

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Mikrobiológiai Tanszék

„XXXI. OTDK Biológia Szekció”

Az amantadin hidroklorid, az R(-)-deprenil hidroklorid és a valproinsav; illetve antifungális szerekkel történő kombinációjuk in vitro hatása központi idegrendszeri fertőzést okozó fonalassgomba izolátumok ellen

Készítette:

Tóth Liliána

I. éves biológus MSc szakos hallgató

Témavezetők:

Prof. Dr. Vágvolgyi Csaba (tanszékvezető egyetemi tanár)

Dr. Galgóczi László (tudományos munkatárs)

Szeged

2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
1. Bevezetés.....	2
1.1. A kísérletek során alkalmazott központi idegrendszeri és antifungális szerek jellemzése	3
1.1.1. A központi idegrendszeri szerek és antifungális hatásuk	3
1.1.1.1. Amantadin hidroklorid (AMH).....	3
1.1.1.2. R-deprenil hidroklorid (RDP)	4
1.1.1.3. Valproinsav (VPA)	4
1.1.2. Antifungális szerek és hatásaik	5
1.1.2.1. Amfotericin B (AMB).....	5
1.1.2.2. Itrakonazol (ITZ).....	5
1.1.2.3. Terbinafin (TBF)	6
2. Célkitűzés	7
3. Anyagok és módszerek	9
3.1. A vizsgálatokban szereplő mikroorganizmusok	9
3.2. Alkalmazott táptalajok és tenyésztési körülmények	10
3.3. A vizsgálatokban felhasznált nem-antifungális és antifungális szerek.....	10
3.3.1 Központi idegrendszeri szerek	10
3.3.2. Antifungális szerek	10
3.4 Antimikrobiális érzékenységvizsgálat	10
3.4.1. Inokulum készítés	10
3.4.2. Antimikrobiális hatásvizsgálat mikrodilúciós módszerrel	11
3.4.3. Adatok kiértékelése	11
4. Eredmények és értékelésük	13
4.1. A vizsgált antifungális szerek és nem-antifungális szerek érzékenysége.....	13
4.2. Az AMD, R-DEP, NaVAP és az antifungális szerek közötti kölcsönhatások ...	15
5. Összefoglalás	18
6. Irodalomjegyzék	20
7. Köszönetnyilvánítás.....	26
8. Nyilatkozat	27

1. Bevezetés

Az utóbbi évek során folyamatosan emelkedett az opportunisták okozta invazív fertőzések esetszáma az antibiotikumokra rezisztens törzsek és az immunhiányos betegek megnövekedett számának következményeként [46]. A központi idegrendszert (KPI) érintő gombafertőzések nem gyakoriak, mégis az utóbbi néhány évtizedben folyamatos növekedés figyelhető meg az ilyen fertőzések esetszámában [15]. A problémát tovább súlyosbítja az ilyen fertőzések magas halálozási aránya (80%-100%), mivel nem áll rendelkezésre a KPI-t érintő gombafertőzések kezelésére, a vér-agy és a vér-gerincvelői folyadék gáton könnyen átjutó, hatékony antifungális szer [15, 16, 27].

Minden patogén fonalas gomba képes központi idegrendszeri fertőzést okozni [15], de leggyakrabban járomspórás gombák és az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. terreus* és *A. nidulans*) izolálhatók az ilyen típusú fertőzések közül [8, 15, 44, 45, 58, 60].

A járomspórás gombák törzsébe tartozó fajok képesek opportunistákként fertőzést okozni elsősorban az immunhiányos páciensek körében [49]. Ezt zigomikózisnak nevezik, amelynek a leggyakoribb és legsúlyosabb megjelenési formája a KPI-t érintő rhinocerebrális zigomikózis (kb. 30-50%) [27, 50]. A rhinocerebrális zigomikózisokból leggyakrabban izolált kórokozók a *Rhizopus* nemzetségbe tartoznak, de más nemzetségbe tartozó fajokat (mint pl. az *Absidia*, a *Rhizomucor* vagy a *Saksenaea* nemzetség) is izoláltak már klinikai mintákból [50]. A fertőzés során a sporangiospóra belégzés útján a felső légutakon keresztül jut a beteg szervezetébe, ahol a hifák néhány nap alatt a paranazális és orbitális régióktól az agyig terjedhetnek. A fertőzés tünetei közé tartozik a gyorsan kezdődő magas láz, a fejfájás, az orrfolyás, majd az agyi funkciók leállása és ennek következtében a halál [18, 34, 59]. Az ilyen típusú fertőzéseknél a halálozási arány általában túllépi a 80%-ot, még a klinikumban más szervet, szervrendszert érintő fertőzések kezelésére hatékonyan alkalmazott antifungális szerek használata ellenére is [27].

Az *Aspergillus* nemzetség tagjai által okozott, a KPI-t érintő invazív gombafertőzést rhinocerebrális aszpergillózisnak nevezzük. Másodlagosan létrejövő gombafertőzés, ami az agyi területeket is érintheti. A kórokozó a fertőzés során az orrüregben keresztül közvetlenül az ércsatornákból, vagy a véráram útján a tüdőből és a gasztrointesztinális traktusokból jut az agyba, ami következtében ott több tályog alakulhat

ki. A fertőzés létrejöhet úgy is, hogy a fej bőrén, a hallójáratban vagy az orrmelléküregekben megtelepedő gomba az agy felé terjed. Ez utóbbi esetben, az agyban általában egyetlen tályog alakul ki [45]. A betegség előrehaladtával súlyos agyhártya- és agyvelőgyulladás illetve kóma is kialakulhat. A leggyakoribb tünetek: szédülés, gyengeség, fejfájás, zavartság, akaratlan izomrángások, hányás valamint fokozódó tudatzavar. Az ilyen fertőzésekből leggyakrabban izolált kórokozók az *A. flavus* és az *A. fumigatus* [13].

A rendelkezésre álló antifungális szerek súlyos mellékhatásainak és a KPI-be való gyenge behatolásuk következtében a központi idegrendszeri gombafertőzések kezelése nehéz [16]. Annak ellenére, hogy az amfotericin B (AMB) csak gyengén képes penetrálni a vér-agy gáton keresztül, mégis ezt a szert (gyakran azol vegyületekkel kombinálva) használják egy agresszív sebészeti eljárással egybekötve a rhinocerebrális gombafertőzések kezelésére [16, 58]. Az AMB elég toxikus, ezért intenzív terápiás alkalmazása súlyos mellékhatásokkal járhat (pl.: vese- és májelégtelenség) [17, 58]. Az azol vegyületek képesek az agyszövetbe és a cerebrospinális folyadékba penetrálni, de ezek terápiás alkalmazása a súlyos, a betegséggel gyakran összeférhetetlen mellékhatásai miatt (pl. neurotoxicitás) kerülendő a KPI-t érintő gombafertőzések kezelésére [16, 58]. Összehasonlítva a gyengén penetráló echinocandinokkal, a flucitozin nagyobb mennyiségben képes átjutni a vér-agy gáton, de klinikai alkalmazását szintén korlátozzák az elsődleges mellékhatásai (pl. hepatotoxicitás és csontvelő szuppresszió) [16, 58].

Mindezekből következően szükség van olyan új, hatékonyan alkalmazható antifungális szerekre, amelyek könnyen át tudnak jutni a vér-agy és a vér-cerebrospinális folyadék gáton, ezáltal képesek felhalmozódni az agyszövetekben vagy a cerebrospinális folyadékban, továbbá képesek szinergisztikus kölcsönhatásba lépni klinikailag használt antimikotikumokkal, hogy ezek terápiás koncentrációja (így a mellékhatások kialakulásának a kockázata is) is csökkenthetővé váljon.

1.1. A kísérletek során alkalmazott központi idegrendszeri és antifungális szerek jellemzése

1.1.1. A központi idegrendszeri szerek és antifungális hatásuk

1.1.1.1. Amantadin hidroklorid (AMD)

Az amantadin egy organikus vegyület. Hivatalosan 1-aminoadamantán néven, a vér-agy és a vér-gerincvelői folyadék gáton jól penetrálódó szerként ismert. 1966 októberében Asian influenzával (madárinfluenza H5N1-es variánsa) szembeni profilaktikus (betegségtől megvédő) szerként hagyták jóvá és végül az A típusú influenzavírus kezelésében is elismerték [13, 37, 38, 66]. 1969-ben további hatásait fedezték fel egy baleset során, ahol a Parkinson-kór, extrapiramidális szindróma és akathisia (magyar jelentése nincs, tünetei: izgatottság, mozgékonyság, érzelmi labilitás, öngyilkossági és erőszakos késztetések) tüneteinek csökkentését segítette. Az amantadin az influenza vírus által okozott fertőzések kezelésére és gátlására használt gyógyszer, de hatásos lehet a Parkinson-kór tüneteinek kezelésében is [9, 10, 14], habár ez esetben a hatásmódja még nem teljesen tisztázott. Az agyban nagyobb mennyiségű dopamin felszabadulását idézi elő, csökkenti az acetilkolin szintjét, ezáltal hozzájárul a motoros funkciók végrehajtásához. Gyakran használják multiplex szklerózisban szenvedő betegek sűrűn tapasztalt fáradtságának kezelésére is. Az amantadin hidroklorid egy szintetikus, vírus elleni szer, ami a sejtben a vírus replikációját gátolja. Ahhoz, hogy a fertőzést megakadályozza, még a vírus elszaporodása előtt meg kell jelennie a szernek a szervezetben. Az A típusú influenza megelőzésére használják [55].

1.1.1.2. R-(-)-deprenil hidroklorid (R-DEP)

Az 1960-as években Magyarországon fedezte fel a budapesti Semmelweis Egyetem farmakológiai professzora, Knoll József. A fenetilaminnak nevezett szerek osztályába tartozik. A vér-agy és a vér-gerincvelői folyadék gáton könnyen átjutó szerként ismert. Ezt a szert a korai stádiumú Parkinson-kór, depresszió és időskori demencia tüneteinek kezelése során alkalmazzák [72]. Átlagos klinikai dózisban szelektív irreverzibilis monoamin-oxidáz-B (MAO-B) inhibitor, azonban nagyobb dózisban ezt a specititását elveszti és gátolja a monoamin-oxidáz-A-t (MAO-A) is. A szelegilint (L-deprenil) Parkinson-kór kezelésében használják egyedül vagy kombinációban más szerekkel együtt, leggyakrabban az L-DOPA-val és a levopodával [51].

1.1.1.3. Valproinsav (NaVAP)

A vér-agy és a vér-gerincvelői folyadék gáton könnyen átjutó szerként ismert. Epilepszia és bipoláris rendellenesség kezelésében használt antikonvulsivum (epilepszia

elleni szer). Gyakran használják hangulatjavítóként is [33]. A valproinsav alkalmazása súlyos kockázati tényezőt jelenthet a várandós anyák esetében, ugyanis megfigyelték, hogy a terhesség alatt valproinsavat használó anyák gyermekeinek jelentősen alacsonyabb az IQ szintje [39, 53, 67]. Gyakran speciális faciális változást is előidézhethet a magzaton, amit fetális valproát szindrómának neveznek, továbbá a szert kapcsolatba hozták az Ouvrier-Billson szindrómaként ismert betegséggel is [35, 48].

1.1.2. Antifungális szerek és hatásaik

1.1.2.1. Amfotericin B (AMB)

Természetes eredetű antimikotikum. Először *Streptomyces nodosus*-ból izolálták. Polién alapú antifungális szer, amit intravénásan szisztémás gombafertőzések, orálisan szájpenész kezelésére alkalmaznak. Amfipatikus vegyület, mivel savas és bázikus molekulákhoz egyaránt képes kapcsolódni. Két típusa van, az amfotericin A és B, azonban a gyógyászatban csak a B-t használják, mert ez, a másik formájával szemben, *in vivo* sokkal hatékonyabbnak bizonyult. Intravénás alkalmazása során súlyos vese- és májkárosító hatást eredményezhet, ami orális alkalmazásnál kisebb mértékű. A sejtmembránon ergoszterolhoz kötve pórusokat képez, amin keresztül K^+ jut ki a sejtől, ami végül a sejt pusztulásához vezet. Jelenleg a leghatásosabb antifungális készítmény, azonban nagy dózisú alkalmazása súlyos mellékhatásokat eredményez, melyek akár végzetesek is lehetnek [17, 23, 70].

1.1.2.2. Itrakonazol (ITZ)

Az itraconazol egy triazol alapú intravénásan vagy orálisan alkalmazható antifungális szer. A citokróm P450 oxidáz által mediált ergoszterol bioszintézist gátolja a gombában, ami következtében a sejtmembrán nem képes kiépülni. Az itraconazol szélesebb hatásspektrummal rendelkezik, mint a flukonazol és különösen aktívnak bizonyult *Aspergillus* fajokkal szemben. Az alkalmazott dózis több, mint 99%-a a szervezetben proteinekhez kötődik és így nem képes belépni a cerebrospinális folyadékba, ezért az ITZ-t nem használják meningitis (agyhártyagyulladás) és más központi idegrendszeri fertőzés kezelésére [20]. *In vitro* vizsgálatokkal bizonyították, hogy $\leq 0,025$ - $0,8 \mu\text{g/ml}$ koncentrációtartományban gátolja az emberi szervezetben a patogén gombák

növekedését. Nem csak antifungális, hanem tumorellenes szerként is hatásosnak bizonyult. Képes a daganat méretének csökkentésére és más kemoterápiás szerek hatékonyságának feljavítására [3].

1.1.2.3. Terbinafin (TBF)

A terbinafin egy szintetikus allilamin szerkezetű antifungális szer. Erősen lipofil tulajdonságú, ezért felhalmozódik a bőrben, körömben és a zsírszövetekben. A szkvalén-epoxidáz enzim gátlásával megakadályozza az ergoszterol bioszintézisét, ami következtében a sejtmembrán és a sejtfal nem alakul ki tökéletesen. Emiatt egyéb szterolok épülnek be a sejtmembránba, ami hatására megváltozik a membránfluiditás és a membránpermeabilitás, és ez a sejt halálához vezet. Elsősorban felületi bőrfertőzések kezelésére használják 1%-os krém vagy por formájában, de orálisan alkalmazható készítmény formájában is létezik a köröm gombafertőzésének a kezelésére. Ez utóbbi esetben a terbinafin májkárosító hatásával is számolni kell [30].

2. Célkitűzés

A központi idegrendszert (KPI) érintő gombafertőzések halálozási aránya igen magas mivel nem áll rendelkezésre a kezelésüket elősegítő, a vér-agy és a vér-gerincvelői folyadék gáton könnyen átjutó, hatékony antifungális szer. A problémát tovább súlyosbítja a széles spektrumú antibiotikumok nem megfelelő használata, melynek eredményeként rezisztens és multirezisztens törzsek jelennek meg. További problémát jelent az, hogy a széles körben alkalmazott hatékony antifungális szerek (pl. amphotericin B, azol vegyületek) számos mellékhatással rendelkeznek és nagy dózisú alkalmazásuk súlyos szervkárosodást eredményezhet.

Mindezekből következően szükség van új, hatékony antifungális szerek kifejlesztésére. A gyógyászatban már használt nem-antifungális szerként alkalmazott készítmények, amelyek másodlagosan antifungális aktivitással rendelkeznek, alkalmasak lehetnek a gombák által okozott fertőzések kezelésére.

Munkánk során vizsgáltuk három, jól penetráló nem-antifungális, KPI szernek (amantadin hidroklorid, AMD; R(-)-deprenil hidroklorid, R-DEP; valproinsav, NaVAP), illetve ezek antifungális szerekkel (amfotericin B, AMB; itrakonazol, ITZ; terbinafin, TBF) történő kombinációinak *in vitro* gombaellenes hatását négy-négy, a járomspórás gombák törzsébe (*Absidia corymbifera*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, *Saksenaea vasiformis*) és az *Aspergillus* nemzetségbe (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. terreus*) tartozó izolátummal szemben. Ezek a fajok képesek központi idegrendszeri fertőzést okozni [7, 44, 49, 58].

Munkánk során vizsgáltuk:

1. Az AMD, az R-DEP és a NaVAP antifungális hatását négy-négy, a járomspórás gombák törzsébe és az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó izolátummal szemben *in vitro* mikrodilúciós módszerrel.
2. Az AMB, az ITZ és a TBF antifungális hatását négy-négy, a járomspórás gombák törzsébe és az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó izolátummal szemben *in vitro* mikrodilúciós módszerrel.
3. A központi idegrendszeri gyógyszereknek (AMD, R-DEP, NaVAP) a klinikumban alkalmazott antifungális szerekkel (AMB, ITZ, TBF) történő kombinációjának gombaellenes hatását négy-négy, a járomspórás gombák

törzsébe és az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó izolátum ellen *in vitro* mikrodilúciós módszerrel.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A vizsgálatokban szereplő mikroorganizmusok

Ascomycota- tömlős gombák törzse

Euascomycetes- valódi aszkuszos gombák osztálya

Plectomycetes (Eurotiomycetes) alosztály

Izolátum	Izolálás adatai
<i>Aspergillus flavus</i> (SZMC 2387)	humán keratomikózis
<i>Aspergillus fumigatus</i> (SZMC 2394)	humán keratomikózis
<i>Aspergillus nidulans</i> (SZMC 0278)	nincs adat
<i>Aspergillus terreus</i> (SZMC 2414)	humán keratomikózis

Zygomycota- járomspórás gombák törzse

Zygomycetes- járomspórás gombák osztálya

Izolátum	Izolálás adatai
<i>Absidia corymbifera</i> (SZMC 95033)	humán nyelvfertőzés
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> (CBS 102.277)	humán rhinocerebrális mikózis
<i>Rhizomucor miehei</i> (CBS 360.92)	humán mikózis
<i>Saksenaea vasiformis</i> (NRRL 2443)	nincs adat

Törzsgyűjtemények rövidítései:

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

NRRL: Northern Regional Research Laboratory Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Ill.

SZMC: Szeged Microbial Collection, University of Szeged, Szeged, Hungary

3.2. Alkalmazott táptalajok és tenyésztési körülmények

A járomspórás gombák törzsébe és az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajokat malátás táptalajon (MEA: 0,25% élesztő kivonat, 0,5% maláta, 1% glükóz, 2% agar) 4 °C-on tartottuk fenn. A nem-antifungális és antifungális szerekkel végzett érzékenységvizsgálatot 0,3 mg/ml L-glutaminnal kiegészített és 0,615 M 3-(N-morfolino)-propán-szulfonsavval (MOPS) pH=7-re pufferel RPMI 1640 tápoldatban (Sigma-Aldrich) végeztük el.

3.3. A vizsgálatokban felhasznált nem-antifungális és antifungális szerek

3.3.1. Központi idegrendszeri szerek

Az amantadin hidroklorid (AMD), a R-(-)-deprenil hidroklorid (R-DEP) és a valproinsav (NaVAP) só formájában, por alakban állt rendelkezésünkre. Ezekből 10240 µg/ml-es törzsoldatot készítettünk 96%-os etanollal majd ezt RPMI 1640 tápoldatban tízszeresére hígítottuk. Az így kapott oldatból (1024 µg/ml) felező hígítási sort készítettünk (1024-2 µg/ml) RPMI 1640 tápoldatban.

3.3.2. Antifungális szerek

Az itraconazol (ITZ) és a terbinafin (TBF) só formájában, por alakban állt rendelkezésünkre. Ezekből 1280 µg/ml-es törzsoldatot készítettünk 96%-os etanollal, amit RPMI 1640 tápoldatban tízszeresére hígítottuk. Az így kapott oldatból (128 µg/ml) felező hígítási sort készítettünk (128-0,25 µg/ml) RPMI 1640 tápoldatban.

Az amfotericin B (AMB) kereskedelmi forgalomban kapható törzsoldatából (250 µg/ml) RPMI 1640 tápoldattal, hígítási sort készítettünk (128-0,25 µg/ml, felező hígítás).

3.4. Antimikrobiális érzékenységvizsgálat

3.4.1. Inokulum készítés

A spóraszuszpenzió készítéséhez 7 napos, MEA ferde agaron növesztett járomspórás gomba és *Aspergillus* tenyészet felszínére 5 ml RPMI 1640 tápoldatot

pipettáztunk és enyhe keveréssel felfuszpendáltuk benne a spórákat, majd az így kapott szuszpenziót steril vattán átszűrtük és Bürker-kamrában történő spóraszám meghatározás után RPMI 1640 tápoldatban 10^5 spóra/ml-es koncentrációra hígítottuk ki.

3.4.2. Antimikrobiális hatásvizsgálat mikrodilúciós módszerrel

A vizsgálatba bevont anyagok *in vitro* antimikrobiális hatását 96 lyukú mikrotiter lemezen 620 nm hullámhosszúságú fény abszorbanciájával mértük (Jupiter HD univerzális mikrotiter lemez leolvasó interferenciaszűrővel, ASYS Hitech GmbH, Ausztria). Minden lyuk 100 µl mintát és 100 µl 10^5 sejt/ml szuszpenziót tartalmazott. Spektrometriai háttér korrekcióhoz 200 µl steril tápoldatot használtunk. Növekedési kontrollként 100 µl tápoldatot és 100 µl 10^5 sejt/ml szuszpenzió elegyét alkalmaztuk. A mikrotiter lapokat 37 °C-on inkubáltuk és az abszorbanciát 24, illetve 48 óra után mértük.

Két szer kombinációinak vizsgálata során a checkerboard-titrálási módszert alkalmaztuk: Az AMD, R-DEP és a NaVAP csökkenő koncentrációit (64-4 µg/ml, felező hígítás) az ITZ-nek, a TBF-nek és az AMB-nek, az adott izolátumnak megfelelő MIC értékeitől csökkenő felező hígításaival mértük össze. A spóraszuszpenziót (10^5 sejt/ml) az AMD-ben, R-DEP-ben és a NaVAP-ban készítettük el.

A kísérleteink során vizsgált szer kombinációk:

1. AMD és AMB, AMD és ITZ, AMD és TBF
2. R-DEP és AMB, R-DEP és ITZ, R-DEP és TBF
3. NaVAP és AMB, NaVAP és ITZ, NaVAP és TBF

Kísérleteinket három párhuzamos leoltás bevonásával végeztük el.

3.4.3. Adatok kiértékelése

Az egyes anyagok antimikrobiális hatását az adott szer alkalmazása során bekövetkezett növekedésgátlás mértékével jellemeztük. A növekedési kontrollhoz tartozó fényelnyelés mértékét vettük 100%-os növekedésnek minden faj esetében. Az anyagok közötti kölcsönhatás mértékét pedig az Abbot-képlet segítségével számoltuk ki: $I_e = X + Y - (XY/100)$, ahol I_e a várt gátlás százalékos értéke egy adott kölcsönhatásban, az X és az Y pedig a kölcsönhatásban szereplő anyagok külön-külön mért gátlási százaléakai. Ha I_0 a

mért gátlási százalék, akkor a kölcsönhatás mértékét (IR) az $IR=I_0/I_e$ hányadossal számolhatjuk. Ha $IR<0,5$ antagonista, ha $IR>1,5$ akkor szinergista kölcsönhatás feltételezhető a két szer között. Ha az IR értéke 0,5 és 1,5 közé esik, akkor a vizsgált két anyag kölcsönhatása additív jellegű [43].

4. Eredmények és értékelésük

4.1. A vizsgált antifungális és nem-antifungális szerek érzékenysége

A vizsgálatba bevont egyes anyagok növekedésgátlási értékeit az inkubációs idő (37 °C, 24 óra a járomspórás gombák és 48 óra az *Aspergillus* fajok esetében) letelte után határoztuk meg.

A TBF-re minden vizsgált izolátum érzékenynek bizonyult (MIC=0,5-4 µg/ml). Az ITZ (MIC=2-8 µg/ml) eltérő koncentrációinál, a *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* kivételével, minden törzs esetében teljes növekedésgátlás volt megfigyelhető. Az AMB bizonyult a legkevésbé hatékony antifungális szernek a vizsgálataink során: az *A. flavus*-nál, az *A. fumigatus*-nál (MIC=16 µg/ml) és a járomspórás gombáknál (MIC=4-16 µg/ml) teljes növekedésgátlást figyeltünk meg (viszonylag magas AMB koncentrációértékeknél). Az *A. terreus* és az *A. nidulans* esetében a vizsgált koncentráció tartományon belül teljes növekedésgátlást nem értünk el az AMB-vel (**1. Táblázat**).

A nem-antifungális szerek kevésbé voltak hatásosak, mint az antimikotikumok. A *R. miehei* és a *S. vasiformis* bizonyult a legérzékenyebb járomspórás gomba izolátumnak ezekre a szerekre (MIC= 512 µg/ml). Az *Aspergillus* izolátumok esetében, teljes növekedésgátlást a nem-antifungális szerekkel csak az *A. fumigatus* és az *A. terreus* esetében sikerült elérni 512 µg/ml R-DEP alkalmazásával (**1. Táblázat**).

Az antifungális szerek minimálisan hatékony koncentráció (MEC) értéke az vizsgált izolátumok érzékenységétől függött. Az antifungális szerek hatékonyak bizonyultak a MIC értékeiken túl is egészen a felező hígítási sor harmadik lépéséig. A nem-antifungális szerek csak a felező hígítási sor második lépésig voltak antifungálisan hatékonyak.

A vizsgálatba bevont szerek MIC és MEC értékeit az **1. Táblázat** foglalja össze.

1. Táblázat. A vizsgált nem-antifungális és antifungális szerek minimálisan gátló és minimálisan hatékony koncentrációi (µg/ml)

Fajok / Szerek	Antifungális szerek						Nem-antifungális szerek					
	AMB		ITZ		TBF		AMD		R-DEP		NaVAP	
Zygomycetes	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC
<i>A. corymbifera</i> (SZMC 95033)	4	2 (65±5,%)	8	1 (88±4,9%)	4	0,25 (82±4,3%)	>512	512 (73±5,7%)	>512	256 (69±3,5%)	>512	512 (88±8,6%)
<i>R. miehei</i> (CBS 360.92)	4	2 (45±4,6%)	2	1 (62±7,7%)	4	0,5 (45±2,2%)	512	256 (85±9,5%)	512	256 (78±4,7%)	512	256 (57±6,3%)
<i>Rh. microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> (CBS.102.277)	16	4 (47±2,7%)	>64	32 (73±8,4%)	4	2 (78±7,7%)		>512	>512	512 (49±7,0%)	>512	512 (88±4,5%)
<i>S. vasiformis</i> (NRRL 2443)	4	2 (54±6,8%)	2	1 (76±6,5%)	1	0,5 (77±2,5%)	512	512 (0±0,0%)	512	256 (48±5,6%)	512	256 (73±4,3%)
<i>Aspergillus</i> spp.	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC	MIC	MEC
<i>A. flavus</i> (SZMC 2387)	16	4 (83±6,9%)	2	0,5 (85±8,1%)	0,5	0,125 (47±5,0%)	>512	256 (88±2,1%)	>512	64 (77±6,1%)	>512	256 (87±4,1%)
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 2394)	16	4 (60±17%)	4	2 (71±5,5%)	4	0,5 (86±6,6%)	>512	512 (62±2,0%)	512	64 (65±4,1%)		>512
<i>A. nidulans</i> (SZMC 0278)	>64	16 (80±3,2%)	4	1 (88±0,6%)	4	0,25 (85±8,0%)	>512	256 (82±4,5%)	>512	128 (72±4,2%)		>512
<i>A. terreus</i> (SZMC 2414)	>64	0,5 (88±3,9%)	2	0,5 (56±6,0%)	1	0,25 (38±6,0%)		>512	512	256 (48±10,4%)	>512	512 (64±8,0%)

Zárójelben a gombák növekedési százaléka látható a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (100%). Rövidítések: AMB, amfotericin B; AMD, amantadin hidroklorid; ITZ, itrakonazol; MIC, minimálisan gátló koncentráció; MEC, minimálisan hatékony koncentráció; NaVAP, valproinsav; R-DEP, R-(-)-deprenil hidroklorid; TBF, terbinafin.

4.2. Az AMD, R-DEP, NaVAP és az antifungális szerek közötti kölcsönhatások

A vizsgált izolátumtól függően az AMD-, az R-DEP- és a NaVAP különböző kölcsönhatásba lépett az antifungális szerekkel az inkubációt követően (37 °C, 24 óra a járomspórás gombák és 48 óra az *Aspergillus* fajok esetében) (2. és 3. Táblázat). A járomspórás gomba izolátumok esetében antagonista, additív és szinergista kölcsönhatás volt megfigyelhető a vizsgálatba bevont szerek között. A *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* esetén semmilyen kölcsönhatás nem volt kimutatható (2. Táblázat). Az *Aspergillus* izolátumoknál a nem-antifungális szerek elsősorban antagonisztikus kölcsönhatásba léptek az antimikotikumokkal, de additív (*A. terreus* esetében az AMD és az ITZ, illetve az R-DEP és az ITZ között) és szinergista (*A. flavus* és *A. fumigatus* esetében az AMD, az R-DEP és az ITZ, illetve az R-DEP és az AMB között,) kölcsönhatás is megfigyelhető volt (3. Táblázat). Kivételt az *A. nidulans* képzett, amely esetében a nem-antifungális szerek antimikotikumokkal történő kombinációja szinergista kölcsönhatást mutatott vagy a két szer nem lépett kölcsönhatásba egymással a vizsgált koncentrációtartományon belül (3. Táblázat).

Az additív és szinergisztikus szerkombinációk esetében a vizsgált gomba izolátumok növekedése teljesen vagy jelentős mértékben csökkent összehasonlítva azzal, amikor a nem-antifungális szereket és az antimikotikumokat önmagukban alkalmaztuk ugyanezek a koncentrációértékeken (1., 2. és 3. Táblázat).

2. Táblázat. Az AMD, az R-DEP, a NaVAP és az antifungális szerek eltérő koncentrációjú kombinációinak hatása a vizsgált járomspórás gomba izolátumokkal szemben *in vitro* a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (100% növekedés), 24 órás 37 °C-os inkubációt követően.

Fajok / Kombinációk			<i>A. corymbifera</i> (SZMC 95033)	<i>R. miehei</i> (CBS 360.92)	<i>S. vasiformis</i> (NRRL 2443)
AMD	AMB	cc. (µg/ml) és IR növekedési %	64-4+4; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	64-4+4-2; 4,81±2,88, SZIN, 52-82% (65±5,3%)	64-4+4-2; 9,37±1,87, SZIN 24-72% (47±4,0%)
	ITZ		64-4+1; 4,34±1,93, SZIN 35-64% (50±2,8%)	64-4+1; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	64-16+1, 3,40±0,92, SZIN 10-43% (24±2,8%)
	TBF		64-4+1-0,25; 0,01±0,00, ANT 90-100% (99±0,1%)	64-4+1-0,5; 0,91±0,05, ADD 24-52% (39±4,6%)	64-4+1; 0,15±0,02, ANT 47-100% (85±1,1%)
R-DEP	AMB	cc. (µg/ml) és IR növekedési %	64-4+4; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	NK	64-4+4; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)
	ITZ		64-4+1; 4,02±1,57, SZIN 38-65% (57±2,6%)	64-4+1-0,5; 11,51±3,54, SZIN 43-66% (60±2,9%)	64-4+1-0,5; 9,66±3,16, SZIN 6-87% (48±4,3%)
	TBF		64-4+1-0,25; 1,40±0,14, ADD 39-67% (50±3,4%)	64-4+1-0,5; 0,31±0,04, ANT 66-100% (75±3,1%)	64-4+1-0,5; 0,05±0,01, SZIN 80-100% (95±1,5%)
NaVAP	AMB	cc. (µg/ml) és IR növekedési %	64-12+2; 1,53±0,15, ADD 40-55% (47±2,7%)	64-4+4; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	64-4+4; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)
	ITZ		NK	64-4+1-0,5; 9,88±1,81, SZIN 4-83% (30±2,4%)	64-4+1; 4,12±0,98, SZIN 1-14% (9±4,0%)
	TBF		64-4+1-0,25; 1,77±0,06, SZIN 9-15% (13±4,1%)	64-4+1-0,5; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	64-4+1-0,5; 0,26±0,02, ANT 53-100% (94±0,3%)

A cellák első sorában a jelzett koncentrációtartományban megfigyelt kölcsönhatások átlagos mértéke (IR) és típusa található. A cellák második sorában a kölcsönhatásokban megfigyelt növekedési százalékok minimális és maximális értéke, illetve zárójelben ezek átlaga látható. Rövidítések: ADD, additív kölcsönhatás; AMB, amfotericin B; AMD, amantadin hidroklorid; ANT: antagonista kölcsönhatás; ITZ, itrakonazol; NaVAP, valproinsav; NK, nincs kölcsönhatás R-DEP, R(-)-deprenil hidroklorid; SZIN: szinergista kölcsönhatás; TBF, terbinafin.

3. Táblázat. Az AMD, az R-DEP, a NaVAP és az antifungális szerek eltérő koncentrációjú kombinációinak hatása a vizsgált *Aspergillus* izolátumokkal szemben *in vitro* a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (100% növekedés), 48 órás 37 °C-os inkubációt követően.

Fajok / Kombinációk			<i>A. flavus</i> (SZMC 2387)	<i>A. fumigatus</i> (SZMC 2394)	<i>A. nidulans</i> (SZMC 0278)	<i>A. terreus</i> (SZMC 2414)
AMD	AMB		NK	64-4+4-1; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	NK	64-4 / 4-0,5; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)
	ITZ	cc. (µg/ml) és IR növekedési %	64-4+1-0,5; 4,09±0,20, SZIN 0% (0±0,00%)	NK	64-4+1-0,5; 6,77±0,97, SZIN 32-77% (57±6,2%)	64-4+1-0,5; 0,84±0,08, ADD 16-70% (39±5,1%)
	TBF		64-4+0,5-0,03125; 0,12±0,05, ANT 80-98% (91±4,5%)	64-4+0,5; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	64+0,5-0,25; 1,95±0,27, SZIN 45-75% (60±6,8%)	64-4+0,5-0,125; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)
R-DEP	AMB		64-4+4-0,25; 0,12±0,03, ANT 92-100% (97±1,0%)	64-8+4-0,5; 2,30±0,61, SZIN 46-81% (56±5,9%)	64-4+4-0,25; 35,77±4,16, SZIN 13-71% (29±7,8%)	64-4+4-0,5; 0,02±0,01, ANT 87-100% (99±0,3%)
	ITZ	cc. (µg/ml) és IR növekedési %	64-4+1-0,5; 1,38±0,45, SZIN 52-75% (59±3,3%)	NK	64-4+1-0,5; 11,28±2,23, SZIN 0-78%, (30±4,1%)	64-4+1; 1,08±0,03, ADD 0% (0±0,0%)
	TBF		64-4+0,5-0,03125; 0,07±0,05, ANT 55-100% (94±0,9%)	64-4+0,5-0,03125; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	64-4+0,5; 3,62±1,00, SZIN 0% (0±0,0%)	64-4 / 0,5-0,125; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)
NaVAP	AMB		64-4+4; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	64-4+4-1; 0,07±0,00, ANT 71-100% (97±0,0%)	NK	64-4+4-0,5; 0,01±0,01, ANT 96-100% (100±0,2%)
	ITZ	cc. (µg/ml) és IR növekedési %	64-12+1-0,5; 0,00±0,00 ANT 100% (100±0,0%)	NK	NK	64-4+1; 0,23±0,05, ANT 69-82% (78±4,9%)
	TBF		64-4+0,5-0,125; 0,08±0,08, ANT 60-100% (87±3,2%)	64-4+0,5; 0,00±0,00, ANT 100% (100±0,0%)	NK	64-4+0,5-0,125; 0,07±0,02, ANT 63-100% (95±0,3%)

A cellák első sorában a jelzett koncentrációtartományban megfigyelt kölcsönhatások átlagos mértéke (IR) és típusa található. A cellák második sorában kölcsönhatásokban megfigyelt növekedési százalékok minimális és maximális értéke, illetve zárójelben ezek átlaga látható. Rövidítések: ADD, additív kölcsönhatás; AMB, amfotericin B; AMD, amantadin hidroklorid; ANT: antagonista kölcsönhatás; ITZ, itrakonazol; NaVAP, valproinsav; NK, nincs kölcsönhatás R-DEP, R-(-)-deprenil hidroklorid; SZIN: szinergista kölcsönhatás; TBF, terbinafin.

5. Összefoglalás

Munkánk során három, nem-antifungális szernek (AMD, R-DEP és NaVAP) három, a klinikumban alkalmazott antifungális szerrel (AMB, ITZ és TBF) történő kombinációiknak gombaellenes hatását vizsgáltuk központi idegrendszeri (KPI) fertőzést okozó *Aspergillus* és járomspórás gomba izolátumokkal szemben *in vitro*.

A vizsgálatba bevont nem-antifungális szerek gombaellenes hatását jelen dolgozat elkészültéig nem vizsgálták. Az AMD, az R-DEP és a NaVAP csak csekély mértékben gátolta a vizsgálatba bevont gomba izolátumok növekedését, azonban ezek az antifungálisan hatékony koncentrációértékeik elérhetőek a központi idegrendszerben (KPI) és a vérplazmában [4, 6, 32, 36]. Ennek ellenére önmagukban alkalmazva nem lehetnek hatékonyak a központi idegrendszeri gombafertőzések kezelésére kismértékű antifungális hatásuk miatt.

A szakirodalomban fellelhető korábbi munkák alapján az AMB, az ITZ és a TBF MIC értékei 4-5 µg/ml-nek, 1-32 µg/ml-nek, illetve 0,5-64 µg/ml-nek adódtak járomspórás gomba izolátumok ellen [12, 21, 40, 54, 63]. Ezek az értékek az *Aspergillus* fajok esetében 0,12-8 µg/ml-nek, 0,03 - >16 µg/ml-nek és 0,03-16 µg/ml-nek bizonyultak [1, 11, 19, 21, 29, 41, 49]. Vizsgálataink eredményeképpen az AMB, az ITZ és a TBF MIC értékei hasonlóak voltak a fent említettekhez. Eltérést csak az *Aspergillus* fajok AMB érzékenységiében tapasztaltunk. Az *A. flavus* és az *A. fumigatus* esetében az AMB MIC értéke 16 µg/ml volt. A vizsgált *A. nidulans* és *A. terreus* izolátumok ellenállónak bizonyultak ezzel az antifungális szerrel szemben a vizsgált koncentrációtartományon belül. Ez a megfigyelés összefüggésben lehet azzal, hogy az utóbbi években egyre több AMB rezisztens *Aspergillus* törzset izoláltak klinikai mintákból, ami az AMB rezisztencia terjedését jelzi az *Aspergillus* nemzetségben belül [7, 31, 42, 64].

Az antifungális szerek átjutását a vér-agy gáton nagymértékben akadályozza a molekulák mérete és egyéb fizikai-kémiai sajátosságai, továbbá az hogy képesek irreverzibilisen a vér-agy gát transzportrendszerének tagjaihoz kötni (pl. P-glycoprotein) [57]. Mindez azt jelenti, hogy a KPI egy viszonylag elzárt környezet az antimikotikumokkal szemben, és a vizsgálatainkba bevont gomba izolátumok esetében a MIC és MEC értékeik nem érhetők el az agyszövetben és/vagy a cerebrospinális folyadékban. Abban az esetben, ha a MIC és MEC értékek magas intravénás dózis esetében elérhetőek a KPI-ben, számolni kell az antifungális szerek súlyos

mellékhatásaival hosszan tartó terápia esetén. A cerebrospinális folyadékban és az agyszövetben az AMB maximálisan elérhető koncentrációja 0,033 µg/ml, illetve 5,8 µg/g [22, 57, 62]. ITZ esetében ezek a koncentrációk 0,156 µg/ml és 1 µg/g [28, 57]. A TBF maximális koncentrációja az agyszövetben ~1-8 µg/g [24, 25]. A munkánk során használt szerkombinációk koncentrációértékei elérhetőek a KPI-ben és biztonságosan használhatók lehetnek a központi idegrendszeri gombafertőzések kezelésére [4, 6, 24, 25, 28, 32, 36, 57, 62].

Klinikai esetleírások alapján a legtöbb esetben nem hatékony az AMB önmagában vagy azolokkal történő kombinációjának alkalmazása rhinocerebrális zigomikózis és agyi aszpergilloma kezelésére [5, 56, 58, 61, 71]. A problémát tovább súlyosbítja, hogy a központi idegrendszeri gombafertőzések közül izolált antibiotikum rezisztens gomba törzsek kialakulásának következményeképpen az ilyen betegségek hagyományos antifungális szerekkel történő kezelése egyre nehezebb [5, 68, 71]. Mindezek miatt szükségessé vált új hatékony, a vér-agy gáton könnyen penetráló az AMB-vel és az azol vegyületekkel szinergisztikusan ható, hatékony gombaellenes szerek kifejlesztése. Egy ilyen szeren alapuló kombinált antifungális terápia hatékony és kevésbé toxikus megoldás lehet a közeljövőben a KPI idegrendszeri gombafertőzések kezelésére [2].

A munkánk során megfigyelt kölcsönhatások alapján az AMD-nek, az R-DEP-nek és a NaVAP-nak az AMB-vel, az ITZ-lal és a TBF-nel történő együttes alkalmazása alkalmas lehet a KPI-i gombafertőzések hatékony kezelésére *in vivo*. *In vitro* tesztjeinkben a vizsgált nem-antifungális szerek az antifungális szerekkel additív és szinergista kölcsönhatásba léptek, ami lehetővé tette az AMB, az ITZ és a TBF csökkentett koncentrációjának az alkalmazását, hogy ezáltal hasonló vagy jobb gombaellenes hatást érjünk el ahhoz, mint amit az antimikotikum önmagában képes kifejteni. Azokban az esetekben, amikor az AMB, az ITZ és a TBF az AMD-vel, az R-DEP-lel és a TBF-nal antagonista kölcsönhatásba lépett, az ilyen szerek együttes alkalmazása nem javasolt egy gombaellenes terápia során.

A szerkombináción alapuló antifungális terápia új lehetőséget biztosít a gombák által okozott fertőzések hatékony és biztonságos kezelésére [69]. Az AMD-nek, az R-DEP-nek és a NaVAP-nak az AMB-vel, az ITZ-lal és a TBF-nel megfigyelt hatékony kölcsönhatási alapján feltételezzük, hogy ezek a vegyületek alkalmasak lehetnek egy szerkombináción alapuló gombaellenes terápia kifejlesztésére további *in vitro* és *in vivo* kísérletek után.

6. Irodalomjegyzék

1. Abraham, O.C., Manavathu, E.K., Cutright, J.L. and Chandrasekar, P.H. (1999) In vitro susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 7-11.
2. Afeltra, J. and Verweij, P.E. (2003) Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 397-407.
3. Aftab B.T., Dobromilskaya, I., Liu, J.O. and Rudin, C.M. (2011). Itraconazole Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*; 71(21); 6764–72.
4. Azzaro, A.J., Ziemniak, J., Kemper, E., Campbell, B.J. and Van Den Berg, C. (2007) Pharmacokinetics and absolute bioavailability of selegiline following treatment of healthy subjects with the selegiline transdermal system (6 mg/24 h): a comparison with oral selegiline capsules. *J. Clin. Pharmacol.* 47, 1256-1267.
5. Baddley, J.W., Salzman, D. and Pappas, P.G. (2002) Fungal brain abscess in transplant recipients: epidemiologic, microbiologic, and clinical features. *Clin. Transplant.* 16, 419-424.
6. Bazinet, R.P., Weis, M.T., Rapoport, S.I. and Rosenberger, T.A. (2006) Valproic acid selectively inhibits conversion of arachidonic acid to arachidonoyl-CoA by brain microsomal long-chain fatty acyl-CoA synthetases: relevance to bipolar disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 122-129.
7. Blum, G., Perkhof, S., Haas, H., Schrettl, M., Würzner, R., Dierich, M.P. and Lass-Flörl, C. (2008) Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52, 1553-1555.
8. Chakrabarti, A., Marak, R.S.K., Singhi, S., Gupta, S., Hurst, S.F. and Padhye, A.A. (2005) Brain abscess due to *Aspergillus nidulans*. *J. Mycol. Med.* 16, 100-104.
9. Cohen, R.A. and Fisher, M. (1989) Amantadine treatment of fatigue associated with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 46, 676-680.
10. Crosby, N., Deane, K.H. and Clarke, C.E. (2003) Amantadine in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD003468.
11. Dannaoui, E., Persat, F., Monier, M.F., Borel, E., Piens, M.A. and Picot, S. (1999) In-vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 553-555.

12. Dannaoui, E., Meletiadis, J., Mouton, J.W., Meis, J.F. and Verweij, P.E., Eurofung Network. (2003) In vitro susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 45-52.
13. David W. D. (1998) Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases.* 26, 781–805
14. Deyde, V.M., Xu, X., Bright, R.A., Shaw, M., Smith, C.B., Zhang, Y., Shu, Y., Gubareva, L.V., Cox, N.J. and Klimov, A.I. (2007) Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide. *J. Infect. Dis.* 196, 249-257.
15. Dotis, J. and Roilides, E. (2007) Immunopathogenesis of central nervous system fungal infections. *Neurol, India.* 55, 216-220.
16. Eltoukhy, N.S. and Crank, C.W. (2010) Antifungal distribution into cerebrospinal fluid, vitreous humor, bone, and other difficult sites. *Curr. Fungal. Infect. Rep.* 4, 111-119.
17. Gallagher, C.G., Ashley, E.S.D., Drew, R.H. and Perfect, J.R. (2003) Antifungal pharmacotherapy for invasive mould infections. *Expert Opin. Pharm.* 4, 147-164.
18. Garcia-Diaz, J.B., Palau, L. and Pankey, G.A. (2001) Resolution of rhinocerebral zygomycosis associated with adjuvant administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis.* 32, 166-170.
19. Garcia-Effron, G., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Monzon, A., Rodriguez-Tudela, J.L. and Cuenca-Estrella, M. (2004) In vitro activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 1086-1089.
20. Gilbert, D.N.; Moellering, R.C.; Eliopoulos, G.M. and Sande, M.A. (2006) The Sanford Guide to antimicrobial therapy ISBN 1-930808-30-5.
21. Gómez-López, A., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E. and Rodríguez-Tudela, J.L. (2003) In vitro evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against Zygomycota. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45, 199-202.
22. Groll, A.H., Giri, N., Petraitis, V., Petraitiene, R., Candelario, M., Bacher, J.S., Piscitelli, S.C. and Walsh, T.J. (2000) Comparative efficacy and distribution of lipid formulations of amphotericin B in experimental *Candida albicans* infection of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* 182, 274-282.
23. Hollós, S. és Zörényi, Gy. (Szerk.) (2004) Alkalmazott gyógyszerteran 2. javított, bővített Kiad. Semmelweis Egyetem Egészségügyi Főiskolai Kar, Budapest.

24. Hosseini-Yeganeh, M. and McLachlan, A.J. (2001) Tissue distribution of terbinafine in rats. *J. Pharm. Sci.* 90, 1817-1828.
25. Hosseini-Yeganeh, M. and McLachlan, A. J. (2002) Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46, 2219-2228.
26. Hounshell, D.A. and Smith, J.K. (1988), „Science and Corporate Strategy: Du Pont R&D, 1902-1980”, Cambridge University Press, p. 469.
27. Hsiao, Y.C., Tsan, K.W. and Wang, T.Y. (2002) Rhinocerebral mucormycosis in diabetes: A case report. *J Intern Med Taiwan.* 13, 160-164.
28. Imbert, F., Jardin, M., Fernandez, C., Gantier, J.C., Dromer, F., Baron, G., Mentre, F., Van Beijsterveldt, L., Singlas, E. and Gimenez, F. (2003) Effect of efflux inhibition on brain uptake of itraconazole in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Drug Metab. Dispos.* 31, 319-325.
29. Karaarslan, A., Arikan, S., Ozcan, M. and Ozcan, K.M. (2004) In vitro activity of terbinafine and itraconazole against *Aspergillus* species isolated from otomycosis. *Mycoses.* 47, 284-287.
30. Kirkpatrick, W.R., Vallor, A.C., McAtee, R.K., Ryder, N.S., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G. and Patterson' T.F. (2005) Combination Therapy with Terbinafine and Amphotericin B in a Rabbit Model of Experimental Invasive Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(11), 4751–4753.
31. Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., May, G.S., Osherov, N. and Rinaldi, M.G. (2002) *Aspergillus nidulans* is frequently resistant to amphotericin B. *Mycoses.* 45, 406-407.
32. Kornhuber, J., Quack, G., Danysz, W., Jellinger, K., Danielczyk, W., Gsell, W. and Riederer, P. (1995) Therapeutic brain concentration of the NMDA receptor antagonist amantadine. *Neuropharmacology.* 34, 713-721.
33. Kurita, M., Nishino, S., Ohtomo, K., Rai, M., Shirakawa, H., Mashiko, H., Niwa, S. and Nakahata, N. (2007) Sodium valproate at therapeutic concentrations changes Ca²⁺ response accompanied with its weak inhibition of protein kinase C in human astrocytoma cells. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 31, 600-604.
34. Lerchenmüller, C., Goner, M., Buchner, T. and Berdel, W.E. (2001) Rhinocerebral zygomycosis in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Oncol.* 12, 415-419.
35. Luat, A.F.; Asano, E. and Chugani, H.T. (2007) Paroxysmal tonic upgaze of childhood with co-existent absence epilepsy. *Epileptic Disord.* 9, 332-336.

36. Mahmood, I. (1997) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of selegiline. An update. *Clin. Pharmacokinet.* 33, 91-102.
37. Maugh, T. (1979) Panel urges wide use of antiviral drug. *Science.* 206, 1058.
38. Maugh, T. H. (1976) Amantadine: an Alternative for prevention of influenza. *Science.* 192, 130.
39. Meador, K.J.; Baker G.A.; Browning, N.; Clayton-Smith, J.; Combs-Cantrell, D.T.; Cohen, M.; Kalayjian, L.A.; Kanner, A.; Liporace, J.D.; Pennell, P.B.; Privitera, M. and Loring, D.W. (2009) NEAD study group. Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs. *N. Engl. J. Med.* 360, 1597-1605.
40. Minassian, B., Huczko, E., Washo, T., Bonner, T. and Fung-Tomc, J. (2003) In vitro activity of ravuconazole against Zygomycetes, *Scedosporium* and *Fusarium* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 1250-1252.
41. Misra, R., Malik, A. and Singhal, S. (2011) Comparison of the activities of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical and environmental isolates of *Aspergillus* species. *Indian. J. Pathol. Microbiol.* 54, 112-116.
42. Moosa, M.Y., Alangaden, G.J., Manavathu, E. and Chandrasekar, P.H. (2002) Resistance to amphotericin B does not emerge during treatment for invasive aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 209-213.
43. Moreno, A.B.; del Pozo, A.M., Borja, M. and San Segundo, B. (2003) Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopatology.* 93, 1344-1353.
44. Murthy, J.M. (2007) Fungal infections of the central nervous system: the clinical syndromes. *Neurol. India.* 55, 221-225.
45. Nadkarni, T. and Goel, A. (2005) Aspergilloma of the brain: an overview. *J. Postgrad. Med.* 51 Suppl 1, S37-41.
46. Nosanchuk, J.D. (2006) Current status and future of antifungal therapy for systemic mycoses. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 1, 75-84.
47. Odds, F.C.; Brown, A.J.P. and Gow, N.A.R. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11, 272-279.
48. Ouvrier, R.A. and Billson, F. (1988) Benign paroxysmal tonic upgaze of childhood. *J Child Neurol.* 3, 177-180.
49. Rath, P.M. (1998) Susceptibility of *Aspergillus* strains from culture collections to amphotericin B and itraconazole. *J. Antimicrob. Chemother* 41, 567-570.

50. Ribes, J.A. Vanhover-Sams, C.L. and Baker, D.J. (2000) Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 13, 236-301.
51. Riederer, P.; Lachenmayer, L. and Laux, G. (2004). Clinical applications of MAO-inhibitors. *Curr Med Chem.* 11, 2033-2043.
52. Cohen, R.A. and Fisher, M. (1989) Amantadine Treatment of Fatigue Associated With Multiple Sclerosis *Arch Neurol.* 46(6), 676-680.
53. Roni, C.R. (2009) I.Q. harmed by epilepsy drug in utero. *New York Times*.
54. Sabatelli, F, Patel, R., Mann, P.A., Mendrick, C.A., Norris, C.C., Hare, R., Loebenberg, D., Black, T.A. and McNicholas, P.M. (2006) In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2009-2015.
55. Sanglard, D. and Odds, F.C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* 2, 73-85.
56. Schwartz, S., Ruhnke, M., Ribaud, P., Reed, E., Troke, P. and Thiel, E. (2007) Poor efficacy of amphotericin B-based therapy in CNS aspergillosis. *Mycoses.* 50, 196-200.
57. Schwartz, S. and Thiel, E. (2009) Cerebral aspergillosis: tissue penetration is the key. *Med. Mycol.* 47 Suppl 1, S387-393.
58. Scully, E.P., Baden, L.R. and Katz, J.T. (2008) Fungal brain infections. *Curr. Opin. Neurol.* 21, 347-352.
59. Severo, L.C., de Mattos, O.F., Dreher, R., Teixeira, P.Z., da Silva, P.N. and Londero, A.T. (2002) Zygomycosis: A report of eleven cases and a review of the Brazilian literature. *Rev Iberoam Micol.* 19, 52-56.
60. Sharma, R.R. (2010) Fungal infections of the nervous system: current perspective and controversies in management. *Int. J. Surg.* 8, 591-601.
61. Skiada, A., Vrana, L., Polychronopoulou, H., Prodromou, P., Chantzis, A., Tofas, P. and Daikos, G.L. (2009) Disseminated zygomycosis with involvement of the central nervous system. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 5, 46-49.
62. Smith, J. and Andes, D.R. (2006) Pharmacokinetics of antifungals: Implications for drug selections. *Infect. Med.* 23, 328-333.
63. Sun, Q.N., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Rinaldi, M.G. and Graybill, J.R. (2002) In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46, 1581-1582.

64. Sutton, D.A., Sanche, S.E., Revankar, S.G., Fothergill, A.W. and Rinaldi, M.G. (1999) In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2343-2345.
65. Theis, T. and Sthal, U. (2004) Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 437-244.
66. The New York Times, "Sales of flu drug by du Pont unit a 'disappointment'" (Last accessed May 19, 2008.) October 5, 1982.
67. Torbjorn, T. (2009) Which drug for the pregnant woman with epilepsy?. *N Engl J Med.* 360, 1667-1669.
68. Van der Linden, J.W., Jansen, R.R., Bresters, D., Visser, C.E., Geerlings, S.E., Kuijper, E.J., Melchers, W.J. and Verweij, P.E. (2009) Azole-resistant central nervous system aspergillosis. *Clin Infect Dis* 48, 1111-1113.
69. Vazquez, J.A. (2007) Combination antifungal therapy: the new frontier. *Future Microbiol.* 2, 115-139.
70. Vicente, M.F.; Basilio, A.; Cabello, A. and Pelaez, F. (2003) Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 15-32.
71. Vyzantiadis, T.A., Kioumi, A., Papadakis, E., Braimi, M., Dermitzakis, E., Tsitouridis, I. and Antoniadis, A. (2002) Rhino-cerebral zygomycosis resistant to antimycotic treatment: a case report. *Mycoses.* 52, 87-90.
72. Yasar, S., Justinova, Z., Lee, S.H., Stefanski, R., Goldberg, S.R. and Tanda, G. (2006) Metabolic transformation plays a primary role in the psychostimulant-like discriminative-stimulus effects of selegiline [(R)-(-)-deprenyl]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 387-394.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Vágvolgyi Csabának és Dr. Galgóczi Lászlónak, valamint köszönet illeti mindazokat, akik hasznos tanácsaikkal és értékes észrevételeikkel segítették munkámat.

8. Nyilatkozat

Alulírott Tóth Liliána, biológus szakos hallgató, kijelentem, hogy a dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel. Az IR értékek kiszámításában és az ezeken alapuló táblázatok elkészítésében témavezetőm, Dr. Galgóczi László segített.

.....
Tóth Liliána

Szeged, 2012. április 15.