

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**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**

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Palicz Zoltán, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szentesi Péter, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Dr. Ivanics Tamás, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2017. május 22. 11 óra, Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettani
Intézet könyvtár

Az értekezés bírálói: Dr. Galgóczi László, PhD
Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsa, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora
Dr. Galgóczi László, PhD
Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsa, PhD
Dr. Szabó Judit, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2017. október 2. 13 óra, Debreceni Egyetem, ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme

Bevezetés

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 átesett betegek. 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 (itraconazole, posaconazole, voriconazole). 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 fehérjéről korábban kimutatták, hogy *in vitro* több patogén gombafajra (*Aspergillus* és különböző dermatophytonok) fungicid hatással rendelkezik, illetve emlős sejtekre nincs toxikus hatása.

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 esetleges toxikus és gyulladáskeltő hatásainak vizsgálata állatmodellben helyi és szisztémás adagolás mellett.
2. A PAF jelenlétének és funkcióképességének kimutatása a kezelt állatok szöveteiből.
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 foszfáttal pufferált 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 fertőződést. 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 volt a 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 fiziológiás 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, ezért ennek megfelelően választottuk ki az alkalmazandó koncentrációkat. Az egereket pentobarbitállal elaltattuk (50 mg/ttkg) intraperitonealis adagolással, majd a megfelelő PAF koncentrációjú oldatokat csepegtettük pipetta segítségével a foguknál felfüggesztett állatok orrába 50 µl-es mennyiségben. Ilyen körülmények között az oldat eljut a tüdőbe normál légzés révén. Az eljárás hatékonyságát ellenőriztük egy festék oldat alkalmazásával. A kontroll csoportban levő állatokat 50 µl fiziológiás sóoldattal kezeltük. Az egerek súlyát megmértük a rövid távú kísérlet első és utolsó napján, illetve a hosszú távú kísérletben hetente egyszer.

Egészséges állatok intraperitonealis PAF kezelése

Az egereket véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az első csoportot (n=8) IP kezeltük 100 µL PBS-ben oldott 5,4 mg/kg dózisú PAF-fal naponta kétszer, és intranasalisan 50 µL 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 üvegkapillárisal 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. 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. 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 perjódsvav 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 fehérjéket acetonnal kicsapattuk, és újra feloldottuk 25 mM ammóniumbikarbonátban. A fehérje koncentráció méréshez a Bradford módszert használtuk. 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 fehérjet használtunk.

A többszörös reakció mérésen (MRM/SRM) alapuló tömegspektrometriai módszert 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. A 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 a 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. *A. nidulans* konídium szuszpenzióból származó konidiumot 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 intratrachealisan 50 µl térfogatban. Ezt a dózist előző tanulmányok alapján határoztuk meg. A kezelést az egerek túléltek, és hamar rendbejöttek a beavatkozás után.

A tüdőoedema meghatározása

Az előző bekezdésben leírt módon kezel 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.

Pozitron emissziós tomográfia (PET)

A vizsgálatokhoz a glukóz analóg ^{18}F FDG-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.

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 pufferált sóoldatban (PBS, pH 7,4; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4) oldott 4–6 mBq ^{18}F FDG-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.

Irritációs dermatitis

Az irritációs dermatitis modellt egy korábban leírt módszer szerint hoztuk létre 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 krémbe (Unguentum hydrophylicum non-ionicum, 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•10 μl vivőanyagot (fiziológiás sóoldat), PMA-t (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), illetve PAF-ot (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 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. A vizsgált szerek végső koncentrációi 0,0625 és 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ között változott AMB esetén, és 25 és 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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. Az AMB és PAF kölcsönhatását a frakcionált gátló koncentráció index (FICI) kiszámításával határoztuk meg a következő formulával: $FICI = ((MIC\ A\ kombinációjában)/MIC\ A) + ((MIC\ B\ kombinációjában)/MIC\ B)$. A kölcsönhatás szinergikus, ha a $FICI \leq 0,5$, közömbös, ha a $FICI > 0,5$ és ≤ 4 ; és antagonisztikus, ha a $FICI > 4$.

Az *Aspergillus fumigatus* gombakonídium előkészítése

A beinjektálásra kerülő *A. fumigatus* AF293 (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 megszámoltuk. A Tween-20 általánosan használt detergens gombasejtszuszpenziók készítéséhez. Vizes oldatban a Tween-20 megváltoztatja az *A. fumigatus* spórák felszíni töltését.

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 isofluránnal végzett altatásban. A konídiumszámot úgy választottuk ki, hogy 100% legyen a mortalitás. Ezt előzetes kísérletekkel határoztuk meg. Az egerek vizéhez gentamicint adtunk (5 mg/kg). Az állatok túlélését a fertőzés után naponta háromszor ellenőriztük. Minden fertőzött állatot humánusan megöltünk, ha súlyosan csökkent a mozgásképeségük (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 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 5 mg/kg koncentrációban három alkalommal a gombás fertőzés után követ 1., 2. és 4. napon. 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:

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

ahol R_0 a kezdeti halálozási arány, pl 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. 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. Nem találtunk semmilyen patológiás eltérést a szövettani vizsgálatok során a tüdőkben, a vesékben, sem a májban 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 $1,83 \pm 0,18 \cdot 10^9/l$; 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. 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.

A PAF jelenléte és aktivitása a tüdőkb

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. 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 µg/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 hatása 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 tüdőkb

A PAF kezelés tüdőgyulladást kiváltó hatásának vizsgálata céljából egy új, nem invazív módszert használtunk, mely ^{18}F FDG pozitron emissziós tomográfián alapszik. A módszer érzékeny minden sejtfolyamatra, amely metabolizálja a glukózt, mivel a 19-fluorodeoxiglukózt a glukóztranszporterek felveszik a sejtekbe, és nem tudják metabolizálni a ^{18}F FDG-6-foszfáttá váló foszforiláció után. A felhalmozódása ezért arányos a glukóz felvétellel és következésképpen a sejt metabolikus aktivitásával. 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) 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. Az egereket előző nap fiziológiás sóoldattal, PAF-ot tartalmazó sóoldattal (2700 µg/kg), illetve a pozitív kontrollként használt LPS-tartalmazó sóoldattal (250 µg/kg) 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. 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.

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, 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 ($57,5 \pm 29,2$ µm; $n = 4$) ($F_{(1,10)} = 5,42$, $p = 0,04$) 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 $23,8 \pm 9,2$ μm ; a kontroll és a PAF-fal kezelt csoportban, $n = 4$ mindkét csoportban, $F_{(1,10)} = 0,06$, $p = 0,81$).

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.

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 a 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 intranasalisan 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.

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

A tüdők szövettani vizsgálata súlyos multifokális léziókat mutatott, melyeket makrofágok és neutrofil granulocyták infiltrációja jellemzett vaszkuláris jelenségekkel együtt (thrombusok,

necrosis és vérzések) és alveoláris és bronchiális epitheliális sejtnekrózissal. Az antifungális fehérjével történt intranasalis kezelésnek nem volt figyelemre méltó pozitív hatása a tüdőkben. A pozitív kontroll egerekben nagyszámú proliferáló hifát 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.

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 fertőzött állatokat PAF-fal, amfotericin B-vel (5 mg/kg), illetve mindkét szerrel együttesen kezeltük. Tisztán látható, 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. 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 plátó (pl) értékét nullának tekintettük.

Nem volt szignifikáns különbség az átlagos túlélési időben 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.

Ezeket a megfigyeléseket szövettani vizsgálatokkal erősítettük meg. Az intraperitonealisan PAF-fal kezelt egerek tüdejében számos proliferáló hifát és koagulációs necrosist találtunk a bronchiolusokban és alveolusokban. A PAF-fal és AMB-vel együttesen kezelt állatok tüdejében hifákat nem figyeltünk meg. A metszetek H&E festése kevésbé kiterjedt gyulladást igazolt a kombinált PAF és AMB kezelést kapó állatokban. 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. Továbbá a tüdő károsodás értéke alacsonyabb volt a kombinált kezelést kapó csoportban ($4,0\pm0,6$, $F_{(1,5)}=4,96$, $p=0,08$), mint a kontroll csoportban ($6,3\pm0,8$). Másrészt a PAF kezelést kapott csoport értéke ($5,0\pm0,0$) majdnem azonos volt az AMB-vel kezelt állatokéval ($5,3\pm0,6$, $F_{(1,4)}=0,25$, $p=0,64$). Azonban egyik sem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll érték ($F_{(2,7)}=1,11$, $p=0,38$.)

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 ($n=11$). 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 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.

Megbeszélés

Az *Aspergillus* fajok kiemelkedően fontosak az immunszupprimált betegek megbetegedési és halálozási okai között. A legjobb elérhető kezelés ellenére a túlélési ráta 12 hét után 60-70% között mozog invazív tüdőaspergillosisban szenvedő betegekben. Hasonló trend figyelhető meg a dermatophytonok esetén, amely könnyen terjed öltözőkben és uszodákban, ha rendszeresen sokan használják. 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 fehérjéről (PAF) bebizonyosodott, hogy nagyon hatékonyan gátolja a növekedését *in vitro* sok állatpathogén gombának. A PAF hatásai közé tartozik a gomba sejtek membránjainak hyperpolarizációja, a reaktív oxigén gyökök képződésének növekedése, melyek oxidálják az intracelluláris fehérjket, lipideket és nukleinsavakat, nem csak a sejt, hanem a mitokondriumok membránjainak dezintegrációját is okozva. Ezeket a hatásokat 10 µg/ml koncentrációval sikerült kiváltani a legérzékenyebb fajoknál és 50 µg/ml koncentrációnál minden érintett fajnál megjelentek. A kísérleteinkben alkalmazott koncentrációkat e korábbi kísérletek alapján határoztuk meg, ahol a membrán hyperpolarizáció 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 fehérje 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. 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 orrnyálkahártyán 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 májenzimek, a fontos szérumszerek, a kreatin kináz szintek a PAF-fal kezelt állatok vérében lényegében megegyeznek a kontroll állatokéval. Másrészt meg kell említeni, hogy PAF kezelés esetén egy kis csökkenő trend volt megfigyelhető a plazma paraméterek esetén. Mivel egyes paraméterek (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. 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 fehérjét 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. 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 tüdőben. Másrészt az LPS, mint pozitív kontroll, nagy emelkedést indukált a SUV értékekben, hasonlóan a korábban LPS-sel kezelt patkányok esetében. 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.

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. 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. 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 intranasálisan és intraperitoneálisan 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 fehérje, 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 fehérje 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. 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 e szerek 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. Habár az IPA-ban szenvedő betegeknél nem figyeltek meg különbséget a hatékonyságban az AMB alacsony és nagy dózisa között, mindkét esetben ~50% pozitív hatást tapasztaltak. Egy összehasonlító tanulmány pozakonazollal és AMB-vel azt találta, hogy habár a túlélés pozakonazollal 70-90% között volt, csak 0-50% volt AMB-vel. Az AMB és anidulafungin hatékonyságát ugyancsak összehasonlították, és mindkét antifungális szer megnövelte a túlélést, de végül az állatok legalább 90%-a elpusztult minden csoportban. Ezek az eredmények összhangban vannak a mi megfigyeléseinkkel. Meg kell jegyeznünk, hogy az AMB intraperitonealis 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 intraperitonealis és intravénás alkalmazásnál. 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. Ezzel szemben a PAF alkalmazásánál sem toxicitást, sem mellékhatást nem figyeltünk meg eddig.

Más pathogén gombákhoz hasonlóan, az *Apergillus* fajok is rezisztenssé válhatnak különböző antifungális szerekkel szemben. Például az itraconazol rezisztenciát 1997-ben jelentették először, és az itraconazolra rezisztens törzsek több mint 50%-a kereszt-rezisztensek voltak más azolokra, mint pl. a vorikonazol és pozakonazol, amelyek az antifungális terápiák elsőszámú gyógyszerei.

Tekintve a gyakran használt antifungális szerek iránt kifejlődött rezisztencia terjedését, sürgősen szükséges új típusú antimycoticus szereket találni, amelyek hatékonyak a humán opportunistá kórokozó *Aspergillus* fajok ellen. Mi mutattuk ki először, hogy a PAF *in vivo* alkalmazható IPA ellen, még relatív 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 pathogén 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-fot intranasalisán különböző koncentrációkban, maximálisan 2700 µg/kg-ig két hétig naponta. Ez a koncentráció már erősen toxikus *in vitro* az összes használt érzékeny gombafajra. 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. 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. 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 hatékonyságának teszteltük IPA-ban szenvedő egereken. Felnőtt egereket immunszupprimáltunk, majd megfertőztünk *Aspergillus fumigatus*-szal. A stabil fertőzés létrehozása után, az állatokat PAF-fal kezeltük intranasalisán 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 intranasalisán 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.



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.

