

# Doktori (PhD) értekezés tézisei

## ***A Candida* biofilmek klinikai jelentősége és alternatív terápiás megközelítésük**

Dr. Vitális Eszter

Témavezető: Dr. Kovács Renátó



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

## **A *Candida* biofilmek klinikai jelentősége és alternatív terápiás megközelítésük**

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

Írta: Dr. Vitális Eszter, általános orvos

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

Témavezető: Dr. Kovács Renátó, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Varga István, PhD

Dr. Domán Marianna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok: Dr. Varga István, PhD

Dr. Domán Marianna, PhD

Dr. Fehér Enikő, PhD

Dr. Váradi Judit, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: 2022. április 12. (online)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni a védésen, úgy jelezze a [kovacs.renato@med.unideb.hu](mailto:kovacs.renato@med.unideb.hu) e-mail címre küldött üzenettel a vitát megelőző nap (2022. április 11.) 16.00-ig.

## 1. Bevezetés

Becslések szerint világszerte 2,2-3,8 millió gombafaj létezik, melyek közül körülbelül 300 képes emberi megbetegedést okozni. A *Candida* fajok az emberi gombafertőzések leggyakoribb kórokozói közé tartoznak. Évente körülbelül 400 000 *Candida* okozta véráramfertőzés fordul elő világszerte, amelyek halálozási aránya meghaladja a 40%-ot. Az Amerikai Egyesült Államokban a *Candida* okozta véráramfertőzések éves előfordulási aránya 9,5-14,4/100 000 között mozog. Európában ez az érték országtól függően általában 1,4 és 5,7/100 000 közötti.

Az elmúlt két évtizedben a rezisztens gombafertőzések előfordulása folyamatosan nő a sokszor kontrolálatlan mezőgazdasági, állat- és humángyógyászati antifungális szer felhasználás miatt. Ráadásul a globális felmelegedés és az antropogén hatások következtében kevésbé ismert, potenciálisan multirezisztens gombafajok jelentek meg a klinikai gyakorlatban, mint például a *Candida auris*, az azolrezisztens *Aspergillus* fajok vagy a *Lomentosporaprolificans*. Ezek az újonnan megjelenő kórokozók további kihívások elé állítják az orvostudományt.

Számos gombafaj képes a környezeti hatásoktól függően különböző morfológiai változásokra, mint például élesztőből hifa átalakulásra, ami sokszor biofilm képzéssel is párosulhat. A gombabiofilmek kulcsszerepet játszanak az adott faj virulenciájában, valamint a gombaellenes szerek ellen mutatott rezisztenciában. Sajnos jelenleg kevés olyan szer áll rendelkezésre, amelyek potens biofilm ellenes aktivitással rendelkeznek, ezért egyre inkább új típusú terápiákban, illetve alternatív antifungális megközelítésekben látják a gyakorló klinikusok a megoldást. A legígéretesebb gombaellenes szerek már a fejlesztés 3. fázisában járnak. Ezek közül kiemelendő az ibrexafungin, a rezafungin, a magas biohasznosulással rendelkező új típusú itraconazol, valamint a VT-1161-es kódszámon elérhető új típusú azol molekula. A közelmúltban vizsgált alternatív terápiai megközelítések közé tartozik a rendelkezésre álló gombaellenes szerekkel végzett nagy dózisú terápia, antifungális lock terápia és a kombináció alapú terápiák. Az *in vitro* és *in vivo* adatok alapján az echinocandinok és az amphotericin B a legígéretesebb kombináció-alapú terápiai stratégiák alapszerei, azonban további innovatív kezelési megközelítések lehetnek a quorum-sensing-et megzavaró terápiák. A quorum-sensing molekulák szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazva megzavarják a biofilmen belüli sejt-sejt kommunikációt, ami a biofilmek szilárd struktúrájának megbomlásához vezethet. Reményeink szerint ezek az új, innovatív kombinációs terápiák hatékonyak lehetnek az újonnan megjelenő, csökkent érzékenységet mutató *Candida* fajokkal szemben, mint

például a *C. auris*. A vizsgálataink eredményei jelentősen hozzájárulhatnak olyan új, alternatív terápiás stratégiák bevezetéséhez, amelyek segítségével hatékonyabban vehetjük fel a küzdelmet a jövő és a jelen multirezisztens gomba kórokozói ellen, különösen, ha a biofilm okozta védelmi vonalat is át kell törni.

## 2. Célkitűzések

Vizsgálatainkban kíváncsiak voltunk, hogy a Debreceni Egyetem Klinikai Központban a hemokultúrákból izolált *Candida* fajok esetében milyen biofilmtermelési jellemzőket találunk biofilm tömeg és metabolikus aktivitás szempontjából. Továbbá találunk-e bármilyen kapcsolatot a biofilmek jelenléte és a mortalitás között. A vizsgálatok második felében a farnesol expozíció hatását vizsgáltuk *C. auris* klinikai izolátumok ellen, hogy új típusú terápiát javasolhassunk ez ellen a potenciálisan multirezisztens, új típusú nozokomiális kórokozó ellen.

### **Kísérleteink során az alábbiakat tűztük ki célul:**

- A hemokultúrákból származó *Candida* izolátumok biofilmképzési tulajdonságainak vizsgálata, valamint a planktonikus és szesszilis érzékenységi profil feltérképezése.
- Összefüggés keresése a biofilm termelés és a mortalitás, valamint egyéb prediszponáló tényezők, komorbiditási faktorok között.
- A farnesol hatásának *in vitro* vizsgálata *C. auris* planktonikus sejtek és egynapos biofilmek esetében.
- A farnesol és az azolok között fennálló *in vitro* interakció vizsgálata *C. auris* ellen.
- A farnesol *in vivo* hatásának vizsgálata *C. auris*-szal fertőzött neutropeniás egérmodellben.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. A biofilm képzési vizsgálatra használt izolátumok kiválasztási kritériumai, definíciók

Összesen 127 *Candida* izolátumot vizsgáltunk, amelyeket 2013. januárja és 2018. decembere között gyűjtöttünk a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában (1667 ágy) 127 egymástól független candidaemia-s epizódból. Akkor tekintettük az adott klinikai szituációt candidaemia-nak, ha a beteg legalább egy haemokultúrájából valamilyen *Candida* faj tenyésztett ki. Ha ugyanattól a betegről egynél többször izoláltunk *Candida*-t, különböző candidaemia-s epizódnak tekintettük a két eseményt, amennyiben legalább 30 nap különbséggel történt a két tenyésztés. Azokat a betegeket, akiknél egyidejűleg több *Candida* faj is előfordult ugyanabból az epizódból, kizártuk a vizsgálatból. A betegek demográfiai adatait, az alapbetegségeket és az antimikrobiális terápia részleteit az elektronikus betegdokumentációs rendszerben elérhető kórtörténet áttekintésével gyűjtöttük össze. A candidaemia kimenetelét az első pozitív haemokultúrától számított 30 napig vagy a betegek haláláig követtük.

Fisher-egzakt tesztet használtuk annak vizsgálatára, hogy a biofilm képző izolátumokkal való fertőzésre jobban hajlamosít-e bármiféle kockázati tényező, illetve, hogy az izolátumok biofilm képzése kapcsolatba hozható-e a 30 napos mortalitási adatokkal. A biofilm termelést, valamint a különböző betegjellemzők és körülmények hatását a betegek halálozására több szempontos regressziós modellben elemeztük. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a  $p$  érték kisebb volt, mint 0,05.

A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága az alábbi engedélyszámon jegyezte be: 5190-2019

##### 3.1.1. A *Candida auris* izolátumok eredete

A *C. auris*-szal kapcsolatos kísérleteinkben három klinikai izolátumot vizsgáltunk (10, 12, 27-es izolátum), amelyek az Egyesült Királyság Nemzeti Mikológiai Referencia Laboratóriumából származtak. A vizsgálatok során az SC5314-es *C. albicans* referencia törzset használtuk összehasonlító kontrollként. Fontos hangsúlyozni, hogy minden vizsgált *C.*

*auris* izolátum nem aggregálófenotípust mutatott, amelyeknél a *C. albicans*-hoz hasonló patogenitásfigyelhető meg.

### **3.2. A candidaemia-ból származó klinikai izolátumok biofilm képzésének vizsgálata**

Az egynapos Sabouraud dextróz agarra (SDA) kikent gombapázsitból fiziológiás sóoldatban egy 25-30 ml-es végtérfogatú szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót háromszor mostuk (3000g fordulaton 3-szor 5 percig). A felülúszó leöntését követően ismételtén 25-30 ml fiziológiás sóoldatba vettük fel a gombasejteket. Az egyes izolátumok esetében RPMI-1640-ben  $1 \times 10^6$  Colony Forming Unit (CFU)/ml gombaszuszpenziót állítottunk be, majd lapos aljú, 96 lyukú mikrotiter lemez (TPP, Trasadingen, Svájc) szeszilis sejteket tartalmazó üregeibe 0,1 ml-t pipettáztunk. A negatív kontrollnak megfelelő üregekbe 0,1 ml RPMI-1640 került. Ezt követően a plate-eket statikusan inkubáltuk 24 órán keresztül 37 °C-on. Az egynapos biofilmekre 0,1%-os kristályibolya oldatot mértünk (125  $\mu$ l), ezt követően 15 percet inkubáltuk őket szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően a biofilmeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal (200  $\mu$ l). A lekötött kristályibolya molekulákat szolubilizáltuk 125  $\mu$ l 33%-os ecetsav hozzáadásával. Negyedóra inkubációt követően 100  $\mu$ l felülúszót steril mikrotiter lemezbe pipettáztunk. A kapott felülúszó abszorbanciáját 540 nm-en spektrofotométer segítségével mértük le.

A metabolikus aktivitás vizsgálatához XTT [2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide]-assayt (VWR, Debrecen, Magyarország) alkalmaztunk. A háromszor mosott biofilmekhez 100  $\mu$ l XTT/menadion (0,5 g/l XTT, kiegészítve 1  $\mu$ M menadionnal) oldatot adtunk. Ezt követően a lemezeket statikusan inkubáltuk 2 órán át, 37 °C-on. A metabolikus aktivitás méréséhez 80  $\mu$ l felülúszót eltávolítottunk az egyes üregekből majd 492 nm-enspektrofotométerrel mértük őket. Irodalmi adatok alapján a kristályibolya-assay és az XTT-assay segítségével nyert adatok nem feltétlenül korrelálnak egymással és alapvetően két független biofilm jellemzőt vizsgálnak, ezért az izolátumokat a biomassza mennyiségük és a metabolikus aktivitásuk alapján alacsony, közepes vagy magas biofilmtermelőként, továbbá alacsony, közepes és magas metabolikus aktivitást mutató szeszilis közösségként kategorizáltuk Rajendran és mtsai. (2016) által közölt publikáció szerint. Az első kvartilisbe (Q1) tartozó izolátumokat alacsony biofilmtermelőnek, a harmadik kvartilisnél (Q3) magasabb biomasszával rendelkező izolátumokat magas biofilmképzőnek, a kettő közöttiek pedig közepes biofilmtermelőnek (Q2) minősítettük. Ennek a besorolásnak

az elvét követtük a metabolikus aktivitáson alapuló kategorizálásnál is. A hasonló vizsgálatokkal való jobb összehasonlíthatóság érdekében az izolátumokat a következőképpen vizsgáltuk: alacsony vs. közepes/magas biomassa és alacsony vs. közepes/magas metabolikus aktivitás.

A különböző *Candida* izolátumok biofilmtömegét és a biofilmek metabolikus aktivitását Dunn teszttel kiegészített Kruskal-Wallis-teszttel elemeztük.

### **3.3. A planktonikus sejtek érzékenységeinek vizsgálata**

A *Candida* izolátumok fluconazol (Sigma, Budapest, Magyarország), amphotericin B (Sigma, Budapest, Magyarország), caspofungin, micafungin és anidulafungin (Molcan, Torontó, Kanada) iránti MIC érték meghatározását a ClinicalLaboratoryStandards Institute (CLSI) által jóváhagyott standard mikrodilúciós módszerrel végeztük a szervezet M27-A3-as protokollja alapján. Tápközegként L-glutaminnal kiegészített, hidrogén-karbonát mentes RPMI-1640-et használtunk (pH=7,0), MOPS [3-(N-morpholino) propánszulfonsav) Sigma] puffer hozzáadásával) (Clinical and LaboratoryStandards Institute 2008). A vizsgált gyógyszerkoncentrációk 0,03-32 mg/L, 0,016-8 mg/L és 0,008-4 mg/L volt a fluconazol, az amphotericin B és a három vizsgált echinocandin esetében. Minden izolátumot három párhuzamosban mértünk, és a további elemzéshez a medián eredményeket használtuk. A *C. parapsilosis* ATCC 22019 és a *C. krusei* ATCC 6258 törzseket minden kísérletben kontrolltörzsekként használtuk. A planktonikus MIC értékek leolvasására 24 órás, 35°C-on végzett inkubációs időszakot követően került sor. A fluconazol és a vizsgált echinocandinok esetében a részleges gátlást tekintettük MIC végpontnak (legalább 50%-os turbiditáscsökkenés a növekedési kontrollhoz képest), míg az amphotericin B esetében azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol először tapasztaltunk 100%-os növekedéscsökkenést a pozitív kontrollal összehasonlítva. A planktonikus és szesszilis sejtek adott antifungális szerekkel szembeni MIC értékeinek különbségeit Wilcoxonmatched-pairs teszttel elemeztük.

A *C. auris* izolátumok esetében a fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol és farnesol (mind a Sigma, Budapest, Magyarország) iránti MIC értékek meghatározását a korábbiakhoz hasonlóan standard leveshígításmóddal végeztük, a CLSI által elfogadott M27-A3-as protokoll alapján. A vizsgált gyógyszerkoncentrációk 0,5 és 32 mg/L, 0,008 és 0,5 mg/L, illetve 1,17 és 300 µM mg/L között változtak a fluconazol, a

többi vizsgált azol és a farnesol esetében. Minden esetben azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol először tapasztaltunk 50%-os növekedéscsökkenést a pozitív kontrollal összehasonlítva.

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

A vizsgált gombaellenes szerek biofilmekkel szembeni aktivitását XTT-assay segítségével vizsgáltuk. A biofilmekkel szembeni MIC meghatározás során vizsgált koncentrációk 0,06-512 mg/l, 0,015-8 mg/l és 0,008-4 mg/l voltak a fluconazol, az amphotericin B és a vizsgált echinocandinok esetében. A *C. parapsilosis* esetében a vizsgált echinocandinok koncentrációja 2 és 1024 mg/L között mozgott. A szesszilis MIC értékek meghatározásához a biofilmeket háromszor mostuk 200 µL steril fiziológiás sóoldattal. Az XTT-assay menete megegyezett a fentebb leírt protokollal. Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol először tapasztaltunk 50%-os metabolikus aktivitás csökkenést a kezeletlen kontroll biofilmmel összehasonlítva. A gyógyszer-expozíció által okozott metabolikus aktivitás százalékos változását a következőképpen számoltuk ki:  $(A_{\text{üreg}} - A_{\text{negatív kontroll}}) / (A_{\text{pozitív kontroll}} - A_{\text{negatív kontroll}})$ , ahol  $A$  a mért abszorbancia. Minden izolátumot három független kísérletben vizsgáltunk, és a további elemzéshez a három érték mediánját használtuk. Minden biofilmmel kapcsolatos kísérletben a *C. albicans* SC5314 referencia törzset használtuk minőségi kontrollként. A szesszilis sejtek adott antifungális szerekkel szembeni MIC értékeinek különbségeit Wilcoxon matched-pairs tesztekkel elemeztük.

A triazolok és a farnesol egynapos *C. auris* biofilmekkel szembeni aktivitását szintén a fentebb leírt XTT-assay segítségével határoztuk meg. A vizsgált koncentrációk 8 és 512 mg/L, 0,5 és 32 mg/L, 0,125 és 8 mg/L, illetve 1,17 és 300 µM között mozogtak a fluconazol, voriconazol/itraconazol, posaconazol/isavuconazol és a farnesol esetében.

### **3.5. A farnesol planktonikus növekedésre gyakorolt hatásának a vizsgálata *Candida auris* sejtek esetében**

A növekedési vizsgálatokban a farnesol pre-expozíció, valamint a folyamatos farnesol kezelés hatását vizsgáltuk az alábbi kísérleti elrendezésben: (i) különböző farnesol-koncentrációk hatása a planktonikus sejtekkel szemben, (ii) különböző farnesol-koncentrációk hatása a 24

órán keresztül farnesollal (75  $\mu\text{M}$ ) pre-exponált planktonikus sejtekkel szemben. A 75  $\mu\text{M}$  farnesolt azért választottuk pre-expozíciós koncentrációnak, mert ez körülbelül a *C. albicans* fiziológiás farnesol termelésének kétszeresének felel meg, így már supraфизиológiásnak tekinthető, de még nem mutat citotoxicitást. A vizsgált farnesol koncentrációk minden kísérletben 10, 50, 100 és 300  $\mu\text{M}$  voltak.

A planktonikus sejtek számát time-kill kísérletekkel határoztuk meg. A mintákat (100  $\mu\text{L}$ ) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 és 24 órákor vettük, minden egyes minta esetében tízes-alapú hígítást végeztünk, majd minden hígításból  $4 \times 30 \mu\text{L}$ -t pipettáztunk SDA-ra, ezt követően a táptalajokat 48 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Minden izolátumot három független kísérletben vizsgáltunk, és a három érték átlagát ábrázoltuk. Az adott időpontokban Dunnett-teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk, hogy elemezzük az élő sejtek számára gyakorolt farnesol hatást. Szignifikánsnak tekintettük az eredményt ha  $p < 0,05$  volt.

### **3.6. A farnesol biofilmre gyakorolt hatásának vizsgálata *Candida auris* sejtek esetében**

Három kísérleti protokoll szerint vizsgáltuk a farnesol pre-expozíció és a folyamatos farnesol kezelés hatását a *C. auris* és a *C. albicans* biofilmekre: (i) a biofilmképződés során fennálló 24 órán keresztüli folyamatos farnesol kezelés, (ii) a biofilmképződés előtt 24 órán keresztül farnesollal (75  $\mu\text{M}$ ) pre-exponált sejtek biofilmképző képessége, majd a biofilmképződés alatt 24 órán keresztül folyamatos kezelés adott farnesol-koncentrációval, (iii) a különböző farnesol koncentrációk hatása az egynapos biofilmekre. A vizsgált farnesol-koncentrációk minden kísérletben 10, 50, 100 és 300  $\mu\text{M}$  voltak. A szesszilis sejtek metabolikus aktivitását 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 és 24 órákor határoztuk meg XTT-assay segítségével. Minden izolátumot három független kísérletben vizsgáltunk, és a három érték átlagát használtuk az elemzés során. Az adott időpontokban Dunnett-teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk a különböző farnesol-koncentrációk által kifejtett metabolikus aktivitásváltozás elemzésére. A kezelt és a kontroll sejtek értékei közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a  $p$  érték kisebb volt 0,05-nél.

### **3.7. Az azolok, illetve a farnesol között fennálló *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata**

A vizsgált vegyületek között esetlegesen fennálló szinergista kölcsönhatás vizsgálatához kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúciós assay-t alkalmaztunk. A kölcsönhatás vizsgálatok esetében a *C. albicans* izolátumoknál eltekintettünk a planktonikus sejtek tesztelésétől, mivel azok fiziológiásan magasabb érzékenységet mutattak a tesztelt szerek iránt. A plate elrendezés általánosan az alábbiak szerint történt: a lemez Asora tartalmazta az egyes farnesol koncentrációkat önmagában, míg a 10. oszlopban a különböző azol koncentrációk voltak megtalálhatóak. A mátrix további üregei a két gyógyszer eltérő kombinációit tartalmazták. A 11. oszlop volt a kezeletlen növekedési kontroll, míg a 12. oszlop az úgynevezett táptalajkontroll. Az interakciók természetét a széleskörben használt gátló koncentrációhányad indexszel (Fractional Inhibitory Concentration Index - FICI) határoztuk meg, amelyet az alábbiak szerint definiáltunk:  $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = MIC_A$  kombináció /  $MIC_A$  önmaga +  $MIC_B$  kombináció /  $MIC_B$  önmaga, ahol a  $MIC_A$  és  $MIC_B$  önmagában a két gyógyszer MIC értéke önmagában, míg a  $MIC_A$  és  $MIC_B$  kombinációban a két gyógyszer MIC értéke az a tesztelt izoeffektív kombinációkban. Az izoeffektív kombinációk esetében meghatároztuk a FIC értéket, melyek közül a legalacsonyabb érték felelt meg a FIC indexnek, amit az alábbiak alapján interpretáltunk: szinergizmus, ha a  $FICI \leq 0,5$ , indifferens a hatás amennyiben  $0,5 < FICI \leq 4$ , míg antagonizmusról akkor beszélünk, ha  $FICI > 4$ .

### **3.8. A farnesol hatásának *in vivo* vizsgálata neutropéniás egérmódelben**

BALB/c neutropéniás nőstény egerek (21-23g) segítségével vizsgáltuk a farnesol pre-expozíció (75  $\mu$ M) és a napi farnesol kezelés (75  $\mu$ M) hatását egy reprezentatív *C. auris* izolátum és a *C. albicans* SC5314 törzs virulenciájára. Az állatokat a laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó irányelveknek megfelelően tartottuk. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottsága (Debrecen, Magyarország) hagyta jóvá (12/2014 DEMÁB számú engedély). Tartós immunszuppressziót 150 mg/kg ciklofoszfamid intraperitoneális beadásával hoztuk létre 4 nappal a fertőzés előtt, ezt követően 100 mg/kg ciklofoszfamidot adtunk 1 nappal a fertőzés előtt, majd újfént 100 mg/kg ciklofoszfamid adása következett 2 nappal és 5 nappal a fertőzés után. Előzetes kísérleteinknek megfelelően az egereket intravénásan, a laterális farok vénán keresztül fertőztük meg, a fertőző dózisok  $1 \times 10^7$  CFU/egér és  $8 \times 10^3$  CFU/egér voltak 0,2 ml térfogatban a *C. auris* és a *C. albicans* esetében. Az egereket négy csoportra osztottuk (csoportonként 10 egeret használtunk); (i) kezeletlen kontroll egerek; (ii) 24 órán keresztül farnesol pre-exponált (75  $\mu$ M) sejtekkel történő fertőzés; (iii) a fertőzést megelőzően nem volt farnesol pre-expozíció, de napi 75  $\mu$ M farnesol indult a fertőzést követő 24 órával; (iv) 24 órán át tartó farnesol pre-expozíció (75

$\mu\text{M}$ ) a gombasejteken a fertőzést megelőzően; ezt követően 24 órával a fertőzést követően napi  $75 \mu\text{M}$  farnesolkezelés kezdődött.

A kezelést intraperitoneálisan adtuk be  $0,5 \text{ ml}$  térfogatban fiziológias sóoldattal hígítva. A kontroll egerek  $0,5 \text{ ml}$  fiziológias sóoldatot kaptak intraperitoneálisan. A fertőzés után 6 nappal az egereket elaltattuk, és a veséjüket eltávolítottuk, lemértük, majd aseptikusan homogenizáltuk. A vesékben lévő gombák mennyiségét kvantitatív tenyésztéssel határoztuk meg. A kapott eredményeket Dunn-teszttel kiegészített Kruskal-Wallis-teszttel elemeztük. Szignifikáns volt az eredmény, ha a p-érték kisebb volt, mint  $0,05$ .

A kezelt és kezeletlen egerek veséit szövettani vizsgálatoknak is alávetettük. A szövettani vizsgálatot és a szövettani festést rutinszerűen formalinban rögzített, paraffinba ágyazott egérvese-szöveteken végeztük. Paraffin blokkokból  $4 \mu\text{m}$  vastagságú metszeteket vágunk, és PAS festést végeztünk.

## 4. Eredmények

### 4.1. A biofilmképzési epidemiológiai vizsgálatok eredményei

A vizsgált klinikai izolátumok többsége (59%) férfibetegből származott, a betegek átlagéletkora 61 év volt. A betegek 79%-át intenzív osztályon kezelték. A *Candida* fajok prevalenciáját tekintve a *C. albicans* volt a leggyakrabban izolált faj; a vizsgált candidaemia-s epizódok 51%-áért (65/127) volt felelős, őt követte a *C. parapsilosis* (23/127; 18%), a *C. tropicalis* (19/127; 15%), a *C. krusei* (10/127; 8%), *C. glabrata* (4/127; 3%) és egyéb, kevésbé gyakori fajok (6/127; 5%) a *C. lyopolitica*, *C. catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. inconspicua* és *C. orthopsilosis* egy-egy candidaemia-s epizódot okoztak.

A biofilm tömege és a szesszilis sejtek metabolikus aktivitása meglehetősen heterogén volt, függetlenül a vizsgált fajoktól. Ugyanakkor a *C. tropicalis* izolátumok szignifikánsan nagyobb biofilmtömeeggel rendelkeztek a többi *Candida* fajhoz képest ( $p < 0,001-0,05$ ); továbbá metabolikus aktivitásuk is szignifikánsan magasabb volt a *C. glabrata* és a *C. krusei* fajokkal összehasonlítva ( $p < 0,01-0,05$ ).

A különböző *Candida* izolátumok által termelt biofilm tömegét kristályibolyaassay segítségével mértük. Az izolátumokat alacsony (Q1), közepes (Q2) vagy magas (Q3) biofilmtermelő kategóriákba soroltuk. A törzset alacsony biofilm termelőnek minősítettük, ha abszorbanciájuk kisebb volt, mint 0,01 ( $OD_{540\text{ nm}}$ ), közepesnek számított, ha az abszorbancia 0,01 és 0,276 közé esett ( $OD_{540\text{ nm}}$ ), magas biofilmtermelésről pedig 0,276-os ( $OD_{540\text{ nm}}$ ) értékektől beszéltünk. Tizenöt, 42 és 8 *C. albicans*; 8, 7 és 8 *C. parapsilosis*; 12,7 és 0 *C. tropicalis*; 4,6 és 0 *C. krusei*; valamint 1,3 és 0 *C. glabrata* minősült alacsony, közepes és magas biofilmtermelőnek. Ami a kevésbé gyakori fajokat illeti, a vizsgált *C. catenulata* és *C. inconspicua* izolátumok alacsony biofilmtermelőnek, míg a *C. lyopolitica*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* és *C. orthopsilosis* izolátumok a határértékek alapján közepes biofilmtermelőnek bizonyultak.

A kristályibolya alapú vizsgálatokhoz hasonlóan a különböző szesszilis *Candida* izolátumokat metabolikus aktivitásuk alapján szintén kategorizáltuk XTT-assay segítségével. Alacsony (Q1) metabolikus aktivitásúnak tekintettük azokat az izolátumokat, amelyek abszorbanciája kisebb volt, mint 0,019 ( $OD_{492\text{ nm}}$ ), közepesnek számított (Q2), ha az abszorbancia 0,0019 és 0,149 közé esett ( $OD_{492\text{ nm}}$ ), míg magas metabolikus aktivitásról (Q3) 0,149-es ( $OD_{492\text{ nm}}$ ) értékektől beszéltünk. Tizennégy, 34 és 17 *C. albicans*; 8, 8 és 7 *C. parapsilosis*; 0, 13 és 6 *C. tropicalis*; 4, 6 és 0 *C. krusei*; és 3, 1 és 0 *C. glabrata* rendelkezett alacsony, közepes és magas

metabolikus aktivitással. A vizsgált *C. catenulata* alacsony metabolikus aktivitású, míg a *C. inconspicua*, *C. lypholitica*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* és *C. orthopsilosis* izolátumok közepes metabolikus aktivitásúak voltak.

Az izolátumok medián planktonikus MIC értékei 0,125 és >32 mg/l; 0,06 és 1 mg/l; 0,008 és 2 mg/l; 0,03 és 1 mg/l; illetve 0,008 és 2 mg/l között mozogtak a fluconazol, az amphotericin B, az anidulafungin, a caspofungin és a micafungin esetében. Az érvényben lévő CLSI breakpointok alapján 3 *C. albicans* és valamennyi *C. krusei* esetében fluconazol rezisztenciát figyeltünk meg. Továbbá az egyik *C. inconspicua* izolátum csökkent érzékenységet mutatott a fluconazolra (MIC = 8 mg/L). Az összes fluconazol-rezisztens *C. albicans* törzs, 8 *C. krusei* izolátum és egy *C. inconspicua* alacsony biofilmtömeget és alacsony metabolikus aktivitást mutatott. Az echinocandin rezisztencia tekintetében 19 *C. albicans*, 6 *C. tropicalis*, 6 *C. krusei* és 3 *C. glabrata* törzs mutatott mérsékelt érzékenységet a caspofunginnal szemben. Az echinocandinokra rezisztens izolátumokat nem találtunk.

A *C. albicans* esetében a medián szesszilis MICértékek 0,125 és 512 mg/l; 0,06 és 1 mg/l; 0,008 és 4 mg/l; 0,03 és 4 mg/l; illetve 0,008 és 4 mg/l között mozogtak a fluconazol, az amphotericin B, az anidulafungin, a caspofungin és a micafungin esetében. A non-*albicans* fajok biofilm MICértékeinek mediánja 0,06 és 1024 mg/l; 0,016 és 1 mg/l; 0,008 és 1024 mg/l; 0,008 és 512 mg/l; illetve 0,008 és 1024 mg/l között mozgott a fluconazol, az amphotericin B, az anidulafungin, a caspofungin és a micafungin esetében. A *C. albicans* szesszilis MICértékei a fluconazolra és az anidulafunginra szignifikánsan magasabbak voltak a planktonikus MICértékekhez képest ( $p = 0,001-0,05$ ). Hasonlóképpen, a non-*albicans* fajok esetében a fluconazol, az anidulafungin, a caspofungin és a micafunginszesszilis MICértékei szignifikánsan magasabbak voltak a planktonikus MICértékekhez képest ( $p < 0,001$ ).

Megvizsgáltuk a biofilm tömege, metabolikus aktivitása, valamint a betegek komorbiditási jellemzői közötti kapcsolatot. A legmagasabb 30 napos mortalitást a *C. tropicalis* candidaemia (68%) esetében figyeltük meg, ezt követte a *C. albicans* (62%), a *C. parapsilosis* (30%), a *C. krusei* (30%) és a *C. glabrata* (25%). Szignifikánsan magasabb 30 napos mortalitást tapasztalhattunk a közepes és magas biofilmtömege esetében (61%) ( $p = 0,023$ ). Figyelemre méltó, hogy az összes *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* és *C. glabrata* izolátum, amelynélletális kimenetelű volt a candidaemia, a közepes/magas kategóriába tartozott mind a biofilmtömeg, mind a metabolikus aktivitás tekintetében, míg ez az arány 85% volt a *C. albicans* izolátumok esetében. A kapott klinikai adatok alapján a szolid malignus daganatos megbetegedések a közepes/magas biofilmtermelő *Candida* izolátumokkal való fertőzésekhez

kapcsolódtak ( $p = 0,043$ ). A metabolikus aktivitás tekintetében a 30 napos halálzási arány szignifikánsan magasabb volt ( $p = 0,01$ ) a közepes/magas metabolikus aktivitással rendelkező biofilmképző *Candida* törzsek által okozott fertőzésekben (62%). Ezzel szemben az alacsony metabolikus aktivitású *Candida* biofilmekhez 33%-os halálzási arány társult. Érdekes módon a bacteraemia aránya szignifikánsan magasabb volt ( $p = 0,015$ ) az alacsony metabolikus aktivitású *Candida* fajok esetében (53% és 28% volt a bacteraemia aránya az alacsony metabolikus aktivitású és a közepes/magas metabolikus aktivitású biofilmekezetén). A regressziós analízis kimutatta, hogy a közepes/magas metabolikus aktivitású biofilmet termelő izolátummal való fertőződés a halálzási független előrejelzője lehet, míg ez a korreláció nem volt jelen a kristályibolya-alapú biofilmtömegmeghatározással kapott eredményekben.

#### **4.2. A farnesol hatása a *Candida albicans* és a *Candida auris* planktonikus sejtekre**

A farnesol szignifikánsan gátolta a *C. auris* sejtek növekedését az első 12 órában az 50 és 300  $\mu\text{M}$  farnesol közötti koncentrációtartományban mindkét kísérleti modellünkben, vagyis farnesol pre-exponált sejteket használva és pre-expozíció mentes sejteket vizsgálva ( $p = 0,001-0,05$ ). Huszonnégy óra elteltével a 100 és 300  $\mu\text{M}$  farnesol mindkét kísérleti modellben jelentősen csökkentette az életképes sejtek számát a kezeletlen kontroll sejtszámhoz képest ( $p = 0,01-0,001$ ). Meglepő módon 24 óráig sem a farnesolpre-exponált, sem pedig a normál, expozíció mentes *C. albicans* sejtek nem mutattak szignifikáns növekedés csökkenést ( $p > 0,05$ ).

#### **4.3. A farnesol hatása a *Candida albicans* és a *Candida auris* biofilmképzésére, valamint az egynapos biofilmekre**

##### **4.3.1. A különböző farnesol-koncentrációk hatása a biofilmképző képességre**

Minden vizsgált farnesol-koncentráció gátolta a *C. auris* sejtek metabolikus aktivitását a kontrollsejtekhez képest az első 8 órában ( $p = 0,001-0,05$ ); míg a 24 órás expozíciót követően statisztikailag hasonló metabolikus aktivitást mértünk a kontroll sejtekkel összehasonlítva ( $p > 0,05$ ). Ezzel szemben minden vizsgált farnesol-koncentráció szignifikánsan gátolta a *C. albicans* sejtek metabolikus aktivitását a vizsgált 24 órában.

##### **4.3.2. A biofilm képződést megelőzően 24 órán keresztül farnesollal (75 $\mu\text{M}$ ) pre-exponált sejtek biofilmképző képessége**

Érdekes módon a *C. auris* sejtek metabolikus aktivitásában csak 24 óránál tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns különbséget, ebben az esetben is csak az 50 és 300  $\mu\text{M}$  volt látható ez a differencia. A *C. albicans* esetében az 50 és 300  $\mu\text{M}$  közötti koncentrációkon metabolikus aktivitásban statisztikailag szignifikáns különbségeket először 8 óránál figyeltünk meg, de a különböző koncentrációkkal kezelt sejtek metabolikus aktivitása 24 óránál statisztikailag már nem különbözött.

#### **4.3.3. A különböző farnesol-koncentrációk hatása az egynapos biofilmekkel szemben**

Kettő és 24 óra között a 300  $\mu\text{M}$  farnesol kezelés erős biofilm ellenes hatást fejtett ki a *C. auris* ellen a kontrollhoz képest a metabolikus aktivitás szempontjából. Ezzel szemben érdekes módon az alacsony farnesol-koncentrációk (10-50  $\mu\text{M}$ ) növelték a *C. albicans* biofilmek metabolikus aktivitását az első 4 órában. Huszonnégy óra elteltével a különböző farnesolkezelések azonban statisztikailag nem különböztek szignifikánsan a *C. albicans* esetében.

#### **4.4. A planktonikus és szesszilis *Candida albicans* és *Candida auris* sejtek érzékenységi profilja**

A *C. auris* izolátumok esetében a planktonikus MIC értékek 4 és  $>32$  mg/l, 0,03 és 0,06 mg/l, 0,008 és 0,015 mg/l, 0,015 és 0,03 mg/l, illetve 0,008 és 0,015 mg/l között mozogtak a fluconazol, voriconazol, isavuconazol, itraconazol és posaconazol esetében. A 10-es izolátum fluconazol iránti érzékenysége magasabb volt, mint a fluconazol MIC breakpoint ( $>32$  mg/l), míg a másik két törzs érzékenynek bizonyult a fluconazolra. A planktonikus *C. albicans* SC5314 referenciatörzs esetében a MIC-értékek mediánja 0,125 mg/l, 0,015 mg/l, 0,015 mg/l, 0,125 mg/l és 0,008 mg/l volt a fluconazol, voriconazol, isavuconazol, itraconazol és posaconazol érzékenységi vizsgálata során. A biofilmek esetében mért median MIC értékek  $>512$  mg/l, 64 mg/l, 16-32 mg/l, 16 mg/l és 4-8 mg/l volt fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol és az isavuconazol vizsgálata során.

#### **4.5. A triazolok és a farnesol közötti interakciók természete a *Candida auris* és *Candidaalbicans* biofilmek esetében**

A *C. auris* planktonikus sejtek esetében csak indifferens kölcsönhatásokat detektáltunk. A triazol-farnesol kölcsönhatás eredményeit illetően elmondhatjuk, hogy antagonizmus soha nem volt megfigyelhető. A triazolok és a farnesol közötti szinergia mindhárom *C. auris*

izolátum esetében megfigyelhető volt a szesszilis sejtek esetében (FICI 0,038 és 0,375 között). A *C. albicans* SC5314 törzsnél a megfigyelt kölcsönhatási mintázat nagyon hasonló volt a *C. auris*-hoz: azol-farnesol közötti indifferens kölcsönhatás csak a fluconazol esetében volt megfigyelhető, bár a számított FICI-érték nagyon közel volt a szinergizmus küszöbértékéhez.

#### **4.6. A farnesol hatásának *in vivo* vizsgálata *Candida albicans* és *Candida auris* esetében**

Az *in vivo* kísérletek eredményei a következőkben foglalhatóak össze: 75 µM farnesol kezelés jelentősen csökkentette a veséből kitenyészett élő gombasejtek számát, különösen akkor, ha a farnesollal előzetesen exponált *C. auris* sejteket használtuk inokulumként. A *C. albicans* esetében minden kísérleti beállítás statisztikailag hasonló élő gombasejtszámot eredményezett a kezeletlen kontrollhoz képest (11B ábra). A megfigyelt szövettani eredmények összhangban voltak a kvantitatív tenyésztéssel kapcsolatos eredményekkel. A *C. auris* fertőzésönálló élesztősejteket és számos bimbózó élesztősejtet hozott létre a kezeletlen kontroll egerekben. Habár a farnesollal előzetesen exponált *C. auris* sejtek beoltása nagyszámú gombasejt aggregátumot okozott a veseszövetben; a napi farnesol kezelés jelentősen csökkentette az elváltozások számát. Mind a farnesol pre-expozíció, mind a napi farnesol kezelés többnyire kiterjedésúpatológias elváltozást okozott a veseszövetben a *C. albicans* fertőzés esetén, ahol minden csoportban megfigyelhetőek voltak önálló és bimbózó élesztősejtek, pszeudohifák, valamint valódi hifák is.

## 5. Megbeszélés

A candidaemia továbbra is az egyik legmagasabb halálozással társuló megnyilvánulása az invazív candidiasisnak, és továbbra is komoly veszélyt jelent a kórházak fekvőosztályain, különösen az intenzív terápiás osztályokon. Korábbi epidemiológiai tanulmányok kiemelkedően magas candidaemia incidenciát azonosítottak Pakisztánból (21 eset/100 000), Brazíliából (14,9/100 000), illetve Oroszországból (8,29/100 000). Az átlagosnál alacsonyabb incidenciát publikáltak Jamaikából (5/100 000), Ausztriából (2,1/100 000) és Portugáliából (2,2/100 000). Az európai számok tekintetében elmondható, szinte az egész kontinenst lefedő metaanalízis alapján, hogy a candidaemia incidenciája az „öreg kontinensen” 3,88 eset 100 000 betegre vetítve, ami 79 esetnek felel meg naponta. Első olvasásra nem tűnik magas számnak, azonban ehhez a relatíve kevés esethez magas mortalitási adatok társulnak (40-50%). Számos tanulmány szerint a biofilmet termelő izolátumokkal fertőzött betegek prognózisa szignifikánsan rosszabb; azonban azt érdemes kiemelni, hogy több egymásnak ellentmondó tanulmány is létezik, amely diszkrepancia általában a különböző betegbeválasztási kritériumokban, illetve a biofilmképzés eltérő határértékeiben keresendő. Egy további lehetséges ok a vizsgált betegpopulációk nagyfokú változékonysága lehet.

Jelenleg két *in vitro* módszert (kristályibolya-assay, XTT-assay) használnak széleskörben a biofilmképzés meglétének értékelésére. Ezen módszerek preferálásának oka a relatíve olcsó és könnyű kivitelezés, továbbá egyik módszer sem tekinthető invazívnak, és nem jár a sejtek közvetlen roncsolásával, mint más kísérleti megközelítések (pl. az életképes sejtek áramlási citometriával történő számlálása). Ami jelenleg komoly limitáló tényezője a biofilmmel foglalkozó epidemiológiai tanulmányoknak, vagy éppen a biofilmekkel kapcsolatos alap kutatásnak, azaz, hogy egyelőre nincs általánosan elfogadott konszenzus a biofilm termelési pozitívitás kritériumairól.

Jelen vizsgálatunkban, mindkét széleskörben dokumentált módszer alkalmazásával értékeltük a biofilmek tömegének, valamint a metabolikus aktivitásuknak a candidaemia-k mortalitására gyakorolt hatását. Jelenleg nincs elfogadott határérték arra vonatkozóan, hogy mikortól is beszélünk biofilmképzésről egy adott *Candida* izolátum esetében, ezért egy nemrég javasolt módszert alkalmaztunk annak eldöntésére, hogy biofilmképző-e az adott izolátum. Ebben a tanulmányban az XTT-assay, a kristályibolya-assay és a SYTO-9 festés alapján jelentős különbséget találtak az alacsony és a magas biofilmmel termelő izolátumokkal fertőzött betegek 30-napos túlélése között (35% és 41%-os volt a mortalitás az alacsony, illetve magas

biofilmképző törzsek esetében). Vizsgálatukban mindhárom teszt magas korrelációt mutatott a biofilmképzés és a candidaemia kimenetele vonatkozásában. Ezek a megfigyelések összhangban vannak a más kutatócsoportok által publikált eredményekkel, akik az XTT-assay alapján 51%-os mortalitást mutattak ki a biofilmet termelő izolátumok okozta candidaemia-ban a biofilmet nem termelő izolátumoknál megfigyelt 32%-hoz képest. Ezzel szemben vannak vizsgálatok, amelyek nem erősítették meg a biofilmtermelést, mint a mortalitás kockázati tényezőjét a candidaemia-s esetekben.

Eredményeink alapján a biofilmet termelő *Candida*-izolátumok okozta candidaemia-hoz társuló 30-napos mortalitás szignifikánsan magasabb volt a közepes és magas metabolikus aktivitással rendelkező izolátumok esetén összehasonlítva az alacsony metabolikus aktivitást mutató törzsek által okozott mortalitási számokkal. Emellett fontos kiemelni, hogy a közepes/magas metabolikus aktivitás a mortalitás szignifikáns prediktorának bizonyult a többváltozós regressziós elemzésben.

Egyes munkacsoportok nem találtak korrelációt a kristályibolyával vagy szafraninnalnyert biofilmtömeg adatok és a mortalitás vonatkozásában. Azonban érdemes megjegyezni, hogy ezek közül egyik vizsgálatában nagy arányban szerepeltek *C. parapsilosis* izolátumok, amelyek az alacsony virulenciájuk miatt kisebb százalékban okoznak végzetes kimenetelt. Ez a tény jelentősen torzíthatta az eredményeket. Egy másik, korábban is hivatkozott tanulmányban a biofilm vastagságát, annak robusztusságát a halálozás szignifikáns prediktoraként határozták meg.

Tanulmányunkban a kevés biofilmet termelő izolátumokkal fertőzött betegek körében a halálozás szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a közepes/magas biofilmtömeget mutató izolátumokkal fertőzött egyének esetében. Azonban a kristályibolya-assay segítségével mért biofilmtömeg nem számított a halálozás függetlenprediktorának a többváltozós regressziós modellünk alapján.

Amennyiben a predisponáló tényezőket vizsgáljuk, tanulmányunkban nagyobb arányban izoláltunk biofilmet termelő törzseket malignus tumoros megbetegedésben szenvedő betegek esetében. Korábban már bebizonyították, hogy az intravénásan beadott planktonikus *Pseudomonas aeruginosa* képes felhalmozódni az egér szubkután tumorokban; emellett bizonyítékot szolgáltatott arra is, hogy a baktériumsejtek a tumorszövetben szesszilisz vagyis biofilm fenotípust mutatnak. Megint mások kimutatták, hogy a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* képes behatolni szolid tumorokba, és a *P. aeruginosa*-hoz hasonlóan biofilmet termelni. A recens irodalmi adatok alapján jóval kevesebb bizonyíték áll rendelkezésre a gombák biofilm termelése, valamint a rák közötti kapcsolatra. Mindazonáltal

a szájnyálkahártyán lévő elváltozások nagyobb valószínűséggel mennek át malignusfolyamatokba, ha egyidejűleg *Candida* fertőzés is van jelen. Ráadásul a *Candida* sejtek adhéziója és biofilm termelése fokozott a beteg nyálkahártyáján sugárterápiát követően, akár az élősejt számot nézzük, akár a biofilm kiterjedésének nagyságát, ami összefüggésbe hozható az adott betegcsoportban megfigyelhető magasabb gombás nyálkahártya-fertőzések arányával.

Tanulmányunkban az esetek 34%-ában figyeltünk meg bacteraemiával járó candidaemiát, ami összhangban van a korábban leírt, 6%-os és 34,5% közötti arányokkal. Érdekes módon a candidaemia és az egyidejű bakteraemia aránya jelentősen magasabb volt az alacsony metabolikus aktivitású biofilmet termelő *Candida*-izolátumok esetében. A baktériumok felszabadíthatnak bizonyos vegyületeket, amelyek megzavarhatják a planktonikus és szesszilis *Candida*-sejtek anyagcseréjét, zavarhatják a biofilmtermelést vagy a gombasejtek közötti quorum-sensing-et. Egy 2013-as tanulmány szerzői kimutatták, hogy a *P. aeruginosa*-ból származó fenazinok károsítják a *C. albicans* metabolikus aktivitását, befolyásolják a sejt-morfológiát, a sejt-sejt kölcsönhatásokat és a biofilmképződést. Mások pár évvel később megfigyelték, hogy az *Enterococcus faecalis* egyik bakteriocinja gátolja a baktériumok növekedését, ami szintén hatással van a metabolikus aktivitásra, negatív értelemben. Jelen elemzésünk tehát megerősítette, hogy a biofilmek termelése, különösen a közepes/magas metabolikus aktivitással bíró biofilmek esetében, összefüggést mutat a magasabb mortalitással a candidaemia-ban szenvedő betegek esetében. Továbbá rávilágít arra a tényre, hogy a biofilmek tömegének és a metabolikus aktivitásnak egyenértékűnek vett eredménye ellentmondásos konklúziókat eredményez, ezért ezeket a faktorokat az ilyen és hasonló típusú vizsgálatokban külön-külön kell elemezni és interpretálni.

Bár már több mint 10 éves klinikai múltja tekint vissza, a *C. auris* továbbra is nagy kihívást jelent a klinikai gyakorlatban. Ez a potenciálisan multirezisztens faj nagy arányban képes candidaemia-t okozni, amelyekhez magas mortalitás társul különösen az intenzív osztályokon. Eradikálását nehezíti az izolátumok biofilmképző képessége, amely miatt új, innovatív terápiákra lehet szükség a jövőben ezen faj ellen. A szisztémás gombás fertőzések kezelésére rendelkezésre álló szerek száma erősen limitált; ráadásul a gombaellenes gyógyszerek felfedezése lassú és nagy kihívást jelentő feladat, különösen az újonnan megjelenő, nehezen kezelhető fajok esetében, mint például a *C. auris*. A *C. auris* fertőzések terápiás alternatívájaként kombinációs alapú kezelési megközelítéseket javasolnak. A fluorocytosin amphotericin B-vel vagy micafunginnal való kombinációja hatékony lehet a *C. auris* fertőzések ellen. Sőt, a micafungin és a voriconazol között is egyértelmű szinergista

kölcsönhatást figyeltek meg, hasonlóan az isavuconazol és caspofungin közötti interakcióhoz. Az utóbbi években egyre többet tudunk a quorum-sensing megzavarásán alapuló alternatív terápiás lehetőségekről, amelyekben a farnesol vagy a tyrosol potenciális antimikrobiális hatását vizsgálták. Számos *in vitro* és *in vivo* tanulmányt végeztek a farnesol antimikrobiális hatásainak felderítésére, amelyekből kiderült, hogy ez a vegyület potenciálisan monoterápiáshatóanyagként vagy tradicionális antifungális szerrel együtt alkalmazva, adjuvánsként szolgálhat. A farnesol fiziológiás koncentrációban sokoldalú hatással rendelkezik, ezek közül azonban a legkiemelkedőbb, hogy képes befolyásolni a *C. albicans* morfológiáját. Figyelemre méltó, hogy a farnesol nem csak a *C. albicans*-ra van hatással, hanem - különösen szuperfiziológiás koncentrációban - más non-*albicans* fajokra és penészgombákra is jelentős gátlást fejt ki.

Egy korábbi vizsgálatunkban leírtuk, hogy a farnesol potenciális gombaellenes hatással rendelkezik a *C. auris* biofilmekkel szemben, mindazonáltal a farnesol esetében megfigyelt gombaellenes aktivitás háttérben álló fiziológiai folyamatok ezidáig még tisztázásra vártak. Eredményeink alapján a farnesol nem volt hatással a planktonikus *C. albicans* sejtek növekedésére; a *C. auris* esetében azonban jelentős növekedésgátlást eredményezett. A szesszilis sejtek vonatkozásában a farnesol az első 24 órában gátolta az egynapos biofilmek metabolikus aktivitását, ami a *C. albicans*-nál egyértelműen hiányzott.

Több epidemiológiai tanulmány is beszámolt már *C. auris* okozta katéter-asszociált fertőzésekről, amelyek a korábban már széles körben dokumentált biofilmtermelésnek köszönhetőek. Korábbi vizsgálatok a *C. auris* által okozott centrális vénás fertőzések magas prevalenciájáról számoltak be: a különböző vizsgálatokban az összes invazív *C. auris* fertőzés 11-92%-a kapcsolódott centrális vénás kanül jelenlétéhez. Bár a szesszilis közösségek a gyakran használt antifungális szerek többségével szemben lényegesen nagyobb rezisztenciát mutatnak a planktonikus érzékenységhöz képest, az antimikotikumok hatékonysága fokozható olyan adjuvánsokkal, mint például a farnesol. A vizsgált triazolok és a farnesol között egyértelmű szinergizmust mutattunk ki a *C. auris* biofilmek ellen, hasonlóan, mintegy korábbi tanulmányban az echinocandinok és a farnesol kombinációi között. Valószínűsíthetően a farnesol interferál az ergosterol bioszintéziséhez kapcsolódó gének expressziójával, ami magyarázatot adhat a vegyület és a triazolok szinergiájára.

Bár a farnesol *in vitro* hatása jól ismert, különösen a *C. albicans* ellen, *in vivo* szerepe továbbra is ellentmondásos és számos kérdést vet fel a klinikai alkalmazhatóságát illetően.

Míg egyesek azt találták, hogy az exogén farnesol (20 mM/egér) fokozhatja a *C. albicans* patogenitását, növelve a mortalitást a szisztémás candidiasis egérmodellben, mások ezzel szemben farnesol által kiváltott protektív hatást figyeltek meg (9  $\mu$ M/egér dózisban) a *C. albicans*-asszociált oropharyngeális candidiasisban. Bár egy harmadik munkacsoport kimutatta, hogy a farnesol önmagában nem protektív vulvovaginitisben (150-300  $\mu$ M/egér), de fokozza a fluconazol aktivitását a fluconazol-rezisztens *C. albicans* izolátumokkal szemben. Mindeközben más kutatók mikonazol és farnesolt tartalmazó kitozánnanorészecskéket hoztak létre, ahol a farnesol koncentrációja  $\geq 240$   $\mu$ M volt, amely szintén gátolta a gombasejtek szaporodását a vulvovaginitisben szenvedő egerekben.

Jelen vizsgálatunkban a napi farnesolkezelés csökkentette a *C. auris* élő gombasejtek számát az egér veséiben, függetlenül az inokulum korábbi farnesol-expozíciójától. Ezenkívül a farnesolnak előzetesen kitett inokulumok esetében a gombasejtek számának csökkenése statisztikailag szignifikáns volt, ami összhangban van az *in vitro* növekedéssel kapcsolatos eredményeinkkel. A megfigyelt gombaellenes aktivitás a korábban *in vitro* mért megemelkedett reaktív oxigén gyök szintekkel magyarázható, amelyek a *C. albicans*-szal végzett hasonló kísérletekben nem voltak kimutathatók. Továbbá, a farnesol lipofil tulajdonságai lehetővé teszik a gomba sejtmembránba való beépülését, befolyásolva a membránok fluiditását és integritását. Egy korábbi vizsgálat tanulsága szerint a farnesol befolyásolta a sejtpolarizációt és a membránpermeabilitást *C. parapsilosis* és *C. dubliniensis* esetében, ami szintén magyarázhatja a vizsgálatunkban megfigyelt gombaellenes hatást. Figyelemre méltó eredmény, hogy a farnesollal előzetesen exponált sejtek beoltása a napi farnesol terápia nélkül virulensebb infekciót és nagyobb vesezöveti károsodást eredményezett az egerekben. A 24 órás farnesol pre-expozíció további folyamatos farnesol kezelés nélkül befolyásolhatja a virulenciafaktorok expresszióját, illetve a membrántulajdonságokat a fluconazolpre-expozícióhoz hasonlóan, ami magyarázatot adhat a virulencia fokozó hatásra.

Kutatásaim egy részében a candidaemia-bantapasztalható mortalitás és a biofilm termelés közötti kapcsolatot vizsgáltam, ahol egyértelműen megállapítottuk, hogy a biofilmek metabolikus aktivitása szignifikáns hatással van a candidaemia esetében tapasztalt 30-napos túlélésre. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a farnesol által indukált antifungális hatás hátterében milyen élettani jellemző van, valamintmi lehet az oka a megfigyelt antifungális hatásnak. Eredményeink alapján új perspektíva nyílhat a *C. auris* okozta infekciók terápiájában, továbbá a candidaemia-k vizsgálataiból kapott eredmények nagyban

hangsúlyozzák a biofilm termelés fontosságát, amelyek jelenléte vagy hiánya meghatározhatja a candidaemia-s esetek kezelését.

## 6. Összefoglalás

A candidaemia az invazív candidiasis egy relatíve gyakori és életveszélyes formája, amely elsősorban a kórházi betegek körében okoz súlyos problémát. Emellett számos újonnan megjelenő *Candida*-faj, mint például a *Candida auris*, hozzájárul a candidaemia-k aggasztó halálozási és epidemiológiai trendjéhez. A biofilmképzés számos *Candida*-faj esetében fontos virulenciafaktor; azonban a *Candida* biofilmképző képességének hatása a klinikai kimenetelre továbbra is ellentmondásos. Ráadásul a biofilm ellenes és/vagy az újonnan kialakult *C. auris* elleni hatékony terápiás kezelési módok száma erősen korlátozott; ezért sürgősen szükség van új stratégiák kifejlesztésére.

Doktori projektem első célja az volt, hogy meghatározzuk a biofilmek hatását a candidaemiában szenvedő betegek mortalitására, különös tekintettel a biofilmek tömegére és metabolikus aktivitására. Míg a második cél a farnesol potenciális gombaellenes és/vagy adjuváns hatásának vizsgálata volt a *C. auris* ellen. A farnesol *C. auris*-ra gyakorolt hatásának vizsgálatához növekedésre, a biofilmképző képességre, a triazolérzékenységre és a virulenciára összpontosító kísérleteket végeztünk.

A biofilmmel kapcsolatos epidemiológiai kísérletek alapján a közepes/magas biofilmtömeg szignifikánsan magasabb mortalitással (61%) járt együtt. A mortalitás szignifikánsan magasabb volt a közepes/magas metabolikus aktivitású biofilmet termelő *Candida* izolátumok által okozott fertőzésekben (62% vs. 33%,  $p=0,01$ ). A *C. auris*-szal kapcsolatos kísérletekben a farnesolkezelés koncentrációfüggő gátlást mutatott a biofilmképző képességet illetően; azonban 24 óránál már nem gátolta jelentősen a biofilm kialakulását. A 300  $\mu\text{M}$  farnesol az egynapos biofilmekkel szemben jelentős metabolikus aktivitás csökkenést eredményezett 2 és 24 óra között ( $p<0,001$ ). Az azolok és a farnesol között szinergista kölcsönhatást tapasztaltunk (FICI 0,038 és 0,375 között) abiofilmek esetében. Immunszuppresszált egérmodellünkben a napi 75  $\mu\text{M}$  farnesolkezelésszignifikánsan csökkentette a veséből kitenyészett élő gombasejtek számát ( $p<0,01$ ).

Összefoglalva, eredményeink egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a *Candida* biofilmek, különösen a közepes/magas metabolikus aktivitást mutatók, kapcsolatba hozhatóak candidaemia-ban szenvedő betegek magasabb mortalitásával. Továbbá a farnesol ígéretes terápiás vagy adjuváns potenciált mutatott a *C. auris* ellen, ami jó kiindulópont lehet az alternatív *C. auris* ellenes terápiák megfogalmazásakor.



Nyilvántartási szám: DEENK/435/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vitális Eszter  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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: 4.377
2. 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: 5.64

### További közlemények

3. Nagy, G. G., Tudlik, Z., Gergely, L., Kónya, J., Orosi, P., Rákóczi, É., Szabó, J., Várvölgyi, C.,  
**Vitális, E.**, Paragh, G.: A székletmikrobiota-transzplantáció technológiájának és minőségirányítási hátterének újragondolása a SARS-CoV-2 víruspandémia kapcsán.  
*Orv. hetil.* 161 (44), 1858-1871, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.32023>  
IF: 0.54
4. Velkey, B., **Vitális, E.**, Vitális, Z.: Spontán bakteriális peritonitis.  
*Orv. hetil.* 158 (2), 50-57, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30637>  
IF: 0.322
5. **Vitális, E.**: Perioperatív antibiotikum-profilaxis.  
In: Perioperatív betegellátás. Szerk.: Tassonyi Edömér, Fülesdi Béla, Molnár Csilla, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 350-356, 2016.





6. Nemes, B. Á., Gelley, F., Dabasi, E., Gámán, G., Fehérvári, I., Görög, D., Kóbori, L., Fazakas, J., **Vitális, E.**, Doros, A., Gálffy, Z., Máthé, Z.: Bakteriális infekciók májátültetés után.  
*Orvosi Hetilap.* 156 (34), 1366-1382, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2015.30204>  
IF: 0.291
7. Fazekas, B., Mohácsi, A., Gyöngyösi, Z., **Vitális, E.**, Simon, É., Molnár, C., Fülesdi, B.: A maghőmérséklet transoesophagealis mérésének megbízhatósága félig zárt és zárt narkózis rendszerrel végzett anesztéziák során.  
*Anaesthesiol. Intenzív Ther.* 38 (3), 121-126, 2008.
8. Molnár, C., Kovács, Z., Tankó, B., Fülepi, Z., **Vitális, E.**, Sárkány, P., Fülesdi, B.: Különböző elven működő anesztézia mélység mérő monitorok klinikai alkalmazásának összehasonlítása idegsebészeti beavatkozások során = Comparison of two different indices used in anaesthesia depth monitors during neurosurgical operations.  
*Anaesthesiol. Intenzív Ther.* 37 (3), 115-120, 2007.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,17**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
10,017**

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

Debrecen, 2021.09.09.

