

**Orrpolyposis kezelésére szolgáló gombaellenes hatóanyag
tartalmú készítmény fejlesztésének klinikai és analitikai
vonatkozásai**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

dr. Fittler András

Program vezető:

Prof. Dr. Fischer Emil

Témavezetők:

Prof. Dr. Botz Lajos

Prof. Dr. Gerlinger Imre



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Gyógyszerészeti Intézet

Pécs, 2010.

Bevezetés

Jól megtervezett pilot klinikai vizsgálatok fontos szerepet játszanak a még tisztázatlan etiológiai hátterű megbetegedések megismerésében, illetve az új gyógyszerkészítmények kifejlesztésében. Kiváltképpen a ritka megbetegedések kutatása esetében igaz mindez, hiszen a betegek nem számíthatnak a nagy gyógyszerállatok ilyen irányú gyógyszerfejlesztéseire, melyet nagymértékben befolyásolnak gazdasági és versenyképességi tényezők. Annak ellenére, hogy a pilot vizsgálatok hátrányát egyértelműen a beválogatott betegek alacsony száma jelenti, ezek szisztematikus összefoglalói és az azokat feldolgozó metaanalízisek segítségével hasznos bizonyítékok nyerhetők egy adott témakörben.

Természetesen egy jól megtervezett klinikai vizsgálatot alapos előkészületek előznek meg és a közreműködő egészségügyi szakemberek szoros együttműködését igényli (orvosok, gyógyszerészek, nővérek, statisztikusok, analitikusok, stb.).

Dolgozatomban gyógyszerészeti nézőpontból szeretnék rávilágítani, számos fontos szakmai kérdésre, melyek egy klinikai vizsgálat során merültek fel.

2006-ban egy placebo kontrolllos, kettős vak pilot klinikai vizsgálat indult, amely a hosszú távú gombaellenes kezelés hatékonyságát vizsgálta orrpolypósisal járó krónikus rhinosinuszitisen (chronic rhinosinusitis with nasal polyposis - CRSwNP) szenvedő betegeknél. A klinikai tanulmány hátterében az a feltételezés állt, hogy az orrnyálkahártyában megtapadó gombasejtek által kiváltott fokozott immunválasz okozza a polipok kialakulását. Annak ellenére, hogy számos vizsgálat eredményét publikálták, napjainkban is ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésre a gombaellenes kezelés hatékonyságára vonatkozólag. Még a vizsgálatunk megkezdése előtt felmerült a vizsgálati készítmények stabilitásának bizonytalansága. A három hónapos stabilitásvizsgálatot követően további kérdésekkel kellett szembesülnünk az amphotericin B (AmB) analitikai módszertanával kapcsolatban. Ezért a mikrobiológiai és kémiai analitikai módszertan területén módszertani fejlesztésekre volt szükség, melyek alkalmazása hozzájárult a gombaellenes készítmények tulajdonságainak teljesebb megismeréséhez.

Célkitűzések

Doktori értekezésemben a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikája által és a Gyógyszerészeti Intézet és Klinikai Központi Gyógyszertár közreműködésével kivitelezett klinikai vizsgálat átfogó gyógyszerészeti szemléletű megközelítését szeretném bemutatni. A vizsgálat előkészítése közben és azt követően számos gyógyszerészeti szempontból is meghatározó kérdés merült fel.

A munkám célja:

- az AmB tartalmú gombaellenes kezelés alkalmazhatóságáról beszámoló korábbi közlemények kritikus elemzése, illetve olyan gyógyszerészeti szempontból fontos kérdések értékelése, mint a klinikai vizsgálati készítmények előállítása, a megfelelő hatóanyag tartalom, tárolás és stabilitás;
- a hosszú távú AmB kezelés hatásosságának vizsgálata CRSwNP-ben szenvedő betegeknél;
- a vizsgálatba bevont betegek együttműködésének meghatározása;
- a különböző kémiai és mikrobiológiai módszereken alapuló analitikai eljárások bemutatása és értékelése;
- az AmB kémiai és mikrobiológiai analíziseinek metodikai fejlesztése.

Mivel igen eltérő témákat és kutatási területeket érintett az eddigi munkám, ezért a jobb átláthatóság érdekében két fő részre osztottam a doktori értekezéseimet. A klinikai vizsgálatokat bemutató részben a orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitis etiológiája és terápiája kerül bemutatásra, a pécsi pilot klinikai vizsgálat részletes ismertetésével együtt. A második, analitikai vizsgálatokat összefoglaló rész, az AmB kihívásokkal teli analitikai módszertanát és a vizsgálati készítmények stabilitásvizsgálatát foglalja össze, az alkalmazott kémiai és mikrobiológiai módszerek fejlesztéseit is bemutatva.

I. Klinikai vizsgálatok

I.a Az orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitis bemutatása és az orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitis etiológiája

A krónikus rhinosinusitis (KRS) az orrüreg és az orrmelléküregek nyálkahártyájának több mint 3 hónapja fennálló, jellegzetes vezető tünetekkel (orrdugulás, sűrű orrváladékozás, szaglászavar, arcfájdalom, illetve nyomásérzékenység) járó gyulladásos, esetenként extrém mértékű polyposus elváltozással kísért megbetegedése. Kísérő tünetekként a betegek fejfájásról, lázról, kellemetlen szagú leheletről, fáradtságról, füldugulásról és fogfájdalomról panaszkodhatnak.

Napjainkban a kórkép etiológiája és patogenezise még nem ismert pontosan; a legnépszerűbb és intenzív kutatómunka tárgyát képező elméletek közé tartoznak az orrüreg laterális falát érintő anatómiai eltérések oki szerepét feltételező, a biofilm- és a szuperantigén-elméletek. Régóta ismeretes, hogy a KRS egyes ritka formáiban a gombáknak is van kóroki szerepe. Az allergiás gombás rhinosinuszitist Katzenstein írta le 1980-ban. A közelmúltban Ponikau és munkatársai egy új tenyésztési és nyákgyűjtő eljárással az orrpolyposissal járó KRS miatt endoszkópos műtetre kerülő betegek 96%-ában tudták kimutatni a gombafonalak és az allergiára utaló, elhalt eozinofil sejtek klasztereivel teli nyák jelenlétét. Ponikau az „eozinofil gombás rhinosinuszitist” tartja a korrekt nevezéktannak. A KRS-ben szenvedő betegek orrváladékában található eozinofil sejtek „átutazóban” vannak az orrváladékban. Miután elpusztították a gombafonalakat, szétesnek, s a belőlük kiszabaduló fehérje (basic major protein – BMP) rendkívül toxikus az orrnyálkahártyára. Az epithelsérülést elszenvedett orrnyálkahártya másodlagos felülfertőződése, biofilm megtelepedése, illetve a szuperantigének megjelenése kapcsán KRS alakulhat ki, a kórkép multifaktoriális jellegére irányítva a figyelmet.

Amennyiben igaz a gombaelmélet, akkor az antigének mennyiségét csökkentjük vagy azokat elpusztítjuk, így a KRS feltételezett triggerének befolyásolása kapcsán akár tünetmentessé tehetjük betegeinket. Feltételeztük, hogy az endoszkópos orrpolypectomiákat követően megfelelő ideig és koncentrációban adott amphotericin B tartalmú orrspray kedvező hatású lehet a betegek számára, akár csökkentve a recidívák számát.

I.b Korábbi publikációk áttekintése és kritikai értékelése

Az utóbbi 7 évben hét klinikai vizsgálatot publikáltak, amelyek a lokális gombaellenes kezelés KRS-ben történő alkalmazásának tapasztalatairól számoltak be. Csupán három vizsgálat felépítése volt kettős vak, placebo kontrolllos és ezek közül egy volt multicentrikus, mindezekből kifolyólag az eredmények megbízhatósága és helyes értelmezhetősége kétséges. Számos esetben a beválogatott betegek száma igen alacsony volt. A kezelés időtartama 4 és 80 hét között mozgott, az aktív hatóanyag tartalmú- és placebo készítmények gyógyszerformája is eltért (orrspray, orrmosó és nazális inhaláció is előfordult). Az alkalmazott oldatok AmB koncentrációja és a felhasznált napi hatóanyag mennyisége is jelentősen különbözött. A vizsgálati gyógyszerek tárolási körülményeit és stabilitását teljesen figyelmen kívül hagyták a korábbi szerzők. A beteg együttműködés (adherence) követéséről szintén csupán egy közlemény számol be. A további részletek és szempontok a teljes doktori értekezésben és a kapcsolódó közleményben [Gerlinger és mtsai. Laryngoscope, 2010] olvashatóak.

I.c Ellentmondások és figyelmen kívül hagyott tényezők a korábban publikált közleményekben

Számos tényezőt szükséges részletesebben értékelni és tárgyalni. Ezek a következők:

- Gyógyszerforma és alkalmazás módja (spray, orrmosó)
- Vizsgálati készítmények előállítása és alkalmazott AmB koncentráció
- Hozzáadott glükóz szerepe az oldatokban
- Terápia időtartama
- Beteg együttműködés
- Tárolás és stabilitás

A felmerült számos tisztázandó kérdés tette szükségessé egy jól megtervezett és kivitelezett prospektív, kettős vak, placebo kontrolllos pilot klinikai vizsgálat lebonyolítását amelyben a hatásosság tisztázásán túl a fenti kérdések értékelését tűztük ki célul. Vizsgálatunk alapvetően különbözött a korábban publikáltaktól, abból a szempontból hogy az AmB tartalmú és placebo készítményeket az orrpolipok műtéti eltávolítását követően alkalmazták a betegek. Az orrsprayt mint gyógyszerformát előnyben részesítettük, mivel köztudott a hipertóniás

orrmosás előnyös hatása a KRS tüneteinek enyhítésében. A betegek együttműködését is pozitívan befolyásolja az orrsprayk egyszerű és kényelmes alkalmazhatósága.

I.d A pécsi pilot klinikai vizsgálat eredményei

Az intézetünkben lefolytatott, kettős vak, randomizált, placebo kontrollált, prospektív pilot klinikai tanulmányunkban AmB tartalmú orrsprayt (A csoport) vagy hatóanyag nélküli orrsprayt (B csoport) adtunk a betegeknek az orrpolipok endoszkópos eltávolítását követően 12 hónapig. Arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e különbség a két betegcsoportban a recidívák ismételt megjelenése, a tünettán, a betegek életminősége és az endoszkópos lelet között. Tanulmányunkba a 2005 novembere és 2006 októbere között az intézetünkbe utalt és műtéti megoldás céljából felvett, orrpolyposisban szenvedő 33 KRS-es beteget vontuk be. A klinikai vizsgálatot 30 beteg fejezte be. A KRS diagnózisát az „EAACI position paper on rhinosinusitis and nasal polyps executive summary” kritériumai alapján határoztuk meg. A hatóanyag tartalmú, valamint a placebót tartalmazó spray-ket a PTE ÁOK Klinikai Központi Gyógyszertára bocsátotta rendelkezésre. Az aktív spray Fungizone (Bristol-Myers Squibb, Epernon, Franciaország) ampullából készült, hatóanyag tartalma 5 mg/ml amphotericin B volt, míg a placebo spray acroflavinium monochloridum 0,0002%-os steril vizes oldata volt. A betegek az adagoló orrspray feltétellel ellátott vizsgálati készítményből naponta 2 alkalommal két-két befűjást (100 µl) alkalmaztak. Elsődleges hatástényező a Módosított Lund–Mackay-féle CT-értékelő pontrendszer, míg másodlagos hatástényezők az orrmelléküregi panaszokra vonatkozó kérdőív (SNAQ-11); életminőség teszt és az endoszkópos lelet voltak. További részletek, adatok és eredmények a teljes doktori értekezésben, illetve a vonatkozó publikációban olvashatóak [Gerlinger és mtsai. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2009].

Tizennégy beteg a tizenhatból az A csoportban, illetve tizenhat fő a tizenhétből a B csoportban fejezte be a vizsgálatot. Eredményeink alapján megállapítató, hogy az orrpolyposis miatt operált betegeknek az AmB tartalmú orrspray egy évig történő adása nem okoz szignifikáns változást a CT-pontszámok, a klinikai tünetek, valamint az életminőség vonatkozásában.

I.e A beteg együttműködés és a mellékhatások értékelése

A betegek együttműködő készségének (adherence) ismerete úgy a gyógyszerkutatás, mint az orvosi gyakorlat során kiemelkedő fontosságú. Egy klinikai vizsgálat végeredménye nem értelmezhető megbízható módon az adherencia ismeretének hiányában. A pilot vizsgálat során felmértük, hogy hogyan változott a 12 hónap alatt az adherencia, mely tényezők befolyásolták a betegek gyógyszeralkalmazását és milyen mellékhatások jelentkeztek.

Két indirekt módszert alkalmaztunk az adherencia meghatározására: (a) az elhasznált gyógyszer mennyiség visszamérését és (b) a kérdőíves felmérést a standardizált Brief Medication Questionnaire (BMQ) magyarra fordított verziójával. A két módszer együttes alkalmazása megbízhatóbb információt szolgáltatott, mint bármelyik önmagában, hiszen mindegyiknek megvan a maga előnye és hátránya. Az elhasznált gyógyszer mennyiséget havi rendszerességgel mértük, a 80 % feletti gyógyszerfelhasználást tekintettük az adherencia határának. A BMQ kérdőívet a betegek az utolsó orvosi vizit alkalmával töltötték ki. A kérdőív 16 kérdése a potenciális non-adherent betegek azonosítását és az együttműködést befolyásoló tényezők meghatározását szolgálta. Az *Adagolási felület* az utolsó hét gyógyszerfelhasználására kérdezett rá. A *Motivációs felület* a non-adherenciával kapcsolatba hozható viszonyulásokat mérte (kezelés hatástalanságától, vagy a mellékhatásoktól való félelem). Az *Emlékezőképesség felület* az adagolás pontosságát, míg az *Akadályoztatás felület* a készítmények felhasználásnak esetleges korlátozó tényezőit vizsgálta.

Annak ellenére, hogy hónapról-hónapra bizonyos mértékű csökkenés figyelhető meg az együttműködő készségben, a pilot vizsgálat végére is igen magas adherencia volt mérhető. A két csoport betegek között mért adherencia értékek (AmB csoport: $97,3 \pm 8,1$ %; placebo csoport: $97,2 \pm 7,4$ %), illetve a férfi ($97,8 \pm 7,4$ %) és nő ($96,6 \pm 8,1$ %) betegek esetében mért értékek nem tértek el szignifikáns módon. Körülbelül a betegek fele tartotta be tökéletesen az adagolási előírásokat, 37%-uk legfeljebb az adagok egy ötödét nem használta fel, míg csupán a vizsgálatban résztvevők 7,4%-a tekinthető non-adherentnek. A leggyakoribb befolyásoló tényező a motiváció hiánya volt, hiszen 48,1%-a a résztvevőknek tartott a kezelés hatástalanságától és a felmerülő mellékhatásoktól. Minden harmadik beteg utalt valamiféle akadályozó tényezőre és mindössze 25,9%-uk ismerte be, hogy emlékezetük hiányossága áll a gyógyszeralkalmazás elmaradása mögött. A mellékhatások száma és gyakorisága magasabb volt az AmB csoportban.

II. Analitikai vizsgálatok

II.a Az amphotericin B és az alkalmazható analitikai módszerek bemutatása

Az AmB a *Streptomyces nodosus* által termelt polién gombaellenes szer. A poliének mennyiségi meghatározása kémiai és mikrobiológiai módszerekkel is lehetséges. A kémiai analízis a vegyületekben található telítetlen láncból álló (kromofór) molekularész okozta fényelnyelésen alapul. Direkt módon vizsgálva, vagy kromatográfiás elválasztást követően spektrofotometriával határozhatóak meg a vegyületek. Az utóbbi évtizedek során számos HPLC vizsgálati módszert publikáltak. Mikrobiológiai analízis során a hatóanyag mikroorganizmusokra kifejtett gátló hatása mérhető. Ezen belül a legelfogadottabb módszer az agardiffúziós meghatározás. Mikrobiológiai meghatározásokat napjainkban ritkábban közöltek annak ellenére, hogy az Európai (Ph. Eur. 6.) és így a Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.), illetve az Amerikai Gyógyszerkönyv (USP. 21.) is mikrobiológiai értékmérést ír elő az AmB meghatározásához. Biológiai értékmérés alkalmazását az teszi szükségessé, hogy csak változó tisztaságú és homogenitású hatóanyag állítható elő (fő komponens mellett mellékkomponenseket tartalmaz, mint pl. az amphotericin A) a fermentációs módszerrel.

II.b A klinikai vizsgálati készítmények stabilitásának és tárolási körülményeinek meghatározása

Az AmB tartalmú oldatok stabilitásával foglalkozó korábbi közlemények áttekintését és értékelését követően megállapítható, hogy az ellentmondásos adatok helyes értelmezése nehéz és félrevezető következtetésekre adhat okot, ezért egy új stabilitásvizsgálat lebonyolítását tartottuk szükségesnek. Pontosabb információt kaphatunk az AmB tartalmú készítmény stabilitásáról, ha párhuzamosan vizsgáljuk annak kémiai és mikrobiológiai tulajdonságait a tárolás során.

Az 5mg/ml AmB tartalmú oldatok (Fungizone) stabilitását kémiai (spektrofotometria) és mikrobiológiai (biológiai értékmérés) módszerekkel határoztuk meg. A tárolási hőmérséklet és a korábbiakban segédanyagként alkalmazott 5% glükóz szerepét vizsgáltuk három hónapon keresztül.

A két módszer látványos eltérő eredményeket szolgáltatott. A kémiai meghatározás alapján az oldatok minden vizsgált körülmény esetében stabilnak tekinthetők (hatóanyag tartalom csökkenése három hónap elteltével: 14,2% 20°C-on, illetve 4,5% 20°C-on). Ezzel szemben a biológiai értékmérés már a 35. napra a gombaellenes hatásosság teljes megszűnését mutatta a szobahőmérsékleten tárolt minták esetében. A tárolási hőmérséklet szignifikáns módon, míg a glükóz tartalom nem szignifikáns módon befolyásolta az eltarthatóságot. A glükózt nem tartalmazó klinikai vizsgálati minták eltarthatóságát, 4°C-on történő tárolás estében, 30 napban határoztuk meg a biológiai értékmérés során kapott eredményeinknek megfelelően.

Mindezen megfigyeléseink hívták fel a figyelmet az analitikai módszerek által kimutatható különbségekre. Feltételezhetőleg olyan változások történtek a tárolás ideje alatt az oldatokban, melyek a gombaellenes hatékonyságot jelentős mértékben befolyásolták, miközben a hatóanyag szerkezetét - elsősorban a vizsgált hullámhosszúságú fény elnyelésében szerepet játszó kromofór polién szegmenst - nem érintették. Egy újabb, a kor színvonalának inkább megfelelő stabilitásvizsgálat elvégzésének tervezése során, az analitikai módszerek optimalizálását tűztük ki célul. A kémiai metodikát a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásával kívántuk fejleszteni, amely a hatóanyagok pontosabb mennyiségi meghatározását és elválasztását teszi lehetővé. Szintén pontosabb és reprodukálhatóbb biológiai módszerre volt szükség. További részletek, adatok és eredmények a teljes doktori értekezésben, illetve a vonatkozó publikációban olvashatóak [Fittler és mtsai. Act Pharm Hung, 2007].

II.c Kémiai módszerek

Különböző kémiai metodikák alkalmazhatóak a hatóanyag mennyiségi és minőségi meghatározására. Kromatográfias módszerekkel nem csupán a polién szerkezettel rendelkező molekulák mennyisége mérhető meg, hanem az elválasztás lehetőséget nyújt az eltérő fizikai-kémiai paraméterekkel rendelkező rokonvegyületek azonosítására.

II.c.1 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

A korábban publikált módszereket értékeltük és a legmegfelelőbbnek ítélt metodikát továbbfejlesztettük. A fő és mellékkomponensek elválasztásának érdekében az eluens optimalizálást végeztük el. Megfigyeltük, hogy a szerves fázis arányának, illetve a szerves fázison belül a metanol mennyiségének növelésével javul a mellékkomponensek elválasztása, mindazonáltal jelentős mértékben megnő az elúciós idő. A pH csökkentésével tovább fokozható a heptaén főkomponens (AmB) és a minor komponensek elválasztása. Az optimalizált eluens és az alkalmazott gradiens program segítségével 407 nm-en vizsgálva négy heptaén mellékkomponens különíthető el az AmB-től. Nyomokban tetraének is kimutathatóvá váltak. Tudomásunk szerint ezen komponensek elválasztását máig nem publikálták. A korábban alkalmazott és általunk tesztelt belső standardok közül a 4-nitro-1-naphthylamin bizonyult a leginkább megfelelőnek. További részletek, adatok és eredmények a teljes doktori értekezésben, illetve a vonatkozó publikációban olvashatóak [Fittler és mtsai. Act Pharm Hung, 2008].

II.c.2 Vékonyréteg-kromatográfia

A polién gombaellenes szerek vékonyréteg-kromatográfias (VRK) elválasztásának módszereit Thomas már 1976-ban összefoglaló közleményében publikálta. A hét, korábban alkalmazott módszer közül azon kromatográfias körülményeket értékeltük, ahol a főkomponens R_F értéke 0,2 felett volt. A megfelelő metodika segítségével két nehezen elkülöníthető foltot sikerült elválasztani a szilikagél rétegen ($\lambda=366$ nm). Az eluens összetételét a tárolás során képződő bomlástermékek jobb elválaszthatósága érdekében optimalizáltuk. A szerves fázis arányának növelése magasabb R_F értékeket és a foltok jobb elválasztását eredményezte, míg a szerves fázis metanol mennyiségének növelésével az elválasztás romlott. Az általunk javasolt eluens összetétel (kloroform – metanol – bórsav puffer pH 8,3; 4:5:1) előnye a megfelelő elválasztáson túl a gyors kifejlesztési idő és a szilikagél rétegből gyorsan és teljes mértékben eltávolítható oldószer összetétel alkalmazása, elősegítve a mikrobiológiai detektálást. 250-500 ng/folt AmB felvitele esetében a főkomponensen túl egy mellékkomponens is láthatóvá válik UV fény alatt ($\lambda=366$ nm). Célunk a Fungizone oldat tárolása során képződő bomlástermékek kimutatása volt, azonban felismertük, hogy a képződő bomlástermékek igen nagy száma nem teszi lehetővé azok kielégítő elválasztását és azonosítását. További részletek, adatok és eredmények a teljes

doktori értekezésben, illetve a vonatkozó publikációban olvashatóak [Fittler és mtsai. JPC-J Planar Chromat, 2010].

II.d Biológiai módszerek

Egy antibakteriális, vagy gombaellenes hatással rendelkező vegyület a mikroorganizmusokra kifejtett gátló hatása alapján is meghatározható. A biológiai értékmérés olyan vegyületek analizésére alkalmas, melyek fizikai-kémiai módszerekkel nem mérhetőek pontosan, illetve mikor a gátló hatásban bekövetkező változás kémiai módszerekkel nem vizsgálható. A direkt bioautográfia egy VRK elválasztást követő mikrobiológiai detektálást jelent. A módszert számos kutatócsoport használja az analitikai, orvosi és mezőgazdasági tudományok területén.

II.d.1 Agardiffúziós biológiai értékmérés

A mikrobiológiai értékmérés optimalizálása azért vált szükségessé, mert a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv által meghatározott agardiffúziós analitikai körülmények között (táptalaj és tesztörzs) csak kis koncentráció tartományban mérhető az AmB, magas a kimutathatósági határ és pontatlan a kioltási zónák leolvashatósága, így nehezen reprodukálható a mérés. Egy stabilitásvizsgálat szempontjából azonban az lenne az ideális, ha nagy koncentrációtartományt lefedően volna lineáris a log dózis-hatás görbe. Így a módszerek optimalizálásával igyekeztünk meghatározni az analízishez megfelelő körülményeket.

A kísérleteink során öt különböző összetételű gombatáptalajt és két indikátor organizmust, *Candida albicans* (ATCC 90028) és *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), vizsgáltunk. A kimutathatóság határa MHA-E táptalaj és *C. albicans* alkalmazása esetében volt a legalacsonyabb (0,25 µg/ml AmB). A *S. cerevisiae* érzékenyebbé teszi a metodikát az összes többi táptalaj esetében, ezzel szemben a kvantitatív mérésekhez szükséges lineáris koncentrációtartomány *C. albicans* alkalmazása esetében akár hatszor szélesebb. Az általunk javasolt és validált vizsgálati körülmények között (MHA–GMB, *C. albicans*) a kimutathatóság alsó határa 1,54 µg/ml, míg a kvantitatív meghatározás aló határa 15 µg/ml AmB. Ilyen körülmények között a log dózis-hatás görbe már a 1,54-60 µg/ml koncentráció tartományban lineáris, illetve kioltási zónák határai is élesek, így pontosak és jól

dokumentálhatóak a mérések eredményei. További részletek, adatok és eredmények a teljes doktori értekezésben, illetve a vonatkozó publikációban olvashatóak [Fittler és mtsai. Mycoses, 2010].

II.d.2. Direkt bioautográfia

Vizsgálatunk célja az AmB oldatban megtalálható fő- és mellékkomponensek VRK elválasztását követő mikrobiológiai detektálás megvalósítása volt. A vegyület direkt bioautográfias meghatározását korábban nem közölték.

A korábban optimalizált eluens (kloroform – ketanol – bórsav puffer pH 8,3; 4:5:1) segítségével két komponens választható el a szilakagél rétegen. Mindkettő rendelkezik gombaellenes hatással. Méréseink alapján megállapítható, hogy nagyszámú különböző bomlástermék képződik a két évig tartó tárolási idő során az oldatokban. Direkt bioautográfia segítségével igen kis mennyiségű AmB is meghatározható, hiszen a módszer kimutathatósági határa 0.8 ng/folt. A bemutatott módszer előnyei közé tartozik az érzékenység, a könnyű kivitelezhetőség és a gyorsaság. További részletek, adatok és eredmények a teljes doktori értekezésben, illetve a vonatkozó publikációban olvashatóak [Fittler és mtsai. JPC-J Planar Chromat, 2010].

Összefoglalás

A gyógyszerészi tudományok számos területét érintette a doktori értekezés. Természetes velejárója egy ilyen szerteágazó, több metodikát is alkalmazó munkának, hogy egy-egy terület minden részletbemenő kidolgozására nem kerülhet sor. Mindezzel szemben előnye, hogy egy olyan átfogó gyógyszerészi szemléletet tükröz, amely eddigi szakmai munkásságom során alakult ki.

A krónikus rhinosinusitis gombaellenes kezeléséről beszámoló közleményeket olyan gyógyszerészeti szempontok alapján is értékeltük, mint a stabilitás és a beteg együttműködés. Megállapítottuk, hogy az orrpolipok kialakulásának patogenezise tisztázatlan és a lokális gombaellenes kezelés hatásosságára vonatkozólag ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre.

A hosszú távú AmB kezelés eredményességének értékelésére egy kettős vak placebo kontrollos pilot klinikai tanulmányunkba 33 beteget vontunk be, melyben 5 mg/ml koncentrációjú AmB tartalmú orrsprayt, vagy hatóanyag nélküli orrsprayt adtunk a betegeknek az orrpolipok endoszkópos eltávolítását követően 12 hónapig. A kezelés hatásosságának megítélésére a Módosított Lund–Mackay-féle CT-értékelő pontrendszert, egy orrmelléküregi panaszokra vonatkozó kérdőívet és egy életminőség tesztet; illetve az endoszkópos lelet értékelését alkalmaztuk. Eredményeink arra engedtek következtetni, hogy az orrpolyposis miatt operált betegeknek az AmB tartalmú orrspray egy évig történő adása nem okoz szignifikáns változást a CT-pontszámok, a klinikai tünetek, valamint az életminőség vonatkozásában.

A dolgozat második részében az AmB meghatározásához alkalmazható kémiai (spektrofotometria, HPLC) és mikrobiológiai (biológiai értékmérés, direkt bioautográfia) analitikai módszerek összehasonlítását végeztük el. Optimalizált HPLC, VRK, agardiffúziós biológiai értékmérési és direkt bioautográfias metodikákat fejlesztettünk ki az AmB megbízható kvantitatív meghatározása érdekében. Az AmB tartalmú orrspray oldatok stabilitásvizsgálatát elvégeztük. Az általunk továbbfejlesztett HPLC módszer segítségével számos mellékkomponens kimutatását megvalósítottuk. A korábban dokumentált VRK módszereket értékeltük és továbbfejlesztettük, ezáltal a bomlástermékek megjelenése kimutathatóvá vált. Direkt bioautográfiával tovább tudtuk a VRK módszer érzékenységét

fokozni. Mivel a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv által előírt biológiai értékmérési módszer érzékenysége nem megfelelő, optimalizált módszert dolgoztunk ki, mely lehetővé tette az AmB pontos meghatározását a 1,54-60,0 µg/ml koncentrációtartományban.

Mindezen megfigyeléseink hozzájárultak a lokális gombaellenes kezelés szerepének teljesebb megértéséhez krónikus rhinosinusitisben szenvedő betegeknél. Az analitikai vizsgálatok fejlesztése is hasznos többletinformációt jelenthet a későbbi klinikai vizsgálatok számára.

A PhD értekezés fontosabb eredményei

Az orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitis AmB kezeléséről beszámoló klinikai vizsgálatok publikációinak értékelése

1. Az orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitis kialakulásának háttere tisztázatlan és a gombaellenes kezelés eredményessége megkérdőjelezhető.
2. A korábban publikált vizsgálatokban eltérő gyógyszerformát alkalmaztak, a beteg együttműködés meghatározását figyelmen kívül hagyták, a vizsgálati készítmények tárolási körülményeit és stabilitását nem vizsgálták. A vizsgálatok időtartalma jelentős mértékben eltért.
3. A klinikai vizsgálati mintákban a glükóz segédanyagként történő alkalmazása kerülendő, mivel a cukor elősegítheti a gombák növekedését.
4. További jól megtervezett és kivitelezett, magas bizonyítóerejű vizsgálatok szükségesek.

Amphotericin B-tartalmú orrspray posztoperatív alkalmazása orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitis eseteiben. Megelőzhető-e a recidíva?

1. Az orrpolyposis miatt operált betegeknek az amphotericin B-tartalmú orrspray egy évig történő adása nem okoz szignifikáns változást a CT-pontszámok, a klinikai tünetek, valamint az életminőség vonatkozásában.
2. Nem bizonyítható az AmB hatásossága orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitisben.

A betegek együttműködő készségének (adherence) ismerete

1. A betegek együttműködő készsége megfelelő volt, kis mértékben csökken az adherencia a 12 hónap során.
2. A leggyakoribb befolyásoló tényező a motiváció hiánya volt.
3. A mellékhatások száma és gyakorisága magasabb volt az AmB csoportban. A helyi nyálkahártya irritáció, mely a leggyakoribb mellékhatása az AmB kezelésnek, negatív módon befolyásolta az adherenciát.

4. Az orrspray gyógyszerforma kényelmesebben alkalmazható mint az orrmosó folyadék, így feltételezhetőleg magasabb adherenciát eredményez.
5. Két indirekt módszert alkalmaztunk az adherencia meghatározására: (a) az elhasznált gyógyszer mennyiség visszamérését és (b) a kérdőíves felmérést. A két módszer együttes alkalmazása megbízhatóbb információt szolgáltatott, mint bármelyik önmagában, hiszen mindegyiknek megvan a maga előnye és hátránya.

Az AmB analitikai meghatározása

1. A vizsgálat során az 5mg/ml AmB tartalmú oldatok (Fungizone) stabilitását kémiai (spektrofotometria) és mikrobiológiai (biológiai értékmérés) módszerekkel határoztuk meg. A glükózt nem tartalmazó klinikai vizsgálati minták eltarthatóságát, 4 °C-on történő tárolás esetén, 30 napban határoztuk meg, a biológiai értékmérés során kapott eredményeinknek megfelelően.
2. A két módszer eltérő eredményeket szolgáltatott. A kémiai meghatározás alapján az oldatok minden vizsgált körülmény esetében stabilnak tekinthetők. Ezzel szemben a biológiai értékmérés már a 35. napra a gombaellenes hatásosság teljes megszűnését mutatta a szobahőmérsékleten tárolt minták esetében.
3. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv által meghatározott agardiffúziós analitikai körülmények között (táptalaj és tesztörzs) kis koncentráció tartományban mérhető az AmB, magas a kimutathatósági határ és pontatlan a kioltási zónák leolvashatósága, így nehezen reprodukálható a mérés.
4. Optimalizált módszert dolgoztunk ki, mely lehetővé tette az AmB pontos meghatározását a 1,54-60,0 µg/ml koncentrációtartományban.
5. Az általunk optimalizált VRK eluens (kloroform – metanol – bórsav puffer pH 8,3; 4:5:1) segítségével két foltot sikerült elválasztani a szilakagél rétegen, mindkettő rendelkezik gombaellenes hatással.
6. Direkt bioautográfia alkalmazásával igen kis mennyiségű AmB is meghatározható, hiszen a módszer kimutathatósági határa 0.8 ng/folt.

Köszönetnyilvánítás

Mély tisztelettel és köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Dr. Botz Lajosnak és Prof. Dr. Gerlinger Imrének, lelkiismeretes szakmai irányításukért és támogatásukért. Hálásan köszönöm Dr. Kocsis Béla és Kocsis Erika önzetlen segítségét, amire bármikor számíthattam és amely nélkülözhetetlen volt méréseim sikeréhez. Dr. Mayer Anna, Dr. Tóvölgyi Zsuzsa és Pártos Ágnes támogatása és kedvessége szintén köszönetet érdemel. Köszönettel tartozom Dr. Matus Zoltánnak és Herczeg Erikának.

Külön köszönetet szeretnék mondani a PTE ÁOK Gyógyszerésztudományi Szak fiatal munkatársainak, akikben nem csak kollégákra, hanem barátokra is leletem az elmúlt évek során.

Hálás szívvel gondolok családom mindazon tagjaira akik mindvégig szerettek és bíztak bennem. Köszönöm!

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, posztterek és előadások

Közlemények:

1. **Fittler A.**: Amfotericin B tartalmú orrspray orrpolyp kezelésére. *Gyógyszerészet* 51, 280-284. (2007)
2. **Fittler A.**, Mayer A., Kocsis B., Gerlinger I., Fónay F., Botz L.: Amfotericin B orrspray oldat stabilitásvizsgálata biológiai és kémiai detektálással. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 77, 159-164 (2007)
3. Gerlinger Imre dr., **Fittler András.**, Mayer Anna., Fónay Fruzsina dr., Pytel József dr., Botz Lajos dr. Amphotericin B tartalmú orrspray posztoperatív alkalmazása orrpolypózissal járó krónikus rhinosinusitis eseteiben – megelőzhető-e a recidíva? *Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 53(4), 150-159 (2007)
4. **Fittler A.**, Matus Z., Kocsis B., Botz L. Amfotericin B tartalmú készítmények kvantitatív analízisének kémiai és mikrobiológiai vonatkozásai *Acta Pharmaceutica Hungarica* 78. 69-74. (2008)
5. Gerlinger I., **Fittler A.**, Mayer A., Patzkó Á., Fónay F., Pytel J., Botz L. Amphotericin B-tartalmú orrspray posztoperatív alkalmazása orrpolypózissal járó krónikus rhinosinusitis eseteiben. Megelőzhető-e a recidíva? *Orvosi Hetilap* 149(37), 1737-1746. (2008)
6. Imre Gerlinger; **András Fittler**; Fruzsina Fónai; Ágnes Patzkó, MD; Anna Mayer; Lajos Botz, PhD: Postoperative application of amphotericin B nasal spray in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis, with a review of the antifungal therapy. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 266(6), 847-855 (2009). (IF:0,843/2008)
7. **András Fittler**, Lajos Botz. Clinical and analytical aspects of the improvement of a local antifungal preparation for the treatment of nasal polyposis.(abstract) *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38(1),Suppl. 142-143 (2009) (IF:3,65/2008)
8. **András Fittler**, Béla Kocsis, Imre Gerlinger, Lajos Botz: Optimization of bioassay method for the quantitative microbiologic determination of amphotericin B. *Mycoses* 53(1), 57-61 (2010) (IF: 1.529/2008) Times cited:1
9. Imre Gerlinger, **Andras Fittler**. Fungal theory in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis (CRS) - pros and cons (In Reference to The Effect of Topical Amphotericin B on Inflammatory Markers in Patients with Chronic Rhinosinusitis: A

Multicenter Randomized Controlled Study), *The Laryngoscope* 120(1), 210-212 (2010) (IF:1,877/2008)

10. **András Fittler**, Béla Kocsis, Zoltán Matus, Lajos Botz. A sensitive detection method for the thin layer chromatography of amphotericin B. *Journal of Planar Chromatography* 23(1), 17–21 (2010) (IF:0,982/2008)

Poszterek:

1. **Fittler A.**, Mayer A., Botz L., Kocsis B., Gerlinger I.: Amphotericin B tartalmú vizes oldat stabilitásvizsgálata: biológiai és kémiai vonatkozások Gyógyszerkutató Szimpózium, Debrecen, 2006. november 24-25.
2. Tóvölgyi Zs., **Fittler A.**, Gerlinger I., Botz L.: Beteg-együtműködés orrpolyposisban szenvedő betegek klinikai vizsgálata során. Gyógyszerkutató Szimpózium, Szeged, 2007. november 9-10.
3. **Fittler A.**, Botz L., Matus Z.: Amfotericin B tartalmú vizes oldat stabilitásvizsgálata HPLC módszerrel. Gyógyszerkutató Szimpózium, Szeged, 2007. november 9-10.
4. Matus Z., **Fittler A.**, Kocsis B., Botz L. Chemical and microbiological aspects of the quantitative analysis of amphotericin B. Is HPLC in itself enough for quantification? 14th International Symposium on Separation Sciences New Achievements In Chromatography September 30.-October 3. 2008. The Zora Hotel, Primošten Croatia
5. Matus Z., **Fittler A.**, Kocsis B., Botz L.: Kromatográfiai és mikrobiológiai módszerek alkalmazhatósága a gombaellenes hatású amfotericin B meghatározására (Mit is mérünk valójában?) Magyar Elvásztástudományi Társaság, Elvásztástudományi Vándorgyűlés 2008. november 5-7. Sárvár
6. Matus Z., **Fittler A.**, Kocsis B., Botz L. Chemical and microbiological aspects of the quantitative analysis of amphotericin B. Is HPLC in itself enough for quantification? 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences Hotel Azúr, Siófok, 2009. szept 2-4
7. **András Fittler**, Lajos Botz. Clinical and analytical aspects of the improvement of a local antifungal preparation for the treatment of nasal polyposis. 3rd BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences, Antalya-Turkey 26. October 2009.

8. **Fittler András**, Botz Lajos, Intranazális gombaellenes készítmény fejlesztésének klinikai és analitikai vonatkozásai. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV. Budapest 2009. október 13-15.

Előadások:

1. **Fittler A.**: Amphotericin B tartalmú orrspray orrpolip kezelésére.
Rozsnyay Mátyás Emlékverseny Berekfürdő 2006. június 15-17.
2. **Fittler A.**: Amphotericin B tartalmú orrspray orrpolip kezelésére.
Kórházi Gyógyszerészek XV. Kongresszusa Eger 2006. szeptember 28-30.
3. **Fittler A.**, Gerlinger I., Mayer A., Botz L.: Amfotericin B tartalmú orrspray alkalmazása orrpolyposisban. Gyógyszerkutató Szimpózium, Szeged, 2007. november 9-10.
4. **Fittler A.**, Tóvölgyi Zs., Gerlinger I., Mayer A., Botz L.: Beteg-együttműködés meghatározása a klinikai vizsgálat során: Módszerek és tapasztalatok.
Kórházi Gyógyszerészek XVI. Kongresszusa Pécs, 2008. április 17-19.
5. Gerlinger I., **Fittler A.**, Mayer A., Fónay F., Pytel J., Botz L.: Amphotericin B orrspray alkalmazása krónikus rhinosinuszitis orrpolyposissal járó eseteiben – megelőzhető-e a recidíva? Magyar Fül-, Orr-, Gége és Fej-, Nyaksebész Orvosok Egyesületének Tudományos Ülése Budapest 2008. április 25
6. **András Fittler**, Zoltán Matus, Béla Kocsis, Lajos Botz: Chemical and microbiological aspects of the quantitative analysis of amphotericin B. 9th Symposium on instrumental Analysis, Pécs 2008. június 30-július 1
7. **Fittler András**, Egy polién antifungális vegyület analízisének komplexitása. IX. Clauder Ottó Emlékverseny Budapest, 2009. április 23-24.
8. **Fittler András**, Amfotericin B orrpolyposisban történő alkalmazhatóságának kritikai értékelése. Az MTA Gyógyszerésztudományi Osztályközi Komplex Bizottságának ülése, Budapest 2009. április. 29.