

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Caspofungin, micafungin és nikkomycin *Z in vitro*  
hatékonyságának vizsgálata mikro- és makrodilúciós  
módszerekkel a fontosabb *Candida* fajok ellen**

**Földi Richárd**

Témavezető: Dr. Majoros László



**DEBRECENI EGYETEM**

**Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola**

Debrecen, 2012

**Caspofungin, micafungin és nikkomyacin *Z in vitro* hatékonyságának vizsgálata mikro- és makrodilúciós módszerekkel a fontosabb *Candida* fajok ellen**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Földi Richárd okleveles molekuláris biológus (mikrobiológus)

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszertudományok doktori iskolája  
(Mikrobiológia és farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Majoros László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D.  
Dr. Urbán Edit, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

2012. október 2. 11 óra, DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kovács Péter, kandidátus  
Dr. Dóczi Ilona, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Kovács Péter, kandidátus  
Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D.  
Dr. Urbán Edit, Ph.D.  
Dr. Dóczi Ilona, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja:

2012. október 2. 13 óra, DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

## BEVEZETÉS

A súlyos gombafertőzések közel 90%-áért a különböző *Candida* fajok tehetők felelőssé. Mint a normál flóra tagjai, megtalálhatóak az egészséges szervezetben, de az oportunistá fertőzések, illetve az orvosi beavatkozások következtében számuk jelentősen megnövekedhet. A *Candida* fajokat a negyedik (8-10%) leggyakoribb nozokomiális szepszist előidéző patogénként tartják számon világszerte. A leggyakrabban izolált kórokozó, melyet egyben a legvirulensebbnek is tartanak, a *Candida albicans*, azonban az 1990-es évektől a nem-albicans *Candida* fajok által okozott megbetegedések száma is megnövekedett.

Az *in vitro* antifungális érzékenységi vizsgálatok fontos szerepet töltenek be a megfelelő terápiához szükséges gyógyszer kiválasztásában, a gyógyszerfejlesztési kísérletekben és az antifungális rezisztencia fejlődésének nyomon követésében.

Vizsgálatainkban a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által létrehozott antifungális érzékenységi vizsgálati eljárásokat alkalmaztuk. Ezt a dokumentumot először 1992-ben adták ki, majd az évek során több módosításon ment keresztül, míg mostani formáját az M27-A3 változatban nyerte el.

A kísérleteinkben is használt idő-ölés módszer elengedhetetlen kelléke az antimikrobiális szerek aktivitásának megismerésében. Megfelelő információt nyújt a szer hatásának mértékéről, a farmakodinámiás tulajdonságairól (pl. a koncentráció, gyógyszer által kifejtett hatás és a posztantibiotikus effektus kapcsolata) és több gyógyszer együttes alkalmazása esetén megvizsgálható az esetleges antagonista, vagy szinergista hatás.

Az eddigi kutatások legújabb mérföldköve a gombák sejtfalszintézisét gátló echinocandinok bevezetése volt, melyek invazív candidiázis és aspergillózis

esetében biztonsággal és jó hatásfokkal használhatóak, emellett kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Hatásukat az 1,3- $\beta$ -D glükán szintáz nemkompetitív gátlása révén fejtik ki, ami a gomba sejtfa fő glükán komponensét, az 1,3- $\beta$ -D glükán bioszintézisét végzi. A gyógyszer megváltoztatja a sejtfa integritását, csökken a vastagsága, így az elveszíti mechanikai szilárdságát, a sejt nem képes ellenállni az intracelluláris ozmotikus nyomásnak és ez végül a sejt líziséhez vezet.

Az echinocandinok széles hatásspektrummal rendelkeznek a *Candida* és *Aspergillus* fajok körében, míg *Zygomycetes*-ek és *Cryptococcus neoformans* ellen hatástalannak bizonyultak, mivel a sejtfa 1,3- $\alpha$  és 1,6- $\alpha$  glükánt tartalmaz. Mindhárom echinocandin *in vitro* és *in vivo* is fungicid a *Candida* fajok nagy részével szemben, beleértve az azol rezisztenseket (*C. krusei*, *C. glabrata*) és az amphotericin B (AMB) rezisztenseket (*C. lusitaniae*) is.

Az echinocandinokra jellemző, hogy magas fehérjekötő képességgel rendelkeznek humán szérumban. Ez az érték caspofunginnál (CAS) a legalacsonyabb (96,5%), ezt követi az anidulafungin (ANI) 98-99%-kal és a micafungin (MICA) 99,8%-kal. Ezen tulajdonság ismeretében azt feltételezik, hogy a szérumban fehérjékkel *in vitro* szérumos kísérletekben és *in vivo* is szerepe lehet az antimikrobiális szerek hatásának megváltoztatásában. Az echinocandinok csökkent aktivitása szérumban jelenlétében arra enged következtetni, hogy a fehérje kötési tulajdonságuknak közvetlen hatása van a gyógyszerre, ami valószínű abban nyilvánul meg, hogy megváltoztatják a glükán szintáz gátlási képességüket.

A szabad gyógyszer hipotézis szerint csupán az ANI 1%-a, a CAS 3,5%-a és a MICA 0,2%-a farmakológiailag aktív szérumban jelenlétében. Ennek értelmében a MIC értékeknek 200-500-szorosára kellene emelkednie. De ez nem egyezik meg a fentebb említett kísérletekben kapott eredményekkel. Ezért valószínűnek

tartják, hogy a fehérjéhez kötött gyógyszer egy részének megmarad az antifungális aktivitása. Ezt a hipotézist MICA esetében már megcáfolták, mivel a megfigyelések szerint a gyógyszer köti a szérumban a fehérjéket, de ez a kötés reverzibilis és gyenge.

Az echinocandinok mellett, hogy kevésbé toxikusak, a normál dózisuk háromszorosa is jól alkalmazható terápia során. *In vitro* kísérletekben azonban gyakran megfigyelhető jelenség, hogy nagyobb koncentrációjú echinocandinok adagolását követően csökken a gyógyszer aktivitása az adott kórokozóval szemben. Némely esetben az echinocandinok kifejtik ölü hatásukat alacsony koncentrációnál, viszont magasabb koncentráció értéknél közel ugyanolyan növekedést mutatnak, mint a kontroll mintáknál. Ezt nevezik paradox növekedésnek, melyet az antifungális szerek közül kizárólag az echinocandinoknál figyeltek meg.

Figyelemreméltó tény, hogy *in vitro* a paradox növekedés olyan gyógyszerkoncentráción is megjelenik, ami a humán szérumban is elérhető a hagyományos dozírozási stratégia mellett.

A gyógyszerek kombinációban való alkalmazásával számos előnyre tehetünk szert. Így például a fokozott hatékonyság, az alacsonyabb dózisoknak köszönhető csökkent toxicitás és mellékhatások, a ritkábban előforduló gyógyszer-rezisztens variánsok és a szélesebb hatásspektrum mind-mind arra mutat, hogy egyes gyógyszerkombinációkkal nagyobb terápiás siker érhető el. Ezért kísérleteinkben a CAS-t nemcsak magában, hanem egy másik sejtfalkomponenst gátló szerrel, a nikkomycin Z-vel (NIK) is vizsgáltuk.

## CÉLKITŰZÉS

Kísérleteinkben a caspofunginnak, micafunginnak, valamint a kitin szintézis gátló nikkomycin Z-nek az *in vitro* aktivitását vizsgáltuk a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében izolált, klinikailag jelentős *Candida* fajok ellen mikro –és makrodilúciós módszerek segítségével.

Célul tűztük ki:

- a micafungin MIC meghatározását és összehasonlítását RPMI-1640 és RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében a különböző *Candida* fajok ellen, valamint a gyógyszer hatékonyságának tanulmányozását a kétféle tápközegben idő-ölés kísérletek segítségével.
- a caspofungin és a nikkomycin Z MIC értékeinek meghatározását a különböző *Candida* fajok ellen, majd ezek ismeretében idő-ölés görbék felvételével tanulmányozni és összehasonlítani a caspofungin és a nikkomycin Z ölü hatását külön-külön, illetve együttesen RPMI-1640 és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben.
- a kísérlet során a magas koncentrációban adott caspofungin esetében jelentkező paradox növekedés megfigyelését és változását a nikkomycin Z, illetve a tápközeghez hozzáadott humán szérum jelenlétében.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### **A vizsgált gombafajok eredete**

A MICA *in vitro* vizsgálatához 8 *Candida* faj 24 klinikai izolátumát és 5 ATCC tesztörzset (American Type Culture Collection) használtunk. Az összes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* és háromból egy *C. inconspicua* izolátum vérből származott. Az izolátumok azonosítása API ID32C és CHROMagar *Candida* táptalaj segítségével már korábban megtörtént. A *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. inconspicua* fajok azonosítását pedig, molekuláris biológiai módszerekkel erősítettük meg.

A CAS *in vitro* vizsgálata során 15-15 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis*, illetve 4-4 *C. dubliniensis*, *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* klinikai minta paradox növekedését vizsgáltuk mikrodilúciós és idő-ölés módszerrel, melyek közül fajonként 2-5 izolátumot használtunk fel a további kísérletekhez. Azonosításuk és a tenyészet tisztaságának ellenőrzése az előzőekben leírt módszerrel történt. A *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajok azonosítása korábban már megtörtént molekuláris biológiai eljárásokkal.

A *C. metapsilosis* és a *C. orthopsilosis* izolátumokat Tavanti és munkatársai bocsájtották a rendelkezésünkre.

### **Érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel**

A CAS, MICA és a NIK minimális gátló koncentráció (MIC) értékeinek meghatározását a standard CLSI M27-A3 dokumentum ajánlása alapján végeztük el.

Sabouraud agaron nőtt 24 órás tenyészeteket alkalmaztunk az egyes törzsek gombaszuszpenzióinak elkészítéséhez. Denzitométer segítségével 0,5 McFarland

sűrűségű oldatot készítettünk, melyhez 0,9 %-os fiziológiás sóoldatot adtunk. A MIC értékek meghatározásához 96 üregű ELISA-táplemezeket használtunk. Az egyes gombáknál pozitív (gyógyszert nem tartalmazó) és negatív (gombát nem tartalmazó) kontrollt is alkalmaztunk.

A gyógyszereket steril desztillált vízben oldottuk fel és 0,015-8 mg/l koncentráció értékek között vizsgáltuk a MIC értékeket. MICA esetében a mikrodilúciós módszert RPMI-1640 + 50% humán szérum (Sigma, Budapest) jelenlétében is elvégeztük, ahol 0,06-32 mg/l gyógyszerkoncentrációkat használtunk. A NIK (Sigma, Budapest) legmagasabb vizsgált koncentráció értéke a kísérleteink során 8 mg/l volt, mivel ez a maximálisan elérhető érték a szérumban.

Ezt követően a táplemezeket 35°C-on inkubáltuk, majd az üregek tartalmát pipettával összeszuszpendáltuk és leolvastuk az eredményeket.

A MIC értékek meghatározását 24 óra után végeztük el CAS (Cancidas, Merck) és MICA (Mycamin, Astellas), valamint 48 óra elteltével NIK esetében. A szuszpenzió zavarosságának vizsgálatát vizuálisan határoztuk meg a prominens gátlás kritériuma alapján. A MIC az adott antifungális szer azon legkisebb koncentrációja volt, melynél az üregek zavarossága jelentős - legalább 50%-os - csökkenést mutatott a gombakontrollhoz képest.

### **Az antifungális hatás vizsgálata idő-ölés görbék segítségével**

A kísérleteket Klepser és munkatársai által leírt standardizált módon végeztük el. MICA esetében mind az RPMI-1640, mind pedig, a humán szérummal kiegészített tápközeg esetén 0,5-16x MIC koncentrációkat alkalmaztunk, a legmagasabb vizsgált MICA koncentráció pedig 64 mg/l volt.

A CAS idő-ölés görbéit 0,125-16 mg/l, míg a NIK-t 0,125-8 mg/l koncentráció értékek között vettük fel RPMI-1640-ben. A két szer kombinációjánál a CAS-t minden koncentrációértéknél vizsgáltuk (0,125-16 mg/l), míg a NIK-nél az adott izolátum MIC értékét vettük alapul. Ahol a NIK MIC  $\geq 8$  mg/l volt, ott csak a legmagasabb, 8 mg/l koncentrációt használtuk. Az ennél alacsonyabb MIC értékek esetén a MIC-cel megegyező, illetve annál nagyobb koncentrációkat is vizsgáltuk 8 mg/l-ig.

Ötven százalék humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben 2-2 *C. albicans*-t (10920 és 17433), *C. tropicalis*-t (555 és 375), *C. glabrata*-t (6605 és 14545) és *C. parapsilosis*-t (9150 és CP117), valamint 1-1 *C. metapsilosis*-t (CP5) és *C. orthopsilosis*-t (CP85) vizsgáltunk. A CAS koncentrációi 32, 16, 1 és 0,125 mg/l voltak, míg a CAS + NIK kombináció esetén 8 mg/l NIK-t adtunk 16, 1 és 0,125 mg/l koncentrációjú CAS-hoz.

A kísérlet során  $10^5$  CFU/ml (Colony Forming Unit/ml) kiindulási inokulumot alkalmaztunk. A csöveket sötétben, folyamatos rázatás mellett, 35 °C-os termosztátban inkubáltuk. Adott időpontokban (0, 4, 8, 12, 24 és 48 óra) a csövekből 100-100  $\mu$ l-eket vettünk ki, melyekkel 1: 10-es léptékű sorozathígítást végeztünk el fiziológiás sóoldatban.

Ezt követően  $4 \times 30$   $\mu$ l mintát pipettáztunk az egyes Sabouraud agarok felszínére. 15-20 perces száradás után 48 órára, 35 °C-os termosztátba helyeztük, s végül megszámoltuk a kinőtt telepeket. Az élő gombasejtek számát (CFU) a hígítási adatok ismeretében határoztuk meg. A kapott csíraszámokat az idő függvényében grafikusán ábráztuk.

Fungicidnek akkor tekinthető a szer, ha a csíraszámokban legalább 99,9%-os ( $3\text{-log}_{10}$ ) csökkenés tapasztalható a kiindulási inokulumhoz képest. Ha ennél kisebb

a változás, akkor fungisztatikusnak tekinthető az antifungális szer az adott izolátummal szemben.

Paradox hatás akkor figyelhető meg idő-ölés kísérletek során, amikor az antifungális szer alacsony és magas koncentrációin növekedés észlelhető (fungisztatikus hatás), de a köztes koncentrációkon nincs gombanövekedés (fungicid hatás).

A CAS + NIK idő-ölés görbék esetében vizsgáltuk a gyógyszerek egymásra gyakorolt hatását. Szinergista hatás akkor tapasztalható, ha a kombinációban adott szerek legalább 100-szorosával hatékonyabbak az általunk vizsgált leghatásosabb monoterápiás szernél. Ha ez az érték alacsonyabb, akkor additívnek (indifferensnek) tekinthető a kombináció. Ha pedig a két szer gátolta egymás hatását, akkor beszélhetünk antagonizmusról.

## EREDMÉNYEK

### **Micafungin iránti érzékenység vizsgálata mikrodilúciós módszerrel**

RPMI-1640-ben az összes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. parapsilosis* izolátum érzékenynek bizonyult a módosított fajspecifikus CLSI határértékeket figyelembe véve. Ötven százalék humán szérummal kiegészített tápközegben az összes *Candida* faj megfelelő növekedést mutatott, a MIC értékek 4-128x nagyobbak voltak az RPMI-1640-ben tapasztalathoz képest. Négyszeres növekedés két *C. metapsilosis* izolátumnál volt tapasztalható, míg a legmagasabb, 128x-os csupán egy *C. inconspicua* esetében. Leggyakrabban a 64x-es MIC érték növekedés fordult elő (29-ből 11 izolátumnál).

### **Az idő-ölés kísérletek eredményei micafungin esetében**

A MICA fungisztatikus aktivitást mutatott RPMI-1640-ben az összes *C. albicans* és *C. tropicalis* izolátumokkal szemben, még a legmagasabb, 16x-os MIC értéknél is. A többi faj esetében  $\geq 2-8x$  MIC-nél fungicid hatás volt megfigyelhető 48 óra után.

A tápközeghez adott humán szérum jelentősen csökkentette a MICA aktivitását az összes vizsgált izolátumnál. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* esetében csak fungisztatikus hatású volt a szer, míg a többi *Candida* fajnál jelentősen magasabb koncentrációértéknél következett be az ölü hatás RPMI-1640-nel összehasonlítva.

Humán szérum jelenlétében a MICA már 1-2x MIC-nél fungisztatikusnak bizonyult *C. albicans* izolátumokkal szemben, míg a legmagasabb gyógyszerkoncentráción 48 óra után  $-\log 1,54$  és  $-\log 2,78$  CFU/ml mértékben csökkent a sejtszám.

*C. tropicalis* és *C. glabrata* izolátumokkal szemben a MICA az idő-ölés kísérletekben fungisztikus hatású volt 1 mg/l koncentráción (1x MIC) RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében. *C. tropicalis* ellen a gyógyszer a legmagasabb koncentrációin is csak fungisztikus hatást produkált, míg *C. glabrata* esetében a  $\geq 2$ x MIC 24 óra után már fungicidnek bizonyult.

*C. krusei*-vel szemben 1x MIC értéknél 24 óra után fungisztikus hatású volt a MICA, de ez a hatás a következő 24 óra során megszűnt. Tizenhat mg/l gyógyszerkoncentráción fungisztikus és fungicid hatás is érvényesült, míg 32 mg/l-en (4x MIC) 48 óra elteltével az összes izolátumra ölü (fungicid) hatást fejtett ki a gyógyszer.

A MICA fungisztikus hatással rendelkező *C. inconspicua* izolátumaival szemben 1-2 mg/l-en. Ennél magasabb koncentrációkon ( $\geq 2$ -4x MIC) már 12 óra után ölü hatás volt megfigyelhető.

A *C. metapsilosis* esetében a magas koncentrációjú MICA erősen fungisztikus hatással rendelkezik. Ezzel szemben *C. parapsilosis* és *C. orthopsilosis* ATCC tesztörzseknél 8 mg/l-en, míg a klinikai izolátumoknál 32-64 mg/l-en (1-2x MIC) figyelhető meg gyenge fungisztikus hatás.

### ***Candida* fajok caspofunginra és nikkomycin Z-re vonatkoztatott MIC értékei**

A CAS MIC értékei a *C. albicans*, a *C. dubliniensis*, a *C. tropicalis* és a *C. glabrata* esetében 0,015-0,06 mg/l között változtak. Ettől magasabb értékeket a *C. orthopsilosis* (0,12 mg/l) és *C. metapsilosis* (0,25 mg/l) izolátumok vettek fel, míg a *C. parapsilosis*-oknak 0,5-1 mg/l közötti MIC értékeket figyeltünk meg, de még ez is a módosított érzékenységi határértéken belül maradt.

Egyik *C. tropicalis* és *C. glabrata* izolátumnál sem tapasztaltunk prominens csökkenést a gombakontrollhoz képest NIK-vel szemben. A többi faj MIC értékei NIK esetén 1-8 mg/l között változtak, kivéve a *C. albicans* 17433-at, ahol már 0,25 mg/l-en megfigyelhető volt a gátlás.

### **A caspofungin gombaellenes hatása az idő függvényében**

*C. albicans* izolátumokra jellemző, hogy magas gyógyszerkoncentrációban paradox növekedést mutatnak. Ez a jelenség a 4780-as és a 17433-as izolátumnál 8-16 mg/l koncentráción következik be, míg a másik három törzs esetében (10920, 19627 és 19888) 4-16 mg/l között volt megfigyelhető. Alacsonyabb gyógyszerkoncentráción (0,12-2 mg/l) fungicid hatású volt a szer.

A *C. tropicalis* izolátumok esetében szintén megfigyelhető a paradox növekedés. A *C. tropicalis* 3404-es és 375-ös izolátumoknál 8-16 mg/l-en, míg a többi három izolátumnál (555, 5093 és 8640) 16 mg/l gyógyszerkoncentráción.

A vizsgált *C. glabrata* izolátumok közül hárommal szemben (2712, 14545 és 27510) a CAS fungisztatikus hatást fejtett ki 48 óra után, míg a 69-es és 6605-ös törzs ellen fungicid volt a szer, habár 24 óra elteltével még paradox növekedés volt megfigyelhető 8-16 mg/l-en.

A *C. parapsilosis* 9150 és a CP117 izolátumok paradox növekedést mutattak 8-16 mg/l CAS koncentráció jelenlétében. Másik két vizsgált izolátum esetében (CP120, CP121) nem volt megfigyelhető a jelenség és minden gyógyszerkoncentráción fungisztatikus hatású volt a szer.

Az összes CAS koncentráción fungisztatikus hatás jelentkezett a *C. dubliniensis* izolátumokkal szemben. A *C. metapsilosis* CP5 esetében  $\geq 1$  mg/l, míg CP86-nál  $\geq 8$  mg/l fungicid hatás volt megfigyelhető. A *C. orthopsilosis* CP85 izolátum

paradox növekedést mutatott 8-16 mg/l CAS koncentráción, míg a CP125-ös izolátummal szemben 16 mg/l-en fungicid volt a szer.

### **A nikkomycin Z gombaellenes hatása az idő függvényében**

A NIK idő-ölés kísérletekben fungisztatikus hatást mutatott azon izolátumokkal szemben, ahol a MIC érték 0,25-4 mg/l között volt a mikrodilúciós módszer során. A 8 mg/l NIK-t tartalmazó csövek (*C. albicans* 10920, *C. parapsilosis* 9150, *C. orthopsilosis* CP85 valamint az összes *C. tropicalis* és *C. glabrata*) idő-ölés görbéje a kontrollhoz volt hasonló.

### **Az idő-ölés kísérletek eredményei caspofungin + nikkomycin Z kombináció esetében**

Antagonizmus a CAS és a NIK között nem volt megfigyelhető. Szinergizmus a *C. albicans* 10920, a *C. tropicalis* 555, a *C. glabrata* 69 és 6605, illetve a *C. parapsilosis* 9150 és CP121 izolátumoknál tapasztaltunk, ami relatíve magas CAS koncentráción ( $\geq 4$  mg/l) és még MIC érték alatti NIK koncentráción (1 mg/l-en) is megjelent. A többi esetben a két szer indifferens volt egymásra nézve, mely nagy részben fungicid hatással párosult, kivéve a *C. dubliniensis* izolátumokat és a szinergizmust nem mutató *C. glabrata*-kat. A NIK minden esetben megszüntette a CAS-nál tapasztalt paradox növekedést.

Azon *Candida* izolátumoknál, melyekkel szemben szinergizmust mutat a CAS + NIK kombináció, jól megfigyelhető, hogy 48 óra után minden gyógyszerkombinációnál fungicid hatás tapasztalható annak ellenére, hogy a NIK nem csökkentette a gombatelepek számát monoterápiás szerként alkalmazva. A paradox növekedést a kombináció minden esetben megszüntette, habár *C. tropicalis* 555-ös izolátumnál 8 és 12 óránál a két legmagasabb, míg 24 óránál a 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK gyógyszerkoncentráció fungisztatikus hatást mutatott, míg az alacsonyabb dózisok fungicidnek bizonyultak.

Szinergizmust nem mutató *C. parapsilosis* CP117 esetében csak a 4-8-16 mg/l CAS + 4 mg/l NIK bizonyult fungicid hatásúnak, az ettől alacsonyabb koncentrációkon fungisztatikus volt a szer 48 óra elteltével, míg a 0,12 mg/l CAS + 4 mg/l NIK hasonló lefutást mutatott a kontroll görbéhez képest.

### **Idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 + 50% humán szérumban**

A CAS MIC értékei 50% humán szérumban kiegészített tápközegben *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. tropicalis* fajoknál 0,12 mg/l volt, ami 2-8x-os növekedést jelent RPMI-1640-hez képest. *C. glabrata* (MIC= 0,5 mg/l), *C. parapsilosis* (MIC= 8 mg/l) és *C. orthopsilosis* (1 mg/l) 8-16x-os MIC emelkedést mutatott, míg *C. metapsilosis* izolátumok MIC értéke a 4x-esére emelkedett (1 mg/l) humán szérumban tápközegben.

Egy törzsnél sem fordult elő paradox növekedés 50% humán szérumban tartalmazó közegben. A 0,12 mg/l gyógyszerkoncentráció minden vizsgált izolátum esetében hatástalannak bizonyult, azaz a gombák erőteljes növekedést mutattak. A *C. parapsilosis sensu lato* összes tagjánál az 1 mg/l sem gátolta a gomba növekedését, míg *C. parapsilosis* 9150 izolátum esetében még a legmagasabb koncentráció is hatástalan volt. Fungicid hatás a *C. albicans*, *C. tropicalis* és a *C. glabrata* 6605-ös izolátumainál volt megfigyelhető 16 mg/l gyógyszerkoncentráción.

*C. albicans* 17433 és *C. glabrata* 6605 izolátumok idő-ölés görbéje alapján elmondható, hogy a monoterápiás szerként adott NIK mellett a legalacsonyabb CAS dózissal kombinált 8 mg/l NIK is hatástalannak bizonyult 48 óra elteltével. Az 1 és 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK kombináció 48 óra után fungicid hatást fejtett ki.

*C. tropicalis* 555 izolátum esetében csupán két monoterápiás dózis, a 8 mg/l NIK és a 0,12 mg/l CAS nem mutatott hatékonyságot. A többi gyógyszerkoncentrációkon erősen fungisztikus (0,12 CAS + 8 mg/l NIK) és fungicid (1 és 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK) hatás érvényesült 48 óra után.

A *C. parapsilosis* 9150 izolátum idő-ölés görbájéről leolvasható, hogy 48 óra elteltével csupán a legmagasabb koncentrációjú kombináció, a 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK csökkentette a gombatelepek számát az egyedül alkalmazott 16 mg/l CAS-hoz hasonlóan; gyenge fungisztikus hatás volt megfigyelhető. A többi gyógyszerkoncentráció nem volt hatásos.

A CAS + NIK kombináció között szinergizmus *C. tropicalis* 555 és *C. albicans* 17443 izolátumoknál volt megfigyelhető 0,12 mg/l CAS koncentrációnál, míg *C. albicans* 10920 esetében az 1 és a 0,12 mg/l gyógyszerkoncentráció is szinergizmust mutatott. Az összes többi izolátumot figyelembe véve a két szer kombinációja indifferens (additív) volt. A *C. parapsilosis* esetében, ahol a monoterápiás szerként adott CAS hatástalannak bizonyult, a kombinációban használt CAS + NIK sem okozott jelentős telepszámcsökkenést.

## MEGBESZÉLÉS

Az invazív candidiázis egy állandóan jelenlevő közegészségügyi probléma. Prevalenciája és mortalitása már több mint egy évtizede változatlan annak ellenére is, hogy az antifungális terápia területe folyamatosan fejlődik. Az 1980-as évek eleje óta a gombás fertőzések egyre nagyobb arányban jelentek meg az immunszuppresszáltak, illetve a kórházban fekvő súlyos alapbetegségtől szenvedő betegek körében.

A sejtfalszintézist gátló echinocandinok bevezetése nagy áttörést jelentett a klinikai gyakorlatban kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságaik miatt. *In vitro* kísérletekben a *Candida* fajok MIC értéke az echinocandinok iránt általában alacsony, míg néhány faj, mint például a *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* esetében  $\geq 2$  mg/l MIC értékek is előfordulnak.

Mindezek mellett magas MIC ( $> 2$  mg/l) értékkel rendelkező *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. tropicalis* klinikai izolátumokat is leírtak már, ami a glükán-szintáz enzim Fks1 alegységének a HS1 és HS2 régióiban történt aminosav változása miatt fordulhat elő.

Az előbb említett, aminosavcsereben megnyilvánuló rezisztenciát általában elkülönítik a magas echinocandin koncentráció jelenlétében történő, a sokszor jóval a MIC érték feletti gombanövekedéstől. Ez a paradox jelenség egy stresszválasz-reakció, mely során a túlélő sejtek sejtfalában a 1,3- $\beta$  glükánt felváltja a kitin. A magas CAS koncentráció a *C. albicans* sejtfal 1,3- $\beta$  glükán mennyiségét 81 %-ban csökkentette, míg a kitin szintet hatszorosra növelte.

Az echinocandinoknak humán szérumban jelenlétében magas a fehérjekötő képessége, ezért *in vitro* kísérletekben 50% humán szérummal kiegészített tápközeg is alkalmazható, hogy az *in vivo* körülmények minél hitelesebben

legyenek modellezve. A humán szérum hatása az echinocandinokra még nem teljesen tisztázott, de nem valószínű, hogy *in vivo* szerepe lehet a paradox növekedésnek, akár az egyszeri nagy dózisú echinocandin terápiánál sem, mivel a humán szérum, illetve az egyéb szérum faktorok megszüntetik a paradox növekedést a gyakorlatban használt gyógyszerkoncentrációkon.

Mindezen adatok ellenére a közelmúltban sikerült először leírni a klinikumban egy, a kitin szintézis fokozódása következtében fellépő echinocandin rezisztenciát. Egy 51 éves, súlyos májelégtelenségben szenvedő beteg CAS-nal történő empirikus terápiáját követően (70 mg telítő dózis után 35 mg napi dózis) olyan ritka *C. albicans*-t izoláltak vérből, ami mind FKS mutációval (HS1 régióban a 645-ös szerin cseréje prolinra), mind pedig, négyszer magasabb kitin szinttel rendelkezett a vad típushoz viszonyítva. Tehát úgy tűnik, bizonyos esetekben *in vivo* is számítani kell echinocandin terápia során a kompenzatórikus kitin szint megnövekedésére és ezáltal a gyógyszer hatástalanságára.

A MICA-nal végzett kísérleteinkben a MIC értékek RPMI-1640 tápközegben a módosított érzékenységi határértéken belül mozogtak, humán szérum jelenlétében pedig a 4-128x-ára emelkedtek.

A MICA hatékony volt 50% humán szérum jelenlétében az összes vizsgált *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* és *C. inconspicua* izolátumokkal szemben  $\leq 4$  mg/l koncentráción.

Habár ezt, a szérumban és a szövetekben is elérhető átlagos MICA koncentrációt a klinikumban elfogadott, 100 mg/kg napi dózis alkalmazásával nem biztos, hogy elérjük, az emelt, 150 mg/kg/nap gyógyszerdózis már hatékony vér és szöveti MICA szintet biztosíthat.

A *C. krusei* kevésbé tűnt érzékenynek MICA iránt az *in vitro* kísérletek során, mivel fungisztikus hatás csak  $\geq 16$  mg/l-n fordult elő, ami arra enged következtetni, hogy a 150 mg/kg/nap dózis sem elegendő *C. krusei* által kiváltott candidiázis során.

A jelenlegi és a régebbi eredmények is azt mutatják, hogy *C. parapsilosis* által okozott invazív candidiázis kezelésére az echinocandinok nem az elsőként ajánlott antifungális szerek, mégis az emelt napi dózis megfelelően magas gyógyszer csúcskoncentrációt ( $C_{max}$ ) eredményezhet szérumban.

Emellett a faj csökkent virulenciája a többi *Candida* fajjal összehasonlítva szintén fontos szerepet játszhat az echinocandinok hatásosságában. Ennek ellenére szoros összefüggést vélnek felfedezni az echinocandin használat és a *C. parapsilosis* fertőzés során létrejött candidémia újboli megjelenésével.

A *C. orthopsilosis* hasonló tulajdonságokat mutatott, mint a *C. parapsilosis*, míg a *C. metapsilosis* izolátumok esetében már 1-8 mg/l koncentráción fungisztikus hatás volt megfigyelhető annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis sensu lato* csoportnak mindhárom tagja ugyanazon aminosavcserével rendelkezik az FKS alegységben.

A CAS-nal végzett tanulmány során az idő-ölés kísérlet hasznos módszernek bizonyult a paradox növekedés vizsgálatára NIK és humán szérum jelenlétében. A kísérlet során paradox növekedés RPMI-1640 tápközegben a *C. albicans*, *C. tropicalis*, két *C. parapsilosis* és egy *C. orthopsilosis* izolátumok esetében volt tapasztalható olyan gyógyszerkoncentrációkon (kivéve a 3 *C. tropicalis* izolátumot), melyek normál dozírozási stratégia mellett a humán szérumban is elérhetőek (12,1 mg/l).

A kitin szintézis gátló NIK MIC meghatározása során a legmagasabb, 8 mg/l koncentráció sem hozott prominens gátlást *C. tropicalis* és *C. glabrata*

izolátumok esetében, míg a többi fajnál elég széles skálán mozogtak a MIC értékek (0,25-8 mg/l).

A CAS + NIK kombináció alkalmazása megszüntette a paradox növekedést, ami gyakran még a NIK, MIC alatti koncentrációin is megfigyelhető volt. Emellett a NIK fokozta a CAS aktivitását azon izolátumok esetében, melyeknél paradox növekedés nem volt tapasztalható.

Ötven százalék humán szérumot tartalmazó tápközegben a paradox növekedés megszűnt, ezzel szemben fontos megjegyezni, hogy a CAS hatékonysága jelentősen lecsökkent az összes vizsgált *Candida* faj esetében. A gyógyszer ezen aktivitásváltozása valószínűleg a 96,5%-os fehérjekötő képesség miatt jelentkezhet.

Szérummal kiegészített RPMI-1640-ben már 1 mg/l CAS koncentráción erős fungisztatikus vagy fungicid hatás érvényesült a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. dubliniensis* fajok ellen. *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok esetében csak a 16-32 mg/l CAS mutatott aktivitást, míg a *C. parapsilosis*-szal szemben csupán gyenge fungisztatikus hatás volt megfigyelhető. CAS + NIK kombináció csak *C. albicans* 10920 és 17433, illetve *C. tropicalis* 555 izolátumok esetében okozott szinergista hatást az alacsonyabb CAS koncentrációértékeknél. A többi törzs esetében nem változott jelentősen a gombaszám a kombináció alkalmazásával RPMI-1640 + 50% szérum közegben.

Habár a szérummal kiegészített tápközegben végzett érzékenységi vizsgálatok jobban utánozzák az emberi szervezetben zajló folyamatokat, emellett pedig könnyebben el lehet különíteni az FKS mutánsokat a vad típustól, csupán néhány MIC meghatározást végeztek eddig humán vagy szarvasmarha szérummal.

Ahogy a MIC eredmények mutatják, a gombák érzékenysége közvetlenül függ a szérumban jelenlététől, viszont a kísérletekben használható szérumban koncentráció mennyisége még nem tisztázott.

Az invazív gombafertőzések kimenetelét döntően a kórokozó virulenciája, az alapbetegség és a fehérvérsejtek száma határozza meg. Az *in vitro* farmakodinámiás vizsgálatok szerepet játszanak az adott MIC értékkel rendelkező kórokozó gátlásában vagy elölésében a kérdéses antifungális szer esetén. Ismerve a gombaellenes szer farmakokinetikáját (humán vagy kísérletes állatmodellek által) lehetőség van arra, hogy a gyógyszeres terápia tervezésével az invazív gombafertőzés kezelése még eredményesebb legyen.

Minezen erőfeszítések ellenére, nagy lehet a különbség az *in vitro* érzékenyek minősülő kórokozó kezelése és a végkimenetel között. A terápiás sikertelenségek jelenlegi magas száma vezetett az utóbbi 1-2 évben a fajspecifikus határértékek bevezetéséhez.

A humán szérumban végzett vizsgálataink eredményei tovább javíthatják a betegek gyógyulási esélyeit, mivel világosan mutatják a két, általunk vizsgált echinocandin esetén, hogy a szérumban csökken az antifungális hatás. Ez mindenképpen azt jelzi, hogy nagyobb echinocandin dózisok valószínűleg jobb terápiás hatást eredményeznek, bár ez a stratégia sokkal több anyagi ráfordítással jár. A szérumban végzett vizsgálatok eredményeinek a felhasználása a határértékek jövőbeli, esetleges módosításánál fontosnak tűnik.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérletek során két echinocandin, a micafungin és a caspofungin *in vitro* aktivitását tanulmányoztuk a klinikailag fontos *Candida* fajokkal szemben RPMI-1640, illetve 50% humán szérummal kiegészített tápközegben, mikro- és makrodilúciós módszerekkel. Ugyancsak vizsgáltuk a nikkomycin Z-nek és a szérumnak a hatását caspofungin esetén paradox növekedést mutató és paradox növekedést nem mutató *Candida* izolátumok esetén.

Az eredmények alapján mind a caspofungin, mind pedig, a micafungin *in vitro* hatékonysága csökkent 50% humán szérum jelenlétében a klinikailag fontos *Candida* fajok ellen. Micafungin esetén a MIC értékek közelítettek, vagy néhány faj esetében jóval az újonnan bevezetett érzékenységi határérték felé emelkedtek szérumos tápközegben. Vizsgálataink alapján az olyan magas micafungin koncentráción gátolható gombák, mint a *C. parapsilosis*, a *C. orthopsilosis* vagy a *C. krusei* nagyobb napi dózisú terápiát igényelhetnek.

A caspofunginnal végzett vizsgálatok során bebizonyítottuk, hogy a nikkomycin Z illetve 50% humán szérum alkalmazása megszünteti a néhány *Candida* fajnál észlelt paradox növekedést. Bár a paradox növekedés csupán egy *in vitro* tapasztalható jelenségnek tűnik, a nikkomycin Z-vel kapott eredményeink segíthetnek, hogy a jövőben más gyógyszerekkel együtt adva hatékonyabb kezelési stratégiákat lehessen kidolgozni, mivel kísérleteinkben is több *Candida* fajjal szemben szinergista hatást mutatott a caspofunginnal kombinálva.

A humán szérummal végzett vizsgálataink eredményei tovább javíthatják a betegek gyógyulási esélyeit, mivel világosan mutatják a két, általunk vizsgált echinocandin esetén, hogy a szérumban csökken az antifungális hatás. Az általunk kapott eredményeket állatkísérletekben kell a közeljövőben megerősíteni.

Iktatószám: DEENKÉTK/267/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Földi Richárd

Neptun kód: A6IM32

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Földi, R.**, Szilágyi, J., Kardos, G., Berényi, R., Kovács, R., Majoros, L.: Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73 (4), 338-342, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.011>  
IF:2.528 (2011)
2. Szilágyi, J., **Földi, R.**, Sedigh, B., Kardos, G., Majoros, L.: Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high-concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology. *J. Chemother.* 24 (1), 18-25, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/1120009X12Z.0000000005>  
IF:1.084 (2011)



### További Közlemények

3. **Földi, R.**, Kovács, R., Gesztelyi, R., Kardos, G., Berényi, R., Juhász, B., Szilágyi, J., Mózes, J., Majoros, L.: Comparison of In Vitro and Vivo Efficacy of Caspofungin Against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*.  
*Mycopathologia. Epub ahead of print (2012)*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9554-7>  
IF:1.654 (2011)
4. Szilágyi, J., **Földi, R.**, Gesztelyi, R., Bayegan, S., Kardos, G., Juhász, B., Majoros, L.: Comparison of the kidney fungal burden in experimental disseminated candidiasis by species of the *Candida parapsilosis* complex treated with fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a temporarily neutropenic murine model.  
*Chemotherapy. 58 (2)*, 159-164, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000337088>  
IF:1.816 (2011)
5. Bayegan, S., Szilágyi, J., Kemény-Beke, Á., **Földi, R.**, Kardos, G., Gesztelyi, R., Juhász, B., Adnan, A., Majoros, L.: Efficacy of a single 6 mg/kg versus two 3 mg/kg caspofungin doses for treatment of disseminated candidiasis caused by *Candida albicans* in a neutropenic mouse model.  
*J. Chemother. 23 (2)*, 107-109, 2011.  
IF:1.084

**Összesített impakt faktor: 8.166**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.612**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.09.04



### ***Fontosabb előadások listája***

Varga I, Sóczó G, Kardos G, Majoros L., **Foldi R.** A Caspofungin ölü hatásának összehasonlító vizsgálata RPMI-1640 és antibiotikum medium 3 közegben *Candida dubliniensis* törzsek esetén. DEOEC TDK Konferencia 2008 Debrecen

J. Szilágyi, **R. Foldi**, S. Bayegan, G. Kardos, Á. Kemény-Beke, R. Gesztelyi, B. Juhász, A. Adnan, L. Majoros. Evaluation of the Etest method for determining micafungin MICs for 360 clinical isolates of ten *Candida* species. MMT 2010 konferencia. Keszthely

### ***Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek listája***

**Richárd Földi**, Judit Szilágyi, Gábor Kardos, Réka Berényi, Renátó Kovács, László Majoros. Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. 2nd Joint Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT & ÖGHMP, 2011. Vienna

László Majoros, Renátó Kovács, Réka Berényi, Judit Szilágyi, **Richárd Földi**, Rudolf Gesztelyi, Gábor Kardos, Béla Juhász. *In vitro* and *vivo* efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. 2nd Joint Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT & ÖGHMP, 2011. Vienna

**Földi Richárd**, Berényi Réka, Domán Marianna, Szilágyi Judit, Kovács Renátó, Kardos Gábor és Majoros László: A micafungin antifungális hatása 50% humán szérum jelenlétében nyolc *Candida* faj ellen az idő-ölés görbék felvétele esetében. V. Magyar Mikológiai Konferencia. 2012. Budapest

Köszönet illeti a Richter Gedeon gyógyszergyárat, akik a tanulmányaimat támogatták.

A kísérletek a TÁMOP 4.2.1./B-09/I/KONV-2010-0007 pályázat által valósultak meg.