

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Antifungális szerek és a farneazol kombinációjának vizsgálata *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* biofilmek ellen

Bozó Aliz

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2018

**Antifungális szerek és a farneazol kombinációjának vizsgálata *Candida albicans* és
Candida parapsilosis biofilmek ellen**

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

Írta: Bozó Aliz okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori
Iskolája Mikrobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Majoros László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Emri Tamás, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára
2018. június 18. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Kemény-Beke Ádám, PhD
Dr. Ostorházi Eszter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Emri Tamás, PhD
Dr. Kemény-Beke Ádám, PhD
Dr. Ostorházi Eszter, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme
2018. június 18. 13 óra

BEVEZETÉS

A különböző gomba fajok által okozott fertőzések prevalenciája és incidenciája az 1980-as évektől folyamatosan növekszik, különösen az immunszuppresszált, illetve a hosszú kórházi ápolást igénylő betegek körében. A legfrissebb epidemiológiai kutatások alapján a gomba eredetű invazív fertőzések 80%-át különböző *Candida* fajok okozzák, míg az *Aspergillus* nemzetség tagjai 0,3-19%-ban tehetőek felelőssé a földrajzi területtől függően.

A *Candida* fajok a normál flóra tagjaiként megtalálhatók a szájüregben, a vastagbélben, illetve a női genitális traktusban. Kommenzalista mikroorganizmusként kolonizálják a nyálkahártyák felszíneit anélkül, hogy tüneteket okoznának, azonban bizonyos körülmények között akár életet veszélyeztető fertőzések kialakulásáért is felelősek. Az elmúlt évtizedekben megnövekedett a *Candida* fajok által okozott nozokomiális infekciók száma, jelenleg a harmadik-negyedik leggyakrabban izolálható kórházi véráramfertőzést okozó mikróbák.

A beültethető orvostechikai eszközök (kanül, katéter, műbillentyű, endotracheális tubus, ízületi protézis) egyre szélesebb körű alkalmazása miatt a biofilm-asszociált fertőzések száma is megemelkedett az elmúlt két évtizedben. A *Candida* fajok a katéter-asszociált véráramfertőzések harmadik leggyakoribb kórokozói, a leggyakrabban izolálható fajok a *C. parapsilosis* komplex tagjai (42,8%), illetve a *C. albicans* (34,7%). A gomba biofilmek sikeres terápiája komoly feladatot jelent, hiszen sok esetben magas fokú rezisztencia figyelhető meg a terápia során alkalmazott gyógyszerekkel szemben. A biofilm szerkezete védelmet nyújt a gomba sejtek számára az amúgy is limitált számú szisztémás kezelésre alkalmas antimikotikumok többségével szemben, illetve elrejt azokat a gazdaszervezet immunsejtjei elől. A katéterek felszínén és lumenében képződő biofilmek kiváló forrásai lehetnek az invazív, szisztémás *Candida* fertőzéseknek. Jelenleg az IDSA (Infectious Diseases Society of America) ajánlása szerint a katéterek felszínén képződő biofilmek ellen az elfogadott „terápia” a katéter eltávolítása/cseréje, ez azonban a beteg állapota miatt nem minden esetben valósítható meg. Alternatív megoldást jelenthet olyan speciális terápiák alkalmazása, mint az antifungális “lock” terápia, azonban ezidáig nincs hivatalosan elfogadott antifungális “lock” terápia a *Candida* okozta biofilmek kezelésére. A hagyományos antifungális szerek közül az amphotericin B (AmB), illetve az echinocandinok rendelkezhetnek biofilm-ellenes aktivitással, azonban önmagukban nem minden esetben mutatnak megfelelő hatékonyságot. Egy új típusú, innovatív megoldást jelenthet a biofilmek elleni küzdelemben a konvencionális antimikotikumok alkalmazása *Candida* fajok által termelt speciális kommunikációs, úgynevezett quorum-sensing molekulákkal kombinációban.

A *Candida* biofilmek növekedése során több extracelluláris szignál molekula akkumulálódik, melyek segítségével az extracelluláris mátrixban képesek koordinálni saját metabolikus aktivitásukat, illetve a génexpressziós folyamataikat, elősegítve ezzel saját túlélésüket. Korábbi kísérletekben leírták, hogy bizonyos quorum-sensing molekulák szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazva gátolják a gombasejtek növekedését a biofilmen belül. Feltételezésünk szerint a szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazott quorum-sensing molekulák összezavarhatják a *Candida* sejtek közötti kommunikációt, ezáltal gyengül a biofilm kompakt szerkezete, ami elősegíti a tradicionális anifungális szerek nagyobb mértékű penetrációját a biofilm belsejébe. Ez különösen fontos lehet a *C. parapsilosis* esetében, amely generikusan csökkent érzékenységet mutat olyan biofilm-ellenes aktivitással rendelkező antimikotikumok iránt, mint az echinocandinok. A quorum-sensing molekulák *in vitro* potenciális szinergizáló hatása mellett szeretnénk volna megvizsgálni, hogy *in vivo* ezen molekulák alkalmazása jelent-e bármilyen terápiás előnyt olyan gyakori mukozális biofilm-asszociált fertőzésekben, mint a *C. albicans* által okozott vulvovaginitis. Reményeink szerint eredményeink hozzájárulhatnak olyan új típusú alternatív terápiák megfogalmazásához, amelyekkel hatékonyabban vehetjük fel a harcot a *Candida* fajok által képzett biofilmek ellen.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során elsődleges célunk volt olyan új típusú terápiás stratégiák megfogalmazása, amelyek segítségével sikeresen lehetne eradikálni a *C. albicans*, illetve a *C. parapsilosis* által okozott biofilm-asszociált fertőzéseket. Vizsgálatainkban tradicionális antifungális szereket kombináltunk egy gomba eredetű quorum-sensing molekulával - a farnezollal - így növelve a hagyományos antimikotikumok *in vitro* és *in vivo* hatékonyságát.

Vizsgálataink során célunk volt:

- ❖ A caspofungin, micafungin és a farnezol minimális gátló koncentrációjának meghatározása *C. parapsilosis* planktonikus sejtek és biofilmek ellen klinikai izolátumok esetében.
- ❖ A caspofungin, micafungin és a farnezol közötti kölcsönhatás vizsgálata *C. parapsilosis* klinikai izolátumok által képzett biofilmek ellen kétdimenziós „checkerboard” („sakktábla”) mikrodilúciós módszerrel.
- ❖ A caspofungin, micafungin és a farnezol által kiváltott metabolikus aktivitás csökkenés vizsgálata az idő függvényében *C. parapsilosis* klinikai izolátumok által képzett biofilmek ellen.
- ❖ A fluconazol és a farnezol minimális gátló koncentrációjának meghatározása fluconazol-érzékeny és fluconazol-rezisztens *C. albicans* klinikai izolátumok planktonikus és szesszilis populációjával szemben.
- ❖ A fluconazol és a farnezol kombinációjának *in vitro* hatékonyságának vizsgálata fluconazol-érzékeny és fluconazol-rezisztens *C. albicans* klinikai izolátumok planktonikus és szesszilis formáival szemben.
- ❖ A fluconazol és a farnezol *in vivo* hatékonyságának vizsgálata önmagukban, illetve kombinációkban *C. albicans*-szal fertőzött vulvovaginitises egérmodellben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált izolátumok

Kísérleteink során öt *C. parapsilosis sensu stricto* (16641, 17432, 17818, 10252, 9613), két fluconazol (FLU)-érzékeny (1216, 10431), illetve két FLU-rezisztens (21616, 27700) *C. albicans* klinikai izolátumot, valamint két referencia törzset [*C. parapsilosis* ATCC 22019 (American Type Culture Collection), (*C. albicans* SC5314)] vizsgáltunk. Az összes vizsgált *C. parapsilosis* izolátum hemokultúrából származott, míg a *C. albicans* izolátumokat vulvovaginitisben szenvedő páciensekből identifikáltuk. A *C. parapsilosis* valamint a *C. albicans* klinikai izolátumok azonosításához API® ID32C panelt (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország) és MALDI-TOF [(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight), (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Németország)] tömegspektrométert alkalmaztunk. A *C. parapsilosis* és *C. albicans* klinikai izolátumok, valamint a referencia törzsek biofilmképző képességét a Marcos-Zambrano és munkatársai által közölt kristályibolya-assay segítségével ellenőriztük.

A planktonikus sejtek érzékenységi vizsgálata

A caspofingin (CAS) (Sigma, Budapest, Magyarország), a micafungin (MICA) (Astellas, Tokyo, Japán), a FLU (Sigma, Budapest, Magyarország) és a farnezol (Sigma, Budapest, Magyarország) iránti MIC (minimális gátló koncentráció) értékek meghatározása a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által elfogadott M27-A3-as protokoll alapján, standard mikrodilúciós módszerrel történt RPMI-1640 tápközegben (L-glutaminnal kiegészített, hidrogén-karbonát mentes, pH=7,0 MOPS [3-(N-morpholino) propánszulfonsav] Sigma] puffer felhasználásával). “Quality” kontrollként a *C. parapsilosis* ATCC 22019-es és a *C. krusei* ATCC 6258-as törzsét használtuk. Mindkét faj izolátumai esetében a CAS, MICA és a FLU iránti érzékenység vizsgálata során 0,06-4 mg/L közötti koncentrációkat alkalmaztunk, a két FLU-rezisztens *C. albicans* izolátum esetében 2-128 mg/L közötti gyógyszer koncentrációkat vizsgáltunk. A farnezol esetén 1,17 és 300 µM közötti koncentrációkat teszteltünk. A vizsgált koncentrációkat RPMI-1640 tápközegben állítottuk össze. A gyógyszert nem tartalmazó növekedési és negatív kontroll üregek 1% metanolt tartalmaztak. A MIC értékek meghatározásához $0,5-2,5 \times 10^3$ sejt/mL gombaszuszpenziókat készítettünk, melyeket a gyógyszert tartalmazó 96 lyukú mikrotitrátor lemezek üregeibe mértünk. Ezt követően 37 °C-on 24 órán keresztül statikusan inkubáltuk a táplemezeket. MIC

értéknek azt a koncentrációt tekintettük, ahol legalább 50%-os turbiditás csökkenést tapasztaltunk a gyógyszert nem tartalmazó növekedési kontrollhoz képest. A turbiditás csökkenés meghatározása spektrofotométerrel történt 492 nm-en. A turbiditás százalékos változásának kiszámítását az alábbi abszorbancián alapuló képlet segítségével végeztük el:

$100\% \times (A_{\text{lyuk}} - A_{\text{háttér}}) / (A_{\text{gyógyszermenteslyuk}} - A_{\text{háttér}})$. A háttér abszorbanciájának mérése a gombamentes üregben történt. Az összes izolátum esetében három, egymástól független mérést végeztünk, melyek medián értékeit tüntettük fel.

Biofilm képzés

A biofilmet Pierce és munkatársai által publikált módszer segítségével hoztuk létre. Az izolátumokat két, egymás utáni napon kioltottuk Sabouraud dextróz agarra (SDA), majd a friss törzseket izolátumonként egy-egy SDA táptalajra szélesztettük. A 35 °C-on 24 órán át tartó inkubációt követően, a kinőtt gombapázsitot steril vattatampon segítségével gyűjtöttük össze, amit 25 mL fiziológiás sóoldatba beoldottunk. Az így elkészített gombaszuszpenziót lecentrifugáltuk 3000 g fordulaton 5 percig. Ezután a felülúszót pipettával leszívtuk, majd újra feltöltöttük a centrifugacsöveket 25 mL fiziológiás sóoldattal és ismételten centrifugáltuk. Ezt a lépést még egyszer megismételtük, majd a felülúszó eltávolítása után a gomba mennyiségétől függően 5-6 mL fiziológiás sóoldatot mértünk a sejtekhez. Az egyes izolátumokból Bürker-kamrában 1×10^6 Colony Forming Unit (CFU)/mL gombaszuszpenziót állítottunk be. A szuszpenzióból 100 µL-t mértünk a 96 üregű lapos aljú táplemezek (TPP, lapos aljú, polisztirol) egyes üregeibe, melyet parafilmmel fedtünk le és statikusan inkubáltuk 37 °C-on 24 órán át. Az alkalmazott negatív kontroll üregei 100 µL RPMI-1640-et tartalmaztak.

A biofilm mennyiségi meghatározása

A 24 órás biofilmet 3×200 µL fiziológiás sóoldattal mostuk, majd a táplemez egyes üregeibe 125 µL 0,1%-os kristályibolya oldatot pipettáztunk, melyet 15 percen keresztül inkubáltunk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után az oldatot eltávolítottuk, majd háromszor 200 µL sóoldattal újra mostuk a táplemez üregeit. Ezután 125 µL 30%-os ecetsavat pipettáztunk az üregekbe, hogy a biofilm által leköttött kristályibolyát kioldjuk. További 15 perces szobahőmérsékleten történő inkubáció után 100 µL felülúszót pipettával leszívtunk, melyet egy steril táplemezbe helyeztünk és spektrofotométerrel mértünk 540 nm-en. Vak oldatként 100 µL 30%-os ecetsav oldatot alkalmaztunk.

A biofilmet alkotó sejtek érzékenységi vizsgálata

A *C. parapsilosis* biofilmek CAS, MICA és farnezol iránti MIC érték meghatározását az előkísérletek során meghatározott 4-256 mg/L, 2-512 mg/L, illetve 1,17-300 µM közötti koncentrációkon vizsgáltuk. A referencia törzs (ATCC 22019) esetében alacsonyabb gyógyszer koncentrációkat alkalmaztunk (0,5-32 mg/L). A *C. albicans* esetében képzett biofilmek FLU és farnezol iránti érzékenysége vizsgálatára 8-512 mg/L és 1,17-300 µM közötti koncentrációkon történt. A biofilmek MIC értékének meghatározásához a biofilmet alkotó sejtek XTT [2,3 -bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] assay-n alapuló metabolikus aktivitását mértük. Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol legalább 50%-os volt a metabolikus aktivitás csökkenés a gyógyszermentes növekedési kontrollal összehasonlítva.

Az egy napos biofilmet 3x200 µL steril fiziológiás sóoldattal mostuk. Ezután 0,5 g/L töménységű XTT (Sigma, Budapest, Magyarország) oldat felhasználásával 1 µM végkoncentrációjú XTT/menadion (Sigma, Budapest, Magyarország, 100 mM, 100%-os acetonban oldott) oldatot készítettünk, melyből 100-100 µL-t pipettáztunk a táplemez egyes üregeibe. A táplemezt alufóliával lefedtük, majd 37 °C-os termosztátban, sötétben, statikusan inkubáltuk 2 órán keresztül. Az inkubációs idő elteltével az XTT/menadion oldat felülúszójából 80 µL-t pipetta segítségével leszívtunk, melyet steril táplemezbe helyeztünk át, amit spektrofotométerrel 492 nm hullámhosszon mértünk. A metabolikus aktivitás százalékos változásának számolásához ugyanazt az egyenletet használtuk, amit a planktonikus sejtek turbiditás változásának vizsgálatánál.

A caspofungin, micafungin, fluconazol és a farnezol közötti kölcsönhatás vizsgálata

A gyógyszerek közötti interakció megállapítása a szesszilis és a planktonikus sejtek esetén is kétdimenziós „checkerboard” (sakktábla) mikrodilúciós módszerrel történt. Az alkalmazott koncentráció tartományok megegyeznek a már korábban leírt, a planktonikus és szesszilis sejtek MIC vizsgálataiban használt koncentrációkkal. Az interakció természetének meghatározására a gátló koncentrációhányad indexet alkalmaztuk (Fractional Inhibitory Concentration Index: FICI) melyet az alábbi képlet segítségével számoltunk ki:

$$\Sigma FIC = FICA + FICB = MIC_A^{kombinációban} / MIC_A^{önmagában} + MIC_B^{kombinációban} / MIC_B^{önmagában}$$
, ahol a $MIC_A^{kombinációban}$ és $MIC_B^{kombinációban}$ a szerek kombinációban történő alkalmazása során kapott MIC értékeket jelöli, míg a $MIC_A^{önmagában}$ és a $MIC_B^{önmagában}$ a gyógyszerek külön-külön történő alkalmazása során mért MIC értékeket fejezi ki. A FIC értékeket az összes izoeffektív

kombináció esetén meghatároztuk, majd ezt követően a legalacsonyabb FIC értéket tekintettük FICI-nek, amit az alábbiak szerint interpretáltunk: szinergizmusnak tekintettük a kombinációt, ha a FICI 0,5 vagy annál kisebb értéket vett fel, indifferens az interakció, ha $>0,5$ és 4 közé esik a FICI, míg antagonizmus, ha 4-nél nagyobb értéket tapasztaltunk.

A metabolikus aktivitás változás vizsgálata az idő függvényében

A FICI-vel kapott eredményeket más módszerekkel is igyekeztünk megerősíteni, ezért vizsgáltuk a metabolikus változás ütemét az idő függvényében. Ennek a módszernek a segítségével pontosabb képet kaphattunk a gyógyszerek önmagában és kombinációkban kifejtett hatásáról illetve dinamikájáról. A módszer során a CAS és a MICA *C. parapsilosis* biofilmek ellen kifejtett hatását, míg a FLU esetében a *C. albicans* biofilm-ellenes aktivitását vizsgáltuk önmagukban, illetve farnezollal kombinációban *in vitro* körülmények között. Az XTT „checkerboard” mikrodilúciós módszerrel végzett vizsgálatok eredményei alapján a CAS és a MICA esetében a 4 mg/L, 8 mg/L és 16 mg/L végkoncentrációkat választottunk ki, melyeket a kombináció során 75 μ M farnezollal egészítettünk ki. A *C. albicans* vizsgálata során a FLU-érzékeny izolátumok, illetve a referencia törzs esetében a választott gyógyszer koncentrációk 0,5 mg/L, 8 mg/L, 64 mg/L és 512 mg/L voltak, míg a FLU-rezisztens törzsek vizsgálata során 64 mg/L, 128 mg/L, 256 mg/L és 512 mg/L koncentrációkat alkalmaztunk önmagukban, illetve 75 μ M farnezol jelenlétében.

Az egynapos biofilmeket háromszor mostuk 200 μ L fiziológias sóoldattal. A kiválasztott gyógyszer koncentrációkat RPMI-1640 tápfolyadékban készítettük el, melyeket a táplemez előre megjelölt üregeibe pipettáztunk. A kombinációk esetében mindkét gyógyszerből 100-100 μ L-t mértünk be az egyes üregekbe, míg a CAS, MICA és a FLU önmagában történő vizsgálata során 100 μ L-t mértünk a különböző gyógyszer koncentrációkból a táplemez egyes üregeibe, melyet 100 μ L tápfolyadékkal egészítettünk ki. A negatív kontroll üregeibe 200 μ L RPMI-1640-et pipettáztunk. Az előre meghatározott, 37 °C-on történő inkubációs idő (3, 6, 9, 12 és 24 óra) letelte után az adott időponthoz tartozó üregben lévő biofilmet 3x200 μ L fiziológias sóoldattal mostuk, majd a metabolikus aktivitást mértük a már korábban leírt módszer alapján. Az összes izolátum esetében legalább három párhuzamos mérést végeztünk. Az eredményeket grafikonon ábrázoltuk GraphPad Prism 6.05 segítségével. A még gyógyszert nem tartalmazó tápfolyadékban 0 óránál mért metabolikus aktivitást tekintettük 100%-nak.

Adatok elemzése

Az egyes koncentrációknál tapasztalható metabolikus aktivitásváltozást Dunnett-tesztel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (One-way ANOVA) hasonlítottuk a kezeletlen kontroll sejtek metabolikus aktivitásához. Az adott gyógyszer koncentrációk, valamint az ezekhez a koncentrációkhoz tartozó kombinációk közötti szignifikanciát Sidak-tesztel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (One-way ANOVA) határoztuk meg. Az eredményt abban az esetben tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$.

***In vivo* kísérletek**

A kísérlet során alkalmazott egerek

A kísérletekben csoportonként 10 db, 22-23 g-os BALB/c típusú nőstény, immunkompetens egeret használtunk fel (Charles River Laboratories), melyeket a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című előírás alapján tartottunk. Az *in vivo* kísérletek engedélyszáma: 12/2014 DE MÁB.

A fertőzés folyamata

Az egerek 50 μ L szezámolajban oldott ösztradiol-valerátot (10 mg/mL) kaptak szubkután 3 nappal a fertőzés előtt. Az oltóanyag készítéséhez felhasznált *C. albicans* törzseket két egymás utáni napon SDA táptalajra oltottuk ki, majd a frissített izolátumokat 3-4 SDA felületén szélesztettük. A táptalajokat 35°C-on 24 órán keresztül inkubáltuk, majd a kinőtt pázsitot steril vattatamponnal gyűjtöttük össze és steril fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk. A gomba szuszpenziókat 3000 g fordulaton centrifugáltuk 10 percen keresztül, majd a felülúszót pipettával leszívtuk. Ezután a leülepedett gombasejtekhez 25 mL steril fiziológiás sóoldatot adtunk, majd újra centrifugáltuk. A mosási folyamatot összesen négyszer ismételtük meg, majd az utolsó centrifugálás után 8 mL fiziológiás sóoldatot pipettáztunk a gombasejtekhez. A szuszpenzióból két lépésben 1:10 arányú hígítást készítettünk a Bürker-kamrában történő számoláshoz. A csíraszám beállításának ellenőrzését kvantitatív kioltással végeztük. Az egereket 25 μ L gomba szuszpenzióval fertőztük intravaginálisan. Korábban végzett előkísérleteink alapján a fertőző dózis $1-1,2 \times 10^7$ CFU volt egerenként.

Antifungális terápia

A terápiát 24 órával a fertőzést követően kezdtük el az alábbi séma alkalmazásával: 5 mg/kg/nap FLU (intraperitoneálisan), 35 mg/kg egyszeri FLU (intraperitoneálisan), 150 μ M/nap farnezol (intravaginálisan), 300 μ M/nap farnezol (intravaginálisan), 5 mg/kg/nap FLU (i.p.) + 150 μ M/nap farnezol (intravaginálisan), 5 mg/kg/nap FLU (i.p.) + 300 μ M/nap farnezol (intravaginálisan). A kezelés során 0,5 mL FLU-t adtunk be intraperitoneálisan, melyet egy óra elteltével 25 μ L intravaginálisan alkalmazott farnezol követett. Az *in vivo* célokra felhasznált farnezol törzsoldatot a használat előtt 0,25%-os Tween 80-ban oldottuk fel. A kontroll egerek 0,5 mL fiziológiás sóoldatot kaptak intraperitoneálisan, illetve 25 μ L 0,25%-os Tween 80-at intravaginálisan. A fertőzést követő negyedik napon az egereket cervikális diszlokációval elpusztítottuk, majd felboncoltuk. A kvantitatív csíraszám meghatározásához vaginájukat eltávolítottuk, majd lemértük. Steril dörzscsészében 1 mL fiziológiás sóoldat hozzáadásával homogenizátumot készítettünk, majd az egyes mintákból 1:10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk. A hígított mintákból 100 μ L-t kioltottunk SDA agarra. A táptalajok 35°C-on, 48 órán át tartó inkubációját követően a kinőtt telepeket megszámoltuk. A kitenyészett gombák szignifikancia vizsgálata Kruskal-Wallis tesztel történt (GraphPadPrism 6.05 Windows). Az eredményt szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

EREDMÉNYEK

A caspofungin és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel *Candida parapsilosis* planktonikus sejtek esetén

A kísérleteink során az egyik vizsgált *C. parapsilosis* klinikai izolátum (9613) és a referencia törzs (ATCC 22019) érzékenynek bizonyult a CAS-nal szemben, míg a 16641, 17432, 10252 és a 17818-as izolátum mérsékelten érzékeny fenotípust mutatott a 2011-ben módosított fajspecifikus CLSI határértékek szerint. A CAS és a farnezol kombinációjának alkalmazása során a CAS iránti MIC értékek esetében 2-64-szeres csökkenést figyeltünk meg az önmagában alkalmazott CAS iránti MIC értékekhez képest. A kombinációban alkalmazott farnezol MIC értékeinél 4-32-szeres csökkenést tapasztaltunk a klinikai izolátumok vizsgálatakor. A referencia törzs (ATCC 22019) esetében a kombinációkban mért MIC értéket illetően 2-8-szoros csökkenés volt megfigyelhető.

A caspofungin és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel *Candida parapsilosis* szesszilis sejtek esetén

A klinikai izolátumok által képzett biofilmek vizsgálata esetében a CAS iránti MIC értékek jóval magasabb értéket mutattak (32-256 mg/L) a planktonikus sejtekhez képest. A farnezollal történő kombináció esetében a medián MIC értékek az összes klinikai izolátum esetében lecsökkentek 4 mg/L-re. Ez 8-64-szeres csökkenésnek felel meg, míg a farnezol iránti MIC értékek változása a planktonikus sejtekhez hasonlóan 4-32-szeres csökkentést mutatott. A referencia törzsnél a vizsgált gyógyszer esetében csak egy hígítási fokkal csökkent a MIC érték. A planktonikus, illetve a szesszilis sejtek vizsgálata során a CAS iránti medián MIC értékek megegyezést mutattak az ATCC 22019 törzs esetében (2 mg/L), ami valószínűsíthetően az alacsonyabb biofilmképző képességgel magyarázható.

A caspofungin és a farnezol közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata *Candida parapsilosis* izolátumok esetén

A kombináció (CAS és farnezol) alkalmazása esetén az alkalmazott klinikai izolátumok planktonikus sejtjeinél egy izolátum kivételével (17432) indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk. Ezzel ellentétben a szesszilis sejtek vizsgálatakor a farnezol a CAS jelenlétében mindegyik izolátum esetében szinergista hatást fejtett ki ($FICI_{median}$: 0,155-0,5). A két

alkalmazott szer közötti *in vitro* interakció vizsgálata során antagonizmust egyik esetben sem tapasztaltunk (FICI: <4). A referencia törzs esetében mind a planktonikus, mind a szesszilis sejtek esetében indifferens kölcsönhatást figyeltünk meg.

A metabolikus aktivitás változása az idő függvényében caspofungin és farnezol esetében *Candida parapsilosis* által képzett biofilmek ellen

Egy, a „checkerboard” assay-vel párhuzamosan végzett kísérletben a kezelt szesszilis sejtek metabolikus aktivitás változásait hasonlítottuk össze a kezeletlen sejtek metabolikus aktivitásával. A CAS különböző koncentrációi (4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L) nem csökkentették szignifikánsan a szesszilis sejtek metabolikus aktivitását a kontroll sejtekhez viszonyítva az első 3 órában. Hat és huszonnégy óra között azonban egy koncentrációfüggő módon bekövetkező szignifikáns metabolikus aktivitás csökkenés volt megfigyelhető. Ugyanakkor a CAS és FAR mindhárom vizsgált kombinációjában (4 mg/L+75 µM, 8 mg/L+ 75 µM, 16 mg/L+ 75 µM) jelentősen és nagymértékben csökkentette a biofilmek metabolikus aktivitását a kísérlet teljes időtartama alatt a kontrollal összehasonlítva ($p<0,05-0,001$). Mindazonáltal az első 12 órára jellemző markáns metabolikus aktivitás csökkenés után lassú növekedés figyelhető meg, azaz a kombinációk a legnagyobb hatást elsősorban az első 12 órában fejtik ki. A farnezol 8 és 16 mg/L CAS-nal kombinációban 3 és 24 óra között szignifikánsan jobbnak bizonyult a farnezol nélküli CAS koncentrációkkal összehasonlítva ($p<0,001-0,05$). A 4 mg/L CAS és farnezol kombináció csak az első 9 órában volt szignifikánsan jobb a farnezol nélküli CAS-nal összehasonlítva ($p<0,01-0,05$).

A micafungin és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel a *Candida parapsilosis* planktonikus sejtek esetén

A vizsgálatok során a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok (16641, 17818, 10252) és a referencia törzs (ATCC 22019) érzékenyek, illetve mérsékelten érzékenyek (17432, 9613) voltak a MICA-nal szemben a CLSI érvényben lévő érzékenységi határértékei alapján. A klinikai izolátumok esetében a MICA és farnezol együttesen alkalmazva jelentős, 2-64-szeres csökkenést okozott az önmagában vizsgált MICA MIC értékekhez képest. A kombináció alkalmazása során a farnezol a MIC értékek 16-256-szoros csökkenését okozta a klinikai izolátumok esetében. A referencia törzs (ATCC 22019) vizsgálatakor a mért MIC értékekben 8-16-szoros csökkenést okozott a kombináció alkalmazása.

A micafungin és a farneazol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel *Candida parapsilosis* szesszilis sejtek esetén

A klinikai izolátumok által létrehozott biofilmek vizsgálata esetén a mért MICA iránti MIC értékek magasabbak voltak (16-512 mg/L) a planktonikus sejtekhez viszonyítva. A két szer kombinációja (MICA és farneazol) azonban lecsökkentette a minimális gátló koncentrációkat 4-8 mg/L-re. A farneazol iránti MIC értékek kisebb mértékű (8-16-szoros) csökkenést mutattak a kombináció alkalmazásakor. Az ATCC 22019 vizsgálata során a vizsgált gyógyszert figyelembe véve felére csökkent a koncentráció. Megjegyzendő, hogy mind a planktonikus, mind a szesszilis sejtek esetén a MICA iránti medián MIC értékek azonosak voltak (1 mg/L).

A micafungin és a farneazol közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata *Candida parapsilosis* izolátumok esetén

A FICI értékek minden esetben 4 alatt voltak, tehát antagonista kölcsönhatást egyik esetben sem tapasztaltunk. A MICA és farneazol kombinációjának vizsgálata során szinergizmus volt megfigyelhető az összes klinikai izolátum planktonikus és a szesszilis sejtjei esetén is. A biofilmek esetén jellemző nagyobb mértékű szinergista kölcsönhatás tényét bizonyítja a párhuzamos mérések során látható $FICI \leq 0,5$ értékek. A planktonikus sejteknél több izolátum esetén is 0,5 feletti értéket figyeltünk meg (17818, 10252, 9613). Az ATCC 22019 referencia törzsnél a planktonikus és szesszilis sejtek vizsgálatakor is indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk.

A metabolikus aktivitás változása az idő függvényében micafungin és farneazol esetében *Candida parapsilosis* által képzett biofilmek ellen

A metabolikus aktivitás változás dinamikáján látszik, hogy a MICA a CAS-hoz hasonlóan önmagában koncentrációfüggő módon viselkedett; 4 és 8 mg/L MICA koncentráció az első 9 órában ($p < 0,05$ - $0,001$), míg a 16 mg/L MICA koncentráció az első 12 órában szignifikánsan csökkentette a biofilmek metabolikus aktivitását a kontroll sejtekhez viszonyítva ($p < 0,001$). Huszonnégy óra elteltével azonban már nem detektáltunk szignifikáns különbséget a kezeltlen sejtekkel összehasonlítva, hanem ismét folyamatos metabolikus aktivitás növekedés volt tapasztalható. A MICA és farneazol mindhárom vizsgált kombinációja esetén (4 mg/L+75 μ M, 8 mg/L+75 μ M, 16 mg/L+75 μ M) a metabolikus aktivitás szignifikáns csökkenését tapasztaltuk az első 12 órában ($p < 0,001$). Huszonnégy óra elteltével azonban a

metabolikus aktivitás a kontrollal hasonló mértéket mutatott, tehát a kombinációban jelentkező metabolikus aktivitás gátlása csak részben volt megfigyelhető. A CAS-nal ellentétben a MICA esetében az első 9 órában tapasztaltunk erőteljes metabolikus aktivitás csökkenést a kombinációk alkalmazása során. A 9. órától azonban a metabolikus aktivitás erőteljes növekedésnek indult, ami 24 órára a kontrollhoz hasonló értékeket vett fel. Ennek ellenére mindhárom MICA+farnezol kombináció az első 12 órában szignifikánsan csökkentette a gomba sejtek metabolikus aktivitását a farnezol mentes MICA koncentrációkkal összehasonlítva ($p < 0,05-0,001$). Mindenképpen érdemes kiemelni, hogy egyes klinikai izolátumok esetében paradox növekedést tapasztaltunk magasabb koncentrációkon a metabolikus aktivitás emelkedés alapján. A paradox növekedés kizárólag a szesszilis sejtek esetében volt jellemző. CAS esetében 32 és 128 mg/L között volt megfigyelhető a jelenség, míg a MICA vizsgálatánál 64 és 512 mg/L között volt ez a tartomány. A farnezol jelenlétében azonban a fentebb leírt koncentrációkon tapasztalt paradox viselkedés nem volt megfigyelhető.

A fluconazol és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel *Candida albicans* planktonikus sejtek esetén

A kísérletekben vizsgált *C. albicans* klinikai izolátumok és a referencia törzs érzékenyek (SC5314, 1216, 10431), illetve rezisztensek (27700, 21616) voltak a FLU-lal szemben a CLSI fajspecifikus határértékei alapján. A farnezolnak önmagában nem volt hatása a planktonikus sejtekre a vizsgált koncentrációkon. Kombináció alkalmazása során a farnezol iránti MIC értékek csökkenést mutattak, azonban ezekben a kombinációkban elsősorban a FLU hatása érvényesült.

A fluconazol és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel *Candida albicans* szesszilis sejtek esetén

A FLU és farnezol kombinációkban megfigyelt FLU iránti MIC értékek 2-64-szeres csökkenést mutattak az önmagában mért FLU MIC koncentrációkhoz képest. A kombinációkban mért farnezol MIC értékek kisebb mértékű (2-4-szeres) csökkenést mutattak.

A fluconazol és a farneazol közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata *Candida albicans* izolátumok esetén

A FLU és farneazol kombinációja során a planktonikus sejtek vizsgálatakor az összes izolátum esetében indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk. A szesszilis sejtek vizsgálatakor szinergista kölcsönhatást egyedül az SC5314 referencia törzs esetén figyeltünk meg, a klinikai izolátumok indifferens kölcsönhatást mutattak. A FICI minden esetben 4 alatti érték volt, tehát antagonizmus egyik esetben sem volt jellemző.

A metabolikus aktivitás változása az idő függvényében fluconazol és farneazol esetében *Candida albicans* által képzett biofilmek ellen

Az eredmények alapján látható, hogy az alkalmazott gyógyszerek idő és koncentrációfüggő módon viselkedtek a három FLU-érzékeny *C. albicans* izolátum által képzett biofilm ellen. Az önmagában, illetve a kombinációban alkalmazott FLU 24 óra elteltével, szignifikánsan csökkentette a biofilmek metabolikus aktivitását a kontroll sejtekhez viszonyítva ($p < 0,01-0,001$). A legnagyobb vizsgált FLU koncentráció (512 mg/L) farnezollal kiegészítve már 6 óra elteltével is hatékony volt ($p < 0,05$). Az önmagában alkalmazott gyógyszer koncentrációk, valamint az ezekhez a koncentrációkhoz tartozó kombinációk között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk (0,5 mg/L és 0,5 mg/L + 75 μ M; stb.) ($p > 0,05$). A rezisztens izolátumok esetében 6 óra elteltével az összes tesztelt FLU koncentráció csökkentette a biofilmek metabolikus aktivitását ($p < 0,001$), azonban 6 és 12 óra között egy átmeneti újránövekedés volt megfigyelhető. Huszonnégy óra elteltével az egyes FLU koncentrációval kezelt biofilmek metabolikus aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva ($p < 0,001$). Fontos kiemelni, hogy a 256 mg/L FLU és 75 μ M farneazol kombinációban szignifikánsan csökkentette a biofilmek metabolikus aktivitását az önmagában alkalmazott gyógyszer koncentrációhoz képest (256 mg/L) ($p > 0,001$).

A fluconazol *in vivo* hatékonyságának vizsgálata *Candida albicans* izolátumok ellen vulvovaginitis egérmodellben

In vivo kísérleteink során két FLU-érzékeny és két FLU-rezisztens *C. albicans* klinikai izolátumot használtunk. A FLU-érzékeny *C. albicans* klinikai izolátumok esetében (1216, 10431) az 5 mg/kg napi és a 35 mg/kg egyszeri terápiás dózisok szignifikánsan csökkentették

a vaginából kinőtt élő gomba sejtek számát ($p < 0,05-0,001$). Továbbá az 5 mg/kg napi FLU dózisok kiegészítve 150 és 300 μM farnezollal szintén hatékonyak voltak a kontroll csoportokhoz viszonyítva ($p < 0,05-0,001$). Önmagában egyik vizsgált intravaginális farnezol dózis sem volt hatékony a kezeletlen egerekhez képest ($p > 0,05$). A 21616-os FLU-rezisztens törzs esetében a naponta önmagában alkalmazott 5 mg/kg FLU dózis nem bizonyult hatékonynak, azonban farnezollal kombinációban szignifikánsan csökkentette a vaginából kinőtt gombasejt számot az alkalmazott farnezol dózistól függetlenül ($p < 0,05-0,01$). A legmagasabb vizsgált FLU dózis [35 mg/kg egér dózis, mely a 24 órás AUC (area under curve, koncentráció-idő függvény alatti terület) érték alapján 150 mg humán dózishoz felel meg] önmagában is hatékony volt. A kombináció alkalmazása (5 mg/kg/nap+150 μM /nap farnezol; 5 mg/kg/nap + 300 μM /nap farnezol) szignifikáns különbséget nem okozott az önmagában (35 mg/kg) vizsgált egyszeri FLU dózishoz képest ($p > 0,05$). A 27700-as FLU-rezisztens törzs esetében egyik alkalmazott terápiás dózis sem volt hatékony ($p > 0,05$).

MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt évtizedekben drámaian megnövekedett a különböző *Candida* fajok által kiváltott invazív fertőzések száma, amelyek főként az immunszuppresszált betegek hosszabb kórházi ellátása során alakulnak ki. Napjainkban a leggyakrabban izolált species a *C. albicans*, azonban a legfrissebb epidemiológiai adatok alapján a non-*albicans* fajok (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) által kiváltott invazív fertőzések incidenciája folyamatos növekedést mutat.

A magas mortalitási adatokhoz hozzájárul a különböző *Candida* fajok biofilm képzési képessége mind biotikus (gazdaszervezet szövetei), mind pedig abiotikus (beültetett orvosi eszközök) felületeken, illetve hogy kevés antifungális szer képes terápiás koncentrációt elérni a biofilmen belül. A szisztémás fertőzésekben adható antimikotikumok közül egyedül a különböző AmB készítmények [ABLC, Liposzómás AmB (L-AmB)] és az echinocandinok képesek megfelelően penetrálni a biofilmbe. Az echinocandinok azonban nem tartoznak az elsőként választandó szerek közé a *C. parapsilosis* esetén, mivel ez a faj az FKS alegységben található generikus mutáció következtében csökkent érzékenységgel rendelkezik ezen echinocandinok iránt. A gomba okozta katéter-asszociált fertőzések során a szisztémás antimikotikum kezelés mellett elsődlegesen választandó művelet a katéter eltávolítása és cseréje. Ez az eljárás azonban nem minden esetben jelent jobb terápiás eredményt, hiszen a biofilm viszonylag gyorsan (24-48 óra) újratermelődik a beültetett eszköz felszínén, ráadásul a primer adherencia már 90 perc után kialakulhat. Problémát jelent főként a kritikus állapotú betegek esetében, hogy a beültetett eszközök eltávolítása és cseréje gyakran fájdalmas beavatkozást igényel, illetve a csere tovább emelheti az amúgy is magas kórházi költségeket. A biofilm kialakulásának - így a katéterekkel összefüggő infekciók - megelőzésére szolgálhatnak a különféle bevonatokkal ellátott katéterek.

Az impregnált katéterek használata egy elég költséges módja a katéter-asszociált fertőzések kezelésének, azonban egy újabb és olcsóbb megoldást jelenthet az antibiotikumok esetében már a klinikumban is alkalmazott „lock” terápia, melynek során a lezárt katétert nagy dózisú antimikrobás szerrel töltik fel, majd néhány órás inkubációt követően átmoszák és újranyitják az eszközt. A koaguláz-negatív *Staphylococcus*-ok, illetve gram-negatív baktériumok által okozott katéter-asszociált fertőzések kezelésére az IDSA által hivatalosan jóváhagyott „lock” protokoll már rendelkezésre áll, azonban a gombák esetében nincs még elfogadott ajánlás. Korábban megjelent irodalmi adatok alapján a *C. albicans* által termelt quorum-sensing molekula, a farnezol szinergista módon fokozhatja bizonyos antifungális szerek

hatékonyságát, ezért potenciális adjuváns lehet a *Candida* fajok által kiváltott infekciók terápiája során. Mindazonáltal ezek a vizsgálatok ezidáig csupán a *C. albicans* elleni hatékonyságot vizsgálták. Munkacsoportunk által végzett kísérletekben öt különböző *C. parapsilosis* klinikai izolátum által képzett biofilm esetén vizsgáltuk a farnezol potenciális adjuváns hatását CAS-nal és MICA-nal kombinálva. Hipotézisünk alapján az exogén úton, szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazott farnezol megzavarja a biofilmben található *Candida* sejtek kommunikációs és anyagcsere folyamatait (elsősorban az ergosterol szintézis útvonalt), ezért fokozottan érzékenyvé válnak a farnezollal kombinációban adagolt tradicionális antifungális szerekkel szemben. Ennek következtében a *C. parapsilosis* esetén tapasztalt generikusan magasabb echinocandin MIC értékeket - ami a biofilmek esetében még markánsabban jelentkezik - csökkenteni tudjuk, továbbá fokozhatjuk a sejtfalszintézis gátlásából eredő fungicid hatást.

Kísérleteinkben a planktonikus *C. parapsilosis* izolátumok vizsgálatai során a CAS és farnezol kombináció alkalmazásakor a MIC értékek esetében jelentős csökkenést (2-64-szeres és 4-32-szeres) figyeltünk meg az önmagában alkalmazott CAS és farnezol MIC értékekhez képest. A MICA és a farnezol kombinációja során hasonló mértékű csökkenés volt tapasztalható (2-64-szeres és 16-256-szoros). A CAS és farnezol kombinációja esetén egy izolátum kivételével (17432) indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk, habár a számított medián FICI eredmények több izolátum esetén megközelítették a szinergizmus határértékét (medián FICI: 0,375-0,75). A MICA és a farnezol kombinációja során szinergista kölcsönhatás volt megfigyelhető az összes *C. parapsilosis* klinikai izolátum esetében (medián FICI: 0,131-0,5). *In vitro* kísérleteinkben a *C. parapsilosis* szesszilis sejtjeinek vizsgálatokor CAS és a farnezol, illetve a MICA és farnezol kombinációja esetében is egyértelműen bebizonyosodott a szinergista kölcsönhatás. A CAS és farnezol kombinációja során 8-64-szeres, míg a MICA és farnezol alkalmazása esetén 4-32-szeres MIC értékcsökkenés jött létre az önmagában mért MIC koncentrációkhoz képest. A CAS és a MICA farnezollal történő kombinációja esetén a *C. parapsilosis* klinikai izolátumainál minden esetben szinergizmus volt megfigyelhető ($FICI_{CAS}$: 0,155-0,5; $FICI_{MICA}$: 0,093-0,5). A FICI alapján tapasztalt szinergista kölcsönhatást a biofilmek esetében a metabolikus aktivitás változásának nyomonkövetésével erősítettük meg, melyet az idő függvényében vizsgáltunk. A CAS az összes tesztelt koncentrációban szignifikánsan csökkentette a biofilmek metabolikus aktivitását, míg MICA esetében az első 12 órában figyeltünk meg hasonló eredményt a kezletlen sejtekkel összehasonlítva. Az ATCC 22019 referencia törzs esetében a planktonikus és a szesszilis sejtek esetén megfigyelt indifferens hatás a lassabb növekedési

rátával, illetve az izolátum gyengébb biofilmképző képességével magyarázható. Ahogyan a vizsgálatainkból kiderül, a farnezozol növelte a CAS és a MICA hatását egy napos biofilmek ellen, melyet két, egymástól független módszerrel is sikerült bizonyítani.

A biofilm-asszociált fertőzések kezelésében az azol-típusú antifungális szerek nem javasoltak az elsődleges terápia részeként, azonban a quorum-sensing molekulák adjuvánsként történő alkalmazása fokozhatja az azol-alapú terápiák hatékonyságát is. A farnezozol antimikotikum hatást fokozó viselkedését talán ki lehetne használni a mukozális fertőzések terápiájában. Ezért kísérleteinkben immunkompetens vulvovaginitis egérmodellt alkalmazva igyekeztünk megerősíteni a korábban *in vitro* tapasztalt farnezozol által kiváltott szinergizáló hatást *C. albicans* biofilmek ellen. Az emberi szervezetben *Candida* biofilmek alakulhatnak ki a szájüregben, a légző- és emésztőrendszerben, illetve a húgyutakban egyaránt. Nők esetében leggyakrabban a hüvely nyálkahártyáján jöhet létre biofilm, amelynek szerepe lehet a rekuráló vaginitises esetek kialakulásában. A korábban leírt epidemiológiai adatok alapján a vulvovaginitis esetében mindenképpen egy releváns népegészségügyi problémáról beszélünk, amely az egyre inkább terjedő azol rezisztencia miatt igényli az új típusú alternatív terápiák kialakítását. Az ilyen terápiák egyik sarokköve lehet a quorum-sensing molekulák adjuvánsként történő alkalmazása a hüvely nyálkahártyáján lévő biofilmek megbontására. *In vitro* kísérleteink alapján a planktonikus *C. albicans* izolátumok és az SC5314 referencia törzs esetén is indifferens interakciót figyeltünk meg a FLU és a farnezozol kombinációja során. Vizsgálatainkban FICI alapján az SC5314 *C. albicans* által képzett biofilmek esetében viszont már szinergista kölcsönhatást, míg a klinikai izolátumok vizsgálatakor indifferens interakciót figyeltünk meg. A klinikai izolátumok egységes viselkedése ellenére bizonyos esetekben szokatlan élettani jellemzőket tapasztaltunk. A FLU-rezisztens izolátumok által képzett szeszilis sejtek vizsgálata során a „checkerboard” mikrodilúciós módszer esetében magas FLU és farnezozol koncentrációkon a metabolikus aktivitás paradox módon történő emelkedése volt megfigyelhető. Korábban leírták, hogy az exogén úton hozzáadott farnezozol szerepet játszhat az egyes anyagcsere útvonalak (glikolízis, glükoneogenezis, aminosav bioszintézis) szabályozásában résztvevő gének expressziójában, mely magyarázhatja a metabolikus aktivitás paradox úton bekövetkező erősödését. Ez a jelenség megfigyelhető volt az általunk vizsgált rezisztens izolátumok (21616, 27700) esetében, ahol 6 és 12 óra között a metabolikus aktivitás növekedése volt jellemző.

In vivo kísérleteinkben alkalmazott 150 μ M és a 300 μ M farnezozol önmagukban nem voltak hatékonyak. Azonban a 21616-os FLU-rezisztens izolátum esetében az alkalmazott farnezozol dózistól függetlenül fokozta a naponta adagolt 5 mg/kg FLU dózis hatékonyságát a kontroll

egerekhez viszonyítva ($p < 0,05-0,01$). *In vitro* vizsgálatainkban a planktonikus sejtek esetén indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk, azonban a szesszilis sejtek vizsgálatakor a farnezo1 egyedül az SC5314 FLU-érzékeny vad típusú izolátum esetében növelte a FLU *in vitro* biofilm-ellenes aktivitását.

A farnezo1 potenciális *in vivo* adjuvánsként betöltött szerepe tehát jelenleg megkérdőjelezhető, hiszen vizsgálatainkban egyedül a 21616-os izolátum esetében volt képes kis mértékben növelni a FLU *in vivo* hatékonyságát. Bár az érzékeny izolátumok vizsgálata során terápiás előnyt nem jelentett a kombináció használata, a rezisztens izolátumok esetében a farnezo1 törzsfüggő módon csökkentheti vagy akár meg is szüntetheti a FLU rezisztenciát. További *in vivo* kísérletek szükségesek a jövőben mind a katéteres-, mind pedig a mukozális fertőzéseket vizsgáló modellek esetében, hogy egyértelműen alátámaszthassuk a farnezo1 terápiás jogosultságát az alternatív kezelésekben.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk első részében megvizsgáltuk a caspofungin, a micafungin és a farneazol közötti *in vitro* kölcsönhatást kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúciós módszerrel, illetve követtük a metabolikus aktivitás változását az idő függvényében *C. parapsilosis* klinikai izolátumok által képzett biofilmek ellen. Ezt követően meghatároztuk a fluconazol és a farneazol *in vitro-in vivo* hatékonyságát önmagában, illetve kombinációban *C. albicans* klinikai izolátumok ellen a klasszikus „checkerboard” módszert és vulvovaginitises egérmodellt használva. A *C. parapsilosis*-sal végzett vizsgálatainkban a biofilmek caspofungin iránti medián MIC értéke 32-256 mg/L között változott, míg micafungin esetében 16-512 mg/L értékeket tapasztaltunk. Farnezollal kombinálva ezek az értékek 4-8 mg/L-re csökkentek. Az echinocandinok és a farneazol kombinációja esetén az összes vizsgált klinikai izolátumnál a FIC index alapján szinergista kölcsönhatás volt megfigyelhető (FICI_{CAS}: 0,155-0,5; FICI_{MICA}: 0,093-0,5). Az aktivitás dinamikája szempontjából a caspofungin és farneazol mindhárom tesztelt kombinációja csökkentette a gombasejtek metabolikus aktivitását 3 és 24 óra között a kontroll sejtekhez viszonyítva ($p < 0,05$ - $0,001$). A micafungin és farneazol vizsgált kombinációi esetében szignifikáns csökkenést az első 12 órában tapasztaltunk ($p < 0,001$). A *C. albicans* esetében végzett vizsgálatoknál a fluconazol és farneazol kombinációkban megfigyelt fluconazol iránti MIC értékek 2-64-szeres csökkenést mutattak. A két szer kombinációja során kizárólag a referencia törzs esetén volt megfigyelhető szinergista kölcsönhatás (FICI: 0,16-0,27). *In vivo* eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a farneazol önmagában nem volt protektív vulvovaginitisben, azonban kombinációban törzsfüggő módon növelheti a fluconazol hatékonyságát a fluconazol-rezisztens izolátumok ellen. Eredményeink alapján a farneazol egy potenciális adjuváns szer lehet a *C. parapsilosis* okozta katéter-asszociált fertőzésekben olyan speciális terápiákban, mint az antifungális „lock” terápia, azonban további *in vivo* vizsgálatok szükségesek a mukozális biofilmek elleni hatás egyértelmű bizonyításáról.



Nyilvántartási szám: DEENK/3/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

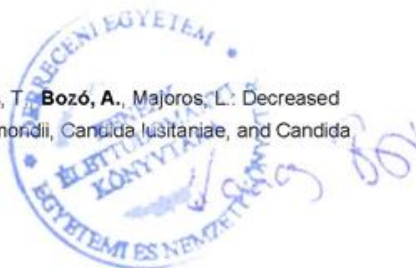
Jelölt: Bozó Aliz
Neptun kód: MEOPYO
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. 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
2. **Bozó, A.**, Domán, M., Majoros, L., Kardos, G., Varga, I., Kovács, R. L.: The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model.
J. Microbiol. 54 (11), 753-760, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-016-6298-y>
IF: 1.924

További közlemények

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 sessile cells.
J. Appl. Microbiol. 122 (6), 1529-1536, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13452>
IF: 2.099 (2016)
4. Saleh, Q., Kovács, R. L., Kardos, G., Gesztelyi, R., Kardos, T., **Bozó, A.**, Majoros, L.: Decreased Killing Activity of Micafungin Against *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, and *Candida kefyr* in the Presence of Human Serum.
Microb. Drug Resist. 23 (6), 764-770, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0241>
IF: 2.306 (2016)





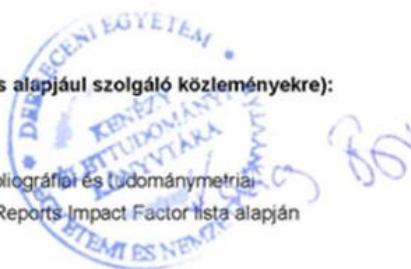
5. Nagy, F., **Bozó, A.**, Tóth, Z., Daróczy, L., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro antifungal susceptibility patterns of planktonic and sessile *Candida kefyr* clinical isolates.
Med. Mycol. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx062>
IF: 2.377 (2016)
6. Kovács, R. L., Saleh, Q., **Bozó, A.**, Tóth, Z., Gesztelyi, R., Kardos, T., Kardos, G., Takács, I., Majoros, L.: Killing Activity of Micafungin Against *Candida albicans*, *C. dubliniensis* and *Candida africana* in the Presence of Human Serum.
Mycopathologia. 182 (11-12), 979-987, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-017-0178-9>
IF: 1.71 (2016)
7. Kardos, T., Saleh, Q., Kovács, R. L., Gesztelyi, R., Kardos, G., **Bozó, A.**, Tóth, Z., Majoros, L.: Postantifungal effect of micafungin against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana* in the presence and absence of serum.
New Microbiol. 40 (4), 286-288, 2017.
IF: 1.568 (2016)
8. Domán, M., Kovács, R. L., Kardos, G., Gesztelyi, R., Juhász, B., **Bozó, A.**, Kardos, T., Saleh, Q., Majoros, L.: Killing rates of caspofungin in 50 percent serum correlate with caspofungin efficacy against *Candida albicans* in a neutropenic murine model.
Current Drug Del. 13 (2), 255-264, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1567201812666150623091336>
IF: 2.516
9. Domán, M., Kovács, R. L., Perlín, D., Kardos, G., Gesztelyi, R., Juhász, B., **Bozó, A.**, Majoros, L.: Dose escalation studies with caspofungin against *Candida glabrata*.
J. Med. Microbiol. 64 (9), 998-1007, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000116>
IF: 2.269

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,076

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,231

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

Debrecen, 2018.01.05.



Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája

Renátó Kovács, **Aliz Bozó**, Marianna Domán, Fruzsina Nagy, Zoltán Tóth, László Majoros. Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. 7th Trends in Medical Mycology, 9-12 October 2015. Lisbon, Portugal (P073)

Fontosabb előadások listája

Bozó Aliz, Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Kardos Tamás, Majoros László, Kovács Renátó. A caspofungin, a micafungin és a farnesol kombinációjának *in vitro* vizsgálata *Candida parapsilosis* biofilmek ellen. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium 2016. október 19-21. Keszthely.

Kovács Renátó, **Bozó Aliz**, Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Majoros László. A flukonazol és a farnesol kombinációjának *in vitro-in vivo* vizsgálata *Candida albicans* biofilmek ellen. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium 2016. október 19-21. Keszthely.

Bozó Aliz, Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Daróczi Lajos, Majoros László, Kovács Renátó. A caspofungin, micafungin és a tyrosol kombinációjának *in vitro* vizsgálata *Candida parapsilosis* biofilmek ellen. VI. Magyar Mikológiai Konferencia 2017. július 3-5. Szeged.

Kovács Renátó, Nagy Fruzsina, **Bozó Aliz**, Tóth Zoltán, Daróczi Lajos, Majoros László. A fluconazol, amphotericin b, caspofungin és a micafungin *in vitro* hatékonyságának vizsgálata *Candida kefyr* planktonikus és szesszilis sejtek ellen. VI. Magyar Mikológiai Konferencia 2017. július 3-5. Szeged.

Kardos Tamás, Saleh Qasem, Kovács Renátó, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, **Bozó Aliz**, Tóth Zoltán, Majoros László. A micafungin posztantifungális hatásának vizsgálata a *Candida albicans* komplex fajai ellen. VI. Magyar Mikológiai Konferencia 2017. július 3-5. Szeged.