczaniu lekoopornych pleśni z rodzaju *Aspergillus* skuteczną alternatywę dla antybiotyków mogą stanowić olejki eteryczne izolowane z roślin [13, 14].

Olejki eteryczne są metabolitami wtórnymi roślin, w przypadku cytrusów pozyskiwane są z naowocni (skórki) poprzez

mechaniczne wyciskanie, a ich działanie przeciwdrobnoustrojowe znane jest od dawna. Olejki eteryczne cytrusów charakteryzuje wiele działań farmakologicznych. Olejek eteryczny *C. aurantium* ma działanie hamujące wzrost licznych mikroorganizmów, m.in.: grzybów *Aspergillus* [15, 16], *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listaria monocytogenes* czy *Salmonella* sp. [17, 18].

Cytrusy są bogate w witaminy, zwłaszcza witaminę C, zawierają liczne składniki mineralne oraz inne związki o działaniach prozdrowotnych. Zawartość poszczególnych składników różni się w zależności od gatunku owocu, ale także warunków uprawy czy terminu zbioru [19]. Ekstrakty pozyskiwane z różnych części roślin pomarańczy *Citrus aurantium* zawierają fitoskładniki, takie jak flawonoidy, saponiny, garbniki, alkaloidy glikozydów nasercowych i sterydy. Niektóre z tych związków mają silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe [15, 16]. Głównymi producentami owoców cytrusowych są: Brazylia, kraje azjatyckie takie jak Indie i Chiny, natomiast w Europie znaczącymi producentami są Hiszpania i Portugalia [20]. Do konserwacji owoców na czas dalekiego transportu wykorzystuje się głównie difenyl (E230), fenylofenyl (E231) czy fenylo-fenolan sodu (E232). Związki te są rozpuszczalne w wodzie, a ich roztwory w formie spryskiwań bądź moczenia w nich owoców służą zabezpieczeniu ich przed rozwojem pleśni z rodzaju *Penicillium*. Konserwanty tą są w stanie w bardzo niewielkim stopniu przeniknąć przez skórę (naowocnię) do wnętrza owocu, natomiast z samej skórki możemy je zmyć przed konsumpcją. Roztwory konserwantów są stosowane w dawkach niezagrożających zdrowiu konsumentów. Znacznie lepszą opcją zabezpieczenia owoców przed psuciem jest ich transport i przechowywanie w warunkach chłodniczych, które może trwać do 8 tygodni. Producenci różnego rodzaju ekstraktów czy olejków eterycznych o standardach farmaceutycznych produkują je z owoców, które nie były konserwowane chemicznie. Ma to znaczenie dla zapewnienia wymaganej czystości pozyskanych związków i roztworów, w tym także olejków eterycznych [15, 16, 21].

CEL PRACY

Celem pracy była ocena charakteru interakcji farmakodynamicznej pomiędzy olejkiem eterycznym z pomarańczy *Citrus aurantium* a flukonazolem przeciwko *Aspergillus niger* w badaniach *in vitro*.

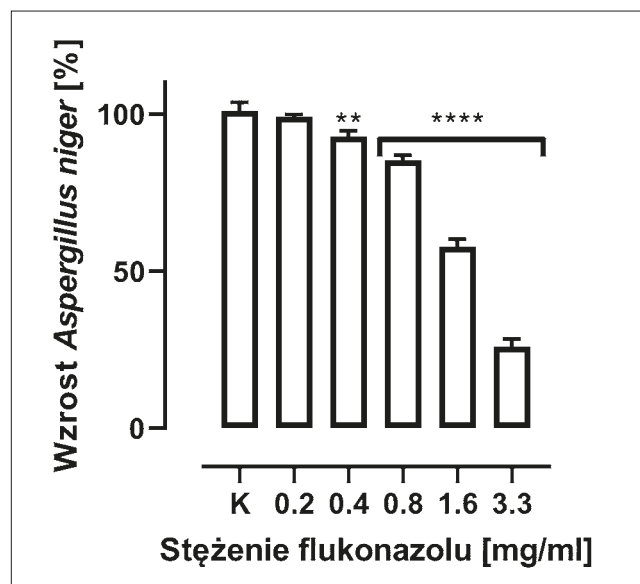
MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia prowadzono metodą hodowli płytkowej na podłożu PDA (ang. *potato dextrose agar*) (Biocorp) z dodatkiem 1% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Hodowle *Aspergillus niger* prowadzono przez 8 dni w temperaturze 37°C. Flukonazol (Sigma-Aldrich) testowano w stężeniach od 0,2 do 3,3 mg/ml, natomiast olejek eteryczny pomarańczowy (łac. *oleum citrus aurantium dulcis*, Avicenna Oil) testowano w stężeniach 1 do 15% poprzez dodanie badanego związku do pożywki hodowlanej. Każde doświadczenie przeprowadzono trzykrotnie. Po 8 dniach wzrostu zmierzono wielkość kolonii w porównaniu z kolonią kontrolą, co pozwoliło określić procent zahamowania wzrostu grzybów wywołanego dodatkiem

flukonazolu lub olejku eterycznego pomarańczowego [22, 23]. Wyniki opracowano statystycznie (analiza wariancji ANOVA) przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 8.0. Otrzymane wyniki posłużyły do wyznaczenia krzywej zależności „dawka-efekt” dla stężenia badanych substancji lub ich mieszaniny w pożywce od procentu zahamowania wzrostu *A. niger* według metody logarymiczno-probitowej [24]. Określono wartości IC_{50} (mediana stężenia hamującego) dla substancji testowych, następnie przeprowadzono test równoległości krzywych zależności „dawka-efekt” dla flukonazolu i olejku pomarańczowego. Wpływ mieszaniny flukonazolu i olejku eterycznego pomarańczowego w stałym stosunku 1:1 na *Aspergillus niger* oceniano również metodą płytkową. Przeprowadzono analizę izobolograficzną otrzymanych wyników [16, 25, 26], która pozwoliła na określenie charakteru interakcji farmakodynamicznej pomiędzy flukonazolem a olejkim eterycznym pomarańczowym.

WYNIKI

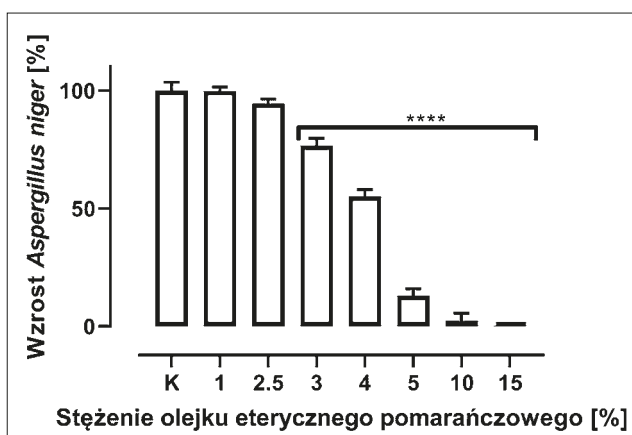
Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że flukonazol hamuje wzrost *A. niger* w sposób zależny od stężenia (ryc. 1). Flukonazol w stężeniu 0,2 mg/ml nie wywołuje żadnego efektu, jednak w stężeniu powyżej 0,4 mg/ml hamuje wzrost pleśni, a przy stężeniu 3,3 mg/ml hamuje wzrost *A. niger* o ok. 75%.



Rycina 1. Wpływ flukonazolu na wzrost *Aspergillus niger*. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm S.E. dla każdego stężenia (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs. K), K – kontrola (100% wzrostu *A. niger*)

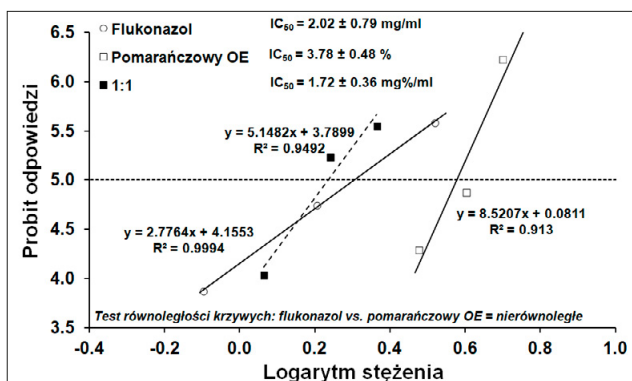
Testowany olejek eteryczny pomarańczowy *Oleum citrus aurantium dulcis* również wykazuje hamujący wpływ na wzrost pleśni *A. niger* zależny od zastosowanej dawki (ryc. 2). Stężenie olejku eterycznego pomarańczowego w pożywce wynoszące maksymalnie 1% nie powoduje żadnego zahamowania wzrostu *A. niger*. Natomiast stężenie 10-procentowe i większe olejku w pożywce powoduje całkowicie zahamowanie wzrostu *Aspergillus niger*.

Na podstawie otrzymanych wyników przy zastosowaniu metody logarymiczno-probitowej wg Litchfielda i Wilcoxon [24] narysowano wykres zależności „dawka-efekt”



Rycina 2. Wpływ olejku eterycznego pomarańczowego na wzrost *Aspergillus niger*. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm S.E. dla każdego stężenia (**** $p < 0,0001$ vs. K), K – kontrola (100% wzrostu *A. niger*)

flukonazolu, olejku eterycznego pomarańczowego oraz ich mieszaniny w stosunku 1:1. Wartość IC_{50} flukonazolu względem *Aspergillus niger* wynosi $IC_{50} = 2,02 \pm 0,79$ mg/ml, natomiast olejku eterycznego pomarańczowego $IC_{50} = 3,78 \pm 0,48$ (ryc. 3).

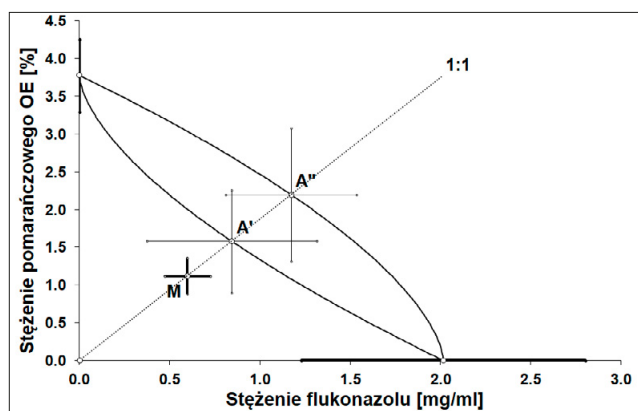


Rycina 3. Logarymiczno-probitowa zależność stężeń flukonazolu, olejku eterycznego pomarańczowego oraz ich kombinacji na zahamowanie wzrostu kolonii *Aspergillus niger*. Stężenia badanych związków zostały przekształcone na logarytmy dziesiętne a zahamowanie wzrostu kolonii *Aspergillus niger* przekształcono w probit odpowiedzi. Równania liniowych zależności dawka-efekt dla flukonazolu, olejku eterycznego pomarańczowego i ich kombinacji w stałej proporcji stężeń 1:1, pokazane są na rycinie, gdzie: x – logarytm dziesiętny stężenia badanych substancji, y – probit odpowiedzi, a R^2 – współczynnik determinacji. Linia przerywana równoległa do osi X na wysokości 5-go probita odpowiada 50% zahamowaniu wzrostu kolonii pleśni. Na wykresie ujęto również wyliczone wartości $IC_{50} \pm$ S.E.

Analiza izobolograficzna wykazała, że efektem kombinacji olejku eterycznego pomarańczowego i flukonazolu w stałej proporcji dawek 1:1 jest interakcja addytywna z tendencją do synergizmu w testach hodowlanych dla *Aspergillus niger* (ryc. 4).

DYSKUSJA

Analiza izobolograficzna jest metodą statystyczną, pozwalającą precyzyjnie ocenić farmakodynamiczne interakcje pomiędzy stosowanymi lekami czy substancjami chemicznymi. Głównie wykorzystywana jest w badaniach na zwierzętach, choć coraz częściej obserwuje się jej zastosowania w badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach nowotworowych [27, 28] czy w badaniach mikrobiologicznych [16, 29–31].



Rycyna 4. Izoblogram przedstawiający interakcję addytywną z tendencją do synergizmu dla kombinacji flukonazolu z olejkiem eterycznym pomarańczowym względem *Aspergillus niger*. Mediany stężeń hamujących wzrost *Aspergillus niger* (IC_{50}) dla flukonazolu i olejku eterycznego pomarańczowego zostały umieszczone na osiach X i Y. Odcinki umieszczone bezpośrednio na osiach X i Y przedstawiają błędy standardowe (S.E.) dla wartości IC_{50} badanych substancji aktywnych podawanych osobno. Linia o początku w punkcie (0,0) układu współrzędnych odzwierciedla stałą proporcję badanych substancji (1:1) podawanych w mieszaninie. Dolne i górne izobole addytywności przedstawiają krzywe łączące wartości IC_{50} dla flukonazolu i olejku eterycznego pomarańczowego podawanych osobno. Punkty A' i A'' przedstawiają teoretycznie wyliczone wartości IC_{50} add dla dolnych i górnych izoboli addytywności. Punkt M reprezentuje eksperymentalną wartość IC_{50} mix dla całkowitej dawki mieszaniny wyrażonej jako proporcja flukonazolu i olejku eterycznego pomarańczowego, która wywołała 50% efekt zahamowania wzrostu grzyba *Aspergillus niger*. Na wykresie wartości błędów standardowych (S.E.) są przedstawione jako poziomy i pionowy słupek błędów dla każdej wartości IC_{50} .

Flukonazol jest wykorzystywany w niektórych badaniach eksperymentalnych jako standardowy lek o działaniu przeciwgrzybiczym względem m.in.: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* [32]. Flukonazol w stężeniu 32 $\mu\text{g/ml}$ powodował zahamowanie wzrostu *Aspergillus niger* o 52,9% [33]. Inne badanie wykazało, że minimalne stężenie flukonazolu hamujące wzrost *Aspergillus niger* wynosiło co najmniej 3,12 $\mu\text{g/ml}$ [34] albo co najmniej 2,04 $\mu\text{mol/ml}$ [35]. Badania własne wykazały, że dawka IC_{50} flukonazolu ($IC_{50} = 2,02 \pm 0,79$ mg/ml), która może być porównywana z minimalnym stężeniem hamującym wzrost mikroorganizmów w 50%, jest nieco wyższa niż w prezentowanych badaniach, co może wynikać z różnic metodycznych, m.in. z użycia płytek mikrotitracyjnych [30, 36, 37] czy skrócenia czasu hodowli do 5–7 dób [37]. Jednakże wyniki własne są porównywalne z dawką flukonazolu $IC_{50} = 1,87 \pm 0,88$ mg/ml otrzymaną względem *Aspergillus fumigatus* [16].

Związki pochodzenia roślinnego, zawarte w ziołach, są stosowane przez człowieka w celach leczniczych od wieków. Roślinne związki bioaktywne są metabolitami wtórnymi roślin, które odpowiadają w roślinie za obronę bądź przystosowanie do wpływów środowiska. Związki te należą do różnych grup chemicznych związków, wśród których najczęstsze mogą obejmować fenole, terpenoidy czy alkaloidy. Wykorzystanie ziół i roślin jako lekarstw i nutraceutyków jest obecnie ważnym nurtem badań [38]. Ponadto wiadomo, że współczesna medycyna (a zatem i opracowywanie leków) częściowo opiera się na roślinnych metabolitach wtórnych, w których pierwotny związek chemiczny został zmodyfikowany w celu zwiększenia jego skuteczności [39, 40].

Poszukiwanie nowych leków jest wynikiem wyzerpywania się aktualnych możliwości leczenia m.in. infekcji bakteryjnych i grzybiczych, zwłaszcza w przypadku wystąpienia wielolekooporności szczepów [12]. Oporność na antybiotyki wynika z nadużywania leków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Wiele leków syntetycznych zawodzi, ponadto

zdarza się, że wykazują one działanie toksyczne, rakotwórcze lub są potencjalnym zagrożeniem dla środowiska. Olejki eteryczne zyskują coraz większą popularność, ponieważ liczne leki syntetyczne powodują nieprzyjemne skutki uboczne, takie jak nefrotoksyczność czy ototoksyczność. Przy zwalczaniu lekoopornych drobnoustrojów skuteczną alternatywą mogą stać się olejki eteryczne. Wiele olejków eterycznych i ekstraktów pochodzenia roślinnego wykazuje silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Ze względu na coraz większą popularność naturalnych produktów leczniczych, a także zapotrzebowanie rynku na takie produkty bardzo ważne wydają się dokładne badania właściwości roślin i ich metabolitów wtórnych, w tym olejków eterycznych [38, 41]. Wykazano, że olejki eteryczne hamują wzrost lekoopornych szczepów drobnoustrojów, wywołujących choroby, które są nawet trudne do leczenia konwencjonalnymi antybiotykami. Mechanizm działania przeciwgrzybiczego olejków eterycznych polega na ustanawianiu potencjału błonowego na ścianie komórkowej i zakłócaniu tworzenia się ATP, prowadząc do uszkodzenia ściany komórkowej. Olejki eteryczne mogą również uszkadzać błonę mitochondrialną, zakłócając system transportu elektronów [42].

Olejki eteryczne cytrusów znajdują się pomiędzy skórką a białą częścią skórki cytrusów, znaną jako albedo, zawierają różnorodne składniki bioaktywne, takie jak D-limonen, linalol, cytral, α -pinen, β -pinen i kamfen [43]. Aktywności przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne cytrusowego olejku przypisuje się obecności tych związków bioaktywnych. Doniesiono, że olejki eteryczne pomarańczy, mandarynki i grejpfruta wykazują działanie przeciwgrzybicze przeciwko *Aspergillus* i *Penicillium* spp. [44]. Działanie przeciwgrzybicze olejków eterycznych wynika z ich zdolności przenikania przez błony komórkowe mikroorganizmów, co powoduje wyciek jonów i zaburzenie struktury komórkowej. Olejki eteryczne wykazują również potencjał antyoksydacyjny ze względu na ich zdolność do neutralizowania wolnych rodników [45].

Olejek eteryczny z *Citrus sinensis*, ekstrahowany n-heksanem w dawce 200 $\mu\text{l/ml}$, hamował wzrost *Aspergillus niger* w 45%, natomiast olejek ekstrahowany etanolem już w dawce 100 $\mu\text{l/ml}$ pożywki hamował całkowicie wzrost *A. niger* [45]. W innym badaniu określono, że dawka 3,0 $\mu\text{g/ml}$ olejku eterycznego pomarańczowego z *Citrus sinensis* hamuje całkowicie rozwój grzyba *Aspergillus niger* po 7-dniowej inkubacji na podłożu PDA z dodatkiem 0,5% Tween 80. Wzrost i biomasa *Aspergillus niger* były zmniejszone w odpowiedzi na stężenia olejku eterycznego pomarańczowego w zakresie 0,1 do 3,0 $\mu\text{g/ml}$. Dawka w 50% skuteczna została określona na 0,7 $\mu\text{g/ml}$ olejku eterycznego pomarańczowego względem *Aspergillus niger* [46]. Inni badacze określili dawkę 16 mg/ml olejku eterycznego pomarańczowego jako hamującą wzrost *Aspergillus flavus* [47], zaś inne badania wykazały, że olejek z pomarańczy gorzkiej (*C. aurantium*) lub słodkiej (*C. sinensis*) hamuje wzrost *A. flavus* w 60% przy 5% stężeniu olejku w pożywce [22]. Olejek eteryczny z *Citrus aurantium* wykazuje aktywność względem *Aspergillus fumigatus*, hamując jego wzrost całkowicie przy 10-procentowym dodatku olejku do podłoża [16], co odpowiada wynikom otrzymanym w prezentowanej pracy w odniesieniu do *Aspergillus niger*. Dawka powodująca działanie hamujące wzrost *A. niger*, jakie wykazał olejek eteryczny z gorzkiej pomarańczy *C. aurantium*, została określona na 1,25 mg/ml [48], co potwierdziły również wyniki badań innych autorów [17]. Różnice mogą wynikać z różnic

gatunkowych pomiędzy grzybami użytymi w badaniach a grzybami wskazanymi przez innych autorów oraz z różnic w składzie badanych olejków eterycznych wynikających z różnych metod ekstrakcji czy sezonu uprawy cytrusów.

Istotną kwestią obecnego doświadczenia jest ocena interakcji pomiędzy flukonazolem a olejkiem eterycznym pomarańczowym względem *Aspergillus niger*, która wykazała interakcję addytywną z tendencją do synergizmu. Interakcję addytywną połączenia tych związków wykazano względem *Aspergillus fumigatus* [16] oraz *Cladosporium cladosporioides* [29]. Połączenie olejku eterycznego *Citrus aurantium* z flukonazolem oraz amfoterycyną B dawało interakcję synergistyczną w hamowaniu infekcji *Candida albicans* [49]. Łączenie olejków eterycznych ze znanymi lekami przeciwgrzybiczymi może okazać się obiecującym trendem badań przede wszystkim w przypadku mikroorganizmów lekoopornych.

PODSUMOWANIE

Poszukiwane są nowe metody leczenia chorób – zwłaszcza bakteryjnych, grzybiczych czy pasożytniczych. W związku z narastającym problemem lekooporności poszukuje się nowych rozwiązań terapeutycznych. Olejki eteryczne charakteryzują się licznymi właściwościami biologicznymi i farmakologicznymi, dlatego mogą stać się alternatywą dla leków syntetycznych. Z uwagi na szeroki zakres aktywności biologicznej i farmakologicznej mogą w niedalekiej przyszłości stać się dobrą alternatywą dla powszechnie stosowanych syntetycznych leków. Dodatkowo zastosowanie analizy izobolograficznej może przyczynić się do wprowadzenia substancji naturalnych o pożądanym aktywnościach do farmakoterapii wielu infekcji i schorzeń. Istotną zaletą olejków naturalnych jest brak ich toksyczności oraz brak efektów ubocznych ich stosowania, co odróżnia je od leków konwencjonalnych.

Obiecujące wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* zachęcają i uzasadniają konieczność przeprowadzenia dalszych badań i analiz, które mogą przyczynić się do rozwoju nowych metod terapeutycznych zakażeń grzybiczych z użyciem znanych leków przeciwgrzybiczych, których działanie uzupełnione zostałyby substancjami aktywnymi pochodzenia naturalnego.

PIŚMIENICTWO

- Park HS, Jun SC, Han KH, et al. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Adv Appl Microbiol*. 2017; 100: 161–202. doi: 10.1016/bs.aambs.2017.03.001
- Parshikov IA, Woodling KA, Sutherland JB. Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(17): 6971–6986. doi: 10.1007/s00253-015-6765-0
- Abarca ML, Accensi F, Cano J, et al. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2004; 86(1):33–49. doi:10.1023/B:ANTO.0000024907.85688.05
- Schils R, Altdorfer A, Moerman F, et al. A rare case of invasive pulmonary aspergillosis presenting as organizing pneumonia due to *Aspergillus niger* in an immunocompetent host. *Respir Med Case Rep*. 2021; 34: 101503. doi: 10.1016/j.rmcr.2021.101503
- Workum JD, de Jong SW, Gresnigt MS, et al. Microbiological and immunological characteristics of a lethal pulmonary *Aspergillus niger* infection in a non-neutropenic patient. *Med Mycol Case Rep*. 2018; 21: 4–7. doi: 10.1016/j.mmc.2018.03.002
- Vermeulen E, Maertens J, Meersseman P, et al. Invasive *Aspergillus niger* complex infections in a Belgian tertiary care hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(5): O333–5. doi: 10.1111/1469-0691.12394
- Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(7): 1149–55. doi: 10.3201/eid2007.140087
- Okamura K, Noro R, Fujita K, et al. Acute respiratory failure due to *Aspergillus niger* infection with acute fibrinous and organizing pneumonia: A case report. *Respir Med Case Rep*. 2022; 37: 101641. doi: 10.1016/j.rmcr.2022.101641
- Watt K, Manzoni P, Cohen-Wolkowicz M, et al. Triazole use in the nursery: fluconazole, voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. *Curr Drug Metab*. 2013; 14(2):193–202.
- Szymańska M, Baranowski A, Płachta D. Przegląd preparatów najczęściej stosowanych w leczeniu chorób grzybiczych. *Biul Wydz Farm AMW*. 2007;1:1–12.
- Malhotra S, Singh S, Rana N, et al. Chemoenzymatic Synthesis, Nanotization, and Anti-*Aspergillus* Activity of Optically Enriched Fluconazole Analogues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(8): e00273–17. doi: 10.1128/AAC.00273-17
- Pérez-Cantero A, López-Fernández L, Guarro J, et al. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 55(1): 105807. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.011
- Restuccia C, Oliveri Conti G, Zuccarello P, et al. Efficacy of different citrus essential oils to inhibit the growth and B1 aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019; 26(30): 31263–31272. doi: 10.1007/s11356-019-06169-9
- Wróblewska-Luczka P. Prozdrowotne działanie olejków eterycznych cytrusów. *Med Srod*. 2019; 22(3–4):39–43. doi:10.26444/ms/134758
- Abd Rashed A, Rathi DG, Ahmad Nasir NAH, et al. Antifungal Properties of Essential Oils and Their Compounds for Application in Skin Fungal Infections: Conventional and Nonconventional Approaches. *Molecules*. 2021; 26(4): 1093. doi: 10.3390/molecules26041093
- Wróblewska-Luczka P, Łuszczki J. Additivity interactions between fluconazole and citrus essential oils to *Aspergillus fumigatus*. *J Pre-Clin Clin Res*. 2021; 15(3): 116–120. doi: 10.26444/jpccr/140077
- Ben Hsouna A, Hamdi N, Ben Halima N, et al. Characterization of essential oil from *Citrus aurantium L.* flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *J Oleo Sci*. 2013; 62(10): 763–72. doi: 10.5650/jos.62.763
- Oikeh EI, Ayeubuumwan M, Irabor F, et al. Evaluation of the Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Oil and Non-Oil Extracts of *Citrus sinensis (L.) Osbeck* Seeds. *Prev Nutr Food Sci*. 2020; 25(3): 280–285. doi: 10.3746/pnf.2020.25.3.280
- Suntar I, Khan H, Patel S, et al. An Overview on *Citrus aurantium L.*: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2018; 7864269. doi: https://doi.org/10.1155/2018/7864269
- Malawski S, Kot N, Szeffler S. Growing citrus plants in Europe in the light of historic treatises on horticulture. *Agronomy Science*. 2021; 76(2): 51–75. https://doi.org/10.24326/as.2021.2.5
- Krzysztofik B, Dróżdż T, Sobol Z, et al. Metody zabezpieczenia i utrwalania surowców oraz produktów spożywczych – studium przypadku. *Kraków: Wyd. Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej*; 2015.
- Aloui H, Khwaldia K, Licciardello F, et al. Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *Int J Food Microbiol*. 2014; 170:21–28. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.017
- Budzyńska A, Więckowska-Szakiel M, Kalembe D, et al. The optimization of methods utilized for testing the antibacterial activity of essential oils. *Med Dośw Mikrobiol*. 2009; 61: 281–287.
- Litchfield JT Jr, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*. 1949;96:99–113.
- Łuszczki JJ, Mazurkiewicz LP, Wróblewska-Luczka P, et al. Combination of phenobarbital with phenytoin and pregabalin produces synergy in the mouse tonic-clonic seizure model: An isobolographic analysis. *Epilepsy Res*. 2018; 145:116–122. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2018.06.003
- Łuszczki JJ. Isobolographic analysis of interaction between drugs with nonparallel dose-response relationship curves: a practical application. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007; 375:105–114. https://doi.org/10.1007/s00210-007-0144-z
- Grabarska A, Wróblewska-Luczka P, Kukula-Koch W, et al. Palmatine, a Bioactive Protoberberine Alkaloid Isolated from *Berberis cretica*, Inhibits the Growth of Human Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells and Acts Synergistically and Additively with Doxorubicin. *Molecules*. 2021; 26: 6253. https://doi.org/10.3390/molecules26206253
- Wróblewska-Luczka P, Grabarska A, Florek-Łuszczki M, et al. Synergy, Additivity, and Antagonism between Cisplatin and Selected Coumarins

- in Human Melanoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 537. <https://doi.org/10.3390/ijms22020537>
29. Wróblewska-Łuczka P. Isobolographic in vitro interactions of fluconazole with citrus essential oils against *Cladosporium cladosporioides*. *J Pre-Clin Clin Res.* 2021; 15(1): 15–19. doi: 10.26444/jpccr/132014
30. Elefanti A, Mouton JW, Verweij PE, et al. Amphotericin B- and voriconazole-echinocandin combinations against *Aspergillus* spp.: Effect of serum on inhibitory and fungicidal interactions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(10):4656–4663. doi: 10.1128/AAC.00597-13
31. Ferro BE, Meletiadis J, Wattenberg M, et al. Clofazimine prevents the regrowth of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium avium* type strains exposed to amikacin and clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 60(2):1097–1105. doi: 10.1128/AAC.02615-15
32. Riaz T, Abbasi MA, Rehman A, et al. Enzyme inhibitory, antifungal, antibacterial and hemolytic potential of various fractions of *Colebrookia oppositifolia*. *Pak J Pharm Sci.* 2017; 30(1):105–112.
33. Łukowska-Chojnacka E, Mierzejewska J, Milner-Krawczyk M, et al. Synthesis of novel tetrazole derivatives and evaluation of their antifungal activity. *Bioorg Med Chem.* 2016; 24(22):6058–6065. doi: 10.1016/j.bmc.2016.09.066
34. Kauthale S, Tekale S, Damale M, et al. Synthesis, antioxidant, antifungal, molecular docking and ADMET studies of some thiazolyl hydrazones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017; 27(16):3891–3896. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.06.043
35. Kumar S, Lim SM, Ramasamy K, et al. Bis-pyrimidine acetamides: design, synthesis and biological evaluation. *Chem Cent J.* 2017; 11(1):80. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0312-2>
36. Sun N, Li D, Zhang Y, et al. Repurposing an inhibitor of ribosomal biogenesis with broad anti-fungal activity. *Sci Rep.* 2017; 7(1):17014. doi: 10.1038/s41598-017-17147-x
37. Wu J, Ni T, Chai X, et al. Molecular docking, design, synthesis and antifungal activity study of novel triazole derivatives. *Eur J Med Chem.* 2018; 143:1840–1846. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.10.081
38. Łuszczki JJ, Gustaw-Rothenberg K, Chmielewski J, et al. Perspektywy zastosowania leków ziołowych w związku z postępującym zanieczyszczeniem środowiska. *Med Srod.* 2019; 22(1–2):5–8. doi:10.26444/ms/117884.
39. Cisneros-Zevallos L. The power of plants: how fruit and vegetables work as source of nutraceuticals and supplements. *Int J Food Sci Nutr.* 2021; 72(5): 660–664. doi: 10.1080/09637486.2020.1852194
40. Sachdeva V, Roy A, Bharadvaja N. Current Prospects of Nutraceuticals: A Review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020; 21(10): 884–896. doi: 10.2174/1389201021666200130113441
41. Adaszyńska M, Swarcewicz M, Markowska-Szczupak A. Porównanie składu chemicznego i aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejku eterycznego otrzymanego z różnych krajowych odmian lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* L.). *Post Fitoter.* 2013; 2:90–96.
42. Tariq S, Wani S, Rasool W, et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog.* 2019; 134: 103580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580
43. Mahato N, Sharma K, Koteswararao R, et al. Citrus essential oils: extraction, authentication and application in food preservation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019; 59: 611–625. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1384716>
44. Phi NT, van Hung P, Chi PT, et al. Impact of growth locations and genotypes on antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils in Vietnam. *J Essent Oil-Bear Plants.* 2015; 18: 1421–1432. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1004124>
45. Sheikh M, Mehnaz S, Sadiq MB. Prevalence of fungi in fresh tomatoes and their control by chitosan and sweet orange (*Citrus sinensis*) peel essential oil coating. *J Sci Food Agric.* 2021; 101(15): 6248–6257. doi: 10.1002/jsfa.11291
46. Sharma N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res.* 2008; 163(3): 337–44. doi: 10.1016/j.micres.2006.06.009
47. Velázquez-Nuñez MJ, Avila-Sosa R, Palou E, et al. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control.* 2013; 31: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.029>
48. Gniewosz M, Kraśniewska K, Kosakowska O, et al. Chemical compounds and antimicrobial activity of petitgrain (*Citrus aurantium* L. var. amara) essential oil. *Herba Polonica.* 2017; 63(4): 18–25. <https://doi.org/10.1515/hepo-2017-0021>
49. Nidhi P, Rolta R, Kumar V, et al. Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol.* 2020; 262: 113135. doi: 10.1016/j.jep.2020.113135