

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A *Candida* biofilmek alternatív terápia megközelítései**

Nagy Fruzsina

Témavezető: Dr. Kovács Renátó



**DEBRECENI EGYETEM**

**Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola**

**Debrecen, 2021**

## **A *Candida* biofilmek alternatív terápiás megközelítései**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Nagy Fruzsina okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok  
Doktori Iskolája (Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Kovács Renátó, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Ostorházi Eszter, PhD  
Dr. Paholcsek Melinda, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Ostorházi Eszter, PhD  
Dr. Paholcsek Melinda, PhD  
Dr. Fehér Enikő, PhD  
Dr. Juhász Béla, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:  
Debreceni Egyetem ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb előadóterme  
2021. szeptember 1. 13 óra.

## Bevezetés

Napjainkban megközelítőleg 2,2-3,8 millió gomba faj él világszerte, amelyek közül mindössze 300 tekinthető humán patogénnek. Az általuk okozott infekciók csaknem 1,7 milliárd embert érinthetnek világszerte, ahol a betegségek súlyossága a szuperficiálistól az invazív fertőzésekkig terjedhet. Az utóbbiak mintegy 1,5 millió ember haláláért tehetőek felelőssé évente.

A humán patogén gomba fajok jelentős része opportunistá természetű, vagyis permanens immunszuppresszió esetében (pl. HIV fertőzés, malignus daganatos megbetegedés) okozhatnak infekciót, továbbá az invazív orvosi beavatkozások, a széles spektrumú antibiotikum terápia, illetve a szerv transzplantáció is jelentős hajlamosító tényezőnek tekinthető az opportunistá gomba fertőzések szempontjából.

A leggyakoribb humán patogén gomba fajok elsősorban a *Candida* nemzetségből kerülnek ki. A leggyakrabban azonosított *Candida* faj továbbra is a *Candida albicans*, amely a gomba eredetű nyálkahártya-és invazív fertőzések körülbelül 70%-áért felelős világszerte. A *Candida* fajok a normál mikrobiom oszlopos tagjaiként, legfőképp a gasztrointesztinális rendszerben, a bőr felszínén, illetve a női genitális traktusban vannak jelen. Az utóbbi években lejátszódó epidemiológiai változásnak köszönhetően az úgynevezett non-*albicans* fajok (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. auris*) incidenciája és prevalenciája is fokozatosan növekvő tendenciát mutat. Az egyes fajok megoszlása azonban földrajzi területtől függően eltérő lehet.

Az elmúlt években a különböző beültetett orvostechikai eszközök klinikai gyakorlatban történő rutinszerű alkalmazásával a biofilm-asszociált infekciók előfordulása jelentősen emelkedett. A centrális vénás katéterek felszínén, valamint lumenében létrejövő biofilmek állandó gócpontjai lehetnek a szisztémás fertőzéseknek, így a candidémia szempontjából az egyik legjelentősebb rizikó tényezőt jelentik. A candidémia mortalitási aránya még mindig elfogadhatatlanul magas, akár a 40-50%-ot is meghaladhatja (fajtól függően) az intenzív ellátást igénylő páciensek körében.

A biofilmek kompakt szerkezetüknek köszönhetően kiváló védelmet biztosítanak az antifungális szerekkel, illetve az immunrendszerrel szemben a gombasejtek számára. Ennek eredményeképpen a biofilm alapú fertőzések kezelése a mai napig nagyon komoly kihívást jelent a klinikusok számára. A rendelkezésünkre álló antimikotikumok száma erősen limitált, ráadásul a szisztémás infekciók terápiaja során használható gombaellenes szerek közül nem mindegyik képes a biofilm mátrixában terápiás koncentrációt elérni. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható antifungális szerek közül csak az echinocandinok és az amphotericin-B (AMB)

mutatnak fajfüggő biofilm ellenes aktivitást.

Tekintettel a biofilm eredetű fertőzések számának növekedésére, valamint a multirezisztens *Candida* specierek megjelenésére, égető szükség van a korábbiaktól eltérő antifungális terápiás lehetőségek kidolgozására. Ez alatt nem feltétlenül új gyógyszerek szintézisére, tesztelésére és a klinikumba történő bevezetésére kell gondolnunk, hanem érdemes figyelembe venni a már hosszú évek óta ismert, ám más terápiás indikációban használt vegyületek antifungális hatását. További alternatív megoldásként szolgálhatnak a kombinációs terápiák, melyek a későbbiekben szintén mentőövet jelenthetnek az invazív gombás fertőzések kezelése során, akár a biofilmek esetében is.

Korábbi kombinációs vizsgálatok alapján a szinergista interakció a nukleozid-analóg nikkomycin Z (NIKZ) és egyes tradicionális antifungális szerek között jól ismert, azonban ezek a tanulmányok kizárólag a planktonikus formákra összpontosítottak. A jövő egyik legígéretesebb biofilm ellenes kezelési eljárása lehet a quorum-sensing (QS) megzavarásán alapuló terápiás stratégiák, illetve a *Candida* fajok által szekretált QS molekulák tradicionális antifungális szerekkel történő kombinációja. A QS, az individuális mikroba sejtek közötti kommunikáció egy speciális formája, amelynek köszönhetően számos élettani folyamat populáció szinten szinkronizálódhat fokozva a mikroba közösség túlélési esélyeit. A *Candida* fajok által szekretált két legjelentősebb QS molekula a farnesol (FAR), illetve a tyrosol (TYR), amelyek meghatározó szerepet játszanak a *Candida* specierek morfogenezisének, virulenciájának, valamint biofilm képződésének szabályozásában. Korábbi kísérletek eredményei alapján, egyes QS molekulák szuprafiziológiás koncentrációban (fiziológiástól magasabb koncentráció) gátolhatják a *Candida* biofilmek kialakulását, továbbá a FAR és a TYR tradicionális antimikotikumokkal (AMB, azolok, echinocandinok) történő kombinációja során szinergista interakció tapasztalható egyes *Candida* fajok planktonikus és szesszilis alakjai ellen.

A fent vázolt kombinációs terápiák előnyt jelenthetnek az adott antifungális szerekre csökkent érzékenységet mutató *Candida* specierek által okozott fertőzések esetében is, ezért reményeink szerint az eredményeink hozzájárulhatnak olyan új, alternatív kezelési stratégiák kifejlesztéséhez, amelyek segítségével hatékonyabban vehetjük fel a küzdelmet a biofilm-asszociált fertőzésekkel szemben.

## Célkitűzések

Vizsgálatainkban a caspofungin (CAS) és a micafungin (MICA) *Candida* biofilmek elleni hatékonyságával kapcsolatos ismereteinket szeretnénk volna bővíteni. Szakirodalmi adatok hiányában, kíváncsiak voltunk arra, hogy a tesztelt két, bizonyítottan biofilm aktív echinocandin hogyan viselkedik humán szérumban jelenlétében a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmekkel szemben. A továbbiakban pedig olyan innovatív terápiás lehetőségek megfogalmazására törekedtünk, amelyek segítségével a jövőben az echinocandinok aktivitása fokozható lenne, ezáltal a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által okozott biofilm-asszociált infekciók hatékonyabb kezelése válna lehetővé.

Kísérleteink során az alábbiakat tűztük ki célul:

- A planktonikus és a szesszilis *C. albicans*, illetve *C. parapsilosis* sejtek CAS-nal és MICA-nal szembeni minimális gátló koncentrációinak meghatározása, 50% humán szérumban jelenlétében.
- A humán szérumban *C. albicans* és *C. parapsilosis* biofilmképződésre kifejtett hatásának vizsgálata
- A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek metabolikus aktivitásának vizsgálata CAS, valamint MICA expozíciót követően, 50% humán szérumban jelenlétében.
- A planktonikus és a szesszilis *C. albicans*, illetve *C. parapsilosis* sejtek CAS, MICA és NIKZ iránti minimális gátló koncentrációinak meghatározása.
- A CAS, a MICA és a NIKZ közötti *in vitro* interakció vizsgálata a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok által képzett biofilmek ellen.
- A CAS, a MICA és a TYR minimális gátló koncentrációinak meghatározása planktonikus, valamint szesszilis *C. parapsilosis* sejtekkel szemben.
- A CAS, a MICA és a TYR kombinációja során fennálló *in vitro* kölcsönhatás vizsgálata, a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok planktonikus és szesszilis sejtjei ellen.

## **Anyagok és módszerek**

### **A vizsgált izolátumok**

Kísérleteink során 15 *C. albicans* [1822, 2009, 456, 10431, 8568, 1544, 10072, 37181, 10763, 25784, 10781, 10431, 19954, 31401, DPL18 (echinocandin rezisztens törzs)], és 17 *C. parapsilosis sensu stricto* (26977, 8190, 19680, 17820, 4133, 6999, 29042, 16895, 18154, 22913, 16879, 16977, 22482, 27001, 10252, 17432, 9613) klinikai izolátumot, illetve három referencia törzset (*C. albicans* SC5314, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258) vizsgáltunk. A tesztelt klinikai izolátumok minden esetben hemokultúrából származtak. Azonosításuk MALDI-TOF [(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight), (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Németország)] tömegspektrométer segítségével történt.

### **A planktonikus sejtek érzékenységének vizsgálata**

A MICA (Sigma, Budapest, Magyarország), a CAS (Sigma, Budapest, Magyarország), a NIKZ (Sigma, Budapest, Magyarország) és a TYR (Sigma, Budapest, Magyarország) iránti minimális gátló koncentráció (MIC) értékek meghatározását standard mikrodilúciós módszerrel végeztük, a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) által elfogadott M27-A3-as protokoll alapján. Tápközegként L- glutaminnal kiegészített, hidrogén-karbonát mentes RPMI-1640-et használtunk (pH=7,0), MOPS [3-(N-morpholino) propánszulfonsav) Sigma] puffer hozzáadásával).

Kísérleteink egy részében 10 *C. albicans* és 10 *C. parapsilosis* klinikai izolátum esetében 50% humán szérum (AB vércsoportú férfi, Sigma, Budapest, Magyarország) jelenlétében, illetve normál RPMI-1640-ben határoztuk meg a törzsek MICA és CAS iránti MIC értékét. A planktonikus sejtek echinocandinokkal szembeni *in vitro* érzékenységének vizsgálatokor mindkét *Candida* species esetében 0,015 és 8 mg/l közötti MICA és CAS koncentrációkat teszteltünk. A NIKZ-vel végzett kísérleteink során 0,06-32 mg/l koncentrációkat alkalmaztunk, míg a *C. parapsilosis* TYR iránti érzékenységének meghatározásakor 3,9- 1000 µM TYR koncentrációkat vizsgáltunk. A vizsgált gyógyszer koncentrációkat RPMI-1640 tápközegben állítottuk össze. MIC értékek meghatározásához 0,5-2,5x10<sup>3</sup>sejt/ml gombaszuszpenziókat készítettünk, melyeket a gyógyszert tartalmazó 96 lyukú plate üregeibe mértünk. A mikrotiter lemezeket 37 °C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk.

MIC értéknek azt a koncentrációt tekintettük, ahol legalább 50%-os turbiditás csökkenés volt megfigyelhető a pozitív kontrollhoz képest. A turbiditást spektrofotométer segítségével, 492

nm hullámhosszon mértük, majd pedig meghatároztuk a turbiditás százalékos változását az alábbi képlet szerint:  $\text{Turbiditás} = 100\% \times (\text{Aüreg} - \text{Aháttér}) / (\text{Agyógyszermentes üreg} - \text{Aháttér})$

A háttér azt az abszorbancia értéket jelenti, melyet a mikrotiter lemez, gombaszuszpenziót nem tartalmazó üregeiben mértünk. A planktonikus sejtek *in vitro* érzékenységének vizsgálatához minőségi kontrollként a CLSI előírásainak megfelelően a *C. parapsilosis* ATCC 22019, és a *C. krusei* ATCC 6258 referencia törzseket használtuk.

### **Biofilm képzés**

Az izolátumokat frissítés céljából, a biofilm képzés előtt két nappal Sabouraud dextróz agarra (SDA) oltottuk. A biofilmképzést megelőző napon törzsenként, pázsitszerű szélesztést végeztünk, szintén SDA-ra. A táptalajok 37 °C-on, 24 órán keresztül történő inkubációját követően, egy steril vattatampon segítségével a pázsitot 25 ml fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk. Ezt a műveletet három mosási lépés követte, melyek mindegyike során, 3000g fordulaton 5 percig centrifugáltuk a gombaszuszpenziókat, majd pedig a felülúszót határozott mozdulattal leöntöttük, és ismét 25 ml fiziológiás sóoldatban vettük fel a gombasejteket. A centrifugálási folyamat végeztével, a gombamennyiségtől függően 5-6 ml fiziológiás sóoldatot adtunk a pellethez. A különböző izolátumokból, RPMI-1640-ben,  $1 \times 10^6$  Colony Forming Unit (CFU)/ml gombaszuszpenziót állítottunk be Bürker kamra segítségével. Ezt követően a plate meghatározott üregeibe 100 µl-t mértünk az adott gombaszuszpenzióból. A negatív kontroll üregek kizárólag 100 µl RPMI-1640-t tartalmaztak. Végül a mikrotiter lemezeket statikusan inkubáltuk 37 °C-on, 24 óráig.

### **A biofilm tömegének meghatározása**

Az előző nap elkészített biofilmek 24 órás inkubációjának végeztével, háromszor mostuk a mikrotiter lemezeket steril fiziológiás sóoldattal. Ezt követően a *Candida* sejtekre 125 µl 0,1%-os kristályibolya oldatot mértünk, majd egy 15 perces inkubáció következett szobahőmérsékleten. Az újabb mosási lépések végeztével, 125 µl 33%-os ecetsavat adtunk a plate üregeihez, melyet ismét egy 15 perces, szobahőmérsékleten történő inkubáció követett. Végül spektrofotométer segítségével (540 nm) meghatároztuk a felülúszó (100 µl) abszorbanciáját. Vak oldatként 100 µl 33%-os ecetsavat alkalmaztunk.

## **A humán szérum hatása a biofilm képződésére, valamint a szesszilis sejtek antifungális szerekkkel szembeni érzékenységének meghatározása 50% humán szérum jelenlétében**

Annak megállapítására, hogy a különböző humán szérum koncentrációknak milyen hatása van a *Candida* sejtek adhéziójára az alábbi protokollt alkalmaztuk: a biofilmek képzése során a standard gombaszuszpenziókat 1%, 5%, 10%, 30% és 50% humán szérummal egészítettük ki, majd a mikrotiter lemezeket különböző ideig inkubáltuk (2, 4, 8, 12 és 24 óra). Ezt követően az adott időponthoz tartozó üregeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal, végül pedig XTT [2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] assay (VWR, Debrecen, Magyarország) segítségével meghatároztuk a letapadt sejtek metabolikus aktivitást. A mosási lépések elvégzése után 100 µl XTT/menadion oldatot (0,5 g/l XTT, kiegészítve 1 µM menadionnal) adtunk a mikrotiter lemez üregeihez, melyeket fénytől védve, 2 órán át, 37 °C-on statikusan inkubáltunk. A biofilmek metabolikus aktivitásának 492 nm-en történő méréséhez 80 µl felülúszót használtunk. A kapott metabolikus aktivitás relatív százalékos értékeiből görbéket készítettünk a GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) alkalmazás segítségével. Minden vizsgált időpontban a humán szérum nélküli, normál RPMI-1640-ben mért aktivitást tekintettük a 100%-nak. A további vizsgálataink során kizárólag 50% humán szérummal egészítettük ki az RPMI-1640 tápfolyadékot, hogy jobban modellezhessük az *in vivo* környezetet.

A szesszilis sejtek antifungális szerekkkel szembeni érzékenységének vizsgálata során az előző nap elkészített biofilmeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal (200 µl), majd RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben is meghatároztuk a MICA és a CAS elleni MIC értéket, a korábban már ismertetett XTT assay segítségével. A *C. albicans* esetében 0,015-32 mg/l antifungális szer koncentrációkat teszteltünk, míg a *C. parapsilosis* biofilmek érzékenységének megállapításához 0,015-512 mg/l echinocandin koncentrációkat alkalmaztunk. MIC értéknek azt a legalacsonyabb antimikotikum koncentrációt vettük alapul, ahol legalább 50%-os metabolikus aktivitás csökkenés volt látható a gyógyszermentes kontrollhoz képest. A MIC érték meghatározását követően részletesen elemeztük a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek echinocandinokkal szembeni aktivitási mintázatát. A „fungál damage assay” (gomba károsodási vizsgálat) megállapításához az alábbi képletet alkalmaztuk: „fungál damage” (%)  $[1\text{-kezelt sejtek abszorbanciája/kontroll sejtek abszorbanciája}] \cdot 100$ .

## **A biofilmek antifungális szerekkel szembeni érzékenysége**

A *C. parapsilosis* biofilmek antifungális szerekkel szembeni érzékenységének meghatározásához 8 és 512 mg/l közötti CAS és MICA koncentrációkat teszteltünk. Az echinocandin érzékeny *C. albicans* törzsek esetében 0,015-1 mg/l echinocandin koncentrációkat, míg az echinocandin rezisztens *C. albicans* izolátum (DPL18) vizsgálatokor 0,25-16 mg/l CAS és MICA koncentrációkat alkalmaztunk. A NIKZ és a TYR iránti érzékenység megállapításához 0,03-8 mg/l illetve 3,9-1000 µM koncentrációkat használtunk. A korábban leírt protokoll alapján létrehozott biofilmeket az inkubációs idő elteltével háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal. Az adott gyógyszer koncentrációk beállítása RPMI-1640-ben történt, melyekből a mikrotiter lemez meghatározott üregeibe 100 µl-t mértünk. A kezelt biofilmeket 24 órán keresztül inkubáltuk, 37 °C-on. Ezt követően a mikrotiter lemezeket ismét háromszor mostuk fiziológiás sóoldattal, majd az adott szerek iránti MIC értékek meghatározása a már korábban említett metabolikus aktivitás mérésén alapuló XTT assay segítségével történt, 492 nm hullámhosszon. A szesszilis sejtek esetében MIC értéknek azt a legkisebb koncentrációt tekintettük, ahol legalább 50%-os metabolikus aktivitás csökkenést tapasztaltunk, a mikrotiter lemez kezeletlen, kontroll üregeihez viszonyítva. A metabolikus aktivitás százalékos változásának kiszámításához, a korábban a planktonikus sejtek turbiditásának meghatározásához használt képletet alkalmaztuk:  $A=100\% \times (A_{\text{üreg}} - A_{\text{hátter}}) / (A_{\text{gyógyszermentes üreg}} - A_{\text{hátter}})$ .

## **Az antifungális szerek, illetve a tyrosol között fennálló *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata**

A planktonikus valamint a szesszilis *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek esetében egyaránt az úgynevezett kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúciós assay-t alkalmaztuk az adott szerek között fennálló *in vitro* kölcsönhatások vizsgálatához. A tesztelt koncentráció tartományok megegyeztek a korábban leírt MIC meghatározásnál használt koncentrációkkal. Az interakció természetének definiálásához a gátló koncentrációhányad indexet alkalmaztuk (Fractional Inhibitory Concentration Index - FICI), melyet az alábbi képlet alapján fejeztünk ki:  $\Sigma FIC = FICA + FICB = MICA \text{ kombinációban} / MICA \text{ önmagában} + MICB \text{ kombinációban} / MICB \text{ önmagában}$ , ahol a MICA és MICB önmagában az A és a B gyógyszer MIC értéke önmagában, míg a MICA és MICB kombinációban a két gyógyszer MIC értéke az izoeffektív kombinációban. Minden izoeffektív kombináció esetén meghatároztuk a FIC értéket, melyek közül a legalacsonyabbat tekintettük FIC indexnek, amit végül a következőképpen interpretáltunk: szinergista interakciónak tekintettük a kölcsönhatást, ha a  $FICI \leq 0,5$  értéket vett

fel, indifferens hatásról  $0,5 < FICI \leq 4$  esetén beszélhetünk, míg antagonizmust akkor tapasztalhatunk, ha  $FICI > 4$ .

### **A *Candida* biofilmek életképességének vizsgálata**

A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek életképességét RPMI-1640-ben, és 50% humán szérummal kiegészített tápfolyadékban vizsgáltuk. A metabolikus aktivitás, illetve a biofilm tömeg eredményeit illetően mindkét *Candida* species hasonló paraméterekkel rendelkezett, így kísérleteink során egy-egy reprezentatív *C. albicans* (1544) és *C. parapsilosis* (26977) klinikai izolátumot teszteltünk. A biofilmeket a korábban ismertetett módon hoztuk létre RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben, 8 lyukú mikrotiter lemezek üregeibe helyezett kerek fedőlemezek felületén (Lab-Tek, Chamber Slide™ System, VWR, Debrecen, Hungary). Aztán egy 24 órás inkubációs periódus következett, 37 °C-on. A *Candida* biofilmek életképességének tanulmányozása mellett az élő-holt sejtek arányát is elemeztük, ahol epifluoreszcens vizsgálatokat végeztünk LIVE/DEAD viability kit (ThermoFisher Scientific, USA) segítségével. A huszonnégy órás biofilmeket steril fiziológiás sóoldattal mostuk, majd az élő sejtek festésére Syto 9-et (3,34 mmol/l dimetil-szulfoxid oldatban), míg a holt sejtek jelölésére propídium jodidot (20 mmol/l dimetil-szulfoxid oldatban) használtunk. Ezt követően a mikrotiter lemezeket fénytől védve inkubáltuk, 37°C-on, 15 percen keresztül. Ennek a festési eljárásnak köszönhetően az élő szesszilis sejtek zöld, míg az elhaltak piros színűnek láthatóak az epifluoreszcens mikroszkóp által készített felvételeken, arányukból pedig az élő/holt sejt megoszlásra következtethetünk. A megfestett szesszilis sejtek elemzéséhez a Zeiss AxioScope A1 mikroszkópot (Jena, Németország), a Zeiss AxioCam ICm1 kamerát (Jena, Németország), valamint a ZEN lite 2012 (Jena, Németország) szoftvert alkalmaztuk.

A CAS, a MICA és a NIKZ kombinációjának vizsgálata során, eredményeink megerősítésének céljából szintén életképesség assay-t végeztünk, ahol egy-egy reprezentatív *C. albicans* (10431) és *C. parapsilosis* (17820) klinikai izolátumot használtunk. A biofilmek létrehozása, a festési eljárások kivitelezése, valamint a mikroszkópban látott eredmények interpretálása az előző bekezdésben leírtak szerint történt. A szesszilis *C. albicans* sejtek kezelésekor az alábbi gyógyszer koncentrációkat használtuk: 8 mg/l NIKZ; 0,25 mg/l CAS; 0,25 mg/l MICA, illetve a két típusú szer kombinációit (8 mg/l NIKZ + 0,25 mg/l CAS/MICA). A *C. parapsilosis* biofilmek esetében pedig 8 mg/l NIKZ, 128 mg/l CAS, 128 mg/l MICA koncentrációkat, továbbá ezek kombinációit (8 mg/ NIKZ + 128 mg/l CAS/MICA) alkalmaztuk. A kezelési stratégiát a „checkerboard” mikrodilúciós assay eredményeinek alapján dolgoztuk ki.

## **Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok**

A *C. parapsilosis* biofilmek esetében az echinocandinok, illetve a TYR hatására bekövetkező esetleges strukturális változásokat pásztázó elektronmikroszkópos (scanning electron microscope - SEM) vizsgálattal kívántuk szemléltetni, ehhez pedig egy reprezentatív törzset használtunk (16977). A biofilmeket 10 mm átmérőjű kör alakú fedőlemezek felszínén hoztuk létre, melyeket egy napig 37 °C-on inkubáltunk. Huszonnégy óra elteltével a mikrotiter lemezeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal, majd az előzetes eredmények alapján a biofilmekhez az alábbi gyógyszer koncentrációkat adtuk: 256 mg/l CAS, 256 mg/l MICA, 1 mM TYR, valamint ezek kombinációi (256 mg/l CAS + 1 mM TYR; 256 mg/l MICA + 1 mM TYR). Ismét egy 24 órás, 37 °C-on történő inkubáció következett, majd ennek végeztével steril fiziológiás sóoldattal újfent háromszor mostuk az immár kezelt biofilmeket. A továbbiakban 2%-os glutáraldehidet használtunk a fixáláshoz, majd a fixált mintákat etanolos hígítási sorban dehidratáltuk. A szárítást exsikkátor segítségével végeztük, ezt követően a SEM vizsgálat előtt a vezetőképesség fokozásának érdekében a kör alakú fedőlemezeket arannyal vontuk be (Hitachi S-4300).

Az anyagok és módszerek című fejezetben bemutatott metodikák során, valamennyi kísérletben három független vizsgálattal teszteltük mindegyik izolátumot, majd az így kapott eredmények medián értékeit tüntettük fel az eredmények című fejezetben.

## **Statisztikai analízis**

Az idő függvényében nyomon követett metabolikus aktivitás változás statisztikai elemzéséhez minden esetben Dunnett-teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízist (One-way ANOVA) alkalmaztunk, ahol szignifikánsnak tekintettük az eredményt, ha  $P < 0,05$ .

A CAS és a MICA által kiváltott metabolikus aktivitás változásokat 50% humán szérumban jelenlétében, valamint hiányában is meghatároztuk, majd pedig páronként statisztikailag összehasonlítottuk őket, ahol a különbségek elemzésére Wilcoxon párosított  $t$  próbát használtunk. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha a  $P < 0,05$ . Az adatokat a GraphPad Prism 6.05 szoftver segítségével elemeztük.

## Eredmények

### **A planktonikus, illetve szesszilis *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* sejtek echinocandinokkal szembeni érzékenységének meghatározása 50% humán szérum jelenlétében**

Az érvényben lévő CLSI határértékek alapján, minden általunk tesztelt *C. albicans* és *C. parapsilosis* klinikai izolátum, illetve a referencia törzsek is érzékenyek bizonyultak a vizsgált antifungális szerek iránt, normál RPMI-1640-ben.

Ötven százalék humán szérum hozzáadását követően, a planktonikus *C. albicans*, illetve a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok és a referencia törzsek CAS iránti medián MIC értékei 4-8-szoros, míg a MICA-nal szemben mért medián MIC értékek 4-64-szeres emelkedést mutattak, a normál RPMI-1640-ben kapott eredményekhez viszonyítva.

A szesszilis *C. albicans* sejtek antifungális szerek iránti érzékenységének meghatározásakor, az alábbi medián MIC értékeket tapasztaltuk a szérummentes tápközegben: 0,25 mg/l (CAS); 0,03 mg/l (MICA). Az SC5314 referencia törzsnél 0,125 mg/l (CAS) és 0,015 mg/l (MICA) medián MIC értékeket állapítottunk meg. Ezzel ellentétben a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok biofilmjei esetében magasabb CAS és MICA iránti medián MIC értékeket kaptunk (CAS: 384 mg/l; MICA: 256 mg/l). Az ATCC 22019 referencia törzs medián MIC értékei a következőképpen alakultak: 1 mg/l (CAS) és 2 mg/l (MICA).

Ötven százalék humán szérum expozíció hatására mindkét echinocandinallal szemben minimálisan emelkedett MIC értékeket észleltünk a *C. albicans* klinikai izolátumok (CAS: 0,5 mg/l, MICA: 2 mg/l), valamint az SC5314 referencia törzs (CAS: 0,25 mg/l, MICA: 4 mg/l) szesszilis populációi esetében. Meglepő módon a *C. parapsilosis* biofilmek és az ATCC 22019 referencia törzs echinocandin iránti medián MIC értékei 0,015 mg/l-re csökkentek 50% humán szérum jelenlétében.

### **A humán szérum hatása a biofilm képződésére**

A különböző humán szérum koncentrációk (1%, 5%, 10%, 30% és 50%) biofilm képződésre kifejtett hatásának vizsgálatakor, az 1% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközeg nem befolyásolta szignifikánsan a szesszilis *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek metabolikus aktivitását. Az 5% és 50% közötti humán szérum koncentrációk mindkét vizsgált *Candida* fajnál dóziszfüggő hatást gyakoroltak a biofilmek metabolikus aktivitására. A *C. albicans*

esetében szignifikáns különbséget csak 8 ( $P < 0,05-0,001$ ), illetve 12 óránál ( $P < 0,01-0,001$ ) figyeltünk meg 5% és 30%, valamint 5% és 10% közötti humán szérum koncentrációkon a kontroll sejtekhez viszonyítva. Egy napos inkubációt követően a *C. albicans* biofilmek metabolikus aktivitása 5% és 50% közötti humán szérum koncentráció mellett nem különbözött jelentősen az RPMI-1640-ben végzett kísérletek eredményeivel összehasonlítva ( $P > 0,05$ ). Ezzel szemben a szeszilis *C. parapsilosis* sejtek metabolikus aktivitását szignifikánsan gátolta az 5%-50% humán szérum koncentráció 2 és 24 óra között a szérummentes tápközegben mért értékekhez képest ( $P < 0,05 - 0,001$ ).

### **A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* biofilmek érzékenységi mintázata 50% humán szérum jelenlétében**

A *C. albicans* biofilmek vizsgálata során, a 0,015 mg/l és az 1 mg/l közötti CAS koncentrációk esetében szignifikánsan magasabb metabolikus aktivitás csökkenést figyeltünk meg normál RPMI-1640-ben, mint az 50% humán szérummal kiegészített tápközegben ( $P < 0,05$ ). Szérummentes RPMI-1640-ben 0,06 mg/l CAS koncentrációtól tapasztaltunk legalább 50%-os gombakárosodást, amely 50% humán szérum jelenlétében 1 mg/l CAS koncentrációtól kezdődően volt látható. Az általunk tesztelt teljes MICA koncentráció tartományban nagyfokú metabolikus aktivitás csökkenést észleltünk a szérummentes környezetben. Ötven százalék humán szérummal kiegészített tápközegben 2 mg/l MICA koncentrációtól kezdődően figyeltünk meg legalább 50%-os metabolikus aktivitás csökkenést, tehát az echinocandin hatékonysága ebben az esetben is csökkent a szérum expozíciót követően. Azonban a szérummal kezelt, valamint a normál RPMI-1640-ben vizsgált szeszilis sejtek metabolikus aktivitása között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget 1 mg/l MICA koncentráció felett ( $P > 0,05$ ).

A tesztelt echinocandinok figyelemre méltó aktivitást mutattak a *C. parapsilosis* biofilmek ellen 50% humán szérum jelenlétében. Az RPMI-1640-ben megfigyelt eredményekhez képest, jelentős metabolikus aktivitás csökkenés volt látható 0,015 mg/l echinocandin koncentrációtól kezdődően a szérummal kiegészített tápközegben ( $P < 0,01-0,05$ ).

## **A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* biofilmek struktúrájának és életképességének vizsgálata 50% humán szérumban jelenlétében**

A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek struktúráját, valamint a szesszilis populációt alkotó élő és holt sejtek arányát epifluoreszcens mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk a szérumban, valamint az 50% humán szérumban kiegészített tápközegben. Huszonnégy órás inkubációt követően, sem a *C. albicans* (1544) sem pedig a *C. parapsilosis* (26977) biofilmek nem mutattak a várttól eltérő szerkezeti felépítést normál RPMI-1640-ben. Az életképesség vizsgálat során az élő sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a holt sejteké. Az 50%-os humán szérumban expozíció a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmekben is jelentős szerkezeti változásokat okozott. A szérumban kezelt *C. albicans* biofilmekben a sejtek jóval elszórtabban helyezkedtek el, és kizárólag élesztő forma volt jelen. Ennek ellenére az élő sejtek aránya továbbra is szignifikánsan magasabb arányt mutatott (96,83% vs. 3,17%). Ötven százalékos humán szérumban hatására a *C. parapsilosis* biofilmek struktúrája rendezetlenné vált, a holt sejtek arányában pedig jelentős emelkedést tapasztaltunk, a normál RPMI-1640-ben meghatározott értékekhez képest.

## **A caspofungin, a micafungin és a nikkomycin Z aktivitásának vizsgálata planktonikus *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* sejtek ellen**

A CLSI által meghatározott érzékenységi breakpointok alapján, a vizsgálataink során használt hat *C. albicans* klinikai izolátumból öt bizonyult érzékenynek (10431, 19954, 31401, 10781, 1544) a tesztelt echinocandinok iránt, ahol a MIC értékek a következőképpen alakultak: CAS: 0,015-0,03 mg/l; MICA: 0,015-0,06 mg/l. Várakozásunknak megfelelően, a DPL18 törzs az F641S mutációnak köszönhetően a CAS-nal és a MICA-nal szemben egyaránt rezisztenciát mutatott (MIC: 2 mg/l). A NIKZ esetében a planktonikus *C. albicans* MIC értékek 4 mg/l, illetve 8 mg/l között változtak.

A planktonikus *C. parapsilosis* sejtek vizsgálatakor, ötből négy klinikai izolátum (17820, 9613, 10252, 27001) érzékeny, míg a 17432 törzs mérsékelten érzékeny (MIC: 4 mg/l) volt az alkalmazott echinocandinokkal szemben. A planktonikus *C. parapsilosis* sejtekre 8 mg/l NIKZ koncentrációtól tapasztaltunk jelentős gátló hatást.

### **A *Candida albicans* biofilmek echinocandinokkal és nikkomycin Z-vel szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata**

Az echinocandin érzékeny *C. albicans* klinikai izolátumok esetében, a NIKZ-vel történő kombináció a CAS és a MICA iránti medián MIC értékek 2-16-szoros, illetve 16-128-szoros csökkenését eredményezte. A kombinációkban mért NIKZ iránti medián MIC értékek is jelentős visszaesést (8-512-szeres) mutattak az önmagában mért NIKZ iránti MIC értékekhez viszonyítva. A DPL18 törzs CAS és MICA iránti medián MIC értékeiben a NIKZ 64- szeres (CAS) és 4-szeres (MICA) csökkenést okozott.

A *C. albicans* klinikai izolátumok többségénél (10431, 10781, 1544, DPL18) szinergizmus látható a két tesztelt echinocandin és a NIKZ kombinációja során. Érdeemes kiemelni, hogy a 19954 és a 31401 törzsek vizsgálatakor a MICA és a NIKZ kombinációja szinergista interakciót eredményezett, míg a CAS esetén indifferens kölcsönhatást detektáltunk. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy ezen klinikai izolátumok szesszilis sejtjei eleve alacsonyabb medián MIC értékeket mutattak az echinocandinok iránt, mint a további vizsgált törzsek.

### **A *Candida parapsilosis* biofilmek echinocandinokkal és nikkomycin Z-vel szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata**

Eredményeink alapján, a NIKZ expozíció hatására, a CAS és MICA iránti medián MIC értékek 2-4-szeres, illetve 2-64-szeres csökkenést mutattak, az önmagában mért echinocandin iránti medián MIC értékekhez viszonyítva. A kombinációkban mért NIKZ iránti medián MIC értékek esetében 2-512-szeres csökkenést észleltük, az önmagában mért NIKZ iránti medián MIC értékekhez képest.

A vizsgált antifungális szerek között fennálló *in vitro* kölcsönhatások tekintetében elmondható, hogy a CAS NIKZ-vel történő kombinációja indifferens interakciót (FICI: 0,502-1) eredményezett mind az öt tesztelt *C. parapsilosis* biofilm esetében. Azonban megjegyzendő, hogy az öt izolátumból háromnál, a medián FICI a szinergista küszöbértékhez igen közeli volt (FICI: 0,502-0,508). Ezzel ellentétben, a MICA és NIKZ expozíció hatására, az ötből négy *C. parapsilosis* törzs markáns szinergizmust mutatott a FICI alapján (FICI:0,017-0,5).

### **A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* biofilmek életképességének vizsgálata**

A LIVE/DEAD életképesség assay segítségével egy-egy reprezentatív *C. albicans* (10431) és *C. parapsilosis* (17820) klinikai izolátumot vizsgáltunk, melyeknél az echinocandin és a NIKZ-expozíciót követően meghatároztuk az élő-holt sejt arányt. A kezeletlen kontroll *Candida* biofilmek esetében a várt szesszilis struktúrát tapasztaltuk, itt detektáltuk a legnagyobb élő sejt arányt. A legmagasabb mértékű sejtpusztulást mindkét *Candida* species az echinocandinok és a NIKZ egyidejű alkalmazása során mutatta, összehasonlítva a kizárólag NIKZ és echinocandin kezelésben részesülő *Candida* biofilmek életképesség vizsgálatának eredményeivel.

### **A planktonikus *Candida parapsilosis* sejtek echinocandinokkal és tyrosollal szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a tyrosol közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata**

A CLSI által meghatározott érzékenységi határértékek alapján, a kísérletekben vizsgált öt *C. parapsilosis* klinikai izolátum közül három (27001, 22482, 16879), valamint a referencia törzs (ATCC 22019) érzékenynek bizonyult a CAS-nal és a MICA-nal szemben. A további két *C. parapsilosis* klinikai izolátum CAS és MICA iránti mérsékelt érzékenységét tapasztaltuk. A tesztelt TYR koncentrációk nem gyakoroltak gátló hatást a planktonikus sejtekre, az echinocandinok és a QS molekula közötti interakciók meghatározásakor pedig kizárólag indifferens kölcsönhatást észleltünk.

### **A *Candida parapsilosis* biofilmek echinocandinokkal és tyrosollal szembeni érzékenységének meghatározása, illetve az echinocandinok és a tyrosol közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata**

A *C. parapsilosis* klinikai izolátumok esetében, jelentősen magasabb (128 -  $\geq$ 512 mg/l) CAS és MICA iránti MIC értékeket tapasztaltunk, a planktonikus sejteknél megfigyelt eredményekhez képest (2-4 mg/l). A TYR-lal történő kombinációt követően, 2-16-szoros CAS, illetve 2-32-szeres MICA iránti medián MIC érték csökkenést láthatunk az önmagukban mért echinocandin iránti medián MIC értékekhez viszonyítva. Az echinocandinok és a TYR kombinációjakor, a TYR iránti MIC értékek 2-8-szoros csökkenését észleltük.

A kölcsönhatások természetét illetően, a CAS és a TYR kombinációja során csupán két *C. parapsilosis* klinikai izolátum (27001, 17820) mutatott szinergista kölcsönhatást (FICI:0,312; FICI:0,298), míg a MICA és a TYR expozíciójának hatására kizárólag a 27001 számú törzs esetében tapasztaltunk szinergizmust (FICI:0,193).

## **Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok**

Kísérleteink során, a SEM vizsgálatokhoz egy reprezentatív *C. parapsilosis* klinikai izolátumot (16977) használtunk. A kezeletlen kontroll biofilm elektronmikroszkópos képén normál morfológiájú élesztő sejtek, valamint pszeudohifák láthatóak. Az 1 mM-os TYR expozíció hatására a szesszilis populáció nagyobb sejtsűrűséget mutatott, mint a kontroll biofilm. Az echinocandin (256 mg/l) kezelés eredményeképpen megnagyobbodott, kerek blasztospórákat figyeltünk meg ráncos felülettel, ám a sejtek egy részében nem történt morfológiai változás. Ugyanakkor a 256 mg/l MICA/CAS + 1 mM TYR kombinációja szignifikánsan magasabb mértékű sejtkárosodást okozott. (amit a kvantitatív csíraszám meghatározás is megerősített). Érdeemes még megjegyezni, hogy a kizárólag echinocandin expozícióban részesülő (256 mg/l CAS/MICA) biofilm struktúrával ellentétben, jelentős számú rendellenes szerkezetű gomba sejtet detektáltunk a szesszilis populációban.

## Megbeszélés

Az epidemiológiai adatok alapján évente több, mint kétmillió véráramfertőzést regisztrálnak Európában, amelyek mortalitási aránya 13% és 20% között mozog.

A *Candida* speciesek évente mintegy 400.000 véráramfertőzés kialakulásáért felelősek, ahol a halálozási arány fajtól függően a felnőtteknél meghaladja a 40-50%-ot, míg gyerekek esetén elérheti akár a 30%-ot is. A candidémia incidenciája és prevalenciája elsősorban az immunszuppresszált betegek, valamint az intenzív terápia ellátásra szoruló páciensek körében emelkedett meg az utóbbi időben.

A leggyakrabban azonosított *Candida* species továbbra is a *C. albicans*, ám az általa okozott invazív infekciók aránya az elmúlt 20 évben 57,4%-ról 46,4%-ra csökkent. Azonban ezzel párhuzamosan az utóbbi évtizedekben a non-*albicans* fajok (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) által kiváltott invazív megbetegedések előfordulása fokozatosan növekvő tendenciát mutat, amely többek között a nem megfelelő antifungális dozírozási stratégiának köszönhető.

A candidémia magas mortalitási arányához nagymértékben hozzájárul a különböző *Candida* fajok biofilmképző hajlama. Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy magasabb halálozási arány (51,2%) társul a biofilmképző törzsek általi véráramfertőzésekhez, mint a biofilmet nem képző *Candida* izolátumok által okozott invazív infekciókhoz (31,7%).

A különböző *Candida* speciesek a katéter-asszociált infekciók megközelítőleg 8%-áért felelősek. A *C. albicans* mellett, a *C. parapsilosis* a második legjelentősebb biofilmképző faj, többek között ez az oka annak, hogy a *C. parapsilosis* kiemelkedő szerepet játszik a katéterek és az egyéb beültethető orvosi eszközök kolonizációjában.

Az IDSA (Infectious Diseases Society of America) jelenlegi ajánlása alapján, az invazív candidiasis kezelése során az echinocandinok tekinthetőek az első vonalbeli antifungális szereknek. Korábbi *in vitro* és *in vivo* kutatások igazolták, hogy az echinocandinok és a különböző AMB készítmények (AMB lipid komplex, liposzomális AMB) képesek terápiás koncentrációt elérni a *Candida* biofilmek mátrixában, bár ez a hatékonyság a különböző *Candida* fajok által képzett biofilmek esetében jelentősen különbözhet.

A fentebb leírt okok miatt a különböző antifungális szerek biofilm ellenes aktivitásának a vizsgálata központi fontossággal bír, hogy terápiás szempontból sikeres dozírozási stratégiát lehessen megfogalmazni a biofilm eredetű fertőzések kezelésére. A biofilmek antifungális szerek iránti érzékenységének meghatározásához leggyakrabban az RPMI-1640 tápfolyadékot használják, amely ugyan jól modellezi az emberi szérum glükóz- és aminosav koncentrációját,

de teljesen figyelmen kívül hagyja a szérumfehérjék hatását. Bár a planktonikus *Candida* sejtek antimikotikumok iránti érzékenységének vizsgálata során, az *in vivo* környezet modellezése érdekében korábban már többször is alkalmazták az 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközeget, jelenlegi ismereteink szerint nem áll rendelkezésünkre olyan szakirodalmi adat, amely az antifungális szerek *Candida* biofilmekkel szembeni hatékonyságát tesztelné humán szérum jelenlétében.

Kísérleteink során a *C. albicans* biofilmek ellen mindkét vizsgált echinocandin (CAS, MICA) a vártak megfelelően figyelemre méltó aktivitást mutatott RPMI-1640-ben. A *C. parapsilosis* biofilmek alacsonyabb érzékenységét tapasztaltuk a klinikailag releváns echinocandin koncentrációk mellett (a szérum csúcskoncentráció 50 mg CAS esetében 7,64 mg/l, míg 100 mg MICA esetében 8,8 mg/l). Továbbá az 50% humán szérummal kezelt *Candida* biofilmek epifluoreszcens felvételein alacsonyabb sejtsűrűséget, valamint a *C. parapsilosis* esetében jelentős mértékű holt sejt arányt detektáltunk, a szérummentes közegben tenyésztett biofilmeknél megfigyelt struktúrához képest. A tesztelt echinocandinok aktivitásában figyelemre méltó változást tapasztaltunk 50% humán szérum jelenlétében. A szeszilis *C. albicans* sejtek szignifikánsan csökkent érzékenységet mutattak az alacsony echinocandin koncentráció tartományban (0,015- 1 mg/l). A *C. parapsilosis* biofilmek esetében a CAS és a MICA fokozott aktivitását észleltük 50% humán szérummal kiegészített tápközegben.

Az invazív gombafertőzések magas mortalitási arányának visszaszorításához, valamint az alkalmazott antifungális szerekkel szembeni tolerancia/rezisztencia terjedésének megfékezéséhez égető szükség lenne az eddigiektől eltérő gomba ellenes és biofilm ellenes kezelési módok kidolgozására. A legígéretesebb lehetőségek között kell említeni az elérhető antifungális szerek lehető legmagasabb dózisban történő alkalmazását, az antifungális „lock” terápiát (az intraluminális biofilm kezelésére magas dózisu antimikotikumokat használnak a lezárt katéterben), illetve a kombináció alapú terápiákat.

Korábbi kutatási eredmények már beszámoltak a NIKZ és a tradicionális antifungális szerek kombinációja során tapasztalt *in vitro* szinergista kölcsönhatásról *Candida* fajok ellen, azonban ezek a vizsgálatok kizárólag a planktonikus sejtekre fókuszáltak. Eredményeink alapján, a tesztelt echinocandinok (CAS, MICA) és a NIKZ kombinációja szinergista kölcsönhatást mutatott, a *C. albicans*, valamint a *C. parapsilosis* biofilmek ellen. Az epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során a legnagyobb holt sejt arányt az echinocandin és a NIKZ expozíció esetében detektáltuk, a kontroll biofilmhez viszonyítva.

Egy kifejezetten újszerű és innovatív terápiás megközelítés lehet a mikroorganizmusok QS rendszerébe történő beavatkozás. Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy a gombák által szekretált QS molekulák szuprafiziológiás koncentrációban történő alkalmazása negatívan befolyásolhatja a biofilmben jelenlévő sejtek közötti „kommunikációt”, ami a szesszilis sejtek csökkent szaporodását és növekedését vonja maga után. Közelmúltbeli tanulmányokban már beszámoltak a FAR és a tradicionális antifungális szerek (AMB, fluconazole, echinocandinok) kombinációja esetén tapasztalt *in vitro* szinergista kölcsönhatásokról, a különböző *Candida* speciemű planktonikus és szesszilis sejtjei ellen. Az echinocandinok és a TYR kombinációjakor fennálló esetleges interakciókról azonban ezidáig nem rendelkezünk túl sok információval, ráadásul a *C. parapsilosis*-ra fókuszáló kombinációs vizsgálatok száma is erősen korlátozott. Kísérleteinkben a TYR nem akadályozta meg a planktonikus *C. parapsilosis* sejtek szaporodását. Az echinocandinok (CAS, MICA) és a TYR kombinációjának vizsgálata során nem észleltünk szinergista kölcsönhatást a planktonikus *C. parapsilosis* sejtekkel szemben. A *C. parapsilosis* biofilmek vizsgálata során, a FICI alapján a CAS esetében hatból két törzs (FICI 0,298–0,312), míg a MICA esetében a hatból egy izolátum mutatott (FICI: 0,193) szinergista kölcsönhatást a TYR-lal történő egyidejű expozíció hatására. A SEM segítségével végzett vizsgálataink során az echinocandinok (256 mg/l) és a TYR (1 mM) kombinációja okozta a legnagyobb mértékű sejtkárosodást, amelyet kvantitatív csíraszám meghatározással is sikerült megerősítenünk.

Eredményeink alapján, a NIKZ és a TYR egyaránt potenciális adjuváns lehet a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által okozott katéter-asszociált infekciók alternatív terápiája során (pl. antifungális „lock” terápia). Eredményeink megerősítéséhez a jövőben nélkülözhetetlenek az *in vivo* katéter-modell vizsgálatok, melyek alátámaszthatják *in vitro* kísérleteinket.

## Összefoglalás

Kísérleteink egy részében a caspofungin és a micafungin biofilm ellenes aktivitását vizsgáltuk 50% humán szérummal kiegészített tápközegben, *Candida albicans* és *C. parapsilosis* biofilmekkel szemben. A *C. albicans* biofilmek esetében az 50%-os humán szérum expozíció hatására csökkent echinocandin aktivitást figyeltünk meg 0,015-1 mg/l közötti koncentráció tartományban ( $P < 0,05$ ). Ezzel ellentétben az echinocandinok fokozott *C. parapsilosis* biofilm elleni hatékonyságot mutattak szérum jelenlétében már a legalacsonyabb tesztelt gyógyszer koncentrációtól kezdődően (0,015 mg/l). További kísérleteink során a kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúció segítségével a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek caspofungin, micafungin, nikkomycin Z, valamint tyrosol elleni érzékenységét vizsgáltuk önmagukban, illetve kombinációkban. Az *in vitro* kölcsönhatások megállapítására a gátló koncentrációhányad indexet alkalmaztuk (FICI). A nikkomycin Z expozíció hatására a caspofungin és a micafungin iránti medián minimális gátló koncentráció (MIC) értékek 2-16-szoros, illetve 2-128-szoros csökkenést mutattak az önmagában mért medián MIC értékekhez viszonyítva. Az echinocandinok és a tyrosol kombinációja során a *C. parapsilosis* biofilmek caspofungin és micafungin iránti medián MIC értékei 128-512 mg/l és 512->512 mg/l között változtak. A tyrosollal történő egyidejű alkalmazást követően ezek a medián MIC értékek 8-128 mg/l-re és 32-512 mg/l-re csökkentek. A caspofungin és a nikkomycin Z kombinációja minden *C. parapsilosis* klinikai izolátum esetében indifferens interakciót (FICI: 0,502-1), míg a micafungin és a nikkomycin Z expozíció a legtöbb törzsnél szinergizmust (FICI: 0,017-0,5) eredményezett. A *C. albicans* biofilmek vizsgálatakor az echinocandinok és a nikkomycin Z egyidejű alkalmazása során többnyire szinergista kölcsönhatást tapasztaltunk (FICI: 0,037-0,245). Az echinocandin és a tyrosol expozíció hatására törzsfüggő módon észleltünk szinergizmust (FICI: 0,193-0,312), amelyeket pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is megerősítettünk.

Eredményeinket összefoglalva a humán szérum jelenlétében végzett biofilm érzékenységi vizsgálatok jobban modellezik az *in vivo* környezetet, ezért alkalmazásuk abszolút indokolt lehet a farmakodinámiai vizsgálatokban. A kombináció alapú kísérleteink alapján, a jövőben a nikkomycin Z és a tyrosol egy potenciális adjuváns lehet a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által kiváltott biofilm-asszociált fertőzések alternatív terápiája során, azonban ennek megerősítéséhez további *in vivo* vizsgálatokra van szükség.



Nyilvántartási szám: DEENK/357/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

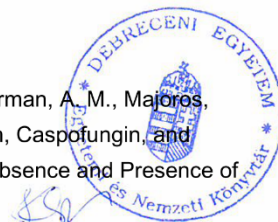
Jelölt: Nagy Fruzsina  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10063834

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, F.**, Tóth, Z., Bozó, A., Czeglédi, A., Rebenku, I., Majoros, L., Kovács, R. L.: Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.  
*Med. Mycol.* 57 (5), 573-581, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy108>  
IF: 2.822
2. Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Bozó, A., Balázs, B., Majoros, L.: Synergistic effect of nikkomycin Z with caspofungin and micafungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.  
*Lett. Appl. Microbiol.* 69 (4), 271-278, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13204>  
IF: 2.173
3. Kovács, R. L., Tóth, Z., **Nagy, F.**, Daróczy, L., Bozó, A., Majoros, L.: Activity of exogenous tyrosol in combination with caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* sessile cells.  
*J. Appl. Microbiol.* 122 (6), 1529-1536, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13452>  
IF: 2.16

### További közlemények

4. Kovács, R. L., Tóth, Z., Locke, J. B., Forgács, L., Kardos, G., **Nagy, F.**, Borman, A. M., Majoros, L.: Comparison of In Vitro Killing Activity of Rezafungin, Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against Four *Candida auris* Clades in RPMI-1640 in the Absence and Presence of Human Serum.  
*Microorganisms.* 9 (4), 1-12, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9040863>  
IF: 4.152 (2019)





5. **Nagy, F.**, Tóth, Z., Nyikos, F., Forgács, L., Jakab, Á., Borman, A. M., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro and in vivo interaction of caspofungin with isavuconazole against *Candida auris* planktonic cells and biofilms.  
*Med. Mycol. [Epub ahead of print]*, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myab032>  
IF: 2.822 (2019)
6. Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Forgács, L., Tóth, L., Váradi, G., Tóth, G. K., Vadászi, K., Borman, A. M., Majoros, L., Galgóczy, L.: The Neosartorya fischeri Antifungal Protein 2 (NFAP2): a New Potential Weapon against Multidrug-Resistant *Candida auris* Biofilms.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (2), 1-14, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020771>  
IF: 4.556 (2019)
7. Balázs, B., Tóth, Z., **Nagy, F.**, Kovács, R. L., Tóth, H., Nagy József, B., Tóth, Á., Szarka, K., Majoros, L., Kardos, G.: The Role of Uniform Meropenem Usage in *Acinetobacter baumannii* Clone Replacement.  
*Antibiotics.* 10 (2), 1-12, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10020127>  
IF: 3.893 (2019)
8. Vitális, E., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Forgács, L., Bozó, A., Kardos, G., Majoros, L., Kovács, R. L.: *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia.  
*Mycoses.* 63 (4), 352-360, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/myc.13049>  
IF: 3.575 (2019)
9. Nemes, D., Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Herczegh, P., Borbás, A., Kelemen, V., Pfliegler, V. P., Rebenku, I., Hajdu, P., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivatives.  
*Eur. J. Pharm. Sci.* 143, 1-9, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105162>  
IF: 3.616 (2019)
10. Forgács, L., Borman, A. M., Prépost, E., Tóth, Z., Kardos, G., Kovács, R. L., Székely, A., **Nagy, F.**, Kovács, I., Majoros, L.: Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model.  
*Emerg. Microbes Infect.* 9 (1), 1160-1169, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1771218>  
IF: 5.776 (2019)
11. **Nagy, F.**, Vitális, E., Jakab, Á., Borman, A. M., Forgács, L., Tóth, Z., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro and in vivo effect of exogenous farnesol exposure against *Candida auris*.  
*Front. Microbiol.* 11, 1-12, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00957>  
IF: 4.235 (2019)





12. Tóth, Z., Forgács, L., Kardos, T., Kovács, R. L., Locke, J. B., Kardos, G., **Nagy, F.**, Borman, A. M., Adnan, A., Majoros, L.: Relative Frequency of Paradoxical Growth and Trailing Effect with Caspofungin, Micafungin, Anidulafungin, and the Novel Echinocandin Rezafungin against *Candida* Species.  
*J. Fungi.* 6 (3), 1-9, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof6030136>  
IF: 4.621 (2019)
13. Prépost, E., Tóth, Z., Perlin, D., Gesztelyi, R., Kardos, G., Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Forgács, L., Majoros, L.: Efficacy of humanized single large doses of caspofungin on the lethality and fungal tissue burden in a deeply neutropenic murine model against *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.  
*Infect Drug Resist.* 12, 1805-1814, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S198764>  
IF: 2.984
14. **Nagy, F.**, Tóth, Z., Daróczy, L., Székely, A., Borman, A. M., Majoros, L., Kovács, R. L.: Farnesol increases the activity of echinocandins against *Candida auris* biofilms.  
*Med. Mycol.* 2019, 1-4, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myz057>  
IF: 2.822
15. Tóth, Z., Forgács, L., Locke, J. B., Kardos, G., **Nagy, F.**, Kovács, R. L., Székely, A., Borman, A. M., Majoros, L.: In vitro activity of rezafungin against common and rare *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*.  
*J. Antimicrob. Chemother.* 74 (12), 3505-3510, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz390>  
IF: 5.439
16. Jakab, Á., Tóth, Z., **Nagy, F.**, Nemes, D., Bácskay, I., Kardos, G., Emri, T., Pócsi, I., Majoros, L., Kovács, R. L.: Physiological and transcriptional response of *Candida parapsilosis* to exogenous tyrosol.  
*Appl. Environ. Microbiol.* 85 (20), e01388-e01419, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01388-19>  
IF: 4.016
17. Tóth, Z., Kardos, T., Kovács, R. L., Kardos, G., **Nagy, F.**, Prépost, E., Barta, Z., Takács, I., Majoros, L.: Comparison of Killing Activity of Micafungin Against Six *Candida* Species Isolated from Peritoneal and Pleural Cavities in RPMI-1640, 10 and 30% Serum.  
*Mycopathologia.* 183 (6), 905-912, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-018-0302-5>  
IF: 2.278





18. Nemes, D., Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Mező, M., Poczok, N., Ujhelyi, Z., Pető, Á., Fehér, P., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Interaction between Different Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms: assessment of Cytotoxicity and Antimicrobial Activity.  
*Molecules*. 23 (7), 1-19, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071827>  
IF: 3.06
19. **Nagy, F.**, Bozó, A., Tóth, Z., Daróczy, L., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro antifungal susceptibility patterns of planktonic and sessile *Candida kefyr* clinical isolates.  
*Med. Mycol.* 56 (4), 493-500, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx062>  
IF: 2.851
20. Kardos, T., Kovács, R. L., Kardos, G., Varga, I., Bozó, A., Tóth, Z., **Nagy, F.**, Majoros, L.: Poor in vivo efficacy of caspofungin, micafungin and amphotericin B against wild-type *Candida krusei* clinical isolates does not correlate with in vitro susceptibility results.  
*J. Chemother.* 30 (4), 233-239, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/1120009X.2018.1487150>  
IF: 1.599
21. Kovács, R. L., Bozó, A., Gesztelyi, R., Domán, M., Kardos, G., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Majoros, L.: Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms.  
*Int. J. Antimicrob. Agents*. 47 (4), 304-310, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.007>  
IF: 4.307

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 73,757**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7,155**

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, 2021.06.09.

