

УДК 616.596-002.282

Новый подход к топической терапии онихомикозов

А.В. Веселов¹, К. Хонрает²¹НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия²Ойстершелл Лабораториз, Гент, Бельгия

Онихомикоз представляет собой грибковую инфекцию ногтей пальцев кистей рук или стоп, приводящую к истончению, изменению цвета и последующему разрушению и отслоению ногтевой пластинки из ногтевого ложа. Причиной возникновения онихомикозов в большинстве случаев являются дерматомицеты, а также грибы рода *Candida* и недерматомицетные мицелиальные грибы. Распространенность онихомикоза в общей популяции достаточно высока и варьирует в различных странах. Современные подходы к терапии включают использование системной терапии, являющейся основным терапевтическим подходом, топическую (местную) терапию, применяющуюся у определенной группы пациентов, и ряд немедикаментозных методов лечения. При использовании любой из терапий достижение высоких показателей эффективности представляет трудную задачу. Основной проблемой является неспособность препаратов

создавать достаточные концентрации активного вещества в структурах ногтевого аппарата. В настоящее время есть данные исследований, как новых лекарственных соединений, так и новых представителей существующих классов антимикотиков. Одним из потенциальных подходов в терапии онихомикозов может быть использование средств, приводящих к снижению pH в ткани ногтевой пластинки и ингибированию роста грибов. В данной статье представлена общая информация об эпидемиологии, этиологии и патогенезе онихомикозов, а также впервые приведены данные по фармакологии и результатам клинических исследований нового комбинированного средства для терапии онихомикозов.

Ключевые слова: онихомикоз, дерматомицеты, антимикотики, комбинированные средства, уксусная кислота.

The New Approach to the Topical Therapy of Onychomycoses

A. Veselov¹, K. Honraet²¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia² Oystershell Laboratories, Ghent, Belgium

Onychomycosis is a fungal infection of nails of fingers of the hands or feet, resulting in thinning, and the subsequent destruction, discoloration and desquamation of the nail plate from the nail bed.

The etiology of onychomycosis in most cases are dermatomycetes, *Candida* species and non-dermatomycetes filamentous fungi. The prevalence of onychomycosis in the general population is high and varies in different countries. Current approaches to the therapy include the use of systemic therapy, which is the main therapeutic approach, topical (local) therapy, administered to a specific group

Контактный адрес:
Александр Валерьевич Веселов
Alex.Veselov@antibiotic.ru

of patients and a number of non-drug treatments. When using any of the therapy the achieving of high clinical efficacy is a difficult task. The main problem is the inability to create sufficient concentrations of the active substance in the structure of the nail unit. At present, there is research data regarding a new drug compounds and the novel representatives of existing classes of antimycotics. One of the potential approaches to the treatment of onychomycosis may be the use of drugs, leading to a decrease in

pH in the nail tissue and inhibition of the growth of fungi. This article provides general information about the epidemiology, etiology and pathogenesis of onychomycosis, and also a data on pharmacology and clinical studies of the new combined preparation for the therapy of onychomycosis will be presented for the first time.

Key words: onychomycosis, dermatomycetes, antimycotics, combined preparations, acetic acid.

Определение, классификация и эпидемиология онихомикозов

Онихомикоз является разновидностью грибковой инфекции, обусловленной дерматомицетами, дрожжами или мицелиальными грибами, при которой поражается ногтевой аппарат. Онихомикоз – одна из самых распространенных клинических форм дерматомикозов, составляя около половины всех патологических состояний, связанных с ногтевой пластинкой [1].

В зависимости от особенностей патогенеза онихомикозы могут быть подразделены на первичные и вторичные. При первичном онихомикозе грибковая инвазия развивается при изначально интактной ногтевой пластинке, в то время как вторичный онихомикоз связан с фоновым нарушением структуры ногтя, что возможно при ряде заболеваний или травматическом повреждении. Следует отметить, что первичный онихомикоз встречается в значимо меньшем проценте случаев. В зависимости от локализации и типа поражения ногтевой пластинки онихомикоз подразделяется на дистальный, латеральный (дистально-латеральный) и проксимальный, а также поверхностный, нормотрофический, гипертрофический, онихолитический и тотальный атрофический онихомикоз. Дистальный и латеральный (дистально-латеральный) подногтевой онихомикоз является клиническим вариантом большинства случаев инфекции и практически всегда вызывается дерматомицетами, в частности *Trichophyton rubrum*. Пальцы стоп поражаются примерно в 25 раз чаще, чем пальцы рук, при этом первый или второй (в зависимости от длины) пальцы стопы наиболее часто вовлекаются в патологический процесс, что связано с постоянным давлением/микротравмами при ношении обуви [2].

Распространенность онихомикоза варьирует в зависимости от страны, но остается стабильно высокой. Исследование Achilles Project, проведенное в 16 европейских странах, показало, что

доля онихомикоза среди всех заболеваний стоп инфекционной или неинфекционной природы может достигать 30% [1]. Согласно результатам ретроспективного исследования, проведенного в Швеции в период с 2005 по 2009 гг., среди всех дерматомикозов онихомикоз имел наибольшую распространенность – на уровне 14,1%, за которым следовала *Tinea pedis* (4,4%) [3]. Эпидемиологические исследования в США и Канаде показали распространенность онихомикозов среди общей популяции данных стран на уровне 6,5% [4] и 14% [5] соответственно. Безусловно, распространенность онихомикозов среди отдельных популяций пациентов с факторами риска также будет варьировать и значимо отличаться от цифр, полученных в общей популяции. Так, например, у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа распространенность может превышать 50% [6].

Онихомикоз может встречаться во всех возрастных группах. В исследовании [7] 36,7% пациентов с онихомикозами были в возрасте от 21 до 30 лет, 1% пациентов был младше 20 лет и 3,3% пациентов были в возрасте старше 60 лет. Обращает на себя внимание низкая совокупная распространенность онихомикозов у детей, которая, как правило, не превышает 0,5–1% [8]. В проведенном недавно эпидемиологическом исследовании в Испании доля детей в возрасте до 16 лет составила 5,1% от всей исследованной популяции пациентов с онихомикозами, при этом *T. rubrum* был выделен в большинстве эпизодов инфекции, а в 25% случаев было отмечено присутствие сопутствующей грибковой инфекции кожи другой локализации [9]. Низкая частота встречаемости онихомикозов у детей может быть объяснена различиями в структуре ногтевой пластинки, меньшей вероятностью травматического повреждения и более быстрой скоростью роста, что способствует элиминации грибковых патогенов.

Этиология и патогенез онихомикозов

Этиология онихомикозов в большинстве случаев представлена дерматомицетами (*Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp., *Microsporum* spp.), однако, помимо данных первичных патогенов онихомикоз может быть обусловлен такими оппортунистическими возбудителями как грибы рода *Candida*, а также другими мицелиальными грибами (*Scytalidium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. и др.).

Лидирующим по частоте выделения возбудителем онихомикозов является *Trichophyton rubrum*. Среди других представителей дерматомицет следует отметить *T. interdigitale*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *Epidermophyton floccosum* и др. За последние несколько десятилетий *T. rubrum* стал наиболее частым возбудителем онихомикозов в Европе [10–12]. В уже упомянутом проведенном в Швеции исследовании *T. rubrum* был наиболее часто выделяемым патогеном (83,2%), за которым следовал *T. mentagrophytes* (7,4%) [3]. По данным ретроспективного исследования, проведенного в Хорватии в период с 1999 по 2008 гг., дерматомицеты были ответственны за 63% случаев всех поверхностных грибковых инфекций, однако наиболее часто выделяемым возбудителем был *T. mentagrophytes* (var. *interdigitalis* и var. *granulosa*) – 58% случаев, за которыми следовали *Microsporum canis* (29%) и *T. rubrum* (10%). Однако наиболее частой клинической формой дерматомикозов был онихомикоз (41%) [13]. Проведенное в Кракове (Польша) исследование в период с 1995 по 2010 гг., в котором приняло участие 5333 человек, показало, что среди возбудителей дерматомикозов лидирующим патогеном был *T. rubrum*, за которым следовал *T. mentagrophytes* [14].

Если дерматомицеты в качестве возбудителей онихомикозов наиболее распространены в странах с умеренным климатом, то грибы рода *Candida* и недерматомицетные мицелиальные грибы наиболее часто встречаются в тропиках и субтропиках, где имеет место влажный и жаркий климат. В этой связи, достаточно показательны результаты проведенного в Тунисе ретроспективного исследования, где оценивались возбудители онихомикозов за период с 1986 по 2007 гг.. Дрожжевые патогены, в частности *Candida* spp., составили 47,4% всех выделенных от пациентов возбудителей онихомикозов, при этом в случае поражения пальцев рук частота выделения *Candida* достигала 84% [15]. Кандидозный онихомикоз наиболее часто отмечается у людей, имеющих постоянный контакт с водой (повышенная влажность, высокая температура). Недерматомицетные мицелиальные грибы чаще выделяются у пожилых,

у пациентов с фоновыми грибковыми поражениями кожных покровов, а также у иммунокомпрометированных больных [16].

Патогенез онихомикозов является менее изученной областью, однако факторы, вовлеченные в процесс грибковой инвазии кожи и ее дериватов, определены. Патогенез включает несколько стадий, основными из которых являются адгезия возбудителя на поверхности кожных покровов с последующей инвазией подлежащих слоев. Вовлечение ногтевой пластинки происходит при проникновении грибковых патогенов за счет секреции ферментов, разрушающих структурные компоненты. Дерматомицеты способны к продукции кератолитических, протеолитических и липолитических ферментов. Гидролиз кератина с помощью протеиназ не только способствует проникновению возбудителя в ткани, но также обеспечивает образование питательных веществ, необходимых для роста и размножения грибковых клеток [17].

Ногтевая пластинка имеет некоторые структурные и функциональные особенности, играющие определенную роль в процессах инфицирования и инвазии. Ногтевой аппарат постоянно подвержен воздействию условий окружающей среды и микроорганизмов, но в нормальных условиях ноготь физически защищен кутикулой и дистальным подногтевым эпителием (*solehorn*). Несмотря на то что ноготь отделен от клеточноопосредованного иммунного ответа организма, он способен к формированию выраженного ответа за счет природного иммунитета [17–19].

В целом, в связи с недостаточной активностью эффективного клеточного иммунитета, ногтевой аппарат имеет предрасположенность к инвазии грибковыми патогенами при их воздействии на фоне определенных предрасполагающих факторов риска, являясь идеальной экологической нишей для длительного персистирования грибов. Это объясняет, почему онихомикоз является, как правило, хронической инфекцией, протекающей без признаков активного воспаления [18, 20].

В зависимости от этиологии достаточно четко определены факторы риска развития онихомикозов:

1) **дерматомицеты** – наследственная предрасположенность (наследуется по аутосомно-доминантному типу), пожилой возраст, мужской пол, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, первичные и вторичные иммунодефициты, гипергидроз, травмы ногтей, другие дерматомикозы;

2) **грибы рода *Candida*** – повышенная влажность и температура окружающей среды, первичные и вторичные иммунодефициты, травмы ногтей, нарушения правил гигиены;

3) **недерматомицетные мицелиальные грибы** – тяжелые первичные и вторичные иммунодефициты, травмы ногтей.

Терапия онихомикозов

В отсутствие лечения при онихомикозе существует значимый риск полного разрушения ногтевой пластинки с вовлечением в процесс окружающих кожных покровов, а также распространения инфекции, как правило, за счет аутоинокуляции. У каждого пациента с онихомикозом следует рассмотреть необходимость и возможность проведения терапии, однако решение о выборе, как подхода, так и конкретного препарата, должно зависеть от ряда индивидуальных факторов, таких как локализация поражения (кисти или стопы), количество и степень вовлечения ногтевых пластинок, общесоматический статус пациента, фоновые заболевания и сопутствующая терапия.

Для терапии онихомикозов в настоящее время доступен целый ряд препаратов, как для системного, так и для местного применения (таблица). Основной целью терапии онихомикозов является эрадикация этиологически значимого патогена, в то время как клиническое улучшение или полное восстановление пораженной ногтевой пластинки рассматриваются в качестве вторичных целей лечения. При этом следует иметь в виду, что полная эрадикация возбудителя не означает обязательное полноценное восстановление структуры ногтевой пластинки по завершению терапии, что связано с развитием дистрофических процессов, которые также могут предшествовать развитию заболевания и быть связаны с травмой или другим неинфекционным заболеванием, представляя собой одно из начальных звеньев патогенеза онихомикоза [2].

В настоящее время следующие антимикотики имеют официально зарегистрированные показания для **системной** терапии онихомикозов: **гризеофульвин, кетоконазол, итраконазол, флуконазол и тербинафин**. Следует отметить, что в связи с неблагоприятным профилем безопасности и наличием более эффективных и безопасных препаратов **кетоконазол** практически ушел из клинической практики. **Гризеофульвин**, несмотря на то что долгое время представлял собой терапию первой линии большинства клинических форм дерматомикозов, включая онихомикоз, на основании данных сравнительных исследований его клинической эффективности с азолами и аллиламинами, на сегодняшний день более не рассматривается в качестве препарата выбора. Необходимость применения высоких доз, связанные с этим нежелательные явления и относительно большая частота рецидивов на фоне терапии гризеофульвином, стали основными ограничивающими факторами его использования у пациентов с онихомикозами [21].

В настоящее время **тербинафин** – наиболее активный препарат среди системных антимикотиков в отношении возбудителей дерматомикозов вообще и онихомикозов в частности. В большинстве ситуаций тербинафин является препаратом выбора, если у пациента, по данным микробиологического исследования, выделены дерматомицеты [20, 22]. Однако он менее активен в отношении дрожжевых патогенов, так как оказывает преимущественно фунгистатическое действие на некоторые из них, например *C. albicans* и *C. parapsilosis* [23]. Показатели МПК **итраконазола** в отношении дерматомицет могут на порядок отличаться от таковых тербинафина, в связи с чем для реализации его активности требуется использование более высоких дозировок для достижения более высоких концентраций препарата. Если сравнивать клиническую эффективность тербинафина и итраконазола при лечении онихомикозов, то терапия тербинафином может обеспечивать более стойкую клиническую эффективность, чем итраконазол, у пациентов с полным первоначальным ответом на терапию [24, 25]. **Флуконазол**, как и итраконазол, активен в отношении возбудителей дерматомикозов, однако основная его роль отводится клиническим формам,

гоприятным профилем безопасности и наличием более эффективных и безопасных препаратов **кетоконазол** практически ушел из клинической практики. **Гризеофульвин**, несмотря на то что долгое время представлял собой терапию первой линии большинства клинических форм дерматомикозов, включая онихомикоз, на основании данных сравнительных исследований его клинической эффективности с азолами и аллиламинами, на сегодняшний день более не рассматривается в качестве препарата выбора. Необходимость применения высоких доз, связанные с этим нежелательные явления и относительно большая частота рецидивов на фоне терапии гризеофульвином, стали основными ограничивающими факторами его использования у пациентов с онихомикозами [21].

Наиболее часто применяемые препараты для системной и местной терапии онихомикозов

Терапия	Препарат	Схема лечения	Продолжительность лечения
Местная	Аморолфин	1–2 раза в неделю	9–12 мес., до достижения клинической эффективности
	Нафтифин	2 раза в сутки	6 мес., до достижения клинической эффективности
	Циклопирокс	1 раз в сутки	9–12 мес., до достижения клинической эффективности
Системная	Тербинафин	250 мг 1 раз в сутки	6 недель при поражении кистей 12 недель при поражении стоп
	Итраконазол	200 мг 2 раза в сутки	2 курса с 3-недельным перерывом при поражении кистей; 3–4 курса с 3-недельным перерывом при поражении стоп
	Флуконазол	150–300 мг 1 раз в сутки	3–6 мес.

обусловленным дрожжевыми патогенами (следует помнить о высокой вторичной резистентности *C. glabrata* и природной устойчивости *C. krusei*), тогда как при дерматомикозах, вызванных дерматомицетами, возможен риск неэффективности терапии. Необходимо отметить, что достаточно часто системная терапия комбинируется с применением топических антимикотиков, например **нафтифина** или **аморолфина** [20, 22].

Показаниями для системной терапии являются дистальный или латеральный онихомикоз в случае, если поражено более 3 ногтей и задействовано более $1/2$ площади ногтевой пластинки, имеется поражение матрикса, а также при проксимальном или тотальном онихомикозе [20, 22].

Говоря о системной терапии как грибковых инфекций вообще, так и онихомикозов в частности, следует помнить о необходимости четкого и постоянного контроля за возникновением нежелательных лекарственных реакций и потенциальных лекарственных взаимодействий у пациентов, получающих сопутствующую терапию. Пациентам может потребоваться модификация дозы или даже отмена терапии, если, по мнению лечащего врача, развившееся состояние угрожает жизни и здоровью пациента. Среди антимикотиков для системного применения особое внимание следует уделить итраконазолу, особенно при использовании длительных курсов терапии [26].

Показаниями для **топической** терапии онихомикозов являются поверхностный белый онихомикоз, ранние стадии дистально-латерального поверхностного онихомикоза (поражено не более 2 ногтей с распространением инфекции менее чем на половину площади ногтевой пластинки) и наличие противопоказаний для использования системных антимикотиков [20, 22].

Основной проблемой топической терапии онихомикозов является низкая способность активного вещества к проникновению в пораженные ткани и созданию там необходимых концентраций препарата. Учитывая, что возбудители онихомикоза находятся внутри ногтевой пластинки, а не снаружи нее, формы выпуска препаратов для местного применения, несмотря на достаточно высокие показатели активности *in vitro* и эффективности в целом при дерматомикозах, при онихомикозах могут оказаться малополезными. Ногтевая пластинка сама по себе является достаточно трудно преодолимым барьером для каких-либо соединений. Отдельная проблема – низкие показатели комплаентности пациентов в тех ситуациях, когда необходимо длительное применение препарата несколько раз в сутки.

Среди препаратов, наиболее часто применяющихся для местной терапии онихомикозов, следует отметить **аморолфин**, **нафтифин** и **циклопирокс**. **Аморолфин** – антимикотик для местного применения, обладающий фунгицидным действием. Механизм действия его связан с блокадой синтеза эргостерола и, как следствие, нарушением структуры клеточной мембраны, что приводит к гибели грибковой клетки. Аморолфин обладает достаточно широким спектром активности, включая дерматомицеты (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. и *Epidermophyton* spp.), дрожжи (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp. и *Malassezia* spp.) и другие мицелиальные грибы [27]. **Нафтифин**, как и тербинафин, относится к представителям класса аллиламинов. Помимо широкого спектра активности в отношении дерматомицет, дрожжевых и некоторых мицелиальных патогенов, нафтифин обладает умеренной активностью против грамположительных бактериальных возбудителей (*Staphylococcus* spp.), а также оказывает противовоспалительный эффект за счет подавления синтеза простагландинов и влияния на адгезию нейтрофилов в очаге воспаления [27, 28]. **Циклопирокс** обладает механизмом действия, связанным с влиянием на метаболические процессы в грибковой клетке. Он связывается с поливалентными катионами (Fe^{3+} и Al^{3+}), которые входят в состав различных ферментов, что приводит к блокаде внутриклеточной продукции энергии и деактивации токсических продуктов окисления. Циклопирокс активен в отношении целого ряда грибковых патогенов, включая дерматомицеты и дрожжи [27, 29]. Переносимость перечисленных препаратов для местного применения, в связи с отсутствием системного воздействия, находится на приемлемом уровне с частотой возникновения локальных нежелательных явлений не более 1–2% [27].

Существует также ряд **немедикаментозных подходов** к терапии онихомикозов, включая хирургическое лечение (как правило, при стойкой неэффективности системной терапии у пациентов с онихомикозом, обусловленным недерматомицетными мицелиальными патогенами) [30], лазерную [31] и фотодинамическую терапию [32]. Последние два подхода находятся в фазе активных исследований.

Несмотря на то что местная терапия онихомикозов в ряде клинических ситуаций не является полностью оправданным терапевтическим подходом, есть целый ряд исследований, которые направлены именно на изучение препаратов, потенциально эффективных в качестве топической терапии онихомикозов [33–36]. Наряду с инновационными лекарственными формами уже существующих

антимикотиков, а также вновь синтезированными представителями классов противогрибковых препаратов, проводятся исследования новых, в том числе комбинированных, лекарственных средств и медицинских изделий, имеющих в своем составе субстанции, влияющие на рост и размножение грибковых клеток. Одним из таких средств является медицинское изделие Excilor[®], Oystershell Laboratories¹, механизм действия которого основан на создании кислой среды в ткани ногтевой пластинки, что является неблагоприятным фактором для существования дерматомицетов. К настоящему времени проведено несколько клинических исследований, которые были направлены на оценку эффективности и безопасности данного средства у отдельных категорий пациентов.

Далее мы остановимся на основных клинико-фармакологических характеристиках этого средства, включая данные по его эффективности и безопасности при лечении онихомикозов.

Клинико-фармакологическая характеристика

Фармакология и механизм действия

В состав средства входят: этиллактат, вода (7%), уксусная кислота, усилитель проницаемости, пленкообразующее вещество и консерванты. Данное средство выпускается в форме ручки для нанесения аппликатора на пораженную ногтевую пластинку.

Органические кислоты, такие как уксусная, молочная или пропионовая кислота, являются хорошо известными соединениями, способными влиять на рост и размножение микроорганизмов, включая грибковые патогены [37]. Дерматомицеты чувствительны к низким значениям pH, т.е. к кислой среде, и при уровне pH менее 4,0 рост и размножение грибов прекращаются [38]. Они являются кератинофильными грибами и могут использовать белки в качестве источника энергии. Большое количество азота, образующегося в результате этого, представлено в виде аммонийных соединений, приводящих к защелачиванию среды, что особенно выражено, если рост грибов происходит при 37 °C [39]. Уровень pH сред для культивирования дерматомицетов примерно равен 8,0, а в культурах с присутствием кератина данный показатель может даже превышать 9,0 [38]. Оптимальный уровень pH для *in vitro* культивирования данных грибов ближе к нейтральному, составляя от 6,5 до 7,0, в связи с

чем их скорее можно отнести к щелочоустойчивым, чем алкалофильным грибам.

В норме pH ногтевой пластинки находится на уровне 5,0 [40]. Следует отметить, что чувствительность к низким значениям pH варьирует среди дерматомицетов, при этом *T. rubrum* оказывается наиболее чувствительным к кислой среде [41]. Однако исследование уровня pH в условиях роста грибковых патогенов осложняется тем, что клетки грибов в процессе своего роста могут сами приводить к изменению значений pH как в кислую, так и щелочную сторону в зависимости от конкретных видов [39]. В целом, грибковые патогены могут переносить достаточно широкий разброс значений pH, при этом большинство сред для культурального исследования грибов имеют незначительное смещение показателя pH в кислую сторону, что способствует росту, в частности, мицелиальных грибов [19].

Как уже было сказано, активность препаратов, применяющихся для терапии онихомикозов, в большой степени зависит от способности препарата проникать в ткань ногтевой пластинки. На это оказывают влияние молекулярная масса активного вещества (молекулярная масса уксусной кислоты равна 22, в то время как, например, у аморолфина она составляет 354), истонченность и гидратация ногтя, лекарственная форма препарата и наличие соединений в его составе, способствующих проникновению активной молекулы в ногтевую пластинку.

Данное средство контролирует состав микросреды в ноге путем увеличения кислотности ногтевого ложа. Постоянный гидролиз входящего в состав этиллактата с образованием этанола и молочной кислоты, а также уксусная кислота, проникая в ногтевую пластинку, приводят к выраженному и быстрому снижению pH, что является неблагоприятным для роста дерматомицетов. В исследовании по изучению активности препарата в отношении *T. mentagrophytes* и *T. rubrum* была продемонстрирована высокая фунгистатическая и фунгицидная активность в отношении этих штаммов. Следует также отметить, что, помимо активного закисления ткани ногтевой пластинки, дополнительная гидратация (7% воды) и усилитель проницаемости, входящие в состав средства, способствуют более быстрому (в среднем 32,9 секунды для проникновения в ноготь) и активному проникновению кислотных соединений в ткань ногтевой пластинки по сравнению с лаками (наименьшие значения pH в ногтевой пластине достигаются через 20 минут после нанесения препарата).

¹ медицинское изделие Excilor[®], Oystershell Laboratories зарегистрировано для применения в некоторых странах Евросоюза и в настоящее время проходит процедуру регистрации в РФ

Клиническая эффективность

К настоящему времени данное медицинское изделие (под кодовым названием Х92001018) было оценено в рамках двух клинических исследований – открытого проспективного и двойного-слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования.

Открытое проспективное исследование (протокол 09Е2994). Проспективное открытое исследование было проведено с целью оценки безопасности и эффективности медицинского изделия Х92001018 у 33 пациентов с поверхностным белым или светлым дистально-латеральным онихомикозом большого пальца стопы. В рамках протокола были использованы стандартные методики исследования, и оно было выполнено в соответствии со стандартами Качественной Клинической Практики (GCP). Медицинское изделие Х92001018 применялось у пациентов с клинически подтвержденным онихомикозом, которым было дано предписание в отношении его регулярного нанесения на пораженные ногтевые пластинки пальцев стоп два раза в сутки в течение 42 последовательных дней. Основной целью данного исследования было оценить безопасность данного медицинского продукта у пациентов с поверхностным белым или светлым дистально-латеральным онихомикозом. Второй целью было определение его клинической эффективности, включая микробиологическую активность, путем проведения культурального микологического исследования, окраски по Шиффу (PAS)² и обработки нативного материала КОН³, а также самостоятельная оценка пациентами эффективности, переносимости и приемлемости медицинского изделия Х92001018 после 42 последовательных дней его использования.

Эффективность оценивалась дерматологом на основании сравнения совокупной клинической картины состояния пролеченных ногтевых пластинок до и после 42 дней терапии (см. рисунок). Соответствующие клинические параметры, такие как дисхромия, хрупкость и слабость ногтевой пластинки, были оценены в баллах (от 0 до 4) до и после проведения терапии с последующим расчетом разницы показателей. В конце периода исследования пациентами заполнялся опросник с целью определения мнения пациентов касательно

эффективности и их отношения к медицинскому изделию Х92001018 в целом (совокупная оценка: упаковка, органолептические свойства, эффективность, переносимость и желание использовать данное средство в будущем).

В исследование были включены 33 пациента в возрасте от 26 до 60 лет (средний возраст 43±2 года), из которых 32 благополучно завершили участие в исследовании. Один пациент выбыл из исследования в связи с нежелательным явлением, не связанным с терапией исследуемым средством.

Врач-дерматолог в исследовательском центре проводил оценку эффективности и безопасности средства. У 26 (81,3%) из 32 пациентов наблюдалось улучшение клинической картины поражения ногтевых пластинок после 42 дней терапии, что проявлялось в снижении хрупкости ногтей и исчезновении (улучшении) их дисколорации.

Участники исследования при проведении опроса дали в целом высокую оценку в отношении самого медицинского продукта, особенно с точки зрения практичности и гигиеничности формы выпуска, удобства применения и эффективности медицинского изделия Х92001018. 97% пациентов в исследовании отметили улучшение состояния пораженных ногтевых пластинок и хотели бы продолжить применение медицинского изделия Х92001018 в будущем.

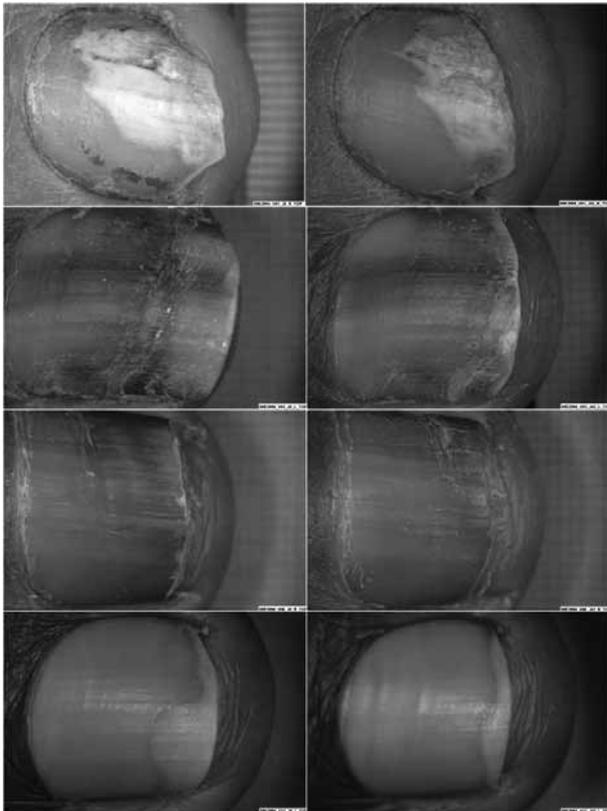
Микробиологическая оценка эффективности проводилась путем забора образцов материала до начала терапии и через 42 дня после завершения лечения. Все образцы были разделены на две группы: одна часть – для исследования с помощью окраски по Шиффу (PAS) и другая часть – для исследования с помощью КОН.

Исходно (0-й день) у 11 пациентов были положительные ответы в группе КОН и у 10 пациентов в группе PAS. Оба теста были положительны в целом у 16 пациентов. У 19 пациентов на 0-й день был положительный ответ культурального исследования в отношении грибковых патогенов. В образцах ногтевых пластинок у подавляющего большинства пациентов возбудители были представлены мицелиальными патогенами (*Aspergillus* spp., *Trichophyton* spp., *Acremonium* spp., *Scytalidium* spp., *Cladosporium* spp. и др.), а у 6 пациентов были обнаружены дрожжи (*Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Malassezia* spp. и *Rhodotorula* spp.). Грибы рода *Trichophyton* исходно были выделены у 2 пациентов.

На 42-й день только у 8 пациентов были положительные результаты теста с КОН и у 4 пациентов в группе PAS. Культуральное исследование дало положительные ответы у 13 пациентов, из которых 3 случая были расценены как контаминация. У 4

² Окраска по Шиффу (PAS, Periodic Acid Schiff) используется для выявления в клеточной стенке грибов нейтральных полисахаридов (глюкан-маннановый комплекс).

³ Обработка нативного материала КОН позволяет разрушить эпидермальные клетки, слизь, пигменты и улучшить тем самым визуализацию грибковых клеток.



А

Б

Динамика изменений состояния ногтевой пластинки до (А) и после (Б) 42 дней терапии у отдельных пациентов в рамках протокола 09Е2994

пациентов были выделены дрожжевые (*Candida* spp.), а у остальных пациентов – мицелиальные патогены. Достаточно высокий процент пациентов с положительными ответами культурального исследования может быть логично объяснен недостаточным периодом в 42 дня для полного замещения пораженных тканей здоровой ногтевой пластинкой и, в связи с этим, сохранением участков поражения, содержащих этиологически значимые грибковые патогены. Другой потенциальной причиной мог быть не до конца правильный забор материала с его контаминацией непосредственно при заборе или при транспортировке. В пользу этого говорит появление у пациентов после прохождения курса лечения возбудителей, которые не выделялись исходно на 0-й день и которые в большинстве случаев были расценены исследователями как контаминация. Помимо этого, следует принять во внимание, что основной целью терапии данным комбинированным средством является именно предупреждение распространения инфекции на окружающие здоровые ткани за счет создания неблагоприятной среды, а не прямое фунгицидное действие.

Двойное-слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование (протокол 09Е1148). Как и в предыдущем исследовании, в данном протоколе были применены стандартные методики проведения исследования применительно к пациентам с белым или светлым дистально-латеральным онихомикозом большого пальца стопы. Медицинское изделие Х92001018 или плацебо назначались пациентам согласно обычным рекомендациям по применению – два раза в сутки в течение 100 последовательных дней. Клиническая оценка проводилась дерматологом до начала и после завершения терапии исследуемым средством на 25-й, 50-й и 100-й день. По прошествии 100 дней терапии только пациенты группы активной терапии продолжили участие в исследовании в последующие 56 дней.

19 пациентов в возрасте от 26 до 60 лет (средний возраст 41 ± 3 года) были включены в исследование и 18 из них благополучно завершили в нем участие. С одним пациентом был потерян контакт на 156-й день исследования.

Эффективность медицинского изделия Х92001018 оценивалась дерматологом путем определения совокупного клинического улучшения состояния ногтевой пластинки на основании данных фотографий, сделанных на 100-й день, в сравнении с 5-м днем с использованием балльной системы. На каждом из визитов в рамках протокола исследователем оценивались онихолизис и дистрофия ногтевой пластинки (от 0 до 4 баллов), а также процент пораженной поверхности. Анализ проводился среди *per protocol* популяции пациентов ($n=18$). Группы активной терапии и плацебо не различались значимо по полу, возрасту и фототипу.

На 100-й день улучшение состояния пораженных ногтевых пластинок было отмечено у 5 из 8 пациентов из группы активной терапии и у 7 из 9 пациентов группы плацебо. На 156-й день у 6 из 8 пациентов в группе активной терапии было отмечено клиническое улучшение. Различия между группами были статистически незначимыми. т.е. как в группе плацебо, так и в группе активной терапии общий внешний вид ногтевых пластинок улучшился у большинства пациентов после 100 дней периода исследования. Однако цифровой анализ изображений, полученных на 5-й день и 100-й день, показал, что только в группе активной терапии имело место статистически значимое снижение общей площади инфекционного поражения ($p=0,013$). Данное снижение площади пораженной поверхности в группе активной терапии было значимо выше ($p=0,026$) на 100-й день в сравнении с группой плацебо.

Расхождения между результатами общей клинической оценки и показателями изменения площади инфицированной области, по всей видимости, связаны с тем, что клиническая оценка принимала во внимание все аспекты касательно состояния ногтей и что все включенные в исследование пациенты обеспечивали тщательный уход за ногтями независимо от группы терапии. Однако, когда внимание было сфокусировано на самом инфекционном процессе (цифровое определение размеров области поражения), а не на общем состоянии ногтевой пластинки, было отмечено четкое различие между группами активной терапии и плацебо, так как на данный результат здоровый внешний вид в целом, как пальца, так и ногтевой пластинки оказывали минимальное влияние.

Вторичные критерии оценки эффективности терапии включали микробиологические показатели и оценку клинической эффективности, проводимую исследователем на каждом визите.

Микробиологическая эффективность оценивалась с помощью окраски по Шиффу (PAS) и обработки нативного материала КОН по завершении 100 дней терапии. Было отмечено снижение числа пациентов с положительными пробами в группе активной терапии со 100% до 38% на 100-й день. В группе плацебо было большее число пациентов, у которых сохранились положительные ответы к концу терапии – 100% на 5-й день и 78% на 100-й день. На 0-й день у подавляющего большинства пациентов были выделены мицелиальные патогены (*Aspergillus*, *Trichophyton*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scytalidium* spp.), а у 8 пациентов были идентифицированы дрожжи (*Candida*, *Trichosporon* и *Saccharomyces* spp.). Грибы рода *Trichophyton* исходно были выделены у 4 пациентов.

При самостоятельной оценке исследователями на каждом визите таких важных параметров, как ониходистрофия и онихолизис, было отмечено статистически значимое снижение на 156-й день в сравнении с 0-м днем онихолизиса ($p=0,031$) и заметное снижение проявлений дистрофии ($p=0,062$) в группе активной терапии.

По результатам опроса пациентов (совокупная оценка: упаковка, органолептические свойства, эффективность, переносимость и желание использовать данное средство в будущем) они были очень удовлетворены всеми из перечисленных характеристик, особенно его удобной и гигиеничной формой выпуска.

Безопасность и переносимость

Учитывая отсутствие системного воздействия медицинского изделия X92001018, проведенные

исследования безопасности были направлены на изучение местных нежелательных лекарственных реакций. К настоящему времени оценка безопасности включила проведение кожно-аллергических проб (Patch test), а также результаты в рамках уже упомянутых клинических исследований.

Оценка раздражающего действия медицинского изделия X92001018 у здоровых добровольцев (протокол 09E2747). В исследовании приняли участие 10 здоровых добровольцев (8 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 18 до 26 лет. Исследуемое средство в 5% концентрации и объемом 25 мкл наносилось на спину в области лопаток, сверху которого помещалась полуокклюзионная повязка (с помощью камеры Finn Chambers на ленте Scanpor, 8 мм, 50 мм²). Также помещался отрицательный контроль, который состоял из дистиллированной воды и фильтровальной бумаги. Клиническая оценка отека и эритемы (от 0 до 3 баллов) проводилась врачом через 24 часа после нанесения препарата и контроля. По результатам исследования был сделан вывод об отсутствии раздражающего действия медицинского изделия X92001018 при местном применении.

Открытое проспективное исследование (протокол 09E2994). В открытом проспективном исследовании показатели безопасности оценивались дерматологом в начале и в конце периода исследования до и после нанесения исследуемого средства. После каждой клинической оценки пациентам было предложено самостоятельно оценить такие параметры, как чувство жжения, покалывания, боль и т. д. Пациенты также вели дневник, где давалось описание всех возникших в период исследования нежелательных явлений. В конце периода исследования пациентами заполнялся опросник, целью которого было выяснение положительных и отрицательных моментов использования исследуемого средства.

В исследование были включены 33 пациента в возрасте от 26 до 60 лет (средний возраст 43±2 года), из которых 32 благополучно завершили участие в исследовании. Один пациент выбыл из исследования в связи с серьезным нежелательным явлением и запрещенной по протоколу сопутствующей терапией. У данного пациента был перелом колена, что сделало невозможным самостоятельное нанесение исследуемого средства на пораженный большой палец стопы.

В целом в рамках протокола было зарегистрировано 8 нежелательных явлений у 6 пациентов между первым и финальным визитом, которые были представлены следующими состояниями: инфекция правого большого пальца стопы (не исследуемый палец; возникновение после травма-

тического повреждения), головная боль (n=3), боли в спине, ОРВИ, изжога. Ни одно из нежелательных явлений не было связано с исследуемым средством.

Самими пациентами было репортировано четыре функциональных и физикальных признака/симптома (12,5%) после 6 недель применения терапии, которые были представлены чувством жжения/боли/зуда в месте нанесения средства (n=3) и незначительной десквамацией кожных покровов вокруг ногтевой пластинки у одного пациента. По мнению исследователя, ни один из них не был расценен как клинически значимый. На 42-й день, согласно оценке дерматологом, не было зафиксировано ни одного из имевших место клинических признаков.

На основании указанных данных исследователями был сделан вывод о хорошей локальной переносимости исследуемого средства.

Двойное-слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование (протокол 09E1148). Хотя основной целью данного исследования была оценка клинической эффективности медицинского изделия Х92001018 при онихомикозе большого пальца стопы, но при этом также были оценены показатели безопасности. Локальная переносимость оценивалась клиницистом и самим пациентом на каждом из визитов на 25-й, 50-й, 75-й и 100-й дни. После 156 дней терапии только два пациента (по одному из каждой группы терапии – 13%) отметили появление функциональных признаков, связанных с переносимостью медицинского изделия Х92001018, которые не были расценены как клинически значимые (активная терапия – умеренные чувство жжения и боль в большом пальце стопы в течение 1–2 часов в ночное время; группа плацебо – незначительное чувство жжения в области наружного угла большого пальца стопы в течение 5 мин. после нанесения средства). Всего было зарегистрировано три нежелательных явления: два в группе активной терапии (головная боль) и одно в группе плацебо (головная боль), ни одно из которых, по мнению исследователей, не было связано с исследуемым средством. Серьезных нежелательных явлений отмечено не было.

На основании указанных данных исследователями также был сделан вывод о хорошей локальной переносимости исследуемого средства.

Заключение

Высокая распространенность онихомикозов в общей популяции требует адекватных и своевременных клинико-диагностических мероприятий. Лечение онихомикозов представляет собой при кажущейся простоте инфекции исключительно сложную задачу не только при распространенных

процессах, но и на этапе начальных проявлений заболевания. Сегодня в распоряжении врача для терапии онихомикозов имеется достаточное число антимикотиков как для системного, так и для местного применения, а также ряд немедикаментозных методов лечения. Однако высокая и сохраняющаяся со временем активность большинства используемых препаратов *in vitro* не может однозначно свидетельствовать о их клинической эффективности у того или иного пациента. Основной причиной этого является сложность достижения адекватных концентраций препарата в пораженной ногтевой пластинке, что связано как с анатомическими особенностями области поражения, так и с фармакокинетикой ряда препаратов, комплаентностью пациента и правильностью применяемых схем лечения в целом.

Не вызывает сомнений, что сегодня необходимо четко дифференцировать пациентов, которым требуется применение системной или местной терапии. Несмотря на определенные проблемы, связанные с достижением эффективных концентраций ряда препаратов для местного применения, топическая терапия продолжает активно применяться клиницистами при лечении отдельных форм онихомикозов, а в ряде ситуаций, когда невозможно использование системных антимикотиков, местная терапия остается единственно возможной тактикой достижения излечения. Также необходимо помнить о потенциальной возможности комбинированного применения системных и местных препаратов, что позволяет достичь более высоких концентраций активного вещества внутри ногтевой пластинки и привести к ликвидации инфекционного процесса.

В связи с этим на сегодняшний день продолжают исследования препаратов, как для системного, так и для местного применения, различных медицинских изделий с целью повышения эффективности и безопасности терапии онихомикозов. Одним из новых представителей таких средств для топической терапии онихомикозов является медицинское изделие под кодовым названием Х92001018, механизм действия которого связан с созданием кислой среды в пораженных тканях ногтевой пластинки, которая является неблагоприятной для существования грибковых патогенов. Эффективность и безопасность данного комбинированного средства были показаны в ряде клинических исследований у пациентов с онихомикозами большого пальца стопы. Учитывая его достаточно высокую эффективность и хорошую переносимость у данной категории пациентов, безусловно, необходимы дальнейшие исследования при других клинических формах онихомикозов и у других категорий паци-

ентов, включая оценку результатов его долгосрочного применения. Учитывая, что лечение онихомикоза с поражением пальцев стоп значимо сложнее в плане достижения эффективности терапии, с большой долей вероятности можно предположить высокие показатели эффективности при лечении онихомикоза пальцев рук. Не исключено, что его комбинация с другими применяющимися на сегодняшний день антимикотиками может быть темой для будущих клинических исследований с целью оценки возможности повышения эффективности терапии, что является краеугольным камнем медицинской проблемы онихомикозов в целом. Также вполне вероятной областью для применения может стать профилактика онихомикоза у пациентов с уже имеющимися грибковыми инфекциями других локализаций, а также при наличии факторов риска его развития, в частности при травматическом

повреждении ногтевой пластинки. Помимо всего прочего необходимо отметить, что в связи с отсутствием потенциальных механизмов резистентности грибковых возбудителей к компонентам данного средства, его активность не будет снижаться со временем, что потенциально может наблюдаться применительно к существующим классам антимикотиков.

На сегодняшний день медицинское изделие Excilor[®], Oystershell Laboratories, зарегистрировано для применения в некоторых странах Евросоюза и в настоящее время проходит процедуру регистрации в РФ. Принимая во внимание изложенные в данной статье результаты, вполне резонным будет обозначить достаточно позитивные ожидания касательно применения данного средства в популяции пациентов с онихомикозами.

Литература

- Burzykowski T., Molenberghs G., Abeck D., et al. High prevalence of foot disease in Europe; results of the Achilles Project. *Mycoses* 2003; 46:496-505.
- Clinical Mycology. Elias J. Anaissie, Michael R. McGinnis, and Michael A. Pfaller Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. 608 pp.
- Drakensjö I.T., Chrystanthou E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. *Med Mycol* 2011; 49:484-8.
- Ghannoum M.A., Hajjeh R.A., Scher R., et al. A large scale North American study of fungal isolated from nails; the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43:641-8.
- Gupta A.K., Jain H.C., Lynde C.W. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter Canadian survey of 15,000 patients. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43:244-8.
- Gulcan A., Gulcan E., Oksuz S., Sahin I., Kaya D. Prevalence of toenail onychomycosis in patients with type 2 diabetes mellitus and evaluation of risk factors. *J Am Podiatr Med Assoc* 2011; 101:49-54.
- Narotham Reddy K., Akshaya Srikanth B., Ram Sharan T., Biradar P. Epidemiological, clinical and cultural study of onychomycosis. *Amer J Dermatol Venereol* 2012; 1:35-40.
- Ahmed M., Gupta S., Gupta S. A Clinico-mycological study of onychomycosis. *Egyptian Dermatol Online J* 2010; 6:4.
- Rodríguez-Pazos L., Pereiro-Ferreirós M.M., Pereiro M. Jr., Toribio J. Onychomycosis observed in children over a 20-year period. *Mycoses* 2011; 54:450-3.
- Lehenkari E., Silvennoinen-Kassinen S. Dermatophytes in northern Finland in 1982-90. *Mycoses* 1995; 38:411-4.
- Burri C.H., Hany M. Zur Epidemiologie der Dermatophytosen in der Region Zurich. *Akt Dermatol* 1986; 12:128-32.
- Kostanje M.J., Staats C. Fungal infections in the Netherlands. *Dermatology* 1995; 190:39-42.
- Miklić P., Skerlev M., Budimčić D., Lipozencić J. The frequency of superficial mycoses according to agents isolated during a ten-year period (1999-2008) in Zagreb area, Croatia. *Acta Dermatovenerol Croat* 2010; 18:92-8.
- Budak A., Bogusz B., Tokarczyk M., Trojanowska D. Dermatophytes isolated from superficial fungal infections in Krakow, Poland, between 1995 and 2010. *Mycoses* 2013. Неопубликованные (предварительные данные).
- Dhib I., Fathallah A., Yaacoub A., et al. Clinical and mycological features of onychomycosis in central Tunisia: a 22-years retrospective study (1986-2007). *Mycoses* 2012. Неопубликованные (предварительные данные).
- Greer D.L. Evolving role of nondermatophytes in onychomycosis. *Int J Dermatol* 1995; 34:521-8.
- Monod M., Capoccia S., Lechenne B., et al. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:405-19.
- Ito T., Meyer K.C., Ito N., Paus R. Immune privilege and the skin. *Curr Dir Autoimmun* 2008; 10:27-52.
- Martinez-Rossi N.M., Persinoti G.F., Peres N.T., Rossi A. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses* 2012; 55:381-7.
- Seebacher C., Brasch J., Abeck D., et al. Onychomycosis. *Mycoses* 2007; 50:321-7.
- Van Minnebruggen G., François I., Cammue B., et al. A General overview on past, present and future antimycotics. *The Open Mycology Journal* 2010; 4:22-32.
- Roberts D.T., Taylor W.D., Boyle J.; British Association of Dermatologists. Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol* 2003; 148:402-10.
- Ryder N.S., Favre B. Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine. *Rev Contemp Pharmacother* 1997; 8:275-87.
- Zapata B., Sanclemente G., Gallego M., et al. *In vitro*

- activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35:658-63.
25. Piraccini B.M., Sisti A., Tosti A. Long-term follow-up of toenail onychomycosis caused by dermatophytes after successful treatment with systemic antifungal agents. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62:411-4.
 26. Bellmann R. Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics. *Curr Clin Pharmacol* 2008; 2:37-58.
 27. Lecha M. Effendy I., Feuilhade de Chauvin M., Di Chiacchio N., Baran R. Taskforce on onychomycosis education. Treatment options-development of consensus guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19(Suppl 1):25-33.
 28. Choi T.S., Solomon B., Nowakowski M., et al. Effect of naftifine on neutrophil adhesion. *Skin Pharmacol* 1996; 9:190-6.
 29. Subissi A., Monti D., Togni G., Mailland F. Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs* 2010; 70:2133-52.
 30. Lai W.Y., Tang W.Y., Loo S.K., Chan Y. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients undergoing nail avulsion surgery for dystrophic nails. *Hong Kong Med J* 2011; 17:127-31.
 31. Hochman L.G. Laser treatment of onychomycosis using a novel 0.65-millisecond pulsed Nd:YAG 1064-nm laser. *J Cosmet Las Ther* 2011; 13:2-5.
 32. Aspiroz C., Fortuño Cebamanos B., Rezusta A., et al. Photodynamic therapy for onychomycosis. Case report and review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2011; 28:191-3.
 33. Jo Siu W.J., Tatsumi Y., Senda H., et al. Comparison of *in vitro* antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013. [Epub ahead of print].
 34. Elewski B.E., Rich P., Pollak R., et al. Efinaconazole 10% solution in the treatment of toenail onychomycosis: Two phase III multicenter, randomized, double-blind studies. *J Am Acad Dermatol* 2012; (S0190-9622):1140-1.
 35. Emtestam L., Kaaman T., Rensfeldt K. Treatment of distal subungual onychomycosis with a topical preparation of urea, propylene glycol and lactic acid: results of a 24-week, double-blind, placebo-controlled study. *Mycoses* 2012; 55:532-40.
 36. Letscher-Bru V., Obszynski C.M., Samsen M., et al. Antifungal activity of sodium bicarbonate against fungal agents causing superficial infections. *Mycopathologia* 2012. [Epub ahead of print].
 37. Matsuda T., Yano T., Maruyama A., Kumagai H. Antimicrobial activities of organic acids determined by minimum inhibitory concentrations at different pH ranged from 4.0 to 7.0. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 1994; 41:687-702.
 38. Kunert et al. Physiology of keratinophilic fungi. In: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.). *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, 2000.
 39. Paveia M. Culture media alkalization by dermatophytes. *Mycopathologia* 1975; 55:35-40.
 40. Murdan S., Milcovich G., Goriparthi G.S. An assessment of the human nail plate pH. *Skin Pharmacol Physiol* 2011; 24:175-81.
 41. Honraet K., Rigole P., Matthijs N., Rossel B., Coenye T. Acidification as an approach to control dermatophytes. 20th EADV Congress, 20-24 October 2011, Lisbon, Portugal. Abstr. PO 480.