

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A *Penicillium chrysogenum* által termelt antifungális fehérje (PAF) vizsgálata állatmodellben

Dr. Palicz Zoltán

Témavezető:
Dr. Szentesi Péter



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN
2017

Tartalomjegyzék

Alkalmazott rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés és irodalmi áttekintés	8
<i>Az Aspergillus gombák</i>	9
A tüdőaspergillosis patológiája	9
Az aspergillosis tünetei, diagnosztikája és kezelése	11
Az IPA állatmodellekben	13
Gyógyszerek és rezisztencia	14
A PAF	18
A PAF hatása emlős sejtekre	24
A PAF stabilitásának vizsgálata	26
A PAF hatása Dermatophytonokra	29
PAF hatása a hifák növekedésére	29
A PAF szekréciójának külső környezettől való függése	32
Célkitűzés	34
Anyagok és módszerek	35
A PAF tisztítása	35
A kísérleti állatok tartása	35
A PAF intranasalis adagolása egészséges állatokon	35
Egészséges állatok intraperitonealis PAF kezelése	37
Vérvétel és sejtszámolás	38
Szövetteni vizsgálat és tüdőkárosodási ráta meghatározása	38
A PAF relatív mennyiségének meghatározása tömegspektrométerrel tüdőmintákban	39

A PAF antifungális aktivitásának <i>in vitro</i> tesztje tüdőszöveten	39
LPS-kiváltotta akut tüdőgyulladás modellje	40
A tüdőoedema meghatározása	40
Pozitron emissziós tomográfia (PET)	40
Irritációs dermatitis	41
PAF és AMB kombinációjának <i>in vitro</i> vizsgálata	42
Az <i>Aspergillus fumigatus</i> gombakonídium előkészítése	42
Az egerek megfertőzése <i>A. fumigatus</i> -szal	43
Invazív pulmonalis aspergillosisban szenvedő állatok intranasalis PAF kezelése	43
Invazív pulmonalis aspergillosisban szenvedő állatok kombinált PAF és amfotericin B kezelése	44
Vegyszerek és statisztikai analízis	44
Eredmények	46
A PAF biztonságosságának vizsgálata egészséges egereken	46
A PAF jelenléte és aktivitása a tüdőkben	48
PAF kezelés hatása a tüdőkben	49
PAF kezelés hatása bőrre	52
Az intraperitonealis PAF kezelés hatásai	53
A PAF hatásosságának vizsgálata tüdőaspergillosisban szenvedő egereken	55
Az intranasalis PAF kezelés hatása	55
Pulmonalis aspergillosisban szenvedő állatok kombinált kezelése	58
Kombinált kezelés csökkentett AMB koncentrációval	62
Megbeszélés	64

Összefoglalás	69
Summary	70
Irodalomjegyzék	71
Tárgyszavak	84
Köszönetnyilvánítás	85
Függelék	87

Rövidítések jegyzéke

5-FC	5-fluorouracil
¹⁸ FDG	2-[18 F]fluoro-2-deoxi-D-glukóz (2-[18 F]fluoro-2-deoxy-D-glucose)
α	Gompertz paraméter
ABPA	allergiás bronchopulmonalis aspergillosis (allergic bronchopulmonary aspergillosis)
ACD	savas citrát dextróz (acid-citrate dextrose)
ALT	alanin transzamináz
AMB	amfotericin-B
AST	aszpartát aminotranszferáz
ATP	adenozin-trifoszfát
AUC	görbe alatti terület (area under the curve)
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
CM	teljes tápközeg (complete medium)
COPD	chronicus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease)
cps	beütésszám/másodperc (count per second)
CT	computer tomographia
CYP	Cytochrom P-450 enzimrendszer
Da	Dalton
DMSO	dimetil-szulfoxid
DN	diszkrét nodulus (discrete nodule)
DNS	dezoxiribonukleinsav
exp	exponenciális függvény
FICI	frakcionális gátlási koncentráció index (fractional inhibitory concentration index)

FLC	egybeolvadt lobularis konszolidáció (fused lobular consolidation)
GDP	guanozin-difoszfát
GOT	szérum glutamát oxaloacetát transzamináz,
GPT	glutamát piruvát transzamináz
GTP	guanozin-trifoszfát
H ₂ DCFDA	diklorodihidrofluorescein diacetát (dichlorodihydrofluorescein diacetate)
H&E	hematoxin-eosin festés
HEPA	nagyhatékonyságú részecske szűrő (High-efficiency particulate arrestance)
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (high performance liquid chromatography)
I _h	hiperpolarizáció aktivált nem specifikus kation áram
I _k	késleltetett (rectifier) K ⁺ áram
IgG	immunglobulin G
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
IP	intraperitonealis
IPA	invazív pulmonalis aspergillosis (invasive pulmonary aspergillosis)
iv	intravénás
LAS	LEICA Application Suite V3 szoftver
LPS	lipopoliszacharid
mBq	milli Becquerel
MIC	minimális gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration)
mPAF	érett PAF (mature PAF)

MRM/SRM	többszörös reakció monitorozás/szelektív reakció monitorozás (multiple reaction monitoring/selected reaction monitoring)
mRNS	messenger ribonukleinsav
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-tetrazolium-bromid (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide)
NADPH oxidáz	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase)
NRE	fő nitrogén szabályozó fehérje (major nitrogen regulatory protein)
OD ₆₂₀	620 nm-es fénnel mért optikai denzitás
p	valószínűségi érték
PA	posteroanterior
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> antifungális fehérje
PAS	perjódsvav-Schiff festés (periodic acid–Schiff)
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PET	pozitron emissziós tomográfia
pl	plató
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát (phorbol-12-myristate- 13-acetate)
PS	foszfatidilszerin láncok (phosphatidylserine)
R ₀	kezdeti halálozási arány
R _m	túlélési arány
RGS	G-protein jelátvitel regulátor (regulator of G-protein signaling)
ROS	reaktív oxigéngyök (reactive oxygen species)
RMLM	Regional Mycology Laboratory Manchester
RNS	ribonukleinsav
ROI	vizsgált terület (regions of interest)

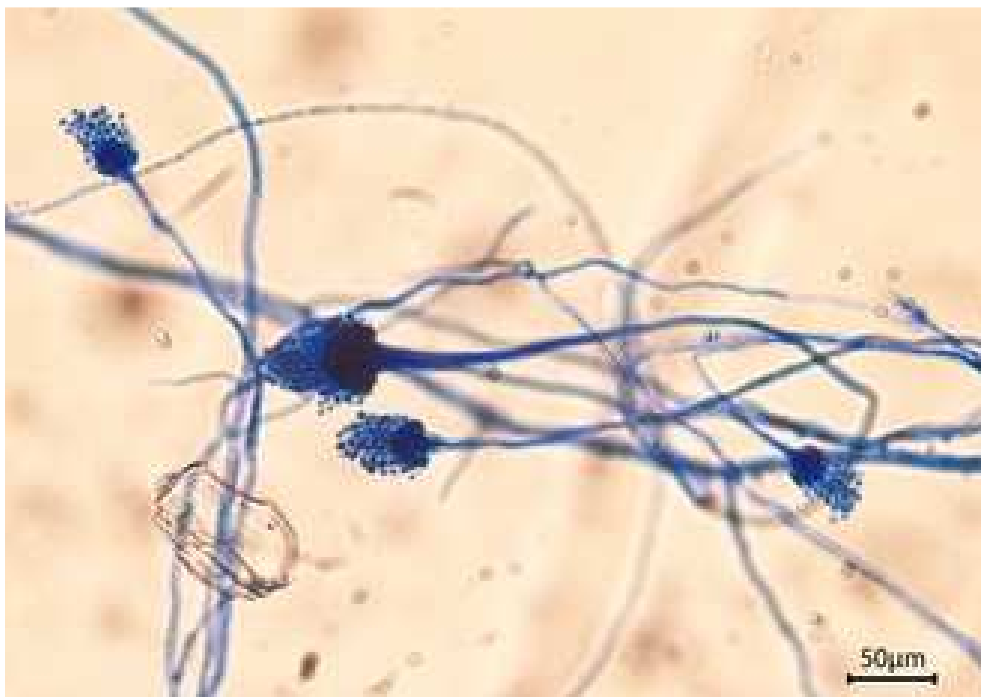
SDS/PAGE	nátrium dodecil szulfát/poliakrilamid gél elektroforézis (sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis)
SE	standard hiba (standard error)
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope)
SUV	standardizált felvételi érték (standardized uptake value)
TEM	transzmissziós elektron mikroszkóp
TNF- α	tumornekrózis faktor- α
ttkg	testtömegkilogramm
TUNEL	terminális deoxynukleotidyltranszferáz-mediált dUTP-biotin jelölés (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A tüdőaspergillosis az egyik legsúlyosabb gomba által okozott humán megbetegedés, mely elsősorban a legyengült immunrendszerrel rendelkező betegeket fenyegeti. Ezt a növekvő populációt olyan betegek alkotják, akik HIV-fertőzésben, elhúzódó neutropeniában, veleszületett immunhiányban szenvednek, vagy szerv transzplantáción és allogenicus hematopoeticus őssejt átültetésen estek át. A tüdőaspergillosis legsúlyosabb formája az invazív pulmonalis aspergillosis, mely nagyon magas mortalitási rátával jár. Ebben a betegségben a gombafonalak a tüdőben növekednek, majd az ereket infiltrálva eljuthatnak más szervekbe is, gombaszepszist és halált okozva. Kezelésére többféle antifungális szert alkalmaznak, ezek közül a legfontosabbak az azolok (itrakonazol, pozakonazol, vorikonazol). A mortalitás a kezelt betegeknél is magas, ennek egyik oka lehet a gombák antifungális szerek ellen kifejlődő rezisztenciája, amely a kutatások szerint növekvőben van. Az azolok ellen kifejlődő rezisztencia esetén sok esetben a gomba több azolra is rezisztens lesz egyszerre. Mivel az azolok az aspergillosis kezelésére használt legfontosabb gyógyszerek, az ellenük kifejlődő rezisztencia terjedése komoly problémát jelent a legyengült immunrendszerű betegek kezelése során. Emiatt sürgető feladat új antifungális szerek kifejlesztése, és a humán terápiába való bevezetése. Egyik ilyen ígéretes gyógyszerjelölt a *Penicillium chrysogenum* által termelt antifungális fehérje (PAF). Erről a proteinnél korábban kimutatták, hogy *in vitro* több pathogén gombafajra (*Aspergillus* és különböző dermatophytonok) fungicid hatással rendelkezik [1-2], illetve emlős sejtekre nincs toxikus hatása [3].

Az *Aspergillus* gombák

Az *Aspergillus* fajok a természetben mindenhol megtalálható penészgombák közé tartoznak. Többnyire szürkészöld színű telepeket alkotnak. A genus számos faja közül eddig 10 species bizonyult humánpathogénnek. Ezek opportunista kórokozók, tehát csak gyengült immunrendszerű emberek fertőződnek meg vele. A leggyakrabban izolált fajok: *A. fumigatus* (1. ábra), *A. niger*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. terreus* és *A. nidulans*. Mikroszkóppal vizsgálva őket elágazó fonalak láthatók jellegzetes konídiumtartókkal. Az *Aspergillus* fajok által okozott betegségek közül a legfontosabb a tüdőaspergillosis. Előfordulhat még a szív, a központi idegrendszer, az ízületek, a csontok, a hashártya, a trachea és a bronchusok, illetve főként trauma következtében a szem szaruhártyája, a külső hallójárat, a sinusok és az égési sebek fertőzése [4].

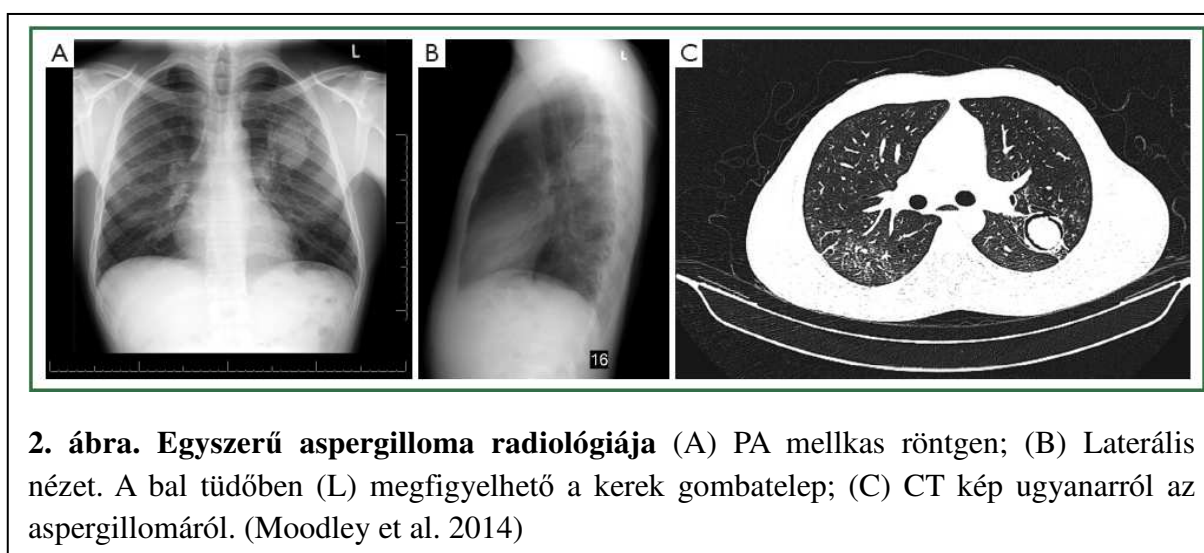


1. ábra. *Aspergillus fumigatus* képe laktofenol kékkel megfestve (100× nagyítás). Clinical & Experimental Allergy 43(8):850-873. 2013.

A tüdőaspergillosis patológiája

Az aspergillosisnak három fő formája különíthető el. Az allergiás bronchopulmonalis aspergillosis (ABPA), a fungus ball típusú pulmonalis aspergillosis és az invazív pulmonalis aspergillosis (IPA) [5]. Ismert még a kevésbé fontos krónikus nekrotizáló pulmonalis

aspergillosis és a szemiinvaszív forma [6,7]. A nem invazív formák átalakulhatnak invazív aspergillosisba, ha a beteg immunrendszere külső vagy belső hatásra romlik [8]. Az allergiás bronchopulmonalis aspergillosis egy hyperszenzitivitási reakció az *Aspergillus* (főként *A. fumigatus*) antigének ellen, ekkor az *Aspergillus* kolonizációja allergiás választ indukálhat arra hajlamos egyéneknél, főleg az asthma bronchiale-ban, cysticus fibrosisban, illetve krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) szenvedőknél [5, 9, 10]. A betegség kialakulásában az I. és III. típusú hyperszenzitivitási reakció játsza a főszerepet [11, 12, 13]. A bronchoalveolaris folyadékból végzett citológiai vizsgálatban láthatóak lehetnek a gombafonalak és eosinophil sejtek. Biopszia esetén allergiás bronchitishez hasonló képet láthatunk, bár a gombafonalak inváziója nem mindig található meg [8]. A fungus ball típusú pulmonalis aspergillosis esetén egy a tüdőben már létező üregben telepszik meg a gomba. Ezek az üregek keletkezhetnek tuberculosis vagy a tüdő cystás betegségei következtében. A gombafonalak alkotta labdában sugárirányú rendezettség látható.



Az üreg fala vagy erodált vagy metaplasticus hámmal borított. Szöveti invázió mindaddig nem látható, amíg a beteg immunrendszere jól működik (2. ábra). A szemi-invaszív formában [6] a gombafonalak erodálják és infiltrálják az üreg falát. Ilyenkor akut és krónikus gyulladásos infiltrátum is megfigyelhető különböző fokú fibrosissal és nekrozissal. Az erek inváziója azok elzáródását okozhatja, mely vérköppéssel járhat.

Invazív aspergillosisban kétféle szövettani képet különböztetnek meg. Az egyik fajta az egybeolvadt lobularis konszolidáció (FLC), mely a szokványos bronchopneumoniára hasonlít, ahol akut gyulladásos exsudatum látható az alveolusokban gomba proliferációval.

Kollikvációs nekrózis lehet jelen, melyet neutrophil infiltráció indít el. Ha bronchus is involvált a nekrózisban, üreg alakulhat ki [8, 15](3. ábra). A másik forma a diszkrét nodulus (DN), ahol egy jól körülhatárolt, kör alakú koagulációs nekrózisban sugárirányú elrendezésben helyezkednek el a gombafonalak, mely körül vérzéses zóna található. Gyulladásos infiltrátum kevésbé látható, mivel a betegek súlyos csontvelő-szupresszióban vagy agranulocytosisban szenvednek [14, 15] (4. ábra). Az invazív formában a gomba távoli szervekbe is eljuthat hematogén szóródással, pl. meningitist is okozhat [13].



3. ábra. Kísérleti pulmonalis aspergillosis patkányban. Egybeolvadt lobularis konszolidáció látható az alsó lebeny egy részében, amely hasonló az emberi betegséghez. (Shibuya et al. 2004)



4. ábra. Invazív pulmonalis aspergillosis, diszkrét nodulus. Élesen demarkálódott nodulusok láthatók vérzéssel körülvéve a tüdőmetszeten. (Shibuya et al. 2004)

Az aspergillosis tünetei, diagnosztikája és kezelése

A fungus ball típusú aspergillosis (aspergilloma) évekig tünetmentes maradhat. Enyhe vagy akár súlyos vérköpés is előfordulhat [16], melynek okozója lehet az üreg falában levő erek

gombahifák általi inváziója, gombaeredetű haemolyticus endotoxinok felszabadulása illetve a gombafonalaknak az üreg falához való dörzsölődése [17, 18, 19]. Ezen kívül krónikus köhögés, dyspnoe és ritkán láz fordulhat elő, főleg, ha más tüdőbetegség is van a háttérben. Az aspergilloma sokszor véletlenül derül ki mellkasröntgenen, illetve vérköpés miatti kivizsgáláson. A diagnózishoz szükség lehet mellkas CT-re is [20](2. ábra). A köpet vizsgálata 50 %-ban pozitív [21], *Aspergillus*-ellenes IgG antitestek az esetek többségében jelen vannak, de lehetnek álnegatív esetek, ha nem *A. fumigatus* okozza a fertőzést, illetve ha a beteg kortikoszteroid kezelést kap [22]. Azonnali bőrreaktivitás vizsgálat csak az esetek kis százalékában pozitív [13, 21]. Terápiája a sebészi kimetszés, illetve itraconazol vagy vorikonazol kezelés [23].

Az allergiás bronchopulmonalis aspergillosis tünetei a zihálás, barna köpet, pleuraeredetű mellkasi fájdalom és láz [24]. Diagnózisához mellkas röntgen [25] illetve CT felvétel lehet szükséges. Az IgE szint emelkedett lehet [26], a gomba kitenyészthető lehet a köpetből, *A. fumigatus* antigének elleni azonnali bőrreaktivitás és emelkedett szérum IgG antitest szint kimutatható [11]. Terápiája orális kortikoszteroidokból és esetleg itraconazolból, vorikonazolból vagy pozakonazolból áll [13, 23].

Az invazív pulmonalis aspergillosis legfőbb rizikófaktorai a neutropenia [27-31]. A fertőzés általában az alsóbb légutakba bejutott spórákból indul ki, de előfordulhat a sinusok, a gastrointestinalis traktus vagy a bőr fertőzése nyomán is [32-35]. Tünetei megfelelnek a bronchopneumoniának, lázzal, köpettel, köhögéssel és nehézlégzéssel. Előfordulhat még pleura eredetű mellkasi fájdalom és enyhe vagy súlyos vérköpés is. Lehet izolált tracheobronchitis is, ulcerációkkal és plakk-képződéssel. Ha a hifák elérik és infiltrálják az ereket, vérzés és infarktus alakulhat ki a tüdőben, illetve a gomba hematogén szóródásához vezet, elsősorban az agyba, a bőrbe, vesékbe, pleurába, szívbe, nyelőcsőbe vagy a májba [36]. A diagnózisban segít a köpet tenyésztése [37-41], mellkasröntgen [42-43], CT felvétel [44, 45-49], bronchoszkópia [50], tüdő-biopszia [51], illetve bronchoalveolaris lavage [52-53]. A biztos diagnózist a hifák kimutatása adja meg szövetszövetbiopsziából meténamin-ezüst impregnációval, illetve perjódsav-Schiff festéssel (PAS). A szerológiai és tenyésztési leletek esetén az eredményt megghamisíthatja a gomba jelenléte a környezetben illetve az a tény, hogy a kolonizáció jelen lehet invázió nélkül is [13]. Terápiájában vorikonazol, amfotericin-B, (újabbán liposzómális és lipid komplex változata), kaszopofungin, mikafungin, pozakonazol, itraconazol alkalmazása, esetleg sebészi kimetszés lehetséges [23].

Az IPA állatmodellekben

A leggyakrabban alkalmazott laboratóriumi állatok a beltenyésztésű egerek, habár gombafertőzéses modellt kifejlesztettek főemlősökön, nyulakon, tengerimalacokon, patkányokon, hörcsögökön, madarakon, zebrahalakon, és kutyaféléken is. Az egerekkel való kísérletek előnye, hogy az immunológiai reagensek és a rágcsló törzsek széles spektruma elérhető, beleértve a növekvő számú géndeficiens és transzgén törzseket [54]. Emellett az alacsony költség és helyigény is lényeges. A nagyobb állatmodellek előnye viszont, hogy szövettani, illetve szerológiai vizsgálatokat ismételtelen lehet végezni. A farmakológiai kutatásokban viszont, az antifungális szerek rágcslók általi metabolizmusa nem feltétlenül tükrözi a humán farmakokinetikát és farmakodinamikát. A nagyobb állatok hátránya a nagyobb költség és tenyésztési követelmények, intenzívebb monitorozást igényel a kísérleti fertőzés során, kevesebb molekuláris reagens (pl. antitestek) áll rendelkezésre, és nincsenek genetikailag meghatározott törzsek. Ezek a tényezők mind korlátozzák a kivitelezhető kísérletek számát. Így a laboratóriumi egerek a legideálisabbak a legtöbb mikológiai vizsgálathoz. Viszont fontos különbségek is vannak az egerek és az emberek között, melyeket figyelembe kell venni a kísérleti eredmények értékelésénél. Például lényeges különbség van a gombaflórában, melyet főként a nyálkahártyák gombás fertőzéseit vizsgáló kísérleteknél figyelembe kell venni. Különbségek vannak a biokémiai útvonalakban is, melyet a rágcslókon nyert kísérleti adatok humán terápiás stratégiákra való extrapolálásánál kell megfontolni. Hasonlóan az immunkompetens emberekhez, az egerek természetes módon nagyon ellenállóak az *Aspergillus fumigatus* általi intratracheális fertőzéssel szemben, és a spórák nem képesek invazív hifákat létrehozni a légzőrendszerben. Ezért számos különböző modellt fejlesztettek ki az invazív pulmonalis aspergillosisra, ezek különböző immunszuppresszív szerek adagolásán (pl. kortikoszteroidok, ill. myelotoxikus kemoterápia), vagy az antifungális védekezési mechanizmusok genetikai hiányán alapszanak (pl. NADPH oxidáz). Ezekben a különböző rágcsló modellekben a pathogenesis és a betegség progressziója különböző és a gazdaszervezet immunfunkcióinak alapvető sérülését tükrözi [55]. A kemoterápiával kezelt egerekben az akadálytalan gomba növekedés, terjedés és az invazív hifák által a parenchymális struktúra pusztulása a fő mechanizmusa a szövet sérülésnek és az állatok halálának. Az antifungális hatású amfotericin B (AMB) adagolásával a rágcslók túlélése meghosszabbítható. Kortikoszteroiddal kezelt egerekben a gomba növekedése szignifikánsan csökkent a kemoterápiával kezelt egerekkel összehasonlítva, és a

funkcionálisan működésképtelen neutrophilok masszív beáramlása rosszul szabályozott válaszokat indít be, mely szövetkárosodással, hypoxiával, patológiás immunreakcióval, és az amfotericin B adagolásra adott válasz hiányával jár [55-56]. Tehát a gazdaszövet mikrokörnyezetének változásai az invazív aspergillosis különböző modelljeivel együtt befolyásolják a gomba növekedését és virulenciáját.

A bejuttatás módja kritikus részét képezi a gomba fertőzések gerinces állat modelljeiben. Ideálisan a spórákat a fertőzés fiziológiásan releváns útján keresztül érdemes bejuttatni. A különböző kísérleti modellekben nagyon sokféle fertőzési módot fejlesztettek ki a szisztémás (intravénás, intraperitonealis), pulmonalis (intranasalis, intratrachealis, inhalációs), nyálkahártya (oropharyngealis, vaginális), gastricus (gyomorszondán keresztül), felszíni (pl. bőr abrázio és lokális alkalmazás), dermalis (subcutan), szem (cornealis), és központi idegrendszeri (intracranialis, intracisternalis, intrathecalis) mycosisok vizsgálatára. A szisztémás gombafertőzéseket a gombasejtek intravénás beadásával lehet modellezni, de ez a módszer kikerüli a nyálkahártyán keresztüli immunvédekezést, amelyet a fertőzésnek át kell törnie, mielőtt a fungaemia kialakulna. A fertőző spórák belélegzésével terjedő gombabetegségek rágszálókban történő modellezéséhez folyékony gombakonídium szuszpenzió intranasalis vagy intratrachealis befecskendezése, illetve száraz gomba sejtek inhalációja szükséges. A folyékony gombakonídium szuszpenzió előnye intranasalis vagy intratrachealis fertőzés létrehozásánál, hogy a beadott mennyiség precízen kontrollálható, és kalibrálható, hogy minimális különbség legyen a különböző kísérletek között. Emellett a beadott mennyiség széles határok között változtatható, és az intratrachealis bevitel biztosítja, hogy a megfelelő dózis eléri a tüdőket. A gombasejtek intranasalis bevitele általánosan használt tüdőbetegség létrehozására, mivel a technika könnyen kivitelezhető [57], hátránya viszont, hogy a gombasejtek tüdőbe való bejutása változó lehet, mivel a sejtek gyakran nem érik el a terminális légutakat. A rágszáló intranasalis infekciós modellekben az *Aspergillus fumigatus* spórák lerakódhatnak a nagyobb légutakban az alveolusok helyett, ami a humán betegség tipikus helye [58-60]. Az intranasalis infekció alternatívája katéter behelyezése a hangszalagok alá, és így a gombasejtek intratracheális bejuttatása [61].

Gyógyszerek és rezisztencia

A sejtmembrán alkotóelemeiben levő különbségek és a sejtfal jelenléte ellenére a gombák metabolikusan hasonlóak az emlős sejtekhez és ezért kevés pathogén specifikus célmolekulát

ismerünk. A szisztémás antifungális szereket aszerint lehet csoportosítani, hogy a sejt melyik alkotórészére fejtik ki a hatásukat. Az azol és polién típusú antifungális szerek hatásukat az ergoszterolon keresztül fejtik ki, ami sok patogén fonalas gomba sejtmembránjának esszenciális szterol alkotórésze. A 14 α -demetiláz (lanoszterol demetiláz), egy gomba citokróm P450 (CYP) függő enzim, amely az ergoszterol bioszintézisében katalizál egy lépést. Ezen enzim gátlásával, az azol típusú antifungális szerek lecsökkentik a sejtmembránban az ergoszterol szintjét, ezzel a membrán fluiditását, és a toxikus 14 α -metilált szterolok felhalmozódását okozzák, ezzel a növekedés leállítását, esetlegesen a gombasejt halálát okozzák [62]. Mivel ez a gátlás nem teljesen szelektív gombákra, a humán CYP enzimek azolok általi párhuzamos gátlása gyakran felelős a farmakokinetikai gyógyszer kölcsönhatásokért. Az azolok egy hem-tartalmú zsebhez kötődnek a 14 α -demetiláz enzimen [63]. A 14 α -demetiláz kötőhely konformációjának és az azolok struktúrájának különbségei nagyban meghatározzák minden gyógyszer kötődési affinitását, és néhány gombafajban a triazolok közötti keresztrezisztencia lehetőségét is [63]. A ketokonazolból származó molekulák esetén (pl. itrakonazol, pozakonazol) az apoláris oldalláncok meghosszabbítása fokozza az azolok kötődését a 14 α -demetiláz apoproteinhez, fokozott spektrumú aktivitást okozva penészgombafajokkal szemben [64]. A vorikonazol, a flukonazol egy származéka egy α -o-metil csoporthoz kapcsolódik, amely közvetíti az aktivitását *Aspergillus* fajokkal és egyéb fonalas gombákkal szemben [64-65]. A triazol antifungális szerekkel szembeni rezisztencia leggyakrabban a 14 α -demetiláz azol kötő zsebének mutációjának eredménye [64-65] illetve az *MDR1* efflux pumpák overexpressziójának, amely a flukonazolt pumpálja ki, illetve a *CDR1* és *CDR2* multidrog adenosin trifoszfát-függő efflux pumpák overexpressziójának, melyek minden triazolt képesek eltávolítani, ezáltal keresztrezisztenciához vezetve [66-67]. Az azolok mellett az aspergillosis terápiájára alkalmazott gyógyszerek közé tartoznak még az amfotericin B és a kaszopofungin. Ezek csak intravénásan adhatók invazív aspergillosis esetén, míg krónikus és allergiás aspergillosisban korlátozottan használhatóak. Az azolok az egyetlen orálisan alkalmazható gyógyszer-csoport [23, 68].

Aspergillus fajokban elsőként 1997-ben jelentettek itrakonazol rezisztenciát három Kaliforniából származó klinikai izolátumban [69]. Az *A. fumigatus* klinikai izolátumokban leírt elsődleges rezisztencia mechanizmus a célfehérje mutációja. Az *Aspergillus* fajokban a *cyp51A* gén kódolja az azolok célfehérjéjét, a már említett lanoszterol 14 α -demetilázt. A mutációk az enzim strukturális változását okozhatják, ami a gyógyszerek kötődését

megakadályozhatja. Rezisztenciát okozó mutációkat leírtak a gén 54. [70-74], 220. [70, 75-76], és 98. [77-79] kodonjában. Egyéb mutációkat is találtak a génben, ezek feltételezhetően más mechanizmussal okoznak rezisztenciát [72, 80-81].

Egy tanulmányban 519 db *A. fumigatus* RMLM izolátum érzékenységét határozták meg [82]. Minden izolátumot megvizsgáltak az itraconazol és amfotericin B iránti érzékenységre, 456 és 118 izolátumot vizsgáltak vorikonazol és pozakonazol iránti érzékenységre. Utána minden itraconazol rezisztens izolátumot megvizsgáltak vorikonazolra és pozakonazolra. Az amfotericin B érzékenység megmaradt a 34 vizsgált itraconazolra rezisztens izolátumban. Ezek közül 65% [83] keresztrezisztens volt vorikonazolra és 74% [84] keresztrezisztens volt pozakonazolra. Olyan izolátumot nem találtak, amely rezisztens volt vorikonazolra vagy pozakonazolra, míg itraconazolra érzékeny lett volna. A 400 izolátum 5%-a volt rezisztens itraconazolra, amikor az azonos betegből származó duplikált izolátumokat eltávolították az elemzésből. A teljes itraconazol rezisztencia gyakoriság 7% volt (n=519). Az első azol rezisztencia esetet ebben a mintagyűjteményben 1999-ben találták. 2004 óta (8%) a rezisztencia gyakorisága szignifikánsan növekedett a 2004 előtti időtartamhoz képest [82].

Az azolokhoz hasonlóan, az allilamin terbinafin az ergosterol bioszintézisét gátolja a szkvalén monoxigenáz gátlásával. Ez egy gombaenzim, amely a szkvalének szkvalén epoxiddá való átalakításáért felelős, ami a lanosterol egy prekürzora az ergosterol szintézis útvonalában [63]. Orálisan szedve, a terbinafin a bőrben és a körömágyakban koncentrálnak, és viszonylag alacsony a vérben a koncentrációja. Használata emiatt az onychomycosis és bőrgomba kezelésére korlátozódik [85]. A széles spektrumú polién amfotericin B is a sejtmembránra hat. Az amfotericin B közvetlenül kötődik az ergosterolhoz, komplexet képez, ami beépül a sejtmembránba, ezáltal pórust formál, és a sejt tartalmának kiáramlásához vezet [86]. Az amfotericin B nagyobb affinitással rendelkezik az ergosterolban gazdag gomba sejtmembránok iránt, mint a koleszterolban gazdag emlős sejtmembránok iránt, habár ez a specificitás nem mindig érvényesül, ha a gyógyszer felhalmozódik szervekben, mint a vese, ahol direkt károsodást okozhat a disztális tubulus membránjában [87]. Ezért a nephrotoxicitás egy általános dózis limitáló mellékhatása az amfotericin B terápiának. Az amfotericin B emellett közvetlenül stimulálja a mononuclearis fagocita sejtek proinflammatoricus citokinjeinek felszabadulását, ezért gyakran okoz lázat, hidegrázást és izomgörcsöket az infúzió beadása közben [88-89]. Ez a reakció csökkenthető az amfotericin B lipid hordozóhoz kapcsolásával. Ebben az esetben kevésbé halmozódik fel a vesében, ami

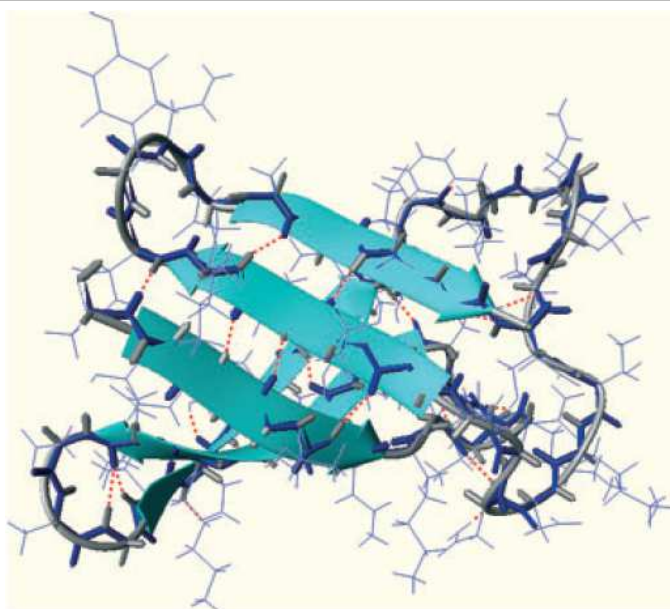
csökkenti, de nem szünteti meg teljesen a nephrotoxicitást [90]. Két formula – egy liposzómális formula és egy lipid komplex – használt általánosan az invazív gombás fertőzések széles spektrumának kezeléséhez. Habár az amfotericin B rezisztencia kialakulása terápia közben ritka klinikai jelenség, a sejtfalba alternatív szterolok beépítése [66, 91] és a sejtmembrán oxidatív károsodása iránti fokozott védelem neutralizáló enzimek termelése révén [92] két mechanizmus, amit eddig felfedeztek természetes vagy szerzett amfotericin B rezisztenciával rendelkező klinikai izolátumokban. A jelenleg klinikai használatban levő antifungális szerek közül az echinocandinok az egyetlenek, amelyek a gomba sejtfalat támadják a β -1,3-D glükán polimerek szintézisének kompetitív gátlásával – ezek a fő keresztkötések létrehozó strukturális komponensei a sejtfalnak néhány patogén gombában [93]. Az echinocandinok a β -1,3-D glükán szintáz enzim komplexhez kötődnek az érzékeny gombákban, egy csökkent glukantartalmú sejtfalat eredményezve, ami érzékeny az ozmotikus lízisre, főként a gyorsan növekvő sejtekben [94]. A β -1,3-D glükán polimerizáció mértéke a gomba sejtfalban és a glukan szintáz enzim expressziója nagyban meghatározza ennek a gyógyszercsoportnak a spektrumát, melyről azt tartják, hogy fungicid hatása van a *Candida* fajokra és fungisztatikus az *Aspergillus* fajokra [95]. Legfontosabb képviselői a kaszpfungin és a mikafungin, és az anidulafungin. Habár az echinocandin rezisztencia relatíve ritka klinikai jelenség, a glükán szintáz *FKS1* és *FKS2* katalitikus alegységeinek egyes régióiban jelentkező mutációk esetén az echinocandin csökkent gátló aktivitással rendelkezik az enzimmel szemben, magasabb a minimális gátló koncentráció (MIC), és a terápia sikertelenségének nagyobb lesz a kockázata [96].

Az antifungális szerek két csoportja szelektíven a gombák intracelluláris folyamataira hatnak hasonlóan a rákterápiában használt kemoterápiás szerekhez, és ezek általában nem hatékonyak monoterápiában szisztémás mycosisokban. A flucitozint (5-FC) 2 gombaszpecifikus enzim veszi fel szelektíven, a citozin permeáz és a citozin deamináz, és a citosztatikus hatású 5-fluorouracillá alakul át a gombasejtekben, ahol az aktív szer gátolja a timidilát szintáz, és az RNS hibás kódolását okozza [87, 97]. Habár az állandó intestinális baktérium flóra az emberi bélben képes átalakítani az 5-FC-t 5-fluorouracillá, amelynek hányinger, hányás, hasmenés és a csontvelő vérképzésének csökkenése lehet a következménye [87, 98]. A flucitozin elsősorban élesztőgombák ellen hatékony, de más szerekkel kombinációban kell adni, hogy elkerüljük a rezisztenciát, amit a citozin permeázban és citozin deaminázban jelentkező mutációk okoznak, a szer csökkent felvételével és

átalakításával az aktív formába [98]. A grizeofulvin egy szisztémás antifungális szer, amely a tubulinhoz kötődik, a microtubulus képzést befolyásolva. Mivel a szer a keratinocytákban koncentrálódik, csak neminvazív dermatophyta infekciókban használatos. Érdekes módon, a grizeofulvin gátolja sok ráksejtnek a proliferációját *in vitro*, ami miatt felmerült a lehetősége az alkalmazásának mellrák esetén adjuváns szerként [67].

A PAF

Ígéretes gyógyszerjelölt az *Ascomycota* közé tartozó *Penicillium chrysogenum* által termelt antifungális fehérje, a PAF. A ciszteinben és lizinben gazdag fehérje 55 aminosavból áll, a molekulatömege 6,25 kDa (5. ábra).



5. ábra. A PAF szerkezete diszulfid hidak nélkül (Batta et al. 2009)

Kationos jellege miatt ioncserélő kromatográfiával tisztítható a gomba által termelt felülúszóból. Sok fonalas gomba iránt fejt ki citotoxikus hatást *in vitro*, köztük fontos növény- és állatpatogének ellen is, miközben emlős sejtekre nem fejt ki káros hatást. Az *Ascomycota* közül számos fajt találtak eddig, amely a PAF-hoz hasonló antifungális proteint termel, ezek például az *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus niger* és *Penicillium nalgiovense* [99-101]. Más fajok által termelt fehérjékkel nem mutat homológiát. A PAF prekursor proteinként termelődik: egy 18 aminosavból álló szekrécióhoz szükséges szekvencia után egy 19 aminosavból álló proszekvencia következik N terminálisan, ez utóbbi eltávolításra kerül a

szekréció során, mely után a fehérje elnyeri a harmadlagos szerkezetét és a funkcióképességét [102]. 13 lizin maradék okozza a nettó pozitív töltést, míg hat cisztein maradék diszulfid hidakban vesz részt. Az így kialakult harmadlagos szerkezet nagy stabilitást biztosít a környezeti tényezőkkel szemben.

A legfontosabb mikroorganizmusok, melyek ellen a PAF hatékony, az *Aspergillus* család tagjai (*A. fumigatus*, *A. niger*) és a *Botrytis cinerea*. Prokarióták és élesztők ellen nem figyeltek meg hatást [1, 103-105]. A legérzékenyebb mikroorganizmusok esetében szubletális dózisban adagolva a növekedés lassulását figyelték meg, míg a dózist növelve fungicid hatás volt látható. A minimális gátló koncentráció (MIC) mikromoláris volt. Ez összevethető a többi antifungális szerrel: *A. fumigatus* esetében a minimális gátló koncentráció 4 μ M volt amfotericin B-re és kaszpopunginra, 6 μ mol itrakonazolra, és 12 μ mol vorikonazolra. A legérzékenyebbek a konídiumok: 8 μ mol PAF megakadályozza az *A. niger* spórák kifejlődését és telepképzését. A PAF eltávolítása nem szünteti meg ezt a hatást. Ezzel szemben, 8 μ mol PAF 24 órás folyékony *A. niger* kultúrához adva fungisztatikus hatást fejt ki: a hifák növekedése megáll, de nem pusztulnak el. A szubletális dózisú adagolás esetén kialakuló növekedési lassulás a morfológia látványos megváltozásával jár: deformált hifák keletkeznek fokozott elágazódással, hifavégek szétrobbanásával [1], mely hasonlít bizonyos növényi defensinek hatásához [106-108]. A PAF hatását erősen befolyásolja az oldat ion összetétele. Magnézium vagy kálium ionok részlegesen semlegesítik a hatását, de a nátrium ionoknak nincs ilyen hatása [1]. Indirekt immunfluoreszcens festéssel a PAF internalizációja kimutatható volt, de csak az érzékeny gombák esetén [109]. A PAF-specifikus fluoreszcens jel eloszlása citoplazmatikus lokalizációt jelez, mely nincs összefüggésben sem a sejtmaggal, sem a sejtben található nukleotidokkal [104]. Az internalizáció függ a protein funkcionális struktúrájától, az organizmus metabolizmusától, ATP és aktin filamentumok jelenlététől. Ezek egy endocytosis jellegű folyamatra utalnak [109]. Sok antimikrobiális fehérje pórusképző aktivitással rendelkezik [110-116], de a PAF esetén ez nem volt igazolható. Korábbi vizsgálatok szerint egyes antifungális fehérjék hatásukat a heterotrimer G-proteinen keresztül fejtik ki [117-120]. Az *flbA* és *fadA* gének egy G-protein jelátvitel regulátort (RGS) és egy heterotrimer G-protein α -alegységet kódolnak. Mindkét gén a sejtnövekedés és konídiumképzés közötti egyensúlyt szabályozza *A. nidulans*-ban. A Δ *flbA* mutáció fokozza a G α alegységek intrinzik GTPáz aktivitását, mely az intracelluláris jelátvitel negatív szabályozásában nyilvánul meg. A Δ *flbA* mutánsok korábbi vizsgálatok szerint „szőrös

autolízis” fenotípust mutatnak, mert nem képesek az átmenetre a vegetatív növekedésből a konídiumképzésbe [121-123]. A *fadA*^{G203R} mutáció (a 203-as pozíciójú glicin argininre cserélése) a FadA guanidin nukleotid kötő doménjén következik be, és befolyásolja a G α alegység leválását a G $\beta\gamma$ alegységről, mely a heterotrimer G-protein jelátvitel konstitutív inaktivációjában, csökkent növekedésben és intenzív konídiumképzésben nyilvánul meg [123]. A *fadA* génben mutáns transzgenikus *A. nidulans* törzsek segítségével sikerült kimutatni, hogy a PAF a G-proteinen keresztül fejti ki hatását. A mutáns FGSC1035 *A. nidulans* törzsekkel végzett proliferációs vizsgálatok csökkent PAF-érzékenységet mutattak. Viszont a *flbA* deléciója nem tudta megmenteni az RJH046 törzset a PAF citotoxikus hatásától, és a PAF érzékenység hasonló volt a vad törzshöz és a rokon FGSC116 és FGSC33 törzsekhez. Az utóbbi kettő izogén kontrollként szolgál az FGSC1035 és RJH046-os törzsekhez. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PAF toxicitás kapcsolatban áll az intracelluláris G-protein jelátviteli úttal. Ellenben egymásnak ellentmondó eredmények születtek a guanidin nukleotid analóg GTP γ S és GDP β S jelenlétében, melyek a G-protein jelátvitelt befolyásolják a G-protein GTP kötött aktív, illetve GDP kötött inaktív formában való megkötésével [124-125]. Az *A. nidulans* kevésbé volt érzékeny a PAF kezelésre 100 μ M GTP γ S jelenlétében, mely fokozza a G-protein jelátvitelt, mint a nukleotid analóg hiányában. Ellenben a GDP β S, mely gátolja a G-protein jelátvitelt, nem volt képes semlegesíteni a PAF hatását. ATP γ S hozzáadása, mely egy olyan nukleotid analóg, amely nem befolyásolja a G-proteineket, nem mutatott szignifikáns befolyást a PAF által okozott növekedés csökkenésre [126].

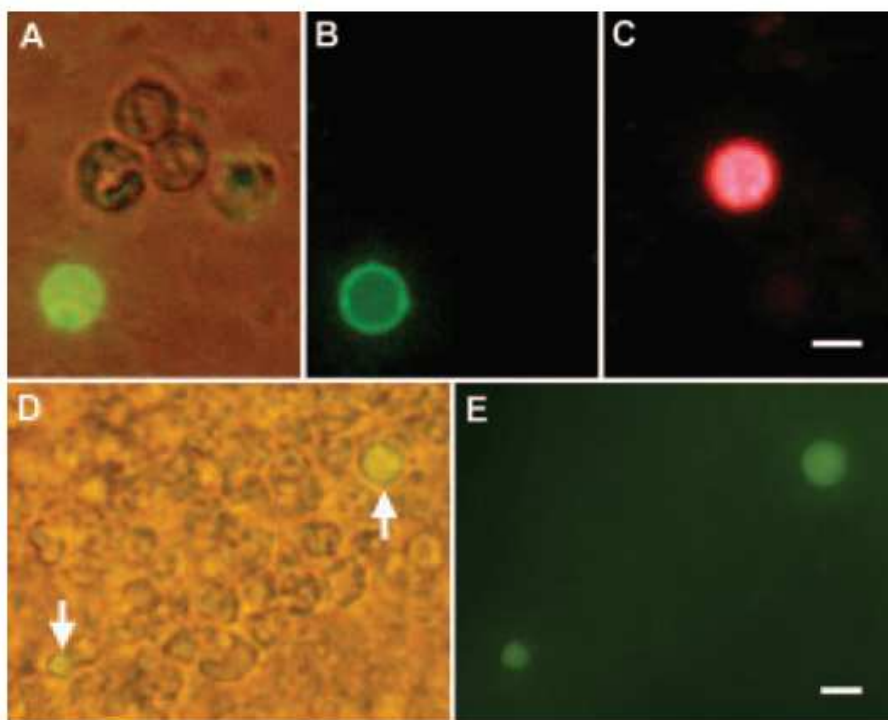
A PAF kifejtheti hatását közvetlenül a G-protein valamelyik alegységén keresztül [127-128], vagy indirekt módon a szignál transzdukción keresztül. PAF-fal kezelt *A. nidulans* hifák felülúszójában szignifikánsan megemelkedik a kálium ionok szintje [1], melyhez a gomba sejtmembránjának hiperpolarizációja társul a hifák csúcsán közvetlenül a PAF-fal való érintkezés után [126]. Ennek oka feltehetően a kálium ionok szelektív permeabilitás növekedése. A belső ion homeosztázis zavara felelős lehet a gomba hifák morfológiai változásaiért. Ez a mechanizmus hasonlít a növényi defensinek hatására [117], de különbözik más, baktériumok, rovarok, illetve emberek által termelt antimikrobiális fehérjék hatásmechanizmusától, melyek pórust képeznek az adott sejtben, alacsony fajspecifitással mellett [113, 115-116, 120].

Annak eldöntésére, hogy a PAF kezelés hatására megfigyelt K^+ -kiáramlás [1] nem specifikus membrán károsodás, illetve egy káliumra specifikus útvonal aktiválódásának következménye, PAF-fal kezelt *A. nidulans* törzsek membránpotenciáljának változását mérték. Bár a membrán permeabilitás nem specifikus növekedése okozhat depolarizációt, egy káliumra szelektív permeabilitás növekedés a gomba sejtmembránjának hiperpolarizációjához vezetne. Az *A. nidulans* hifák plazmamembránjában PAF hatására bekövetkezett potenciálváltozásokat fluoreszcens membránpotenciál érzékeny festékkel vizsgálták. Kezeletlen gombában jellemzően negatívabb membrán potenciált mértek az első hifa szegmentekben, közel az első szeptumokhoz, mint a hifacsúcson. Eszerint a hifacsúcsok depolarizáltak az első szeptumokhoz közeli régiókhoz képest. 10 $\mu\text{g/ml}$ PAF hozzáadása azonnal elindított egy időfüggő növekedést a fluoreszcens jelintenzitásban az első hifaszegmentekben. A fluoreszcens jel a hifacsúcsoktól terjedt a szomszédos területekre a szeptumok közelében. A fluoreszcens intenzitások aránya növekedett, mely a gomba membránok hiperpolarizációjára utal. Hasonló események történtek a hifacsúcsokon is, a változások itt kifejezettebbek voltak, tehát a hiperpolarizáció kifejezettebb volt a csúcsokon, mint az első szeptumok közelében. 80 perccel a PAF hozzáadása után már nem volt potenciál különbség a hifák mentén. PAF-fal nem kezelt hifák esetén nem volt változás a fluoreszcens jel eloszlásában, sem a fluoreszcencia arányokban a kísérlet kezdetén, és 80 perc után [126].

Az intracelluláris organelumok, csakúgy, mint a makromolekulák, lipidek, fehérjék és nukleotidok rendkívül érzékenyek a reaktív oxigén gyökök jelenlétére az aerob metabolizmussal rendelkező organizmusokban. Az egészséges sejtekben adaptív mechanizmusok fejlődtek ki, melyek normál körülmények között védik a sejtet az oxigén gyökök károsító hatásaitól. Bizonyos külső hatásokra az oxigén gyökök termelése megnövekedhet, és az emelkedett mennyiségük károsíthatja az intracelluláris organelumokat, illetve a makromolekulák oxidációját okozhatja. A mitochondrium nem csak a legfőbb forrása a reaktív oxigén gyököknek, hanem kifejezetten érzékeny is rájuk. A következményként kialakuló mitochondrium dezintegrálódást nevezzük mitoptosisnak [129-132]. Nem csak az egyes organelumok károsodhatnak, hanem programozott sejthalál, apoptózis is kialakulhat a reaktív oxigén gyökök emelkedett szintjének hatására [120, 133-139]. PAF hatására a reaktív oxigéngyök képződés (ROS) fokozódott *A. niger*-ben és *A. nidulans*-ban [1, 140]. Ennek vizsgálatára PAF-fal kezelt *A. nidulans* hifákat diklorodihidrofluoreszcein diacetát-tal (H_2DCFDA) jelölték. A ROS specifikus jelek megtalálhatóak voltak a plazmamembrán

mentén és a citoplazmában, és hasonlítottak a nystatinnal kezelt hifákban látható jelekhez. A nystatinról közismert, hogy fokozza a reaktív oxigéngyök képződést a sejtmembránok foszfolipidjeinek oxidációja által [141]. Kezeletlen hifákban nem volt látható ROS specifikus jel [126]. Amint a sejtekben a reaktív oxigén gyökök szintje elér egy kritikus szintet, az alapvető fiziológiai funkciók károsodnak, és programozott sejthalál következhet be. Az apoptózis kezdetén a foszfatidilszerin láncok (PS) externalizációja, vagyis a sejtek felszínén való megjelenése figyelhető meg, megnövekedett vakuolizáció, membrán kidudorodások, a DNS láncok törései és nukleáris fragmentáció, illetve apoptózis test képződés. Habár korábban úgy gondolták, hogy az apoptózis csak a magasabb szintű eukarióták sajátja, egyre több rá a bizonyíték, hogy prokarióták és alacsonyabb szintű eukarióták, mint élesztőgombák és fonalas gombák is mutathatnak egy apoptózis-szerű sejthalált [120, 136-137, 142-147]. Ezek a változások a legtöbb sejttípusra és organizmusra jellemzőek, és különböző sejthalál szignálok hatására jelenhetnek meg [148-151]. A *nidulans* protoplasztokat vizsgálták, melyeket 50 µg/ml PAF-fal kezeltek különböző időtartamig. A foszfatidilszerin láncok flip-flop mozgását a plazmamembrán belső oldaláról a külső oldalra Annexin V festéssel vizsgálták (6. ábra A és B), míg a DNS fragmentációját a TUNEL módszer segítségével tették láthatóvá [152] (6. ábra D és E). Az Annexin V nagy affinitással rendelkezik a foszfatidilszerin láncok iránt [153]. A kísérlet kezdetén a protoplasztok kevesebb, mint 0,2%-a volt Annexin V pozitív, míg a PAF hozzáadása után az apoptotikus sejtek aránya 2,2%-ra nőtt 1 óra inkubáció után, szemben a kezeletlen sejteknél megfigyelt 0,5%-kal. 3 óra inkubáció után az arány 24,4% volt a kontroll 6,1%-kal szemben (6. ábra A, B, C). Mivel a kezelt sejteknél négyszeres volt az apoptotikus sejtek aránya, így ez a protein specifikus hatására utal. Az apoptózis másik jele a DNS fragmentációja a nukleosómák közötti összekötő régiók hasítása révén a nukleázok által [154-155]. A *nidulans* protoplasztok esetén, melyeket 50 µg/ml PAF-fal kezeltek, növekedett a TUNEL-pozitív sejtek aránya a kezeletlen sejtekkel szemben (6. ábra D, E). Hasonlóan az Annexin V membrán vizsgálatokhoz, a TUNEL pozitív, magtartalmú sejtek aránya a kísérlet elején <0,3% volt, majd 2,7%-ra nőtt 1 óra után, és 11,7% lett 3 óra PAF kezelés után, szemben a kontroll sejtekben talált 0,6%-kal 1 óra után és 1,6%-kal 3 óra után (6. ábra F). A nekrozis láthatóvá tételéhez a protoplasztokat propidium jodiddal festették meg, mely szorosan kötődik a nukleinsavakhoz és csak a nekrotikus sejtekbe jut be [156] (6. ábra C). A PAF-fal való kezelés nem változtatta meg szignifikánsan a nekrotikus protoplasztok számát: PAF jelenlétében 0,2% volt 1 óra után és 1,2% lett 3 óra

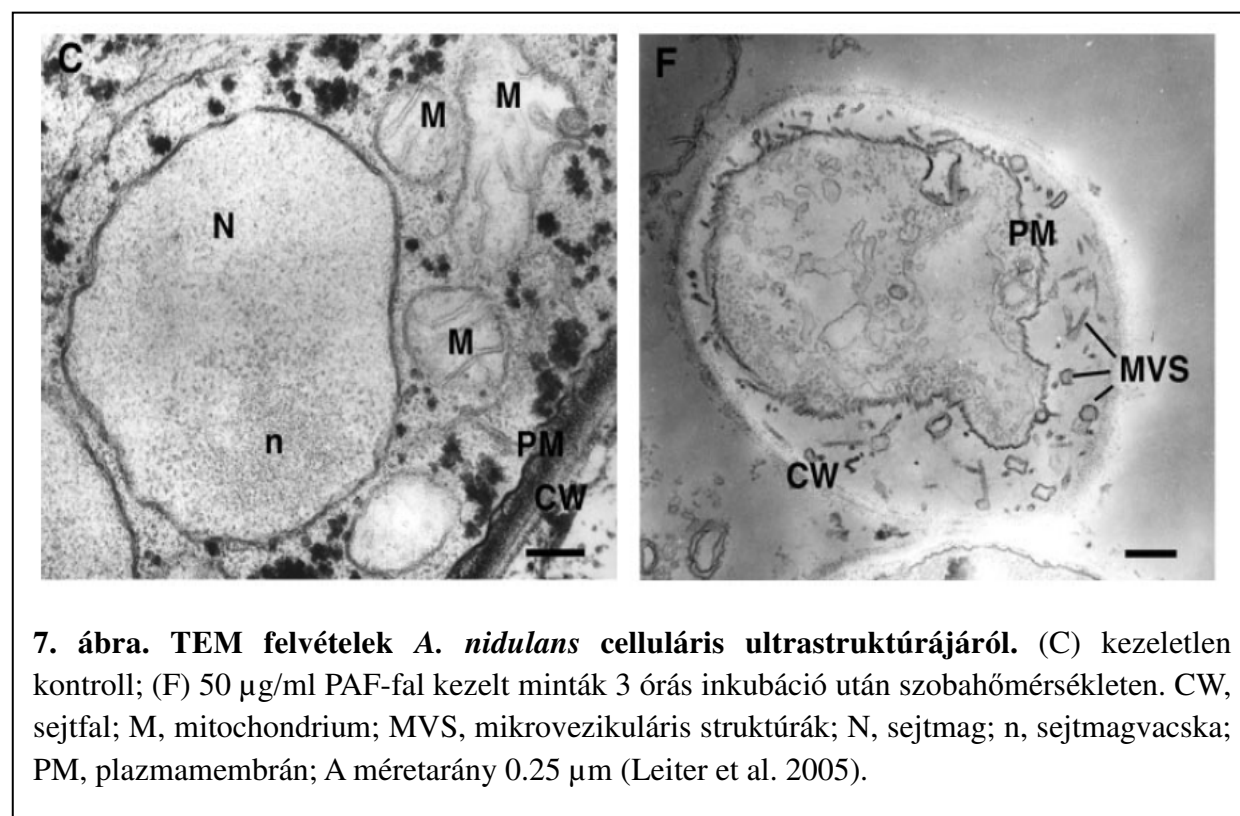
inkubáció után hasonlóan a kontroll tenyészetekben megfigyelt 0,2%-hoz 1 óra után és 1,0%-hoz 3 óra inkubáció után (6. ábra E).



6. ábra. Apoptotikus jelek vizsgálata *A. nidulans* protoplaszokon 50 µg/ml PAF-fal történt kezelés után. Annexin-V (A és B) és PI-vel (C) festett protoplasztok PAF kezelés után 3 órányi, és TUNEL-lel festett protoplaszt magok (D és E) 1 órányi inkubáció után, fázis kontraszt fluoreszcens (A és D), és csak fluoreszcens mikroszkóppal (B, C, és E). A nyilak a D képen két TUNEL pozitív sejtet mutatnak. A méretarány 5 µm (Leiter et al. 2005).

További apoptotikus jelként a gomba hifák ultrastruktúráját vizsgálták ultravékony metszetekben transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével (TEM) (7. ábra). A kezeletlen *A. nidulans* hifák sejtjeiben szabályos szubmikroszkópikus struktúrát és tisztán felismerhető organelumokat figyeltek meg (7. ábra C). A hifaszegmentek típusosan sok magmembránnal körbevett magot tartalmaztak, és sok esetben a sejtmagvacskák is láthatóak voltak (7. ábra C). A számos mitokondriumban mindig jól megőrzött külső és belső membránok voltak láthatóak. A gomba sejtmembrán egy éles, elektrondenz lipid kettősréteggént látszott, mellette a sejtfal egy sötét belső, finoman szemcsés réteggént, és egy fényes, külső rostos réteggént jelent meg (7. ábra C). A kezeletlen sejtekhez hasonlítva a PAF kezelt hifák esetén egy abnormális szubcelluláris morfológia volt látható (7. ábra F). A sejtfal elvesztette a szemcsézettségét és a szerkezetét. Az összezsugorodott citoplazma levált a sejtfalról és

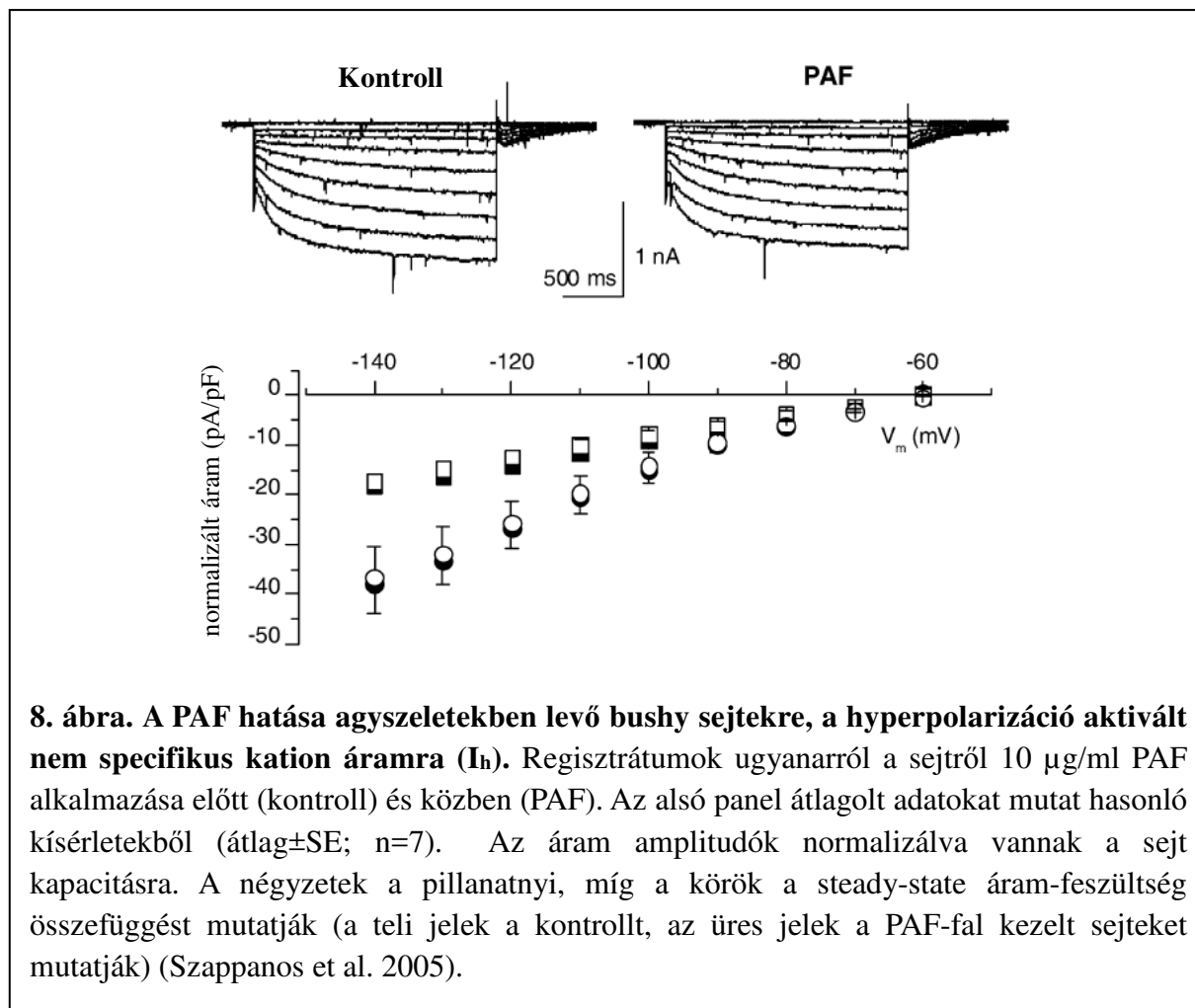
mikrovezikula-szerű képződmények jelentek meg a sejtfal és a sejtmembrán között, mely az apoptotikus sejtek membrán kitüremkedéseire emlékeztet (7. ábra F). A citoplazmában a mitokondriumok kevésbé voltak elkülöníthetőek és gyakran a külső membránjuk nem volt folyamatos vagy hiányzott. A sejt sérülésének fokozódásával a citoplazmatikus organelumok nem voltak többé elkülöníthetőek és az egész sejt dezintegrálódott. Ezek az elváltozások gyakran megjelentek, de nem mindegyik volt látható minden sejtben [126].



A PAF hatása emlős sejtekre

A PAF emlős idegsejtekre kifejtett hatását patkányokon vizsgálták. Túlélő agyszeletek nucleus cochlearis ventralisban található bushy sejteken hiperpolarizáció aktivált nem specifikus kation áramokat regisztráltak (I_h) [157]. 2 másodperc hosszúságú hiperpolarizáló pulzusokat alkalmaztak -60 mV-os nyugalmi potenciáltól 10 mV-os lépésekben -140 mV-os maximális hiperpolarizációig. Az ionáramok időfüggése nem változott meg szignifikánsan 10 µg/ml PAF jelenlétében (8 ábra A). Ezután a depolarizáció aktivált áramkomponenseket is megvizsgálták. -60 mV-os nyugalmi potenciálról kiindulva 200 ms-os feszültség lépéseket alkalmaztak -80

mV-tól indulva +40 mV-os maximális depolarizációig. Sem a Na^+ áram, sem a kifelé irányuló K^+ áram amplitúdója nem változott meg a depolarizáció hatására 10 $\mu\text{g/ml}$ PAF kezelés után.



A méréseket megismételték enzimatikusan szeparált hippocampalis neuronokon is. A PAF nem befolyásolta a depolarizáció aktivált K^+ csatornákat, sem az aktivációs küszöböt, sem az amplitúdót. Astrocytákat is vizsgáltak szövetkultúrában. A PAF ezek ionáramait sem változtatta meg szignifikánsan [158].

Idegsejtek mellett patkányból származó harántcsíkolt izomrostokon is vizsgáltak feszültség clamp technikával a K^+ csatornán áthaladó ionáramokat. 10 $\mu\text{g/ml}$ PAF hozzáadása után a K^+ áramoknak (I_k) sem az időbeli lefutása, sem az amplitúdója nem változott szignifikánsan. Hasonló eredményeket kaptak az L-típusú Ca^{2+} csatornákon is. Ez az áram kontroll körülmények között -20 mV-nál aktiválódott, majd egy lassú emelkedő fázis után egy nagyon lassú inaktiváció volt látható. A PAF 10 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban nem változtatta meg sem azt a feszültséget, amikor az áram megjelent, sem az áram aktivációjának kinetikáját.

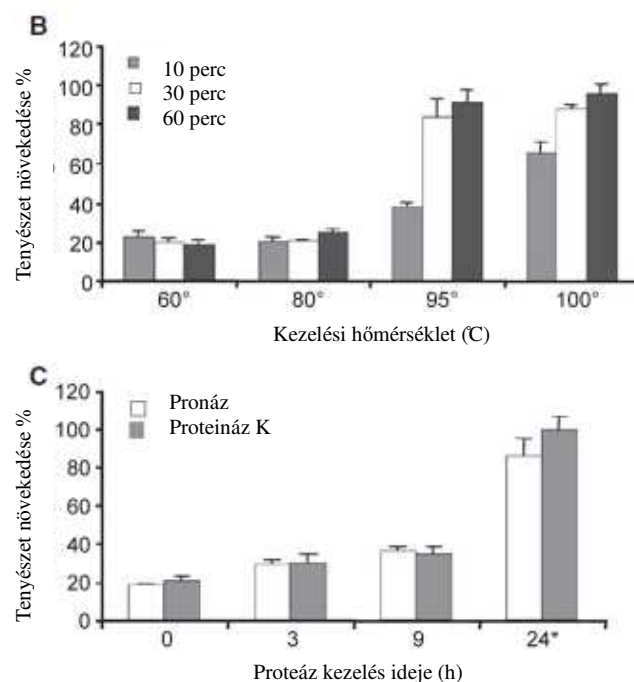
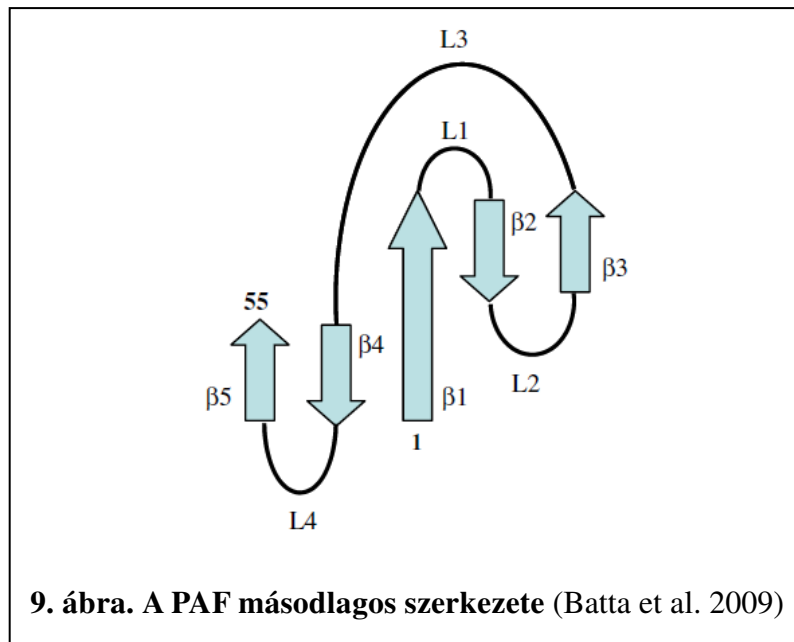
A PAF citotoxicitásának meghatározásához endotheliális sejteket izoláltak humán köldökvénából, melyeket tenyésztés után különböző koncentrációjú (2-100 µg/ml) PAF oldatokkal kezeltek órákon keresztül. A citotoxikus hatást kolorimetriás MTT módszer (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-tetrazolium-bromid) segítségével vizsgálták. A sejtek optikai denzitásának arányát meghatározták, és az értékeket a kezeletlen sejtek százalékában fejezték ki. A PAF-nak nem volt káros hatása a humán köldökvénából származó endothelialis sejtekre.

A PAF gyulladást kiváltó hatásának vizsgálatához teljes humán vért kezeltek a fehérje különböző koncentrációjú oldataival, és a felszabaduló citokinek (IL-6, TNF- α , IL-8) koncentrációját mérték. A pozitív kontrolként használt LPS (lipopoliszacharid) 0,1 µg/ml-es koncentrációban mindhárom citokin esetében masszívan megemelte a termelést, IL-8 esetében több tízszeresére, TNF- α esetén százszorosára, IL-6 esetén ezerszeresére. A PAF 2 µg/ml-es koncentráció mellett ellenben nem váltott ki jelentős fokozódást a citokin termelésben. A talált változások szignifikánsan alacsonyabbak voltak a 20-szor kisebb koncentrációban alkalmazott LPS által okozottnál. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a PAF-nak ha van egyáltalán gyulladáskeltő hatása, akkor az csak minimális lehet [3].

A PAF stabilitásának vizsgálata

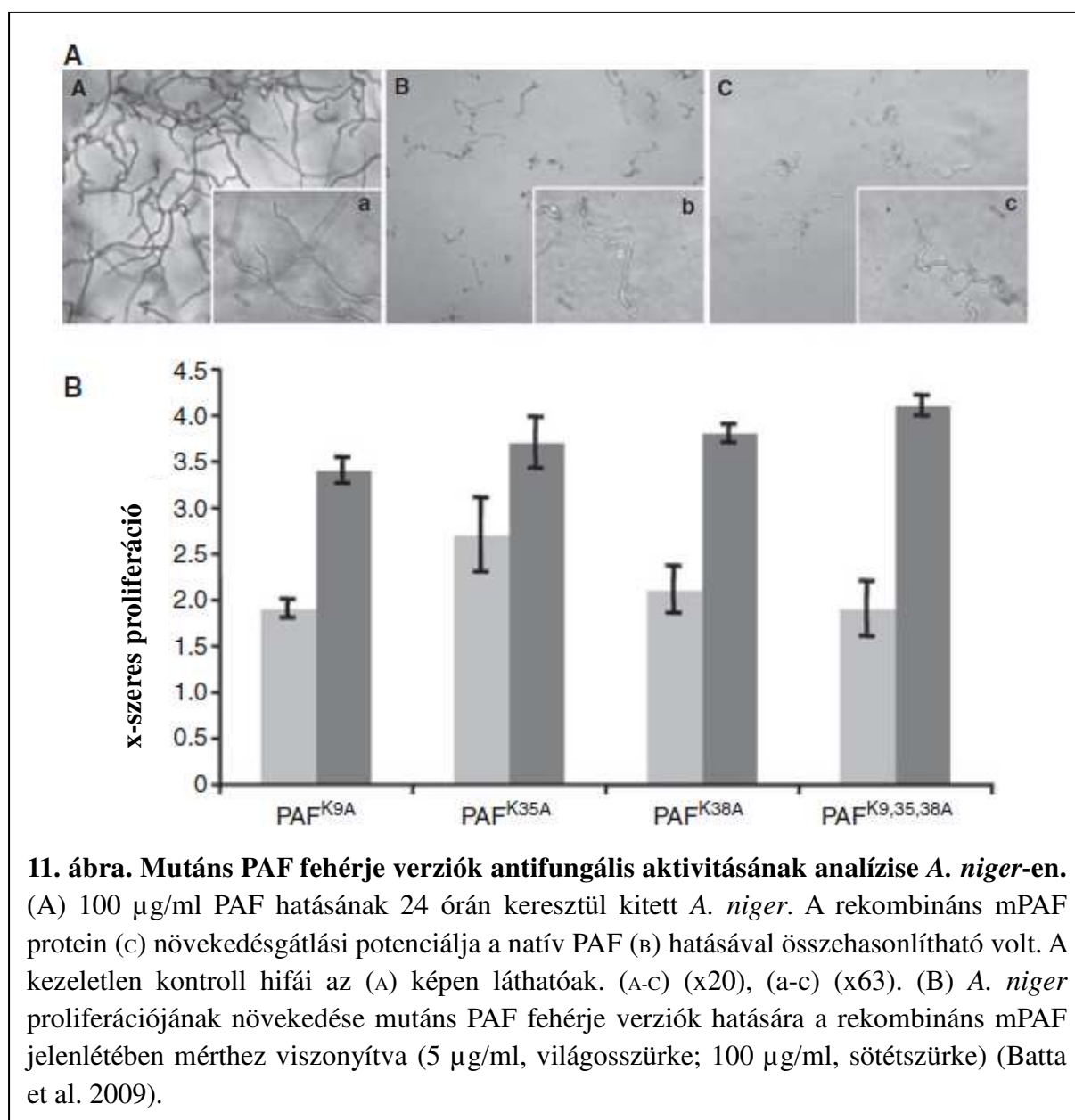
A PAF 55 aminosavból áll, mely tartalmaz egy lizinben gazdag szekvenciát. A másodlagos struktúrája 5 β -redőt tartalmaz (5. és 9. ábra). Három diszulfid hidat mutattak ki benne, amelyek szükségesek a harmadlagos struktúra és az antifungális aktivitás fenntartásához.

A PAF stabil volt az 1,5-11-es pH tartományok között. A PAF megőrzi antifungális aktivitását 80 °C-on történő 60 perces inkubálás után is, de a 95-100 °C hőmérséklet már 79%-ra csökkenti az aktivitását (10. ábra B). Az aktivitáscsökkenés nem volt reverzibilis a minta szobahőmérsékletre történő lehűtése után. Ez alapján végleges változás alakult ki a PAF struktúrájában és aktivitásában. Pepszines emésztés pH 4 és 5 között nem változtatta meg a PAF antifungális aktivitását. Ugyancsak ellenállt a proteináz K és pronáz emésztésnek 3-9 órán keresztül (10. ábra C). Viszont a 12 órás pronáz emésztés és a 24 órás proteináz K emésztés szignifikánsan csökkentette a protein aktivitását (10. ábra C).



10. ábra. Mikrotiter plate aktivitás esszé az *A. niger* növekedésének meghatározására PAF jelenlétében, amelyet különböző teszt körülményeknek tettek ki. 10^4 /ml spórát inkubáltak 1-5 μ g/ml PAF-fal 24 órán át 30°C-on. (B) A PAF-ot 60, 80, 90 és 100°C-on tartották 10, 30 és 60 percig. (C) A PAF-ot proteináz K-val emésztették 3, 9 és 24 órán át, illetve pronázzal 3, 9 és 12 órán át. A csillag a C ábrán különböző emésztési időt jelöl a pronáz esetén (12 óra 24 helyett). Az értékek az *A. niger* növekedésének százalékát jelzik (%) PAF jelenlétében, amelyet különböző teszt körülményeknek tettek ki, összehasonlítva a kezeletlen *A. niger*-rel (=100 %) (Batta et al. 2009).

Mutáns PAF verziók antifungális hatását vizsgálták aminosav cserékkel. A 9, 35, 38-as pozícióban levő lizin maradékok cseréje szignifikánsan csökkentette a PAF antifungális hatását, és az *A. niger* törzsek proliferációja fokozódott (11. ábra B). Ezen eredmények szerint a konzervált lizin-gazdag régiók felismerő motívumként szerepelnek az érzékeny gombák számára. 3 mutáció esetén már nem csökkent tovább az antifungális hatás, mely arra enged következtetni, hogy más protein motívumoknak is van hasonló szerepe [159].



A PAF hatása Dermatophytonokra

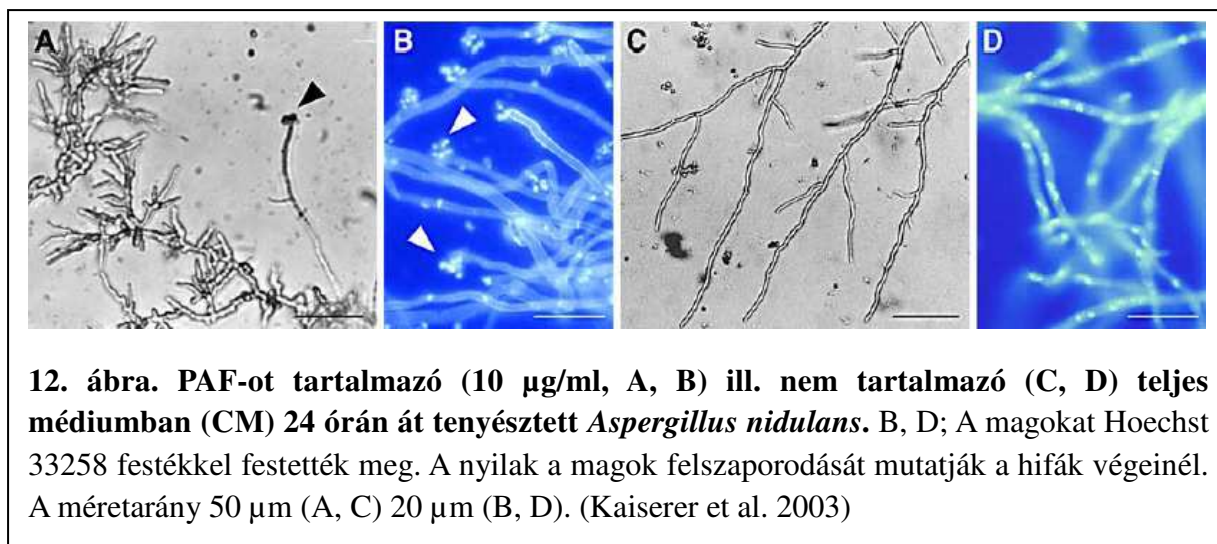
Különböző Dermatophyton fajoknál is kipróbálták a PAF hatását, és összevetették a széleskörben használt flukonazollal. 5 fajt vizsgáltak, ezek a *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* és a *Trichophyton tonsurans*. A PAF 200 µg/ml-es koncentrációban teljes növekedési gátlást okozott az összes tesztelt fajnál. A hatás minden esetben fungicid volt. A hifák megduzzadtak és számos elágazódás volt látható 4 nap után 100 µg/ml-es PAF koncentráció mellett, szemben a kezeletlen kontrollokkal. 100 µg/ml PAF csökkentette a növekedési rátát, de nem találtak gátló hatást 50 µg/ml-es PAF koncentráció alatt. A következő kísérletben 100 µg/ml PAF koncentráció mellett flukonazolt is használtak nyolc különböző koncentrációban (0,25-32 µg/ml) és szinergisztikus kölcsönhatást észleltek közöttük a 8, 16 és 32 µg/ml-es koncentrációban [2].

PAF hatása a hifák növekedésére

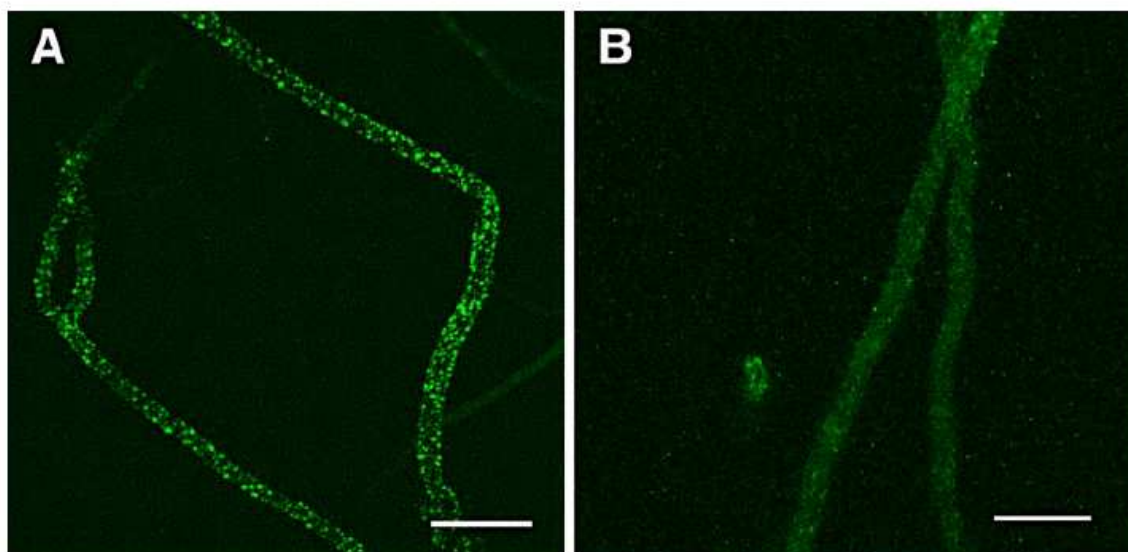
Tizenhét fonalas gombán vizsgálták a hifák növekedését PAF jelenlétében, melyből tizenkettő érzékeny volt, öt törzsre viszont nem volt hatással (*Aspergillus terreus*, *Fusarium sambucinum*, *Mucor circinelloides*, *Mucor genevensis* és *Penicillium chrysogenum* Q176) (1. táblázat). Az *Aspergillus* törzsek közül egyedül az *A. terreus* nem volt érzékeny, a többi öt törzs közül az *A. niger*-nél találták a legnagyobb növekedés gátlást, az *A. flavus*-nál pedig csak enyhe volt a gátló hatás. Élesztőgombákra (*S. cerevisiae*, *Candida albicans*) és baktériumokra (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) nem volt a PAF hatással. Minden érzékeny törzs dózis függően reagált, emelkedő PAF koncentrációra fokozott növekedési gátlással válaszoltak. A hatás kimutatható volt konídiumokon is ugyanúgy, mint hifákon. Az *A. niger* konídiumok közül kevesebb, mint 1 % képzett telepeket 50 µg/ml PAF hatására, míg a kontrollok telepképzése 91,8% volt. Az *A. niger* hifák növekedését hatékonyan gátolta a spórázás után hozzáadott PAF. A gátlás mértéke hasonló volt ahhoz, amikor a konídiumokhoz adták a PAF-ot. Az összes érzékeny törzs hifáin jelentős morfológiai változásokat találtak a kontrollokhöz képest, amikor PAF tartalmú folyékony tápközegben tenyésztették őket. A hifák megduzzadtak, és rövidek lettek, sok elágazással, így erősen eltorzult képet mutattak. A vastagságuk csökkent, megfigyelhető volt a citoplazma fragmentációja, a sejtmagok felszaporodása a töredezett hifa végeknél (12. ábra).

1. táblázat. Az 50 µg/ml PAF-fal kezelt fonalas gombák növekedése. A százalékos növekedést a PAF-fal kezelt gombák OD₆₂₀-ban bekövetkezett százalékos változások alapján számolták ki, a kezeletlen kontrollhoz hasonlítva (=100%). Az értékek az átlag ± SE-ben vannak kifejezve (n=3) (Kaiserer et al. 2003)

Faj	Növekedés (%)	Érzékenység ^a
<i>Aspergillus flavus</i>	31,2±6,6	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5,4±0,2	+++
<i>Aspergillus giganteus</i>	10,5±2,1	++
<i>Aspergillus nidulans</i>	6,4±2,2	+++
<i>Aspergillus niger</i>	0,5±0,1	+++
<i>Aspergillus terreus</i>	100±9,2	–
<i>Botrytis cinerea</i>	4,2±3,1	+++
<i>Cochliobolus carbonum</i>	10,1±0,79	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	54,9±3,4	+
<i>Fusarium sambucinum</i>	92±5,1	–
<i>Gliocladium roseum</i>	42,2±3,1	+
<i>Mucor circinelloides</i>	99±6,5	–
<i>Mucor genevensis</i>	97±3,2	–
<i>Neurospora crassa</i>	12,9±0,5	++
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	81,5±1,9	–
<i>Penicillium chrysogenum</i> (wild-type)	34,2±5,3	+
<i>Trichoderma koningii</i>	8,7±2,9	+++
^a Növekedés csökkenés: +++ ≥90%, ++ 70–90%, + 30–70%, – 0–30%		



A PAF által okozott növekedésgátlást nagymértékben ellensúlyozta MgCl_2 és Na_2SO_4 növekvő koncentrációjú adagolása, míg KCl-nak kisebb hatása volt. A legkiemelkedőbb hatást 0,1 M sóoldattal érték el 5 µg/ml PAF jelenlétében. Viszont a NaCl a növekedést csak 10 ± 1 %-kal növelte. Ha a PAF koncentrációját növelték, a hatás kevésbé volt kifejezett. A PAF hatását vizsgálták hypotóniás, izotóniás és hypertóniás közegben is, hogy tisztázzák a gyenge sejtfal szerepét a növekedésgátlásban. Szorbitolnak és szacharóznak nem volt stabilizáló hatása a PAF-fal kezelt sejtekre. A kálium kiáramlás segítségével vizsgálták a PAF hatását a plazmamembrán integritására. Ehhez a kevésbé érzékeny *A. nidulans*-t használták. 80 perc inkubáció után a hifavégek még intaktak voltak. Az oldat háttér kálium koncentrációja 35 µM volt hifák nélkül, és 138 µM hifák jelenlétében. További kálium kiáramlás volt megfigyelhető 1 µg/ml (26 µM) és 10 µg/ml PAF (209 µM) hozzáadásával. Kontrollként Nystatint használtak, ami 104 µM-os kálium effluxot okozott. Az oxidatív aktivitást H_2DCFDA esszé segítségével vizsgálták. Ezzel ki tudták mutatni a reaktív oxigén gyökök jelenlétét a PAF-fal kezelt *A. niger*-ben. A fluoreszcens jel az 50 µg/ml PAF-fal kezelt hifákban volt a legintenzívebb (13. ábra A), és hasonlított a 10 µg/ml Nystatin által létrehozott jelhez. Ellenben nem volt detektálható jel a PAF-fal nem kezelt hifákban (13. ábra B), illetve a PAF-ra nem érzékeny *A. terreus* esetén. A PAF-fal kezelt hifákban csökkent sejtmetabolizmus volt detektálható. A metabolikusan inaktív hifák száma fokozatosan nőtt a PAF emelkedő koncentrációjával [1].



13. ábra. Az intracelluláris reaktív oxigén gyökök észlelése *A. niger* hifákon fluoreszcens festéssel, H₂DCFDA-val. (A) A hifákat 50 µg/ml PAF-fal kezelték 90 percen át. (B) Kezeletlen kontroll. A méretarány 10µm. (Kaiserer et al. 2003)

A PAF szekréciójának külső környezettől való függése

A *Penicillium chrysogenum* több különböző proteint szekretál, amikor egyedüli szénforrásként szacharózt tartalmazó tápközegen tenyésztik. Ezek közé tartozik a PAF, melynek molekuláris tömege 6,25 kDa és 30%-át képezi az extracelluláris protein frakciónak. A *Penicillium chrysogenum* sejtek tápközegében jelen lévő proteinek vizsgálata azt mutatta, hogy a PAF szintézise függ a tápközegben szénforrásként szolgáló anyagtól, ami glukóz vagy szacharóz volt. A protein nem jelenik meg a frakcióban, ha a tápközeg szacharóz helyett 2% glukózt tartalmaz egyedüli szénforrásként. Annak meghatározásához, hogy a PAF szintézise a transzkripció szintjén regulált-e, RNS-t izoláltak különböző szénforrást tartalmazó tápközegeken tenyésztett sejtekből. Amikor ezen RNS mintákat Northern blot segítségével a PAF cDNS mintájához hibridizálták, egy egyszerű kötést figyeltek meg azon sejtekből származó RNS-sel, melyek tenyésztő tápközegében keményítő vagy szacharóz volt jelen. Ugyanez a glukóz tartalmú tápközegen tenyésztett sejtek esetében nem volt megfigyelhető. Ezen adatok megerősítik, hogy a PAF expressziója a transzkripció szintjén és a szén katabolizmus által szabályozott. Emellett a nitrogén metabolizmusnak is szerepe lehet a szabályozásban. Különböző nitrogén forrást tartalmazó tápközegeken tenyésztett sejtekből származó RNS minták Northern blot vizsgálata alapján a glutamint tartalmazó tápközegeken

tenyésztett sejtekben csak kevés PAF transzkriptum volt, míg a kevésbé kedvelt nitrogén forrás, a nitrát esetén sokkal magasabb volt a PAF mRNS szintje. Mivel a PAF promóter régiója számos GATA motívumot tartalmaz, valószínű, hogy a *Penicillium chrysogenum* major nitrogen regulatory proteinje (NRE) [160], ami kötődik a GATA motívumokhoz [161], részt vesz a PAF gén expresszió nitrogén általi szabályozásában [102].

Célkitűzés

Az *Aspergillus* fajoknál terjedőben levő azol rezisztencia miatt kezdtük el vizsgálni a *Penicillium chrysogenum* által termelt antifungális fehérjét (PAF), egy új, *Aspergillus* fajok ellen is hatékony antifungális gyógyszer létrehozása céljából. Mivel a fehérjét *in vitro* már megvizsgálták toxikológiai és mikológiai szempontból, ezért a célunk a PAF *in vivo* hatásainak felderítése volt:

1. A PAF jelenlétének és funkcióképességének kimutatása a kezelt állatok szöveteiből.
2. A PAF esetleges toxikus és gyulladáskeltő hatásainak vizsgálata állatmodellben helyi és szisztémás adagolás mellett.
3. Stabil invazív pulmonalis aspergillosis állatmodell létrehozása.
4. A PAF hatékonyságának kimutatása invazív pulmonalis aspergillosis állatmodellben intranasalis és intraperitonealis adagolás mellett.
5. A PAF és amfotericin B (AMB) együttes adása előnyeinek kimutatása invazív pulmonalis aspergillosis állatmodellben.

Anyagok és Módszerek

A PAF tisztítása

A PAF tisztítása a következő módon történt. A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 vagy Q176 törzset szacharóz (20 g/l) - NaNO₃ (3 g/l) minimál tápközegen tenyésztettük 72-96 órán keresztül 25 °C-on rázatás mellett. A micéliumokat centrifugálással eltávolítottuk, és a felülúszó alacsony molekulású fehérje frakcióját ultrafiltrációs lemezekkel szétválasztottuk (kizárási méret határ MWCO=30000; Amicon Stirred Cells, Biomax PBTK, Millipore, Billerica, MA, USA). A PAF-ot ioncserélő kromatográfiával tisztítottuk meg CM Sephadex Fast Flow oszlopon (2x18 cm, 50 mM nátrium-foszfát pufferrel equilibrálva, pH=6,6, folyási sebesség 1 ml/min, t=4 °C; Amersham-Pharmacia, Uppsala, Svédország). A fehérje tisztaságát SDS-PAGE és Western blot segítségével ellenőriztük. A PAF-ot foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) oldottuk fel az *in vivo* kísérletekhez.

A kísérleti állatok tartása

Nyolc és 12 hét közötti korú vegyes nemű C57/Bl6 és Balb/c egereket (17-25 g tömeg) használtunk az *in vivo* kísérletekben. Az állatkísérletek megfeleltek az Európai Közöség ajánlásainak (86/609/EEC). A kísérleti protokollt jóváhagyta a Debreceni Egyetem intézeti Állatetikai Bizottsága (11/2008/DE MÁB). Az egereket műanyag ketrecben tartottuk rácsos fedéllel, granulált egér eledelt kaptak és vizet *ad libitum*. A helyiség megvilágítása automatizált volt, 12 órás megvilágítással és 12 óra sötétséggel, a helyiség hőmérséklete 22-25 °C között volt.

Az *A. fumigatus*-szal fertőzött egereket nagy hatékonyságú részecske légszűrővel (HEPA) ellátott izolációs ketrecekben tartottuk. A ketrecek folyamatosan ventiláltak, és enyhe negatív légnyomást alkalmaztunk, hogy megelőzzük az állatgondozók és a kísérletet végzők gomba spórákkal való fertőződését. Minden ketrecet legalább háromszor ellenőriztünk naponta.

A PAF intranasalis adagolása egészséges állatokon

12 hetes C57/Bl6 vegyes nemű egereket használtunk az *in vivo* kísérlethez. A rövid távú kísérletben egy kontroll és 2700 µg/kg PAF dózissal kezelt csoport volt. Ebben az esetben 5 állat volt csoportonként, melyeket 2 hétig kezeltünk naponta. A hosszú távú kísérletekhez hat

csoportra osztottuk az állatokat. Az egereket steril fiziológias sóoldatban (0,9%) oldott PAF-fal kezeltük, testtömegkilogrammonként 5, 25, 125, 250 és 2700 µg mennyiségekkel, a kontroll csoport csak sóoldatot kapott. Egy csoportban 10 állat volt. A PAF hosszú távú hatásának vizsgálatához az egereket hetente egyszer kezeltük nyolc héten át. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a PAF hosszabb távú alkalmazás során vált-e ki immunválaszt. Mivel a PAF 95%-ban gátolta az *A. fumigatus* szaporodását 125 µg/kg-os koncentrációban [1], ezért ennek megfelelően választottuk ki az alkalmazandó koncentrációkat. Az egereket pentobarbitallal elaltattuk (50 mg/ttkg) intraperitonealis adagolással, majd a megfelelő PAF koncentrációjú oldatokat csepegtettük pipetta segítségével a foguknál felfüggesztett állatok orrába 50 µl-es mennyiségben. (14. ábra) Ilyen körülmények között az oldat eljut a tüdőbe normál légzés révén. Az eljárás hatékonyságát ellenőriztük egy festék oldat alkalmazásával (15. ábra). A kontroll csoportban levő állatokat 50 µl fiziológias sóoldattal kezeltük. Az egerek súlyát megmértük a rövid távú kísérlet első és utolsó napján, illetve a hosszú távú kísérletben hetente egyszer.

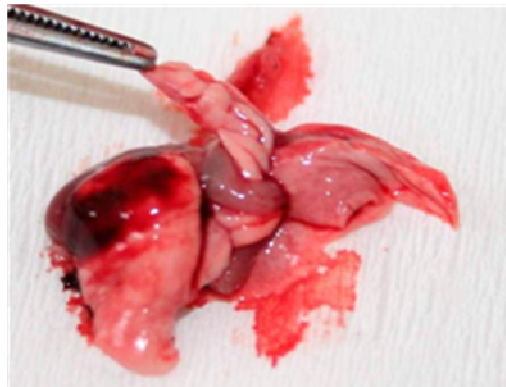


14. ábra. Az oldatok intranasalis bevitele altatott egéren

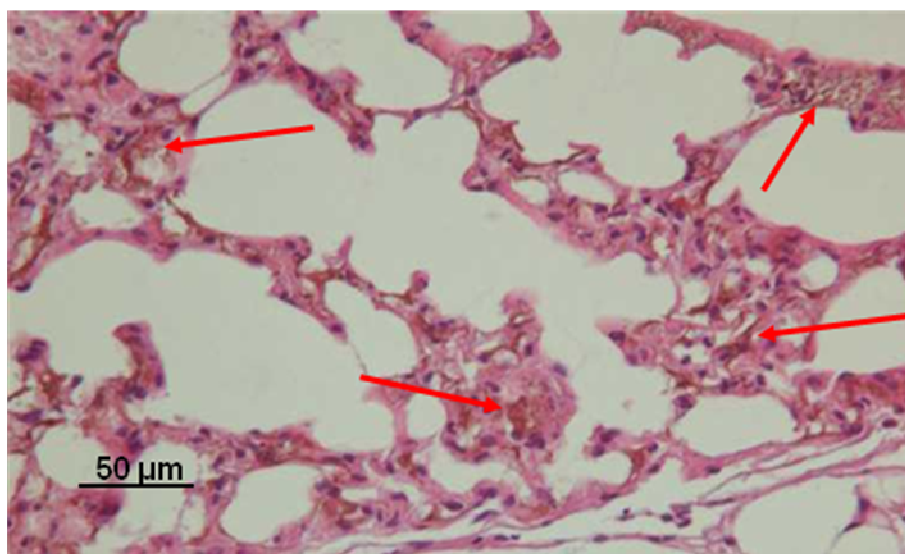
A



B



C



15. ábra. Az intranasalis kezelés tesztelése festékoldat alkalmazásával. (A) A tüdön látható a festék felhalmozódása. (B) A kontroll állat tüdeje, melyet fiziológiás sóoldattal kezeltünk. (C) Az (A) képen látható tüdőből hematoxin-eosin festéssel készült metszet, melyen nyilak mutatják a felhalmozódott festékrészecskéket.

Egészséges állatok intraperitonealis PAF kezelése

Az egereket véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az első csoportot (n=8) IP kezeltük 100 μ L PBS-ben oldott 5,4 mg/kg dózisú PAF-fal naponta kétszer, és intranasalisan 50 μ L PBS-ben oldott 2,7 mg/kg dózisú PAF-fal naponta kétszer 7 napig. A második (kontroll) csoportot (n=8) PAF-mentes PBS-sel kezeltük azonos módon. A 8. napon néhány állatot megöltünk, és a szerveiket eltávolítottuk szövettani vizsgálatra. A kísérlet első és utolsó napján a

testsúlyukat megmértük, vért vettünk, és a vérsejtszámokat és egyéb plazma paramétereket meghatároztuk.

Vérvétel és sejtszámolás

A rövidtávú (két hetes) intranasalis PAF adagolás elején és végén vért vettünk a kontroll csoportból (n=16) és a legnagyobb koncentrációjú PAF oldattal kezelt (2,7 mg/ttkg) csoportból (n=10). Ugyancsak vért vettünk az egy hetes intraperitoneális adagolással kombinált kezelés kezdetén és végén a kontroll állatokból (n=8) és az IP 10,8 mg/kg és intranasalisan 5,4 mg/kg dózisú PAF-fal kezelt állatokból (n=8). Az állatokat elaltattuk pentobarbitállal és 200 µl vért vettünk egy 40 µl véralvadás gátlót (ACD, Vacutainer tube, Becton Dickinson Diagnostics-Preanalytical Systems Plymouth, UK) tartalmazó 1,5 mm átmérőjű üvegapillárisal a retrobulbáris vénás plexus punkciójával. Az ACD-vel antikoagulált teljes vért Siemens Advia-120 hematológiai analizátorral elemeztük Multi Species szoftverrel (Deerfield, IL, USA), megszámoltuk a fehérvérsejtek és a neutrofil granulocyták számát [162]. Ezen kívül a PAF lehetséges toxikus hatásait vizsgálándó a máj enzimek és a plazmában található ionok szintjét megmértük Roche Integra 800 (Roche Diagnostics Mannheim, Németország) segítségével.

Szövettani vizsgálat és tüdőkárosodási ráta meghatározása

A PAF rövid és hosszú távú intranasalis és intraperitonealis alkalmazásából eredő lehetséges mellékhatások, illetve a fertőzött állatokra kifejtett pozitív hatások vizsgálatához néhány állat tüdejét, veséit és a máját szövettanilag megvizsgáltuk a kontroll és az intranasalisan és intraperitonealisan PAF-ot (2,7 mg/ttkg, 5,4 mg/ttkg, és 10,8 mg/ttkg) illetve amfotericin B-t kapó csoportokban. A csak PAF-ot kapó állatokat a PAF kezelés utolsó napján megöltük (14. vagy 56. nap). A gombaspórával fertőzött állatokból elhullásuk napján vettünk mintákat (a fertőzés leírását lásd később). Az eltávolított szervek súlyát megmértük. A szövetmintákat 8%-os formalin oldatban fixáltuk 24 órára, és paraffinba ágyasztuk be (Shandon Pathcenter, Thermo-Shandon, Astmoor, WA, USA). 4 µm vastag metszeteket készítettünk és haematoxylin-eosin festést (H&E) és perjódsav és Schiff-reagens (PAS) festést alkalmaztunk. A metszeteket LEICA DM 2500 típusú mikroszkóppal vizsgáltuk, melyhez egy LEICA DFC 420 típusú fényképezőgépet használtunk (Leica Microsystems, Németország). A képek kiértékeléséhez LEICA Application Suite (LAS) V3 szoftvert használtunk. Az alveoláris ödéma és vérzés értékeléséhez egy nullától háromig terjedő skálát használtunk (0, nincs jelen;

1, enyhe; 2, mérsékelt; 3, súlyos) 5 véletlenszerűen választott területről minden tüdő metszetben.

A PAF relatív mennyiségének meghatározása tömegspektrométerrel tüdőmintákban

A PAF-fal kezelt (2,7 mg/kg, n=5) és a kontroll (n=4) állatokat megöltük, tüdejüket eltávolítottuk 4 órával az oldatok orron keresztüli beadása után. A tüdőket azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben és -70°C fokon tartottuk a mérés kezdetéig. A fagyasztott tüdőszövetet homogenizáltuk, a bennük levő fehérjét acetonnal kicsapattuk, és újra feloldottuk 25 mM ammóniumbikarbonátban. A fehérje koncentráció méréshez a Bradford módszert használtuk [163]. A tripszines emésztéshez 100 µl mintát és 0,25 ng tripszint használtunk. Az emésztés 37°C hőmérsékleten történt, egy éjszakán keresztül. A tömegspektrometriai mérésekhez 10 µg proteint használtunk.

A többszörös reakció mérésen (MRM/SRM) alapuló tömegspektrometriai módszert [164] fejlesztettünk ki a PAF vizsgálatára. A 1041.4/1038.6 és 1249.1/1245.9 PAF specifikus átmenetet használtunk. Az MRM mérést 4000 QTRAP (ABSciex, Farmingham, USA) tömegspektrométer segítségével NanoSpray II. Micro Ion Source Analyst 1.4.2 szoftverrel (ABSciex) értékeltük ki. Folyadékkromatográfiát egy EasynLC II. nano HPLC (Bruker, Bremen, Németország) segítségével, míg a peptid keverék szétválasztását egy Zorbax 300SB-C18 oszlop (Agilent, Santa Clara, USA) segítségével 30 perc acetonitril/víz gradienssel végeztük. Az MRM/SRM átmenet specificitását egér tüdő szövetminták és 250 fmol PAF kombinációjának analizálásával teszteltük. A PAF koncentráció becslésére a spektrum görbék alatti területet (AUC) használtuk. Az AUC értékeket minden esetben normáltuk a felhasznált tüdőszövet teljes fehérjetartalmára. Csak azokat az MRM spektrumokat használtuk az AUC számolására, ahol a jelerősség meghaladta a 150 cps (beütésszám/másodperc) értéket mindkét MRM átmenetben.

A PAF antifungális aktivitásának *in vitro* tesztje tüdőszöveten

A PAF antifungális aktivitását 3 állatból izolált tüdőszöveten vizsgáltuk. A tüdőket 6 órával 2,7 mg/kg PAF alkalmazása után távolítottuk el, kvarchomokkal homogenizáltuk, majd 900 µl fiziológiás sóoldatban 4 °C-on centrifugáltuk 16,100 g-n 10 percig. A felülúszó antifungális aktivitását *A. nidulans* határoztuk meg micro-titer módszerrel [1]. *A. nidulans* konídium szuszpenzióból származó konídiumot inkubáltunk 100 µl 1% élesztő kivonat, 2%

peptone, 2% glukóz és 50–75–100 µl tüdőszövet homogenizátummal egy éjszakán át 37 °C-on pH=7,0-en. Az *A. nidulans* növekedését az optikai denzitás mérésével határoztuk meg 630 nm-en. Kontrollként a PAF mentes fiziológiás sóoldattal kezelt egerekből (3 állat) származó tüdőszövet antifungális aktivitását is meghatároztuk.

LPS-kiváltotta akut tüdőgyulladás modellje

Akut tüdőgyulladás kiváltásához C57/Bl6 egereket osztottunk 3 csoportra, pentobarbitallal elaltattuk, és fiziológiás sóoldattal (n=4), PAF-fal (2,7 mg/kg; n=4) illetve lipopoliszahariddal (LPS, *Escherichia coli* szerotípus 055:B5; Sigma-Aldrich; 250 µg/kg; n=6) kezeltük intranasalisan 50 µl térfogatban. Ezt a dózist előző tanulmányok alapján határoztuk meg [165]. A kezelést az egerek túléltek, és hamar rendbejöttek a beavatkozás után.

A tüdőoedema meghatározása

Az előző bekezdésben leírt módon kezelt egerekből 24 órával a kezelés után a tüdőket eltávolítottuk és a nedves tömegüket megmértük. A tüdőszövetek súlyát 3 napig tartó 60 °C-on történő szárítás után újra lemértük. A nedves-száraz arányt a következőképpen számoltuk ki: nedves-száraz arány = (nedves tömeg – száraz tömeg)/száraz tömeg [166].

Pozitron emissziós tomográfia (PET)

A vizsgálatokhoz a glukóz analóg ¹⁸FDG-t (2-[18 F]fluoro-2-deoxi-D-glukóz) használtuk és a felvételeket a MiniPET-II rendszer (<http://www.minipetct.hu>) segítségével készítettük, ami egy kisállatokra tervezett PET kamera [167] (16. ábra).

Az FDG-PET kísérleteket véletlenszerűen 3 csoportba osztott egereken végeztük (kontroll, n=4; PAF, n=4; LPS, n=6) az oldatok orron át történő bejuttatása utáni napon. Az egerek nem kaptak élelmet legalább 6 órával a PET vizsgálat előtt. 150 µl foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS, pH 7,4; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) oldott 4–6 mBq ¹⁸FDG-t tartalmazó injekciót adtunk a farokvénába, ezután dinamikus PET képrögzítés készült a kisállat PET kamera segítségével. Az állatokat izoflurán altatásban 35 °C-os testhőmérsékleten tartottuk az injekció és a képrögzítés alatt. A három dimenziós kiértékelendő képtartományokat (ROI) manuálisan rajzoltuk a tüdő szélei köré BrainCad programmal (<http://www.minipetct.hu>). A standardizált felvételi érték (standardized uptake

value, SUV) kiszámításához a ROI-kban mérhető aktivitás átlagát szoroztuk az egér súlyával és osztottuk a beadott dózissal.



16. ábra. A MiniPET-II rendszer

Irritációs dermatitis

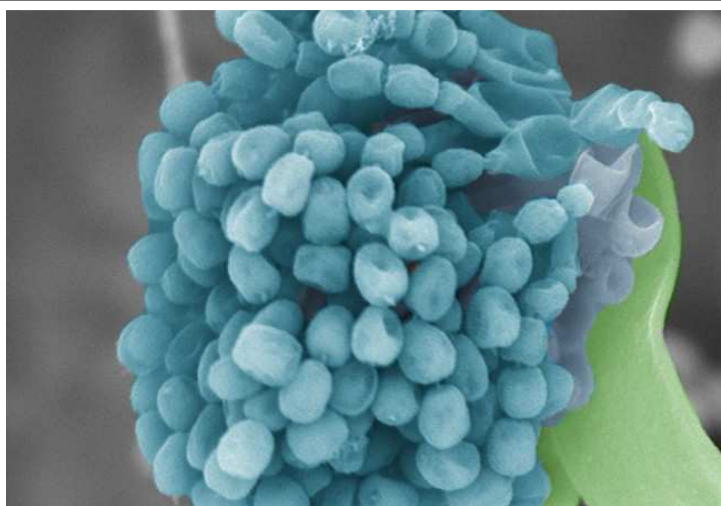
Az irritációs dermatitis modellt egy korábban leírt módszer szerint hoztuk létre [168-169] minimális módosításokkal. A PAF és forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) törzsoldatokat fiziológiás sóoldatban és DMSO-ban készítettük el, és mindkét összetevőt tovább hígítottuk hidrofíl krémekben (Unguentum hydrophilicum nonionicum, Pharmacopoeia Hungarica VIII). A kísérlethez 12 nőstény C57/BL6 egeret használtunk, melyeket véletlenszerűen 3 csoportra osztottunk (kontroll, PMA és PAF), és a füleik vastagságát megmértük a vizsgálat elején. Az egerek mindkét fülének külső és belső felszínére kentünk $4 \cdot 10 \mu\text{l}$ vivőanyagot (fiziológiás sóoldat), PMA-t ($500 \mu\text{g/ml}$), illetve PAF-ot ($100 \mu\text{g/ml}$). 24 óra után a füleik vastagságát ismét megmértük *in vivo*. Végül az állatokat leöltük és fülükből mintákat vettünk szövettani vizsgálatra.

PAF és AMB kombinációjának *in vitro* vizsgálata

Az AMB, PAF és a kettő kombinációjának a minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározását a CLSI M38-A2 irányelv szerint végeztük el [170]. A vizsgált szerek végső koncentrációi 0,0625 és 16 µg/mL között változott AMB esetén, és 25 és 500 µg/mL között PAF esetén. Az antifungális szerek MIC értékét 48 óra 35 °C-on történő inkubáció után határoztuk meg, mint a legkisebb koncentrációt, aminél a szer teljes növekedési gátlást okozott. A módszer szerint a két szer kombinációját a külön-külön mért MIC értékük szerint határoztuk meg [171]. Az AMB és PAF kölcsönhatását a frakcionált gátló koncentráció index (FICI) kiszámításával határoztuk meg a következő formulával: $FICI = ((MIC\ A\ kombinációban) / MIC\ A) + ((MIC\ B\ kombinációban) / MIC\ B)$. A kölcsönhatás szinergikus, ha a $FICI \leq 0,5$, közömbös, ha a $FICI > 0,5$ és ≤ 4 ; és antagonisztikus, ha a $FICI > 4$ [171].

Az *Aspergillus fumigatus* gombakonídium előkészítése

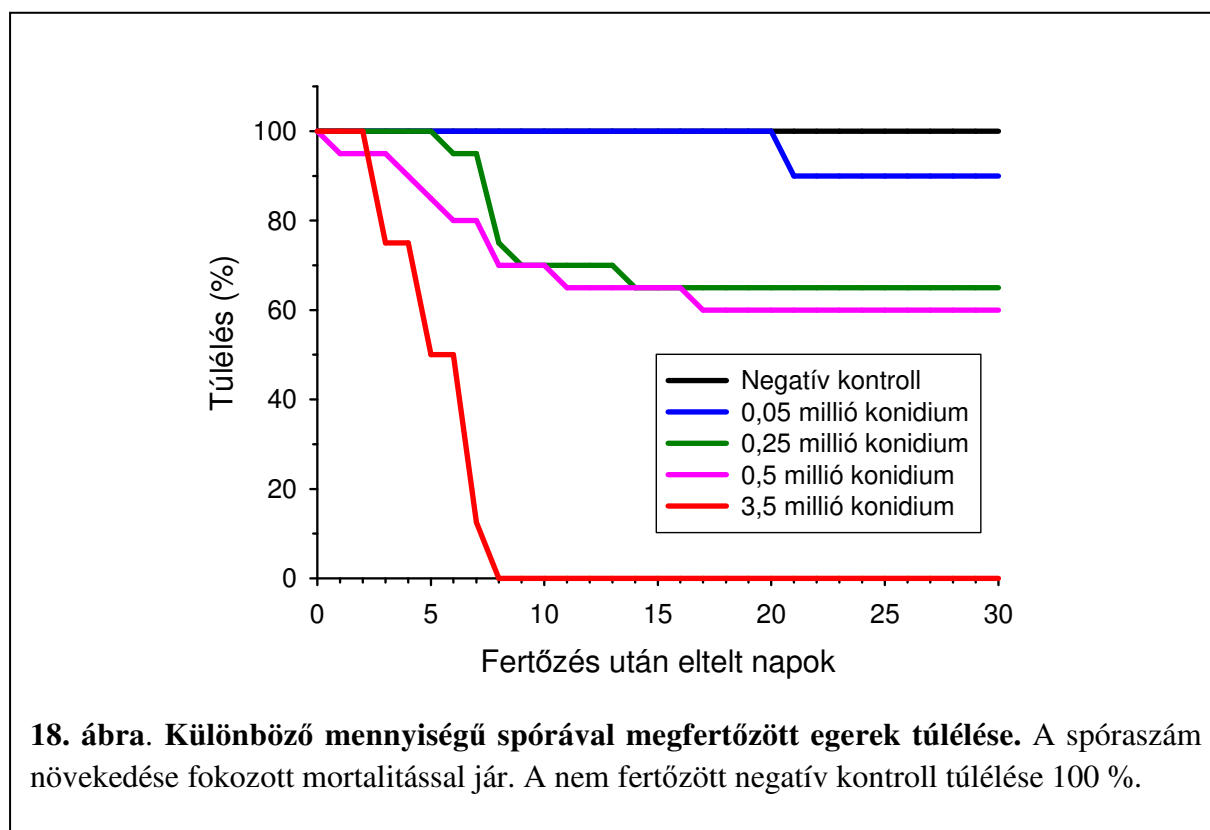
A beinjektálásra kerülő *A. fumigatus* AF293 (17. ábra) (emberi tüdőszövetből nyert klinikai izolátum) kinyeréséhez a gombát minimál nitrát tápközegen tenyésztettük. Frissen termeltetett (6 nap) spórákat PBS és 0,01% Tween 80-ban kevertük el, és Bürker kamrában megszámloltuk. A Tween 80 általánosan használt detergens gombasejtszuszpenziók készítéséhez. Vizes oldatban a Tween 80 megváltoztatja az *A. fumigatus* spórák felszíni töltését [172].



17. ábra. *Aspergillus fumigatus* spórák agarral borított fedőlemezen növesztve 3 napig és pásztázó elektron mikroszkóppal vizsgálva (SEM). Utólag színezve egy eredetileg fekete-fehér képből. Nagyítás: 10.000 x Szerző: Iris Brinkman

Az egerek megfertőzése *A. fumigatus*-szal

Az egereket immunszupprimáltuk 250 mg/kg cyclophosphamide-dal (Endoxan, Baxter, IL, USA) intraperitonealisan (IP) három nappal a fertőzés előtt, és egy nappal az *A. fumigatus* spórákkal történő fertőzés után. 50 µL PBS-ben feloldott $3,5 \times 10^6$ spórát adtunk be az egereknek intranasalisan izofluránnal végzett altatásban. A konídiumszámot úgy választottuk ki, hogy 100% legyen a mortalitás. Ezt előzetes kísérletekkel határoztuk meg (18. ábra). Az egerek vizéhez gentamicint adtunk (5 mg/kg). Az állatok túlélését a fertőzés után naponta háromszor ellenőriztük. Minden fertőzött állatot humánusan megöltünk (cervikális diszlokáció), ha súlyosan csökkent a mozgáskéességük (pl. ha képtelenek voltak elérni az élelmüket vagy a vizüket), vagy nagymértékű látható szenvedés esetén. Az állatok halála után a szerveiket eltávolítottuk, és szövettani vizsgálatot végeztünk.



Invazív pulmonalis aspergillosisban szenvedő állatok intranasalis PAF kezelése

Öt független kísérletben immunszupprimált egereket véletlenszerűen három csoportra osztottunk, amiből két csoportban *Aspergillus* spórákkal fertőzést hoztunk létre. A fertőzött csoportok közül az első csoportot 5,4 mg/kg PAF-fal kezeltünk (26 egér), a második csoportot

PAF-mentes PBS-sel (pozitív kontroll, 23 egér) intranasalisan 50 µL térfogatban, a korábban leírtak szerint. A kezelések az állatok haláláig tartottak a fertőzés napjától naponta kétszer (reggel és délután). A kontroll csoportot (negatív kontroll, hat egér) nem fertőztük meg, de immunszupprimáltuk, és PAF-mentes PBS-sel kezeltük intranasalisan naponta kétszer. Néhány állatot a fertőzött csoportokból megöltünk 3 nappal a fertőzés után, és a szerveiken szövettani vizsgálatot végeztünk.

Invazív pulmonalis aspergillosisban szenvedő állatok kombinált PAF és amfotericin B kezelése

Két független kísérletben immunszupprimált egereket véletlenszerűen öt csoportra osztottunk (összesen 11 egér csoportonként). Négy csoport állatait megfertőztük *Aspergillus* spórával, a nem fertőzött csoport volt a negatív kontroll. Minden antifungális kezelést a gombás fertőzés napján kezdtünk el, és az állatok haláláig tartott. Az első fertőzött csoportot PAF-fal és amfotericin B-desoxycholate-tal (Fungizone, Bristol-Myers Squibb, Montreal, QC, Canada) kezeltük, a második csoportot PAF-fal, a harmadik csoportot AMB-val, és a pozitív kontroll csoportot csak PBS-sel. PBS-ben oldott 5,4 mg/kg dózisú PAF-ot adtunk be IP 100 µL térfogatban naponta kétszer, és 50 µL-t adtunk be pipettával az állatok orrnyílásaiba anaesthesiában naponta egyszer. 100 µL AMB-t adtunk be IP 2,5 illetve 5 mg/kg koncentrációban három alkalommal a gombás fertőzést követő 1., 2. és 4. napon [173]. A negatív kontroll csoport állatait csak PBS-sel kezeltük azonos módon, mint a PAF-fal kezelt csoportban. A fertőzött állatok halála után, a szerveiket eltávolítottuk szövettani vizsgálatra.

Vegyszerek és statisztikai analízis

A vegyszereket, amennyiben külön nem jelezzük, a Sigmától szereztük be (St. Louis, USA) és analitikai minőségűek voltak.

Az átlagot a középértékek $\pm$ standard hiba (SE) alakban adtuk meg. A kontroll és kezelt állatok közötti különbségeket egy változós varianciaanalízissel (ANOVA) és többszörös összehasonlító teszttel (Student-Newman-Keuls módszer) állapítottuk meg. F próbát használtunk, hogy megállapítsuk a szignifikancia mértékét, és a 0,05 alatti P értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A túlélési százalékot a Kaplan-Meier módszerrel számoltuk ki. A túlélési arányt, mint az idő függvényét a következő Gompertz mortalitási ráta egyenlettel illesztettük:

$$R_m = (R_0 - p_l) \times \exp(\alpha \cdot t),$$

ahol R_0 a kezdeti halálozási arány, p_l a plató a kísérlet végén, α a Gompertz paraméter és t az idő.

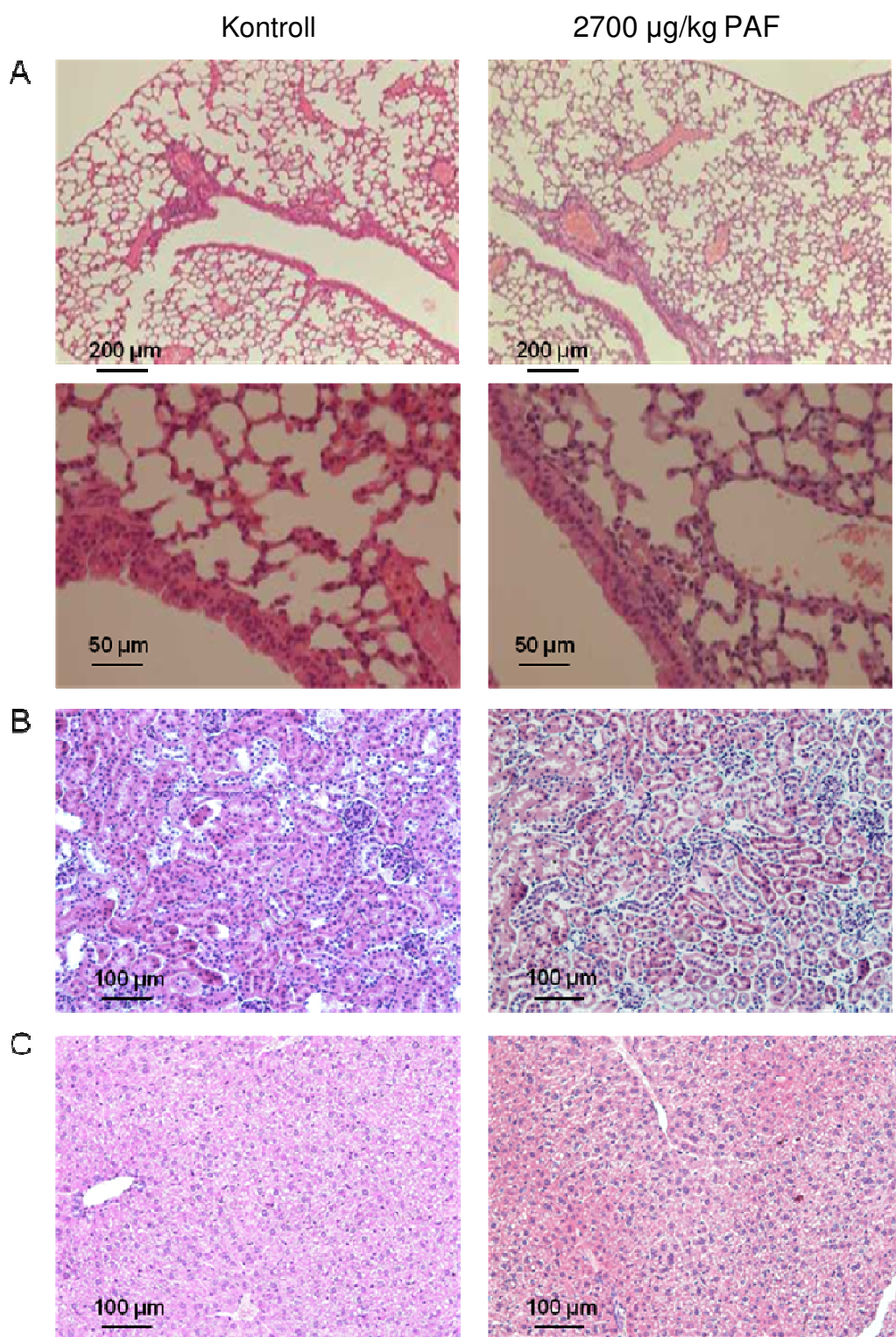
A túlélési görbék közötti különbségek szignifikanciáját, az illesztett Gompertz paraméterben (α) statisztikailag elfogadott különbségként, és a log-rank (Mantel–Cox) teszttel állapítottuk meg. Az eredmények statisztikai elemzését a GraphPad Prism 6.0 szoftverrel (La Jolla, CA, USA) végeztük.

Eredmények

A PAF biztonságosságának vizsgálata egészséges egereken

Az intranasalisan PAF-fal kezelt állatok szövettani vizsgálata és laboratóriumi értékei

A PAF-ot egereken *in vivo* különböző dózisokban (5–2700 µg/kg) vizsgáltuk egy hosszabb (8 hét), illetve egy rövidebb ideig (2 hét) nagy dózisban (2700 µg/kg). Az utóbbi esetben a PAF-ot naponta adtuk, az előző esetben pedig hetente egyszer. A humán terápiában a PAF legvalószínűbb felhasználása az aspergillosis kezelése lenne, amelyhez a gyógyszert a légutakon keresztül kellene bejuttatni, valószínűleg inhalátorok segítségével. Ezért ezt próbáltuk meg szimulálni a PAF-nak az egerek légútjaiba való bejuttatásával úgy, hogy anesztéziában adagoltuk az orron keresztül. A módszer alkalmazhatóságát pedig egy független kísérletben igazoltuk, ahol megmutattuk, hogy a folyadék eléri az alveolusokat (15. ábra). A kísérletek során egy állat sem pusztult el a szer alkalmazása következtében, és a súlyuk és a fizikális aktivitásuk változatlan maradt a teljes kísérlet ideje alatt. A PAF adagolásának következtében kialakuló lehetséges morfológiai eltérések vizsgálatára szövettani vizsgálatot végeztünk néhány állat tüdejéből, veséjéből és a májból. Amint az a 19. ábrán látható, nem találtunk semmilyen patológiás eltérést a szövettani vizsgálatok során a tüdőkben (19. A ábra), a vesékben (19. B ábra), sem a májban (19. C ábra) a PAF rövid távú (2 hét, napi) adagolása után. Hasonló megfigyeléseket tettünk a hosszú távú (8 hetes, heti 1) kezelés során is. Az egerektől vért vettünk a kísérletek kezdetén és végén a fontosabb laboratóriumi paraméterek vizsgálatához. Az össz-fehérvérsejtszám ($1,94 \pm 0,15$ és $1,83 \pm 0,18$ $10^9/l$; kontroll vs. kezelt; $F_{(1,8)} = 0,2$, $p = 0,66$) és a neutrophilek aránya ($2,08 \pm 0,57$ és $2,10 \pm 0,29\%$; kontroll vs. kezelt; $F_{(1,8)} = 0,001$, $p = 0,98$) változatlan maradt a legmagasabb PAF koncentráció (2700 µg/kg) 2 hetes napi adagolása mellett. Továbbá a májenzimek és ionok koncentrációja a vérben nem mutatott szignifikáns emelkedést/eltérést a PAF kezelés után (2. táblázat). A PAF alkalmazása során nem volt szignifikáns változás az egerek súlyában. A rövid távú alkalmazás során az átlagos tömeg $21,6 \pm 0,2$ g volt a kezelés kezdetén, és $21,7 \pm 0,3$ g a kezelés végén ($F_{(1,8)} = 0,01$, $p = 0,92$), és $20,7 \pm 0,8$ g és $20,4 \pm 0,2$ g a kontroll csoportban ($F_{(1,8)} = 0,17$, $p = 0,70$). A PAF kezelés nem változtatta meg az állatok növekedését a hosszú távú (8 hetes) kísérlet során sem. Ezen eredmények alapján a PAF alkalmazása nem váltott ki semmilyen látható eltérést a szervek morfológiájában, sem általános immunválaszt nem indukált.



19. ábra. Különböző egér szövetek szövettani vizsgálata intranasalis PAF kezelés után. Hematoxin-eosin festéssel készült metszetek a tüdőkről (A) a kontroll (bal) és PAF-fal kezelt (2700 $\mu\text{g/kg}$; jobb) egerekből két nagyításban. Metszetek a vesékről (B) és a májról (C). A PAF-fal kezelt állatok szövetein semmilyen patológiai elváltozás nem látható.

2. táblázat

Fontos plazma paraméterek kontroll és intranasalis PAF-fal kezelt egerekből

	Kontroll (n=16)	PAF (n=10)
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	34,6 $\pm$ 1,9	37,9 $\pm$ 1,2
Totál bilirubin (mmol/l)	3,18 $\pm$ 0,55	3,00 $\pm$ 0,1
AST-GOT (U/l)	464,1 $\pm$ 74,8	391,7 $\pm$ 91,3
ALT-GPT (U/l)	86,7 $\pm$ 16,3	54,1 $\pm$ 12,9
Albumin (g/l)	18,7 $\pm$ 1,6	16,2 $\pm$ 1,2
Ca ²⁺ (mmol/l)	1,17 $\pm$ 0,13	1,10 $\pm$ 0,04
K ⁺ (mmol/l)	5,11 $\pm$ 0,19	4,64 $\pm$ 0,18
Na ⁺ (mmol/l)	137,6 $\pm$ 2,6	131,8 $\pm$ 0,6

AST — aszpartát aminotranszferáz, ALT — alanin transzamináz, GOT — glutamát oxaloacetát transzamináz, GPT — glutamát piruvát transzamináz.

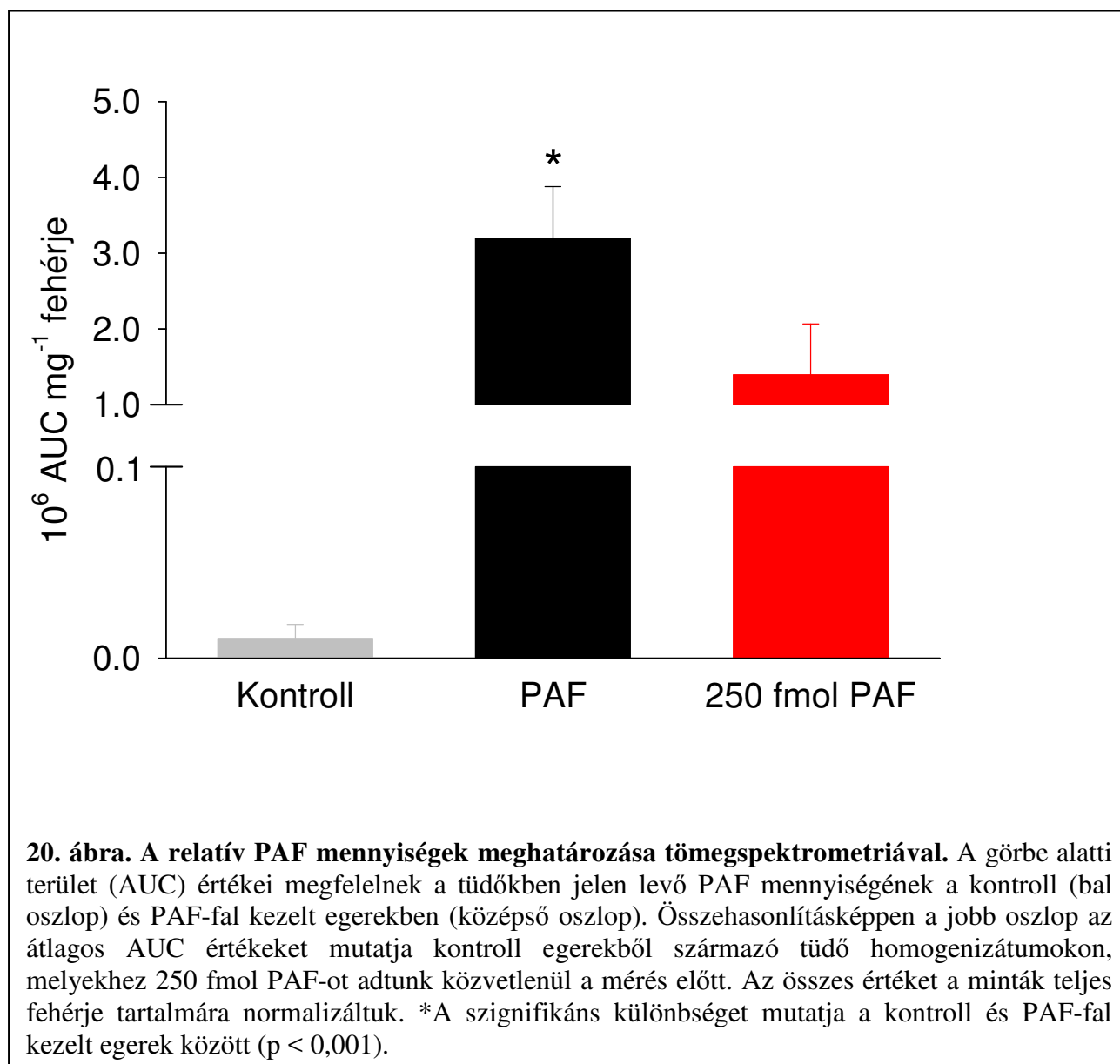
A PAF kezelés utáni értékek közül egy sem különbözött szignifikánsan a kontroll értékektől (F próbát használva: 24 szabadsági fok minden esetben; $F_{1,24}=2,98$, $p>0,11$).

A PAF jelenléte és aktivitása a tüdőben

A módszerünk bizonyításához, hogy nem csak az oldószer, hanem a PAF is jelen van a tüdőben intranasalis adagolás után – tömegspektrometriát alkalmaztunk, hogy bizonyítsuk a fehérje jelenlétét a kezelt állatok tüdejében. A PAF mennyiségét a tömegspektrometriai grafikonok görbe alatti területének számításával határoztuk meg. A relatív PAF mennyiséget (a teljes fehérje tartalomra normalizálva) megmértük a kontroll (n=4) és a PAF-fal kezelt (n=5) tüdő mintákban (20. ábra). Az eredmények szerint az antifungális fehérje egyértelműen jelen van a PAF-fal kezelt állatok tüdejében és a mennyisége (3,2 $\pm$ 0,7 AUC/mg fehérje) szignifikánsan különbözik a nullától ($F_{(1,18)} = 22,121$, $p = 2,1 \cdot 10^{-3}$), és szignifikánsan nagyobb a standardnál is (1,4 $\pm$ 0,7 AUC/mg fehérje, $F_{(1,12)} = 6,8$, $p = 0,023$). A kezeletlen egerekből nyert eredmények szerint a PAF tartalom nem különbözött szignifikánsan a nullától (0,010 $\pm$ 0,007 AUC/mg fehérje; $F_{(1,14)} = 0,197$, $p = 0,665$).

Annak bizonyítására, hogy a PAF megtartotta az antifungális aktivitását a tüdőben, a kontroll és PAF-fal kezelt egerek tüdejének homogenizátumát használtuk *A. nidulans* ellen *in vitro* tesztben. A homogenizátumok felülúszójának 100 μl -e olyan mértékben gátolta az *A. nidulans* növekedését, mint 50 $\mu\text{g/ml}$ PAF oldat. Nevezetesen, az *A. nidulans* növekedését szignifikánsan 25,2 $\pm$ 1,6%-ra csökkentette ($F_{(1,4)} = 3350,5$, $p = 5,3 \cdot 10^{-7}$, ahol 100 % a növekedés a PAF mentes tenyésztő tápközegben). Csökkentve a használt felülúszó mennyiségét 75 μl -re vagy 50 μl -re, a növekedés gátló hatás is csökkent (39,4 $\pm$ 1,2%-ra, $F_{(1,4)}$

= $3524,1$, $p = 4,8 \cdot 10^{-7}$ és $55,3 \pm 1,5\%$ -ra, $F_{(1,4)} = 1184,5$, $p = 4,3 \cdot 10^{-6}$), de még mindig szignifikáns maradt. A PAF-fal nem kezelt egerekből származó tüdőhomogenizátum nem mutatott növekedésgátló hatást *A. nidulans*on ($93,1 \pm 0,6\%$).

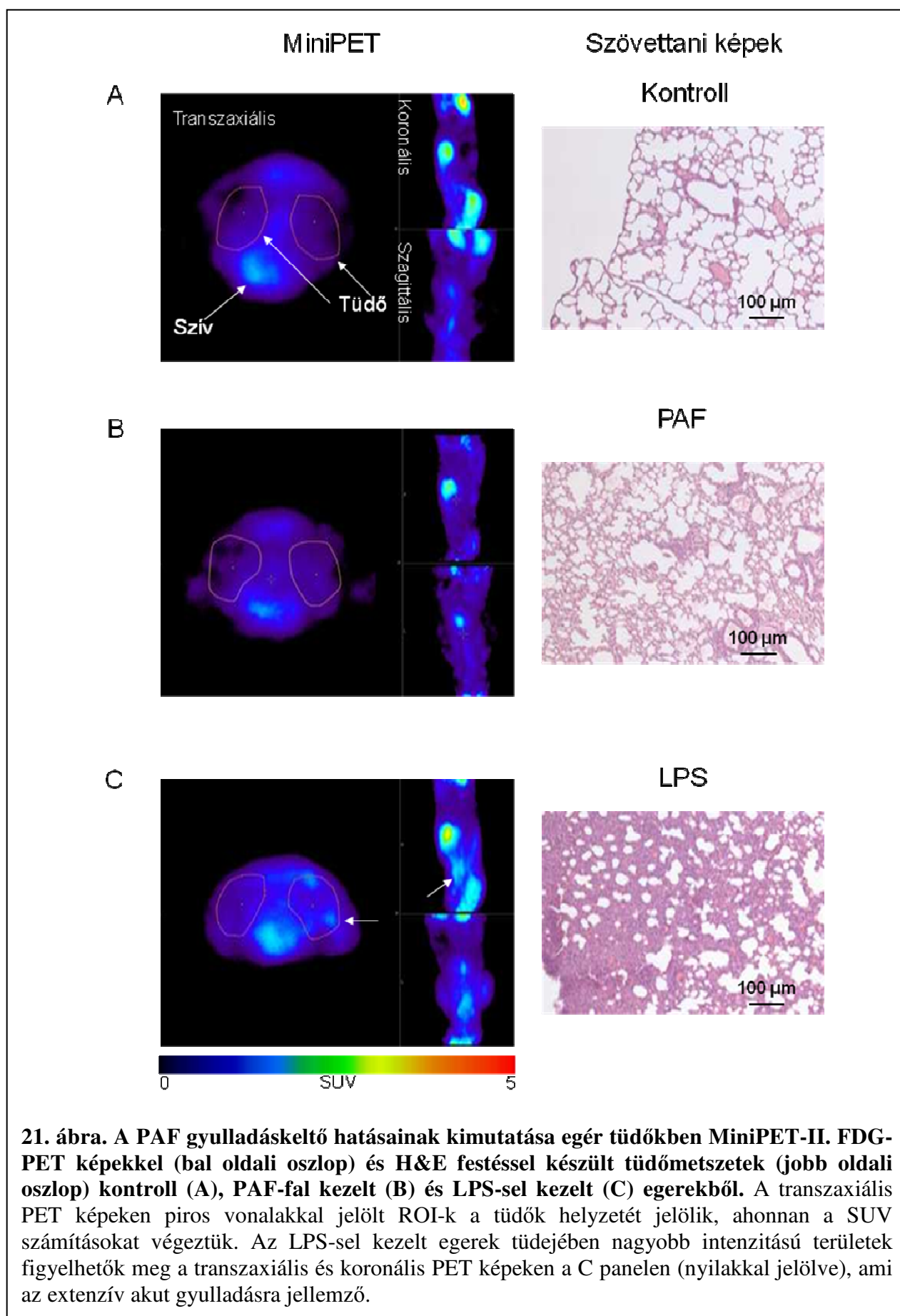


PAF kezelés hatása a tüdőkben

A PAF kezelés tüdőgyulladást kiváltó hatásának vizsgálata céljából egy új, nem invazív módszert használtunk, mely ¹⁸FDG pozitron emissziós tomográfián alapszik. A módszer

érzékeny minden sejtfolymatra, amely metabolizálja a glukózt, mivel a 18-fluorodeoxiglukózt a glukóztansporterek felveszik a sejtekbe, és nem tudják metabolizálni a ^{18}F FDG-6-foszfáttá való foszforiláció után. A felhalmozódása ezért arányos a glukóz felvétellel és következésképpen a sejt metabolikus aktivitásával [174]. Az FDG-PET vizsgálatokat 3 csoportba véletlenszerűen szétosztott 14 egéren végeztük. A test 3D képét az elkészített felvételekből rekonstruáltuk, és a tüdőt vizsgálandó területnek (ROI; lásd 21. ábra bal panel) jelöltük ki. A ^{18}F FDG akkumuláció intenzitását a ROI-n belül a gyulladás mértékeként értékeltük. Ez a módszer lehetőséget adott arra, hogy megbecsüljük, illetve kövessük a fellépő gyulladásos reakciókat az egerekben. A 21. ábrán láthatóak a rekonstruált képek egerekről, melyeket előző nap fiziológiás sóoldattal (21. A ábra), PAF-ot tartalmazó sóoldattal (2700 $\mu\text{g/kg}$; 21. B ábra), illetve a pozitív kontrollként használt LPS-t tartalmazó sóoldattal (250 $\mu\text{g/kg}$, 21. C ábra) kezeltünk. Tisztán látható a felvételekről, hogy míg a PAF önmagában nem fokozta az emissziós intenzitást a tüdőben a kontrollhoz képest, addig az LPS észrevehető emelkedést okozott az emisszióban, mely jelzi a gyulladás jelenlétét. Ezeket a megfigyeléseket számszerűsítettük azáltal, hogy kiszámoltuk a ROI-kban az emissziót. Az átlagolt adatok szignifikáns csökkenést mutattak a PAF-fal kezelt csoportban ($0,50 \pm 0,01$ SUV, $n = 4$, $F_{(1,6)} = 33,43$, $p = 0,01$) a kontrollal összehasonlítva ($0,72 \pm 0,04$ SUV, $n = 4$) és szignifikáns emelkedést az LPS-sel kezelt állatokban ($0,99 \pm 0,09$ SUV, $n = 6$, $F_{(1,8)} = 5,55$, $p = 0,04$).

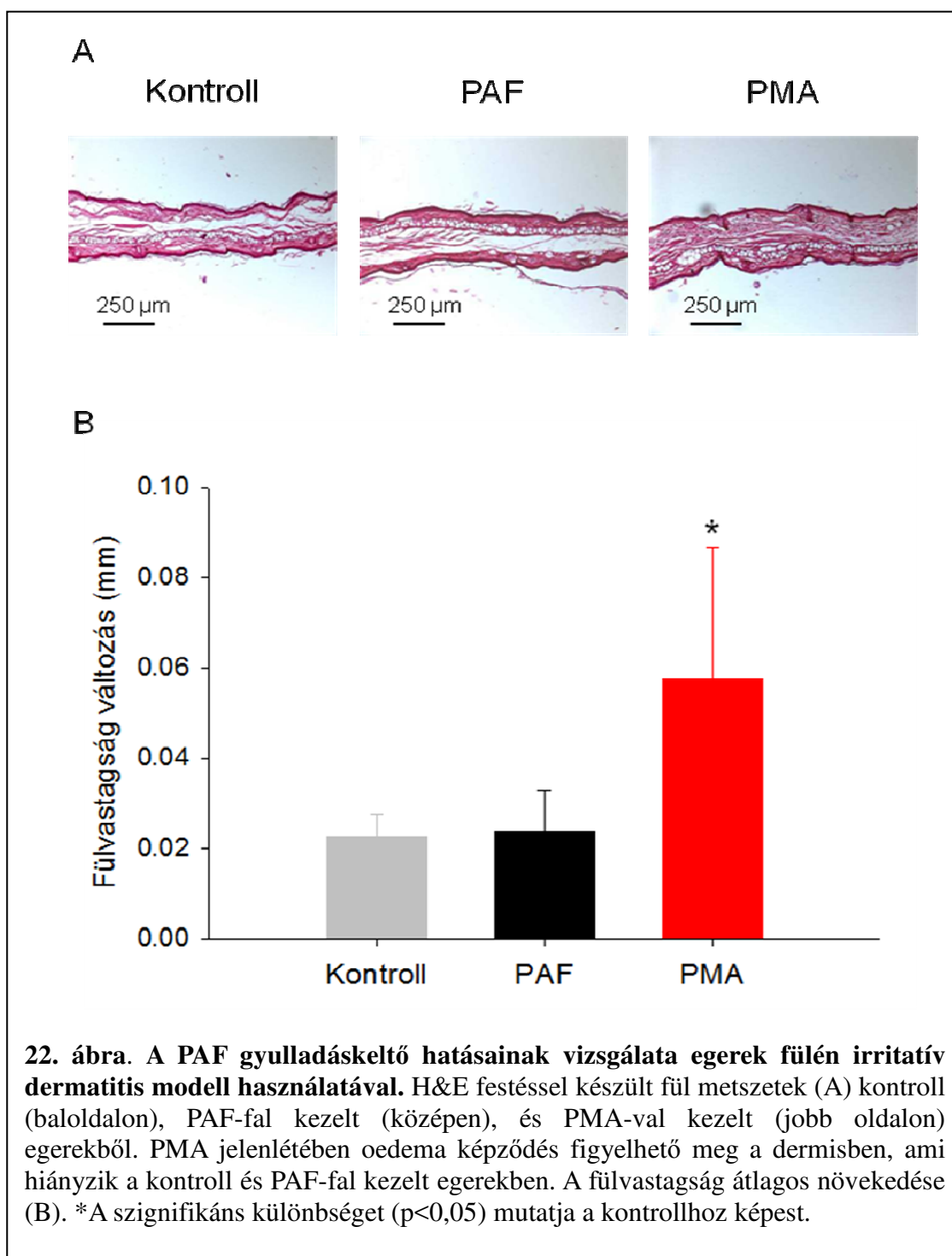
A PET eredmények megerősítéséhez feláldoztunk néhány állatot minden csoportból, és szövettani vizsgálatot végeztünk. A H&E festéssel jelölt metszetek bizonyították a gyulladás hiányát a kontroll és a PAF-fal kezelt állatokban, míg kiterjedt gyulladást mutattak az LPS-sel kezelt állatokban (21. ábra A-C jobb panel). Továbbá a tüdőkárosodási ráta szignifikánsan magasabb volt az LPS-sel kezelt csoportban ($3,7 \pm 0,5$, $F_{(1,11)} = 19,5$, $p = 0,001$), mint a kontroll csoportban ($1,0 \pm 0,4$). Másrészt a PAF-fal kezelt csoport pontszáma ($1,3 \pm 0,3$, $F_{(1,11)} = 0,39$, $p = 0,54$) majdnem teljesen megegyezett a kontroll csoportéval. Továbbá az LPS-sel ellentétben, a PAF kezelést nem kísérte tüdőoedema kialakulása. A tüdőgyulladást és tüdőoedema képződést vizsgáló egyszerű módszerünk szerint az LPS-sel kezelt csoportban szignifikánsan növekedett a tüdő nedves-száraz tömegaránya ($4,04 \pm 0,10$, $F_{(1,6)} = 11,041$, $p = 0,016$) a kontrollhoz képest ($3,61 \pm 0,07$), míg a PAF nem növelte ezt az arányt szignifikánsan ($3,81 \pm 0,10$, $F_{(1,6)} = 2,75$, $p = 0,15$) 24 órával a kezelés után vizsgálva.



21. ábra. A PAF gyulladásokeltő hatásainak kimutatása egér tüdőkben MiniPET-II. FDG-PET képekkel (bal oldali oszlop) és H&E festéssel készült tüdőmetszetek (jobb oldali oszlop) kontroll (A), PAF-fal kezelt (B) és LPS-sel kezelt (C) egerekből. A transzaxiális PET képeken piros vonalakkal jelölt ROI-k a tüdők helyzetét jelölik, ahonnan a SUV számításokat végeztük. Az LPS-sel kezelt egerek tüdejében nagyobb intenzitású területek figyelhetők meg a transzaxiális és koronális PET képeken a C panelen (nyilakkal jelölve), ami az extenzív akut gyulladásra jellemző.

PAF kezelés hatása bőrre

Habár a PAF humán alkalmazása aspergillosis ellen valószínűleg belégzés útján történne, a felszíni alkalmazás is megfontolandó, mivel a PAF sok dermatophytonra gátló hatással bír. A PAF lokális, kontakt bőrgyulladást okozó hatásának vizsgálatához egy irritációs dermatitis modellt használtunk, ahol a fülek duzzanatát mértük.



A PAF kezelés nem okozta a fülek duzzanatát az alkalmazott dózisban. Másrészt a PMA, amelyet pozitív kontrollként használtunk, oedemát okozott (22. A ábra), mely gyulladást jelez. Az utóbbi megfigyelés bizonyította, hogy a modell elég érzékeny ahhoz, hogy jelezze a gyulladást. Különösen a PMA-val kezelt csoportban a fülvastagság növekedése szignifikánsan nagyobb volt ($57,5 \pm 29,2 \mu\text{m}$; $n = 4$) ($F_{(1,10)} = 5,42$, $p = 0,04$) az oedema képződés miatt a kontrollhoz hasonlítva. Ellenben a PAF-fal kezelt állatok fülvastagságának növekedése lényegében azonos volt a kontroll csoporttal ($22,5 \pm 5,0$ és $23,8 \pm 9,2 \mu\text{m}$; a kontroll és a PAF-fal kezelt csoportban, $n = 4$ mindkét csoportban, $F_{(1,10)} = 0,06$, $p = 0,81$; 22. B ábra).

Az intraperitonealis PAF kezelés hatásai

A kísérletek során kiderült, hogy az orron keresztüli PAF alkalmazás nem volt olyan sikeres, mint vártuk, ezért a szert intraperitonealisan is adagoltuk. Kontroll, gombával nem fertőzött egereket kezeltünk intraperitonealisan 0 és 5,4 mg/kg dózisú PAF-fal naponta kétszer egy hétig. Vérmintákat vettünk a kísérlet kezdetén és végén (3. táblázat).

3. táblázat

Fontos plazma paraméterek a kontroll és IP PAF-fal kezelt egerekből

	Kontroll	PAF	F statisztika
Fehérvérsejtszám (G/l)	$9,75 \pm 0,51$	$5,87 \pm 0,41^a$	$F_{1,14}=35,53$, $P=3 \times 10^{-5}$
Neutrophil (%)	$20,1 \pm 2,6$	$23,2 \pm 2,5$	$F_{1,14}=0,71$, $P=0,41$
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	$14,1 \pm 2,1$	$13 \pm 1,5$	$F_{1,14}=0,20$, $P=0,66$
Totál bilirubin (mmol/l)	$1,68 \pm 0,11$	$1,63 \pm 0,11$	$F_{1,14}=0,17$, $P=0,70$
AST-GOT (U/l)	$389,5 \pm 45,2$	$238,8 \pm 56$	$F_{1,14}=4,39$, $P=0,08$
ALT-GPT (U/l)	$208,6 \pm 63,7$	$82,3 \pm 39,4$	$F_{1,14}=1,73$, $P=0,22$
Albumin (g/l)	$35,4 \pm 0,5$	$37,3 \pm 1,3$	$F_{1,14}=1,83$, $P=0,20$
Ca^{2+} (mmol/l)	$2,41 \pm 0,01$	$2,49 \pm 0,07$	$F_{1,14}=1,23$, $P=0,31$
K^+ (mmol/l)	$7,73 \pm 0,38$	$7,56 \pm 0,41$	$F_{1,14}=0,08$, $P=0,79$
Na^+ (mmol/l)	$149,4 \pm 0,9$	$149,5 \pm 0,6$	$F_{1,14}=0,01$, $P=0,93$
Cl^- (mmol/l)	$109,3 \pm 0,7$	$108,3 \pm 0,6$	$F_{1,14}=1,04$, $P=0,33$

Rövidítések: Aszpartát aminotranszferáz, AST; alanin transzamináz, ALT; glutamát oxaloacetát transzamináz, GOT; glutamát piruvát transzamináz, GPT; intraperitoneális, IP.

^aA fehérvérsejtszámok kivételével egy érték sem különbözött szignifikánsan a PAF kezelés után a kontrolltól.

Habár a teljes fehérvérsejtszám enyhén csökkent ($F_{(1,14)}=35,5$, $p=3\cdot 10^{-5}$), a neutrofilek százaléka változatlan maradt ($F_{(1,14)}=0,71$, $p=0,41$). Továbbá a vér májenzim koncentrációja és az ionok szintje nem mutatott szignifikáns ($0,01 < F_{(1,14)} < 4,39$, $0,08 < p < 0,93$) emelkedést/eltérést PAF kezelés után. Nem volt szignifikáns eltérés az állatok tömegében az IP PAF kezelés során. Az állatok átlagos tömege $17,0 \pm 0,3$ g volt a kísérlet kezdetén és $17,2 \pm 0,4$ g a végén ($F_{(1,14)}=0,19$, $p=0,67$). Ezen eredmények szerint a PAF intraperitonealis adagolása nem okozott semmilyen változást az állatokban, és nem indukált semmilyen immunválaszt sem, hasonlóan a nasalis adagoláshoz.

A PAF hatásosságának vizsgálata tüdőaspergillosisban szenvedő egereken

Az intranasalis PAF kezelés hatása

A PAF legvalószínűbb alkalmazása a humán terápiában a tüdőaspergillosis kezelésére a légutakon keresztüli bejuttatás lenne. Ezt az eljárást szimuláltuk azzal, hogy a PAF-ot intranasalisán adagoltuk egereknek nagy koncentrációban (5,4 mg/kg). Az IPA-tól szenvedő fertőzött állatok egyértelműen betegek voltak, lassan mozogtak és a szőrük fénytelen volt. Továbbá, a súlyuk szignifikánsan csökkent (4. táblázat).

4. táblázat

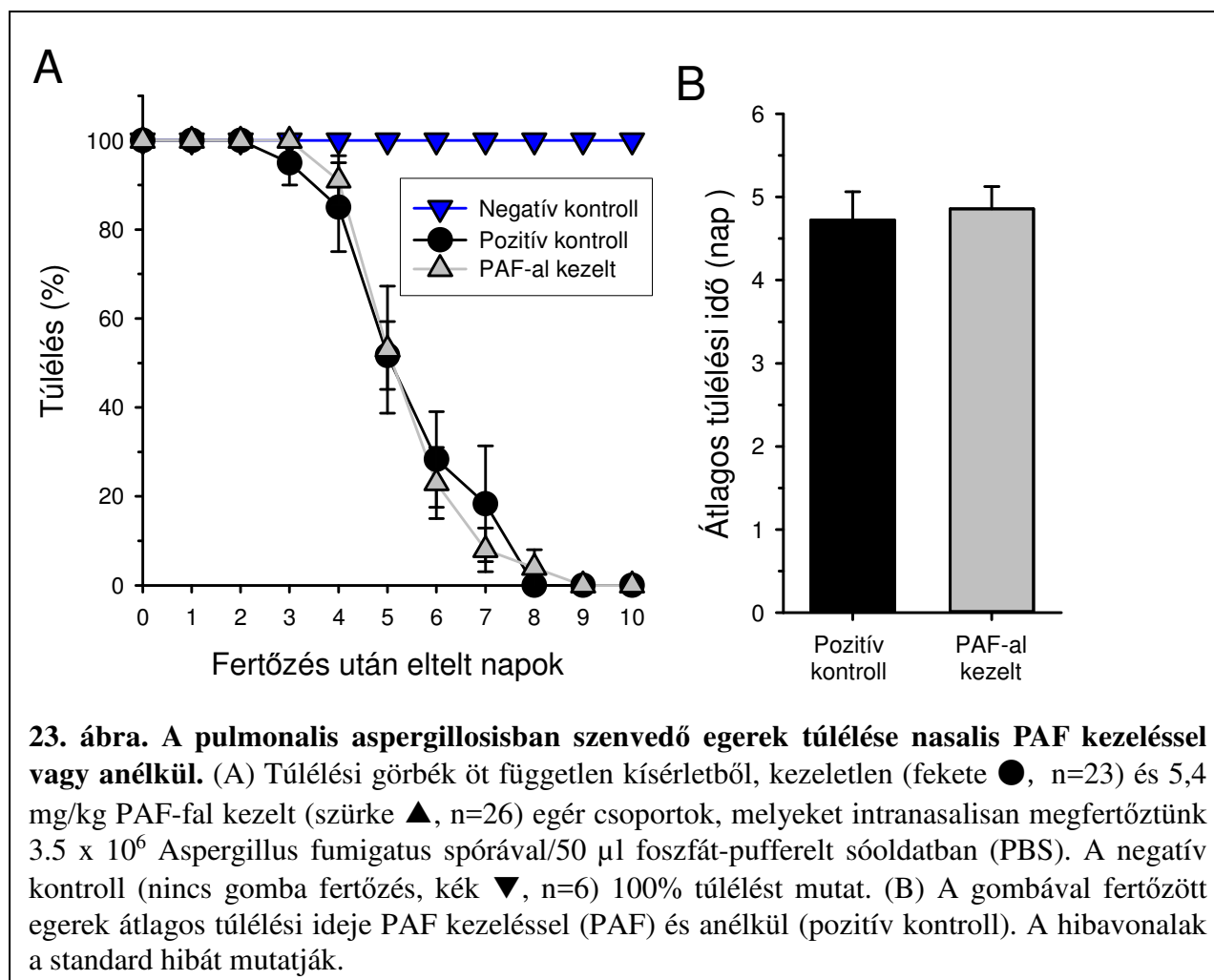
Az egerek átlagos testtömege különböző kezelések után

	Relatív idő a fertőzéshez képest		F statisztika
	-1 nap	+3 nap	
Intranasalis kezelés			
Negatív kontroll (n=6)	17,9±0,7	17,2±0,4	F _{1,10} =0,13, P=0,73
Pozitív kontroll (n=23)	17,1±0,4	13,8±0,3 ^a	F _{1,44} =42,9, P=2×10 ⁻⁴
PAF-fal kezelt (n=26)	17±0,4	13,7±0,4 ^a	F _{1,50} =41,1, P=2×10 ⁻⁴
Intranasalis és IP kezelés			
Negatív kontroll (n=11)	18,5±0,2	17,2±0,7	F _{1,20} =4,24, P=0,06
Pozitív kontroll (n=11)	18,5±0,1	11,9±0,1 ^a	F _{1,20} =338, P=2×10 ⁻⁸
PAF-fal kezelt (n=11)	17,5±0,5	12,2±0,3 ^a	F _{1,20} =73,6, P=6×10 ⁻⁵
AMB-vel kezelt (n=11)	18,6±0,2	12,6±0,3 ^a	F _{1,20} =192, P=7×10 ⁻⁸
PAF+AMB-vel kezelt (n=11)	19,4±0,5	12,7±0,3 ^a	F _{1,20} =115, P=5×10 ⁻⁶

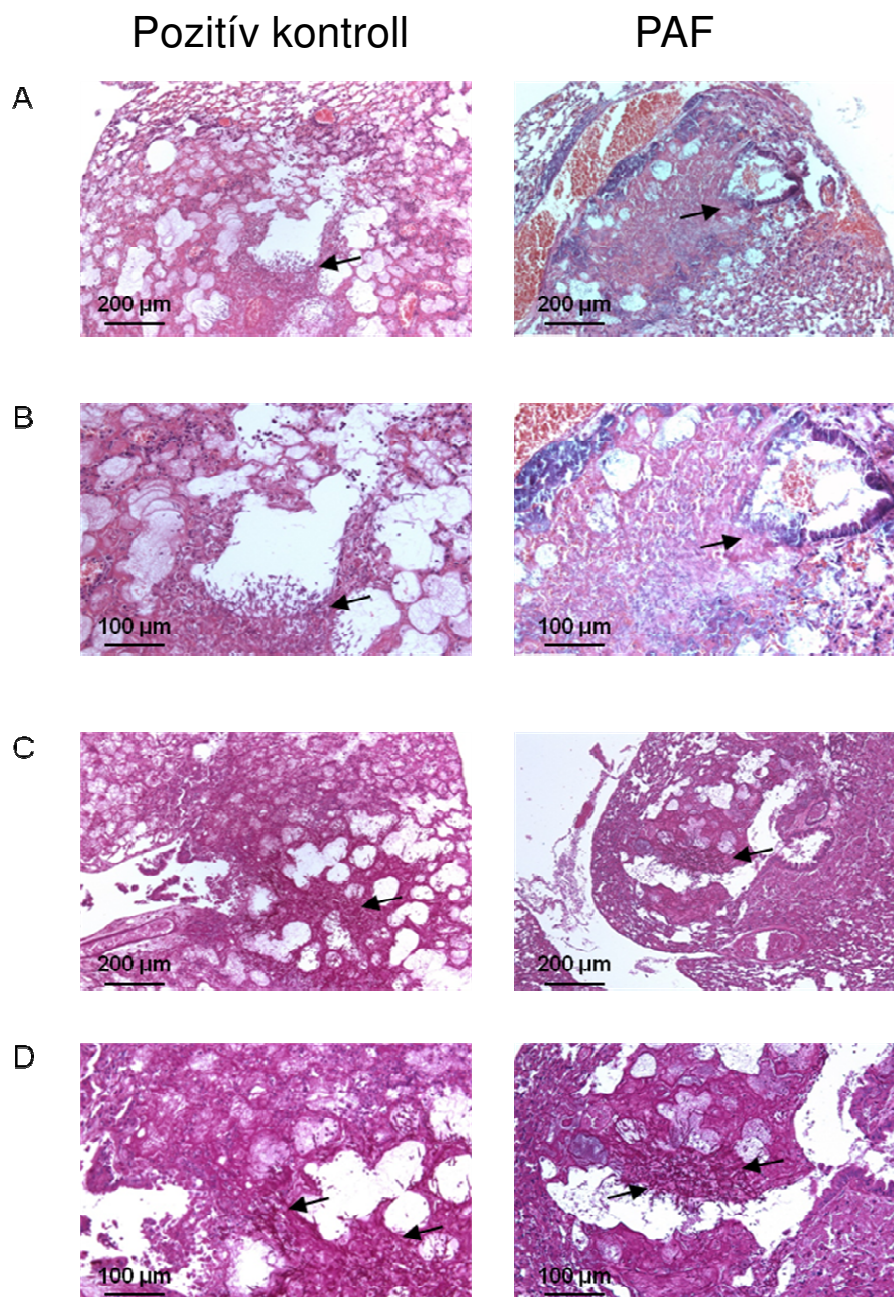
Rövidítések: Amfotericin B, AMB; intraperitonealis, IP

^a mutatja a gomba fertőzés előtti (-1 nap) testtömegetől szignifikáns különbséget. Az értékek grammban vannak megadva. A negatív kontroll csoport állatait immunszupprimáltuk, de nem fertőztük meg *A. fumigatus*-szal.

A PAF késleltette a halálukat kb. egy nappal, de minden állat elpusztult a kilencedik napra (23. A ábra). Ellenben a kontroll nem fertőzött állatok, melyeket csak PBS-ben oldott PAF-fal kezeltünk, 100%-os túlélést mutattak, és a testsúlyuk stabil volt (4. táblázat). Összességében az intranasalis PAF kezelés nem növelte szignifikánsan ($F_{(1,47)}=0,23$, $p=0,63$) az állatok átlagos túlélési idejét (23. B ábra).



A tüdők szövettani vizsgálata súlyos multifokális léziókat mutatott, melyeket makrofágok és neutrofil granulocyták infiltrációja jellemzett vaszkuláris jelenségekkel együtt (thrombusok, nekrosis és vérzések) és alveoláris és bronchiális epitheliális sejtnekrózissal. Az antifungális proteinnel történt intranasalis kezelésnek nem volt figyelemre méltó pozitív hatása a tüdőkben. A pozitív kontroll egerekben nagyszámú proliferáló hifát (24. ábra bal oldali panel) és koagulációs nekrozist figyeltünk meg a vérerekben, szeptumokban, bronchiolusokban, és alveolusokban. Az intranasalis PAF kezelésben részesült egerek tüdejében ugyancsak gyakran figyeltünk meg hifákat a bronchiolusokban és az alveolusokban. Habár a hifák vérerekbe történő inváziója nem volt megfigyelhető (24. ábra jobb oldali panel).

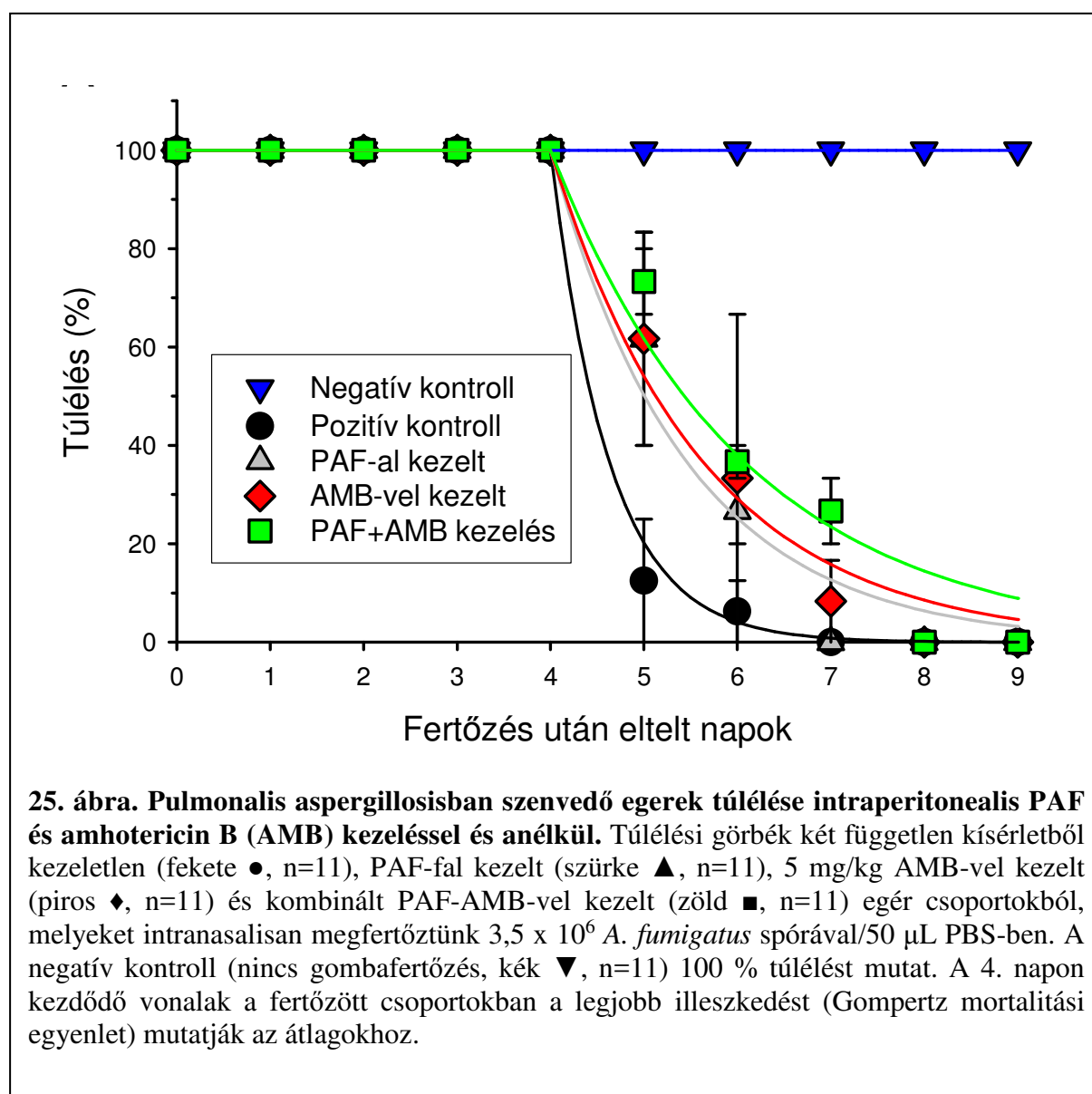


24. ábra. Pulmonalis aspergillosisban szenvedő egerek tüdőszövetének szövettani vizsgálata nasalis PAF kezeléssel és anélkül. A reprezentatív képek a hematoxin-eosin (H&E) (A és B) és PAS (C és D) festéssel készült tüdőszövet metszetek szövettani sajátosságait mutatják a kezeletlen pozitív kontroll (bal oldali oszlop) és 5,4 mg/kg PAF-fal kezelt (jobb oldali oszlop) invazív pulmonalis aspergillosisban (IPA) szenvedő egerekből két nagyításban. A kiterjedt gomba növekedés és szövetkárosodás egyértelműen látható a kezeletlen IPA egerekben. A PAF-fal kezelt egerekben kevésbé kiterjedt gombás fertőzés van jelen. A nyilak gomba csomókat mutatnak nagy sűrűségű gombával és proliferáló hifákkal. Figyelje meg az élénk magenta színű hifákat a C és D képeken.

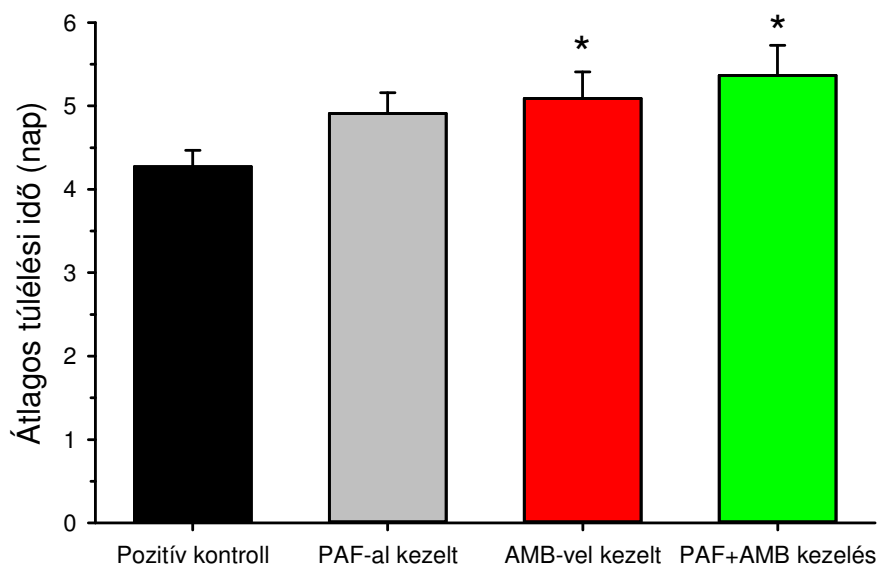
A tüdő károsodási értéke szignifikánsan magasabb volt mindkét esetben ($6,0 \pm 0,0$ és $5,3 \pm 1,2$ a pozitív kontrollban és a PAF-fal kezelt egerekben), mint a nem fertőzött negatív kontroll állatokban ($0,3 \pm 0,3$; $F_{(2,6)}=18,5$, $p=0,003$). A PAF-fal kezelt állatoknak csak minimálisan, de nem szignifikánsan kisebb értékei voltak, mint a kezeletlen egereknek ($F_{(1,4)}=0,31$, $p=0,61$). Fontos megemlíteni, hogy nem találtunk gombás fertőzést a vesékben és a májban.

Pulmonalis aspergillosisban szenvedő állatok kombinált kezelése

A PAF pozitív hatásainak fokozásához az intranasalis adagolást kiegészítettük intraperitonealis injekcióval. A PAF és AMB kombinált alkalmazását is teszteltük. Az *in vivo* alkalmazás előtt *in vitro* PAF és AMB gyógyszer kombinációs vizsgálatot végeztünk. Külön AMB-vel és PAF-fal a MIC értékek *A. fumigatus* AF 293 ellen $1 \mu\text{g/ml}$ és $300 \mu\text{g/ml}$ -nek adódtak. A FICI értékek szerint *in vitro* szinergisztikus hatás áll fenn, ha az AMB-t PAF-fal kombináljuk. A FICI értékeket a szerek individuális és kombinált MIC értékeiből ($0,25 \mu\text{g/ml}$ az AMB és $50 \mu\text{g/ml}$ a PAF esetén) számoltuk ki, és ez $0,42$ -nek adódott. A 25. A ábra mutatja a PAF-fal, amfotericin B-vel (5 mg/kg), illetve mindkét szerrel együttesen kezelt fertőzött állatok túlélését. Tisztán látható a 26. B ábrán, hogy míg sem a PAF, sem az AMB egyedül nem növelte meg a túlélést, a kombinált kezelés figyelemre méltóan meghosszabbította az élettartamot. Ebben a kísérletben minden fertőzött állat elpusztult 7 napon belül függetlenül a kapott kezeléstől. A kezeletlen fertőzött csoportban az állatok több, mint 80%-a meghalt 5 nap után. Lényeges, hogy ezen a napon a PAF-fal vagy AMB-vel kezelt állatok több mint 50%-a még életben volt. Említésre méltó, hogy a kombinált kezelést kapó csoportban csak az állatok 30%-a halt meg az 5. napig. Hat nap után minden PAF-fal kezelt állat elpusztult, míg az AMB-vel kezelt állatok 9%-a, és a kombinált kezelést kapott állatok 27%-a életben volt. Összességében a PAF és az AMB kezelés 1 nappal növelte meg az állatok túlélését, míg néhány állat a kombinált kezelést kapó csoportban két nappal tovább élt, mint a kezeletlen csoport tagjai. A túlélési görbék közti különbségek vizsgálatához, az adatokat az 1-es egyenlettel illesztettük (25. A ábra). Míg a Gompertz halálozási ráta magas volt ($\alpha=1,596$) a pozitív kontroll csoportban, szignifikánsan alacsonyabb volt a PAF-fal ($\alpha=0,6882$, $p<0,001$) és AMB-vel kezelt ($\alpha=0,6146$, $p<0,001$) csoportban. Továbbá, a kombinált kezelés szignifikánsan lelassította a halálozást ($\alpha=0,4831$, $p<0,001$) a kezeletlen csoporthoz képest. Mivel minden állat elpusztult minden csoportban az illesztett egyenletben a plató (pl) értékét nullának tekintettük.



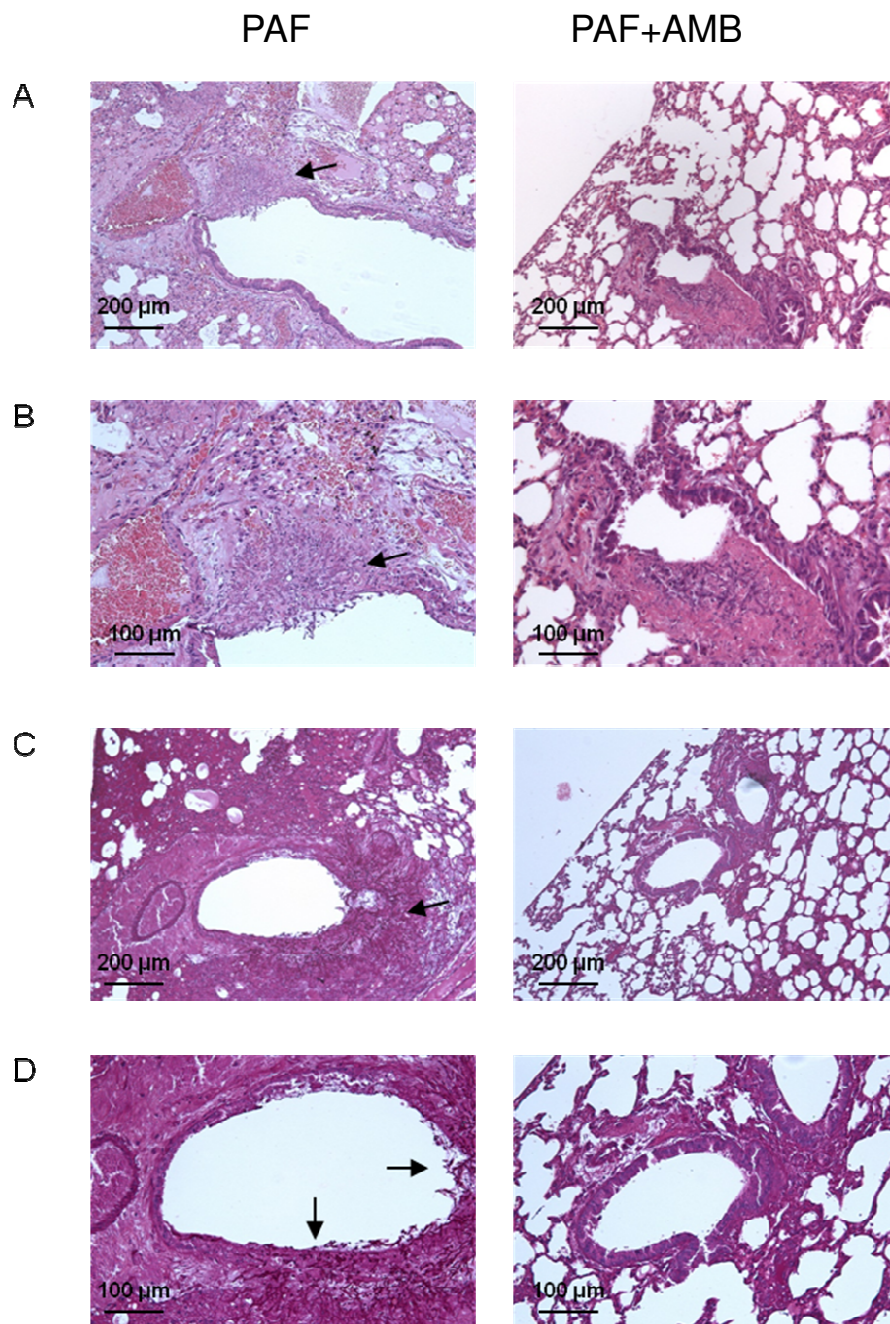
Nem volt szignifikáns különbség az átlagos túlélési időben (26. B ábra) az egyféle kezelést kapó csoportokban ($F_{(1,20)}=0,20$, $p=0,66$). A PAF kezelés önmagában egy közel szignifikáns növekedést okozott az állatok átlagos túlélésében ($F_{(1,20)}=4,02$, $p=0,06$). Másrészt, az AMB egyedül ($F_{(1,20)}=4,88$, $p=0,04$), és a kombinált PAF és AMB kezelés ($F_{(1,20)}=6,99$, $p=0,02$) szignifikánsan megnövelte az állatok túlélését.



26. ábra. Pulmonalis aspergillosisban szenvedő egerek túlélése intraperitonealis PAF és amphotericin B (AMB) kezeléssel és anélkül. A gombával fertőzött egerek átlagos túlélési ideje PAF-fal, PAF nélkül (pozitív kontroll), AMB-vel és kombinált (PAF+AMB) kezeléssel.

* Jelzi a szignifikáns különbséget a pozitív kontrolltól ($P=0,06$, $P=0,04$ és $P=0,02$ PAF, AMB és PAF+AMB kezelés esetén. A hibavonalak a standard hibát mutatják.

Ezeket a megfigyeléseket szövettani vizsgálatokkal erősítettük meg. Az intraperitonealisan PAF-fal kezelt egerek tüdejében számos proliferáló hifát (27. ábra bal panelek) és koagulációs nekrózist találtunk a bronchiolusokban és alveolusokban. A PAF-fal és AMB-vel együttesen kezelt állatok tüdejében hifákat nem figyeltünk meg (27. ábra jobb oldali panelek). A metszetek H&E festése kevésbé kiterjedt gyulladást igazolt a kombinált PAF és AMB kezelést kapó állatokban (27. A és 27. B ábrák). Továbbá, a PAS festés bizonyította a kiterjedt gombás fertőzés jelenlétét az egyféle antimycoticus kezelést (PAF vagy AMB) kapó állatokban, és a fertőzés hiányát, amikor a PAF-ot és AMB-t kombinációban alkalmaztuk (27. C és 27. D ábrák). Továbbá a tüdő károsodás értéke alacsonyabb volt a kombinált kezelést kapó csoportban ($4,0 \pm 0,6$, $F_{(1,5)}=4,96$, $p=0,08$), mint a kontroll csoportban ($6,3 \pm 0,8$). Másrészt a PAF kezelést kapott csoport értéke ($5,0 \pm 0,0$) majdnem azonos volt az AMB-vel kezelt állatokéval ($5,3 \pm 0,6$, $F_{(1,4)}=0,25$, $p=0,64$). Azonban egyik sem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll érték ($F_{(2,7)}=1,11$, $p=0,38$.)

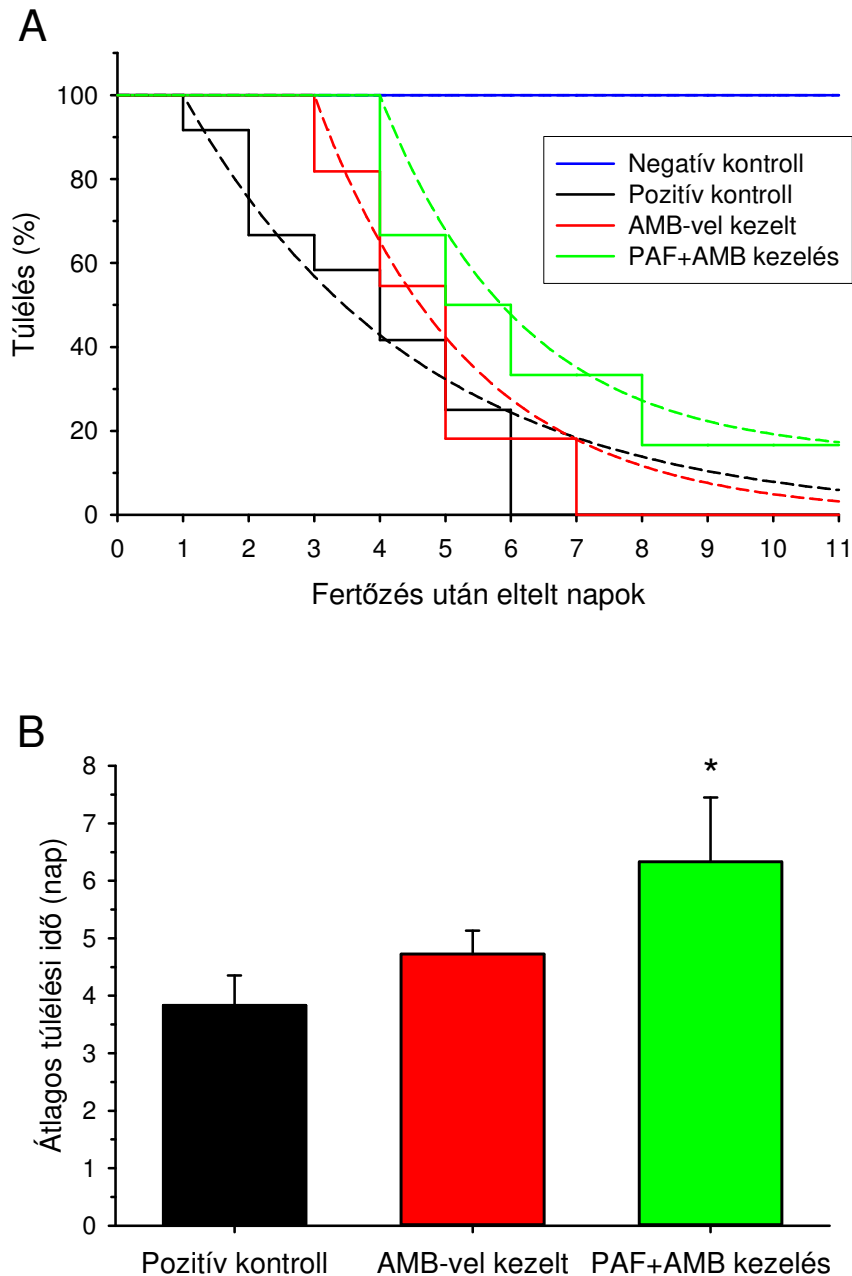


27. ábra. Intraperitonealis PAF és amphotericin B (AMB) kezelésben részesült pulmonalis aspergillosisban szenvedő egerek tüdőszöveiteinek szövettani vizsgálata. A reprezentatív képek a hematoxinilín-eosin (H&E) (A és B) és PAS (C és D) festéssel készült tüdőszövet metszetek szövettani sajátosságait mutatják a PAF-fal kezelt (bal oldali oszlop) és PAF-fal és amphotericin B-vel kezelt (jobb oldali oszlop) invazív pulmonalis aspergillosisban (IPA) szenvedő egerekből két nagyításban. A kiterjedt gomba növekedés és szövetkárosodás egyértelműen látható a PAF-fal kezelt IPA egerekben (nyilakkal jelölve). A kombinált kezelést kapó állatok tüdejében nem voltak megfigyelhetőek gomba labdák és hifák.

Kombinált kezelés csökkentett AMB koncentrációval

A PAF hatékonyságának vizsgálatához, az előző kísérletet megismételtük csökkentett koncentrációjú AMB-vel (2,5 mg/kg). A kombinált PAF és AMB kezelést (n=6) a csak AMB kezelést kapó csoporthoz hasonlítottuk (n=11). A 28. A ábra mutatja, hogy az AMB önmagában késleltette, de nem akadályozta meg az állatok halálát. Nyolc nap után minden AMB-vel kezelt állat elpusztult, míg a PAF-fal való kombinált alkalmazása nem csak tovább késleltette az aspergillosis kifejlődését, de egy fertőzött egér túlélését okozta (16,6%). Ellenben minden fertőzött, és nem kezelt állat (n=12) elpusztult 7 napon belül. A kombinált PAF és AMB kezelés 1 nappal növelte meg az állatok túlélését, és 1 állat túlélte az aspergillosist. Mivel az állatok hamarabb kezdtek el pusztulni (a 2. napon) a pozitív kontroll csoportban, a túlélési görbék analízise egy lassú Gompertz halálozási rátát ($\alpha=0,2822$) eredményezett. Ez szignifikánsan magasabb volt az AMB-vel kezelt csoportokban ($\alpha=0,4292$, $p=0,002$), de az állatok csak a harmadik napon kezdtek el pusztulni. Mindkét esetben a túlélő állatok végső száma (plató) 0 volt. Másrészt, a kombinált kezelés a 4. napig késleltette az állatok pusztulásának kezdetét, növelte az állatok túlélését (a plató 14,1%), és szignifikánsan különböző halálozási rátát eredményezett ($\alpha=0,4689$, $p=0,007$) a kezeletlen csoporthoz hasonlítva.

Nem volt szignifikáns különbség az átlagos túlélési időben (28. B ábra) az egyféle kezelést kapó csoportok és a pozitív kontroll csoport között ($F_{(1,21)}=1,79$, $p=0,20$). Ellenben a kombinált PAF és AMB kezelés ($F_{(1,16)}=5,48$, $p=0,03$) szignifikánsan növelte az állatok túlélését.



28. ábra. Pulmonalis aspergillosisban szenvedő egerek túlélése PAF+AMB kezeléssel és anélkül, és csökkentett dózisú amfotericin B (AMB) kezeléssel. (A) Túlélési görbék egy kísérletből kezeletlen (fekete, n=12), 2,5 mg/kg AMB-vel kezelt (piros, n=11) és kombinált AMB és PAF kezelésben részesült (zöld, n=6) egér csoportokból, melyeket intranasalisán megfertőztünk $3,5 \times 10^6$ *A. fumigatus* spórával/50 μ L PBS-ben oldva. A negatív kontroll (nincs gomba fertőzés, kék, n=6) 100% túlélést mutat. Az 1, 3, és 4. napon kezdődő szaggatott vonalak a fertőzött csoportokban a legjobb illeszkedést mutatják (az illesztett egyenlet a Módszerekben található) az adatokhoz. (B) A gombával fertőzött egerek átlagos túlélési ideje AMB-vel vagy anélkül (pozitív kontroll) és kombinált (PAF+AMB) kezeléssel. *Jelzi a szignifikáns eltérést a pozitív kontrolltól (P=0,20 és P=0,03 AMB és PAF+AMB kezelés esetén). A hibavonalak a standard hibát mutatják.

Megbeszélés

Az *Aspergillus* fajok kiemelkedően fontosak az immunszupprimált betegek megbetegedési és halálozási okai között [36, 44, 175]. A legjobb elérhető kezelés ellenére a túlélési ráta 12 hét után 60-70% között mozog invazív tüdőaspergillosisban szenvedő betegekben [176]. Hasonló trend figyelhető meg a dermatophytonok esetén, amely könnyen terjed öltözőkben és uszodákban, ha rendszeresen sokan használják [177]. Mivel az antifungális terápia hatékonysága nem teljes egyik gombás fertőzésben sem, új antimycoticus szerek kifejlesztése és bevezetése a humán terápiában egyértelműen hasznos lenne.

A *Penicillium chrysogenum*-ból származó antifungális proteinről (PAF) bebizonyosodott, hogy nagyon hatékonyan gátolja a növekedését *in vitro* sok állatpathogén gombának [1]. A PAF hatásai közé tartozik a gomba sejtek membránjainak hiperpolarizációja, a reaktív oxigén gyökök képződésének növekedése, melyek oxidálják az intracelluláris proteineket, lipideket és nukleinsavakat, nem csak a sejt, hanem a mitokondriumok membránjainak dezintegrációját is okozva [126]. Ezeket a hatásokat 10 µg/ml koncentrációval sikerült kiváltani a legérzékenyebb fajoknál és 50 µg/ml koncentrációnál minden érintett fajnál megjelentek [1, 3]. A kísérleteinkben alkalmazott koncentrációkat e korábbi kísérletek alapján határoztuk meg [126], ahol a membrán hiperpolarizáció és az apoptózis nyilvánvaló jeleit megfigyelték az *Aspergillus* hifákban vagy protoplasztokban PAF kezelés után. A vizsgálatainkban ezért 5–2700 µg/kg PAF koncentrációkat használtunk, ami megfelel 2–1100 µg/ml-nek. Arra számítottunk, hogy a legnagyobb koncentráció, amit használtunk, jóval nagyobb annál, ami az észlelhető antifungális hatáshoz szükséges. Ezt bizonyítottuk *in vitro* a PAF-fal kezelt egerek tüdőhomogenizátumainak *A. nidulans* növekedésére kifejtett hatásának vizsgálatával. Valójában két különböző módszert használtunk a PAF jelenlétének és antifungális hatékonyságának meghatározásához a kezelt egerek tüdejében. Először tömegspektrometriai mérések kimutatták, hogy mérhető mennyiség volt jelen a fehérjéből a kezelt egerek tüdejében 4 órával az inhalációs adagolás után. Másodszor, e tüdők homogenizátumai sikeresen gátolták az *A. nidulans* növekedését megközelítőleg 50-70%-kal az alkalmazott mennyiségtől függően, míg a kezeletlen egerekből származó homogenizátumoknak nem volt ilyen hatása. Ezen megfigyelések egyértelműen megmutatták, hogy a protein nem csak jelen volt a tüdőkben órákkal a beadása után, de a funkcionális aktivitását is megtartotta.

Ugyancsak lényeges kiemelni, hogy a PAF-fal kezelt egerek nem mutattak semmi változást a viselkedésükben. Az állatok aktivitása nem változott, beleértve a víz és élelem fogyasztásukat, illetve a fizikai aktivitásukat. Továbbá megtartották a testsúlyukat, illetve még gyarapodott is a súlyuk a fehérje hosszú távú alkalmazása során. Ezek teljesen egybevágnak a korábbi *in vitro* vizsgálatainkkal, ahol nem észleltük toxikus hatását a PAF-nak emlős sejteken: neuronokon, endothelialis sejteken és vázizom rostokon [3]. Mindent együttvéve, a PAF *in vivo* alkalmazásával kapcsolatos jelenlegi megfigyeléseink egyértelműen arra utalnak, hogy ez az antifungális szer a használt koncentráció tartományban nincs hatással a kezelt állatok általános állapotára.

A legnagyobb koncentrációjú PAF-fal kezelt (2700 µg/kg) egerek több szervén, köztük a tüdőkön, a májon, a vesén és az ornyálkahártyán szövettani vizsgálatot végeztünk. A tény, hogy semmilyen morfológiai eltérést nem figyeltünk meg ezekben a szervekben, alátámasztja, hogy a PAF-nak nincsenek toxikus hatásai, habár az ideg-, a muszkuloskeletális, kardiovaszkuláris, és lymphoreticularis rendszereket is meg kellene vizsgálni, a teljes toxikológiai vizsgálathoz. A megfigyelésünk szerint a máj, a vesék, a vázizmok esetén a májenzimek, a fontos szérum ionok, a kreatin kináz szintek a PAF-fal kezelt állatok vérében lényegében megegyeznek a kontroll állatokéval (3. táblázat). Másrészt meg kell említeni, hogy PAF kezelés esetén egy kis csökkenő trend volt megfigyelhető a plazma paraméterek esetén. Mivel egyes paramétereknél (kreatinin, totál bilirubin, máj enzimek) a növekedés, míg mások esetén (albumin, Ca^{2+} , K^+ és Na^+) minden eltérés patológiás lehet, a fehérje alkalmazásánál szisztematikus toxikus hatást nem figyeltünk meg. Ez ismét alátámasztja, hogy a PAF kezelés nem váltott ki semmilyen detektálható toxikus hatást egereken.

Korábbi kísérletekben a PAF lehetséges *in vitro* pro-inflammatorikus hatását vizsgálták emberi véren [3]. Azokban a vizsgálatokban a vérmintákat különböző koncentrációjú PAF oldatokkal kezelték, és az IL-6, IL-8 és TNF- α szintjét mérték. A citokinek termelésében jelentkező emelkedés minimális volt az LPS hatásához képest. Mi itt megvizsgáltuk, hogy a PAF *in vivo* alkalmazása megváltoztatja-e a teljes fehérvérsejt számot és a neutrophil granulocyták relatív arányát. Az eredmények szerint a PAF jelenléte nem váltott ki semmilyen változást a fehérvérsejtszámban, sem a neutrophil granulocyták relatív arányában. Továbbá nem volt neutrophil infiltráció egyik vizsgált szerv szövettani mintáiban sem. Különösen a tüdő esetén a tüdőkárosodás értéke hasonlóan alacsony volt a kontroll és a PAF-fal kezelt

csoportban, tehát vérzés nem volt jelen egyik állatcsoportban sem. Habár mivel egy idegen proteint adtunk be az egereknek, az immunreakciók lehetőségét nem lehet kizárni.

Ezek a megfigyelések összhangban állnak az FDG-PET technikával szerzett adatokkal. Mivel a ^{18}F FDG felhalmozódása a szövetekben arányos a sejtanyagcserével, ezért megfelelő jelzője a szöveti gyulladásnak [178]. A PET hasznos lehet a makrofágok és a neutrophilek aktivációjának kimutatására korai tüdőgyulladásban. Ezért arra számíthatunk, hogy egy világos növekedést látunk a ^{18}F FDG jelben azokban a szövetekben, ahol gyulladás alakul ki. A MiniPET-II rendszerünk bizonyítottan megfelelően érzékeny az ilyen jelek észleléséhez. A PAF alkalmazása nem járt az FDG-hez kötődő pozitron emisszió jel emelkedésével, világosan jelezve bármilyen gyulladás hiányát a tüdőkben. Másrészt az LPS, mint pozitív kontroll, nagy emelkedést indukált a SUV értékekben, hasonlóan a korábban LPS-sel kezelt patkányok esetében [178]. Érdeemes megjegyezni, hogy néhány állatban az FDG-PET vizsgálatokkal megállapított gyulladás hiányát illetve jelenlétét szövettani vizsgálatokkal is megerősítettük, és ezek alátámasztották a ^{18}F FDG segítségével tett megfigyeléseinket. Érdekes módon a PAF-fal kezelt állatokban a SUV értékek csökkentek a kontroll társaikhoz képest. Jelenleg nincs megfelelő magyarázatunk erre a megfigyelésre, habár hasonló eredmények születtek daganatellenes szerekkel sejt kultúrákban [179].

Korábbi tanulmányok megmutatták, hogy a PAF rendelkezik növekedés gátló hatással több dermatophytonra, mely morfológiailag és élettanilag kapcsolódó penészfajok csoportja, és a gerincesek keratin szöveteit befolyásolják [2]. Ez felveti a lehetőségét a PAF lehetséges terápiás felhasználásának dermatophytosisban. Ilyesfajta alkalmazás esetén elkerülhetetlenül szükséges lenne, hogy a PAF bőrön történő lokális alkalmazása ne váltson ki semmilyen helyi gyulladásos reakciót. A különböző szerekkel való felszíni kezelés után a fülvastagság mérése egy elfogadott modellje a bőrgyulladások detektálásának [168-169]. Ezen kísérletekből származó eredményeink bizonyítják, hogy a PAF nem váltott ki gyulladást lokálisan a bőrön való alkalmazás esetén. Ez felveti a lehetőségét, hogy a fehérje használható lenne a helyi és szisztémás dermatophytosis gyógyításában.

A hatásossági kísérletek eredményei bizonyítják, hogy a PAF-nak nincs toxicitása, és nincs gyulladáskeltő hatás számos szervében az egereknek, így folytathattuk kísérleteinket, melyekben a PAF antifungális hatékonyságát vizsgáltuk.

Összehasonlítottuk a PAF *in vivo* antifungális aktivitását amikor intranasalisan és intraperitonealisan adagoltuk, akár önmagában, vagy kombinációban amfotericin B-vel *A. fumigatus* által kiváltott invazív pulmonalis aspergillosis modellben immunszuppresszált egerekben. A modell megfelelően reprodukálható volt, és minden kezeletlen állat elpusztult 9 napon belül a gombás fertőzés után. A PAF egy nagyon stabil protein [159], és ezért könnyű és biztonságos előkészíteni a beadásra az alkalmazás módjától függetlenül. A nasalis alkalmazás esetén az antifungális hatáshoz elegendő koncentrációt meghatároztuk a tüdőben *in vitro*. Sajnos az alkalmazás módjától függetlenül, a protein nem volt kimutatható a szérumban. Megjegyzendő a tény, hogy a PAF felhalmozódása nem volt megfigyelhető, mely valószínűleg a szervezetben lévő rövid féléletidejével magyarázható. Mivel a vérmintákat 120 perccel a szer utolsó intraperitonealis adagolása után vettük, a PAF elég kicsi ahhoz, hogy a glomerulusokban filtrálódjon, és ezért kiválasztódjon a vesékkel. Ez alapján ahhoz, hogy kimutatható PAF koncentrációt érjünk el az egerek szérumában, a fehérjét nagyobb koncentrációban kellene alkalmazni, mint ahogy mi a kísérleteinkben adagoltuk. A megfelelő terápiás koncentrációkat az IPA kezelésére későbbi vizsgálatokkal kell majd megállapítani.

A PAF intraperitonealis adagolása biztató volt az 5. és 6. fertőzés utáni napon a gomba terjedésének megelőzésére a tüdőben, de végül nem tudta megakadályozni a gomba invázióját. Figyelemre méltó, hogy a PAF önmagában majdnem olyan hatékony volt, mint a kis koncentrációjú (2,5 mg/kg) AMB, ami egy gyakran használt antifungális szer az IPA kezelésében [180-181]. Továbbá, a PAF és AMB együttes alkalmazása egyértelműen hatásosabb volt az egyféle antifungális szer (PAF vagy AMB) kezelésnél, ha a megnövekedett túlélési időket figyelembe vesszük. Az *in vitro* interakciós vizsgálat bebizonyította, hogy ezek hatása szinergisztikus *A. fumigatus*-szal szemben. A modellünkben használt magasabb dózisú (5 mg/kg) AMB sem volt képes önmagában megelőzni az IPA terjedését egerekben. A humán terápiában az AMB-t leggyakrabban intravénás (iv.) infúzió formájában alkalmazzák 1-2 hétig, a szokásos dózisa 3 mg/kg/nap. Az AMB magasabb dózisainál (10 mg/kg/nap) a nephrotoxicitás előfordulása megnövekszik [182]. Habár az IPA-ban szenvedő betegeknél nem figyeltek meg különbséget a hatékonyságban az AMB alacsony és nagy dózisa között, mindkét esetben ~50%-ban tapasztaltak pozitív hatást. Egy összehasonlító tanulmány pozakonazollal és AMB-vel azt találta, hogy habár a túlélés pozakonazollal 70-90% között volt, csak 0-50% volt AMB-vel [183]. Az AMB és anidulafungin hatékonyságát ugyancsak összehasonlították, és mindkét antifungális szer megnövelte a túlélést, de végül az állatok

legalább 90%-a elpusztult minden csoportban [184]. Ezek az eredmények összhangban vannak a mi megfigyeléseinkkel. Meg kell jegyeznünk, hogy az AMB intraperitoneális adagolása klinikailag kevésbé releváns, de a PAF-fal való szinergikus hatása ilyen módon is vizsgálható az állatmodellünkben. Korábban kimutatták, hogy az AMB eloszlása a tüdőkben szignifikánsan különböző az intraperitoneális és intravénás alkalmazásnál [185]. Mivel az IP adagolásnál az AMB nagyobb mennyiségben volt jelen a tüdőkben, mint az iv. adagolásnál, ezért a későbbi állatkísérletekben az alkalmazott koncentráció különbözhet a jelen kísérletben alkalmazottnál. Az is lehetséges, hogy az általunk megfigyelt szövettani eltérések részben az AMB felhalmozódásának következménye volt, habár az AMB-t alacsony koncentrációban alkalmaztuk, és csak 3 alkalommal.

Ugyancsak ígéretes, hogy a PAF és alacsony koncentrációjú AMB (2,5 mg/kg) kombinált kezelés ugyanolyan hatékony volt, ha nem hatékonyabb, mint a nagy koncentrációjú AMB-vel végzett kombinált kezelés esetében. Ez a megfigyelés felveti a lehetőségét egy csökkentett dózisú AMB-vel végzett kombinált kezelésnek, hogy csökkentsék az IPA-ban szenvedő egereknél megfigyelt toxicitást [186]. Ezzel szemben a PAF alkalmazásánál sem toxicitást, sem mellékhatást nem figyeltünk meg eddig.

Más patogén gombákhoz hasonlóan, az *Apergillus* fajok is rezisztenssé válhatnak különböző antifungális szerekkel szemben. Például az itraconazol rezisztenciát 1997-ben jelentették először [187], és az itraconazolra rezisztens törzsek több mint 50%-a kereszt-rezisztens volt más azolokra, mint pl. a vorikonazol és pozakonazol, amelyek az antifungális terápia elsősorú gyógyszerei [82].

Tekintve a gyakran használt antifungális szerek iránt kifejlődött rezisztencia terjedését, sürgősen szükséges új típusú antimycoticus szereket találni, amelyek hatékonyak a humán opportunisták kórokozó *Aspergillus* fajok ellen. Mi mutattuk ki először, hogy a PAF *in vivo* alkalmazható IPA ellen, még relatíve kis koncentrációjú adagolás mellett is. Továbbá a tény, hogy az AMB szinergikusan hatott a PAF-fal *in vitro*, felveti a lehetőségét, hogy hasonló kombinációknak ugyancsak jó hatása lehet az IPA-ban szenvedő neutropeniás betegek esetében. További *in vivo* kísérletek szükségesek más antimycoticus szerek PAF-fal való interakcióinak felderítésére, és a megfelelő koncentrációk meghatározására, amelyekkel az IPA vagy más gombák által okozott betegségek progressziója megállítható, vagy akár visszafordítható.

Összefoglalás

A *Penicillium chrysogenum* által termelt antifungális fehérje (PAF) gátolja a szaporodását fontos patogén fonalas gombáknak, köztük az *Aspergillus* család tagjainak és néhány dermatophytonnak. Továbbá a PAF-ról bebizonyították, hogy nincs toxikus hatása emlős sejtekre *in vitro*. Annak bizonyítására, hogy a PAF biztonságosan használható lehet a humán terápiában, *in vivo* kísérleteket végeztünk. Felnőtt egereknek adagoltunk PAF-ot intranasalisan különböző koncentrációkban, maximálisan 2700 µg/kg-ig két hétig naponta. Ez a koncentráció már erősen toxikus *in vitro* az összes használt érzékeny gombafajra. Tömegspektrometriával bizonyítottuk, hogy mérhető mennyiségű PAF halmozódott fel a tüdőkben a kezelés után. A PAF-fal kezelt egerekből származó tüdőszövet kivonatok szignifikáns antifungális aktivitást mutattak. Még a legmagasabb koncentrációnál sem pusztult el egyetlen egy állat sem a kezelés következtében, illetve nem figyeltünk meg mellékhatásokat. Szövettani vizsgálattal nem találtunk patológias eltéréseket sem a májban, a vesékben, vagy a tüdőkben. Kisállat pozitron emissziós tomográfiával kimutattuk, hogy sem a fiziológiás sóoldat, sem a PAF nem váltott ki gyulladást, míg a lipopoliszacharid igen. A szer bőrre kifejtett hatását megvizsgáltuk, ahol az egerek füleinek vastagsága nem változott PAF kezelés után, míg a pozitív kontroll PMA adása után igen. Mivel nem találtunk toxikus hatást a PAF adagolása során, invazív pulmonalis aspergillosis (IPA) elleni hatékonyságát teszteltük IPA-ban szenvedő egereken. Felnőtt egereket immunszupprimáltunk, majd megfertőztünk *Aspergillus fumigatus*-szal. A stabil fertőzés létrehozása után, az állatokat PAF-fal kezeltük intranasalisan naponta kétszer 2,7 mg/kg koncentrációban, ami erősen toxikus *in vitro* *A. fumigatus*-ra. Az állatok mortalitása enyhén lassult, de végül minden állat elpusztult. A szövettani vizsgálatok masszív gombás fertőzést mutattak ki a PAF-fal kezelt és a kezeletlen állatok tüdejében is. Mivel az intranasalisan adagolt PAF képtelen volt legyőzni az IPA-t, módosított és kombinált kezeléseket alkalmaztunk. Az IPA-ban szenvedő állatok intraperitonealis kezelése PAF-fal az állatok túlélését csak 1 nappal hosszabbította meg. Hasonló eredményeket kaptunk amfotericin B-vel (AMB), amely szinergisztikusan hat *in vitro* a PAF-al. A kombinált kezelés AMB-vel és PAF-fal hatékonyabbnak bizonyult, mint akár az AMB vagy PAF kezelés önmagában. Mivel emlősökben eddig nem derült ki a PAF-nak semmilyen toxikus hatása, továbbá nem jelentettek eddig természetes vagy szerzett PAF rezisztenciával rendelkező *A. fumigatus* törzseket, érdemes lenne további vizsgálatokat végezni a PAF bevezetéséhez potenciális antifungális szerként a humán terápiába.

Summary

The antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF) inhibits the growth of important pathogenic filamentous fungi, including members of the *Aspergillus* family and some dermatophytes. PAF was proven to have no toxic effects on mammalian cells *in vitro*. To prove that PAF could be safely used in therapy, experiments were carried out to investigate its *in vivo* effects. Adult mice were inoculated with PAF intranasally in different concentrations, up to 2700 µg/kg daily, for 2 weeks. Mass spectrometry confirmed that a measurable amount of PAF was accumulated in the lungs after the treatment. Lung tissue extracts from PAF treated mice exerted significant antifungal activity. Even at the highest concentration - a concentration highly toxic *in vitro* for all affected molds used - animals neither died due to the treatment nor were any side effects observed. Histological examinations did not find pathological reactions in the liver, in the kidney, and in the lungs. Small-animal positron emission tomography revealed that neither the application of physiological saline nor that of PAF induced any inflammation while the positive control lipopolysaccharide did. The effect of the drug on the skin was examined in an irritative dermatitis model where the change in the thickness of the ears following PAF application was found to be the same as in control. Since no toxic effects of PAF were found in intranasal application, the next step was to test its efficacy against invasive pulmonary aspergillosis (IPA), experiments were carried out in mice suffering from IPA. Adult mice were immunosuppressed and then infected with *Aspergillus fumigatus*. After stable infection, the animals were inoculated with PAF intranasally at a concentration of 2,7 mg/kg twice per day. At this concentration -which is highly toxic *in vitro* to *A. fumigatus*- the mortality of the animals was slightly delayed but finally all animals died. Histological examinations revealed massive fungal infections in the lungs of both PAF-treated and untreated animal groups. Because intranasally administered PAF was unable to overcome IPA, modified and combined therapies were introduced. The intraperitoneal application of PAF in animals with IPA prolonged the survival of the animals only 1 day. Similar results were obtained with amphotericin B (AMB), with PAF and AMB being equally effective. Combined therapy with AMB and PAF -which are synergistic *in vitro*- was found to be more effective than either AMB or PAF treatment alone. As no toxic effects of PAF in mammals have been described thus far, and, moreover, there are so far no *A. fumigatus* strains with reported inherent or acquired PAF resistance, it is worth carrying out further studies to introduce PAF as a potential antifungal drug in human therapy.

Irodalomjegyzék

- [1] Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler-Goerz R, Burgstaller W, Leiter E, Marx F. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. Arch Microbiol. 2003;180:204–10.
- [2] Galgoczy L, Papp T, Pócsi I, Hegedus N, Vagvolgyi C. In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008;94:463–70.
- [3] Szappanos H, Szigeti GP, Pal B, Rusznak Z, Szucs, G, Rajnavolgyi, E, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter E, Pócsi I, Marx F, Csernoch L. The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2005;371:122–32.
- [4] Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, Rediers H, Lievens B. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. Microb Biotechnol. 2016 Jun 7.
- [5] Shibuya K, Naoe S, Yamaguchi H. Animal models of *A. fumigatus* infections. Contribution to microbiology. 1999;2:130–38.
- [6] Geftter WB. The spectrum of pulmonary aspergillosis. J Thorac Imaging. 1992;7:56–74.
- [7] Binder RE, Faling LJ, Pugatch RD, Mahasaen C, Snider GL. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: A discrete clinical entity. Medicine. 1982;61:109–24.
- [8] Shibuya K, Ando T, Hasegawa C, Wakayama M, Hamatani S, Hatori T, Nagayama T, Nonaka H. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. J. Infect. Chemother. 2004;10(3): 138–45.
- [9] Basich JE, Graves TS, Baz MN, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid-dependent asthmatics. J Allergy Clin Immunol. 1981;68:98–102.
- [10] Mroueh S, Spock A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. Chest. 1994;105:32–36.
- [11] Wang JL, Patterson R, Rosenberg M, et al. Serum IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* as a diagnostic aid in allergic bronchopulmonary aspergillosis. Am Rev Respir Dis. 1978;117:917–27.
- [12] Cockrill BA, Hales CA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Annu Rev Med. 1999; 50:303–16.
- [13] Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Chest. 2002;121(6):1988–99.
- [14] Shibuya K, Ando T, Wakayama M, Takaoka M, Uchida K, Naoe S. Pathological spectrum of invasive pulmonary aspergillosis: Study of pulmonary lesions of 54 autopsies and the relationship between neutrophilic response and histologic features of lesions in experimental aspergillosis. Jpn J Med Mycol. 1997;38:175–81.
- [15] Shibuya K, Takaoka M, Uchida K, et al. Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats: Pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. Microbiol Pathog. 1999;27:123–31.
- [16] Faulkner SL, Vernon R, Brown PP, et al. Hemoptysis and pulmonary aspergilloma: operative versus nonoperative treatment. Ann Thorac Surg. 1978;25:389–92.
- [17] Tomee JF, van der Werf TS, Latge JP, et al. Serologic monitoring of disease and treatment in a patient with pulmonary aspergilloma. Am J Respir Crit Care Med. 1995;151:199–204.

- [18] Addrizzo-Harris DJ, Harkin TJ, McGuinness G, et al. Pulmonary aspergilloma and AIDS: a comparison of HIV infected and HIV-negative individuals. *Chest*. 1997;111:612–618.
- [19] Aslam PA, Eastridge CE, Hughes FA Jr. Aspergillosis of the lung: an eighteen-year experience. *Chest*. 1971;59:28–32.
- [20] Roberts CM, Citron KM, Strickland B. Intrathoracic aspergilloma: role of CT in diagnosis and treatment. *Radiology*. 1987;165:123–28.
- [21] McCarthy DS, Pepys J. Pulmonary aspergilloma: clinical immunology. *Clin Allergy*. 1973;3:57–70.
- [22] Rafferty P, Biggs BA, Crompton GK, et al. What happens to patients with pulmonary aspergilloma? Analysis of 23 cases. *Thorax*. 1983;38:579–83.
- [23] Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46:327–60.
- [24] Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, et al. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Intern Med*. 1977;86:405–414.
- [25] Mintzer RA, Rogers LF, Kruglik GD, et al. The spectrum of radiologic findings in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Radiology*. 1978;127:301–07.
- [26] Greenberger PA, Patterson R. Diagnosis and management of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Allergy*. 1986;56:444–48.
- [27] Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, et al. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*. 1984;100:345–51.
- [28] Schaffner A. Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to gamma interferon. *J Clin Invest*. 1985;76:1755–64.
- [29] Minamoto GY, Barlam TF, Vander Els NJ. Invasive aspergillosis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992;14:66–74.
- [30] Hibberd PL, Rubin RH. Clinical aspects of fungal infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 1994;19:33–40.
- [31] Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, et al. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1991;324:654–62.
- [32] Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, et al. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 1998;26:1092–97.
- [33] Young RC, Bennett JE, Vogel CL, et al. Aspergillosis: the spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine*. 1970;49:147–73.
- [34] Prystowsky SD, Vogelstein B, Ettinger DS, et al. Invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 1976;295:655–58.
- [35] Allo MD, Miller J, Townsend T, et al. Primary cutaneous aspergillosis associated with Hickman intravenous catheters. *N Engl J Med*. 1987;317:1105–08.
- [36] Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998;26:781–803.
- [37] Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: results from a three-year prospective study. *Am J Med*. 1986;81:249–54.
- [38] Nalesnik MA, Myerowitz RL, Jenkins R, et al. Significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory secretions in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 1980;11:370–76.

- [39] Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med.* 1996;100:171–78.
- [40] Tang CM, Cohen J. Diagnosing fungal infections in immunocompromised hosts. *J Clin Pathol.* 1992;45:1–5.
- [41] Duthie R, Denning DW. *Aspergillus* fungemia: report of two cases and review. *Clin Infect Dis.* 1995;20:598–605.
- [42] Libshitz HI, Pagani JJ. Aspergillosis and mucormycosis: two types of opportunistic fungal pneumonia. *Radiology.* 1981;140:301–06.
- [43] Pagani JJ, Libshitz HI. Opportunistic fungal pneumonias in cancer patients. *AJR Am J Roentgenol.* 1981;137:1033–39.
- [44] Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, Rinaldi MG, Stevens DA, Graybill JR. Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 *Aspergillus* Study Group. *Medicine.* 2000;79:250–60.
- [45] Kuhlman JE, Fishman EK, Siegelman SS. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. *Radiology.* 1985;157:611–14.
- [46] Kuhlman JE, Fishman EK, Burch PA, et al. CT of invasive pulmonary aspergillosis. *AJR Am J Roentgenol.* 1988;150:1015–20.
- [47] Kuhlman JE, Fishman EK, Burch PA, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: the contribution of CT to early diagnosis and aggressive management. *Chest.* 1987;92:95–99.
- [48] Curtis AM, Smith GJ, Ravin CE. Air crescent sign of invasive aspergillosis. *Radiology.* 1979; 133:17–21.
- [49] Gefter WB, Albelda SM, Talbot GH, et al. Invasive pulmonary aspergillosis and acute leukemia: limitations in the diagnostic utility of the air crescent sign. *Radiology.* 1985;157:605–10.
- [50] Jewkes J, Kay PH, Paneth M, et al. Pulmonary aspergilloma: analysis of prognosis in relation to haemoptysis and survey of treatment. *Thorax.* 1983;38:572–78.
- [51] McCabe RE, Brooks RG, Mark JB, et al. Open lung biopsy in patients with acute leukemia. *Am J Med.* 1985;78:609–16.
- [52] Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol.* 1986;86:518–23.
- [53] Albelda SM, Talbot GH, Gerson SL, et al. Role of fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Am J Med.* 1984;76:1027–34.
- [54] Deepe GS Jr, Romani L, Calich VL, Huffnagle G, Arruda C, Molinari-Madlum EE, Perfect JR. Knockout mice as experimental models of virulence. *Medical mycology.* 2000;381:87–98.
- [55] Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 2005;73:494–503.
- [56] Grahl N, Puttikamonkul S, Macdonald JM, Gamcsik MP, Ngo LY, Hohl TM, Cramer RA. In vivo hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. *PLoS pathogens.* 2011;7:e1002145.
- [57] Machholz E, Mulder G, Ruiz C, Corning BF, Pritchett-Corning KR. Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *Journal of visualized experiments.* 2012 Sep 26.
- [58] Shibuya K, Takaoka M, Uchida K, Wakayama M, Yamaguchi H, Takahashi K, Paris S, Latge JP, Naoe S. Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats:

pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. *Microbial pathogenesis*. 1999;27:123–31.

[59] Tang CM, Cohen J, Krausz T, Van Noorden S, Holden DW. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*. 1993;61:1650–56.

[60] Steinbach WJ, Benjamin DK Jr, Trasi SA, Miller JL, Schell WA, Zaas AK, Foster WM, Perfect JR. Value of an inhalational model of invasive aspergillosis. *Medical mycology*. 2004;42:417–25.

[61] Hohl TM. Overview of vertebrate animal models of fungal infection. *J Immunol Methods*. 2014;410:100–12.

[62] Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:40–79.

[63] Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11:272–79.

[64] Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome p450 14 alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:577–81.

[65] Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al. Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2747–50.

[66] Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*. 2002;359:1135–44.

[67] Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc*. 2011;86:805–17.

[68] Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs*. 2007;67:1567–601.

[69] Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:1364–68.

[70] Chen J, Li H, Li R, Bu D, Wan Z. Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *J Antimicrob Chemother*. 2004;55:31–37.

[71] Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1120–24.

[72] Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SA, Delmas G, Oza U, et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1719–26.

[73] Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the *cyp51A* gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. *J Clin Microbiol*. 2005;43:214–22.

[74] Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, Mendrick CA, Li X, Loeberberg D, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:577–81.

[75] da Silva Ferreira ME, Capellaro JL, dos Reis Marques E, Malavazi I, Perlin D, Park S, et al. In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:4405–13.

- [76] Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2747–50.
- [77] Mellado E, Alcazar-Fuoli L, Garcia-Effron G, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. New resistance mechanisms to azole drugs in *Aspergillus fumigatus* and emergence of antifungal drugs-resistant *A. fumigatus* atypical strains. *Med Mycol*. 2006;44:367–71.
- [78] Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1897–904.
- [79] Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med*. 2007;356:1481–83.
- [80] Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infect*. 2000;41:203–20.
- [81] Mowat E, Warn P, Denning D, Fitzpatrick W, Patterson T, Jones B, et al. The potential role of Afumdr4 in azole resistance during *Aspergillus fumigatus* multicellular growth. Presented at: 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2008 Oct 25–28; Washington, DC. Abstract M–2190.
- [82] Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1068–76.
- [83] Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2468–72.
- [84] Pasqualotto AC, Denning DW, Anderson MJ. A cautionary tale: lack of consistency in allele sizes between two laboratories for a published multilocus microsatellite typing system. *J Clin Microbiol*. 2007;45:522–28.
- [85] Ryder NS. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses*. 1999;42:115–19.
- [86] Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, et al. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34:183–88.
- [87] Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv Pharmacol*. 1998;44:343–500.
- [88] Cleary JD, Rogers PD, Chapman SW. Variability in polyene content and cellular toxicity among deoxycholate amphotericin B formulations. *Pharmacotherapy*. 2003;23:572–78.
- [89] Rogers PD, Jenkins JK, Chapman SW, et al. Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines. *J Infect Dis*. 1998;178:1726–33.
- [90] Saliba F, Dupont B. Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections. *Med Mycol*. 2008;46:97–112.
- [91] Chamilos G, Kontoyiannis DP. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat*. 2005;8:344–58.
- [92] Blum G, Perkhofer S, Haas H, et al. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1553–55.
- [93] Bennett JE. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med*. 2006;355:1154–59.

- [94] Douglas CM, D'Ippolito JA, Shei GJ, et al. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2471-79.
- [95] Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. 2003;362:1142-51.
- [96] Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*. 2007;10:121-30.
- [97] Diasio RB, Bennett JE, Myers CE. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem Pharmacol*. 1978;27:703-07.
- [98] Francis P, Walsh TJ. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients - new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin Infect Dis*. 1992;15:1003-18.
- [99] Geisen R. *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the paf gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int J Food Microbiol*. 2000;62:95-101.
- [100] Lee GD, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:646-51.
- [101] Wnendt S, Ulbrich N, Stahl U. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet*. 1994;25:519-23.
- [102] Marx F, Haas H, Reindl M, Stoffler G, Lottspeich F, Redl B. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene*. 1995;167:167-71.
- [103] Galgóczy L, Papp T, Leiter É, Marx F, Pócsi I, Vágvölgyi C. Sensitivity of different Zygomycetes to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). *J Basic Microbiol*. 2005;45:136-41.
- [104] Marx F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;65:133-42.
- [105] Galgóczy L, Papp T, Lukács G, Leiter É, Pócsi I, Vágvölgyi C. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;270:109-15.
- [106] Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K. Plant defensins. *Planta*. 2002;216:193-202.
- [107] Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides. *Biopolymers*. 1998;47:479-91.
- [108] Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, Attenborough S, Rees SB, Broekaert WF. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett*. 1995;368:257-62.
- [109] Oberparleiter C, Kaiserer L, Haas H, Ladurner P, Andratsch M, Marx F. Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3598-601.
- [110] Thevissen K, Terras FR, Broekaert WF. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:5451-58.
- [111] Lee DG, Park Y, Kim HN, Kim HK, Kim PI, Choi BH, Hahm KS. Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291:1006-13.
- [112] Hughes P, Dennis E, Whitecross M, Llewellyn D, Gage P. The cytotoxic plant protein, beta-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *J Biol Chem*. 2000;275:823-27.

- [113] Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann, JA, Letellier L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem*. 1993;268:19239–45.
- [114] Torralba S, Heath BI. Analysis of three separate probes suggests the absence of endocytosis in *Neurospora crassa* hyphae. *Fung Genet Biol*. 2002;37:221–32.
- [115] Bourdineaud JP, Boulanger P, Lazdunski C, Letellier L. In vivo properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:1037–41.
- [116] Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer R. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ionpermeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:210–14.
- [117] Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW, Broekaert WF. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem*. 1996;271:15018–25.
- [118] Coca MA, Damsz B, Yun DJ, Hasegawa PM, Bressan RA, Narasimhan ML. Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *Plant J*. 2000;22:61–69.
- [119] Yun DJ, Ibeas JJ, Lee H, Coca MA, Narasimhan ML, Uesono Y, Hasegawa PM, Pardo JM, Bressan RA. Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. *Mol Cell*. 1998;1:807–17.
- [120] Marx F, Binder U, Leiter E, Pócsi I. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:445–54.
- [121] Lee BN, Adams TH. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol*. 1994;14:323–34.
- [122] Wieser J, Lee BN, Fondon JW, Adams TH. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 1994;27:62–69.
- [123] Yu JH, Wieser J, Adams TH. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J*. 1996;15:5184–90.
- [124] Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:615–49.
- [125] Kaziyo Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:349–400.
- [126] Leiter É, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoch L, Pusztahelyi T, Emri T, Pócsi I, Salvenmoser W, Marx F. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2445–53.
- [127] Lax AJ, Pullinger GD, Baldwin MR, Harmey D, Grigoriadis AE, Lakey JH. The *Pasteurella multocida* toxin interacts with signalling pathways to perturb cell growth and differentiation. *Int J Med Microbiol*. 2004;293:505–12.
- [128] Pfeuffer T, Helmreich EJ. Structural and functional relationships of guanosine triphosphate binding proteins. *Curr Top Cell Regul*. 1988;29:129–216.
- [129] Camougrand N, Kissová I, Velours G, Manon S. Uth1p: a yeast mitochondrial protein at the crossroads of stress, degradation and cell death. *FEMS Yeast Res*. 2004;5:133–40.
- [130] Cardomy RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep*. 2001;6:77–90.
- [131] Singh KK. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability. *FEMS Yeast Res*. 2004;5:127–32.

- [132] Skulachev VP. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". IUBMB Life 2000;49:365–73.
- [133] Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 2000;275:27393–98.
- [134] Greenlund LJ, Deckwerth TL, Johnson EM. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. Neuron 1995;14:303–15.
- [135] Ligr M, Madeo F, Froehlich E, Hilt W, Froehlich KU, Wolf DH. Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. FEBS Lett. 1998;438:61–65.
- [136] Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wissing S, Froehlich KU. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. Curr Genet. 2002;41:208–16.
- [137] Mousavi SAA, Robson GD. Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. Microbiology. 2004;150:1937–45.
- [138] Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelsteen DJ, Orrenius S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. Toxicol. Lett. 1995;82–83:149–53.
- [139] Zurgil N, Schiffer Z, Shafran Y, Kaufman M, Deutsch M. Fluorescein fluorescence hyperpolarization as an early kinetic measure of the apoptotic process. Biochem Biophys Res Commun. 2000;268:155–63.
- [140] Marx F, Salvenmoser W, Kaiserer L, Graessle S, Weiler-Goerz R, Zadra I, and Oberparleiter C. Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. Res Microbiol. 2005;156:35–46.
- [141] Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. J Infect. 2000;41:203–20.
- [142] Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hazan R. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. PLoS Genet. 2006;2:1518–26.
- [143] Cheng J, Park TS, Chio LC, Fischl AS, Ye XS. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. Mol Cell Biol. 2003;23:163–77.
- [144] Laun P, Pichova A, Madeo F, Fuchs J, Ellinger A, Kohlwein S, Dawes I, Froehlich KU, Breitenbach M. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. Mol Microbiol. 2001;39:1166–73.
- [145] Mousavi SAA, Robson GD. Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. Fung Genet Biol. 2003;39:221–29.
- [146] Richie DL, Miley MD, Bhabhra R, Robson GD, Rhodes JC, Askew DS. The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. Mol Microbiol. 2007;63:591–604.
- [147] Fedorova ND, Badger JH, Robson GD, Wortman JR, Nierman WC. Comparative analysis of programmed cell death pathways in filamentous fungi. BMC Genomics. 2005;6:177.
- [148] Cheng J, Park TS, Chio LC, Fischl AS, Ye XS. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. Mol Cell Biol. 2003;23:163–177.
- [149] Mousavi SAA, Robson GD. Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol. 2003;39:221–29.
- [150] Narasimhan ML, Damsz B, Coca MA, Ibeas JI, Yun DJ, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. Mol Cell. 2001;8:921–30.

- [151] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*. 2000;243:167–90.
- [152] Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1995;5:21–26.
- [153] Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *BioTechniques*. 1997;23:525–31.
- [154] Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593–608.
- [155] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493–501.
- [156] Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell Biol*. 1989;30:417–48.
- [157] Cuttle MF, Rusznak Z, Wong AY, Owens S, Forsythe ID. Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J Physiol*. 2001;534:733–44.
- [158] Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhauser C. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2003;23:1750–58.
- [159] Batta G, Barna T, Gáspári Z et al. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF—a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *FEBS J*. 2009;276:2875–90.
- [160] Haas H, Bauer B, Redl B, Stöffler G, Marzluf GA. Molecular cloning of *nre*, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet*. 1995;27:150–58.
- [161] Haas H, Marzluf GA. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Curr Genet*. 1995;28:177–83.
- [162] Miszti-Blasius K, Debreceni IB, Felszeghy S, Dezső B, Kappelmayer J. Lack of P-selectin glycoprotein ligand-1 protects mice from thrombosis after collagen/epinephrine challenge. *Thromb Res*. 2011;127:228–34.
- [163] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
- [164] James A, Jorgensen C. Basic design of MRM Assay for peptide quantification. *Methods Mol Biol*. 2010;658:167–85.
- [165] Puljic R, Benediktus E, Plater-Zyberk C, Baeuerle PA, Szelenyi S, Brune K, Pahl A. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol*. 2007;557:230–35.
- [166] Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, Kaneko T, Okubo T. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol*. 1998;160:3031–37.
- [167] Lajtos I, Emri MS, Kis A, Opposits G, Pótári N, Kiraly B, Nagy F, Trón L, Balkay L. Performance evaluation and optimization of the MiniPET-II scanner. *Nucl Instr Meth Physics Res Sect A*. 2013;707:26–34.
- [168] Bai P, Hegedus C, Szabó E, Gyüre L, Bakondi E, Brunyánszki A, Gergely S, Szabó C, Virág L. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity. *J Investig Dermatol*. 2009;129:234–38.
- [169] Szabo E, Virag L, Bakondi E, Gyure L, Hasko G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADPribose) polymerase activation in a

mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2001;117:74–80.

[170] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, Document M38-A. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008. Available at http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M38A2_sample.pdf.

[171] Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:1.

[172] Stephens-Romero SD, Mednick AJ, Feldmesser M. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect Immun.* 2005;73:114–25.

[173] Warn PA, Sharp A, Morrissey G et al. Activity of aminocandin (IP960; HMR3270) compared with amphotericin B, itraconazole, caspofungin and micafungin in neutropenic murine models of disseminated infection caused by itraconazole-susceptible and -resistant strains of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:146–51.

[174] Hagan G, Southwood M, Treacy C, Ross RM, Soon E, Coulson J. ¹⁸FDG PET imaging can quantify increased cellular metabolism in pulmonary arterial hypertension: A proof-of-principle study. *Pulm Circ.* 2011;1:448–55.

[175] Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis: pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am.* 2002;16:875–94.

[176] Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, Haas A, Ruhnke M, Lode H. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2002;34:563–71.

[177] Crawford F, Hollis S. Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007. Jul 18;(3):CD001434.

[178] Hatori A, Yui J, Yamasaki T, Xie L, Kumata K, Fujinaga M, Yoshida Y, Ogawa M, Nengaki N, Kawamura K, Fukumura T, Zhang MR. PET imaging of lung inflammation with [18F]FEDAC, a radioligand for translocator protein (18 kDa). *PLoS One* 2012;7(9):e45065.

[179] Marian T, Balkay L, Tron L, Krasznai ZT, Szabo-Peli J, Krasznai Z. Effects of miltefosine on membrane permeability and accumulation of [99mTc]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile, 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose, daunorubicin and rhodamine123 in multidrug-resistant and sensitive cells. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24:495–501.

[180] Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev.* 2011;20:156–74.

[181] Koulenti D, Garnacho-Monterom J, Blot S. Approach to invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27:174–83.

[182] Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. Liposomal amphotericin B. A review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs.* 2009;69:361–92.

[183] Najvar LK, Cacciapuoti A, Hernandez S et al. Activity of posaconazole combined with amphotericin B against *Aspergillus flavus* infection in mice: Comparative studies in two laboratories. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:758–64.

[184] Spreghini E, Orlando F, Santinelli A et al. Anidulafungin in combination with Amphotericin B against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4035–39.

[185] Chang T, Olson JA, Proffitt RT et al. Differences in tissue drug concentrations following intravenous versus intraperitoneal treatment with amphotericin B deoxycholate or liposomal amphotericin B. *Med Mycol.* 2010;48:430–35.

- [186] Olson JA, Schwartz JA, Hahka D et al. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. *Med Mycol*. 2015;53:107–18.
- [187] Chrysanthou E. In vitro susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. acquired resistance to itraconazole. *Scand J Infect Dis*. 1997;29:509–12.

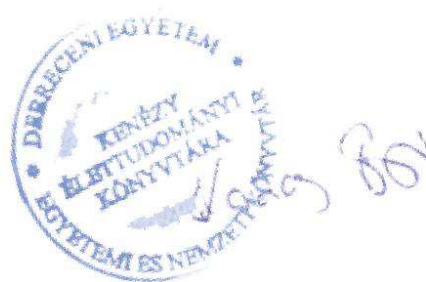


Nyilvántartási szám: DEENK/52/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Palicz Zoltán
Neptun kód: TOL4KI
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Palicz, Z.**, Gáll, T., Leiter, É., Kollár, S., Kovács, I., Miszti-Blasius, K., Pócsi, I., Csernoch, L., Szentesi, P.: Application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF) against pulmonary aspergillosis in mice.
Emerg. Microbes Infect. 5 (11), e114, 2016.
IF: 4.012 (2015)
2. **Palicz, Z.**, Jenes, Á., Gáll, T., Miszti-Blasius, K., Kollár, S., Kovács, I., Emri, M., Márián, T., Leiter, É., Pócsi, I., Csósz, É., Kalló, G., Hegedűs, C., Virág, L., Csernoch, L., Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF).
Toxicol. Appl. Pharmacol. 269 (1), 8-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.014>
IF: 3.63





További közlemények

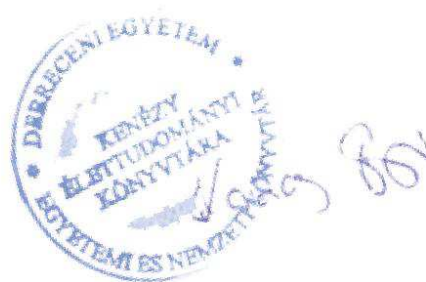
3. Füzi, M., **Palicz, Z.**, Vincze, J., Cseri, J., Szombathy, Z., Kovács, I., Oláh, A., Szentesi, P., Kertai, P., Paragh, G., Csernoch, L.: Fluvastatin-induced alterations of skeletal muscle function in hypercholesterolaemic rats.
J. Muscle Res. Cell. Motil. 32 (6), 391-401, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-011-9272-7>
IF: 1.358

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,642

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.03.08.



Tárgyszavak

Antifungális fehérje, Pulmonalis aspergillosis, PET, Szövettan, Egér, PAF, Dermatitis, Tömegspektrometria

Antifungal protein, Pulmonary aspergillosis, PET, Histology, Mouse, PAF, Dermatitis, Mass spectrometry

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani az Élettani Intézet igazgatójának, Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, aki a munkacsoportunk vezetőjeként megtervezte a kísérleteket, lehetővé tette azok elvégzését, és sokat segített ötleteivel, meglátásaival.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szentesi Péternek, aki rengeteget segített bátorításával, illetve a kísérletek megtervezésénél, végrehajtásánál, a szükséges eszközök beszerzésénél, az eredmények kiértékelésénél, és azok megfogalmazásában.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Pócsi Istvánnak, a Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette a kísérleteinket.

Köszönöm Dr. Leiter Évának, hogy segítségemre volt a kísérletekben, mind tanácsaival, ötleteivel, és hogy fáradhatatlanul dolgozott, hogy rendelkezésemre bocsássa a szükséges anyagokat.

Köszönöm Dr. Gáll Tamásnak, hogy ötleteivel, tanácsaival, bátorításával és a kísérletekben nyújtott segítségével megkönnyítette a munkámat.

Köszönöm Dr. Miszti-Blasius Kornélnak a klinikai laboratóriumi vizsgálatokban nyújtott értékes segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Kovács Ilona főorvosnőnek, és Dr. Kollár Sándornak a szövettani vizsgálatok során nyújtott pótolhatatlan segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Márián Teréznek, Dr. Emri Miklósnak, hogy lehetővé tették a pozitron emissziós tomográfiai vizsgálatokat, tovább Dr. Trencsényi Györgynek, Péliné Szabó Juditnak, és főként Nagy Tamásnak, a PET vizsgálatokban és az állatok altatásában nyújtott fáradhatatlan segítségéért.

Köszönöm Prof. Dr. Virág Lászlónak és Dr. Hegedűs Csabának az irritációs dermatitis modell létrehozásában nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom Dr. Csősz Évának és Dr. Kalló Gergőnek a tömegspektrométeres mérésekben nyújtott segítségükért.

Köszönöm továbbá Dr. Jenes Ágnesnek, Dr. Dienes Beatrixnak, Dr. Fodor Jánosnak és Dr. Sztretye Mónikának, hogy értékes tanácsaikkal és ötleteikkel segítették a munkámat.

Köszönöm munkacsoportunk volt PhD hallgatóinak, Dr. Bodnár Dórának, Dr. Füzi Mártának, Geyer Nikolettnek, Dr. Gomba-Tóth Adriennek, Dr. Kistamás Kornélnak, Dr. Oláh Tamásnak és Dr. Ruzsnavszky Olgának minden segítségüket, és a jó hangulatban eltöltött éveket.

Hálával tartozom továbbá Őri Rózának, a kísérletekben és azok előkészítésében, Orosz Józsefnek az állatokkal végzett munkában, és nem utolsósorban Orosz-Tóth Katalinnak a vérvételben nyújtott segítségéért.

Köszönetet mondok az Élettani Intézet minden munkatársának a támogatásért.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani a családomnak a biztatásért, a türelmükért, és hogy végig mellettem álltak.

Függelék

A disszertációt megalapozó két közlemény különlenyomata.

1. **Palicz Z.**, Jenes A., Gáll T., Miszt-Blasius K., Kollár S., Kovács I., Emri M., Márián T., Leiter E., Pócsi I., Csősz E., Kalló G., Hegedűs C., Virág L., Csernoch L., Szentesi P. (2013) In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269(1): 8-16. **I.F.: 3,63**
2. **Palicz Z.**, Gáll T., Leiter E., Kollár S., Kovács I., Miszt-Blasius K., Pócsi I., Csernoch L., Szentesi P. (2016) Application of a low molecular weight antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* (PAF) to treat pulmonary aspergillosis in mice. *Emerging Microbes and Infections*, 5(11):e114. **I.F.: 4,012**