

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A caspofungin dózisznövelés hatékonyságának vizsgálata
Candida albicans és *Candida glabrata* klinikai izolátumok
ellen**

Domán Marianna

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2016

A caspofungin dózisznövelés hatékonyságának vizsgálata *Candida albicans* és *Candida glabrata* klinikai izolátumok ellen

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

Írta: Domán Marianna 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. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Tóth Beáta, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára
2016. június 28. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Dóczy Ilona, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Dóczy Ilona, PhD
Dr. Tóth Beáta, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme
2016. június 28. 13 óra

BEVEZETÉS

A gombák okozta infekciók incidenciája jelentősen megemelkedett az elmúlt évtizedekben, így napjainkban komoly népegészségügyi problémát jelentenek. Évente több mint 300 millió ember szenved valamilyen súlyos gombás fertőzésben, melyekből közel 1,4 millió eset halállal végződik. Az esetek túlnyomó részében a *Candida*, *Aspergillus*, valamint a *Cryptococcus* fajok tehetők felelőssé.

Az invazív candidiasis kialakulását számos rizikó faktor idézheti elő, melyek közül kiemelhető a hosszan tartó, széles spektrumú antibiotikum kezelés, valamint a kemoterápiában részesülő betegek tartós neutropeniás állapota (<500 neutrofil granulocita/ μ l). Egy több országot magába foglaló felmérés alapján a candidaemia mortalitása minden kórházi osztályt figyelembe véve 29% volt, azonban az intenzív osztályokon ez az arány 50-70% is lehet.

Habár a különböző *Candida* fajok prevalenciájában változások figyelhetők meg az elmúlt 20-30 évben, az infekciók 95%-át az alábbi öt faj okozza: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és a *C. krusei*. A *C. albicans* máig a leggyakrabban izolálható humánpatogén sarjadzó gomba, azonban elsősorban a terápiás, illetve a profilaktikus fluconazol (FLU) használat egy jól látható epidemiológiai változást eredményezett a primer FLU rezisztenciával (*C. krusei*) vagy csökkent FLU érzékenységgel (*C. glabrata*) rendelkező non-*albicans* fajok irányába.

A korábbi szerek esetében felmerülő problémáknak (toxicitás, illetve rezisztencia) köszönhetően a gombák sejtfalszintézisét gátló echinocandinok bevezetése fordulópontot jelentett. Az echinocandinok közül legkorábban a caspofungint (CAS) engedélyezték, mely invazív candidiasis és invazív aspergillosis kezelésére egyaránt alkalmas. A legtöbb *Candida* faj ellen fungicid aktivitást mutat *in vitro*, kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságokkal rendelkezik, ennek

következtében jelenleg elsőként választandó szer az invazív candidiasis empirikus terápiájában.

Az echinocandinok koncentrációfüggő hatást mutatnak. A klinikai hatékonyság a C_{\max}/MIC (C_{\max} : a gyógyszer szérumban mérhető maximális koncentrációja/minimális gátló koncentráció) és az AUC/MIC (AUC plazmakoncentráció-idő függvény alatti terület) farmakodinámiás paraméterekkel áll leginkább összefüggésben. A jelenleg alkalmazott kezelési stratégia CAS esetében 70 mg telítő dózis után napi 50 mg fenntartó dózis. Az echinocandinok farmakodinámiás tulajdonságaiból adódóan a klinikai hatékonyság növelése érdekében lehetőség van nagyobb dózisos adagolására. A CAS akár 150 mg-os napi dózisban is biztonságosan alkalmazható. Mindazonáltal az eddigi klinikai vizsgálatok nem igazolják a nagyobb dózisos jobb hatékonyságát. Bizonyos *Candida* fajok (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*) esetén a MIC érték feletti gyógyszerkoncentrációkon a szer fungisztatikus hatást fejt ki, míg az alacsony koncentrációkon fungicid hatás érvényesül. Ez a paradox növekedés (PG) a humán szérumban elérhető koncentrációkon is megjelenhet, azonban a klinikai relevanciája egyelőre kérdéses.

Kísérleteink során idő-ölés módszerrel vizsgáltuk a CAS aktivitását *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok ellen. Ez a módszer pontosabb adatokat nyújt a szer ölü aktivitásának mértékéről, valamint a farmakodinámiás jellemzőiről. Nem hagyható figyelmen kívül, hogy az echinocandinok nagymértékben kötődnek a szérumfehérjékhez (96,5-99,8%), ebből adódóan az antifungális érzékenység meghatározásánál érdemes humán szérumot alkalmazni, mely jobban modellezi az *in vivo* környezetben lezajló folyamatokat. Munkánk során célunk volt megállapítani a CAS ölési aktivitását, valamint az *in vitro* és *in vivo* kísérleteink közötti összefüggések vizsgálatával meghatározni a dózisznövelés hatékonyságát *C. albicans*, valamint *C. glabrata* izolátumok ellen.

CÉLKITŰZÉS

Kísérleteink során a caspofungin dózisznövelés hatékonyságát vizsgáltuk a két, Magyarországon leggyakrabban izolálható *Candida* faj esetében.

Munkánkban célunk volt:

- A caspofungin minimális gátló koncentrációjának meghatározása standard mikrodilúciós módszer segítségével *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumokkal szemben, továbbá a *C. albicans* izolátumok esetében az értékek összehasonlítása az E-teszt során kapott eredményekkel
- A caspofungin *in vitro* hatékonyságának vizsgálata *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok ellen normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben idő-ölés kísérletek segítségével
- Az idő-ölés kísérletek adatait felhasználva a caspofungin ölési rátájának meghatározása *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok ellen
- A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata napi 1, 2, 3, 5 és 15 mg/kg dózisokat alkalmazva *C. albicans*-szal, valamint napi 1, 2, 3, 5 és 20 mg/kg dózisokat alkalmazva *C. glabrata*-val fertőzött neutropéniás egérmodellben

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált izolátumok

Kísérleteink során 6 *C. albicans* (14171, 18799, 35035, 5265, 10781, 34350), 4 *C. glabrata* (11900, 9098, 18910, 15242) klinikai izolátumot, 4 ATCC (American Type Culture Collection) tesztörzset (10231, 90030, 6258, 22019) és 2-2 echinocandin rezisztens *C. albicans* (DPL18, DPL20), illetve *C. glabrata* (DPL27, DPL245) izolátumot vizsgáltunk. Az összes vizsgált klinikai izolátum vérből származott, melyek izolálása még az antifungális terápia megkezdése előtt megtörtént. A *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok azonosítását a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében API ID32C panel és MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) tömegspektrométer segítségével végeztük el. Az echinocandin rezisztenciával rendelkező DPL18 (F641S mutáció), DPL20 (F645P mutáció), DPL27 (S663P mutáció) és DPL245 (S629P mutáció) törzseket David S. Perlin (Public Health Research Institute, New Jersey Medical School-Rutgers, Newark, New Jersey, USA) biztosította.

In vitro érzékenységi vizsgálatok

A CAS MIC értékek meghatározása kétféle tápközegben, RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal (AB vércsoportú férfi, Sigma, Budapest, Magyarország) kiegészített RPMI-1640-ben történt a CLSI által elfogadott M27-A3-as dokumentum alapján standard mikrodilúciós módszerrel. A MIC meghatározást 0,015-32 mg/l tartományban végeztük el 96 üregű ELISA-lemezekben. Referenciaként az ATCC 6258 *C. krusei* és az ATCC 22019 *C. parapsilosis* törzseket alkalmaztuk. Az egyes törzsek 0,5 McFarland sűrűségű gombaszuszpenzióinak elkészítéséhez 24 órás Sabouraud agaron nőtt tenyészeteket használtunk. Az üregekben 10^3 CFU (Colony Forming Unit)/ml kezdő csíraszámot állítottunk be RPMI-1640

táptalajban. A különböző CAS koncentrációk mellett a lemezeken gombakontroll (antifungális szert nem tartalmazó) és táptalajkontroll (sarjadzó gombát nem tartalmazó) üregeket is alkalmaztunk. Az izolátumok MIC értékét 24 órás 35°C-os inkubálást követően vizuálisan olvastuk le. MIC értéknek tekintettük azt a legkisebb CAS koncentrációt, ahol legalább 50%-os növekedés csökkenés volt megfigyelhető a gyógyszermentes kontrollhoz képest.

A *C. albicans* izolátumok esetében a CAS MIC értékeket E-teszt (AB Biodisk, Svédország) segítségével is meghatároztuk. Az E-teszthez 2% glükózzal kiegészített RPMI-1640 táptalajt alkalmaztunk 50% szérummal, illetve 50% szérum nélkül. Az izolátumok 24 órás tenyészetéből készített 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenziókat steril tampon segítségével egyenletesen kiszélesztettük az agarok felszínére. A táptalajok száradását követően ráhelyeztük a CAS-nal átitatott teszcsíkokat, majd 35°C-on történő 24 órás inkubálás után a MIC értékeket szintén vizuálisan olvastuk le. A MIC érték az a koncentráció, ahol az ellipszis alakú gátlási zóna metszi a teszcsíkot.

Idő-ölés (time-kill) görbék felvétele az antifungális hatás vizsgálatához

Az idő-ölés kísérletekben Klepser és munkatársai által megadott módszer szerint határoztuk meg a CAS *in vitro* hatékonyságát. A normál RPMI-1640, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben elvégzett kísérletek során 0,25-32 mg/l CAS koncentrációkat vizsgáltunk, koncentrációnként 10 ml-es végtérfogatban. Az echinocandin rezisztens izolátumok esetében a magas MIC értékek miatt csak a 8, 16 és 32 mg/l koncentrációkkal dolgoztunk. A legmagasabb vizsgált koncentrációnak a 32 mg/l CAS-t választottuk, mert klinikai adatok alapján a napi 150-200 mg CAS adagolása esetén is csupán 30,4-40,6 mg/l-es szérumban mérhető csúcskoncentráció érhető el.

Az izolátumokból denzitométer segítségével $\sim 10^5$ CFU/ml kiindulási inokulumot állítottunk be. A különböző gyógyszerkoncentrációkat tartalmazó csövekből 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óránként kivett 100-100 μ l mintákból tízes alapú tova futó hígítási sorozatot készítettünk, majd ezekből a hígításokból 4x30 μ l-t oltottunk Sabouraud agarra. A táptalajokat 48 óráig 35°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után a kinőtt telepeket megszámloltuk és a hígítási fokok ismeretében megállapítottuk az élő gombasejtek számát, melyeket az idő függvényében ábrázoltunk. Az idő-ölés görbéket GraphPad Prism 4.03 Windows szoftver segítségével készítettük el.

Az *in vitro* adatok kiértékelése

Azt a CAS koncentrációt tekintettük fungicidnek, amelynél a kezdő csíraszámhoz képest legalább 99,9%-os sejtszám csökkenést figyeltünk meg. Ennél kisebb mértékű csíraszám csökkenés esetében a szer fungisztatikus hatású.

Az idő-ölés kísérletek során kapott adatokat használtuk fel, hogy meghatározzuk a CAS ölési kinetikáját mindkét alkalmazott tesztközegben. Az ölési kinetikát az alábbi exponenciális egyenlet segítségével számítottuk ki: $N_t = N_0 \times e^{-kt}$, ahol a N_t az élő sejtek száma adott időpontban, az N_0 a kísérlet kezdetén mért élő sejtszám, a k az ölési ráta, a t pedig az inkubációs idő. A pozitív k érték a gombasejtek ölését, a negatív k érték azok növekedését jelenti. Az illesztés jóságát r^2 használatával ellenőriztük ($r^2 > \pm 0,8$). Mindegyik izolátum, illetve koncentráció esetében a 99,9%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges időt (h) a k értékekből számoltuk ki mindkét tápközegben ($T_{99,9} = 3/k$). A különböző izolátumok és koncentrációk közötti szignifikáns különbségek meghatározását Tukey-féle teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) végeztük el mindkét tápközegben. Ugyanazon CAS koncentrációk

különböző tápközegben mért ölési kinetikáját t-próbával hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket, ha $p < 0,05$.

***In vivo* kísérletek**

A kísérletben felhasznált egerek

Kísérleteinkhez 20-23 g tömegű BALB/c típusú nőstény egereket használtunk fel, melyeket a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című irányelv szerint tartottunk. Csoportonként 7-8 db egerrel dolgoztunk. Az *in vivo* kísérletek engedélyszáma: 12/2014 DE MÁB. Az egerekben a tartós neutropeniás állapot létrehozásához intraperitoneálisan cyclophosphamidot adagoltunk a következő oltási stratégia szerint: a fertőzést megelőző negyedik nap 150 mg/kg, a fertőzés előtti első nap 100 mg/kg, a fertőzést követő második és ötödik nap 100 mg/kg.

Oltóanyag készítés és a fertőzés menete

Az oltóanyag készítéséhez a vizsgált izolátumokat két egymást követő napon Sabouraud agarra kioltottuk, majd a felfrissített törzseket 3-4 Sabouraud táptalaj felületére szélesztettük. 24 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt izolátumokat a táptalajok felszínéről steril vattatamponnal eltávolítottuk és steril fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk. Ezt követően a szuszpenziókat négyszer 10 percre centrifugáltuk 3000 g fordulaton. Mindegyik centrifugálás után a leülepedett gombasejtekről eltávolítottuk a felülúszót, majd 20-25 ml steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk rá. Az utolsó centrifugálási folyamat után körülbelül 8 ml fiziológiás sóoldatot adtunk a gombasejtekhez. Ezután a szuszpenzióból két lépésben 1:10 arányú hígítást végeztünk a Bürker-kamrában történő sejtszámoláshoz. A csíraszámbeállítás ellenőrzése kvantitatív kioltással valósult meg.

Az egereket 0,2 ml gombaszuszpenzióval a laterális farokvénán keresztül fertőztük meg. A *C. albicans* izolátumok esetében a fertőző csíraszám

$7,5 \times 10^4$ CFU/egér, a *C. glabrata* izolátumoknál $6,6-8,4 \times 10^7$ CFU/egér volt. A *C. glabrata* echinocandin rezisztens törzsei esetében ez a fertőző inokulum 5 napon belül 100% mortalitást eredményezett, így alacsonyabb dózissal ($2,5 \times 10^7$ CFU/egér) végeztük el a kísérleteket.

Antifungális terápia

Az egerek kezelését a különböző, intraperitoneálisan beadott CAS dózissal a fertőzés után 24 órával kezdtük el. Az öt napig tartó terápia során a *C. albicans* izolátumok esetében 1, 2, 3, 5, 15 mg/kg/nap dózisokat, míg a *C. glabrata* izolátumok esetében 1, 2, 3, 5, 20 mg/kg/nap dózisokat alkalmaztunk. A kezelési sémákat farmakokinetikai vizsgálatok, valamint saját és más kutatócsoportok korábbi eredményei alapján határoztuk meg. A beadott gyógyszer mennyiség egerenként 0,5 ml volt. A *C. glabrata* izolátumoknál a CAS kezelés előtt is meghatároztuk 4-4 egérrel a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát.

A kvantitatív csíraszám meghatározása céljából az egereket a fertőzést követő hatodik napon cervikális diszlokációval elpusztítottuk, majd felboncoltuk. A veséket eltávolítottuk, amelyeket a lemérésük után steril dörzscsészében homogenizáltuk. A homogenizátumhoz 1 ml steril fiziológiás sóoldatot adtunk, majd az egyes mintákból 1:10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk. A megfelelő hígításokból 100 μ l mennyiségű mintát oltottunk Sabouraud agarra, majd a táptalajok 48 órás 35°C-on történő inkubálása után a kinőtt telepeket megszámloltuk. A kimutatás alsó határa 50 CFU/szövet (g). A táptalajon kitenyészett gombák esetén a szignifikancia vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk (GraphPad Prism 4.03, Windows). Az eredményt szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ volt.

EREDMÉNYEK

A caspofungin iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszer, valamint E-teszt segítségével

Mikrodilúciós módszerrel normál RPMI-1640 tápközegben az összes vizsgált *C. albicans*, *C. glabrata* klinikai izolátum, valamint a tesztörzsek is érzékenyek voltak CAS iránt a CLSI fajspecifikus határértékei alapján. A 10781 és 34350 izolátumok esetében PG-t figyeltünk meg.

A *C. albicans* izolátumok esetében az E-teszt során kapott MIC értékek RPMI-1640-ben $2 \geq 8$ -szor magasabbak voltak, mint a mikrodilúcióval meghatározott MIC értékek. PG-t egyik izolátumnál sem tapasztaltunk. A *C. albicans* és *C. parapsilosis* referencia törzsek érzékenyek, míg a *C. krusei* tesztörzs mérsékelten érzékeny volt CAS-ra. A két echinocandin rezisztens izolátum MIC értéke 2 illetve >32 mg/l voltak.

A *C. albicans* izolátumok MIC értékei 2-16-szoros emelkedést mutattak 50% humán szérummal kiegészített tápközegben mindkét módszer esetén. Habár kevés vad típusú izolátumot vizsgáltunk a teszt során, látható, hogy a MIC értékek szűkebb tartományban helyezkedtek el, összehasonlítva a normál (RPMI-1640) tápközegben megfigyelhető MIC eloszlással. A *C. glabrata* izolátumok esetében szintén MIC érték emelkedést tapasztaltunk 50% szérumban (4-8-szoros). PG-t nem tapasztaltunk.

A DPL18, DPL20, DPL27 és DPL245 izolátumok CAS rezisztensnek bizonyultak függetlenül az alkalmazott tápközegtől.

Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 és RPMI-1640+50% humán szérum jelenlétében *Candida albicans* izolátumok ellen

Az összes izolátum hasonló növekedést mutatott mindkét tesztelt médiumban, a kontroll egy nagyságrendnyi (1 log) növekedéséhez szükséges idő 8,66-9,77 óra volt RPMI-1640-ben, valamint 8,9-10,89 óra szérum jelenlétében.

A CAS fungisztatikus aktivitást mutatott a 14171 és a 35035 izolátumok ellen RPMI-1640 tápközegben, viszont az alacsonyabb koncentrációkon (0,25 és 1 mg/l) nagyobb mértékű csíraszám csökkenést tapasztaltunk, mint a 16 és 32 mg/l CAS esetében. A 18799 izolátum ellen a CAS fungicid hatása volt ≥ 4 mg/l koncentrációkon. Az 5265, a 10781 és a 34350 izolátumok esetében tipikus PG-t figyeltünk meg, mivel az alacsony koncentrációknál fungicid, a magas koncentrációknál (16 és 32 mg/l) fungisztatikus aktivitás látható. Ennél a három izolátumnál a 99,9%-os csíraszám csökkenéshez szükséges idő < 12 óra volt az 1-8 mg/l koncentrációkon.

A CAS 50% humán szérummal kiegészített tápközegben gátolta a 14171, a 18799 és a 35035 izolátumok növekedését, 99,9%-os csíraszám csökkenést azonban egyik koncentrációval sem sikerült elérni. A CAS ölési hatékonysága szérum jelenlétében megemelkedett mindhárom, RPMI-1640-ben PG-t mutató izolátum ellen, ugyanis 4-32 mg/l koncentrációkon már 10 órán belül fungicid hatást tapasztaltunk.

A caspofungin ölési rátájának meghatározása *Candida albicans* izolátumok ellen

A CAS ölési rátája RPMI-1640 tápközegben izolátum- és koncentrációfüggőnek bizonyult. Érdekes tendenciát figyeltünk meg az izolátumok között, ugyanis az alacsonyabb koncentrációkhoz (0,25 vagy 1 mg/l) tartozó k értékek magasak voltak, míg a 32 mg/l CAS-nál alacsony k értékeket kaptunk. Az 1 mg/l CAS szignifikánsan nagyobb k értéket eredményezett, mint a 16 és a 32 mg/l az összes izolátumot tekintve ($p < 0,001$). Ez a paradox hatás a 35035 és az 5265 izolátumoknál volt a leglátványosabb, ahol az 1 mg/l CAS esetén mért ölési ráta 0,314 1/h és 0,295 1/h volt, szemben a 32 mg/l CAS-nál kapott 0,021 1/h, valamint 0,011 1/h értékekkel. A legmagasabb k érték a 10781-es izolátum ellen 1 mg/l-nél látható (0,961 1/h).

Ötven százalék humán szérummal kiegészített RPMI-1640-ben 0,25 mg/l CAS mellett negatív ölési rátát (növekedés) lehetett megfigyelni a 14171, 35035 és a 10781 izolátumok esetében. Ugyanezen a koncentráción a többi izolátumnál 0,093-0,398 1/h között voltak a k értékek. Egy izolátumtól eltekintve az ölési ráták 1-32 mg/l koncentrációkon koncentráció függetlenek voltak. A k értékek között jelentős eltérések mutatkoztak, a legalacsonyabb a 18799-es izolátum (0,085-0,109 1/h), a legmagasabb a 10781-es izolátum (0,882-0,985 1/h) esetében volt. A többi izolátumtól eltérően a 14171-es izolátum esetén az 1, 4, 8 és 16 mg/l CAS-hoz tartozó k értékek szignifikánsan magasabbak voltak (0,241-0,271 1/h), összehasonlítva a 32 mg/l CAS-nal (0,126 1/h) ($p < 0,05-0,001$).

Ugyanazon CAS koncentrációk ölési kinetikáját összehasonlítottuk a kétféle tápközegben. Az összes izolátum esetében a 0,25 mg/l CAS-nál mérhető k értékek magasabbak voltak RPMI-1640-ben, mint szérum jelenlétében ($p < 0,05-0,001$). A 14171 és 18799 izolátumok esetében a k értékek magasabbak voltak az összes vizsgált koncentráción normál (RPMI-1640) tápközegben, összehasonlítva a szérumot tartalmazó tápközeggel. Ez alól kivétel csupán a 14171-es izolátumnál a 16 mg/l CAS esetén mért, illetve a 18799-es izolátumnál a 32 mg/l CAS mellett kapott ölési aktivitás ($p < 0,05-0,001$). A többi izolátum esetében a CAS aktivitása fokozódott 4-32 mg/l koncentrációkon 50% szérumban ($p < 0,05-0,001$). Ettől eltérő eredményt csak a 8 mg/l CAS-nal tapasztaltunk el az 5265-ös izolátum ellen, valamint a 4 és 32 mg/l CAS esetén a 34350-es izolátumnál.

A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata *Candida albicans* izolátumok ellen

A kontrollhoz viszonyítva az összes alkalmazott CAS dózis csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát a klinikai izolátumoknál, azonban ez a csökkenés nem minden esetben volt szignifikáns. A napi 1 mg/kg CAS dózis nem volt hatékony a 18799, 10781 és a 34350 izolátumok

esetében, továbbá a napi 2 mg/kg dózis szintén nem eredményezett szignifikáns csíraszám csökkenést a 10781-es izolátummal történő fertőzés esetén. Ezzel szemben a 3, 5 és 15 mg/kg napi dózisok minden izolátum ellen hatékonynak bizonyultak ($p < 0,05-0,001$). Három izolátumnál (18799, 5265 és 10781) a legnagyobb CAS dózisonál figyeltük meg a legnagyobb mértékű csíraszám csökkenést. A 14171 és 34350 izolátumok esetében a legalacsonyabb csíraszám a napi 2 mg/kg CAS kezelés után, a 35035 izolátumnál pedig a napi 3 mg/kg-os terápia után tenyészett ki. A hatékony dózisok között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk.

Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 és RPMI-1640+50% humán szérum jelenlétében *Candida glabrata* izolátumok ellen

Az összes vizsgált *C. glabrata* izolátum szignifikánsan jobb növekedést mutatott RPMI-1640-ben, mint a szérumot tartalmazó tápközegben. A klinikai izolátumok vizsgálata során a gyógyszermentes kontroll egy nagyságrendnyi (1 log) növekedéséhez szükséges átlag idő RPMI-1640 tápközegben 8,14 óra, míg a szérummal kiegészített tápközegben 11,17 óra volt. A rezisztens izolátumok esetében ehhez a növekedéshez normál tápközegben 8,57-8,95 óra, valamint 50% humán szérum jelenlétében 14,76-14,86 óra kellett.

RPMI-1640-ben a 16, valamint a 32 mg/l ölési aktivitásához viszonyítva a CAS hatékonyabb volt 1 és 4 mg/l koncentrációban az összes tesztelt klinikai izolátum ellen. A kezdő inokulumhoz képest 99,9%-os csökkenés kevesebb, mint 7 óra alatt bekövetkezett a 9098, 18910, 15242 és az ATCC teszt törzs esetén. A 16 és 32 mg/l CAS fungisztatikus aktivitást mutatott a DPL27 echinocandin rezisztens izolátum ellen. A másik, szintén rezisztens izolátum esetén (DPL245) azonban csak gyenge, átmeneti fungisztatikus hatást tapasztaltunk az első 8 órában 32 mg/l CAS mellett.

Szérumot tartalmazó tápközegben a fungicid hatás elérése szignifikánsan rövidebb idő alatt ($\leq 3,32$ óra) valósult meg. A CAS ölési aktivitása 32 mg/l

koncentráción jobb volt, mint RPMI-1640-ben, beleértve a rezisztens DPL27-es izolátumot is.

A caspofungin ölési rátájának meghatározása *Candida glabrata* izolátumok ellen

A 11900, 18910 és 9098 klinikai izolátumok, valamint az ATCC 90030 törzs esetében a 0,25 és 1 mg/l CAS koncentrációkon kifejtett ölési ráta nagyobb volt, mint a 16, illetve 32 mg/l CAS-nál tapasztalt aktivitás RPMI-1640 tápközegben ($p < 0,05-0,001$). A 15242-es izolátumnál szintén az alacsony koncentrációkon (0,25 és 1 mg/l) figyelhetők meg a magasabb k értékek, emellett hasonló ölési ráta látható a 32 mg/l-nél is. A k értékek alapján viszont az említett koncentrációk között szignifikáns különbséget nem állapítottunk meg. A legnagyobb k értéket a 9098-as izolátum ellen tapasztaltuk 1 mg/l, illetve 4 mg/l CAS esetén (1,058 1/h), a legalacsonyabbat pedig a 11900-as izolátum esetén 32 mg/l-nél (0,177 1/h). A két echinocandin rezisztens törzs esetén minden koncentráción növekedést figyeltünk meg (k értékek negatívak voltak), kivéve a 32 mg/l CAS-t a DPL27-es izolátumnál (0,204 1/h).

Szérumot tartalmazó tápközegben a 0,25 mg/l-nél megfigyelt k értékek széles tartományban mozogtak. Ez a koncentráció negatív k értéket eredményezett a 11900-as izolátum esetében (-0,059 1/h), addig a többi klinikai izolátumnál, valamint az ATCC 90030 tesztörzsnél a k értékek pozitívak voltak. A 4-32 mg/l koncentrációkon az ölés, koncentráció független módon történt a klinikai izolátumok esetében. A tesztörzsnél a legnagyobb k értéket a 16 mg/l CAS esetén mértük (1,426 1/h), az 1, 4, 8 és 32 mg/l CAS-nál megfigyelt k értékek szignifikánsan nem különböztek egymástól (1,022-1,085 1/h). A DPL245-ös izolátumnál a 8-32 mg/l CAS-nál egyaránt növekedést tapasztaltunk, ellenben a DPL27-es izolátumnál a 16 és 32 mg/l CAS-hoz tartozó k értékek 0,065 és 0,354 1/h voltak.

A 0,25 mg/l CAS-nál mért ölési ráta minden izolátum (kivéve a 9098-as *C. glabrata*) esetében nagyobb volt RPMI-1640-ben, mint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben ($p < 0,05-0,001$). Három klinikai izolátum és a referencia törzs esetében a CAS ölési aktivitása szérumban szignifikánsan nagyobb volt a 4-32 mg/l koncentrációkon a normál tápközegben megfigyelt hatékonysággal összehasonlítva ($p < 0,05-0,001$). Hasonló adatokat tapasztaltunk a 15242-es izolátumnál is, azonban a 32 mg/l CAS aktivitása nem különbözött jelentősen a két tápközegben. A DPL27-es izolátum esetében a 16 és 32 mg/l CAS-hoz tartozó k értékek szintén szignifikánsan magasabbak voltak 50% szérumot tartalmazó tápközegben.

A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata *Candida glabrata* izolátumok ellen

Echinocandin rezisztens *C. glabrata* izolátumokkal fertőzött neutropéniás egérmódelben a kísérleteink kezdetén alkalmazott fertőző inokulum 5 napon belül 100% mortalitást eredményezett. A DPL27-es izolátum esetén a fertőzést követő első napon detektált $6,8 \times 10^7$ sejtszám az ötödik napon már $4,3 \times 10^8$ CFU/veseszövet (gramm) volt. Hasonló arányú sejtszám növekedést figyeltünk meg a DPL245-ös izolátum esetében is ($7,2 \times 10^6$ sejtszámról $6,8 \times 10^7$ sejtre). Ezzel ellentétben az érzékeny izolátumokkal fertőzött egerek a kísérlet végéig életben maradtak, a veséikből a fertőzés utáni 6. napon átlagosan 1 gramm veseszövetben 10^7 és 10^8 CFU tenyészt ki. Emiatt a rezisztens izolátumoknál alacsonyabb fertőző inokulumot alkalmaztunk.

A kezelés kezdetén (a fertőzést követő 1. nap) az átlagos, vesékből kitenyésztett csíraszám $4,4 \times 10^6$ - $6,7 \times 10^6$ gombasejt között volt a klinikai izolátumok, valamint $9,7 \times 10^6$ - $1,4 \times 10^7$ gombasejt a rezisztens izolátumok esetén. A 11900-as izolátum kivételével mindegyik izolátum kevesebb, mint egy nagyságrendnyit növekedett a kísérlet végéig.

Az összes alkalmazott CAS dózis szignifikánsan csökkentette a vesékből kitenyészett élő sejtek számát a kontroll csoporttal összehasonlítva a klinikai izolátumok esetében. A dózisok között statisztikailag szignifikáns különbség nem volt, az átlagos csíraszám azonban egyik esetben sem csökkent 10^5 sejt/gramm alá. Az echinocandin rezisztens törzsek ellen a CAS nem volt hatékony, még a legnagyobb dózissal sem (napi 20 mg/kg) értünk el szignifikáns csíraszám csökkenést. A DPL27-es izolátum esetén az egynapos kontrollhoz viszonyítva növekedés gátlást értünk el az összes tesztelt dózissal.

MEGBESZÉLÉS

A *Candida* fertőzésekhez köthető mortalitási arány az alapbetegség súlyossága, valamint az antimikotikum kiválasztása mellett függ az adott *Candida* fajtól is, mivel a *C. krusei* és *C. glabrata* esetében magasabb arányról számoltak be (50-70%), mint a *C. parapsilosis* esetében (20-30%). Habár a szisztémás *Candida* fertőzések kezelésére alkalmas antifungális szerek az echinocandinokkal bővültek a 2000-es évek elején, a mortalitás alapvetően nem csökkent.

Kísérleteinkben kétféle, szérumból alapú érzékenységi módszert (standard mikrodilúció és E-teszt) használtunk a vad típusú, valamint az echinocandin rezisztens izolátumok CAS MIC értékének meghatározására. A PG E-teszttel történő detektálása érdekében szilárd RPMI-1640-et, illetve 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-et alkalmaztunk a *C. albicans* izolátumok esetén. A szérumból tartalmazó E-teszttel leolvasott értékek összhangban voltak a mikrodilúcióval kapott értékekkel ugyanazon tápközegben, következésképpen ez a módszer alkalmazható a CAS MIC értékének meghatározására a *C. albicans* izolátumokkal szemben. PG egyik izolátumnál sem jelent meg. A szérumból alapú tesztek standardizálását nehezíti a szérumból optimális koncentrációjának megválasztása, az eredete (emberi vagy állati), valamint a költsége. A költségek csökkentésére megoldást jelenthet az állati szérumból (szarvasmarha szérumból albumin) alkalmazása a diagnosztikai laborokban, mivel a humán szérumbólhoz hasonlóan jól elkülöníti a vad típusú izolátumokat a szerzett rezisztenciával rendelkező izolátumoktól. A szérumból elvégzett érzékenységi tesztek számának növelésével megfelelő adatmennyiség állna rendelkezésre, hogy a CAS esetében új klinikai határértékeket vezessenek be a *Candida* fajok ellen. Ezáltal még eredményesebb lenne a csökkent echinocandin érzékenységgel rendelkező izolátumok azonosítása, valamint a terápiás sikertelenség prognózisa.

A CAS ölési aktivitásának meghatározására irányuló kísérleteinket hat klinikai *C. albicans* izolátummal végeztük el. A kísérletek alatt az izolátumok változatosan viselkedtek RPMI-1640 tápközegben, ugyanis a CAS egy izolátum ellen fungicid, míg két izolátum ellen fungisztikus volt. Ezen felül három izolátumnál figyeltünk meg PG-t az idő-ölés kísérletekben. Az ölési ráták meghatározása során a 16 és 32 mg/l CAS esetén az alacsony k értékek a CAS csökkent aktivitását jelezték minden izolátum esetében. A *C. glabrata* klinikai izolátumok ölési kinetikáját vizsgálva normál tápközegben szintén a nagy koncentrációkon (16-32 mg/l) tapasztaltunk csökkent aktivitást összehasonlítva a 0,25-1 mg/l CAS esetén elért öléssel. Összességében elmondható viszont, hogy hasonlóan a szakirodalomban megjelent eredményekhez a CAS kiváló *in vitro* aktivitást mutatott a vad típusú klinikai *C. glabrata* izolátumok és az ATCC 90030 tesztörzs ellen is.

Ötven százalék szérumban MIC érték emelkedést figyeltünk meg, melynek mértéke a *C. albicans* izolátumoknál 2-16-szoros, a *C. glabrata* izolátumoknál 4-8-szoros volt. A nagy koncentrációknál azonban a korábban látható PG megszűnt mindkét előbb említett faj esetében mind a MIC meghatározás, mind az idő-ölés kísérletek során. A k értékeket tekintve az 50% humán szérum visszaállította a magasabb CAS koncentrációk ölési aktivitását. Ez alól kivétel csupán a 14171-es *C. albicans* izolátum volt, melynél a 32 mg/l CAS-nál mért ölési ráta nagyobb volt RPMI-1640-ben, mint szérumban jelenlétében.

Az 50% humán szérumban tartalmazó tápközegben a CAS ölési rátája az effektív koncentrációkon (ahol csíraszám csökkenés volt megfigyelhető) koncentráció függetlennek bizonyult, vagyis az első hatékony koncentráció elérése után a koncentráció további növelése nem eredményezett szignifikáns mértékű változást a CAS ölési aktivitásában. Ennek hátterében a CAS fehérjékötődése állhat, ezért a CAS koncentrációjának növelésével a

farmakológiailag aktív gyógyszer mennyisége nem növekszik olyan mértékben, hogy az élő aktivitás fokozása következzen be. A *C. albicans* izolátumok esetében 1-32 mg/l között (kivéve a 14171-es izolátum), míg a *C. glabrata*-nál a 4-32 mg/l CAS-nál tapasztaltunk koncentráció független ölési aktivitást. Érdeemes megjegyezni, hogy az átlag k érték tartományok az izolátumok között viszont jelentős változatosságot mutattak (0,085-0,109 1/h, illetve 0,882-0,985 1/h).

Az egyes izolátumok esetén RPMI-1640-ben vagy 50% humán szérum jelenlétében a k értékek alapján látható jobb ölési aktivitás megjelenését vártuk a neutropeniás egérmódellemel elvégzett kísérleteinkben is, főleg a nagyobb dózisok alkalmazásánál. A dózisokat úgy választottuk ki, hogy az elért AUC értékek azonosak legyenek egérben és emberben. Ezek alapján a napi 1 mg/kg dózis a 35 mg-os humán CAS dózissal egyenértékű, a 2 mg/kg/nap dózis megfelel a napi 50 mg humán dózishoz. A jelenleg érvényben lévő CAS terápiának a 3 mg/kg/nap egérdózis, a naponta adagolt 70 mg-os dózishoz pedig az 5 mg/kg/nap egérdózis felel meg.

Az összes általunk vizsgált *C. albicans* klinikai izolátum, valamint a referencia törzs ellen a 3, 5 és 15 mg/kg napi CAS dózisok hatékonyak voltak neutropeniás egérmódellemben, ezzel szemben a napi 1 és 2 mg/kg dózissal nem minden esetben értünk el szignifikáns csíraszám csökkenést a kontrollhoz képest. A hatékony dózisok között azonban statisztikailag szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk, tehát a dózishoz nem fokozta a CAS hatékonyságát. Ezek az adatok megerősítik a CAS koncentráció független viselkedését, melyet az *in vitro* kísérletek során a szérumos tápközegben kaptunk. Az *in vivo* eredményeink azt is alátámasztják, hogy a PG-nek nincs hatása a CAS *in vivo* hatékonyságára *C. albicans* esetében, mivel a legnagyobb dózis (15 mg/kg/nap) is ugyanolyan hatásos volt, mint a napi 3 és 5 mg/kg CAS dózisok. Fontos megjegyezni, hogy a napi dózistól függetlenül 10^4 - 10^6 CFU/gramm élő gombasejt

tenyésztett ki az egerek veséiből, mely jól demonstrálja az invazív candidiasis kezelésének nehézségeit a neutropeniás szervezetben.

A *C. albicans* izolátumokkal ellentétben a *C. glabrata* vad típusú izolátumok esetén a CAS már 1 mg/kg/nap dózisban is hatékonynak bizonyult. Habár kísérleteinkben az összes vizsgált CAS dózis szignifikáns csíraszám csökkenést eredményezett, a csíraszám átlag egyik esetben sem csökkent 10^5 CFU/gramm alá. Azaz, a nagy CAS dózisokkal is csak fungisztatikus hatás érhető el tartósan neutropeniás egerekben, így a dózisznövelés nem jelent terápiás előnyt az alacsonyabb dózisokkal szemben.

Néhány esetben a kedvezőtlen terápiás kimenetel a késleltetett antifungális kezelésnek köszönhető, hiszen a klinikumban az antifungális terápia elindítása több napot is késhet. A kezelés késésének (akár a fertőzést követő 24 óra) következtében a gomba magas szöveti csíraszámot érhet el a súlyos neutropeniában szenvedő betegeknél. A belső szervekbe jutó kórokozót nehezebb eliminálni, mint csak a vérben jelenlévő patogént, a korai terápiával azonban a kórokozó teljes disszeminációja megakadályozható.

A szérum alapú tápközegben, valamint az *in vivo* modellben megfigyelt adatok szerint az általunk kiválasztott, vérből származó *C. glabrata* izolátumok gyenge szaporodó képességgel rendelkeztek. A lassú *in vivo* növekedés viszonylag alacsony virulenciára utal, ennek ellenére az alkalmazott CAS dózisokkal nem sikerült elérni a vesék sterilizálását. Az egyik lehetséges magyarázat az echinocandinok hatásmechanizmusán alapszik, mivel a lassabb növekedéssel egyidejűleg lassul a sejtfálszintézis is, melynek következtében gyengül a CAS *in vivo* ölő aktivitása. Emellett természetesen egyéb faktorok is (pl. neutropénia, a gyógyszer gyenge penetrációja a gyulladt szövetekbe) befolyásolhatják a terápia kimenetelét. A kevés felhasznált izolátum miatt további vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy ennek a gyenge *in vivo* fitnessnek milyen klinikai

jelentősége van, illetve jellemző-e minden vérmintából izolált *C. glabrata*-ra.

Habár echinocandin rezisztencia ritkán fordul elő a *Candida* fajok között, a CAS-nal szemben kialakuló másodlagos rezisztencia néhány orvosi központban komoly problémát okoz. Előzetes kísérleteinkben a CAS rezisztens *C. glabrata* izolátumok virulensebbnek bizonyultak a vad típusú klinikai izolátumokkal összehasonlítva, ugyanis a többi kísérletben alkalmazott $6,6-8,4 \times 10^7$ CFU/egér fertőző csíraszám öt napon belül 100%-os halálozást okozott. Az általunk vizsgált érzékeny és rezisztens izolátumok azonban nem voltak izogének. A nagy CAS dózisok hatástalannak bizonyultak a prominens FKS mutációval rendelkező izolátumok ellen. Eredményeink megerősítik a klinikai tapasztalatokat, miszerint a nagyobb dózisokkal nem fokozható az echinocandinok hatékonysága az érzékeny *C. albicans* és *C. glabrata* klinikai izolátumokkal szemben. Az *in vitro* mért adatok jól korreláltak az *in vivo* elért eredményekkel, az 50% humán szérumban kapott ölési ráták alapján a CAS *in vivo* hatékonysága előre megjósolható volt. A PG nem befolyásolja a CAS *in vivo* hatékonyságát. A nagyfokú rezisztenciával rendelkező *C. glabrata* izolátumok okozta invazív candidiasis nem kezelhető még nagy dózisú CAS-nal sem neutropéniás betegek esetében.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során meghatároztuk a caspofungin által kifejtett ölési rátát RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben *C. albicans* és *C. glabrata* klinikai izolátumok ellen. Továbbá neutropéniás egérmodellben vizsgáltuk a különböző napi caspofungin dózisok *in vivo* hatékonyságát a fentebb említett fajok esetében.

A caspofungin ölési rátája (*k*) RPMI-1640-ben nagyobb volt 1 mg/l-nél, mint a 16 és 32 mg/l koncentrációkon mért értékek az összes *C. albicans* izolátum esetében. Ugyanazon tápközegben a caspofungin fungicid aktivitással bírt 1 és 4 mg/l koncentrációkon három *C. glabrata* izolátumnál, viszont csak fungisztatikus aktivitást tapasztaltunk a magas koncentrációkon (paradox növekedés). A caspofungin nagymértékben kötődik szérumfehérjékhez (96,5%), így a szérummal kiegészített tápközegben aktivitása csökkent, ellenben a korábban látott paradox növekedés megszűnt. A *C. albicans* klinikai izolátumok esetében 50% szérumban 1-32 mg/l (egy izolátumot kivéve), illetve a *C. glabrata* törzseknél 4-32 mg/l koncentrációkon koncentráció független ölést tapasztaltunk. Neutropéniás egérmodellben a 3, 5 és 15 mg/kg napi caspofungin dózisok hatékonyak bizonyultak az összes *C. albicans* izolátum ellen, de a hatékony dózisok között szignifikáns különbség nem volt. A *C. glabrata* izolátumok esetén az összes dózis (1, 2, 3, 5 és 20 mg/kg/nap) statisztikailag szignifikáns módon csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát a kontrollhoz viszonyítva, a dózisok hatékonyságában szintén nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést. Azonban az átlag szöveti csíraszám egyik esetben sem csökkent 10^5 CFU/g alá. *In vitro* és *in vivo* eredményeink alapján a dózis növelése nem fokozza a caspofungin aktivitását *C. albicans* és *C. glabrata* esetében, de a paradox növekedés nem befolyásolja a caspofungin *in vivo* hatékonyságát.



Nyilvántartási szám: DEENK/84/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Domán Marianna

Neptun kód: I441RU

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Domán, M.**, Kovács, R., Perlin, D.S., 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:2.248 (2014)
2. **Domán, M.**, Kovács, R., 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. 12, 1-10, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1567201812666150623091336>
IF:1.478 (2014)

További közlemények

3. Kovács, R., 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. Epub ahead of print (2016)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.007>
IF:4.296 (2014)





4. Kovács, R., Gesztelyi, R., Perlin, D.S., Kardos, G., **Domán, M.**, Berényi, R., Majoros, L.: Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum.
Mycopathologia. 178 (3-4), 197-206, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9799-4>
IF:1.528
5. Kovács, R., Gesztelyi, R., Berényi, R., **Domán, M.**, Kardos, G., Juhász, B., Majoros, L.: Killing rates exerted by caspofungin in 50 % serum and its correlation with in vivo efficacy in a neutropenic murine model against *Candida krusei* and *Candida inconspicua*.
J. Med. Microbiol. 63 (2), 186-194, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.066381-0>
IF:2.248
6. Berényi, R., Kovács, R., **Domán, M.**, Gesztelyi, R., Kardos, G., Juhász, B., Perlin, D., Majoros, L.: Efficacy of single large doses of caspofungin in a neutropenic murine model against the "psilosis" group.
New Microbiol. 37 (3), 355-362, 2014.
IF:1.784

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,582

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 3,726

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, 2016.04.01.



Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája

R. Kovács, R. Gesztelyi, R. Berényi, **M. Domán**, G. Kardos, B. Juhász, L. Majoros. Should echinocandin doses be increased against *Candida* species? An *in vitro* and *in vivo* study of caspofungin against *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. inconspicua*. 6th Trends in Medical Mycology, 11-14 October 2013. Copenhagen, Denmark (P011) Mycoses

L. Majoros, R. Kovács, R. Berényi, **M. Domán**, C. Miszti and G. Kardos. Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* and *C. kefyr* using time-kill methodology. 6th Trends in Medical Mycology, 11-14 October 2013. Copenhagen, Denmark (P021) Mycoses

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

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

Domán Marianna, Kovács Renátó, Berényi Réka, Kardos Gábor, Majoros László. A caspofungin *in vitro* és *in vivo* aktivitásának vizsgálata paradox növekedést mutató, illetve nem mutató *Candida albicans* izolátumok ellen. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, 2014. október 15-17. Keszthely.

Kovács Renátó, Berényi Réka, **Domán Marianna**, Majoros László. A caspofungin *in vitro* hatékonyságának vizsgálata *Candida krusei*, *C. inconspicua* és *C. albicans* klinikai izolátumok ellen. Tavaszai Szel Konferencia, 2013. május 31-június 2. Sopron.

Kovács Renátó, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, **Domán Marianna**, Berényi Réka, Majoros László. A caspofungin *in vitro* farmakodinámiájának összehasonlító vizsgálata szérumban és 50% szérumban kiegészített tápközegben *Candida albicans* izolátumok ellen. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, 2014. október 15-17. Keszthely