

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Bozó Aliz

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1 A Candida fajok általános jellemzése.....	8
2.2 A Candida fajok virulencia faktorai és a patogenitásban betöltött szerepük.....	10
2.3 A Candida albicans és a Candida parapsilosis okozta fertőzések epidemiológiája	11
2.4 A biofilmek fertőzésekben betöltött szerepe	13
2.4.1 A Candida biofilmek biológiája	15
2.4.2 Candida biofilmek és a quorum-sensing	19
2.4.3 Farneazol	20
2.5 Antifungális szerek.....	24
2.5.1 Echinocandinok	24
2.5.2 Fluconazol	27
2.6 Antifungális „Lock” Terápia	29
3. Célkitűzés	31
4. Anyagok és módszerek.....	32
4.1 A vizsgált izolátumok.....	32
4.2 A planktonikus sejtek érzékenységi vizsgálata	32
4.3 Biofilm képzés.....	33
4.3.1 A biofilm mennyiségi meghatározása	34
4.3.2 A biofilmet alkotó sejtek érzékenységi vizsgálata	34
4.4 A caspofungin, micafungin, fluconazol és a farneazol közötti kölcsönhatás vizsgálata	36
4.5 A metabolikus aktivitás változás vizsgálata az idő függvényében.....	38
4.6 Adatok elemzése.....	39
4.7 In vivo kísérletek	40
4.7.1 A kísérlet során alkalmazott egerek	40
4.7.2 A fertőzés folyamata.....	40
4.7.3 Antifungális terápia	40
4.8 Az in vitro és in vivo kísérleteink képekkel illusztrálva	42

5. Eredmények	44
5.1 A caspofungin és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel Candida parapsilosis planktonikus sejtek esetén.....	44
5.2 A caspofungin és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel Candida parapsilosis szesszilis sejtek esetén.....	45
5.3 A caspofungin és a farnezol közötti in vitro kölcsönhatások vizsgálata Candida parapsilosis izolátumok esetén	46
5.4 A metabolikus aktivitás változása az idő függvényében caspofungin és farnezol esetében Candida parapsilosis által képzett biofilmek ellen	47
5.5 A micafungin és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel a Candida parapsilosis planktonikus sejtek esetén.....	49
5.6 A micafungin és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel Candida parapsilosis szesszilis sejtek esetén.....	50
5.7 A micafungin és a farnezol közötti in vitro kölcsönhatások vizsgálata Candida parapsilosis izolátumok esetén	51
5.8 A metabolikus aktivitás változása az idő függvényében micafungin és farnezol esetében Candida parapsilosis által képzett biofilmek ellen	52
5.9 A fluconazol és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel Candida albicans planktonikus sejtek esetén.....	54
5.10 A fluconazol és a farnezol iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel Candida albicans szesszilis sejtek esetén	55
5.11 A fluconazol és a farnezol közötti in vitro kölcsönhatások vizsgálata Candida albicans izolátumok esetén	56
5.12 A metabolikus aktivitás változása az idő függvényében fluconazol és farnezol esetében Candida albicans által képzett biofilmek ellen.....	57
5.13 A fluconazol in vivo hatékonyságának vizsgálata Candida albicans izolátumok ellen vulvovaginitis egérmodellben	59
5.14 A társszerzők közreműködése a tudományos munka során	62
6. Megbeszélés.....	63
7. Összefoglalás	72
8. Summary	73
9. Irodalomjegyzék	74
10. Tárgyszavak-Keywords	96
11. Köszönetnyilvánítás.....	97
12. Függelék	98

Fontosabb rövidítések

ALS	agglutinin-like sequence
AmB	amphotericin B
ANI	anidulafungin
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	caspofungin
CFU	colony forming unit
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
FLU	fluconazol
IDSA	Infectious Diseases Society of America
MIC	minimal inhibitory concentration = minimális gátló koncentráció
MICA	micafungin
SAP	szekretált aszpartil proteinázok
SDA	Sabouraud dextróz agar
XTT	2,3 -bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium - sejttenyésztésre alkalmas táptalaj

1. 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 (Arendrup és mtsai. 2005; Espinel-Ingroff és mtsai. 2009). 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 (Bassetti és mtsai. 2017).

Napjainkban hozzávetőlegesen 200 *Candida* fajt ismerünk, melyek közül körülbelül 20 speciesnek lehet etiológiai szerepe az invazív candidiasis kialakításában (Akpan és Morgan 2002; Williams és mtsai. 2013). Európai adatok alapján az esetek több mint 50%-ában izolált *C. albicans* mellett egyre többször azonosítanak ún. non-albicans fajokat [*C. parapsilosis* (18,5%), *C. glabrata* (13,8%), *C. tropicalis* (6%), *C. krusei* (2,5%)] (Klingspor és mtsai. 2014).

A *Candida* fajok a normál flóra tagjaiként megtalálhatók a szájüregben, a vastagbélben, illetve a női genitális traktusban (Shao és mtsai. 2007). Kommenzalista mikroorganizmusként kolonizálják a nyálkahártyák felszíneit anélkül, hogy tüneteket okoznának, azonban bizonyos körülmények között akár életet veszélyeztető fertőzések kialakulásáért is felelősek (Wisplinghoff és mtsai. 2006; Vincent és mtsai. 2009). Az elmúlt évtizedekben megnövekedett a *Candida* fajok által okozott nozokomiális infekciók száma, jelenleg a harmadik-negyedik leggyakrabban izolálható kórházi véráramfertőzést okozó mikrobák (Lin és mtsai. 2015; Larru és mtsai. 2016). Ennek háttérében a sebészeti beavatkozások számának növekedése, széles-spektrumú antibiotikumok gyakori vagy éppen indokolatlan alkalmazása, parenterális táplálás valamint a transzplantáció következtében kialakuló immunhiányos állapot állnak (Ortega és mtsai. 2011). A kedvezőtlen epidemiológiai adatokat tovább árnyalja a magas mortalitási arány, amely fajtól függően 42-60% is lehet (Kett és mtsai. 2011; Kollef és mtsai. 2012; Puig-Asensio és mtsai. 2014).

A beültethető orvostechnikai eszközök (kanül, katéter, műbillentyű, endotracheális tubus, ízületi protézis) egyre szélesebb körű alkalmazása miatt a biofilm-asszociált fertőzések száma is megemelkedett az elmúlt két évtizedben. Egy 1992 és 2001 között az Amerikai Egyesült Államokban végzett tanulmány szerint a biofilmekkel kapcsolatba hozható infekciók

50%-áért az évente elvégzett több mint 5 millió központi vénás katéteres beavatkozás tehető felelőssé (Darouiche 2001; NNIS System 2001). A kialakult helyzet súlyosságát tovább árnyalja, hogy az intenzív osztályokon ápoltságban lévő betegek körében éves szinten körülbelül 80.000 esetből mintegy 20.000 halállal végződik. Ezen halálokok nagyrészt közvetlen vagy közvetett oka a mikrobák, többek között a *Candida* fajok által képzett biofilmek (Kojic és Darouiche 2004). A *Candida* fajok a katéter-asszociált véráramfertőzések harmadik leggyakoribb kórokozói (Hidron és mtsai. 2008). Egy 2015-ben megjelent tanulmány eredményei alapján a candidémiában szenvedő betegek vérmintájából származó biofilm termelő *Candida* fajok incidenciája 83,3% volt (Bouza és mtsai. 2015). A katéter-asszociált fertőzések esetén a leggyakrabban izolálható fajok a *C. parapsilosis* komplex tagjai (42,8%), illetve a *C. albicans* (34,7%) (Brunetti és mtsai. 2017). A gomba biofilmek sikeres terápiája komoly feladatot jelent, hiszen sok esetben 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 elrejti azokat a gazdaszervezet immunsejtjei elől (Tsui és mtsai. 2016). 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 (Pappas és mtsai. 2009). 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 (Kuhn és mtsai. 2002), azonban önmagukban nem minden esetben mutatnak megfelelő hatékonyságot (Ramage és mtsai. 2009). 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 génexpressziós folyamataikat, elősegítve ezzel saját túlélésüket (Wongsuk és mtsai. 2016; Polke és Jacobsen 2017). Korábbi kísérletekben leírták, hogy bizonyos quorum-sensing molekulák szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazva gátolják a gombasejtek növekedését

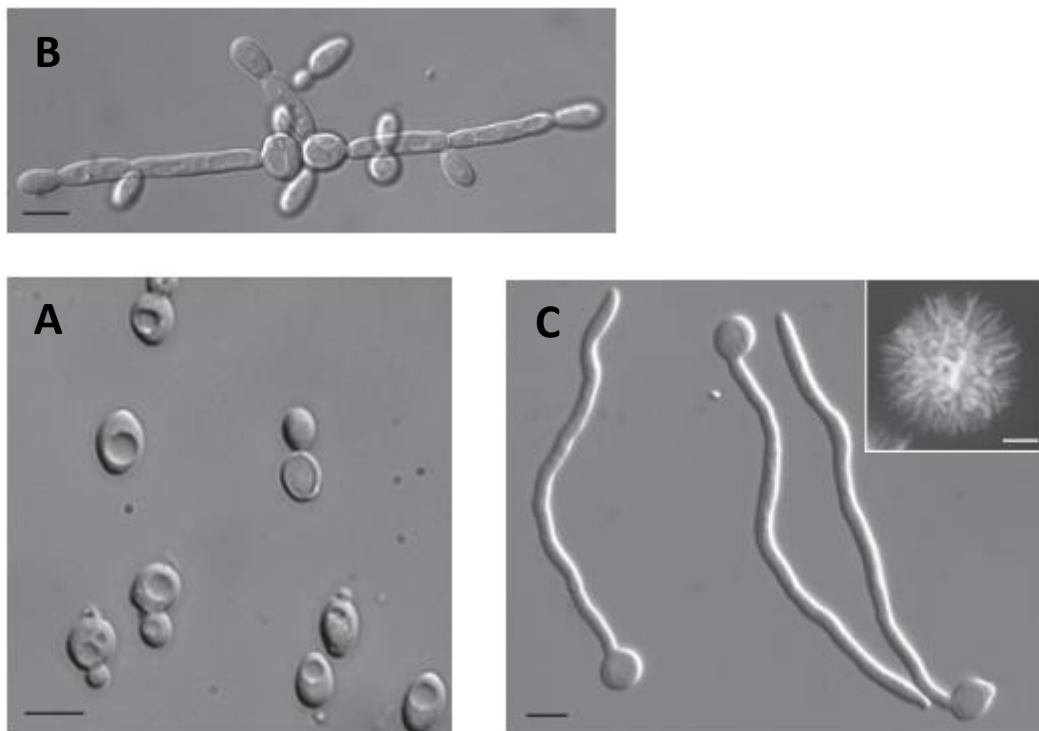
a biofilmen belül (Ramage és mtsai. 2002; Mosel és mtsai. 2005; Jabra- Rizk és mtsai. 2006). Feltételezésünk szerint a szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazott quorum-sensing molekulák megzavarhatják a *Candida* sejtek közötti kommunikációt, ezáltal gyengül a biofilm kompakt szerkezete, ami elősegíti 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 (Uppuluri és mtsai. 2010; Garcia-Effron és mtsai. 2008). A quorum-sensing molekulák *in vitro* potenciális szinergizáló hatása mellett szeretnénk volna megvizsgálni, hogy ezen molekulák *in vivo* alkalmazása jelent-e bármilyen terápiás előnyt az olyan gyakori mukozális biofilm-asszociált fertőzésekben, mint a *C. albicans* által okozott vulvovaginitis (De Cremer és mtsai. 2015). Reményeink szerint eredményeink hozzájárulhatnak olyan új típusú alternatív terápiák megfogalmazásához, amelyekkel hatékonyabban vehetjük fel a harcot a *Candida* fajok által képzett biofilmek ellen.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A *Candida* fajok általános jellemzése

A *Candida* fajok három fő megjelenési formája az élesztő, a pszeudohifa és a hifa (1. ábra). Az élesztő forma 2-10 μm nagyságú, ovális vagy kerek morfológiát mutató egysejtű szerveződés (Eggimann és mtsai. 2003), amelyek tengelyirányú vagy bipoláris sarjadásra egyaránt képesek (Thompson és mtsai. 2011). Az osztódással történő szaporodás során az anyasejtek a leánysejtekkel együtt maradhatnak, így jön létre az ellipszis alakú sejtekből felépülő pszeudohifa, ahol az egyes sejtek között közvetlen anyagáramlás nem figyelhető meg (Sudbery és mtsai. 2004). Ezzel szemben a valódi hifa 15-30 μm méretű, megnyúlt sejtjei közötti szeptumokon található pórusok révén lehetőség van a sejtek közötti közvetlen anyagáramlás kialakítására és fenntartására (Thompson és mtsai. 2011; Eggimann és mtsai. 2003). A *C. albicans* és *C. dubliniensis* esetében tápanyagszegény közegben megfigyelhető speciális képlet a chlamydospóra, amely a hifák végén vagy oldalán megjelenő nagy, kerek, vastag falú kitartóképlet (Staib és Morschhauser 2007). Szöveti környezetben bizonyos fajok csak élesztő és pszeudohifa kialakítására képesek (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi* és *C. lusitaniae*), míg a *C. albicans*, *C. tropicalis* és a *C. dubliniensis* esetében mindhárom morfológiai forma (élesztő, pszeudohifa, hifa) megfigyelhető (Thompson és mtsai. 2011).

A gombák sejtmembránjában ergoszterol található, amely több antifungális szer potenciális támadáspontja lehet (pl.: poliének, azolok) (Lewis 2011). A gomba sejtfal 80-90%-ban tartalmaz szénhidrátokat, melyben a három alapvető építőelem közül legnagyobb mennyiségben a β -glükán (47-60%) és a mannán (40%) fordul elő, míg a kitin jóval kisebb mennyiségben található meg (0,6-9%). A szénhidrát komponenseken kívül a sejtfal tartalmaz még fehérjét (6-25%), illetve kisebb százalékban lipideket (1-7%) (Chaffin és mtsai. 1998). A sejtfal felépítésében résztvevő komponensek megoszlása hasonló képet mutat mind az élesztő, mind pedig a fonalas formában, de a *C. albicans* esetében megjelenéstől függően módosulhat a β -glükán, a kitin és a mannán vegyületek aránya. A hifa forma legalább háromszoros mennyiségben tartalmaz kitint az élesztő sejtekhez képest (Chaffin és mtsai. 1998).



1. ábra: A *Candida* speciesek morfológiai formái (**A.** Élesztő, **B.** Pszeudohifa, **C.** Hifa) Mérték: 5 μ M (Sudbery PE. 2011).

2.2 A *Candida* fajok virulencia faktorai és a patogenitásban betöltött szerepük

A gombák számos virulencia faktoral rendelkeznek, melyek lehetővé teszik a fertőzés kialakítását a gazdaszervezetben. Ezek közül jelentősnek mondható a különböző adhezin és invazin molekulák kontrollált expressziója, a hidrolitikus enzimek szekréciója és a biofilm képzés (Mayer és mtsai. 2013). A dimorfizmus, vagyis az élesztő-hifa átalakulás képessége a *Candida* fajok egyik legfontosabb virulenciafaktora (Biswas és mtsai. 2007). A kisebb méretű élesztő sejtek elsősorban a fertőzés továbbterjedésében és a kolonizációban játszanak fontos szerepet, míg az invazív tulajdonságokkal rendelkező fonalas formák a gazdaszervezet szöveti károsításában és inváziójában vesznek részt (Jacobsen és mtsai. 2012). Az élesztő-hifa átalakulást számos környezeti tényező befolyásolhatja. Az élesztő kialakulásának kedvez az alacsony pH (pH<6), illetve az alacsony hőmérséklet (<25 °C). A hifa forma kialakulását *in vitro* stimulálhatja a szérum, az N-acetil-glükózamin jelenléte, 37 °C, neutrális pH, 5% CO₂ és a tápanyaghiány (Kumamoto és Vincses 2005). A gazdaszervezetben egyéb molekulák is indukálhatják a hifa képződést, ilyenek a hemin, ösztrogén, nukleotidok, prosztaglandin E2 és a luteinizáló hormon (Ernst 2000). A fent említett stimulusk hatására aktiválódik a cAMP/PKA vagy a MAPK szignalizációs útvonal, melynek következtében a hifa forma kialakulásáért felelős elsődleges transzkripciós faktorok (Efg1 és Cph1) expresszálódnak (Sudbery 2011). Az élesztő-hifa morfológiai átalakulás szabályozása közvetlenül quorum-sensing molekulák segítségével is történhet (pl.: farneazol, tirozol). A különböző quorum-sensing molekulák termelése egyenes arányban van a populációt alkotó sejtek denzitásával. Magas sejtszám esetén (>10⁶ sejt/mL) elsősorban a farneazol termelődik, amely az élesztő forma kialakulását segíti elő a cAMP szignál-transzdukciós útvonal repressziója révén (Kebaara és mtsai. 2008). Ezzel szemben alacsony sejtszám (<10⁶ sejt/mL) esetében a tirozol termelés van túlsúlyban elősegítve a fonalas forma, illetve a biofilm képzést (Alem és mtsai. 2006; Kruppa 2009).

A *Candida* fajok által termelt hidrolitikus enzimek a gazdaszervezet károsításában szerepet játszó fontos virulencia faktorok, melyek közül jelentősek a szekretált aszpartil proteinázok (SAP), foszfolipázok, lipázok és a hemolizinek (Silva és mtsai. 2013). A SAP enzimek a mukozális felszínt roncsolják, illetve védelmet nyújtanak az immunrendszer egyes fehérjéivel szemben, ezáltal elősegítik a szövetek kolonizációját és az inváziót (Rüchel 1999; Pichova és mtsai. 2001). Széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek, a humán proteinek közül

roncsolják többek között az albumint, hemoglobint, keratint, valamint a kollagént (Ray és Payne 1990). A *C. albicans* esetében ezidáig 10 SAP gént azonosítottak. Az SAP1-SAP3 gének expressziója elengedhetetlen a mukozális infekciókban, míg az SAP4-SAP6 gének által kódolt fehérjék a szisztémás fertőzések kialakításához szükségesek. Az SAP9-SAP10 géntermékek a sejt integritásának fenntartásában és az adhézió kialakításában nélkülözhetetlenek (Silva és mtsai. 2013). Korábbi tanulmányokban leírták, hogy az SAP1-SAP3 az élesztő, míg az SAP4-SAP6 a hifa fázisban expresszálódik (Naglik és mtsai. 2004). Ezidáig a *C. parapsilosis* esetében csupán 3 SAP gént sikerült azonosítani (SAPP1-SAPP3) (Pichova és mtsai. 2001).

A foszfolipázoknak négy osztálya van (A, B, C, D), melyek közül a B osztály öt tagja kiemelt szerepet játszik a gazdaszervezet sejtjeinek membránkárosításában. A foszfolipázok a foszfolipidek zsírsavakká történő hidrolizálásáért felelősek. Számos tanulmány leírja, hogy a non-*albicans* fajok szignifikánsan kevesebb foszfolipáz enzimet termelnek, mint a *C. albicans*, ezzel magyarázva a non-*albicans* fajok eredendően alacsonyabb virulenciáját (Mayer és mtsai. 2013).

2.3 A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* okozta fertőzések epidemiológiája

Az elmúlt évtizedekben a különböző gomba fajok által okozott invazív fertőzések száma folyamatosan növekszik, főként az intenzív osztályon ápoltság körében (Lepak és Andes 2011). Bár közel 20 *Candida* faj hozható összefüggésbe a szervezetben kialakuló invazív candidiasis-sal, a fertőzések több mint 90%-át 5 species, a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* okozza (Pfaller és Diekema 2007).

Az ARTEMIS DISK Program 1997 és 2003 között végzett átfogó felmérése során 39 ország 127 orvosi központjának bevonásával vizsgálta a különböző klinikai mintákból kitenyésztett *Candida* fajok eloszlását (Pfaller és mtsai. 2005). A candidémiás esetek túlnyomó részében (66%) a *C. albicans* volt izolálható világszerte, azonban érdemes megjegyezni, hogy az incidencia tekintetében csökkenő tendencia figyelhető meg. Ezzel szemben a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések száma növekedést mutat (Pfaller és Diekema 2007). A *Candida* fajok megoszlása nemcsak kontinensenként, országokként vagy városokként, de kórházanként is változó (Morii és mtsai. 2014). A *C. albicans* földrajzi eloszlását tekintve legtöbbször Észak-

és Közép-Európában valamint az Amerikai Egyesült Államokban azonosítják (Falagas és mtsai. 2010), míg a *C. parapsilosis*-t leggyakrabban Ausztrália, Latin-Amerika illetve Afrika, Ázsia és Európa mediterrán országaiban identifikálják (Guinea 2014).

A *C. albicans* által okozott fertőzések többnyire endogén (vastagbél) eredetűek, azonban exogén forrásokból, elsősorban a bőrről származó fertőzések is előfordulhatnak (Vrioni és Matsiota-Bernard 2001). *C. albicans* okozta infekció nagyobb gyakorisággal fordul elő sebészeti beavatkozáson átesett (nem transzplantált) betegek esetén, viszont alacsonyabb prevalencia jellemzi a malignus hematológiai betegségben szenvedőknél és hematopoetikus őssejt transzplantáltaknál (Pfaller és mtsai. 2012).

A *C. parapsilosis* komplex tagjainak elkülönítése RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction) módszer segítségével történt, melynek alapján egy, a korábban *C. parapsilosis*-ként ismert fajt három speciesre bontották szét: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* (Tavanti és mtsai. 2005). Az egymással szoros rokoni kapcsolatban álló fajok azonban virulenciájukban, antifungális szerek iránti érzékenységükben, illetve földrajzi előfordulásukban különböznek egymástól (Lockhart és mtsai. 2008). A *C. parapsilosis sensu stricto* rendszerint a bőr felszínén megtalálható szaprofita, az általa okozott fertőzések leginkább bőr eredetűek. Megtalálhatók a kórházi környezetben, illetve mint biofilm képző faj, különböző beültetett orvosi eszközökön is nagy prevalenciával fordulhat elő (Cantón és mtsai. 2011). Fertőzések leginkább az újszülött intenzív osztályokon alakulhatnak ki, ahol az ápolók és újszülöttek közötti direkt interakció útján horizontális (az ágens átvitele egyik érzékeny gazdáról a másikra) terjedés figyelhető meg, akár előzetes kolonizáció nélkül (Lupetti és mtsai. 2002). További rizikó faktort jelent a parenterális táplálás, korábbi műtét vagy antibiotikumos kezelés (Almirante és mtsai. 2005).

A 2004 és 2008 között elkészített PATH (Prospective Antifungal Therapy) felmérésben összesen 23 egészségügyi központot vizsgáltak az Amerikai Egyesült Államokban az invazív candidiasist okozó *Candida* fajok epidemiológiája szempontjából. Az invazív candidiasis esetek 49,6%-ban volt azonosítható non-*albicans* faj, melyek közül átlagosan 24,7%-ban identifikáltak *C. parapsilosis*-t (Pfaller és mtsai. 2014). Ez mindenképpen emelkedő tendencia a korábbi években mért számokhoz képest. A *C. parapsilosis* 4 központban a leggyakrabban izolált non-*albicans* faj volt, míg 18 intézményben a második helyen állt a *C. glabrata* után.

Érdeemes kihangsúlyozni, hogy legtöbbször újszülött, illetve gyermekosztályokon azonosították. Megjegyzést érdemel, hogy a 15 vizsgált non-albicans faj közül a *C. parapsilosis* rendelkezett a második legmagasabb 90 napos túlélési aránnyal (70,7%) a *C. lusitaniae*-t követően (74,5%) (Pfaller és mtsai. 2014).

2.4 A biofilmek fertőzésekben betöltött szerepe

A természetes környezetben előforduló mikroorganizmusok a szabadon lebegő, ún. planktonikus forma helyett a saját túlélésük érdekében előnyben részesítik a szesszilis vagy másnéven biofilm fenotípust (Douglas 2003). A biofilm biotikus (gazdaszervezet szövetei) és abiotikus (beültetett orvosi eszközök) felületeken megtapadó strukturált mikrobiális közösség, melyek leggyakrabban a sejtek által termelt poliszacharid mátrixba ágyazva helyezkednek el. A biofilmet alkotó mikroorganizmusok fenotípusa, illetve élettani tulajdonságaik az eltérő génexpresszióknak köszönhetően jelentősen különbözik ugyanazon species planktonikus formáitól (Donlan 2002).

A szilárd fázis és a nedves közeg (víz, vér) közötti határfelület ideális környezetet teremt a mikroorganizmusok megtapadásához és növekedéséhez. A szilárd felületek fizikai-kémiai jellemzői nagyban befolyásolják a sejtek adhézióját. Az érdesebb, durvább anyagok nagyobb kolonizációs felületet biztosítanak a mikrobák számára, mely nem utolsó sorban a biofilmre gyakorolt nyíróerő hatását is képes csökkenteni (Donlan 2002). Korábban leírták, hogy a felületek fiziko-kémiai tulajdonságait tekintve a mikrobák könnyebben kötődnek a hidrofób, nem poláros felületekhez (teflon, műanyagok), mint a hidrofil anyagokhoz (üveg, fém). A sejtek adhézióját befolyásolja továbbá a vizes közeg pH-ja, a rendelkezésre álló tápanyag mennyisége, az ionerősség és a hőmérséklet (Donlan és mtsai. 1994). A szekretált poliszacharid mátrix elsősorban a biofilm integritásának fenntartásáért felelős, de hozzájárul az antimikrobás szerekkel szemben kialakuló rezisztenciához is. A mátrix összetevői legnagyobb mennyiségben fehérjék és glikoproteinek (55%), szénhidrátok (25%), kisebb mennyiségben megtalálhatók még lipidek (15%) és extracelluláris DNS (5%) is (Nobile és Johnson 2015).

Napjainkban az egyre szélesebb körben alkalmazott implantált orvosi eszközök felületén kialakuló biofilm fontos prediszponáló tényezője lehet a különböző szisztémás fertőzéseknek

(Ramage és mtsai. 2005). A fertőzés forrása egyrészt lehet az eleve kontaminált katéterek és infúziós oldatok alkalmazása, másrészt az ápoló személyzet nem megfelelően fertőtlenített bőrfelszíne (Sherertz 2000). Egy 2015-ben megjelent tanulmány szerint a kórházban ápolat súlyos és krónikus betegek legalább 8%-ánál végeznek ellátásuk során centrális vénába ültetett katéteres beavatkozást (Yousif és mtsai. 2015). Az eszköz behelyezését követően 24-36 órával már intakt biofilmet találhatunk a katéterek vagy kanülök felszínén (Anaissie és mtsai. 1995). Raad és munkatársai kísérleteik során megfigyelték, hogy a rövid, átmeneti időre behelyezett katétert (<10 nap) viselőknél a katéter külső felszínén, míg az állandó (tartós) (>30 nap) katéter beültetésekor elsősorban intraluminalisan alakul ki a biofilm (Raad és mtsai. 1993; Raad 1998). Az érett biofilmről leszakadó sejtek bekerülve a véráramba hozzájárulnak a magas mortalitással társuló szisztémás fertőzések kialakulásához (Finkel és Mitchell 2011; Yousif és mtsai. 2015). Mivel a biofilmek rezisztensek az antimikrobás szerek nagy részével szemben, ezért eradikálásuk történhet a kolonizált orvosi eszköz - gyakran sebészeti úton történő - eltávolításával, illetve nagy dózisú antimikrobás szerek kombinációban történő alkalmazásával (Fox és mtsai. 2015; Andes és mtsai. 2012). Fontos azonban megjegyezni, hogy a beültetett eszközök eltávolítása költséges és a súlyos állapotú betegek esetében kontraindikált lehet, továbbá az antimikrobás szerek magas dózisban történő alkalmazása során bizonyos esetekben máj-, illetve vesekárosodással is számolni kell (Andes és mtsai. 2012).

Az abiotikus felszínen képződő biofilmek mellett több nyálkahártyához társuló mikroba fertőzésnél írtak le biofilm kapcsolatot. A gombák közül a *Candida* fajok elsősorban az orális és a vaginalis epithelium felszínén képesek biofilmet képezni (Ganguly és mtsai. 2011), de a gasztrointesztinális rendszerből izolált *Candida* fajok génexpressziós mintázata is a szesszilis formához hasonlít, tehát gyanítható, hogy a vastagbél falán is biofilmként vannak jelen (Ramage és mtsai. 2002; Rosenbach és mtsai. 2010). A *C. albicans* által a szájüreg nyálkahártyáján okozott pseudomembranosus candidiasis többnyire immunszuppresszált egyéneknél jelenik meg, illetve HIV-pozitív személyekben az AIDS elsődleges manifesztációjaként. Jellemző tünetei a szájpadláson, a buccalis nyálkahártyán és a nyelv felületén is megjelenő fehér színű lerakódások, melyek alatt diffúz erythema helyezkedik el (Williams és Lewia 2011).

Becslések szerint a szülőképes korú nők 75%-a élete során legalább egyszer szenved *Candida* okozta vulvovaginitisben (Sobel 2007), mely 40-50%-ban legalább egyszer ismét kialakul

(Mayer és mtsai. 2013). A rekuráló megbetegedésben szenvedők aránya 5-8%-ra tehető (Harriott és mtsai. 2010). A fertőzés kialakulására predisponáló faktorok közül jelentős a diabetes mellitus, különböző antibiotikumok használata, orális fogamzásgátló szerek alkalmazása, terhesség, illetve a hormonterápia (Fidel 2004; Peters és mtsai. 2014).

2.4.1 A *Candida* biofilmek biológiája

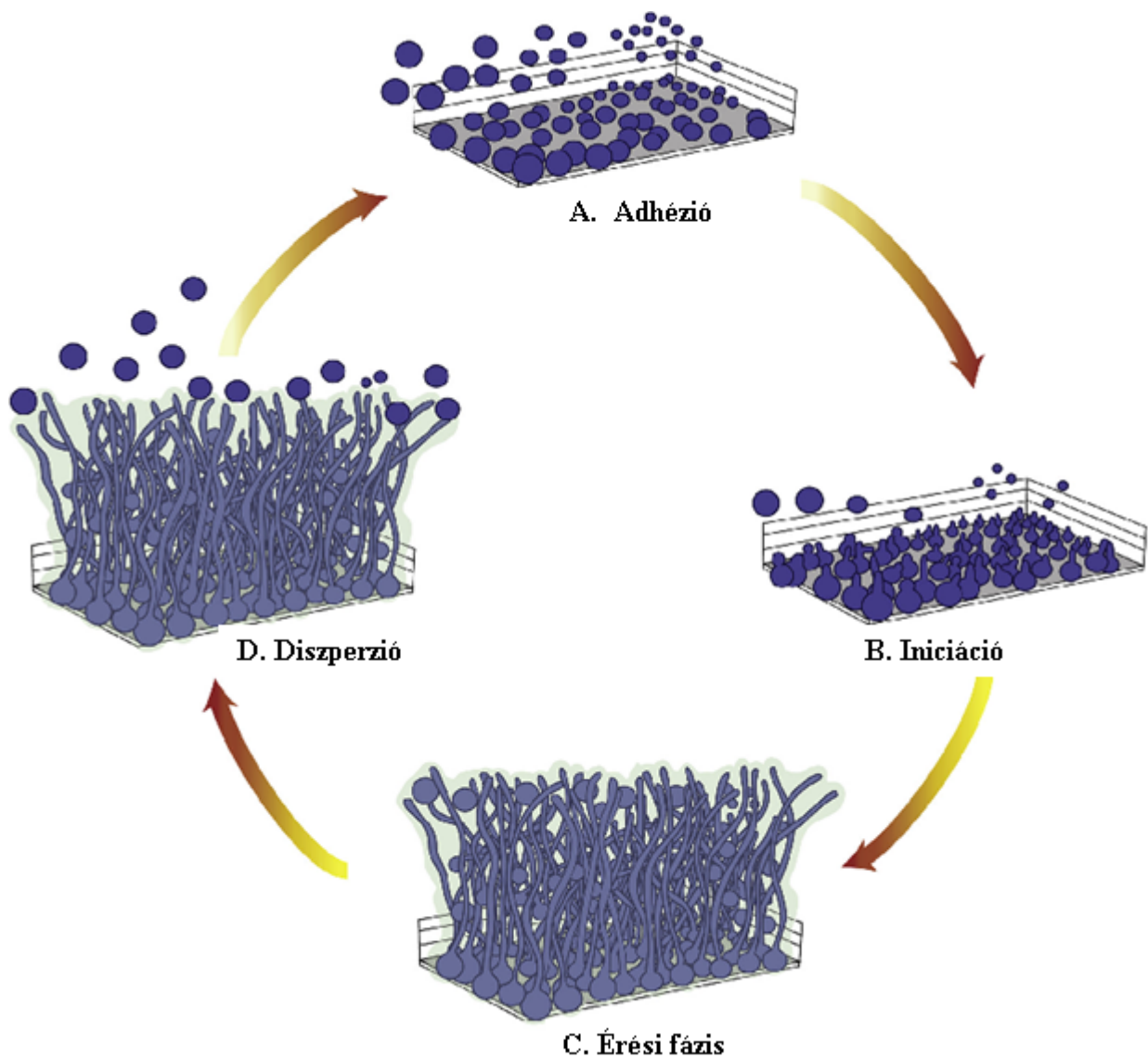
Az elmúlt két évtizedben végzett kutatások eredményei azt bizonyítják, hogy a *Candida* fajok biofilm képző képessége biotikus és abiotikus felszíneken a nemzetség egyik fontos virulencia faktora (Thein és mtsai. 2009). Az utóbbi évtizedben kezdődött el igazán a *Candida* biofilmek biológiájának kutatása, így napjainkban elsősorban a *C. albicans* biofilmek biológiájáról vannak információink. A non-albicans fajok esetében végzett vizsgálatok száma még erősen limitált. A *C. albicans* elsősorban szilikon- és akrilát alapú elasztomer, polisztrén, nylon és polivinil-klorid felületekhez kötődik és képez biofilmet, míg a poliuretán és a 100%-ban szilikon anyagok felületéhez kevésbé kapcsolódik (Hawser és Douglas 1994).

A *C. albicans* biofilm képzése 4 fő lépésben zajlik (Chandra és mtsai. 2001). Az első fázis során a sejtek a sejtfalukban található fehérjék révén tapadnak egymáshoz, illetve a különböző felületekhez (Dranginis és mtsai. 2007). Ezt a folyamatot a *Candida* fajok adhezijeik és mannoпротеinjeik segítségével valósítják meg. Az adhéziót mediáló fehérjék mellett a galaktóz, Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok is elősegítik a felületekhez történő tapadást (2. A ábra) (Cuéllar-Cruz és mtsai. 2012). A legismertebb adhezin csoport a nyolc tagot (ALS1-7, ALS9) számláló agglutinin-like sequence (ALS) fehérje család. Az ALS géncsalád által kódolt fehérjék glikozilfoszfatidilinozitol (GPI)-kapcsolt sejt felszíni glikoproteinek (Cuéllar-Cruz és mtsai. 2012; Hoyer és mtsai. 2008). Az ALS1-4 gének által kódolt adhezinek csíratömlő és hifa specifikusak, míg az Als5-7 és Als9 fehérjék elsősorban az élesztő sejtek felszínén expresszálódnak (Modrzewska és Kurnatowski 2015). A *C. albicans* esetében a biofilm képzés szempontjából a két legfontosabb adhezin az Als1 és az Als3 (Nailis és mtsai. 2009).

A mannoпротеinek családjába tartozó egyik legfontosabb hifa-asszociált fehérje a Hwp1 (hyphal wall protein1), az epithel sejtek transzglutamináz enzimének a szubsztrátja, amely biztosítja a *Candida*-gazdasejt közötti adhézió kialakítását (Cuéllar-Cruz és mtsai. 2012; Sundstrom és mtsai. 2002). A különböző *Candida* fajok közül kizárólag a *C. albicans* termel

Hwp1 proteint (Cuéllar-Cruz és mtsai. 2012). A *C. parapsilosis* esetében a *HWPI*-hez filogenetikailag közel álló gén a *CPAG_00831*, amely nemcsak a biofilm képződés során, hanem hipoxiás körülmények között is expresszálódik (Rossignol és mtsai. 2009). A *C. parapsilosis* genomjában ezidáig öt ALS ortológ gént azonosítottak (*CPAG_05054*, *CPAG_05056*, *CPAG_05314*, *CPAG_00368* és *CPAG_00369*), melyek szerepe a biofilm kialakítása során már korábban bizonyítást nyert (Rossignol és mtsai. 2009).

Az adherencia kialakulását számos transzkripciós faktor szabályozza, melyek közül az egyik legfontosabb szabályozó szerepe a Bcr1 molekulának van. Deléciós mutáns (*bcr1Δ/bcr1Δ*) törzzsel végzett vizsgálatok során a központi vénás katéterben csupán egy vékony biofilm réteg alakult ki, míg orális candidiasis egérmódelben képtelen volt a mutáns törzs biofilmet képezni (Dwivedi és mtsai. 2011). Miután az élesztősejtek megtapadtak az adott felületen és létrehozták a kezdeti bazális réteget, a sejtek növekedése és osztódása következik (2. B ábra). Ebben az iniciációs szakaszban a *C. albicans* esetében az élesztő hifa átalakulása megy végbe, melyet számos transzkripciós faktor szabályoz, amelyek közül a legfontosabbak az Efg1, Tec1, Ndt80 és Rob1 faktorok (Nobile és mtsai. 2012; Ramage és mtsai. 2002). A Bcr1, mint fő transzkripciós faktor önmagában nem szükséges a hifa forma kialakulásához, azonban a fizikális sejt-sejt kapcsolatok kialakításában elvülhetetlen szerepe van (Nobile és Mitchell 2005). Az érési fázisban folyamatosan növekszik a sejtek által termelt extracelluláris mátrix mennyisége, amely hozzájárul a biofilm kompakt ellenálló, háromdimenziós struktúrájának kialakításához (2. C ábra). A mátrix tartalmaz különböző aggregátumokat, lizált mikroba- és gazdasejteket, erythrocytákat, epithel és urothel sejteket, valamint neutrophileket, (Nett és mtsai. 2015) attól függően, hogy a biofilm a szervezetben hol lokalizálódik (Nobile és Mitchell 2007).



2. ábra: A *Candida albicans* biofilm képződésének a szakaszai (Gulati és Nobile 2016).

Az érett biofilm fajtól függően 48-72 óra alatt alakul ki, melyben *C. albicans* esetében megtalálhatók élesztő sejtek, pszeudohifa és hifa alakok is (Hawser és Douglas 1994). A biofilm életciklusának záró periódusát a biofilmet alkotó sejtek szétszóródása jellemzi (2. D ábra). A sejtek diszperziója a biofilm fejlődése során folyamatosan történik, de a legnagyobb mértékben a záró szakaszban szakadnak le a sejtek, amelyek aztán újabb felületeken tapadhatnak meg (Uppuluri és mtsai. 2010). A leszakadó sejtek morfológiailag nagyon hasonlítanak a planktonikus életmódot folytató élesztő formához, azonban nagyobb biofilm

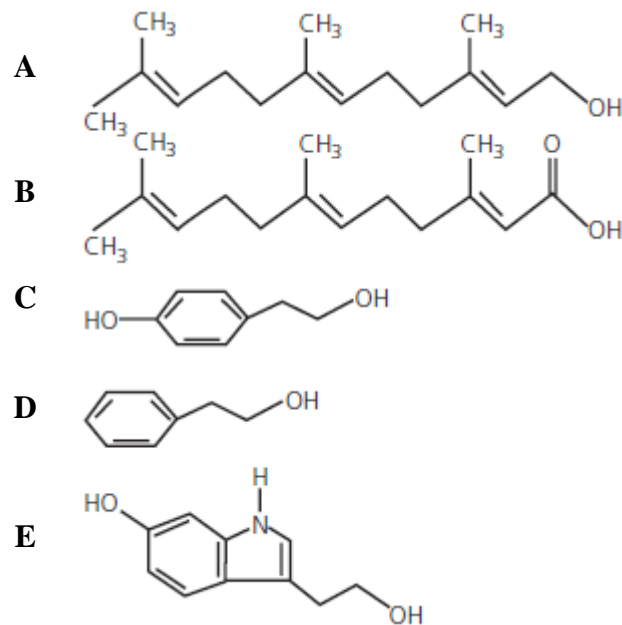
képző képességgel és fokozott virulenciával rendelkeznek (Uppuluri és mtsai. 2010). *C. albicans* esetében az Nrg1, Pes1 és az Ume6 transzkripciós faktorok és a Hsp90 molekuláris chaperon vesznek részt a diszperzió szabályozásában (Gulati és Nobile 2016).

A *C. albicans* által képzett biofilm ellenáll az ismert antifungális szereknek, melyben nagy szerepe van a különböző efflux pumpák over-expressziójának, valamint az ellenálló extracelluláris mátrixnak. Az efflux pumpák overexpressziója már az adhézió első néhány órájában létrejön és a biofilm képzés további szakaszaiban is fennmarad, még antifungális szerek hiányában is (Nobile és mtsai. 2012). A biofilmmátrix jól ismert komponensének, a β -1,3-glükánnak köszönhetően kialakuló stabil szerkezet, mint fizikai barrier gátolja a gyógyszer penetrációját a biofilm belsejébe, ami szintén hozzájárul a rezisztencia kialakulásához (Nett és mtsai. 2007). Shin és munkatársai megfigyelték, hogy a *C. parapsilosis* 8% glükózt tartalmazó tápfolyadékban könnyebben alakít ki biofilmet, ezáltal a parenterális táplálásban részesülő ápoltak esetén a magas glükóz koncentrációt tartalmazó tápoldat hozzájárulhat a *C. parapsilosis*-asszociált candidemia kialakításához (Shin és mtsai. 2002).

A szervezetben kialakuló biofilm alapú infekciók egy része polimikrobiális fertőzés, melyben a *Candida* speciesek különböző más gomba fajokkal, illetve a normál flóra baktériumaival és/vagy további patogén mikrobákkal alakítanak ki egy komplex és igen ellenálló mikrobiális ökoszisztémát (Peleg és mtsai. 2010). A baktériumok közül jellemzően a *Streptococcus mutans*, *S. gordonii*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces viscosus* és *Fusobacterium* fajok fordulnak elő *Candida*-asszociált stomatitis, periodontitis és caries esetén (Peters és Noverr 2013; Jarosz és mtsai. 2009; Bamford és mtsai. 2009; Jack és mtsai. 2015). Katéter okozta fertőzések és krónikus tüdőbetegség (cisztikus fibrózis) esetében a *C. albicans* a *Pseudomonas aeruginosa*-val hoz létre egy ellenálló szesszillis közösséget (Lindsay és Hogan 2014). A gasztrointesztinális és a genitális traktusban az *Enterococcus* fajok, az *Escherichia coli*, illetve a *Lactobacillus*-ok szintén sok esetben tagjai a polimikrobás kevert biofilmeknek (Bandara és mtsai. 2009; Cruz és mtsai. 2013; Falagas és mtsai. 2006).

2.4.2 *Candida* biofilmek és a quorum-sensing

A quorum-sensing a mikroba közösség denzitása által szabályzott inger-válasz rendszer (Polke és Jacobsen 2017). Nagyszámú mikroorganizmus szoros együttélése során a sejtek közötti kommunikáció úgynevezett quorum-sensing molekulák közreműködésével történik. A quorum-sensing molekulák a sejtdenzitástól függően termelődnek, majd miután elérnek egy küszöbértéket az adott közösségben, specifikus sejtválaszt váltanak ki (Williams és mtsai. 2007). A jelenséget először egy tengeri baktérium, a *Vibrio fischeri* biolumineszcencia vizsgálata során kezdték el tanulmányozni az 1960-70-es években (Albuquerque és Casadevall 2012).



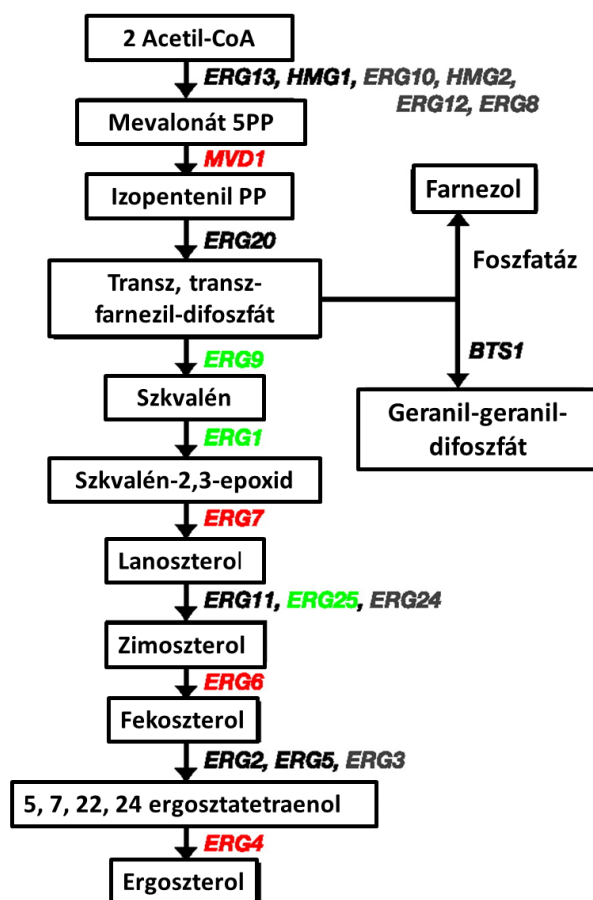
3. ábra: *Candida albicans* által termelt quorum-sensing molekulák. **A.** Farnesol, **B.** Farnesoilsav, **C.** Tirozol, **D.** Feniletil alkohol, **E.** Triptofol (Kruppa 2009).

Az eukarióta mikroorganizmusok körében ismeretlen jelenségnek számított a quorum-sensing, egészen addig, amíg Hornby és munkatársai a 2000-es évek elején nem azonosították az első *Candida* eredetű quorum-sensing molekulát, a farnesolt. Ez a felfedezés indította meg a quorum-sensinggel kapcsolatos vizsgálatokat a *Candida* fajok esetén. Ennek eredményeként az elkövetkezendő években sikerült további kommunikációs molekulákat azonosítani (tirozol, feniletanol, triptofol) (3. ábra) (Albuquerque és Casadevall 2012; Kebaara és mtsai. 2008;

Chen és mtsai. 2004). A quorum-sensing molekulák a gombák esetében koordinálják a morfogenezist, a csíratömlő képzést, a biofilm képződést, valamint megakadályozzák a biofilmet alkotó sejtek kedvezőtlen túlszaporodását. A quorum-sensing molekulák programozott sejthalált indukálhatnak, illetve elősegíthetik a gomba sejtek invázióját a szervezetben. Ezen kívül immunmoduláló hatásuk is jelentősnek mondható, mivel szabályozhatják a T-sejtek differenciálódását és számos citokin (IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF- α) termelődését (Wongsuk és mtsai. 2016; Ghosh és mtsai. 2010). Mivel a gomba quorum-sensing kutatások erősen kezdeti stádiumban vannak, a legtöbb információ ezen kommunikációs folyamat háttéréről egyelőre a *C. albicans*-szal végzett kísérletekből származik. A *C. albicans* esetében a morfogenezis szabályozásában a különböző transzkripciós faktorokon kívül jelentős szerepe van a már fentebb említett quorum-sensing molekuláknak (Kruppa 2009). Érdekes azonban kiemelni, hogy fajon belül az egyes törzsek között is tapasztalhatunk különbségeket, legalábbis ami a quorum-sensing molekulák termelődést illeti. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a *C. albicans* ATCC 10231 tesztörzs farneazol helyett farnezolsavat termel, amely csupán 2-3%-os aktivitással rendelkezik a farnezollal összehasonlítva. Ennek eredményeképpen az ATCC 10231-es törzs virulenciája, illetve patogenitása jóval alacsonyabb a farnezolt termelő törzsekhez képest (Riekhof és Nickerson 2017).

2.4.3 Farneazol

A farneazol egy aciklikus, szeszkviterpén alkohol, amely a farnezil-pirofoszfát defoszforilációjával jön létre a mevalonát bioszintézis útvonalon (4. ábra) (Kuranda és mtsai. 2010; Edwards és Ericsson 1999). A három szén-szén kettőskötést tartalmazó farneazol négy geometriai izomerje közül jelentős quorum-sensing aktivitással csak az *E,E* izomer rendelkezik (Nickerson és mtsai. 2006). A farneazol képes megváltoztatni a sejtek morfológiáját anélkül, hogy a növekedési rátát befolyásolná (Hornby és mtsai. 2001). Indukálja a hifák élesztő sejté történő átalakulását, gátolja a biofilm képződést, továbbá a sejtfalszintézisért felelős gének expressziójára is hatással van. Gátolhatja a gyógyszer rezisztencia gének expresszáldását, valamint a hősök fehérjék termelését (Cao és mtsai. 2005). Fontos azonban kiemelni, hogy a korábban létrejött hifák elongációját már nem képes megakadályozni (Mosel és mtsai. 2005; Ramage és mtsai. 2002).



4. ábra: Az ergoszterol bioszintézis útvonala *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztőben. A *Candida parapsilosis* esetében a farnezol hozzáadását követően az adott gének overexpresszióját piros szín jelöli, míg a zöld szín a gének down-regulációját jelenti. A fekete színnel kiemelt gének esetében nem történik expressziós változás, míg a szürke szín a kísérletben nem vizsgált géneket jelenti (Rossignol és mtsai. 2007).

A *Candida* fajok közül a *C. albicans* termeli a legnagyobb mennyiségű farnezozt, amely elérheti akár az 55 μM -t is (Weber és mtsai. 2008. 2010). A *C. glabrata* ($0,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$), a *C. parapsilosis* ($0,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$) és a *C. krusei* ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) 1 μM -nál kevesebb farnezozt termelnek, míg a *C. tropicalis* ($1,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$) és a *C. dubliniensis* ($8,7 \pm 3,8 \mu\text{M}$) 1 és 10 μM közötti farnezozt képes elválasztani (Weber és mtsai. 2008). Az exogén farnezozt szuprafiziológias koncentrációban ($>100 \mu\text{M}$) jelentősen képes gátolni az élesztő-hifa átalakulást a biofilm képződés korai szakaszában (Ramage és mtsai. 2002; Jabra-Rizk és mtsai. 2006; Mosel és mtsai. 2005). Kísérletekben kimutatták, hogy ha SPIDER tápközegben lévő sejtekhez farnezozt adtak a kísérlet kezdeti szakaszában, a hifa kialakulása elmaradt. Az

elongáció elindulása után 90 perccel azonban már nem volt hatása a farnezoznak (Nickerson és mtsai. 2006). Eddigi ismereteink szerint a farnezoz termelődését az NRG1, TUP1, EED1 és a DPP3 gének szabályozzák. A *C. albicans* genomjában található két további, pirofoszfátot kódoló gén, a DPP1 és DPP2, melyek szerepe a farnezoz szintézis során egyelőre még nem bizonyított (Polke és Jacobsen 2017). A farnezoz termelés optimuma aerob körülmények között 15 és 42 °C között van (Hornby és mtsai. 2001). Anaerob körülmények között nem termelődik detektálható mennyiségű farnezoz, továbbá még 1,2 mM-os exogén farnezoz koncentrációra sem változik a *Candida* sejt génextpressziós mintázata. Ez azt mutatja, hogy az anaerob körülmények között történő biofilm szabályozásban a farnezoznak nincs szerepe (Dumitru és mtsai. 2004). A biofilm-ellenes terápia szempontjából érdemes megjegyezni, hogy bizonyos antifungális szerek növelhetik az endogén farnezoz termelést (Nickerson és mtsai. 2006). Az ergoszterol szintézist gátló antimikotikumok [fluconazol (FLU) klotrimazol, ketokonazol, mikonazol] 0,5-1 µM koncentrációban 10-44-szeres emelkedést okoznak a farnezoz termelésben (Hornby és Nickerson 2003; Hornby és Nickerson 2004). A farnezoz egy további fontos jellemzője, hogy nagymértékben képes kötődni a szérumban fehérjékhez, elsősorban az albuminhoz. Mosel és munkatársai kísérleteiben ugyanolyan hatás eléréséhez 10, 50, 150 és 250 µM farnezozra volt szükség 2, 5, 10 és 20% szérum jelenlétében (Mosel és mtsai. 2005).

A farnezoz számos jelátviteli útvonal szabályozásában vesz részt, melyek közül legjobban ismert a Ras1/Cyr1/cAMP kaszkád gátlása (Polke és Jacobsen 2017). A farnezoz az adenilát-cikláz (Cyr1) enzimhez kötődve gátolja a cAMP szintézisét (Davis-Hanna és mtsai. 2008; Hall és mtsai. 2011) és elősegíti a GTPáz aktivitással rendelkező Ras1 hasítását. Az így létrejött szolubilis Ras1 nem képes aktiválni az adenilát-cikláz enzimet, ami az élesztő forma kialakulásának kedvez (Piispanen és mtsai. 2013). A cAMP jelátviteli útvonal gátlása elősegíti a hifa-élesztő visszaalakulást, melynek révén a farnezoz nagy szerepet játszik a biofilmet alkotó sejtek diszperziójában is (Lindsay és mtsai. 2012). Érdekes tény, hogy a kataláz- (*CAT1*) és a szuperoxid-dizmutáz (*SOD*) enzimeket kódoló gének transzkripciója révén védelmet nyújt az oxidatív stresszel szemben (Davis-Hanna és mtsai. 2008; Deveau és mtsai. 2010; Giacometti és mtsai. 2011). A magas koncentrációban alkalmazott farnezoz a metakaspáz (*MCA1*) gén stimulációjával apoptózist indukálhat a *Candida* sejtekben (Shirliff és mtsai. 2009).

Habár a *C. parapsilosis* egy nagyságrenddel kevesebb farnezolt termel fiziológias körülmények között, az exogén farnezol expozíció így is jelentős élettani és transzkripciós változásokat okoz nála (Rossignol és mtsai. 2007). Rossignol és munkatársai kísérletei alapján 100 μ M farnezol 30%-kal képes csökkenteni a *C. parapsilosis* biofilm képzését (Rossignol és mtsai. 2007). A pontos hatásmechanizmus ezidáig nem ismert, mivel a *C. parapsilosis* nem képez hifákat, így az a klasszikus gátlási kaszkád, amit a *C. albicans*-nál leírtak nem érvényesülhet a *C. parapsilosis* esetében. Ezek alapján bár csökkenti a gomba sejtek növekedését, nincs hatással azok morfológiájára (Rossignol és mtsai. 2007; Laffey és Butler 2005; Ramage és mtsai. 2002). Egyes kísérletek eredményei alapján a farnezol a *C. parapsilosis* membrán szerkezetét befolyásolhatja, mivel megváltoztatja annak permeabilitását (Rossignol és mtsai. 2007). Transzkriptomikai vizsgálatok alapján a szuprafiziológias farnezol koncentráció emeli az oxidoreduktázok (GRP2, ADH7) expresszióját, valamint csökkenti a hexóz és aminosav metabolizmusban résztvevő gének átíródását, ami összhangban áll a csökkent *C. parapsilosis* növekedéssel (Rossignol és mtsai. 2007). Ezen kívül negatívan befolyásolja még a szterol metabolizmusban részt vevő gének expresszióját (Rossignol és mtsai. 2007). A fentebb leírt adatok ellenére elég sok nyitott kérdés van továbbra is a farnezollal kapcsolatban. Többek között ezidáig nincs semmilyen információnk potenciális farnezol receptorokról, illetve farnezol specifikus transzporterekről. Nagyon keveset tudunk a farnezol szintézis szabályozásáról különösen a non-*albicans* fajok esetében, valamint a farnezol és a csíratömlőképzés közötti molekuláris kapcsolatokról.

2.5 Antifungális szerek

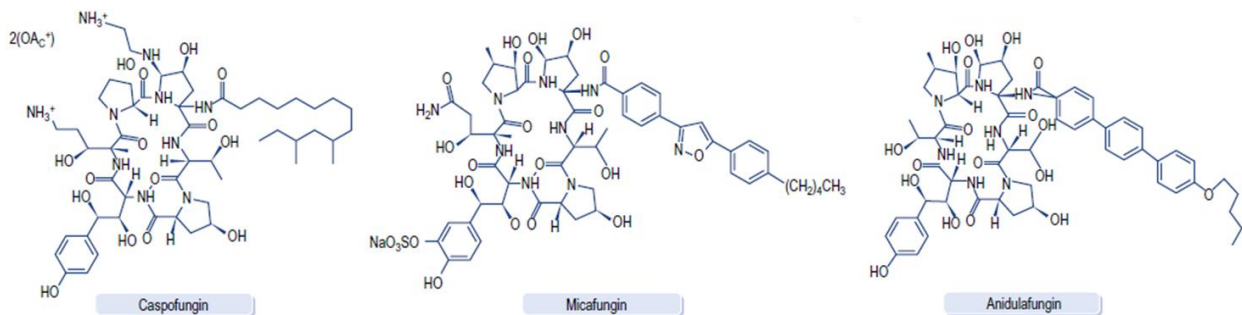
A gombák által okozott invazív fertőzések terápiájában alkalmazható gyógyszerek száma erősen limitált. Eukarióta mikroorganizmusként kevés olyan potenciális célpontot tartalmaznak, melyek ellen szelektíven ható antifungális szert lehet kifejleszteni. További problémát jelenthet az adott szer toxicitása, illetve az egyre gyakrabban kialakuló rezisztencia (Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2010). A patogén gombák által képzett biofilmek újabb szisztémás fertőzések gócpontjai lehetnek a szervezetben, ezért mielőbbi eradikálásuk szükséges. A biofilmek a legtöbb antifungális szernek ellenállnak, ami további kihívás elé állítja a klinikusokat a megfelelő kezelés kiválasztása során. Napjainkban egyre inkább szükségessé válik a gomba alapú biofilmek célzott terápiájára alkalmas újabb antimikotikumok és kezelési stratégiák bevezetése. A rezisztensebb fenotípust jelentő biofilmek eradikálásában hatékonyak lehetnek a különböző kombinációs terápiák, valamint az olyan speciális kezelések alkalmazása, mint az antifungális „lock” terápia (Pierce és mtsai. 2015). A jelenleg elérhető antifungális szerek közül egyedül az AmB készítmények és az echinocandinok rendelkeznek valamilyen mértékű biofilm-ellenes aktivitással a terápiás szempontból releváns koncentrációkon (Pierce és mtsai. 2015). Azonban ez a hatás általában alacsonyabb a planktonikus sejteknél tapasztalt hatékonysággal összehasonlítva.

2.5.1 Echinocandinok

Az antifungális szerek legújabb mérföldkövét jelentették a 2000-es években bevezetett echinocandinok. Jelenleg kereskedelmi forgalomban három echinocandin érhető el, a caspofungin (CAS), a micafungin (MICA) és az anidulafungin (ANI) (Lewis és Fothergill 2015) (5. ábra). Azonban több echinocandin jellegű molekula fejlesztése zajlik napjainkban, amelyek a közeljövőben szintén tagjai lehetnek az antifungális armamentáriumnak (CD-101, SCY-078).

Az echinocandinok egyes gombafajok által termelt természetes anyagok kémiai úton módosított változatai. A CAS a *Glarea lozoyensis* által fermentált pneumocandin B módosított terméke, az ANI az *Aspergillus nidulans* echinocandin B₀, míg a MICA a *Coleophoma empedri* hexapeptid FR901370 molekulájának egy modifikált verziója (Chen és

mtsai. 2011). Az echinocandinok olyan lipopeptid molekulák, melyek non-kompetitív módon gátolják a β -1,3-D-glükán-szintáz enzimet, amely a sejtfal felépítésében kulcsszerepet játszó β -1,3-D-glükán szintézisét végzi. Echinocandin expozíciót követően a sejtfal meggyengül, majd az ozmotikus instabilitás miatt bekövetkezik a sejt lízise (Shoham és mtsai. 2017). A β -1,3-D-glükán szintáz enzimkomplex két alegységből áll: az FKS1, FKS2 és FKS3 gének által kódolt katalitikus alegységből (Fks1p), és egy kulcsfontosságú regulátor fehérjéből (Rho1p). A glükán-szintáz a humán sejtekben nem található meg, tehát szelektív módon képes kifejteni gombaellenes hatását minimális mellékhatások mellett (Chen és mtsai. 2011).



5. ábra: Az echinocandinok szerkezeti képlete (Gubbins és Anaissie 2009).

Az echinocandinok a legtöbb *Candida* faj ellen *in vitro* fungicid aktivitással rendelkeznek, míg az *Aspergillus* fajok esetében csupán sztatikus hatást láthatunk. Az echinocandinok hatékonyak lehetnek még *Pneumocystis jirovecii* ellen, azonban hatástalanok *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* speciesek, *Fusarium* fajok és a *Zygomycetes*-ek ellen (Gubbins és Anaissie 2009).

A *C. albicans* echinocandinok iránti medián MIC (minimális gátló koncentráció) értéke viszonylag alacsony (0,003-0,06 mg/L), azonban bizonyos *Candida* fajok esetében (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*) akár 10-100-szoros MIC érték emelkedést is tapasztalhatunk (Shoham és mtsai 2017; Garcia-Effron és mtsai. 2008). Az echinocandinok iránti generikusan csökkent érzékenység az Fks1p két, ún. hot-spot (hot-spot 1 és hot-spot 2) régiójában történő mutáció következtében alakul ki. *C. parapsilosis sensu stricto* esetében az Fks1p alegység 660. pozíciójában természetes úton bekövetkező prolin-alanin aminosavcsere a csökkent érzékenység oka (Garcia-Effron és mtsai. 2008). Ez a csökkent érzékenység

negatívan befolyásolhatja a terápia kimenetelét az amúgy is rezisztensebb biofilmek echinocandinnal történő kezelése során.

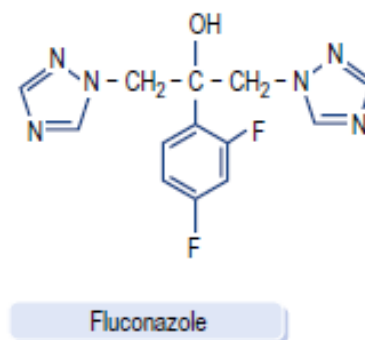
Az echinocandinokra nagy molekulatömegüknek köszönhetően alacsony mértékű orális biohasznosulás jellemző, ezért adagolásuk kizárólag intravénás formában történik (Patil és Majumdar 2017). Nagymértékben kötődnek a szérumban fehérjéhez (96,5-99,8%), elsődlegesen az albumin molekulákhoz. A „szabad gyógyszerhipotézis” értelmében csak a szabadon lévő gyógyszermolekulák rendelkeznek farmakológiai aktivitással. Ennek következtében szérumban jelenlétében az echinocandinok iránti MIC értékek jelentősen megemelkednek (2-256 x MIC) (Odabasi és mtsai. 2007; Garcia-Effron és mtsai. 2011). Invazív candidiasisban szenvedő felnőttek esetén az ajánlott dozírozási stratégia CAS használata során 70 mg telítő dózis után napi 50 mg fenntartó dózist ír elő. MICA adagolása esetében napi 100 mg, míg ANI alkalmazásakor 200 mg telítő dózis utáni naponta 100 mg fenntartó dózis javasolt (Pappas és mtsai. 2016).

Az echinocandinok *Candida* fajokra kifejtett farmakodinámiás tulajdonságai közül jelentős a paradox növekedés, mely leginkább *in vitro* körülmények között figyelhető meg (Steinbach és mtsai. 2015). *In vivo* jelentőségéről egyelőre még ellentmondásosak az eredmények (Bayegan és mtsai. 2011). A paradox növekedés során echinocandinok által indukált kompenzatórikus kitinszintézis következtében újbóli növekedés figyelhető meg a MIC érték fölötti koncentrációkon (Moriyama és mtsai. 2011). Ezt a paradox növekedést mindhárom echinocandin esetén megfigyelték, azonban annak kialakulása függ az alkalmazott tápfolyadéktól, a gyógyszer fajtájától valamint az adott *Candida* fajtától (Chamilos és mtsai. 2007). Chamilos és munkatársai által végzett kísérletekben leginkább a CAS alkalmazása során volt jellemző a paradox növekedés, ahol az előfordulási gyakoriság *C. parapsilosis* (90%), *C. albicans* (60%) és *C. tropicalis* (40%) fajoknál volt a legmagasabb, de alacsonyabb százalékban a *C. krusei* (10%) esetén is előfordult. MICA (*C. tropicalis* 70%, *C. krusei* 60%) és ANI (*C. albicans* 40%, *C. tropicalis* 20%) alkalmazása során a jelenség ritkábban volt jellemző (Chamilos és mtsai. 2007). Melo és munkatársai *in vitro* kísérletekben magas koncentrációban alkalmazott CAS felhasználásával vizsgálták a paradox növekedést *Candida* fajok által képzett biofilmek esetén. A paradox növekedés erősen fajfüggő módon alakult ki: az előfordulás gyakorisága a *C. albicans* (100%) és *C. metapsilosis* (100%) esetében volt a legmagasabb, melyet követett a *C. orthopsilosis* (87%), *C. tropicalis* (67%) és a *C. parapsilosis* (57%) (Melo és mtsai. 2007). A jelenség klinikai jelentősége a biofilmek

tekintetében még nem teljesen tisztázott, a magas MIC érték fölötti koncentráción alkalmazott CAS hatására paradox növekedés alakul ki, ami befolyásolhatja a katéter-asszociált fertőzések kezelése során bevethető olyan speciális terápiák hatékonyságát, mint az antifungális „lock” terápia (Melo és mtsai. 2007).

2.5.2 Fluconazol

A szisztémásan alkalmazott antifungális szerek közül az egyik leggyakrabban használt antimikotikum a triazolok csoportjába tartozó FLU (6. ábra). Hatásmechanizmusa révén képes gátolni a citokróm P-450-dependens lanosterol-14- α -demetiláz enzimet, mely a lanosterol átalakítását végzi ergoszterollá (Odds és mtsai. 2003; Shoham és mtsai. 2017). A folyamat során felhalmozódnak a toxikus 14- α -metilált szterolok, illetve csökken az ergoszterol szintje a gomba sejtmembránban (Shoham és mtsai. 2017).



6. ábra: A fluconazol szerkezeti képlete (Gubbins és Anaissie 2009).

A FLU hatékony a legtöbb *Candida* species, *C. neoformans* és *Trichosporon* fajok ellen, azonban a *C. glabrata* és a *C. krusei* csökkent érzékenységet mutat ezen szerrel szemben (Pfaller és mtsai. 2002). A FLU általánosan fungisztikus aktivitással bír, azonban *C. albicans* esetén bizonyos törzsek ellen fungicid viselkedést is megfigyeltek (Sohnle és mtsai. 1996). Terápia részeként alkalmazható szájüregi-, nyelöcső és hüvelyi candidiasis, illetve *Candida* okozta húgyúti fertőzés során (Goldman és mtsai. 2005). A triazolok közül a legjobban penetrál az agy- és gerincvelői folyadékba, illetve szemben, ezért alkalmazzák központi idegrendszeri-, illetve intraocularis fertőzések kezelésére. A vizeletben terápiás

koncentrációt ér el, ezért *Candida* okozta cystitis terápiajában egyaránt használható (Dodds és mtsai. 2006). A 1990-es években bevezetett FLU alkalmazásának köszönhetően növekedett a másodlagos rezisztenciával rendelkező *Candida* fajok által okozott fertőzések előfordulási aránya (Lewis és mtsai. 2011; Berkow és Lockhart 2017). Az Amerikai Egyesült Államokban végzett felmérés alapján a *C. albicans* esetében a FLU rezisztencia gyakorisága az elmúlt években nem változott jelentősen (0,5-2%), azonban a *C. tropicalis* (4-9%), *C. parapsilosis* (2-6%) és a *C. glabrata* (11-13%) esetében növekvő tendenciát mutat (Berkow és Lockhart 2017). A FLU rezisztencia kialakulhat többek között az ergosterol bioszintéziséért felelős szterol- Δ 5,6-deszaturáz enzimet kódoló gén (ERG3) funkció vesztése következtében, illetve a gyógyszer kötőhely kódoló gén (ERG11) overexpressziója miatt (Perlin és mtsai. 2017).

Invazív candidiasis kezelése során alkalmazott dozírozási stratégia a FLU esetében 800 mg (12 mg/kg) telítő dózis utáni napi 400 mg (6 mg/kg) fenntartó dózist ír elő (Pappas és mtsai. 2016). Komplikációmentes *Candida* okozta vulvovaginitis kezelése során egyszeri 150 mg-os orális FLU dózis vagy különféle topikális készítmények alkalmazása javasolt. Akut vulvovaginitis esetén 72 óránként 2-szeres vagy 3-szoros FLU dózis ajánlott. Topikális szerek közül a 600 mg hatóanyagot tartalmazó bórsavas hüvelykapszulát vagy a 100.000 egység nystatin tartalmú hüvelykúpot alkalmazzák 14 napon keresztül. További alternatív megoldást jelenthet a 17%-os flucytosine hatóanyagot tartalmazó kenőcs önmagában vagy 3% AmB-t tartalmazó krémmel kombinációban szintén 14 napon át alkalmazva. Rekurráló vulvovaginitis kezelési stratégiája 10-14 napon keresztül topikális szerek vagy orális FLU adása, melyet hetente egyszeri 150 mg FLU alkalmazása követ 6 hónapon keresztül (Pappas és mtsai. 2016). *In vitro* hatástalanok a *Candida* speciestek által képzett biofilmek ellen, melynek oka az efflux pumpák biofilmen belüli overexpressziója (CDR1, CDR2, MDR1) (Mukherjee és mtsai. 2003).

2.6 Antifungális „Lock” Terápia

A katéter-asszociált fertőzések terápiája során elsődleges ajánlás a beültetett orvosi eszközök eltávolítása, amely azonban sok esetben nem valósítható meg (Walraven és Lee 2013). Kritikus állapotú betegben gyakran előforduló trombocitopénia, koagulopátia vagy a sérülékeny „vénakészlet” következtében a katéterek újraszúrása technikailag is kihívást jelent (Walraven és Lee 2013). Ezen fertőzések megelőzésére és kezelésére a nyugati országokban egyre gyakrabban alkalmazzák az úgynevezett antifungális „lock” terápiát. A bakteriális katéter-asszociált fertőzések esetében az IDSA már külön ajánlást is megfogalmazott a „lock” terápiát illetően (Mermel és mtsai. 2009). Azonban nincs még hivatalosan is jóváhagyott antifungális „lock” terápia protokoll a *Candida* fajok által okozott katéterhez köthető fertőzések kezelésére.

Az antifungális „lock” terápia során a fertőzött katétert lezárják, majd magas koncentrációjú antifungális szerrel feltöltik azt, melyet gyakran kiegészítenek különböző antiszeptikumokkal, illetve véralvadásgátlókkal (Segarra-Newnham és Martin-Cooper 2005; Walraven és Lee 2013; Pierce és mtsai. 2015). Az adott protokolltól függő inkubációs idő eltelté után az oldatot leszívják, átöblítik, majd újra megnyitják a katétert (Walraven és Lee 2013). Ezidáig számos *in vitro* tanulmány látott napvilágot, amelyekben potenciális antifungális „lock” oldatokat vizsgáltak. Ezek alapján az AmB lipid komplex-et (ABLC) etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) kombinálva, vagy éppen a nagy dózisú CAS, illetve MICA tűnik használható alternatívának (Raad és mtsai. 2008; Toulet és mtsai. 2012). Nagy dózisú antibiotikumok, mint például a doxycyclin vagy tigecyclin heparinnal vagy parabénekkal kombinálva szintén mutattak bizonyos fokú hatékonyságot *Candida* biofilmek ellen (Miceli és mtsai. 2012; Ku és mtsai. 2010; Miceli és mtsai. 2009). További alternatívát jelenthet az etanol használata, ugyanis Balestrino és munkatársai az ethanol-EDTA kombinációval teljesen képesek voltak eliminálni a *C. parapsilosis* biofilmeket (Balestrino és mtsai. 2009). Több kutatócsoport is vizsgálta nyulak vénájába ültetett katéterek lumenében *C. albicans* törzsek által képzett biofilmek ellen a különféle antifungális „lock” oldatok hatékonyságát. Mukherjee és munkatársai 5 mg/mL koncentrációban, egy héten keresztül napi négy, valamint nyolc órás inkubációs idő alatt alkalmazott ABLC-vel a katéterek teljes sterilitását érte el (Mukherjee és mtsai. 2009). Korábbi vizsgálatokban Schinabeck és munkatársai egy héten keresztül napi nyolc órán át alkalmazott L-AmB-t (10 mg/mL) illetve FLU-t (10 mg/mL) tartalmazó „lock”

oldat összehasonlítását végezték, melyek közül a L-AmB tűnt hatékonyának (Schinabeck és mtsai. 2004). Shuford és kutatócsoportja egy héten át alkalmazott 6,67 mg/mL koncentrációjú CAS oldattal 100%-ban eradikálta a katéterek belsejében kialakult biofilmet, míg a 3,33 mg/mL koncentrációjú D-AmB 81,3%-os hatékonyságot mutatott (Shuford és mtsai. 2006). Egérmodellből származó katéterek esetében 0,25 µg/mL CAS-t tartalmazó „lock” alternatíva 24 óra alatt 66,7%-ban volt hatékony (Lazzell és mtsai. 2009). Eredményeik alapján a lipid-asszociált AmB vagy az echinocandinok egy sokat ígérő kezelési stratégia részét képezhetik.

A pozitív eredmények mellett azonban ki kell emelni az előbb említett kezelések korlátait is (Walraven és Lee 2013; Vassallo és mtsai. 2015). Az etanollal kiegészített „lock” terápia limitációja az etanol és a katéterek poliuretán anyaga közötti inkompatibilitásban rejlik (Walraven és Lee 2013). Az echinocandinok bár kiválóan hatnak biofilmek ellen, azonban a „lock” oldatban történő alkalmazásukkor paradox növekedéssel lehet számolni, amivel a kívánt hatás ellenkezőjét érhetjük el (Walraven és Lee 2013).

3. Célkitűzés

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.

4. Anyagok és módszerek

4.1 A vizsgált izolátumok

Kísérleteink során öt *C. parapsilosis sensu stricto* (16641, 17432, 17818, 10252, 9613), két 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 (Marcos-Zambrano és mtsai. 2014).

4.2 A planktonikus sejtek érzékenységi vizsgálata

A CAS (Sigma, Budapest, Magyarország), a MICA (Astellas, Tokyo, Japán), a FLU (Sigma, Budapest, Magyarország) és a farnezol (Sigma, Budapest, Magyarország) iránti MIC értékek meghatározása a CLSI 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) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). „Minőségi” 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 μ M közötti koncentrációkat teszteltünk (Katragkou és mtsai. 2015). A vizsgált koncentrációkat RPMI-1640 tápközegben állítottuk össze. A gyógyszert nem tartalmazó növekedési és negatív kontroll üregek 1% metanolt tartalmaztak. A MIC értékek meghatározásához

0,5-2,5x10³ 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 (Katragkou és mtsai. 2015). A turbiditás csökkenés meghatározása spektrofotométerrel történt 492 nm-en. A turbiditás százalékos változásának kiszámítását az alábbi abszorbancián alapuló képlet segítségével végeztük el:

$100\% \times (A_{\text{lyuk}} - A_{\text{háttér}}) / (A_{\text{gyógyszermentes lyuk}} - A_{\text{háttér}})$. A háttér abszorbanciájának mérése a gombamentes üregben történt. Az összes izolátum esetében három, egymástól független mérést végeztünk, melyek medián értékeit tüntettük fel (Katragkou és mtsai. 2015; Zhou és mtsai 2012; Pierce és mtsai. 2008).

4.3 Biofilm képzés

A biofilmet Pierce és munkatársai (2008) 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 1x10⁶ Colony Forming Unit (CFU)/mL gombaszuszpenziót állítottunk be (1. kép). 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 (2. kép). Az alkalmazott negatív kontroll üregei 100 µL RPMI-1640-et tartalmaztak (Pierce és mtsai. 2008).

4.3.1 A biofilm mennyiségi meghatározása

A 24 órás biofilmet 3x200 µL fiziológias 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 lekötött 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 (O'Toole 2011).

4.3.2 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 (3. kép). 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 (Pierce és mtsai. 2008; Katragkou és mtsai. 2015). Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol legalább 50%-os volt a metabolikus aktivitás csökkenés a gyógyszermentes növekedési kontrollal összehasonlítva.

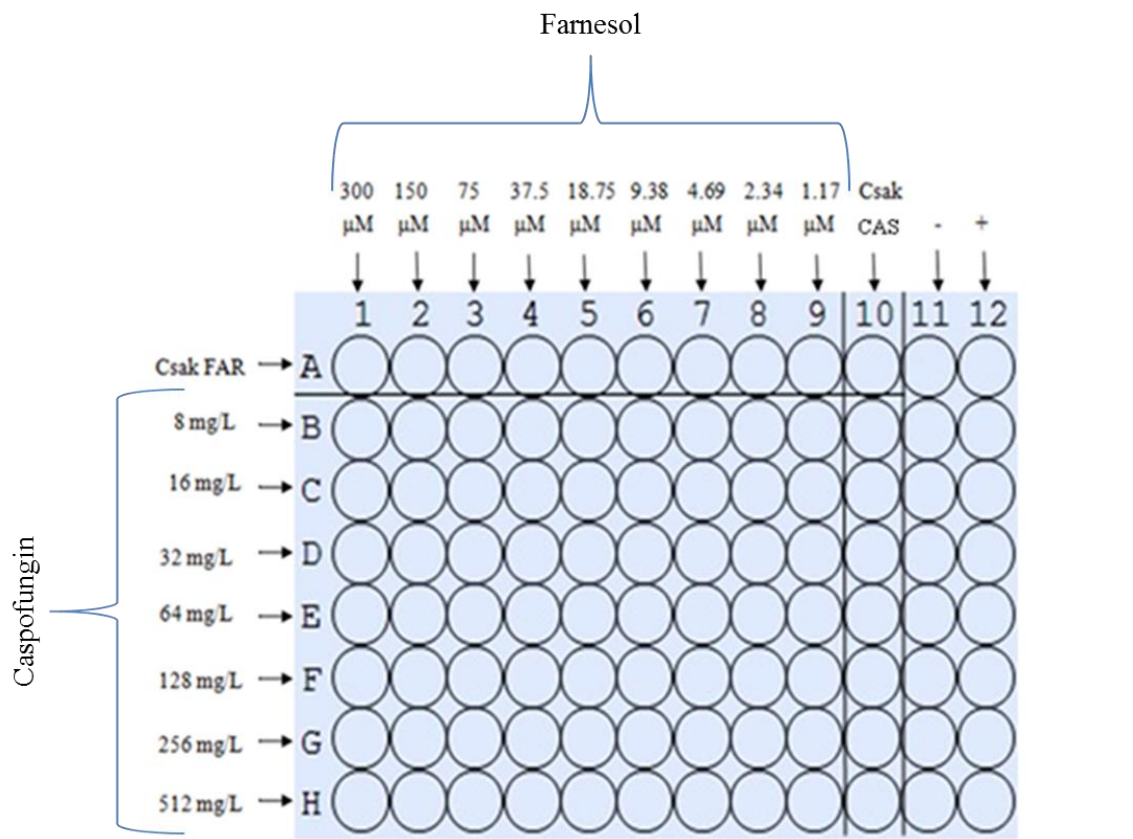
Az egy napos biofilmet 3x200 µL steril fiziológias sóoldattal mostuk. Ezután 0,5 g/L töménységű XTT (Sigma, Budapest, Magyarország) oldat felhasználásával 1 µM végkoncentrációjú XTT/menadion (Sigma, Budapest, Magyarország, 100 mM, 100%-os acetonban oldott) oldatot készítettünk, melyből 100-100 µL-t pipettáztunk a táplemez egyes üregeibe (4. kép). 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 4.2 fejezetben (Hawser 1996; Zhou és mtsai. 2012; Katragkou és mtsai. 2015).

4.4 A caspofungin, micafungin, fluconazol és a farneazol közötti kölcsönhatás vizsgálata

A gyógyszerek közötti interakció megállapítása a szesszilis és a planktonikus sejtek esetén is kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúciós módszerrel történt (7. ábra; 5. kép) (Meletiadis és mtsai. 2005; Zhou és mtsai. 2012; Katragkou és mtsai. 2015). Az alkalmazott koncentráció tartományok megegyeznek a már korábban leírt, a planktonikus és szesszilis sejtek MIC vizsgálataiban használt koncentrációkkal. A könnyebb érthetőség érdekében a 7. ábra segítségével szemléltettem egy reprezentatív példán keresztül a „checkerboard”-assay felépítését. Az interakció természetének meghatározására a gátló koncentrációhányad indexet alkalmaztuk (Fractional Inhibitory Concentration Index: FICI) melyet az alábbi képlet segítségével számoltunk ki:

$\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_A^{\text{kombinációban}}}{MIC_A^{\text{önmagában}}} + \frac{MIC_B^{\text{kombinációban}}}{MIC_B^{\text{önmagában}}}$, ahol a $MIC_A^{\text{kombinációban}}$ és $MIC_B^{\text{kombinációban}}$ a szerek kombinációban történő alkalmazása során kapott MIC értékeket jelöli, míg a $MIC_A^{\text{önmagában}}$ és a $MIC_B^{\text{önmagában}}$ 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 (Meletiadis és mtsai. 2005; Meletiadis és mtsai. 2010; Zhou és mtsai. 2012; Katragkou és mtsai. 2015).



7. ábra: A caspofungin és a farnezol iránti MIC értékek, illetve a két szer interakciójának meghatározása planktonikus és szesszilis sejtek esetén kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúciós módszerrel

4.5 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 (8. ábra). 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 választottuk ki, melyeket a kombináció során 75 μ M farnezollal egészítettük 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 fiziológiás 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 fiziológiás sóoldattal mostuk, majd a metabolikus aktivitást mértük a már korábban leírt módszer alapján (4.2 fejezet) (Zhou és mtsai. 2012; Kovács és mtsai. 2014). 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.

	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Kontroll	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4 mg/L	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8 mg/L	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
16 mg/L	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4 mg/L + 75 μM	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8 mg/L + 75 μM	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
16 mg/L + 75 μM	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

8. ábra: A caspofungin és a micafungin *in vitro* biofilm-ellenes aktivitásának a vizsgálata önmagában és farneazol jelenlétében az idő függvényében

4.6 Adatok elemzése

Az egyes koncentrációknál tapasztalható metabolikus aktivitásváltozást Dunnett-teszttel 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-teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (One-way ANOVA) határoztuk meg. Az eredményt abban az esetben tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$.

4.7 *In vivo* kísérletek

4.7.1 A kísérlet során alkalmazott egerek

A kísérletekben csoportonként 10 db, 22-23 g-os BALB/c típusú nőtény, 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.

4.7.2 A fertőzés folyamata

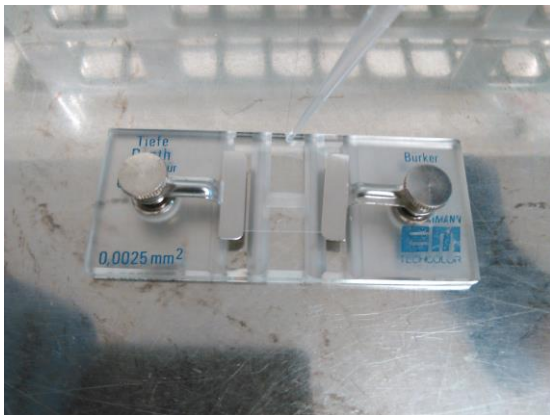
Az egerek 50 µL szezámolajban oldott ösztradiol-valerátot (10 mg/mL) kaptak szubkután 3 nappal a fertőzés előtt (Fidel és mtsai. 2000; Hisajima és mtsai. 2008; Kovács és mtsai. 2014). Az oltóanyag készítéséhez felhasznált *C. albicans* törzseket két egymás utáni napon SDA táptalajra oltottuk ki, majd 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 (Kovács és mtsai. 2014). Az egereket 25 µL gomba szuszpenzióval fertőztük intravaginálisan (6. kép). Korábban végzett előkísérleteink alapján a fertőző dózis $1-1,2 \times 10^7$ CFU volt egerenként.

4.7.3 Antifungális terápia

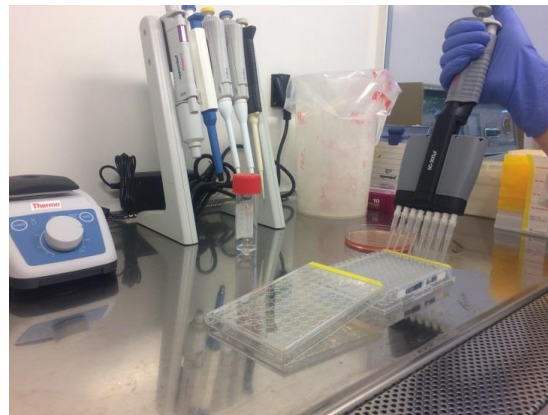
A terápiát 24 órával a fertőzést követően kezdtük el az alábbi séma alkalmazásával: 5 mg/kg/nap FLU (intraperitoneálisan), 35 mg/kg egyszeri FLU (intraperitoneálisan), 150 µM/nap farnezol (intravaginálisan), 300 µM/nap farnezol (intravaginálisan), 5 mg/kg/nap FLU (i.p.) + 150 µM/nap farnezol (intravaginálisan), 5 mg/kg/nap FLU (i.p.) + 300 µM/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 (Hisajima és mtsai. 2008). A fertőzést követő negyedik napon az egereket cervikális diszlokációval elpusztítottuk, majd felboncoltuk. A kvantitatív csíraszám meghatározásához vaginájukat eltávolítottuk, majd lemértük (7. és 8. kép). Steril dörzscsészében 1 mL fiziológiás sóoldat hozzáadásával homogenizátumot készítettünk, majd az egyes mintákból 1:10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk (9. kép). A hígított mintákból 100 μ L-t kioltottunk SDA agarra (10. kép). A táptalajok 35 °C-on, 48 órán át tartó inkubációját követően a kinőtt telepeket megszámláltuk. A kitenyészett gombák szignifikancia vizsgálata Kruskal-Wallis teszttel történt (GraphPadPrism 6.05 Windows). Az eredményt szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

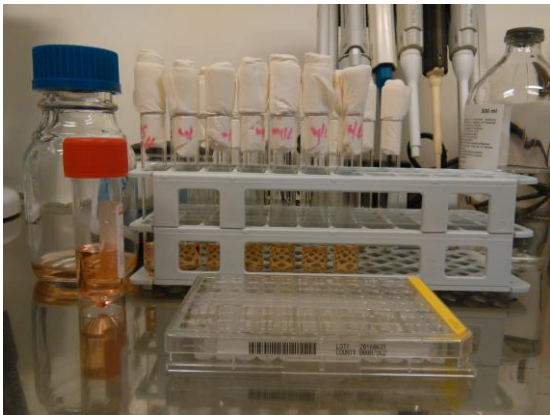
4.8 Az *in vitro* és *in vivo* kísérleteink képekkel illusztrálva



1. kép: Gombaszuszpenzió beállítása



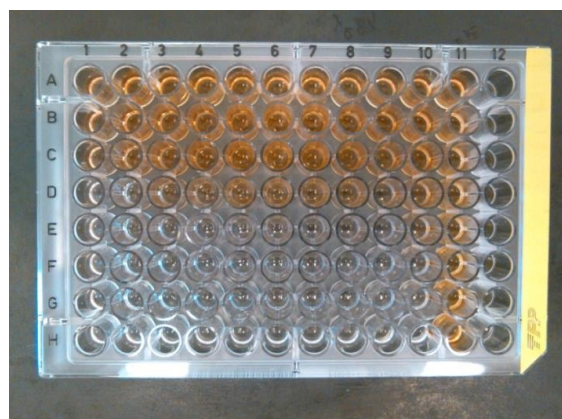
2. kép: Biofilm képzés



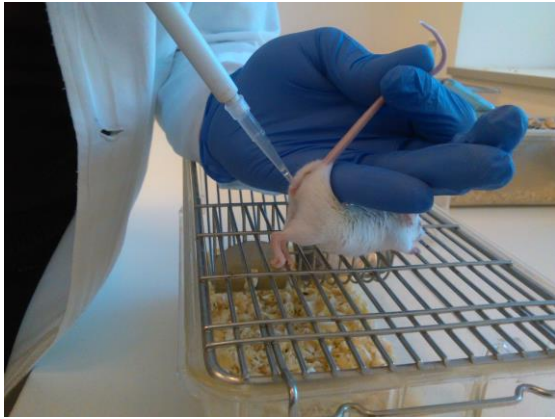
3. kép: Különböző gyógyszer koncentrációkat tartalmazó tápfolyadék



4. kép: XTT/menadion összemérése



5. kép: „Checkerboard” mikrodilúciós assay



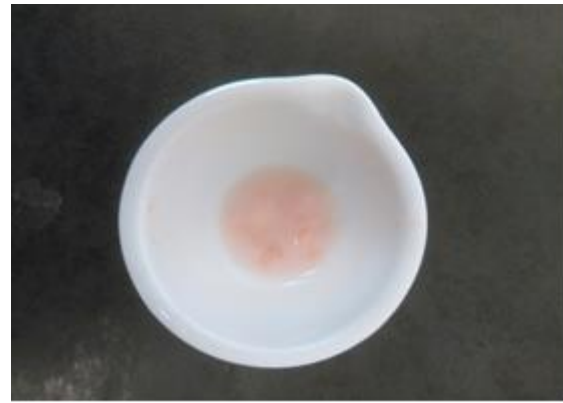
6. kép: Intravaginális fertőzés



7. kép: Vagina eltávolítása



8. kép: Eltávolított vagina



9. kép: Vagina homogenizálása



10. kép: Hígítás és kioltás táptalajra

5. Eredmények

5.1 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 (1. táblázat; Pfaller és mtsai. 2011). 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.

Izolátum	Minimális gátló koncentráció (Medián)			
	Önmagában		Kombinációban	
	CAS (mg/L)	FAR (µM)	CAS (mg/L)	FAR (µM)
16641	4	300 (300->300)	0,12 (0,12-2)	37,5 (37,5-75)
17432	4	150	0,06	18,75
17818	4 (2-4)	150	0,06 (0,03-0,12)	37,5 (1,17-75)
10252	4	>300	2	18,75
9613	2 (2-4)	300 (150->300)	0,06 (0,06-2)	75 (37,5-150)
ATCC 22019	2	75 (75-150)	1 (0,25-1)	18,75 (18,75-37,5)

1. táblázat: A caspofungin és a farnezol iránti MIC értékek eredményei a vizsgált planktonikus *Candida parapsilosis* izolátumok esetében mikrodilúciós módszerrel. A táblázat a kapott medián értékeket, illetve MIC tartományokat ábrázolja. A tartományon kívül esett MIC érték esetén (>300 µM), a medián számításánál a legnagyobb tesztelt koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk MIC értéknek (600 µM)

5.2 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 (2. táblázat). 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. Ez a tény már az előkísérleteknél bizonyítást nyert, mivel a kristályibolya assay-vel végzett biofilm mennyiség mérésekkor szignifikánsan alacsonyabb abszorbanciát mértünk a klinikai izolátumokkal összehasonlítva ($p < 0,01$) (1. és 2. táblázat).

Izolátum	Minimális gátló koncentráció (Medián)			
	Önmagában		Kombinációban	
	CAS (mg/L)	FAR (μ M)	CAS (mg/L)	FAR (μ M)
16641	32 (16-64)	>300	4 (4-8)	18,75
17432	256	>300	4	150 (37,5-150)
17818	256	>300	4	18,75 (18,75-75)
10252	256	>300	4	75 (37,5-150)
9613	256 (256-512)	>300	4	75 (37,5-75)
ATCC 22019	2 (2-4)	>300	1 (1-2)	18,75 (4,5-75)

2. táblázat: A caspofungin és a farnezol iránti MIC értékek eredményei a vizsgált *Candida parapsilosis* biofilmek esetében XTT-assay-n alapuló mikrodilúciós módszerrel. A táblázat a kapott medián értékeket, illetve MIC tartományokat ábrázolja. A tartományon kívül esett MIC érték esetén (>300 μ M), a medián számításánál a legnagyobb tesztelt koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk MIC értéknek (600 μ M)

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

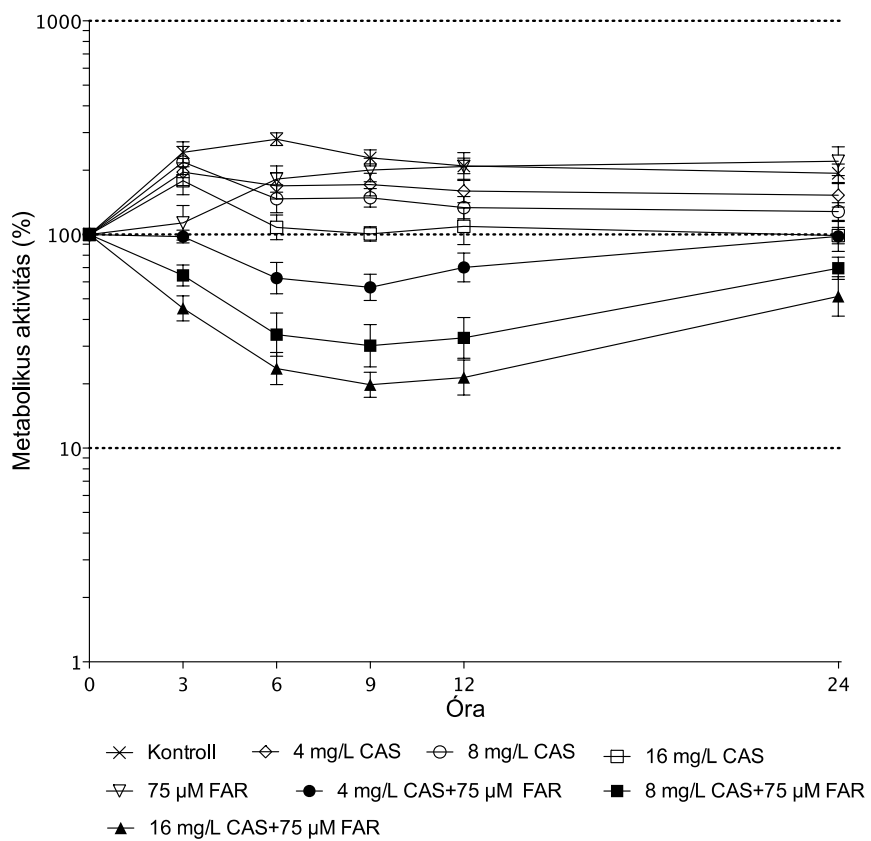
A CAS és a farnezol között megfigyelt, FICI-n alapuló *in vitro* interakciókat a 3. táblázatban foglaltam össze. A kombináció (CAS és farnezol) alkalmazása esetén az alkalmazott klinikai izolátumok planktonikus sejtjeinél egy izolátum kivételével (17432) indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk. Ezzel 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 (3. táblázat).

Izolátum	Gátló Koncentrációjánál Index (FICI) (Medián)			
	Planktonikus sejtek		Szesszilis sejtek	
	FICI	Kölcsönhatás	FICI	Kölcsönhatás
16641	0,53 (0,28-0,563)	Indifferens	0,5 (0,375-0,5)	Szinergizmus
17432	0,375	Szinergizmus	0,28 (0,185-0,28)	Szinergizmus
17818	0,515 (0,375-0,530)	Indifferens	0,155 (0,141-0,155)	Szinergizmus
10252	0,530	Indifferens	0,155 (0,155-0,28)	Szinergizmus
9613	0,53 (0,53-0,56)	Indifferens	0,25 (0,156-0,25)	Szinergizmus
ATCC 22019	0,75 (0,625-1)	Indifferens	0,502 (0,5-0,531)	Indifferens

3. táblázat: A caspofungin és a farnezol kombinációja során tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások eredményei a FIC index (FICI) alapján

5.4 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 9. ábra eredményei alapján láthatjuk, hogy 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 24 óra között azonban egy koncentrációfüggő módon bekövetkező szignifikáns metabolikus aktivitás csökkenés volt megfigyelhető. Ugyanakkor a CAS és farnezol 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 ($p < 0,05-0,001$) (9. ábra). Mindazonáltal az első 12 órára jellemző markáns metabolikus aktivitás csökkenés után lassú növekedés figyelhető meg (9. ábra), 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 ($p < 0,01-0,05$).



9. ábra: A caspofungin és a farneazol alkalmazása során a metabolikus aktivitás változások az idő függvényében *Candida parapsilosis* klinikai izolátumok által képzett biofilmek ellen (átlag ± SEM).

5.5 A micafungin és a farneazol 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 (4. táblázat; Pfaller és mtsai 2011). A klinikai izolátumok esetében a MICA és farneazol együttesen alkalmazva jelentős, 2-64-szeres csökkenést okozott az önmagában vizsgált MICA MIC értékekhez képest. A kombináció alkalmazása során a farneazol a MIC értékek 16-256-szoros csökkenését okozta a klinikai izolátumok esetében. A referencia törzs (ATCC 22019) vizsgálatokor a mért MIC értékekben 8-16-szoros csökkenést okozott a kombináció alkalmazása (4. táblázat).

Izolátum	Minimális gátló koncentráció (Medián)			
	Önmagában		Kombinációban	
	MICA (mg/L)	FAR (µM)	MICA (mg/L)	FAR (µM)
16641	2 (1-4)	300 (150->300)	0,5 (0,06-0,5)	9,38 (1,17-18,75)
17432	4	>300 (150->300)	0,06 (0,03-0,5)	2,34 (2,35-4,7)
17818	2 (2-4)	300 (150-300)	0,12 (0,06-2)	9,38 (4,7-9,38)
10252	2 (2-4)	>300	1 (0,25-1)	18,75 (4,7-18,75)
9613	4 (2-4)	>300 (150->300)	0,5 (0,12-1)	37,5 (1,17-37,5)
ATCC 22019	1	75	0,06 (0,06-0,12)	18,75

4. táblázat: A micafungin és a farneazol iránti MIC értékek eredményei a vizsgált planktonikus *Candida parapsilosis* izolátumok esetében mikrodilúciós módszerrel. A táblázat a kapott medián értékeket, illetve MIC tartományokat ábrázolja. A tartományon kívül esett MIC érték esetén (>300 µM), a medián számításánál a legnagyobb tesztelt koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk MIC értéknek (600 µM)

5.6 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 (5. táblázat). 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). Ennek hátterében ugyanaz az ok lehet, mint amit az 5.2-es fejezetben a CAS esetében már leírtam (4-5. táblázat).

Izolátum	Minimális gátló koncentráció (Medián)			
	Önmagában		Kombinációban	
	MICA (mg/L)	FAR (µM)	MICA (mg/L)	FAR (µM)
16641	16 (16-32)	>300	4 (2-4)	75 (2,35-75)
17432	256 (256-512)	>300	4 (2-8)	37,5 (37,5-150)
17818	512 (256-512)	>300	8 (4-8)	75 (4,7-75)
10252	512 (256->512)	>300	8 (4-8)	37,5 (9,4-37,5)
9613	256 (256-512)	>300	8	37,5 (18,75-75)
ATCC 22019	1 (1-2)	>300	0,5	75 (37,5-300)

5. táblázat: A micafungin és a farneazol iránti MIC értékek eredményei a vizsgált *Candida parapsilosis* biofilmek esetében XTT-assay-n alapuló mikrodilúciós módszerrel. A táblázat a kapott medián értékeket, illetve MIC tartományokat ábrázolja. A tartományon kívül esett MIC érték esetén (>512 mg/L; >300 µM), a medián számításánál a legnagyobb tesztelt koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk MIC értéknek (1024 mg/L; 600 µM)

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

A MICA és a farneazol között megfigyelt, FICI-n alapuló *in vitro* interakciókat a 6. táblázatban foglaltam össze. A FICI értékek minden esetben 4 alatt voltak, tehát antagonistá 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 (6. táblázat).

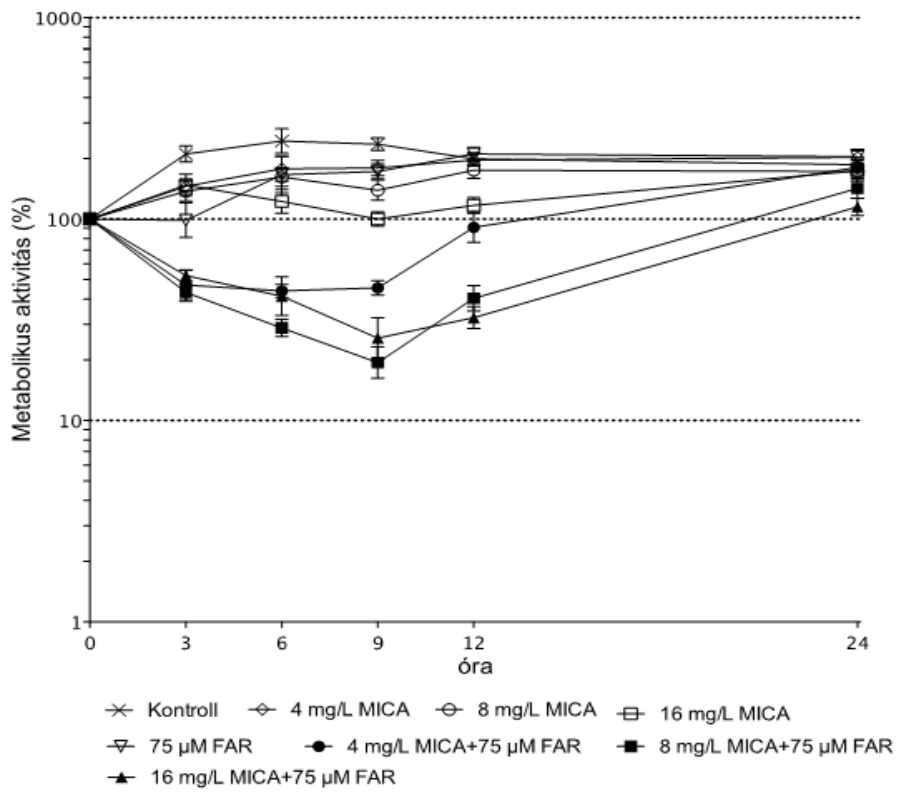
Izolátum	Gátló Koncentrációján Index (FICI) (Medián)			
	Planktonikus sejtek		Szesszilis sejtek	
	FICI	Kölcsönhatás	FICI	Kölcsönhatás
16641	0,31 (0,12-0,5)	Szinergizmus	0,5 (0,375-0,5)	Szinergizmus
17432	0,131 (0,016-0,5)	Szinergizmus	0,188 (0,157-0,281)	Szinergizmus
17818	0,31 (0,28-0,56)	Szinergizmus	0,14 (0,125-0,156)	Szinergizmus
10252	0,5 (0,375-0,53)	Szinergizmus	0,093 (0,077-0,1925)	Szinergizmus
9613	0,5 (0,5-0,56)	Szinergizmus	0,188 (0,155-0,188)	Szinergizmus
ATCC 22019	0,56 (0,56-0,62)	Indifferens	0,625 (0,563-1)	Indifferens

6. táblázat: A micafungin és a farneazol kombinációja során tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások eredményei a FICI index (FICI) alapján

5.8 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 ($p < 0,001$) (10. ábra). Huszonnégy óra elteltével azonban már nem detektáltunk szignifikáns különbséget a kezeletlen sejtekkel összehasonlítva, hanem ismét folyamatos metabolikus aktivitásnövekedés 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 ($p < 0,001$) (10. ábra). 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+farneazol kombináció az első 12 órában szignifikánsan csökkentette a gomba sejtek metabolikus aktivitását a farneazol mentes MICA koncentrációkkal összehasonlítva ($p < 0,05-0,001$) (10. ábra).

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 farneazol jelenlétében azonban a fentebb leírt koncentrációkon tapasztalt paradox viselkedés nem volt megfigyelhető.



10. ábra: A micafungin és a farnezol alkalmazása során a metabolikus aktivitás változások az idő függvényében *Candida parapsilosis* klinikai izolátumok által képzett biofilmek ellen (átlag ± SEM).

5.9 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 (Pfaller és mtsai. 2010). 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 (7. táblázat).

Izolátum	Minimális gátló koncentráció (Medián)			
	Önmagában		Kombinációban	
	FLU (mg/L)	FAR (μ M)	FLU (mg/L)	FAR (μ M)
SC5314	0,5	>300	1 (0,5-1)	2,34 (1,17-300)
1216	0,5	>300	1 (0,5-1)	2,34 (1,17-2,34)
10431	0,5	>300	1	1,17 (1,17-2,34)
27700	16	>300	32 (16-32)	1,17
21616	32	>300	64	1,17

7. táblázat: A fluconazol és a farnezol iránti MIC értékek eredményei a vizsgált planktonikus *Candida albicans* izolátumok esetében mikrodilúciós módszerrel. A táblázat a kapott medián értékeket, illetve MIC tartományokat ábrázolja. A tartományon kívül esett MIC érték esetén (>300 μ M), a medián számításánál a legnagyobb tesztelt koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk MIC értéknek (600 μ M).

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

A FLU és farneazol kombinációkban megfigyelt FLU iránti MIC értékek 2-64-szeres csökkenést mutattak az önmagában mért FLU MIC koncentrációkhoz képest. A kombinációkban mért farneazol MIC értékek kisebb mértékű (2-4-szeres) csökkenést mutattak (8. táblázat)

Izolátum	Minimális gátló koncentráció (Medián)			
	Önmagában		Kombinációban	
	FLU (mg/L)	FAR (µM)	FLU (mg/L)	FAR (µM)
SC5314	512	300	8	75 (37,5-75)
1216	4 (2-8)	150 (150-300)	0,5 (0,12-4)	75 (37,5-150)
10431	>512	150	512	37,5
27700	512	>300	256	300
21616	>512	>300	256	300

8. táblázat: A fluconazol és a farneazol iránti MIC értékek eredményei a vizsgált *Candida albicans* biofilmek esetében XTT-assay-n alapuló mikrodilúciós módszerrel. A táblázat a kapott medián értékeket, illetve MIC tartományokat ábrázolja. A tartományon kívül esett MIC érték esetén (>512 mg/L; >300 µM), a medián számításánál a legnagyobb tesztelt koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk MIC értéknek (1024 mg/L; 600 µM)

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

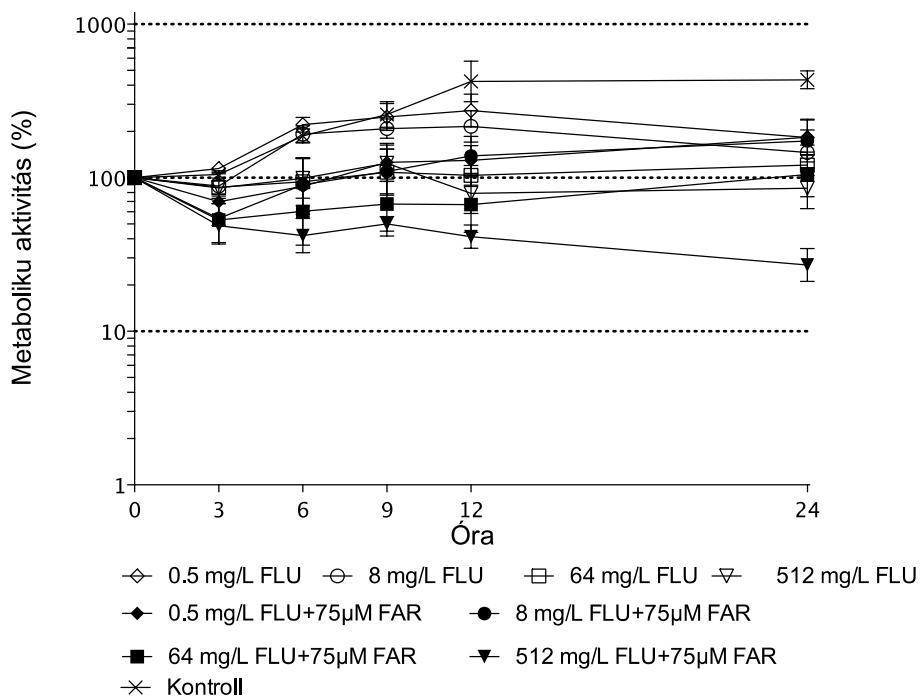
A FLU és farneazol között mért *in vitro* interakció eredményei a 9. táblázatban láthatók. A FLU és farneazol kombinációja során a planktonikus sejtek vizsgálatakor az összes izolátum esetében indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk. A szesszilis sejtek vizsgálatakor szinergista kölcsönhatást egyedül az SC5314 referencia törzs esetén figyeltünk meg, a klinikai izolátumok indifferens kölcsönhatást mutattak. A FICI minden esetben 4 alatti érték volt, tehát antagonizmust egyik esetben sem figyeltünk meg (9. táblázat).

Izolátum	Gátló Koncentrációhányad Index (FICI) (Medián)			
	Planktonikus sejtek		Szesszilis sejtek	
	FICI	Kölcsönhatás	FICI	Kölcsönhatás
SC5314	2 (1-2,5)	Indifferens	0,27 (0,16-0,27)	Szinergizmus
1216	2 (1-2)	Indifferens	0,63 (0,38-1)	Indifferens
10431	2	Indifferens	0,75	Indifferens
27700	2 (1-2)	Indifferens	1	Indifferens
21616	2	Indifferens	0,75	Indifferens

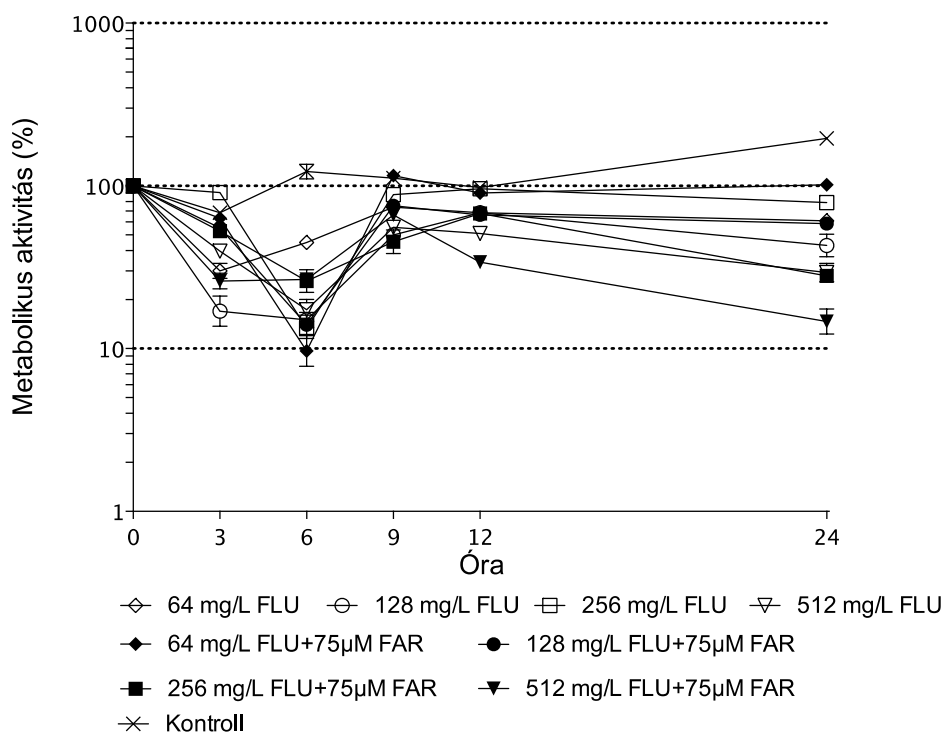
9. táblázat: A fluconazol és a farneazol kombinációja során tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások eredményei a FIC index (FICI) alapján

5.12 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 (11. ábra). 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 ($p < 0,05$) (11. ábra). 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.) ($p > 0,05$) (11. ábra). A rezisztens izolátumok esetében 6 óra elteltével az összes tesztelt FLU koncentráció csökkentette a biofilmek metabolikus aktivitását ($p < 0,001$) (12. ábra), 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) ($p > 0,001$) (12. ábra).



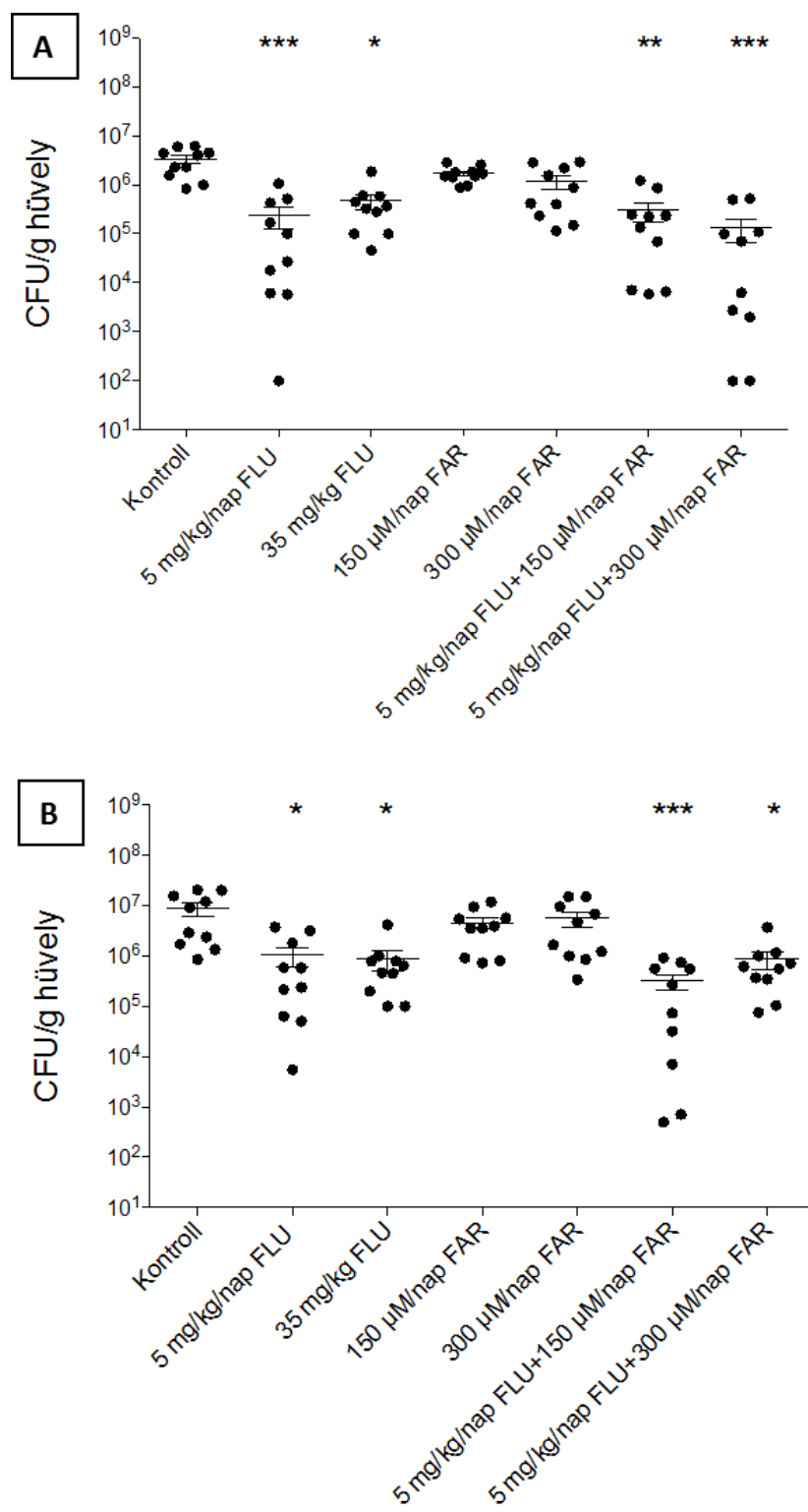
11. ábra: A fluconazol és a farnebol alkalmazása során a metabolikus aktivitásra kifejtett változások a három fluconazol-érzékes *Candida albicans* izolátum által képzett biofilmek ellen (átlag ± SEM)



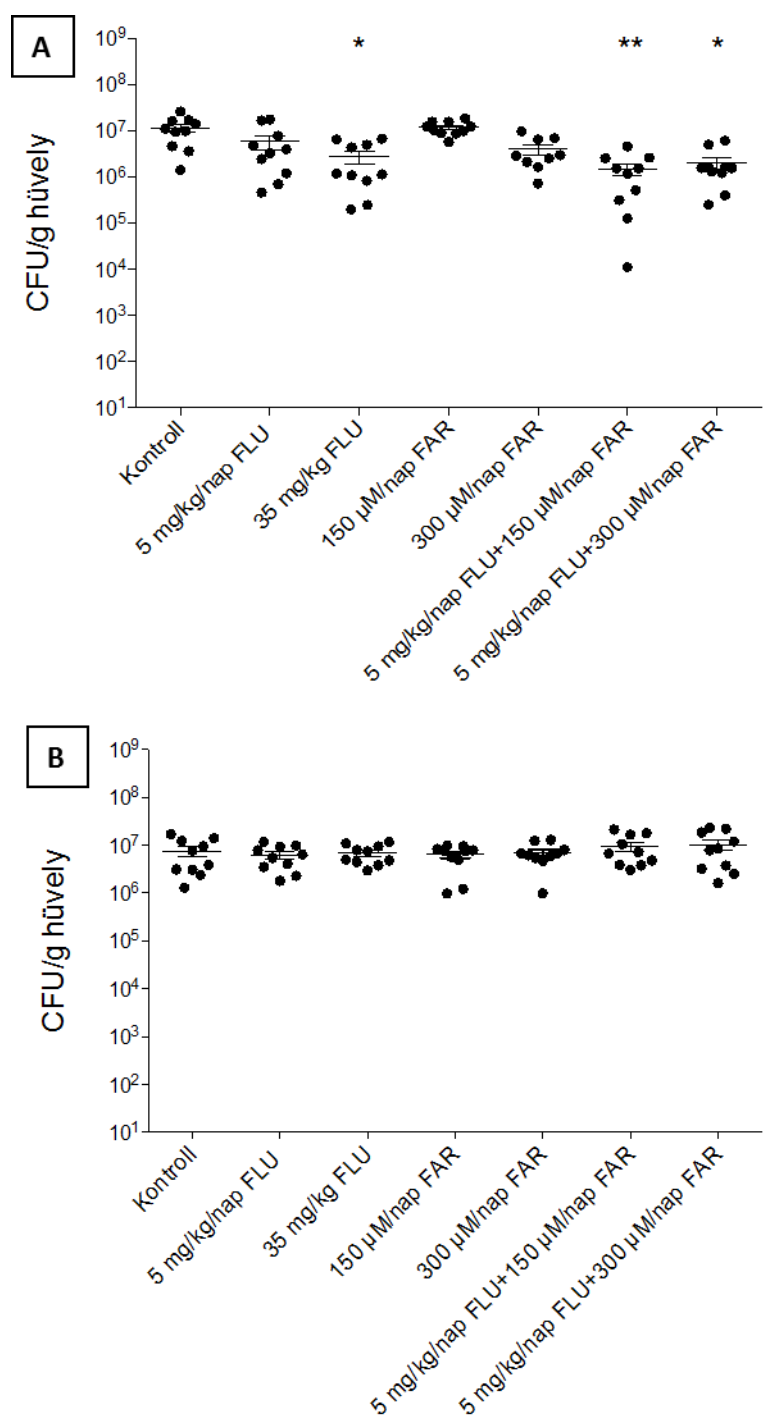
12. ábra: A fluconazol és a farnebol alkalmazása során a metabolikus aktivitásra kifejtett változások a három fluconazol-rezisztens *Candida albicans* klinikai izolátum által képzett biofilm ellen (átlag ± SEM)

5.13 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 ($p > 0,05$) (13. A és B ábra). 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) (Louie és mtsai. 1999) 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 ($p > 0,05$) (14. A ábra). A 27700-as FLU-rezisztens törzs esetében egyik alkalmazott terápiás dózis sem volt hatékony ($p > 0,05$) (14. B ábra).



13. ábra: A fluconazol és a farnezol *in vivo* hatékonysága a fluconazol-érzékeny *Candida albicans* 1216 (A) és 10431 (B) izolátummal fertőzött vulvovaginitis egérmodellben. A vaginából kinőtt gombasejtszám logaritmusát az alkalmazott dózisos függvényében ábrázoltuk (átlag±SEM). (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001)



14. ábra: A fluconazol és a farneazol *in vivo* hatékonysága a fluconazol-rezisztens *Candida albicans* 21616 (A) és 27700 (B) izolátummal fertőzött vulvovaginitis egérmodellben. A vaginából kinőtt gombasejtszám logaritmusát az alkalmazott dózisos függvényében ábrázoltuk (átlag \pm SEM). (*P<0,05; **P<0,01)

5.14 A társszerzők közreműködése a tudományos munka során

Az értekezés alpjául szolgáló két közlemény elkészítésében résztvevő társszerzők munkájának bemutatása:

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. International Journal of Antimicrobial Agents. 2016, 47(4):304-10.

A kísérletek megtervezése: Bozó Aliz, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László

A klinikai minták beszerzése, azonosítása: Bozó Aliz, Dr. Kovács Renátó, Dr. Domán Marianna

Az izolátumok planktonikus-, illetve a biofilmet alkotó sejtjeinek MIC meghatározása: Bozó Aliz, Dr. Domán Marianna, Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán

A metabolikus aktivitás változás vizsgálata: Bozó Aliz, Dr. Kovács Renátó, Nagy Fruzsina

Eredmények statisztikai elemzése: Dr. Gesztelyi Rudolf

Kézirat revízió: Dr. Kovács Renátó, Dr. Kardos Gábor, Dr. Majoros László

Bozó A, Domán M, Majoros L, Kardos G, Varga I, Kovács R. The *in vitro* and *in vivo* efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. Journal of Microbiology. 2016, 54(11):753-760.

A kísérletek megtervezése: Bozó Aliz, Dr. Domán Marianna, Dr. Majoros László, Dr. Kovács Renátó, Dr. Varga István

Az izolátumok planktonikus-, illetve a biofilmet alkotó sejtjeinek MIC meghatározása: Bozó Aliz, Dr. Domán Marianna

A metabolikus aktivitás változás vizsgálata: Bozó Aliz, Dr. Kovács Renátó

In vivo kísérletek elvégzése: Bozó Aliz, Dr. Kovács Renátó, Dr. Domán Marianna

Eredmények statisztikai elemzése: Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László

Kézirat revízió: Dr. Kovács Renátó, Dr. Kardos Gábor, Dr. Majoros László

6. Megbeszélés

Az elmúlt évtizedekben drámaian megnövekedett a különböző *Candida* fajok által kiváltott invazív fertőzések száma, amelyek főként az immunzsuppresszált betegek hosszabb kórházi ellátása során alakulnak ki (Pereira de Mello és mtsai. 2017). Az összes invazív *Candida* infekció 35-51%-a az intenzív osztályokon kezelt páciensek köréből kerül ki, ahol a mortalitási arány még mindig elfogadhatatlanul magas (40-51%) (Sasso és mtsai. 2017). Napjainkban a leggyakrabban izolált species a *C. albicans* (Kett és mtsai. 2011), 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 (Bassetti és mtsai. 2010). A magas mortalitási adatokhoz mindenképpen hozzájárul a különböző *Candida* fajok biofilm képzési képessége mind biotikus, mind pedig abiotikus felületeken. Tumbarello és munkatársai 207 beteg bevonásával vizsgálta a *Candida* véráramfertőzések kialakulásában szerepet játszó rizikófaktorok előfordulását. Az esetek 41%-ában izoláltak biofilm képző *Candida* fajt, melyek közül 38%-ban a *C. albicans*, 34%-ban *C. parapsilosis* volt kimutatható. A tanulmányukban részt vevő betegek több mint 90%-nak volt valamilyen katétere a fertőzést megelőző időszakban (Tumbarello és mtsai. 2012). A biofilmek virulenciafaktor tulajdonságát alátámasztja Kaur és munkatársai által publikált tanulmány, amiben az esetek 53%-ában alakult ki életveszélyes invazív fertőzés, ha biofilm képződött a katéterek felszínén (Kaur és mtsai 2015; Pierce és mtsai. 2013). Pannanusorn és munkatársai a biofilm képzés prevalenciáját vizsgálták különböző klinikailag releváns *Candida* fajok esetében. Tanulmányukban a *C. albicans* izolátumok 40%-a volt képes biofilm létrehozására, míg a *C. parapsilosis* törzsek 67%-a mutatta a szeszilis fenotípust (Pannanusorn és mtsai. 2012).

A magas mortalitási adatokhoz hozzájárul, 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) Kuhn és mtsai. 2002]] és az echinocandinok képesek megfelelően penetrálni a biofilmbe (Ghannoum és mtsai. 2015). 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 (Pierce és mtsai. 2013; Garcia-Effron és mtsai. 2008). Az IDSA 2016-ban megjelent ajánlása alapján a gomba okozta katéter-asszociált fertőzések során a szisztémás antimikotikum kezelés mellett

elsődlegesen választandó művelet a katéter eltávolítása és cseréje (Pappas és mtsai. 2016). 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 (Klingspor és mtsai. 2014). 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 (Gupta és mtsai. 2016). A legújabb technikáknak köszönhetően az antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkező részecskék (pl.: ezüst-partikulumok) orvostechinikai eszközök felületére impregnálhatók (Lemire és mtsai. 2013; Pereira de Mello és mtsai. 2017). Cobrado és munkatársai klórhexidin/ezüst-szulfadiazinnal illetve minociklin/rifampinnal bevont katéterek felületén hasonlították össze a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* izolátumok biofilm termelését. Eredményeik alapján a klórhexidin/ezüst-szulfadiazin kombináció szignifikánsan csökkentette a *Candida* fajok által képzett szesszilis sejtek életképességét (Cobrado és mtsai. 2017).

A fentebb említett 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 újranytják az eszközt (Walraven és mtsai. 2013). 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 (Vassallo és mtsai. 2015; Mermel és mtsai. 2009). Korábban elvégzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján az echinocandinok, az AmB [(L-AmB vagy AmB-deoxiolát (D-AmB))] és az etanol tartalmazó „lock” oldat egy sokat ígérő kezelési stratégia lehet (Walraven és mtsai. 2013; Pierce és mtsai. 2013). Öncü kísérletei során egy *C. parapsilosis* klinikai izolátum által képzett biofilm ellen vizsgálta az AmB és CAS hatékonyságát. Mindkét szer teljes gátlást okozott, azonban komoly limitációja volt ennek a tanulmánynak, hogy kizárólag egyetlen izolátumot vizsgáltak (Öncü 2011). Raad és munkatársai ABLC-t és EDTA oldatot hasonlítottak össze önmagukban, illetve egymással kombinációban. *In vitro* vizsgálataik során szilikon korongok felületén *C. albicans* és *C. parapsilosis* biofilmet állítottak elő. Ezután az ABLC és az EDTA oldatát alkalmazták önmagukban, illetve kombinációban [ABLC (2 mg/mL) + EDTA

(30 mg/mL)]. Eredményeik alapján a kombinációban történő szerek alkalmazása szignifikánsan hatékonyabbnak tűnt az önmagában alkalmazott szerek aktivitásához képest (Raad és mtsai. 2008). Korábban megjelent irodalmi adatok alapján a *C. albicans* által termelt quorum-sensing molekula, a farnezol szinergista módon fokozhatja bizonyos antifungális szerek hatékonyságát (Yu és mtsai. 2012; Cordeiro és mtsai. 2013; Katragkou és mtsai. 2015), ezért potenciális adjuváns lehet a *Candida* fajok által kiváltott infekciók terápiaja során (Hornby és mtsai. 2001). 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 útvonalát), ezért fokozottan érzékenyé válnak a farnezollal kombinációban adagolt tradicionális antifungális szerekkel szemben (Langford és mtsai. 2009). Ennek következtében a *C. parapsilosis* esetén tapasztalt generikusan magasabb echinocandin MIC értékeket - ami a biofilmek esetében még markánsabban jelentkeznek - csökkenteni tudjuk, továbbá fokozhatjuk a sejt-falszintézis gátlásából eredő fungicid hatást.

Cordeiro és munkatársai rezisztens planktonikus *C. parapsilosis* törzsek esetén szignifikáns MIC értékcsökkenést figyeltek meg a farnezol és a CAS kombináció alkalmazása során. Az általuk publikált szinergista kölcsönhatást FICI eredményeik (FICI: 0,124-0,5) is megerősítették. Hasonló eredményeket figyeltek meg a FLU, itraconazole és az AmB plusz farnezol kombináció alkalmazása esetében is (FICI: FLU+farnezol: 0,124-0,249; itraconazole+farnezol: 0,09-0,5; AmB+farnezol: 0,124-1,0) (Cordeiro és mtsai. 2013). Kísérleteinkben a planktonikus *C. parapsilosis* izolátumok vizsgálataiban 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 során 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).

Katragkou és munkatársai *C. albicans* SC5314 referencia törzs által képzett biofilm ellen vizsgálták a MICA és farnezol kombinációját, melynek során szinergizmust figyeltek meg, bár az általuk mért értékek nagyon közel voltak az indifferenciát jelentő határértékhez (FICI: $0,49 \pm 0,02$). A FLU és farnezol kombinációja során szintén szinergista interakciót tapasztaltak SC5314 *C. albicans* referencia izolátum ellen a FICI, illetve a Bliss independence statisztikai módszer alkalmazásával, habár az átlag FICI ebben az esetben is megközelítette az indifferens határértéket (medián FICI: $0,5 \pm 0,02$) (Katragkou és mtsai. 2015). Érdekes jelenség, hogy az AmB és farnezol együttesen történő alkalmazásakor a FICI érték szinergista kölcsönhatást jelzett, míg a Bliss independence modell alapján indifferens hatást kaptak, amely alátámasztja a kombinációs kísérletek több metodikával történő vizsgálatának fontosságát (Katragkou és mtsai. 2015).

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 kezeltlen 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 (Tavanti és mtsai. 2010). Ahogyan a vizsgálatainkból kiderül, a farnezol növelte a CAS és a MICA hatását egy napos biofilmek ellen, melyet két, egymástól független módszerrel is sikerült bizonyítani. A szinergizmus hátterében valószínűleg az antifungális szerek által indukált ROS (reaktív oxigén származék) termelődés állhat, mely up-regulálja a Ras fehérjét. Ezáltal fokozódik a farnezol hatása, mely aktiválja a Ras transzmembrán doménjét, illetve gátolja a cAMP-PKA, valamint a MAP-kináz jelátviteli útvonalakat (Katragkou és mtsai. 2014; Delattin és mtsai. 2014; Inglis és Sherlock 2013).

Az echinocandinok aktivitása farneazol hozzáadásával fokozható, azonban a quorum-sensing megzavarása esetén nem kívánt hatásokat is kiválthatunk. A sejtek közötti kommunikáció exogén úton történő befolyásolása révén serkenthetjük a biofilmben természetesen jelen lévő diszperziós folyamatokat, melynek következtében invazív disszeminált candidiasis kialakulásának a veszélye is fennállhat (Uppuluri és mtsai. 2010). Ráadásul a biofilmből le/kiszakadt sejtek más élettani jellemzőkkel rendelkezhetnek és általában virulensebbek, mint a biofilmet alkotó szesszilis formáik (Uppuluri és mtsai. 2010). Fontos megjegyezni, hogy nemcsak a katéter belső részében, hanem annak felszínén is létrejöhet biofilm, továbbá a diszperzió jelensége miatt a „lock” terápia mellett szisztémás antifungális kezelést is szükséges alkalmazni (Nett 2014).

Az elmúlt években egyéb quorum-sensing molekulákkal történő vizsgálatok alapján is felmerült, hogy potenciális adjuvánsként alkalmazhatók akár a „lock” terápia, akár egyéb alternatív terápia részeként. A *C. albicans* által termelt tirozol-lal önmagában, illetve antifungális szerekkel történő kombinációban végzett kísérletek eredményeiből látható, hogy hatékony szerepet tölthetnek be a biofilm kialakulásának gátlásában (Shanmughapriya és mtsai. 2014; Monteiro és mtsai. 2015; Cordeiro és mtsai. 2015).

Bár a neutropeniás betegek esetén egyre gyakrabban használják az echinocandinokat az empirikus antifungális terápia részeként, az ép immunrendszerrel rendelkező betegek esetében, valamint enyhébb felszíni gombás fertőzések kezelése során továbbra is a különböző azolok a leggyakrabban alkalmazott antifungális szerek. A biofilm-asszociált fertőzések kezelésében az azol-típusú antifungális szerek nem javasoltak az elsődleges terápia részeként (Pierce és mtsai. 2013), azonban a quorum-sensing molekulák adjuvánsként történő alkalmazása fokozhatja az azol-alapú terápiák hatékonyságát is. Korábban Cordeiro és munkatársai által publikált *in vitro* kísérletek során az azol-típusú antimikotikumok közé tartozó FLU és a farneazol kombinációban történő alkalmazása során szinergista kölcsönhatást figyeltek meg FLU-rezisztens *C. albicans* planktonikus sejtek ellen (FICI: 0,015-0,374) (Cordeiro és mtsai. 2013). Sharma és Prasad hasonló eredményeket tapasztaltak FLU és farneazol kombinációja során azol-érzékeny és azol-rezisztens planktonikus *C. albicans* klinikai izolátumok, illetve az SC5314 referencia törzs esetén. A FLU és a farneazol kombinációjának alkalmazásakor az egyes szerek iránti MIC₈₀ értékek esetében 8-64-szeres csökkenést figyeltek meg. Ráadásul a FICI értékek alapján antagonizmust egyik esetben sem írtak le (FICI<0,5) (Sharma és Prasad 2011). A fent leírt eredmények alapján a farneazol

antimikotikum hatást fokozó viselkedését talán ki lehetne használni a mukozális fertőzések terápiajában. Ezért kísérleteinkben immunkompetens vulvovaginitis egérmodellt alkalmazva igyekeztünk megerősíteni a korábban *in vitro* tapasztalt farnezol 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 (Polke és mtsai 2015; Pereira de Mello és mtsai. 2017). Nők esetében leggyakrabban a hüvely nyálkahártyáján jöhet létre biofilm, amelynek szerepe lehet a rekuráló vaginitises esetek kialakulásában. Foxman és munkatársai 2011. június és augusztus között az interneten végzett felmérése során *Candida* fajok által kiváltott rekuráló vulvovaginitis prevalenciáját vizsgálták 16 és 65 év közötti nők esetében öt európai országban, illetve az Amerikai Egyesült Államokban. A vizsgálat alapján Franciaországban a nők 29%-a, míg az olasz nők 49%-a szenvedett élete során legalább egyszer vulvovaginitisben. A felmérésben résztvevők 9%-ánál egy éven belül négy vagy több alkalommal fordult elő tünetet okozó fertőzés (rekuráló vulvovaginitis), legnagyobb gyakorisággal a 25-34 év közötti korosztályban. 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 terápia kialakítását. Az ilyen terápia egyik sarokköve lehet a quorum-sensing molekulák adjuvánsként történő alkalmazása a hüvely nyálkahártyáján lévő biofilmek megbontására (Foxman és mtsai. 2013).

In vitro kísérleteink alapján Cordeiro és Sharma eredményeivel ellentétben a planktonikus *C. albicans* izolátumok és az SC5314 referencia törzs esetén is indifferens interakciót figyeltünk meg a FLU és a farnezol kombinációja során. Hornby és munkatársai korábbi megfigyelése alapján a FLU-al történő kezelés *C. albicans* esetében törzsfüggő módon fokozhatja az endogén farnezol termelést (Hornby és mtsai. 2004), amely magyarázatot adhat a FLU és farnezol között kialakuló *in vitro* interakciók közötti különbségekre (Sharma és Prasad 2011; Cordeiro és mtsai. 2013). 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 szesszilis sejtek vizsgálata során a „checkerboard” mikrodilúciós módszer esetében magas FLU és farnezol koncentrációkon a metabolikus aktivitás paradox módon történő emelkedése volt megfigyelhető. Korábban leírták, hogy az exogén úton hozzáadott farnezol szerepet játszhat az egyes anyagcsere

útvonalak (glikolízis, glükoneogenezis, aminosav bioszintézis) szabályozásában résztvevő gének expressziójában, mely magyarázhatja a metabolikus aktivitás paradox úton bekövetkező erősödését (Han és mtsai. 2012). 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. Napjainkban a kutatók egyre inkább *in vivo* körülmények között különféle állatmodellek alkalmazásával próbálják vizsgálni a farnezol hatását, azonban az eredmények egyelőre ellentmondásosak (Hisajima és mtsai. 2008; Navarathna és mtsai. 2007).

Hisajima és munkatársai orális candidiasisban szenvedő egerek esetében vizsgálták a farnezol hatékonyságát. *C. albicans* gombaszuszpenzióval fertőztek nőstény egereket szájon át, majd 1,125 valamint 2,25 és 9 μM -os farnezol oldatot adagoltak per os a fertőzés után 3, 24 és 30 órával. A csíraszám meghatározásához az egerek eltávolított nyelvét, illetve ürülékét is felhasználták. Eredményeik alapján az alkalmazott 9 μM farnezol protektív hatást mutatott, hiszen szignifikánsan csökkentette a nyelvből kinőtt gombasejtek számát a kezeletlen kontroll egerekhez viszonyítva ($4,50 \pm 0,40$; $5,40 \pm 0,23$ log CFU/nyelv). Továbbá a farnezol kezelés mérsékelte az egerek testsúlycsökkenését, illetve a székletből kitenyészhető gombasejtek számát is (Hisajima és mtsai. 2008).

Az elérhető limiált számú *in vivo* tanulmány közül Navarathna és munkatársai egy másik szemszögből vizsgálták a farnezol hatását, ahol a kapott eredményeik további kérdéseket vetnek fel. A 2007-es tanulmányukban orálisan és intraperitoneálisan alkalmazott farnezol, mint virulenciafaktor szerepét vizsgálták *in vivo* kísérletekben. Eredményeikből jól látszik, hogy a *C. albicans* $1,3 \times 10^6$ CFU/mL gombaszuszpenzióval fertőzött egereknél alkalmazott farnezol hatására fokozódott a szisztémás candidiasis kialakulása, illetve átlagosan 30 órával korábban következett be az egerek elhalálása a kontroll csoportokhoz viszonyítva (Navarathna és mtsai. 2007). Szubletális dózissal történő fertőzés során a farnezollal kezelt csoport tagjai négy nappal korábban kezdtek el pusztulni, illetve esetükben a fertőzés utáni 6. napon ötször alacsonyabb volt a túlélési ráta, mint a kezeletlen egerek esetében (Navarathna és mtsai. 2007). Kísérleteik alapján az intraperitoneálisan és orálisan alkalmazott farnezol (20 mM/egér) elősegítette az egerek pusztulását. Eredményeik azt jelzik, hogy az exogén úton bejuttatott farnezol fokozza a *C. albicans* virulenciáját és fontos szerepet játszik a gombák által okozott fertőzések patogenezisében. Érdemes azonban megjegyezni, hogy Navarathna és

Hisajima kutatócsoportjai által alkalmazott farnezol koncentrációk között három nagyságrendnyi volt a különbség (20 mM/egér; 9 μ M/egér).

Egy másik invazív fertőzést vizsgáló tanulmányban Martins és munkatársai a *C. albicans* CAF2-1 törzssel fertőzött egerek kezelésére 94 μ mol izoamil-alkoholt, 70 μ mol 2-feniletanolt, 3,2 nmol *E*-nerolidolt és 18 nmol *E,E*-farnezolt tartalmazó koktélt alkalmaztak, melynek hatására a fertőzést követő 3. napon felboncolt egerek veséjéből kinőtt gombasejtszám szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll sejtekhez viszonyítva ($p < 0,05$). Eredményeik alapján tehát a farnezol virulenciát fokozó hatása nem teljesen egyértelmű.

Hisajima és munkatársai által kapott eredményekkel ellentétben az *in vivo* kísérleteinkben alkalmazott 150 μ M és a 300 μ M farnezol önmagukban nem voltak hatékonyak. Azonban a 21616-os FLU-rezisztens izolátum esetében az alkalmazott farnezol dózistól függetlenül fokozta a naponta adagolt 5 mg/kg FLU dózis hatékonyságát a kontroll egerekhez viszonyítva ($p < 0,05-0,01$). Korábbi vizsgálatokban *in vitro* planktonikus sejtekkel végzett kísérletek során két munkacsoport is hasonló eredményeket kapott (Jabra-Rizk és mtsai. 2006; Cordeiro és mtsai. 2013). Jabra-Rizk és munkatársai 2006-ban FLU-rezisztens planktonikus *C. dubliniensis* és *C. albicans* izolátumok esetén a FLU és a farnezol kombinációban történő vizsgálata során szinergista interakciót figyeltek meg. A vizsgált törzsek esetében a kombinációban mikrodilúciós módszerrel megfigyelt FLU iránti MIC értékeket a farnezol dóziszfüggő módon csökkentette az önmagában vizsgált FLU iránti MIC értékekhez képest (Jabra-Rizk és mtsai. 2006). Cordeiro és munkatársai 2013-ban FLU-rezisztens ($MIC \geq 64$ mg/L) planktonikus *C. albicans* izolátumok esetén vizsgálták a farnezol hatékonyságát, ahol a kombinációban megfigyelt FLU iránti MIC értékek esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltak ($p < 0,05$). Az általuk leírt szinergista kölcsönhatást FICI eredményeik is alátámasztották (FICI: 0,015-0,374) (Cordeiro és mtsai. 2013). *In vitro* vizsgálatainkban a planktonikus sejtek esetén indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk, azonban a szesszilis sejtek vizsgálatakor a farnezol az SC5314 FLU-érzékeny vad típusú izolátum esetében növelte a FLU *in vitro* biofilm ellenes aktivitását.

A farnezol 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 farnezol törzsfüggő módon csökkentheti vagy akár meg is szüntetheti a FLU rezisztenciát.

További *in vivo* vizsgálatok szükségesek a farnezol pozitív vagy negatív hatásának megerősítésére.

Kutatásaimban arra kerestem a választ, hogy egy új, innovatív komponenst tartalmazó terápia mennyire lehet hatékony a *Candida* biofilmek ellen a két leggyakoribb biofilm képző gomba esetében. Eredményeink alapján a farnezol egy potenciális adjuváns lehet a *C. parapsilosis* okozta katéter-asszociált fertőzésekben olyan speciális terápiákban, mint az antifungális „lock” terápia. A farnezol *in vivo* alkalmazhatósága azonban továbbra is kérdéseket vet fel. Kísérleteink alapján az intravaginálisan alkalmazott farnezolnak önmagában nem volt protektív hatása vulvovaginitises egérmodell esetében, illetve nem növelte a FLU hatékonyságát *in vitro* és *in vivo* körülmények között *C. albicans* klinikai izolátumok ellen. *In vivo* jelentősége elsősorban a FLU rezisztencia megszüntetésében lehet, azonban ez úgy tűnik, hogy törzsfüggő módon jelentkezik. Mindenesetre azt érdemes kiemelni, hogy *in vivo* körülmények között antagonist hatást nem tapasztaltunk a farnezol használata következtében. További *in vivo* kísérletek szükségesek a jövőben mind a katéteres-, mind pedig a mukozális fertőzéseket vizsgáló modellek esetében, hogy egyértelműen alátámaszthassuk a farnezol terápiás jogosultságát az alternatív kezelésekben.

A kísérletek során kapott új eredmények:

A farnezol növelte a CAS és a MICA hatását 24 órás *C. parapsilosis* által képzett biofilmek ellen, melyet több, egymástól független módszerrel is sikerült bizonyítani („checkerboard” mikrodilúciós módszer; metabolikus aktivitás változás vizsgálata az idő függvényében).

A kapott FIC indexek alapján a farnezol szinergista hatást mutatott az echinocandinokkal kombinációban *C. parapsilosis* által képzett biofilmek ellen.

A metabolikus aktivitás változás vizsgálatainak eredményei alapján a CAS farnezollal kiegészítve 24 óra elteltével is szignifikánsan hatékony volt *C. parapsilosis* biofilmek ellen.

Az alkalmazott gyógyszerek (FLU és farnezol) idő- és koncentrációfüggő módon csökkentették a *C. albicans* által képzett biofilmek metabolikus aktivitását.

In vivo eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy vulvovaginitisben a farnezol önmagában nem volt protektív sem az érzékeny, sem pedig a rezisztens izolátumok esetében.

A farnezol potenciális *in vivo* adjuvánsként betöltött szerepe tehát jelenleg megkérdőjelezhető, hiszen vizsgálatainkban egyedül a 21616-os izolátum esetében, törzsfüggő módon volt képes kis mértékben növelni a FLU *in vivo* hatékonyságát (sztatikus hatás).

7. Összefoglalás

A biofilmek gócpontként szolgálhatnak mind az invazív *Candida* fertőzések mind pedig a mukozális infekciók esetében. A vizsgálataink elsődleges célja volt egy olyan potenciális adjuváns vizsgálata, amely mind *in vitro* mind pedig *in vivo* körülmények között fokozhatja az adott terápiában használt antifungális szer hatását. Korábbi *in vitro* adatok alapján egyes quorum-sensing molekulák (pl.: farnezol) növelhetik az antifungális szerek hatékonyságát, ezért adjuvánsok lehetnek különböző terápiákban. Munkánk első részében megvizsgáltuk a caspofungin, a micafungin és a farnezol 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 farnezol *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 farnezol 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 farnezol 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 farnezol vizsgált kombinációi esetében szignifikáns csökkenést az első 12 órában tapasztaltunk ($p < 0,001$). A *C. albicans* esetében végzett vizsgálatoknál a fluconazol és farnezol 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* eredményeink alapján a farnezol önmagában nem volt protektív vulvovaginitisben, azonban kombinációban törzsfüggetlenül növelheti a fluconazol hatékonyságát a fluconazol-rezisztens izolátumok ellen. Eredményeink alapján a farnezol 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 bizonyítására.

8. Summary

Biofilms may be a potential source of invasive candidiasis and mucosal infections. The primary aim of this study was to examine a potential adjuvant which would enhance the *in vitro* and *in vivo* activity of antifungal agents used in the treatment. Previous *in vitro* data suggest that certain quorum-sensing molecules (e.g. farnesol) may potentiate the activity of antifungal agents, hence they may be used as an adjuvant in alternative treatment strategies. During the first part of our investigations *in vitro* interactions were examined between caspofungin, micafungin and farnesol using two-dimensional broth microdilution assay then followed the changes of metabolic activity against *C. parapsilosis* biofilms. Then *in vitro* and *in vivo* activity of fluconazole was studied alone and in combination with farnesol against *C. albicans* biofilms using classical broth microdilution „checkerboard” assay and a murine vulvovaginitis model. The median sessile MICs ranged between 32-256 mg/L and 16-512 mg/L for caspofungin and micafungin, respectively. Median MICs for caspofungin and micafungin in combination with farnesol decreased these rates to 4-8 mg/L. Based on FICIs for sessile clinical isolates, synergism was observed for caspofungin (range of median FICIs: 0.155-0.5) and micafungin (range of median FICIs: 0.093-0.5). The metabolic activity of fungal cells was inhibited by caspofungin+farnesol in all three tested combinations between 3 and 24 hours compared to the control ($p < 0.05$ -0.001). Significant inhibition was observed for micafungin+farnesol in the first 12 hours ($p < 0.001$). In the case of sessile *C. albicans* cells farnesol caused a 2-64-fold MIC decrease in median MICs. For biofilms, synergy between fluconazole and farnesol was observed only against the reference strain (FICIs: 0.16-0.27). *In vivo* findings revealed that farnesol alone was not protective in a murine vulvovaginitis model, but in combination it can enhance the effect of fluconazole against fluconazole-resistant isolates of *C. albicans*. Our results suggest that farnesol may be a potential adjuvant in special therapies (e.g. antifungal lock therapy) in the catheter-associated infections caused by *C. parapsilosis*, but further *in vivo* studies are needed to confirm its anti-biofilm effect in mucosal biofilms.

9. Irodalomjegyzék

1. **Akpan A, Morgan R.** Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002, 78(922):455–9.
2. **Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ.** Production of tyrosol by biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell.* 2006, 5(10):1770–9.
3. **Albuquerque P, Casadevall A.** Quorum sensing in fungi - a review. *Med Mycol.* 2012, 50(4):337-45.
4. **Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group.** Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005, 43(4):1829-35.
5. **Anaissie E, Samonis G, Kontoyiannis D, Costerton J, Sabharwal U, Bodey G, Raad I.** Role of catheter colonization and infrequent hematogenous seeding in catheter-related infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995, 14(2):134-7
6. **Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, Sobel JD, Pappas PG, Kullberg BJ, Mycoses Study Group.** Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidaemia and other forms of invasive candidiasis: a patient –level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis.* 2012, 54(8):1110-22.
7. **Arendrup M C, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, Schønheyder HC, Tvede M.** Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2005, 43(9):4434–40.
8. **Balestrino D, Souweine B, Charbonnel N, Lautrette A, Aumeran C, Traoré O, Forestier C.** Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution. *Nephrol Dial Transplant.* 2009, 24(10):3204-9.

9. **Bamford** CV, d’Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect Immun*. 2009, 77(9):3696–704.
10. **Bandara** HM, Yau JY, Watt RM, Jin LJ, Samaranyake LP. *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate *in vitro* *Candida* biofilm formation. *J Med Microbiol*. 2009, 58(Pt 12):1623–31.
11. **Bassetti** M, Garnacho-Montero J, Calandra T, Kullberg B, Dimopoulos G, Azoulay E, Chakrabarti A, Kett D, Leon C, Ostrosky-Zeichner L, Sanguinetti M, Timsit JF, Richardson MD, Shorr A, Cornely OA. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2017, 43(9):1225-1238.
12. **Bassetti** M, Mikulska M, Viscoli C. Bench-to-bedside review: therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care*. 2010, 14(6):244.
13. **Bayegan** S, Szilágyi J, Kemény-Beke Á, Földi R, Kardos G, Gesztelyi R, Juhasz B, Adnan A, Majoros L. Efficacy of a single 6 mg/kg versus two 3 mg/kg caspofungin doses for treatment of disseminated candidiasis caused by *Candida albicans* in a neutropenic mouse model. *J Chemother*. 2011, 23(2):107-9.
14. **Berkow** EL, **Lockhart** SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist*. 2017, 31;10:237-245.
15. **Bouza** E, Guinea J, Guembe M. The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia. *Antibiotics (Basel)*. 2014, 25;4(1):1-17.
16. **Brunetti** G, Visconti V, Ghezzi MC, Giordano A, Raponi G. The Correlation Between Biofilm Production and Catheter-Related Bloodstream Infections Sustained by *Candida*. A Case Control Study. *Adv Exp Med Biol*. 2017, 973:89-98.
17. **Cao** YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY. 2005. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49(2):584–9.

18. **Chaffin** WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998, 62(1):130-80.
19. **Chandra** J, Kuhn DM, Mujherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001, 183(18):5385-94
20. **Chamilos** G, Lewis RE, Albert N, Kontoyiannis DP. Paradoxical effect of Echinocandins across *Candida* species in vitro: evidence for echinocandin-specific and *candida* species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51(6):2257-9.
21. **Chen** H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, et al. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, 101(14):5048-52.
22. **Chen** SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs.* 2011, 1;71(1):11-41.
23. **Clinical Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Approved standard-third edition M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2008/b
24. **Cruz** MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2013, 81(1):189–200.
25. **Cuéllar-Cruz** M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012, 7(6):755-71.
26. **Darouiche** RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis.* 2001, 1;33(9):1567–72.
27. **Davis-Hanna** A, Piispanen AE, Stateva LI, Hogan DA. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Mol Microbiol.* 2008, 67(1):47-62.

28. **De Cremer K**, Staes I, Delattin N, Cammue BP, Thevissen K, De Brucker K. Combinatorial drug approaches to tackle *Candida albicans* biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015, 13(8):973-84.
29. **Delattin N**, Cammue BP, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem*. 2014, 6(1):77–90.
30. **Deveau A**, Piispanen AE, Jackson AA, Hogan DA. Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell*. 2010, 9(4):569-77.
31. **Donlan RM**, Pipes WO, Yohe TL. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. *Water Res*. 1994, 28:1497-1503.
32. **Donlan RM**. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002, 8(9): 881-90.
33. **Douglas LJ**. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003, 11(1):30-6.
34. **Dranginis AM**, Rauceo JM, Coronado JE, Lipke PN. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007, 71(2):282-94.
35. **Dumitru R**, Hornby JM, and Nickerson KW. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans*: basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004, 48(7):2350–4.
36. **Dwivedi P**, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One*. 2011, 25;6(1):e16218.
37. **Edwards PA**, **Ericsson J**. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem*. 1999, 68:157–85.
38. **Eggimann P**, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003, 3(11):685–702.

- 39. Ernst** JF. Regulation of dimorphism in *Candida albicans*. *Contrib Microbiol.* 2000, 5:98-111.
- 40. Espinel-Ingroff** A, Canton E, Peman J, Rinaldi MG, Fothergill AW. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27–A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. *J Clin Microbiol.* 2009, 47(9):2766–71.
- 41. Falagas** ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis.* 2010, 14(11):e954-66.
- 42. Falagas** ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.* 2006, 58(2):266–72.
- 43. Finkel** JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2011, 9(2):109-18.
- 44. Fidel** PL Jr. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiol.* 2004, 12(5):220-7.
- 45. Fidel** PL Jr, Cutright J, Steele C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2000, 68(2):651-7.
- 46. Fox** EP, Singh-babak SD, Hartooni N, Nobile CJ. Biofilms and antifungal resistance. In: Coste AT, Vandeputte P, editors. *Antifungals from genomics to resistance and the development of novel agents.* Caister academic Press. 2015, p. 71-90.
- 47. Foxman** B, Muraglia R, Dietz J.P, Sobel J.D, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel sur-vey. *J Low Genit Tract Dis.* 2013, 17(3):340-5.
- 48. Furiga** A, Lajoie B, El Hage S, Baziard G, Roques C. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Antibiotics by Combining the Drugs with a New Quorum-Sensing Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, 28;60(3):1676-86.
- 49. Garcia-Effron** G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida*

orthopsilosis, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, 52(7):2305-12.

50. **Garcia-Effron G**, Park S, Perlin DS. Improved detection of *Candida* sp. fks hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine serum albumin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(5):2245-55.
51. **Ghannoum M**, Roilides E, Katragkou A, Petraitis V, Walsh TJ. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm-Related Vascular Catheter Infections: *In Vitro* and *In Vivo* Model Systems. *Clin Infect Dis.* 2015, 1;61 Suppl 6:S618-21.
52. **Ghosh S**, Howe N, Volk K, Tati S. et al., 2010. *Candida albicans* cell wall components and farnesol stimulate the expression of both inflammatory and regulatory cytokines in the murine RAW264.7 macrophage cell line. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 60(1):63–73.
53. **Gubbins PO**, **Anaissie EJ**. In *Clinical Mycology (Second Edition)*, 2009.
54. **Guinea JI**. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2014, Suppl 6:5-10.
55. **Gulati M**, **Nobile CJ**. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016, 18(5):310-21.
56. **Gupta P**, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 2016, 198(1):1-15.
57. **Harriott MM**, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology.* 2010, 156(Pt 12):3635-3644.
58. **Hawser S**. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised *C. albicans* cells. *J Med Vet Mycol.* 1996, 34(2):149-52.
59. **Hawser SP**, **Douglas LJ**. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun.* 1994, 62(3):915-21.
60. **Hidron AI**, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK, National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety

Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008, 29(11):996-1011.

61. **Hisajima** T, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, Nishiyama Y, Funakoshi K, Oshima H, Abe S. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiol Immunol.* 2008, 52(7):327-33.
62. **Hornby** JM, Jensen EC, Lisec AD et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 2001, 67(7):2982-92.
63. **Hornby** JM, Kebaara BW, and Nickerson KW. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular responses to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003, 47(7):2366–9.
64. **Hornby** JM, **Nickerson** KW. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azole antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48(6):2305–7.
65. **Hoyer** LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol.* 2008, 46(1):1-15.
66. **Inglis** DO, **Sherlock** G. Ras signaling gets fine-tuned: regulation of multiple pathogenic traits of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2013, 12(10):1316–25.
67. **Jabra-Rizk** MA, Shirliff M, James C, Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res.* 2006, 6(7):1063–73.
68. **Jack** AA, Daniels DE, Jepson MA, Vickerman MM, Lamont RJ, Jenkinson HF, Nobbs AH. *Streptococcus gordonii* comCDE (competence) operon modulates biofilm formation with *Candida albicans*. *Microbiology.* 2015, 161(Pt2):411–21.

- 69. Kebaara** BW, Langford ML, Navarathna DH, Dumitru R, Nickerson KW, Atkin AL. *Candida albicans* Tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryot Cell*. 2008, 7(6):980-7.
- 70. Kett** DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL, Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med*. 2011, 39(4):665-70.
- 71. Klingspor** L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegraki A, Kibbler C, Meis JF, Sabino R, Ruhnke M, Arian-Akdagli S, Salonen J, Dóczy I. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect*. 2015, 21(1):87.e1-87.e10.
- 72. Kojic** EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004, 17(2):255-67.
- 73. Kollef** M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis*. 2012, 54(12):1739-46.
- 74. Kovács** R, Czudar A, Horváth L, Szakács L, Majoros L, Kónya J. Serum interleukin-6 levels in murine models of *Candida albicans* infection. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2014, 61(1):61-9.
- 75. Kuhn** DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002, 46(6):1773-80.
- 76. Kumamoto** CA, Vinces MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiol*. 2005, 7(11):1546-54.
- 77. Kuranda** K, François J, Palamarczyk G. The isoprenoid pathway and transcriptional response to its inhibitors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2010, 10(1):14-27.
- 78. Kruppa** M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*. 2009, 52(1):1-10.

- 79. Laffey SF, Butler G.** Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2005, 151(Pt4):1073–81.
- 80. Langford ML, Atkin AL, Nickerson KW.** Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans*. *Future Microbiol*. 2009, 4(10):1353–62.
- 81. Larru B, Gong W, Vendetti N, Sullivan KV, Localio R, Zaoutis TE, Gerber JS.** Bloodstream Infections in Hospitalized Children: Epidemiology and Antimicrobial Susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J*. 2016, 35(5):507-10.
- 82. Lazzell AL, Chaturvedi AK, Pierce CG, Prasad D, Uppuluri P, LopezRibot JL.** Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. *J Antimicrob Chemother*. 2009, 64(3):567–70.
- 83. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ.** Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol*. 2013, 11(6):371-84.
- 84. Lepak A, Andes D.** Fungal sepsis: optimizing antifungal therapy in the critical care setting. *Crit Care Clin*. 2011, 27(1):123-47.
- 85. Lewis RE.** Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc*. 2011, 86(8):805-17.
- 86. Lewis RE, Fothergill AW.** Antifungal Agents. *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections* pp 79-97. First Online: 13 May 2015.
- 87. Lin KY, Cheng A, Chang YC, Hung MC, Wang JT, Sheng WH, Hseuh PR, Chen YC, Chang SC.** Central line-associated bloodstream infections among critically-ill patients in the era of bundle care. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017, 50(3):339-348.
- 88. Lindsay AK, Hogan DA.** *Candida albicans*: Molecular interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Fungal Biol Rev*. 2014, 28:85–96.
- 89. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, and Diekema DJ.** Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and

Candida metapsilosis in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2008, 46(8):2659–64.

90. **Lupetti A**, Tavanta A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2002, 40(7):2363-9.
91. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. Int J Med Microbiol. 2014, 304(8):1192–8.
92. **Meletiadis J**, Verweij PE, TeDorsthorst DT, Meis JF, Mouton JW. Assessing *in vitro* combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models. Med Mycol. 2005, 43(2):133–52.
93. **Meletiadis J**, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 2010, 54(2):602-9.
94. **Melo AS**, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2007, 51(9):3081-8.
95. **Mermel LA**, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, Raad II, Rijnders BJ, Sherertz RJ, Warren DK. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009, 49(1):1–45.
96. **Moriyama B**, Ditullio M, Wilson E, Henning SA, Penzak SR, Danner RL, Pennick G, Rinaldi MG, Zelazny AM, Gea-Banacloche J, Barrett AJ, Walsh TJ. Pharmacokinetics of anidulafungin in pleural fluid during the treatment of a patient with *Candida* empyema. Antimicrob Agents Chemother. 2011, 55(5):2478-80.

- 97. Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AJ, and Nickerson KW.** Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl Environ Microbiol.* 2005, 71(8):4938–40.
- 98. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA.** Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun.* 2003, 71(8):4333-40.
- 99. Mukherjee PK, Long L, Kim HG, Ghannoum MA.** Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2009, 33(2):149 –53.
- 100. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B.** *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 2004, 6(10):915-26.
- 101. National Nosocomial Infections Surveillance System.** 2001. NNIS System report. Data summary from January 1992–June 2001, issued August 2001. *Am J Infect Control.* 2001, 29(6):404–21.
- 102. Navarathna DH, Hornby JM, Krishnan N, Parkhurst A, Duhamel GE, Nickerson KW.** Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2007, 75(4):1609-18.
- 103. Nett JE, Zarnowski R, Cabezas-Olcoz J, Brooks EG, Berhardt J, Marchillo K, Mosher DF, Andes DR.** Host contributions to construction of three device-associated *Candida albicans* biofilms. *Infect Immun.* 2015, 83(12):4630-8.
- 104. Nett J, Lincoln N, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D.** Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2007, 51(2):510-20.
- 105. Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM.** Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol.* 2006, 72(6):3805-13.
- 106. Nobile CJ, Johnson AD.** *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev of Microbiol.* 2015, 69:71–92.

- 107. Nobile** CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrels TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, Johnson AD. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012, 148(1-2):126-38.
- 108. Nobile** CJ, **Mitchell** AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol*. 2005, 15(12):1150-5.
- 109. Nobile** CJ, **Mitchell** AP. Microbial biofilms: e pluribus unum. *Curr Biol*. 2007, 17(10):R349-53.
- 110. Mayer** FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013, 4(2):119–28.
- 111. Jarosz** LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell*. 2009, 8(11):1658–64.
- 112. Ku** TS, Palanisamy SKA, Lee SA. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline, and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. *Int J Antimicrob Agents*. 2010, 36(5):441–6.
- 113. Miceli** MH, Bernardo SM, Ku TS, Walraven C, Lee SA. *In vitro* analyses of the effects of heparin and parabens on *Candida albicans* biofilms and planktonic cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 56(1):148 –53.
- 114. Miceli** MH, Bernardo SM, Lee SA. *In vitro* analyses of the combination of high-dose doxycycline and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 34(4):326 –32.
- 115. Morii** D, Seki M, Binongo JN, Ban R, Kobayashi A, Sata M, Hashimoto S, Shimizu J, Morita S, Tomono K. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. *J Infect Chemoter*. 2014, 20(9):558-62.
- 116. Nailis** H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring *ALS1* and *ALS3* gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia*. 2009, 167(1):9-17.

- 117. Thein** ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*. 2009. 52(6):467-75.
- 118. Odabasi** Z, Paetznick V, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Effects of Serum on *In vivo* Susceptibility Testing of Echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51(11):4214-6.
- 119. Odds** FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003, 11(6):272-9.
- 120. Ortega** M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, López J, Pitart C, Mensa J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect*. 2011. 77(2):157–61.
- 121. Ostrosky-Zeichner** L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2010, 9(9):719-27.
- 122. O'Toole** GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011, 30;47. pii: 2437.
- 123. Pappas** PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009, 1;48(5):503-35.
- 124. Pappas** PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016, 15;62(4):409-17.
- 125. Patil** A, **Majumdar** S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 2017, 69(12):1635-1660.
- 126. Peleg** AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2010, 8(5):340-9.

- 127. de Mello TP**, de Souza Ramos L, Braga-Silva LA, Branquinha MH, Dos Santos AL. Fungal Biofilm - A Real Obstacle against an Efficient Therapy: Lessons from *Candida*. *Curr Top Med Chem*. 2017,
- 128. Perlin DS**, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017, 17(12):e383-e392.
- 129. Peters BM**, Junko Y, Noverr MC, Fidel PL Jr. *Candida* vaginitis: when opportunism knocks, the host reponds. *PLoS Pathog*. 2014, 10(4):e1003965.
- 130. Peters BM**, **Noverr MC**. *Candida albicans-Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infect Immun*. 2013, 81(6):2178–89.
- 131. Pfaller MA**, **Diekema DJ**. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007, 20(1):133-63.
- 132. Pfaller MA**, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL, and the global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global antifungal Surveillance Study: a 6,5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*. 2005, 43(12):5848-59.
- 133. Pfaller MA**, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. *PLoS One*. 2014, 3;9(7):e101510.
- 134. Pfaller M**, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012, 74(4):323-31.
- 135. Pfaller MA**, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan, D, and CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole

and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*. 2010, 13(6):180-95.

- 136. Pichova I, Pavlickova L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J, Ruml T, and Soucek M.** Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem*. 2001, 268(9): 2669–77.
- 137. Pierce CG, Srinivasan A, Ramasubramanian AK, López-Ribot JL.** From Biology to Drug Development: New Approaches to Combat the Threat of Fungal Biofilms. *Microbiol Spectr*. 2015, 3(3).
- 138. Pierce CG, Srinivasan A, Uppuluri P, Ramasubramanian AK, López-Ribot JL.** Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Curr Opin Pharmacol*. 2013, 13(5):726-30.
- 139. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL.** A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008, 3(9):1494-500.
- 140. Piispanen AE, Grahl N, Hollomon JM, Hogan DA.** Regulated proteolysis of *Candida albicans* Ras1 is involved in morphogenesis and quorum sensing regulation. *Mol Microbiol*. 2013, 89(1):166-78.
- 141. Polke M, Jacobsen ID.** Quorum sensing by farnesol revisited. *Curr Genet*. 2017, 63(5):791-797.
- 142. Polke M, Hube B, Jacobsen ID.** *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*. 2015, 91:139-235.
- 143. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, Montejo M, Muñoz P, Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M, Almirante B.** Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014, 20(4):O245-54.
- 144. Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey GP.** Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship

between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis.* 1993, 168(2):400-7.

- 145. Raad II**, Hachem RY, Hanna HA, Fang X, Jiang Y, Dvorak T, Sherertz RJ, Kontoyiannis DP. Role of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in catheter lock solutions: EDTA enhances the antifungal activity of amphotericin B lipid complex against *Candida* embedded in biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 2008, 32(6):515–8.
- 146. Ramage G**, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2009, 35(4):340-55.
- 147. Ramage G**, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005, 4(4):633-8.
- 148. Ramage G**, Saville SP, Wickes BL, and Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 2002, 68(11):5459–63.
- 149. Ramage G**, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002, 27;214(1):95-100.
- 150. Ray TL**, Payne CD, Ruchel R, Ritter B, and Schaffrinski M. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun.* 1990, 58(2):508-14.
- 151. Riekhof WR**, Nickerson KW. Quorum sensing in *Candida albicans*: farnesol versus farnesoic acid. *FEBS Lett.* 2017, 591(12):1637-1640.
- 152. Rosenbach A**, Dignard D, Pierce JV, Whiteway M, Kumamoto CA. Adaptations of *Candida albicans* for growth in the mammalian intestinal tract. *Eukaryot Cell.* 2010, 9(7):1075-86.
- 153. Rossignol T**, Logue ME, Reynolds K, Grenon M, Lowndes NF, Butler G. Transcriptional Response of *Candida parapsilosis* following Exposure to Farnesol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51(7):2304-12.

- 154. Rossignol T, Ding C, Guida A, d'Enfert C, Higgins DG, Butler G.** Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. Eucaryot Cell. 2009, 8(4):550-9.
- 155. Schinabeck MK, Long LA, Hossain MA, Chandra J, Mukherjee PK, Mohamed S, Ghannoum MA.** Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. Antimicrobial Agents Chemother. 2004, 48(5):1727–32.
- 156. Segarra-Newnham M, Martin-Cooper EM.** Antibiotic lock technique: a review of the literature. Ann Pharmacother. 2005, 39(2):311–8.
- 157. Shao LC, Sheng CQ, Zhang WN.** [Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds]. Yao Xue Xue Bao. 2007, 42(11):1129–36.
- 158. Sherertz RJ.** Pathogenesis of vascular catheter infection. In Infections Associated with indwelling Medical Devices, 3rd edn, pp. 111-125, 2000, ASM Press
- 159. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK.** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol. 2002, 40(4):1244–8.
- 160. Shirliff ME, Krom BP, Meijering RA, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, Harris ML, Jabra-Rizk MA.** Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2009, 53(6):2392-401.
- 161. Shoham S, Groll AH, Petraitis V, Walsh TJ.** Systemic Antifungal Agents. In book: Infectious Diseases, pp.1333-1344.e4. 2017.
- 162. Shuford JA, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R.** Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. J Infect Dis. 2006, 194(5):710 –3.
- 163. Silva NC, Nery JM, Dias AL.** Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. Mycoses. 2014, 57(1):1-11.
- 164. Sobel JD.** Vulvovaginal candidosis. Lancet. 2007, 9;369(9577):1961-71.

- 165. Sudbery PE.** Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol.* 2011, 16;9(10):737-48.
- 166. Sudbery P, Gow N, Berman J.** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004, 12(7):317-24.
- 167. Sundstrom P, Balish E, Allen CM.** Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal esophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis.* 2002, 15;185(4):521-30.
- 168. Staib P, Morschhauser J.** Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses,* 2007, 50(1):1–12.
- 169. Steinbach WJ, Lamoth F, Juvvadi PR.** Potential Microbiological Effects of Higher Dosing of Echinocandins. *Clin Infect Dis.* 2015, 1;61 Suppl 6:S669-77.
- 170. Tavanti A, Hensgens LA, Mogavero S, Majoros L, Senesi S, Campa M.** Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis sensu strictu* strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol.* 2010, 28;10:203.
- 171. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, and Odds FC.** *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005, 43(1):284–92.
- 172. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D.** Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell.* 2011, 10(9):1173-82.
- 173. Toulet D, Debarre C, Imbert C.** Could liposomal amphotericin B (L-AMB) lock solutions be useful to inhibit *Candida* spp. biofilms on silicone biomaterials? *J Antimicrob Chemother.* 2012, 67(2):430 –2.
- 174. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA.** Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis.* 2016, 74(4):ftw018.
- 175. Tumbarello M, Fiori B, Trecharichi EM, Posteraro P, Losito AR, De Luca A, Sanguinetti M, Fadda G, Cauda R, Posteraro B.** Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS One.* 2012, 7(3):e33705.

- 176. Uppuluri P**, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR, Kadosh D, Lopez-Ribot JL. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* developmental cycle. PLoSPathog 2010, 26;6(3):1000828.
- 177. Vincent JL**, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C. & other authors. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA. 2009, 2;302(21):2323–9.
- 178. Vrieni G, Matsiota-Bernard P**. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. J Infect. 2001, 42(1):50-6
- 179. Walraven CJ, Lee SA**. Antifungal lock therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2013, 57(1):1-8.
- 180. Weber K, Schulz B, Ruhnke M**. The quorum-sensing molecule E,E-farnesol--its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. Yeast. 2010, 27(9):727-39.
- 181. Weber K, Sohr R, Schulz B, Fleischhacker M, Ruhnke M**. Secretion of E,E-Farnesol and Biofilm Formation in Eight Different *Candida* Species. Antimicrobial Agents Chemother. 2008, 52(5):1859-61.
- 182. Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M**. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007, 362(1483):1119-34.
- 183. Williams DW, Lewia M**. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011, 28;3.
- 184. Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, and Lewis MA**. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. J Oral Microbiol. 2013, 21;5.
- 185. Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB**. Inflammatory response and clinical course of adult patients with nosocomial bloodstream infections caused by *Candida* spp. Clin Microbiol Infect. 2006, 12(2):170–7.
- 186. Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N**. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. J Basic Microbiol. 2016, 56(5):440-7.

- 187. Yousif A, Jamal MA, Raad I.** Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol.* 2015, 830:157-79.
- 188. Yu LH, Wei X, Ma M, Chen XJ, Xu SB.** Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012, 56(2):770–5.
- 189. Zhou Y, Wang G, Li Y, Liu Y, Song Y, Zheng W, Zhang N, Hu X, Yan S, and Jia J.** *In vitro* interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrob agents Chemoter.* 2012, 56(6):3250-60.



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

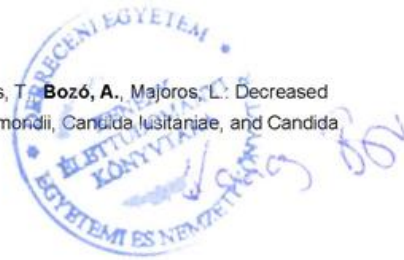
Jelölt: Bozó Aliz
Neptun kód: MEOPYO
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

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*
kefyri 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)





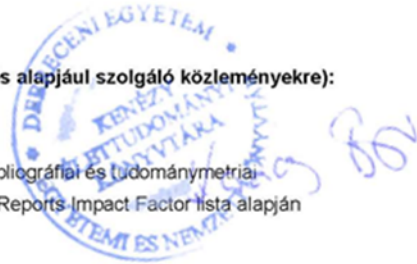
5. Nagy, F., **Bozó, A.**, Tóth, Z., Daróczy, L., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro antifungal susceptibility patterns of planktonic and sessile *Candida kefyr* clinical isolates. *Med. Mycol. [Epub ahead of print]*, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx062>
IF: 2.377 (2016)
6. Kovács, R. 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., Perlin, 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 alapján szolgáló közleményekre): 6,231

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, 2018.01.05.



10. Tárgyszavak-Keywords

echinocandinok, gátló koncentrációhányad index (FICI), gyógyszerek közötti kölcsönhatás, fluconazol rezisztens, vulvovaginitis egérmodell, szinergizmus

echinocandins, fractional inhibitory concentration index (FICI), drug interaction, fluconazol-resistant, murine vulvovaginitis, synergy

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Majoros Lászlónak tartozom köszönettel, aki kitartó szakmai segítségével, építő tanácsaival segítette és támogatta munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Kónya Józsefnek, hogy lehetővé tette számomra a kutatómunka elvégzését az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács Renátónak gyakorlati tanácsaiért, javaslataiért, mellyel nagyban hozzájárult az értekezés végleges formájának kialakulásához.

Szeretném megköszönni a mikológia laboratóriumban korábban, illetve jelenleg dolgozó hallgatóknak, Dr. Domán Mariannának, Tóth Zoltánnak és Nagy Fruzsínának a kísérletek során nyújtott segítséget.

Köszönet illeti Dr. Gesztelyi Rudolfot a statisztikai analízisben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért.

Köszönet az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársának, hogy segítők munkájukkal hozzájárultak kutatásaim kivitelezéséhez.

Végezetül hálával tartozom Férjemnek és családomnak, akik mindvégig mellettem álltak, és kiegyensúlyozott, nyugodt háttérrel biztosították a kísérletek sikeres elvégzéséhez és a disszertáció megírásához.

12. Függelék

Poszterek

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)

Aliz Bozó, Marianna Domán, Renátó Kovács, David S. Perlin, Gábor Kardos, Tamás Kardos, Zoltán Tóth, Qasem Saleh and László Majoros. Dose escalation studies with caspofungin against *Candida glabrata*. 17th International Congress, Hungarian Society for Microbiology Budapest, Hungary, 8-10, July, 2015.

Konferencia előadások

Bozó Aliz, Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Kardos Tamás, Majoros László, Kovács Renátó. A caspofungin, a micafungin és a farnezol 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 farnezol 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 tirozol 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.