

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***A Candida* biofilmek alternatív terápiás megközelítései**

Nagy Fruzsina

Témavezető: Dr. Kovács Renátó



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. A <i>Candida</i> fajok morfológiai sajátosságai	8
2.2. A <i>Candida</i> fajok legfontosabb virulencia faktorai	10
2.3. A <i>Candida</i> fajok klinikai jelentősége	12
2.4. A biofilmek klinikai jelentősége.....	14
2.5. A <i>Candida albicans</i> biofilmek képződése és szabályozása.....	16
2.6. Quorum-sensing.....	19
2.6.1. Tyrosol	22
2.7. Echinocandinok	26
2.8. Nikkomycin Z.....	29
3. Célkitűzések	31
4. Anyagok és módszerek.....	32
4.1. A vizsgált izolátumok	32
4.2. A planktonikus sejtek érzékenységének vizsgálata	32
4.3. Biofilm képzés.....	33
4.3.1. A biofilm tömegének meghatározása	34
4.4. A humán szérum hatása a biofilm képződésére, valamint a szesszilis sejtek antifungális szerekkel szembeni érzékenységének meghatározása 50% humán szérum jelenlétében.....	34
4.5. A biofilmek antifungális szerekkel szembeni érzékenysége	35
4.6. Az antifungális szerek, illetve a tyrosol között fennálló <i>in vitro</i> kölcsönhatások vizsgálata	37
4.7. A <i>Candida</i> biofilmek életképesség vizsgálata.....	37
4.8. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok	38
4.9. Statisztikai analízis	39
5. Eredmények.....	40
5.1. A planktonikus, illetve a szesszilis <i>Candida albicans</i> és <i>Candida parapsilosis</i> sejtek echinocandinokkal szembeni érzékenységének meghatározása 50% humán szérum jelenlétében.....	40
5.2. A humán szérum hatása a biofilm képződésére.....	41
5.3. A <i>Candida albicans</i> és a <i>Candida parapsilosis</i> biofilmek érzékenységi mintázata 50% humán szérum jelenlétében	43
5.4. A <i>Candida albicans</i> és a <i>Candida parapsilosis</i> biofilmek struktúrájának és életképességének vizsgálata 50% humán szérum jelenlétében	46

5.5. A caspofungin, a micafungin és a nikkomycin Z aktivitásának vizsgálata planktonikus <i>Candida albicans</i> és <i>Candida parapsilosis</i> sejtek ellen	48
5.6. A <i>Candida albicans</i> biofilmek echinocandinokkal és nikkomycin Z-vel szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z közötti <i>in vitro</i> kölcsönhatások vizsgálata	49
5.7. A <i>Candida parapsilosis</i> biofilmek echinocandinokkal és nikkomycin Z-vel szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z közötti <i>in vitro</i> kölcsönhatások vizsgálata	51
5.8. A <i>Candida albicans</i> és a <i>Candida parapsilosis</i> biofilmek életképesség vizsgálata.....	53
5.9. A planktonikus <i>Candida parapsilosis</i> sejtek echinocandinokkal és tyrosollal szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a tyrosol közötti <i>in vitro</i> kölcsönhatások vizsgálata.....	56
5.10. A <i>Candida parapsilosis</i> biofilmek echinocandinokkal és tyrosollal szembeni érzékenységének meghatározása, illetve az echinocandinok és a tyrosol közötti <i>in vitro</i> kölcsönhatások vizsgálata.....	58
5.11. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok	60
5.12. A társszerzők közreműködése az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítésében	62
6. Megbeszélés.....	64
7. Összefoglalás.....	71
8. Summary	72
9. Irodalomjegyzék	73
10. Tárgyszavak-Keywords	90
11. Köszönetnyilvánítás	91
12. Függelék	92

Rövidítésjegyzék

ALS	agglutinin-like sequence
AMB	amphotericin-B
ANI	anidulafungin
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	caspofungin
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
FAR	farnesol
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index – gátló koncentráció-hányad index
FKS1, FKS2	a β -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplex két alegysége
FLU	fluconazole
IDSA	Infectious Diseases Society of America
ITRA	itraconazole
MIC	minimal inhibitory concentration – minimális gátló koncentráció
MICA	micafungin
MOPS	3-N-morfolino-propánszulfonsav
NIKZ	nikkomycin Z
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern – patogén-asszociált molekuláris mintázat
PVC	polivinil-klorid
QS	quorum-sensing
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium – sejtenyésztésre alkalmas táptalaj
SAP	szekretált aszpartil proteínázok

SDA	Sabouraud dextrose agar – gombák tenyésztésére alkalmas táptalaj
SEM	scanning electron microscope
TYR	tyrosol
XTT	2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

1. Bevezetés

Napjainkban megközelítőleg 2,2-3,8 millió gomba faj él világszerte, amelyek közül mindössze 300 tekinthető humán patogénnek (Hawksworth és Lücking 2017; Rossato és mtsai. 2021). Az általuk okozott infekciók csaknem 1,7 milliárd embert érinhetnek világszerte, ahol a betegségek súlyossága a szuperficiálistól az invazív fertőzésekig terjedhet. Az utóbbiak mintegy 1,5 millió ember haláláért tehetőek felelőssé évente (Wall és mtsai. 2019; Loh és Ang 2020).

A humán patogén gomba fajok jelentős része opportunistá természetű, vagyis permanens immunszuppresszió esetében (pl. HIV fertőzés, malignus daganatos megbetegedés) okozhatnak infekciót, továbbá az invazív orvosi beavatkozások, a széles spektrumú antibiotikum terápia, illetve a szervtranszplantáció is jelentős hajlamosító tényezőnek tekinthető az opportunistá gomba fertőzések szempontjából (Rossato és mtsai. 2021).

A leggyakoribb humán patogén gomba fajok elsősorban a *Candida* nemzetségből kerülnek ki. A leggyakrabban azonosított *Candida* faj továbbra is a *Candida albicans*, amely a gomba eredetű nyálkahártya-és invazív fertőzések körülbelül 70%-áért felelős világszerte (Talapko és mtsai. 2021). A *Candida* fajok a normál mikrobiom oszlopos tagjaiként, legfőképp a gasztrointesztinális rendszerben, a bőr felszínén, illetve a női genitális traktusban vannak jelen (Dadar és mtsai. 2018). Az utóbbi években lejátszódó epidemiológiai változásnak köszönhetően az úgynevezett non-*albicans* fajok (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. auris*) incidenciája és prevalenciája is fokozatosan növekvő tendenciát mutat. Az egyes fajok megoszlása azonban földrajzi területtől függően eltérő lehet (Pappas és mtsai. 2018; Du és mtsai. 2020).

Az elmúlt években a különböző beültetett orvostechikai eszközök klinikai gyakorlatban történő rutinszerű alkalmazásával a biofilm-asszociált infekciók előfordulása jelentősen emelkedett. A centrális vénás katéterek felszínén, valamint lumenében létrejövő biofilmek állandó gócpontjai lehetnek a szisztémás fertőzéseknek, így a candidémia szempontjából az egyik legjelentősebb rizikó tényezőt jelentik (Pappas és mtsai. 2018). A *Candida* fajok által kiváltott véráramfertőzések incidenciája az Amerikai Egyesült Államokban körülbelül 9,5-14,4/100,000 eset (Magill és mtsai. 2018; Quindós 2014). Egy közelmúltban végzett epidemiológiai metaanalízis szerint a candidémia gyakorisága Európában 3,88/100,000 eset, mely körülbelül napi 79 megbetegedésnek felel meg (Koehler és mtsai. 2019).

Pfaller és munkatársai a SENTRY program (Antimikrobiális Surveillance Program) segítségével, több éven keresztül (2012-2017), 16 orvosi központ (Amerikai Egyesült Államok, Mexikó, Európa, Dél-Korea) bevonásával, a gombák és baktériumok által okozott véráramfertőzések előfordulását vizsgálták. Az eredményeik alapján a *Candida* fajok a 9. helyen szerepeltek a nozokomiális véráramfertőzést kiváltó mikroorganizmusok listáján (Pfaller és mtsai. 2020). Bár incidenciájuk az elmúlt évekhez képest valamelyest csökkent (korábbi adatok szerint az Amerikai Egyesült Államokban a negyedik, míg Európában a hatodik leggyakrabban izolálható mikrobának számítottak a véráramfertőzések során), a candidémia mortalitási aránya még mindig elfogadhatatlanul magas, akár a 40-50%-ot is meghaladhatja (fajtól függően) az intenzív ellátást igénylő páciensek körében (Vitális és mtsai. 2020; Du és mtsai. 2020; Talapko és mtsai. 2021).

A biofilmek kompakt szerkezetüknek köszönhetően kiváló védelmet biztosítanak az antifungális szerekkel, illetve az immunrendszerrel szemben a gombasejtek számára (Gulati és Nobile 2016). Ennek eredményeképpen a biofilm alapú fertőzések kezelése a mai napig nagyon komoly kihívást jelent a klinikusok számára. A rendelkezésünkre álló antimikotikumok száma erősen limitált, ráadásul a szisztémás infekciók terápiája során használható gombaellenes szerek közül nem mindegyik képes a biofilm mátrixában terápiás koncentrációt elérni. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható antifungális szerek közül csak az echinocandinok és az amphotericin-B (AMB) mutatnak fajfüggő biofilm ellenes aktivitást (Kean és Ramage 2019).

Tekintettel a biofilm eredetű fertőzések számának növekedésére, valamint a multirezisztens *Candida* speciesek megjelenésére, égető szükség van a korábbiaktól eltérő antifungális terápiás lehetőségek kidolgozására. Ez alatt nem feltétlenül új gyógyszerek szintézisére, tesztelésére és a klinikumba történő bevezetésére kell gondolnunk, hanem érdemes figyelembe venni a már hosszú évek óta ismert, ám más terápiás indikációban használt vegyületek antifungális hatását. További alternatív megoldásként szolgálhatnak, az utóbbi években a figyelem középpontjába kerülő kombinációs terápiák is, amelyek a későbbiekben szintén mentőövet jelenthetnek az invazív gombás fertőzések kezelése során, akár a biofilmek esetében is (Rossato és mtsai. 2021). Korábbi kombinációs vizsgálatok alapján a szinergista interakció a nukleozid-analóg nikkomycin Z (NIKZ) és egyes tradicionális antifungális szerek között jól ismert, azonban ezek a tanulmányok kizárólag a planktonikus formákra összpontosítottak (Sandovsky-Losica és mtsai. 2008; Szilágyi és mtsai. 2012; Cheung és Hui 2017).

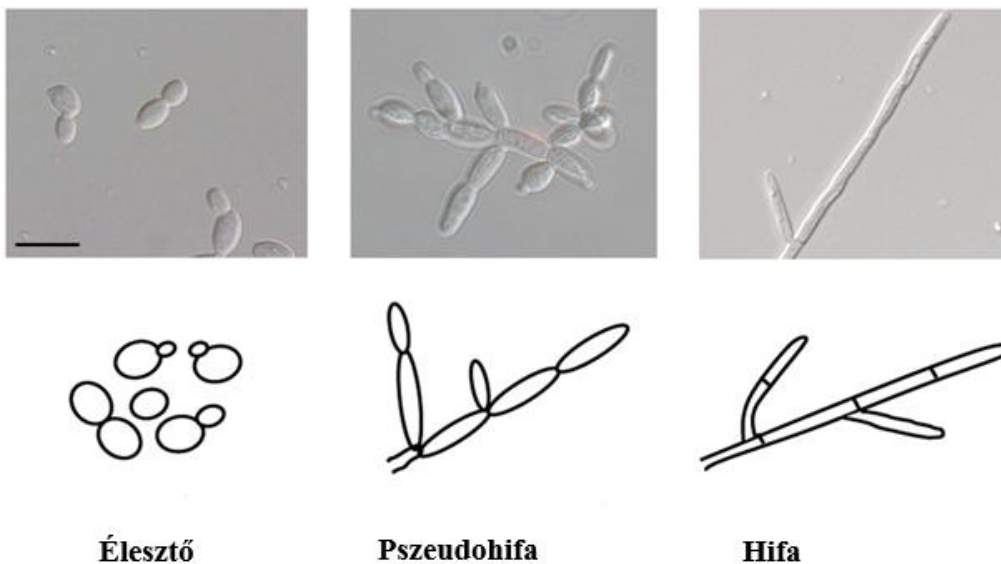
A jövő egyik legígéretesebb biofilm ellenes kezelési eljárásai lehetnek a quorum-sensing (QS) megzavarásán alapuló terápiás stratégiák, illetve a *Candida* fajok által szekretált QS molekulák tradicionális antifungális szerekkel történő kombinációja. A QS, az individuális mikroba sejtek közötti kommunikáció egy speciális formája, amelynek köszönhetően számos élettani folyamat populáció szinten szinkronizálódhat fokozva a mikroba közösség túlélési esélyeit. A *Candida* fajok által szekretált két legjelentősebb QS molekula a farnesol (FAR), illetve a tyrosol (TYR), melyek meghatározó szerepet játszanak a *Candida* speciestek morfogenezisének, virulenciájának, valamint biofilm képződésének szabályozásában (Kovács és Majoros 2020). Korábbi kísérletek eredményei alapján, egyes QS molekulák szuprafiziológias koncentrációban (fiziológiástól magasabb koncentráció) gátolhatják a *Candida* biofilmek képződését, továbbá a FAR és a TYR tradicionális antimikotikumokkal (AMB, azolok, echinocandinok) történő kombinációja során szinergista interakció tapasztalható egyes *Candida* fajok planktonikus és szesszilis alakjai ellen (Jabra-Rizk és mtsai. 2006; Katragkou és mtsai. 2015; Cordeiro és mtsai. 2015, Wongsuk és mtsai. 2016; Fernández-Rivero és mtsai. 2017; Kovács és Majoros 2020).

A fent vázolt kombinációs terápiák előnyt jelenthetnek az adott antifungális szerekre csökkent érzékenységet mutató *Candida* speciestek által okozott fertőzések esetében is, ezért reményeink szerint az eredményeink hozzájárulhatnak olyan új, alternatív kezelési stratégiák kifejlesztéséhez, amelyek segítségével hatékonyabban vehetjük fel a küzdelmet a biofilm-asszociált fertőzésekkel szemben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A *Candida* fajok morfológiai sajátosságai

A *Candida* fajok három fő vegetatív morfológiai alakban lehetnek jelen. (Thompson és mtsai. 2011). Az egysejtű szerveződést mutató sarjadzó forma ovális vagy kerek megjelenésű, általában 2-10 μm átmérőjű, amely tengelyirányú, illetve bipoláris osztódásra egyaránt képes (Sudbery és mtsai. 2004; Thompson és mtsai. 2011). A pszeudohifákat és a hifákat rendszerint „fonalas” morfológiai alakoknak nevezzük. A pszeudohifák esetében az osztódást követően a sejtek egy ellipszis formát létrehozva együtt maradnak ugyan, azonban aktív citoplazmikus anyagáramlás nem figyelhető meg közöttük (Sudbery és mtsai. 2004). Ezzel szemben a 15-30 μm nagyságú hifa alak többnyire párhuzamos oldalú, egyenletes szélességű, sejtjei között valódi szeptumok találhatóak, melyek pórusain keresztül aktív anyagáramlás történik (Sudbery és mtsai. 2004; Thompson és mtsai. 2011). Fontos szem előtt tartani, hogy bár a pszeudohifák fizikailag inkább a hifákhoz hasonlóak, valójában azonban sokkal több közös tulajdonságuk van a sarjadzó formával, így inkább hosszúkás, egymáshoz kapcsolódó élesztősejtekként jellemezhetjük őket (Thompson és mtsai. 2011) (1. ábra).



1. ábra: A *Candida* fajok morfológiai alakjai. Méret: 10 μm
(Thompson és mtsai. 2011)

A *C. albicans* és a *C. dubliniensis* esetében korábban megfigyelték, hogy a kedvezőtlen környezeti körülmények (pl. tápanyaghiány) hatására chlamydospórákat képeznek. Ez a nyugvó, a hifák végein elhelyezkedő vastag falú képlet körülbelül háromszor-négyszer nagyobb méretű, mint egy élesztő sejt és leginkább laboratóriumi körülmények között figyelhető meg (Kruppa 2009; Thompson és mtsai. 2011).

Bizonyos *Candida* fajok mindhárom fő morfológiai formát képesek létrehozni (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*), míg a *C. parapsilosis*, a *C. guilliermondii*, és a *C. lusitanae* esetében csupán az élesztő és a pseudohifa forma figyelhető meg (Thompson és mtsai. 2011). Ezzel szemben például a *C. glabrata* és a *C. auris* kizárólag sarjadzó alakban van jelen a szöveti környezetben (Rodrigues és mtsai. 2014; Lone és Ahmad 2019).

A gombák sejtfala kiemelkedő jelentőséggel bír a mikroorganizmusok növekedése, túlélése és morfogenezise szempontjából. Egy vastag védőpajzsot biztosít a különböző környezeti hatásokkal szemben, mint például a hőmérséklet, vagy az ozmotikus stressz, de kulcsfontosságú szerepe van az adhézió folyamatában is (Free 2013; Höfken 2013). A *Candida* fajok sejtfala az alábbi három fő komponensből épül fel: poliszacharidok, fehérjék és lipidek (Chaffin és mtsai. 1998). A poliszacharidok fajtól függően 80-90%-ban vannak jelen, a fehérjék aránya 6-25% (jelentős hányaduk glikoprotein), míg a sejtfal 1-7%-át lipidek alkotják (Chaffin és mtsai. 1998).

A *C. albicans* sejtfala két fő rétegből épül fel (Gow és mtsai. 2011). A sejtek alakját meghatározó belső sejtfal réteg elsősorban szénhidrátokból [β -1,3-glükán (47-60%), kitin (5%)] áll (Höfken 2013; Gow és mtsai. 2011). A kitin egyik legfontosabb feladata a sejtek integritásának fenntartása, így a kitin szintézis zavara esetén megszűnik a sejtfal rendezett struktúrája, a sejtek alakja megváltozik, amely ozmotikus instabilitáshoz vezet (Kim és mtsai 2002). A sejtfal külső rétege lazább felépítésű, túlnyomórészt O- és N-kapcsolt mannán alkotja (40%). A két réteg a β -1,6-glükán-glikofoszfatidilinozitol segítségével kapcsolódik egymáshoz (Chaffin és mtsai. 1998; Gow és mtsai. 2011). A különböző morfológiai alakok esetében mutatkozhat némi eltérés a sejtfal komponensek arányát illetően. Ezek alapján a hifák sejtfala megközelítőleg háromszor-öttször nagyobb mennyiségű kitint tartalmaz, mint az élesztő sejté, azonban bizonyos körülmények hatására (pl.: echinocandin expozíció) a sarjadzó sejtek kitin tartalma három-négyszeresére növelhető a kompenzatórikus kitinszintézis eredményeképpen. Ezzel szemben a sejtek glükántartalma az élesztő és a fonalas formában is hasonló arányt mutat (Gow és mtsai. 2011).

A *C. albicans* sejtfała olyan fehérje és szénhidrát komponenseket tartalmaz, melyek a humán sejtfałban nincsenek jelen, így ideális immunológiai célpontok a „saját” struktúra „idegentől” történő megkülönböztetése során, ebből adódóan az immunválaszt kiváltó patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) jelentős része a sejtfałban foglal helyet (Gow és mtsai. 2011). Mindemellett a sejtfał további komponensei potenciális célpontként szolgálnak a NIKZ, valamint az antifungális szerek között mérőöldkőnek számító echinocandinok (β -1,3-glükán szintáz gátlószerek) számára (Kim és mtsai. 2002; Lewis 2011; Patil és Majumdar 2017).

2.2. A *Candida* fajok legfontosabb virulencia faktorai

A patogén *Candida* fajok virulencia faktorai feltehetőleg a „kommenzalista élet” eredményeképpen alakultak ki, megkönnyítve ezzel az adott species túlélését például a gasztrointesztinális traktus szélsőséges környezetében. Szerepük van továbbá a kolonizációban, az adhézióban, a biofilm képződésben, a szöveti invázióban, valamint az immunválasz elkerülésében (Kruppa 2009; Thompson és mtsai. 2011; Silva és mtsai. 2012; Höfs és mtsai. 2016).

A *C. albicans* egyik legjelentősebb virulencia faktora, a környezeti hatásokra bekövetkező élesztő-hifa átalakulás, melyet dimorfizmusnak nevezünk. A hifák létrejöttét számos hatás kiválthatja, ezek egy része a kedvezőtlen növekedési körülményekből fakad. A magas pH (>7), a tápanyag hiány, az 5% CO₂ tartalmú közeg, az emelkedett hőmérséklet (37°C), az alacsony sejtsűrűség (<10⁷ sejt/ml), valamint a humán szérum és az N-acetil-glükózamin jelenléte a hifák képződését indukálja, míg a savas pH, a magas sejt denzitás (>10⁷ sejt/ml), illetve a 25°C-os hőmérséklet az élesztő forma kialakulásának kedvez (Mayer és mtsai. 2013).

A *C. albicans* által szekretált FAR, TYR, illetve dodekanol, a mikroorganizmusok közötti „kommunikáció” révén koordinálja az élesztő-hifa átalakulást, melynek pontos háttere a 2.6. fejezetben kerül ismertetésre (Kruppa 2009). A sejtciklus gátlók, a különböző zsírsavak (pl. vajsav, linolsav, arachidonsav) egyes fehérjék (statherin, mucin) szintén befolyásolják a dimorfizmust (Shareck és Belhumeur 2011; Polke és mtsai. 2015). Ezen molekulák egy részét maguk a *Candida* fajok állítják elő, míg másokat a gazdaszervezet mikrobiomjának egyéb tagjai szekretálják. Ahhoz, hogy a *C. albicans* által kiváltott infekció „sikeres” legyen, az alábbi három lépésnek maradéktalanul teljesülnie kell: adhézió, invázió, károsítás (Polke és mtsai. 2015).

A *C. albicans* gazdasejtekhez és az abiotikus felszínhez történő adhéziója a kommenzalizmus és a patogenitás szempontjából is kiemelkedő jelentőséggel bír, hiszen a kolonizációhoz és a gazdaszervezetben való túléléshez egyaránt nélkülözhetetlen folyamatról beszélünk (Polke és mtsai. 2015). Míg a kezdeti sejt-sejt kapcsolatokat leginkább a passzív van der Waals-erők és a hidrofób kölcsönhatások közvetítik, addig az adhézióhoz az úgynevezett *Candida* adhezinek felszíni receptorokkal történő interakciója szükséges (Chaffin 2008; Moyes és mtsai. 2015). *In vivo* körülmények között az adhézió kezdeti fázisa feltehetőleg a sarjadzó forma és a hámsejtek között zajlik, míg a hifaképződés pedig a gazdasejt felszínével való első érintkezés után következik be. A hifák létrejöttét követően a további adhéziós folyamatokban jelentős szerepe van a hifa sejtek felszínén expresszált adhezineknek (Moyes és mtsai. 2015).

A legismertebb adhezin csoport az ALS fehérje család (agglutinin-like sequence), amelynek tagjai glikozilfoszfatidilinozitol-kapcsolt sejt felszíni glikoproteinek (Mayer és mtsai. 2013). Nyolc képviselője (ALS1-7 és ALS9) közül az ALS1-4 gének által kódolt fehérjék a csíratömlőkben és a hifákban fejeződnek ki, míg az ALS5-7 és ALS9 proteinek elsődlegesen az élesztő sejtek felszínén találhatóak meg (Modrzewska és Kurnatowski 2015; Höfs és mtsai. 2016). Az adhézióban a legfontosabb szerepet a hifa asszociált ALS3 adhezin játssza, azonban további kulcsfontosságú fehérjék (Hwp1, Ece1 és Hyr1) is részt vehetnek a folyamatban (Mayer és mtsai. 2013).

Az adhéziót, illetve a hifaképződés indukcióját követően a *Candida* fajok által termelt hidrolitikus enzimek játszanak központi szerepet a patogén élesztők virulenciájában, amelyek megkönnyítik a gomba behatolását a gazdaszervezet sejtjeibe, valamint segítségükkel a gomba sejtek hatékonyabban képesek tápanyaghoz jutni. A *C. albicans* három legjelentősebb extracelluláris hidrolitikus enzime, a szekretált aszpartil-proteináz csoport (SAP), a foszfolipázok és a lipázok (Naglik és mtsai. 2003).

A SAP enzimek viszonylag széles szubsztrátspecifitással bírnak, és számos humán fehérje degradációjára képesek (pl. hemoglobin, albumin, keratin, fibronectin, kollagén, mucin, immunglobulinok), melynek eredményeképpen kiemelkedő szerepük van a szöveti invázióban. Jelenlegi ismereteink szerint a *C. albicans* tíz, meghatározott rendben expresszálandó SAP fehérjével (SAP1-SAP10) rendelkezik (Silva és mtsai. 2014). A SAP1-SAP3 gének termékei a nyálkahártya fertőzések során, míg a SAP4 – SAP6 gének által kódolt fehérjék a szisztémás infekciókban fejeződnek ki. A SAP9 és a SAP10 proteínázoknak az adhézióban betöltött szerepe mellett a sejtek integritásának fenntartása a feladata. Korábbi kutatási eredmények alapján a SAP1 – SAP3 gének az élesztő formában, míg a SAP4–SAP6 gének a fonalas alakban

expresszálódnak (Naglik és mtsai. 2003; Polke és mtsai. 2015). Továbbá vannak olyan proteinázok (SAP9, SAP10), melyek mindkét morfológiai alakban (élesztő, hifa) megtalálhatóak (Silva és mtsai. 2014). Jelenlegi ismereteink szerint a *C. parapsilosis* kettő, a *C. tropicalis* négy, a *C. dubliniensis* pedig nyolc SAP fehérjét kódoló génnel rendelkezik. Ezzel szemben a *C. krusei* és a *C. glabrata* nem expresszál SAP fehérjéket (Silva és mtsai. 2014).

A foszfolipázok a foszfolipideket zsírsavakká alakítják, így segítségükkel képesek a *Candida* speciesek károsítani a gazdasejtek membránját, elősegítve ezzel az adhéziót és a biofilmképződést (Silva és mtsai. 2012). Jelenleg négy foszfolipáz osztályt ismerünk (foszfolipáz A, B, C és D) (Mayer és mtsai. 2013). A foszfolipázok a *C. albicans*, a *C. tropicalis* és a *C. parapsilosis* kulcsfontosságú virulencia faktorai (Silva és mtsai. 2012).

A *C. albicans* hifái két különböző mechanizmust alkalmaznak a gazdasejtekbe történő inváziójukhoz: az indukált endocitózist, illetve az aktív behatolást. Az indukált endocitózis során, a speciális sejtfelszíni fehérjéinek (invazinok, ALS3, SSA1) segítségével a gombasejt kötődik a gazdasejtben található ligandjához (pl. E-kadherin a hámsejteken, N-kadherin az endotél sejteken). Az indukált endocitózis egy passzív folyamat, ugyanis a gazdasejtek még az életképtelen hifák felvételére is képesek (Mayer és mtsai. 2013; Polke és mtsai. 2015). Az indukált endocitózis során, az életképes hifák általi invázió nem okoz jelentős károsodást a hámsejtekkel való érintkezés első óráiban, mivel a gazdasejt membránja a kezdeti inváziót követően nem szakad fel, csupán körbeveszi a hifákat. Mikor a fonalas alakok teljesen behatolnak a gazdasejtbe, valamint elérik a szomszédos sejteket is, a sejtmembrán a fizikai erők hatására felszakad, az intracelluláris komponensek pedig kiáramlanak a gazdasejtből (Wächtler és mtsai. 2011; Wächtler és mtsai. 2012).

2.3. A *Candida* fajok klinikai jelentősége

A *Candida* nemzetségbe tartozó mintegy 200 faj közül, jelenlegi ismereteink szerint mindössze 20 képes humán infekciót kiváltani, amelyek több mint 90%-áért az alábbi öt species tehető felelőssé: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* (Polke és mtsai. 2015; Gonzalez-Lara és Ostrosky-Zeichner 2020).

A nemzetség tagjai közül továbbra is a *C. albicans* a leggyakrabban izolálható *Candida* faj a klinikumban. Az utóbbi években világszerte egyre inkább előtérbe kerülnek az úgynevezett non-*albicans* fajok, amelynek háttérében feltehetőleg az azol készítmények fokozott használata/túlhasználata áll (Gonzalez-Lara és Ostrosky-Zeichner 2020). Továbbá nem

hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy 2009-ben egy addig a klinikai környezetben ismeretlen, új patogén élesztő került leírásra, a *C. auris*. A *Candida* speciesek között egyedülálló módon képes nozokomiális járványok kialakítására, mindemellett a törzsek jelentős része multirezisztensnek tekinthető, sőt mindhárom fő antimikotikum csoporttal szemben rezisztenciát mutató (pánrezisztens) izolátumok is ismertek (Jeffery-Smith és mtsai. 2017; Lone és Ahmad 2019).

A *Candida* fajok eloszlása földrajzi régióként változik, ráadásul elterjedésüket a helyi kórházi környezet is befolyásolhatja (Gonzalez-Lara és Ostrosky-Zeichner 2020). Az ARTEMIS DISK program 41 ország, 142 vizsgálati helyének részvételével tanulmányozta a *Candida* speciesek előfordulását 1997 és 2007 között. Eredményeik alapján, a *C. albicans* alkotta az európai, az afrikai (közel-keleti), valamint az ázsiai/csendes-óceáni térség *Candida* izolátumainak 64-67%-át, míg Latin-Amerikában (52%) és Észak-Amerikában (49%) kevésbé volt hangsúlyos. Az Amerikai Egyesült Államokban és Európa északnyugati részén, a *C. albicans* után a második leggyakrabban izolálható *Candida* species, a *C. glabrata*. A *C. tropicalis* az előfordulását tekintve szintén Latin-Amerikában (13,2%), illetve az ázsiai/csendes-óceáni térségben (11,7%) kiemelkedő jelentőségű. Bár a *C. parapsilosis* Európában ritkábban okoz invazív candidiasist, ezzel szemben Latin-Amerikában (10,3%) és a mediterránumban (13,6%) gyakran izolálható *Candida* faj (Gonzalez-Lara és Ostrosky-Zeichner 2020). A *C. tropicalis* leginkább a neutropéniában, illetve a daganatos megbetegedésben szenvedő páciensek körében okoz infekciót, míg a *C. krusei* által kiváltott fertőzések rendszerint a fluconazole (FLU) profilaxisban részesült, hematopoiitikus őssejt-transzplantáción átesett betegeknél fordulnak elő nagyobb számmal (Yapar 2014; Pappas és mtsai. 2018). A *C. parapsilosis* főleg az újszülöttekre jelent veszélyt, továbbá gyakran kapcsolatba hozható a különböző katéter eredetű infekciókkal, amely feltehetőleg a bőr normál mikrobiom tagjaként betöltött szerepének köszönhető (Yapar 2014; Polke és mtsai. 2015). A *C. glabrata* a transzplantált betegek, valamint a 60 év feletti korosztály körében elterjedt (Pappas és mtsai. 2018).

Az esetek döntő többségében az ép immunrendszerű egyéneknél a *Candida* fajok nem okoznak különösebb problémát. Azonban a gazdaszervezet normál flóráját (pl. széles-spektrumú antibiotikum terápia) vagy az immunrendszert érintő változások, valamint a lokális környezeti hatások hirtelen megváltozása (pl. pH, tápanyagtartalom) felboríthatja a *Candida* sejtek, valamint a normál flórához tartozó egyéb baktériumok egyensúlyát. A gombasejtek felszaporodva, a szuperficiális nyálkahártya infekcióktól (vulvovaginalis candidiasis, oropharyngealis candidiasis) egészen a súlyos, életet veszélyeztető invazív megbetegedésekig okozhatnak fertőzéseket (Yapar 2014; Höfs és mtsai. 2016). Invazív candidiasisról akkor

beszélünk, ha a mikroorganizmus bekerül a véráramba (candidémia), illetve az egész szervezetben való elterjedése következtében úgynevezett „mély” infekciót hoz létre [pl. intraabdominális tályog, endophthalmitis (szem belső rétegeinek gyulladása), peritonitis (hashártyagyulladás), osteomyelitis (csontgyulladás), endocarditis (szívbelhártya-gyulladás), meningitis (agyhártyagyulladás)]. A súlyos, szisztémás *Candida* fertőzések elsősorban az immunszuppresszált betegeket érintik, így nem meglepő, hogy az invazív candidiasis tízszer nagyobb valószínűséggel fordul elő az intenzív osztályokon, mint egyéb klinikai részlegeken (Yapar 2014; Gonzalez-Lara és Ostrosky-Zeichner 2020). Hajlamosító tényezői az elhúzódo kórházi ápolás, a már említett centrális vénás katéterek alkalmazása, a sebészi beavatkozások, a neutropeniás állapot, a különböző daganatos megbetegedések, a HIV-fertőzés, valamint a hosszantartó széles spektrumú antibiotikum terápia (Yapar 2014).

Korábbi kutatási eredmények alapján, a diabetes mellitus, valamint az orális fogamzásgátló tabletták használata és a terhesség hatására megnövekedett ösztrogénszint, az élesztősejtek magasabb mértékű kolonizációjához vezet a hüvelyi nyálkahártyán. A vulvovaginalis candidiasis a reprodukív korú nők csaknem 75% -át érinti élete során legalább egyszer, míg a rekuráló vulvovaginalis candidiasisban szenvedők aránya 7-8%-ra tehető (Höfs és mtsai. 2016). Az oropharyngealis candidiasis legtöbbször a kemény és a lágy szájpad, a nyelv, a buccalis nyálkahártya, valamint a szájpadlás infekciójaként nyilvánul meg. Különösen gyakori HIV-fertőzöttek esetében, rendszerint ez az elváltozás hívja fel a figyelmet a háttérben megbúvó súlyos állapotra (Höfken 2013; Höfs és mtsai. 2016).

A legtöbb *Candida* fertőzés endogén eredetű, ezért a szisztémás infekció szempontjából az egyik fő kockázati tényezőt a gasztrointesztinális traktus nyálkahártyájának kolonizációja jelenti (Höfs és mtsai. 2016). Ennek következtében, egy sebészi beavatkozás során a véráram segítségével a legtöbb szervhez eljuthatnak a *Candida* sejtek, beleértve májat, a vesét, illetve a központi idegrendszert is (Höfken 2013). Az endogén forrás mellett exogén eredetből is okozhatnak szisztémás fertőzést, például centrális vénás katéter, vagy akár az ápoló személyzet közvetítésével (Höfs és mtsai. 2016; Friedman és Schwartz 2019).

2.4. A biofilmek klinikai jelentősége

A biofilm a különböző abiotikus és biotikus felszíneken létrejövő, poliszacharid mátrixba ágyazott mikroba közösség (Donlan 2002). Az elmúlt években végzett kutatások eredményei alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a sejtek planktonikus formában történő *in vivo* növekedése

egyáltalán nem törvénytörő. A becslések szerint a mikroorganizmusok 80%-a inkább a szesszilis struktúrát részesíti előnyben, ráadásul a humán mikrobiális infekciók jelentős része is ilyen szesszilis mikrobaközösségekhez kötött (Wall és mtsai. 2019). Az Amerikai Egyesült Államok Nemzeti Népegészségügyi Intézetének adatai alapján, a biofilm-asszociált fertőzések a nozokomiális infekciók 65% -áért tehetőek felelőssé (Cernáková és mtsai. 2019).

A mindennapi életben számos helyen találkozhatunk a különböző mikroorganizmusok által létrehozott biofilmekkel (Donlan 2002). A természetes vizek üledékeiben például a cianobaktériumok biofilmjei vannak jelen, a csatornarendszerekben leginkább alga biofilmek figyelhetők meg, a *Rhizobium* fajok által létrehozott biofilmek a növényi szöveteket kolonizálják, míg a *Candida* fajok az emlősök nyálkahártya felszínein (orális, urogenitális, gasztrointesztinális) képesek biofilmet létrehozni (Nobile és Johnson 2015).

A klinikai körülmények között rutinszerűen használt orvostechnikai eszközök, például a centrális vénás - vagy urogenitális katéterek, a mesterséges szívbillentyűk, a műfogsor, a pacemaker, a kontaktlencse, a különböző ízületi protézisek, a tracheális kanülök és a mellimplantátumok kiváló abiotikus felszín biztosítanak a mikroorganizmusok primer adhéziójához, elősegítve ezzel a biofilm képződését (Cernáková és mtsai. 2019; Cavalheiro és Teixeira 2018; Wall és mtsai. 2019).

Az orális és a nyelőcső nyálkahártyához kapcsolódó biofilmek nagyon fontos szerepet játszanak a *Candida* fajok által okozott szájüregi megbetegedésekben. Az egyik leggyakoribb fertőzés a szájnyálkahártya gyulladása, melynek kialakulásában hajlamosító tényezőnek számít a műfogsor jelenléte. Az akril felületen képződött biofilm polimikrobiális, a *Candida* fajokhoz előszeretettel csatlakoznak az orális flóra legismertebb tagjai, a *Streptococcusok* (Shirtliff és mtsai. 2009/a). Továbbá a gégeeltávolításon átesett páciensek szilikon hangprotéziseinek felszínén gyakran megtelepedhetnek a *Candida* fajok, a kialakuló biofilm pedig rendszerint az eszköz meghibásodását okozhatja (Douglas 2003).

A candidémia kialakulásának szempontjából a legnagyobb rizikó tényező a centrális vénás katéter alkalmazása, ugyanis ez az eszköz kolonizálódik a leggyakrabban a behelyezés során mikrobák által (Bhatt és mtsai. 2015). Az esetek döntő többségében nem maga a katéter a szennyezett, hanem a beteg bőréről, vagy az ápoló személyzet kezéről származnak a későbbi infekciót okozó mikroorganizmusok (Vrioni és Matsiota-Bernard 2001).

2.5. A *Candida albicans* biofilmek képződése és szabályozása

A *C. albicans* biofilmek képződése egy négy szakaszból álló, összetett szabályozást igénylő folyamat. Szabályozásában kilenc fő transzkripciós faktor vesz részt (Bcr1, Tec1, Efg1, Ndt80, Rob1, Brg1, Flo8, Gal4 és Rfx2), amelyek közvetve vagy közvetlenül mintegy 1000 célgén expresszióját irányítják (Nobile és Johnson 2015). A célgének szerepet játszanak az adhézióban, a hifák képződésében, a mátrixtermelésben, valamint az antifungális szerekkel szembeni rezisztenciában (Wall és mtsai. 2019).

Az első lépés a kerek élesztősejtek biotikus (pl. nyálkahártya hámrétege), vagy abiotikus (pl. különböző orvostechikai eszközök) felszínéhez történő adhéziója. A *Candida* sejtek különböző felszínhez történő tapadásához, így tulajdonképpen a biofilm kialakulásához a galaktóz mellett a kétértékű kationok (Ca^{2+} , Mg^{2+}) jelenléte is szükséges. Az adhéziót befolyásolhatja az adott felszín anyaga, hidrofóbicitása, érdessége, illetve kémiai tulajdonságai. A beültetett orvostechikai eszközök az esetek döntő többségében polivinil-kloridból (PVC) poliuretánból, teflonból, szilikonból, illetve latexből készülnek (Cuéllar-Cruz és mtsai. 2012). A biofilm képzése során a *C. albicans* elsősorban az akril, a szilikonelasztomer, a polisztirol, valamint a PVC felületeket részesíti előnyben, a poliuretán és a 100% szilikon kevésbé alkalmas számára (Douglas 2003).

Az iniciáció tulajdonképpen a sejtproliferáció szakasza, itt történik ugyanis a gomba sejtek osztódása, továbbá a *C. albicans* esetében ebben a fázisban megy végbe az élesztő-hifa átalakulás is. A hifák amellet, hogy segítik a szesszilis struktúra stabilitásának megőrzését, „állványként” szolgálnak az élesztősejtek és további fonalas elemek számára, így jelentőségük megkérdőjelezhetetlen a biofilm fejlődése során (Nobile és Johnson 2015). Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével megállapították, hogy a vad típusú *C. albicans* biofilmek két különálló rétegből állnak. Egy vékony, élesztők alkotta bazális részből, valamint egy vastagabb, fonalas régióból. A hifaképzésre képtelen *C. albicans* mutáns törzs biofilmjét csupán a bazális élesztő réteg alkotta, míg a sarjadzó formával nem rendelkező izolátum esetében egy vastagabb hifából álló biofilm volt jelen. A tény, hogy mindkét mutáns képes volt biofilmet előállítani azt mutatja, hogy a dimorfizmus nem előfeltétele a biofilm képződésének, de szükséges lehet egy térben szervezett struktúra kialakításához (Douglas 2003; Nobile és Johnson 2015) (2. ábra).

Az érési periódus során a szesszilis populáció tovább növekszik, valamint a biofilmet alkotó sejtek által szekretált komponensek segítségével kialakul az extracelluláris mátrix. A folyamat végeredménye egy extracelluláris mátrixba ágyazott többrétegű, háromdimenziós struktúra,

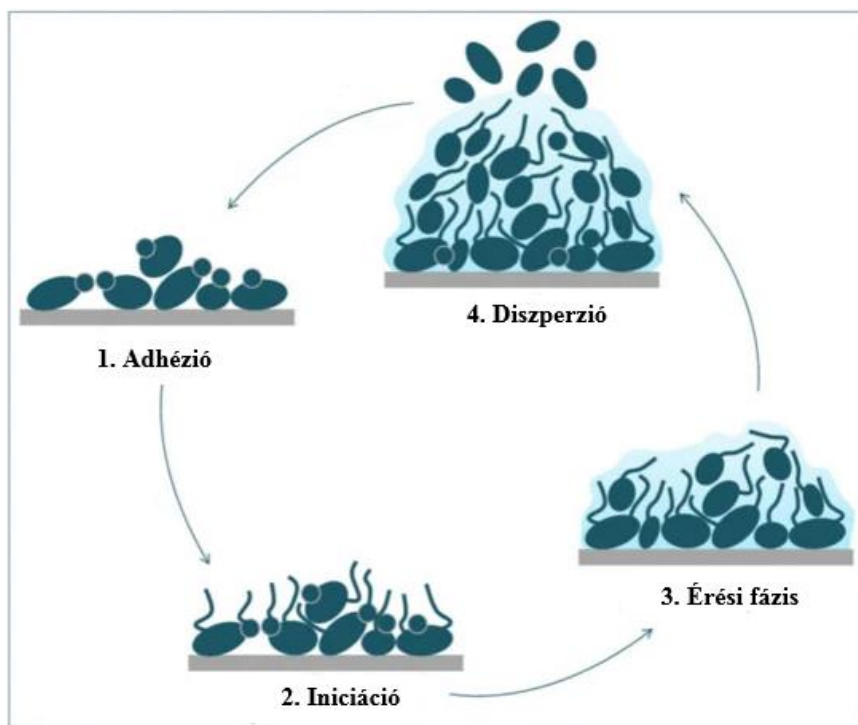
melyben akár mindhárom morfológiai alak (élesztő, hifa, pszeudohifa) is megtalálható. A *C. albicans* biofilmek extracelluláris mátrixa elsősorban glikoproteinekből (55%), szénhidrátokból (25%), lipidekből (15%) és extracelluláris DNS-ből (5%) épül fel. További fontos alkotóelemei a különböző poliszacharidok (glükóz, mannóz, ramnóz és N-acetil-glükózamin) (Nobile és Johnson 2015). Az extracelluláris mátrix egyik központi feladata, a biofilm különböző fizikai és kémiai hatásokkal szembeni (pl. a gazdaszervezet immunreakciói, antifungális szerek) védelme, valamint a biofilm háromdimenziós szerkezeti stabilitásának biztosítása. Habár az extracelluláris mátrixot részben a biofilmet alkotó *C. albicans* sejtek állítják elő és szekretálják, ezen felül környezeti aggregátumokat is tartalmazhat (pl. a lizált *C. albicans* sejtek szerkezeti komponenseit) (Gulati és Nobile 2016). Az extracelluláris mátrixban több, mint 500 fehérjét azonosítottak eddig, melyek többsége valamilyen enzim. A hidrolizáló enzimek jelenlétéből arra következtethetünk, hogy a mátrix feltehetőleg fontos szerepet játszik a biopolimerek lebontásában is. Egy hipotézis szerint a *C. albicans* biofilmek mátrixa egy extracelluláris, enzimatikusan aktív elem, ami képes tápanyagforrásként hasznosítani az általa lebontott molekulákat (Gulati és Nobile 2016). A *C. albicans* biofilmek mátrix termelését jelenlegi ismereteink szerint az Rlm1 és a Zap1 transzkripció faktorok szabályozzák. Míg az Rlm1 deléció a mátrix mennyiségének csökkenéséért, addig a Zap1 deléció a mátrixanyag felhalmozódásáért felelős (Nobile és Johnson 2015) (2. ábra).

A *C. albicans* biofilmképződésének utolsó szakasza, a szesszilis populációt alkotó élesztősejtek diszperziója a környezetbe. A biofilm életciklusának talán ez a legkevésbé ismert fázisa, ám kiemelkedő jelentőséggel bír, ugyanis a biofilmből diszpergált sejtek infekciót hozhatnak létre a szervezet egyéb helyein, elősegítve ezzel a fertőzés terjedését. Bár a „szétszóródott” sejtek morfológiailag nagyfokú hasonlóságot mutatnak a planktonikus élesztősejtekkel, ezek a kiszakadt élesztők fokozottabb adhéziónal rendelkezők, illetve nagyobb biofilmképzési hajlammal rendelkeznek (Gulati és Nobile 2016). A *C. albicans* esetében az alábbi három transzkripció faktor felelős a sejtek diszperziójának szabályozásáért: Nrg1, Pes1 és Ume6. Az Ume6 gén a hifák kialakulásában játszik kulcsfontosságú szerepet, így megnövekedett expressziója a biofilmből aktívan felszabaduló sejtek számának csökkenéséhez vezet. Az élesztő sejtek növekedését elősegítő gének (Pes1 és Nrg1) magasabb mértékű expressziója pedig a diszpergált sejtek számának növekedését vonja maga után (Nobile és Johnson 2015) (2. ábra).

Az Nrg1 valószínűleg a konzervált Set3 komplexen keresztül fejti ki hatását, ugyanis az Nrg1 és a Set3 deléció *C. albicans* mutánsok képtelenek élesztő sejteket létrehozni (Gulati és Nobile

2016). Továbbá a Hsp90 molekuláris chaperon és az Ywp1 sejtfal fehérje is befolyásolja a *C. albicans* sejtek diszperzióját. A Hsp90 kimerülése, valamint az Ywp1 deléciója jelentősen csökkenti a diszpergált sejtek számát, utóbbi esetben pedig fokozottabb adhézions aktivitás figyelhető meg a biofilmképződés során. A Hsp90 ezen felül az extracelluláris mátrix glükán szintjét és az antifungális szerekkel szembeni ellenállást is szabályozza (Nobile és Johnson 2015). Az élesztők által szekretált alkoholtermészetű molekulák közül a FAR a hifaképződés gátlásán keresztül elősegíti az élesztősejtek növekedését, pozitívan befolyásolva ezzel a sejtek diszperzióját (Hornby és mtsai. 2001).

A biofilmek antifungális szerekkel szembeni rezisztenciájában szerepet játszhatnak az úgynevezett perzisztáló sejtek, melyek mélyen a biofilm mátrixában helyezkednek el és a szesszilis populáció körülbelül 1%-át teszik ki (Mathé és Van Dijck 2013). Nyugvó nem szaporodó sejtek, keletkezésükről rendkívül kevés információval rendelkezünk, egyes kutatási eredmények alapján azonban a reaktív oxigén intermedierek által kiváltott stresszválasz szerepet játszhat a képződésükben. A gombaellenes szerekkel végzett kezelést követően a perzisztáló sejtek bizonyos mértékű toleranciát alakítanak ki az antimikotikumokkal szemben, így a populáció e tagjai képesek a későbbiekben újrakolonizálni a szervezetet (Lewis 2007; Polke és mtsai. 2015).



2. ábra: A *Candida albicans* biofilmképződésének fázisai (Talapko és mtsai. 2021)

A biofilmek a kereskedelmi forgalomban lévő antifungális szerekkel szemben 5-8-szor ellenállóbbak, mint a planktonikus forma, amelynek háttérében a biofilmképződés korai szakaszára jellemző fokozott metabolikus aktivitás áll (Cavalheiro és Teixeira 2018). Mindemellett a biofilm lehetővé teszi a sejtek számára az immunrendszerrel való „menekülést”, mivel a fagociták és a perifériás vérből származó mononukleáris sejtek nem képesek bekebelezni a biofilmhez asszociált sejteket, folyamatos gócpontot biztosítva ezzel a humán szervezetben az infekció során (Chandra és mtsai. 2007; Katragkou és mtsai. 2010).

A beültetett orvostechikai eszközön létrejövő *Candida* biofilmek elterjedése véráramfertőzéshez, valamint a szervek és szövetek invazív infekciójához vezethet. A fertőzések kezelése általában magas antimikotikum dózisok alkalmazásával, illetve a kolonizált orvosi eszköz eltávolításával történik. Ez bizonyos esetekben azonban igen költséges (pl. mesterséges szívbillentyűk, ízületi protézisek), a kritikus állapotú pácienseknél pedig szinte kivitelezhetetlen. További probléma, hogy a nagy dóziséjú gombaellenes szerek használata komplikációkat okozhat (pl: vese- és májkárosodás) (Nobile és Johnson 2015). A jelenlegi szakirodalmi adatok alapján a három kereskedelmi forgalomban kapható echinocandin mellett az AMB lipid formulációi mutatnak hatékonyságot a katéter-asszociált infekciók terápiája során (Larkin és mtsai. 2018). A biofilm aktív antifungális szerek limitált száma, valamint az antimikotikumokkal szemben rezisztens *Candida* törzsek egyre növekvő előfordulása rávilágít arra, hogy az eredményes kezeléshez égető szükség van új támadásponttal rendelkező molekulákra, illetve alternatív terápiás stratégiák kidolgozására (Mehmood és mtsai. 2019).

2.6. Quorum-sensing

A mikrobiális kommunikáció egyik fő mechanizmusa a populáció sűrűségétől függő inger-válasz rendszer, az úgynevezett QS (Cernáková és mtsai. 2019). A mikroorganizmusok az általuk szekretált, alacsony molekulatömegű QS molekulák folyamatos kiválasztásával és monitorozásával koordinálják a jelenséget (Albuquerque és Casadevall 2012). Bár a QS molekulák a központi anyagcsere szempontjából nem esszenciális elemek (hiányuk esetén is történik növekedés, illetve szaporodás), azonban igen jelentős biológiai aktivitással rendelkeznek, segítve ezzel a mikroorganizmusok adott helyen való túlélését, környezethez való alkalmazkodását (Rodrigues és Cernáková 2020). Koncentrációjuk arányos a populációt alkotó sejtek sűrűségével. Ha a sejtsűrűség elér egy kritikus küszöbértéket, a QS-hez

kapcsolódó célgénnek szinkronizált expressziója vagy repressziója figyelhető meg (Polke és mtsai. 2018; Kovács és Majoros 2020).

A QS a baktériumok körében egy közismert jelenség, melyet először az 1960-as években figyeltek meg a tengeri *Vibrio* fajok biolumineszcencia vizsgálata során. Ezt követően számos egyéb baktérium fajban leírták a QS virulencia faktor expresszióra, mozgásra, biofilm képződésre, sporulációra és antibiotikum termelésre kifejtett hatását (Albuquerque és Casadevall 2012). A QS az eukarióta mikroorganizmusok között a XXI. század elejéig ismeretlen fogalomnak számított, ám 2001-ben Hornby és munkatársai leírták az első gomba eredetű QS molekulát, a *C. albicans* morfogenezisének szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszó FAR-t, új tudományágat nyitva ezzel a kutatói világ számára (Hornby és mtsai 2001).

Napjainkig négy fő gomba eredetű QS molekulát (FAR, TYR, tryptofol, phenyletanol) sikerült azonosítani, amelyek befolyásolják a sejtek szaporodását, a csíratömlő és biofilm képződését, a morfogenezist, továbbá képesek az apoptózis indukálására, illetve hatást gyakorolnak a sejtek inváziójára is (Sebaa és mtsai. 2019). A QS molekulák immunmoduláns szerepüknek köszönhetően részt vesznek a T-sejtek differenciálódásának és a citokinek (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α) felszabadulásának szabályozásában (Wongsuk és mtsai. 2016). Korábbi kutatások eredményei alapján a FAR elősegíti a *Candida* speciesek által okozott infekciók során kevésbé hatékony Th₂ által közvetített immunválaszt, megnehezítve ezzel a gazdaszervezet számára a fertőzés leküzdését (Kruppa 2009). A patogén mikroorganizmusok elsősorban a virulencia génjeik expresszióját szabályozzák a QS segítségével, amelyek összehangolt működése feltehetőleg túlélési előnyt jelent a mikroba számára (Albuquerque és Casadevall 2012; Rodrigues és Cernáková 2020). Kétségtelenül a FAR a legismertebb gomba eredetű QS molekula, amely fiziológiás körülmények között gátolja az élesztő-hifa átalakulást, megakadályozva a szesszilis populáció túlnövekedését (Polke és mtsai. 2018). A phenyletanol és a tryptofol, a jelenlegi szakirodalmi adatok alapján a *Saccharomyces cerevisiae* morfogenezis szabályozásában tölt be jelentős szerepet (Padder és mtsai. 2018).

A biofilm az esetek döntő többségében polimikrobiális közösség, ahol a különböző mikróbák egymásra is hatást gyakorolnak. Az alábbi példák kiváló bizonyítékai annak, hogy a különféle mikroorganizmusok által kiválasztott QS molekulák nem csak a fajon belüli, hanem a fajok közötti „kommunikációban” is szerepet játszanak (Desai és mtsai. 2014). A *C. albicans* és a *Pseudomonas aeruginosa* gyakran fordul elő egyidejűleg égései sebekben, katéter-asszociált fertőzések következtében kialakuló biofilmekben, vagy cisztás fibrózisban szenvedő betegek alsó légúti mintájában (De Sordi és Mühlshlegel 2009). A *P. aeruginosa*, a *C. albicans*

jelenlétében is képes biofilmet létrehozni, azonban bizonyos mértékig gátolja a gomba adhézióját, valamint biofilm képződését (Polke és mtsai 2015). A *P. aeruginosa* QS molekulája, a 3-oxo-C12-homoszerin-lakton szintén befolyásolja a patogén élesztő morfogenezisét. Többek között megakadályozza a hifák fejlődését, a sarjadzó alak viszont „sértetlen” marad. A jelenség hátterében az állhat, hogy a fonalas forma érzékenyebb a vegyületre, mint az élesztő. Másrészt viszont a 3-oxo-C12-homoszerin-lakton szerkezete nagyon hasonló a FAR felépítéséhez, ezáltal a bakteriális molekula tulajdonképpen „becsapja” a *C. albicans*-t a kötődés során (Kruppa 2009). A *C. albicans* által szekretált FAR blokkolja a *P. aeruginosa* virulencia faktorainak expresszióját (hemolitikus foszfolipáz C, fenazinok). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a két mikroorganizmus közötti kölcsönhatás általában antagonista természetű, azonban érdekes módon a *P. aeruginosa* bizonyos körülmények között fokozhatja a *C. albicans* virulenciáját. A súlyos égési sérülésekkel küzdő betegek esetében a *P. aeruginosa* pszeudolizinjából származó LasB virulencia faktor feltehetőleg olyan aminosav szignált generál, mely növeli a *C. albicans* biofilm képződését (Roux és mtsai. 2009; Mallick és Bennett 2013).

A *C. albicans* és a *Staphylococcus aureus* gyakran okoznak véráramfertőzést, akár egyidejűleg is jelen lehetnek az infekció során. Korábbi *in vivo* eredmények alapján, a két mikroorganizmussal egyszerre történő fertőződés során az egerek 100%-os mortalitását tapasztalták, míg külön-külön a két mikroba nem bizonyult letálisnak (Nash és mtsai. 2014). A *C. albicans* hifái által okozott szövetkárosodás eredményeképpen, a baktériumok könnyebben behatoltak az adott szervekbe. A *S. aureus* képes hatékonyan tapadni a gombafonalakhoz, mellyel elősegíti a polimikrobiális biofilm kialakulását (Polke és mtsai. 2015). A két mikroorganizmus közötti kölcsönhatás azonban nem minden esetben ennyire „felhőtlen”. A *C. albicans* ugyanis gátolja a *S. aureus* biofilmek képződését, a FAR pedig befolyásolja a baktérium antibiotikumokkal szembeni érzékenységet (Shirliff és mtsai. 2009/a).

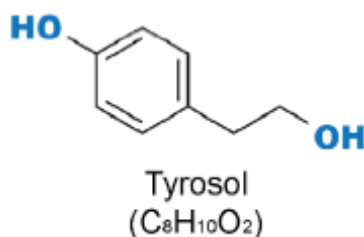
A *Candida* nemzetség tagjai közül kétségtelenül a *C. albicans* a leginkább tanulmányozott species, így a QS-el kapcsolatos kutatási eredmények döntő többsége is a *C. albicans* vizsgálata során született, amelyek non-*albicans* fajokra történő extrapolálása nem minden esetben lehetséges. A szakirodalmi adatok azt mutatják, hogy szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazva a FAR, az oxidatív stressz generálásának következtében figyelemre méltó antifungális és biofilm ellenes aktivitással rendelkezik (Jakab és mtsai. 2019). Továbbá *in vitro* és *in vivo* kutatási eredmények alapján a tradicionális antimikotikumokkal kombinálva jelentős

adjuváns potenciállal is bír (Shirtliff és mtsai. 2009/b; Nagy és mtsai. 2020; Kovács és Majoros 2020).

Az ismertett adatok ellenére a QS kutatások még mindig „gyerekcipőben” járnak. Nincs információnk jelenleg például a QS receptorokról, vagy specifikus transzporterekről. Nagyon keveset tudunk bizonyos QS molekulák pontos hatásmechanizmusáról, illetve az adott species morfogenezisében vagy szabályozásában betöltött szerepéről.

2.6.1. Tyrosol

A TYR [2- (4-hydroxyphenyl) –etanol] a *C. albicans* egyik legjelentősebb QS molekulája. A tirozin egy származéka, amely például magas koncentrációban van jelen az olívaolajban is, hozzájárulva ezzel annak jellegzetes ízéhez és antioxidáns jellemzőihez (de la Puerta és mtsai. 2001; Alem és mtsai. 2006; Albuquerque és mtsai. 2012) (3. ábra).

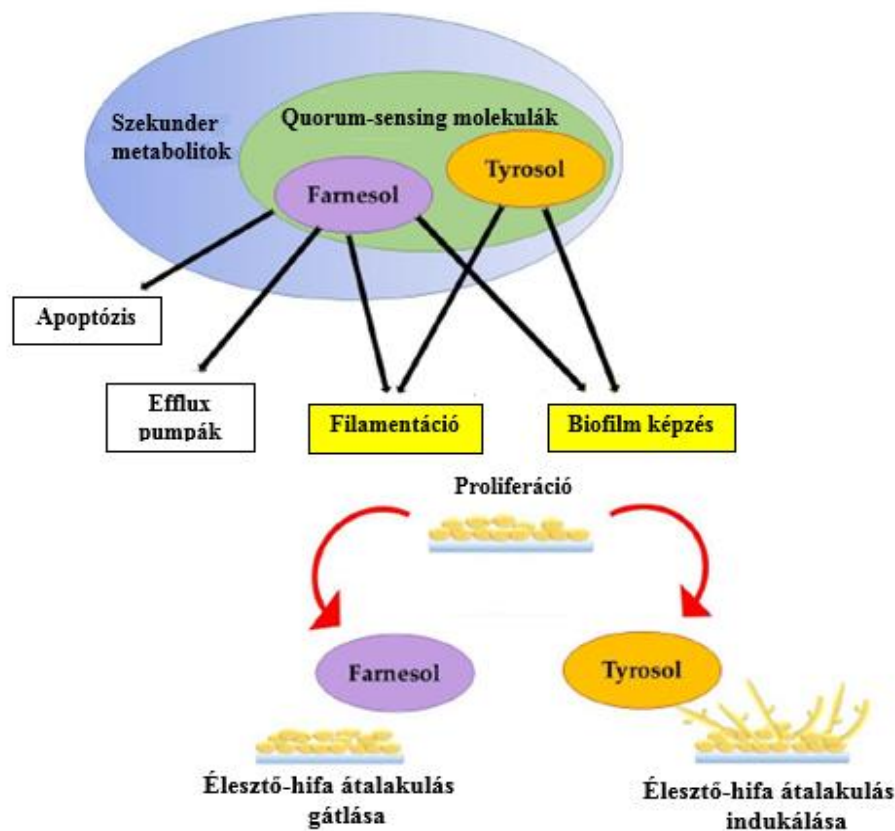


3. ábra: A tyrosol szerkezeti képlete (Rodrigues és Cernáková 2020)

Teljesen ellentétes élettani hatással bír, mint a FAR. Fiziológias körülmények között serkenti az élesztő-hifa átalakulást a *C. albicans* biofilmképződése során, továbbá gyorsítja a csíratömlő kifejlődésének folyamatát. A *C. albicans* vizsgálatokor korábban már bebizonyosodott, hogy a TYR az exponenciális növekedési fázis alatt folyamatosan felszabadul a táptalajba, így képes csökkenteni a lag fázis időtartamát. A FAR kiválasztással szemben, a TYR szekréciójának mértéke anaerob körülmények között fokozottabb (Albuquerque és mtsai. 2012; Rodrigues és Cernáková 2020). A TYR koncentrációja egyenes arányosságot mutat a *C. albicans* biofilmek tömegével. Elsősorban a biofilmképződés korai- és középső szakaszában termelődik, stimulálva az élesztő-hifa átalakulást, elősegítve ezzel a szesszilis populáció létrejöttét (Albuquerque és mtsai. 2012; Rodrigues és Cernáková 2020) (4. ábra).

A *C. albicans* biofilmek legalább 50%-kal több TYR kiválasztására képesek, mint a planktonikus sejtek. Utóbbiak felülűszójában megközelítőleg 11 μM -os koncentrációt érhet el a TYR (Alem és mtsai. 2006). Mennyiségét elsősorban a növekedési körülmények határozzák meg, beleértve az oxigén szintet, az aromás aminosavak és az ammóniumsók jelenlétét, illetve a pH értéket. Termeléséért az ARO80 transzkripciós regulátor a felelős, melynek expressziója szintén pH függő (Rodrigues és Cernáková 2020).

A QS harmonikus működésének egyik alappillére, a különböző szekretált QS molekulák koncentrációja (Albuquerque és mtsai. 2012). Ha a biofilmeket 50 μM FAR-lal kezeljük, a TYR magasabb koncentrációja (0,1–1 mM) megszünteti a FAR filamentáció gátló hatását. Azonban a nagyobb koncentrációjú FAR-lal kezelt biofilmeknél, az exogén TYR alkalmazása többnyire élesztősejtekből felépülő szesszilis populációt eredményez, vagyis a TYR nem képes ellensúlyozni a magasabb FAR koncentrációt. Tehát megállapíthatjuk, hogy a TYR csak akkor idéz elő változást a biofilm fejlődése, illetve a morfológiai átalakulások során, ha a FAR egyáltalán nincs jelen, vagy ha a koncentrációja rendkívül alacsony. Fiziológias körülmények között a biofilmképződés korai és középső szakaszában a TYR koncentrációja és aktivitása a jelentősebb, míg az érett biofilmek esetében a FAR koncentráció meghaladja a szekretált TYR mennyiségét. Utóbbi kulcsfontosságú szerepet játszik az élesztő sejtek felszabadításában, a diszperzióban (Alem és mtsai. 2006; Albuquerque és mtsai. 2012).



4. ábra: Az exogén farnesol és tyrosol szerepe a biofilm képződés proliferációs szakaszában (Rodrigues és Cernáková 2020)

A különböző *Candida* speciesek nem egyenlő mértékben választják ki az adott QS molekulákat. Ami a TYR szekréciót illeti, a *C. albicans* és a *C. tropicalis* szignifikánsan több TYR (*C. albicans*: 21,01- 53,40 μM /1,6 - 5,3x10⁷ sejt/ml; *C. tropicalis*: 41,21- 48,63 μM /2,6 - 2,7x 10⁷ sejt/ml) expresszáására képes, mint a *C. parapsilosis* (1,59 - 3,04 μM /1,7 - 2,3x10⁷ sejt/ml) vagy a *C. glabrata* (1,3 - 3,26 μM /2,7 - 5,5x10⁷ sejt/ml). Ennek ismeretében akár összefüggés is feltételezhető az adott *Candida* fajok virulenciája és TYR termelése között (Alem és mtsai. 2006; Kovács és Majoros 2020).

A *C. albicans* génexpressziós mintázata alapján, a TYR expozíció hatást gyakorol a sejtciklus szabályozására, a DNS replikációra, valamint a kromoszóma szegregációra (Chen és mtsai.

2004). Továbbá bebizonyosodott, hogy a TYR befolyásolja a neutrofil granulociták oxidatív stresszre adott válaszát, gátolva így a fagocita sejtek működését. Jelenleg azonban még nem rendelkezünk információval arra vonatkozóan, hogy a fertőzés során egyáltalán termelődik-e TYR a humán gazdaszervezetben (Albuquerque és Casadevall 2012; Rigacci és Stefani 2016; Bigagli és mtsai. 2017) (4. ábra).

Érdekes módon a *C. albicans* CZF1 génjének működése a TYR expozíciót követően fokozódott. Ugyanakkor Jakab és munkatársai a vizsgálataik során nem tapasztalták a *C. parapsilosis* biofilmek magasabb biofilmképző képességét a TYR jelenlétében, holott a CZF1 gén a *C. parapsilosis* egyik kulcsfontosságú transzkripciós faktora a szeszilis populáció kialakulása során (Holland és mtsai. 2014; Jakab és mtsai. 2019). A *C. parapsilosis* esetében a TYR expozíció hatására az efflux pumpák megnövekedett expressziója, illetve emelkedett oxidatív stressz válasz látható, miközben a QS molekula gátolja a növekedést és a riboszóma biogenezist (Jakab és mtsai. 2019). A TYR mérsékelt, ám stabil antioxidáns aktivitással rendelkezik, a hidrogén-peroxiddal szemben mutatott antigenotoxikus hatása pedig csak magasabb koncentráció (140 μ M) alkalmazása során tapasztalható (Anter és mtsai. 2014). Westwater és munkatársai azonban nem figyelték meg az exogén TYR védő hatását a hidrogén-peroxiddal kezelt *C. albicans* sejtek esetében (Westwater és mtsai. 2005).

A TYR-lal kapcsolatos citotoxicitási vizsgálatok során az alábbi koncentrációknál figyeltek meg károsító hatást: >10 mM (humán íny fibroblast); 3 mM (humán íny hámsejt); 5 mM (humán nyálmirigy karcinóma sejtek); > 15 mM (vastagbél adenokarcinóma sejtvonal) (Babich és Visioli 2003; Jakab és mtsai. 2019). A 2.6. fejezetben leírtak alapján, a különböző mikroorganizmusok által szekretált QS molekulák a polimikrobiális biofilmet alkotó gombákra és baktériumokra egyaránt hatással vannak. Nem kivétel ez alól a TYR sem, mely antibakteriális aktivitását a bakteriális ATP-szintáz gátlásán keresztül fejti ki (Rodrigues és Cernáková 2020). A kedvezőnek mondható humán citotoxicitási profil, valamint a potenciális gombaellenes aktivitás alkalmassá teheti a TYR klinikai használatát egyes alternatív terápiákban.

A *Candida* fajok fiziológiájában betöltött jelentős szerepe mellett, a TYR szuprafiziológiás koncentrációban (1-50 mM), mind a planktonikus mind pedig a szeszilis sejtek ellen figyelemreméltó gombaellenes aktivitással rendelkezik (Jakab és mtsai. 2009). Több, tradicionális antimikotikummal (AMB, azolok) kombinálva, koncentráció függő módon szinergista kölcsönhatást mutat egyes *Candida* fajok ellen (Wongsuk és mtsai. 2016). AMB-vel történő egyidejű alkalmazása során, a TYR szignifikánsan csökkentette a *C. albicans* és a

C. tropicalis planktonikus és szesszilis sejtjeinek AMB iránti minimális gátló koncentráció (MIC) értékét, továbbá redukálta a két vizsgált *Candida* faj biofilmjének tömegét és metabolikus aktivitását (Cordeiro és mtsai. 2015; Wongsuk és mtsai. 2016). Korábbi kutatások eredményei alapján, 80 μ M TYR és 4 mg/l AMB kombinációja 90%-kal csökkentette a *C. tropicalis*, és a *C. krusei* biofilmek kiterjedését.

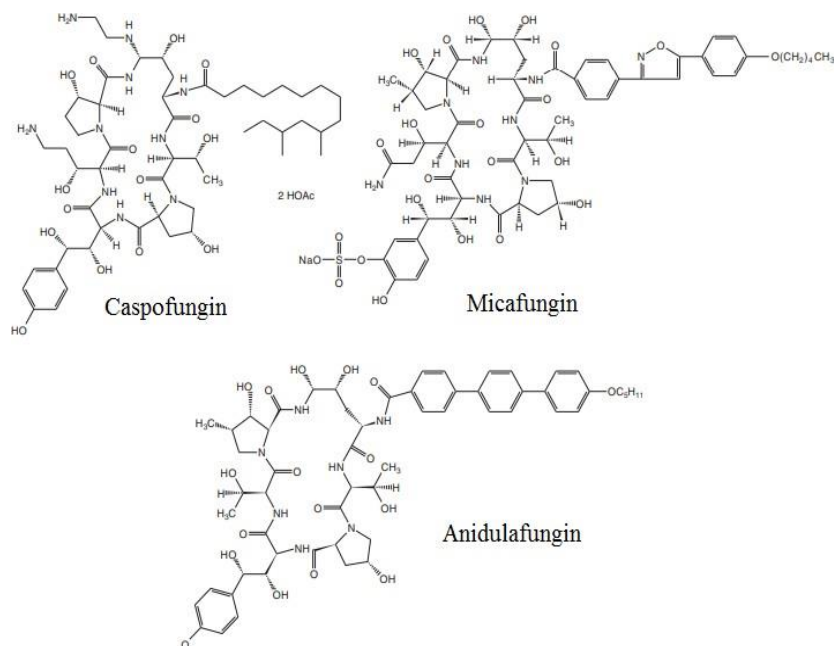
A közelmúltban a TYR anti-adhéziós hatása is bizonyosságot nyert, melynek során a QS molekula gátolta a *C. glabrata* és a *C. albicans* sejtek akril felülethez való tapadását. Ez a megállapítás a különböző TYR tartalmú készítmények kifejlesztése révén, nagyban hozzájárulhat a műfogsort viselők orális egészségének és életminőségének javításához, ugyanis a *Candida* sejtek akril felszínekhez történő adhéziójának megakadályozása a műfogsor okozta stomatitis megelőzésének egyik alternatívája (Monteiro és mtsai. 2015).

Az utóbbi évtizedekben, a *Candida* eredetű QS molekulákkal kapcsolatos alternatív kezelési stratégiák vizsgálata egy viszonylag intenzív kutatási területté vált. A TYR azonban továbbra is egy „rejtélyes” molekula, mert az antifungális aktivitásának pontos háttere továbbra is ismeretlen (Jakab és mtsai. 2019). Feltételezések szerint a TYR megzavarja a gomba sejtmembrán ergoszterol bioszintézisét, melynek eredményeképpen a gombasejt fokozottabb érzékenységet mutat a tradicionális antifungális szerekkel szemben (Cordeiro és mtsai. 2015). A TYR biofilmellenes aktivitására magyarázatként szolgálhat, hogy a szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazott exogén TYR hatására az intracelluláris TYR szint egyensúlya felborul, megakadályozva ezzel az újonnan képződött *Candida* sejtekben a hifák kialakulását (Monteiro és mtsai. 2015).

2.7. Echinocandinok

Az echinocandinok megjelenésével új fejezet nyílt az orvosi mikológia történetében, célpontjuk ugyanis a korábban használt antifungális szerektől eltérő módon a gombák sejtfa. Pontosabban a sejtfa egyik fő szénhidrát eleme, a β -1,3-D-glükán, melynek szintézisét a képződéséhez szükséges enzim (β -1,3-D-glükán-szintáz) blokkolásával képesek gátolni (Mroczynska és Brillowska-Dabrowska 2020). A komponens hiányában a sejtfa elveszti az integritását, az ozmotikus instabilitás hatására pedig bekövetkezik a sejt lízise (Ben-Ami 2018). A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható három echinocandin [casposungin (CAS), micafungin (MICA), anidulafungin (ANI)] mindegyike alkalmas az invazív candidiasis kezelésére (Ben-Ami 2018) (5. ábra). Nagy molekulatömegüknek köszönhetően az orális

biohasznosulásuk csekély mértékű, így kizárólag intravénás formában alkalmazhatóak. A szérum proteinekhez történő kötődésük jelentős (97-99%) (Patil és Majumdar 2017).



5. ábra: Az echinocandinok szerkezeti képlete (Chen és mtsai. 2011).

Az echinocandinok használata még viszonylag magas dózisok alkalmazása esetén is biztonságos, mivel a humán sejtek építőelemei között a β -1,3-D-glükán nem található meg (Ben-Ami 2018; Mroczynska és Brillowska-Dabrowska 2020). Mindezek ellenére azonban előfordulhatnak a használatuk során különböző mellékhatások. Az infúzió beadását követően esetleg bőrpír, csalánkiütés, vagy hipotenzió jelentkezhet, a hisztamin felszabadulás eredményeképpen. A kardiotoxicitás ritka és súlyos mellékhatás, amelyet az echinocandinok centrális vénás katéteren keresztül történő beadásakor figyeltek meg bizonyos esetekben (Ben-Ami 2018).

Az echinocandinok szöveti penetrációja bár eltérő mértékű, bizonyos anatómiai helyeken képtelenek terápiás koncentrációt elérni [pl. agy, szem (kivéve a MICA), cerebrospinális folyadék], a nagy molekulatömegüknek, valamint fehérje kötődésüknek köszönhetően (Patil és Majumdar 2017). A CAS és a MICA a májban metabolizálódik, míg az ANI a vérplazmában degradálódik (Ben-Ami 2018).

Az echinocandinok *in vitro* fungicid hatást mutatnak a *Candida* és *Saccharomyces* fajokkal szemben, beleértve az azol rezisztens törzseket is (Ben-Ami 2018). Az *Aspergillus* speciesek ellen azonban fungisztatikus aktivitásúak (Patil és Majumdar 2017). A *C. parapsilosis*, illetve a *C. guilliermondii* generikusan csökkent érzékenységgel bír az echinocandinok iránt (MIC: 0,5–8 mg/l), így az általuk okozott infekciók terápiája során az echinocandinok nem az elsőként választandó szerek közé tartoznak (Patil és Majumdar 2017). Az echinocandinokkal szembeni magasabb MIC értékek hátterében, mindkét species esetében az FKS1 génben történő mutáció áll, mely aminosav szubsztitúcióhoz vezet az FKS1 fehérje „hot-spot” régiójában. A *C. parapsilosis*-nál a 660. pozícióban egy prolin-alanin csere, míg a *C. guilliermondii* esetében a 642. helyen bekövetkező metionin-leucin szubsztitúció vezet a csökkent érzékenységhez (Perlin 2007; Garcia Efron és mtsai. 2008).

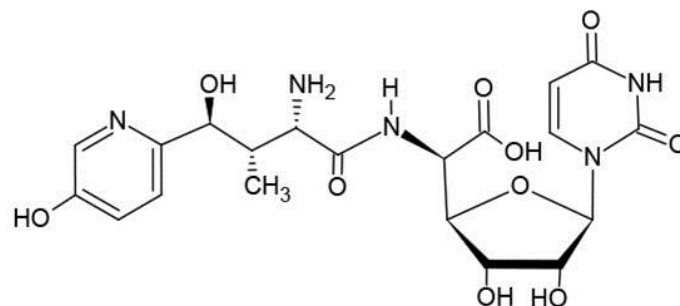
Invazív candidiasis során az alábbi protokoll szerint érdemes alkalmazni az echinocandinokat: CAS: 70 mg telítő dózis, majd 50 mg fenntartó dózis naponta; ANI: 200 mg telítő dózist követően napi 100 mg fenntartó dózis; MICA: napi 100 mg, nincs szükség telítő dózusra (Patil és Majumdar 2017). Az echinocandinok elsővonalbeli antifungális szerek az invazív candidiasis kezelése során, továbbá a biofilm ellenes aktivitásuknak köszönhetően a katéter-asszociált infekciók terápiájában is jelentős szerepük van (Patil és Majumdar).

Bár az echinocandin rezisztencia nem egy gyakori jelenség, mindenképpen figyelmet érdemel. Az Amerikai Egyesült Államokban és egyes nyugat-európai országokban egyre gyakrabban azonosítanak az echinocandikkal szemben nagyfokú ellenállást mutató *Candida* törzseket (Patil és Majumdar 2017). Az érintett speciesek (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. auris*) esetében a rezisztencia hátterében leggyakrabban az FKS1 és FKS2 génekben (a glükán-szintáz enzim katalitikus alegységének kifejeződéséért felelős gének) bekövetkező mutáció áll (Patil és Majumdar 2017; Pappas és mtsai 2018). További rezisztencia mechanizmus lehet az efflux pumpákat kódoló gének megnövekedett expressziója, valamint a fokozott kitintermelés (Chen és mtsai. 2011). Utóbbi magyarázata, hogy a csökkent β -D-glükán mennyisége számos stresszadaptációs utat indukál, ami megnövekedett kitin szintet eredményez a sejtfalban. Az emelkedett kitintartalom segíti a sejtfal stabilizálását, enyhítve ezzel az echinocandinok hatását. Bár ez az adaptív válasz nem vezet mutációkhoz az FKS génekben, az echinocandin expozícióhoz történő korai alkalmazkodás idővel olyan stabil ellenállási mechanizmusok kialakulását teheti lehetővé a túlélő sejtek számára, amely esetleg hosszú távon klinikai rezisztenciához vezethet (Kovács és mtsai. 2021).

Az echinocandinok koncentráció függő módon fejtik ki hatásukat, az esetükben tapasztalt posztantifungális hatás akár a 24 órát is elérheti (Chen és mtsai. 2011). Egyik legérdekesebb és talán legkevésbé ismert farmakodinámiás (gyógyszerhatástani) jellemzőjük az úgynevezett paradox növekedés. A *Candida* fajokra jellemző jelenség lényege, hogy a MIC érték feletti koncentrációkon a gomba sejtek ismételt növekedése látható. A folyamatban a kompenzatórikus kitinszintézisnek, mint stressz válasznak van elsősorban szerepe, melynek segítségével a gomba sejt képes megőrizni a sejtfala integritását, az emelkedett kitin szinttel egyidejűleg ugyanis a sejtfal β -1,3-D-glükán tartalma lecsökken. A paradox növekedés eddig kizárólag *in vitro* körülmények között volt megfigyelhető, hogy van-e bármilyen *in vivo* szerepe az egyelőre kérdéses (Patil és Majumdar 2017).

2.8. Nikkomycin Z

A NIKZ a *Streptomyces tendae* által szekretált másodlagos metabolit, amelyet először az 1970-es években írtak le, mint gombaellenes szert (Chaudhary és mtsai. 2013; Larwood 2020) (6. ábra). Az érdeklődés leginkább akkor fokozódott iránta, amikor bebizonyosodott, hogy aktivitást mutat az endémiás szisztémás mikózisokért felelős specíesekkel szemben is (*Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*) (Larwood 2020).



6. ábra: A nikkomycin Z szerkezeti képlete
(Larwood 2020)

A NIKZ támadáspontja a gomba sejtek kitin komponense. Mivel a humán sejtekből ez az összetevő hiányzik, így a NIKZ ígértes célpontnak tűnik az antifungális terápia során. Ebből adódóan a viszonylag magas, egyszeri NIKZ dózisok (250-2000 mg) alkalmazása is

biztonságos (Larwood 2020). A kitin a gombasejtfal egyik legjelentősebb építőeleme, melynek eloszlása jelentős eltérést mutat a különböző specíesek esetében (Larwood 2020). Az élesztők sejtfalában körülbelül 2%, míg a fonalas gombáknál akár a 67%-ot is elérheti a kitin aránya (Chaudhary és mtsai. 2013).

A NIKZ a kitin-szintáz szubsztrátjának (UDP-N-acetil-glükózamin) kompetitív analógjaként képes gátolni a kitinszintázist. A kitin hiányának következtében sérül a sejtfal szerkezete, instabillá válik, mely végül a sejt líziséhez vezethet (Kim és mtsai 2002). A kitin-szintáz egy glikozil-transzferáz típusú enzim, több izotípusa is ismert (a *C. albicans* esetében például négy típus van jelen a sejtfalban). Tulajdonképpen egy olyan transzglykolizációs folyamatot katalizál, melyben a cukor molekulák az UDP-N-acetil-glükózaminból az egyre növekvő kitinláncba épülnek, felszabadítva ezzel az uridin-difoszfátot (Chaudhary és mtsai. 2013).

Az egereken végzett farmakológiai vizsgálatok eredményei alapján, az intravénás formában beadott NIKZ a kezdeti 320 µg/ml szérumban koncentrációt követően gyorsan eliminálódott, 10-15 perces felezési időt produkálva. Az orális alkalmazás azonban lassú felszívódást eredményezett, lehetővé téve a NIKZ órákig tartó perzisztálását. Az *in vivo* kísérletek azt sugallják, hogy a napi kétszeri 250–500 mg-os adagolásnak köszönhetően optimális NIKZ koncentráció érhető el a szérumban (Rauseo és mtsai. 2020).

A NIKZ bár képes gátolni a *C. albicans* kitin-szintáz izoenzimeinek minden típusát, hatékonysága az élesztő sejtekben csekély mértékben jelenlévő kitinszint miatt korlátozott, ezért leginkább a különböző kombinációs terápíák vizsgálata során került előtérbe az utóbbi években. Szakirodalmi adatok alapján, a NIKZ itraconazole-lal (ITRA) és FLU-lal történő egyidejű alkalmazása szinergista kölcsönhatást eredményezett a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* sejtekkel szemben (Larwood 2020). Szilágyi és munkatársai a CAS aktivitásának fokozódását figyelték meg a NIKZ jelenlétében. Továbbá a CAS és a NIKZ kombinációja során szinergizmust tapasztáltak a *C. albicans*, a *C. tropicalis*, a *C. glabrata* és a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok esetében (Szilágyi és mtsai. 2012).

3. Célkitűzések

Vizsgálatainkban a CAS és a MICA *Candida* biofilmek elleni hatékonyságával kapcsolatos ismereteinket szeretnénk bővíteni. Szakirodalmi adatok hiányában, kíváncsiak voltunk arra, hogy a tesztelt két, bizonyítottan biofilm aktív echinocandin hogyan viselkedik humán szérumban jelenlétében a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmekkel szemben. A továbbiakban pedig olyan innovatív terápiás lehetőségek megfogalmazására törekedtünk, amelyek segítségével a jövőben az echinocandinok aktivitása fokozható lenne, ezáltal a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által okozott biofilm eredetű infekciók hatékonyabb kezelése válna lehetővé.

Kísérleteink során az alábbiakat tűztük ki célul:

- A planktonikus és a szesszilis *C. albicans*, illetve *C. parapsilosis* sejtek echinocandinokkal (CAS, MICA) szembeni minimális gátló koncentrációinak meghatározása, 50% humán szérumban jelenlétében.
- A humán szérumban *C. albicans* és *C. parapsilosis* biofilmképződésre kifejtett hatásának vizsgálata
- A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek metabolikus aktivitásának vizsgálata CAS, valamint MICA expozíció után, 50% humán szérumban jelenlétében.
- A planktonikus és a szesszilis *C. albicans*, illetve *C. parapsilosis* sejtek CAS, MICA és NIKZ iránti minimális gátló koncentrációinak meghatározása.
- A CAS, a MICA és a NIKZ közötti *in vitro* interakció vizsgálata a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok által képzett biofilmek ellen.
- A CAS, a MICA és a TYR minimális gátló koncentrációinak meghatározása planktonikus, valamint szesszilis *C. parapsilosis* sejtekkel szemben.
- A CAS, a MICA és a TYR kombinációja során fennálló *in vitro* kölcsönhatás vizsgálata, a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok planktonikus és szesszilis sejtjei ellen.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgált izolátumok

Kísérleteink során 15 *C. albicans* [1822, 2009, 456, 10431, 8568, 1544, 10072, 37181, 10763, 25784, 10781, 10431, 19954, 31401, DPL18 (echinocandin rezisztens törzs)], és 17 *C. parapsilosis sensu stricto* (26977, 8190, 19680, 17820, 4133, 6999, 29042, 16895, 18154, 22913, 16879, 16977, 22482, 27001, 10252, 17432, 9613) klinikai izolátumot, illetve három referencia törzset (*C. albicans* SC5314, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258) vizsgáltunk. A tesztelt klinikai izolátumok minden esetben hemokultúrából származtak. Azonosításuk MALDI-TOF [(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight), (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Németország)] tömegspektrométer segítségével történt.

4.2. A planktonikus sejtek érzékenységének vizsgálata

A MICA (Sigma, Budapest, Magyarország), a CAS (Sigma, Budapest, Magyarország), a NIKZ (Sigma, Budapest, Magyarország) és a TYR (Sigma, Budapest, Magyarország) iránti MIC értékek meghatározását standard mikrodilúciós módszerrel végeztük, a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) által elfogadott M27-A3-as protokoll alapján. Tápközegként L-glutaminnal kiegészített, hidrogén-karbonát mentes RPMI-1640-et használtunk (pH=7,0), MOPS [3-(N-morpholino) propánszulfonsav] Sigma] puffer hozzáadásával (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

Kísérleteink egy részében 10 *C. albicans* és 10 *C. parapsilosis* klinikai izolátum esetében normál RPMI-1640-ben, illetve 50% humán szérummal (AB vércsoportú férfi, Sigma, Budapest, Magyarország) kiegészített tápközegben, határoztuk meg a törzsek MICA és CAS iránti MIC értékét. A planktonikus sejtek echinocandinokkal szembeni *in vitro* érzékenységének vizsgálatokor mindkét *Candida* species esetében 0,015 és 8 mg/l közötti MICA és CAS koncentrációkat teszteltünk. A NIKZ-vel végzett kísérleteink során 0,06-32 mg/l koncentrációkat alkalmaztunk (1. táblázat). A *C. parapsilosis* TYR iránti érzékenységének meghatározásakor használt 3,9-1000 µM TYR koncentráció tartomány (1. táblázat), megközelítőleg 1-250-szerese a *Candida* fajok fiziológiásan termelt TYR koncentrációjának (Alem és mtsai. 2006).

A TYR-ból először egy 50 mM-os törzsoldatot készítettünk 100% metanolban. A legmagasabb vizsgált TYR koncentráció 1% metanolt tartalmazott, ezért a 96 lyukú mikrotiter lemez (TPP,

Trasadingen, Svájc) gyógyszermentes üregeihez 1% metanolt is adtunk. A tesztelt antifungális szerek és a TYR koncentrációinak beállítása minden kísérlet során RPMI-1640-ben történt, majd az adott koncentrációjú echinocandinokból 100 µl-t mértünk a mikrotiter lemez meghatározott üregeibe. A vizsgált antifungális szerek és a TYR iránti MIC értékek megállapításához először $0,5-2,5 \times 10^3$ sejt/ml gombaszuszpenziókat állítottunk be, melyekből aztán 100 µl-t pipettáztunk a plate üregeibe. A mikrotiter lemezeket 37 °C-on, 24 órán keresztül inkubáltuk. (Kovács és mtsai. 2016). A plate 11. oszlopa pozitív kontrollként (100 µl gombaszuszpenzió + 100 µl RPMI-1640), a 12. oszlopa pedig negatív kontrollként (200 µl RPMI-1640) szolgált.

A planktonikus sejtek MICA-nal, CAS-nal, NIKZ-vel és TYR-lal szembeni érzékenységének megállapításakor, azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol legalább 50%-os turbiditás csökkenés volt megfigyelhető a pozitív kontrollhoz képest (Katragkou és mtsai. 2015). A turbiditást spektrofotométer segítségével (Multiskan Sky), 492 nm hullámhosszon mértük, majd pedig meghatároztuk a turbiditás százalékos változását az alábbi képlet szerint (Katragkou és mtsai. 2015; Kovács és mtsai. 2016):

$$\text{Turbiditás} = 100\% \times (A_{\text{üreg}} - A_{\text{háttér}}) / (A_{\text{gyógyszermentes üreg}} - A_{\text{háttér}})$$

A háttér azt az abszorbancia értéket jelenti, melyet a mikrotiter lemez, gombaszuszpenziót nem tartalmazó üregeiben mértünk (Katragkou és mtsai. 2015; Kovács és mtsai. 2016). A planktonikus sejtek *in vitro* érzékenységének vizsgálatához minőségi kontrollként a CLSI előírásainak megfelelően a *C. parapsilosis* ATCC 22019, és a *C. krusei* ATCC 6258 referencia törzseket használtuk.

4.3. Biofilm képzés

A biofilmeket a Pierce és munkatársai által publikált protokoll alapján hoztuk létre. Az izolátumokat frissítés céljából, a kísérlet kivitelezése előtt két nappal Sabouraud dextróz agarra (SDA) oltottuk. A biofilmképzést megelőző napon törzsenként, pázsitszerű szélesztést végeztünk, szintén SDA-ra. A táptalajok 37 °C-on, 24 órán keresztül történő inkubációját követően, egy steril vattatampon segítségével a pázsitot 25 ml fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk. Ezt a műveletet három mosási lépés követte, melyek mindegyike során, 3000g fordulaton 5 percig centrifugáltuk a gombaszuszpenziókat, majd pedig a felülúszót határozott mozdulattal leöntöttük, és ismét 25 ml fiziológiás sóoldatban vettük fel a gombasejteket. A centrifugálási folyamat végeztével, a gombamennyiségtől függően 5-6 ml fiziológiás sóoldatot adtunk a pallethez. A különböző izolátumokból, RPMI-1640-ben, 1×10^6 Colony Forming Unit

(CFU)/ml gombaszuszpenziót állítottunk be Bürker kamra segítségével. Ezt követően lapos aljú, 96 lyukú mikrotiter lemez (TPP, Trasadingen, Svájc) meghatározott üregeibe 100 µl-t mértünk az adott gombaszuszpenzióból. A plate 12. oszlopa negatív kontrollként szolgált, melybe kizárólag 100 µl RPMI-1640 került. Végül a mikrotiter lemezeket statikusan inkubáltuk 37 °C-on, 24 óráig (Pierce és mtsai. 2008; Kovács és mtsai. 2016).

4.3.1. A biofilm tömegének meghatározása

A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok, valamint a referencia törzsek biofilmképző képességének ellenőrzésére a Marcos-Zambrano és munkatársai által leírt kristályibolya-assay-t alkalmaztuk (Marcos-Zambrano és mtsai. 2014).

Az előző nap elkészített biofilmek 24 órás inkubációjának végeztével, háromszor mostuk a mikrotiter lemezeket steril fiziológiás sóoldattal (200 µl). Erre a lépésre azért volt szükség, hogy a le nem tapadt sejteket eltávolítsuk a festési eljárás előtt, minimalizálva ezzel a háttérfestődés mértékét. Ezt követően a *Candida* sejtekre 125 µl 0,1%-os kristályibolya oldatot mértünk, majd egy 15 perces inkubáció következett szobahőmérsékleten. Ennek végeztével a kristályibolya oldatot pipettával leszívtuk, majd háromszor mostuk a mikrotiter lemezeket fiziológiás sóoldattal (200 µl). A protokoll utolsó lépése során, 125 µl 33%-os ecetsavat adtunk a plate üregeihez, melynek célja a biofilmhez kötött kristályibolya oldat szolubilizálása volt. Ismét egy 15 perces, szobahőmérsékleten történő inkubáció következett, melynek végeztével 100 µl felülúszót egy steril mikrotiter lemezbe mértünk át. Az abszorbanciát spektrofotométer segítségével határoztuk meg (540 nm), negatív kontrollként 33%-os ecetsav oldatot (100 µl) használtunk (Silva és mtsai. 2009; O'Toole 2011; Marcos-Zambrano és mtsai. 2014).

4.4. A humán szérum hatása a biofilm képződésére, valamint a szeszilis sejtek antifungális szerekkkel szembeni érzékenységének meghatározása 50% humán szérum jelenlétében

Annak megállapítására, hogy a különböző humán szérum koncentrációknak milyen hatása van a *Candida* sejtek adhéziójára az alábbi protokollt alkalmaztuk: a biofilmek képzése során a standard gombaszuszpenziókat 1%, 5%, 10%, 30% és 50% humán szérummal egészítettük ki, majd a mikrotiter lemezeket különböző ideig inkubáltuk (2, 4, 8, 12 és 24 óra). Ezt követően az adott időponthoz tartozó üregeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal (200 µl), végül pedig XTT [2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide]

assay (VWR, Debrecen, Magyarország) segítségével meghatároztuk a letapads sejtek metabolikus aktivitást. A mosási lépések elvégzése után 100 µl XTT/menadion oldatot (0,5 g/l XTT, kiegészítve 1 µM menadionnal) adtunk a mikrotiter lemez üregeihez, melyeket fénytől védve, 2 órán át, 37 °C-on statikusan inkubáltunk. A biofilmek metabolikus aktivitásának 492 nm-en történő méréséhez 80 µl felülűszót használtunk (Pierce és mtsai. 2008). A kapott metabolikus aktivitás relatív százalékos értékeiből görbéket készítettünk a GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) alkalmazás segítségével. Minden vizsgált időpontban a humán szérum nélküli, RPMI-1640-ben mért aktivitást tekintettük a 100%-nak. A további vizsgálataink során kizárólag 50% humán szérummal egészítettük ki az RPMI-1640 tápfolyadékot, hogy jobban modellezhessük az *in vivo* környezetet.

A szeszilis sejtek antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata során az előző nap elkészített biofilmeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal (200 µl), majd RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben is meghatároztuk a MICA és a CAS elleni MIC értéket, a korábban már ismertetett XTT assay segítségével. Előkísérleteink alapján, a *C. albicans* esetében 0,015-32 mg/l antifungális szer koncentrációkat teszteltünk, míg a *C. parapsilosis* biofilmek érzékenységének megállapításához 0,015-512 mg/l echinocandin koncentrációkat alkalmaztunk (1. táblázat). MIC értéknek azt a legalacsonyabb antimikotikum koncentrációt vettük alapul, ahol legalább 50%-os metabolikus aktivitás csökkenés volt látható a gyógyszermentes kontrollhoz képest. A MIC érték meghatározását követően részletesen elemeztük a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek echinocandinokkal szembeni aktivitási mintázatát a Simitsopoulou és munkatársai által, 2013-ban leírt módszer alapján. A „fungus damage assay” (gomba károsodási vizsgálat) megállapításához az alábbi képletet alkalmaztuk: „fungus damage” (%) [1-kezelt sejtek abszorbanciája/kontroll sejtek abszorbanciája]*100 (Simitsopoulou és mtsai. 2013).

4.5. A biofilmek antifungális szerekkel szembeni érzékenysége

A *C. parapsilosis* biofilmek antifungális szerekkel szembeni érzékenységének meghatározásához 8 és 512 mg/l közötti CAS és MICA koncentrációkat teszteltünk. Az echinocandin érzékeny *C. albicans* törzsek esetében 0,015-1 mg/l echinocandin koncentrációkat, míg az echinocandin rezisztens *C. albicans* izolátum (DPL18) vizsgálatokor 0,25-16 mg/l CAS és MICA koncentrációkat alkalmaztunk. A NIKZ és a TYR iránti érzékenység megállapításához 0,03-8 mg/l illetve 3,9-1000 µM koncentrációkat használtunk

(1. táblázat). A korábban leírt protokoll alapján létrehozott biofilmeket az inkubációs idő elteltével háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal (200 µl). Az adott gyógyszer koncentrációk beállítása RPMI-1640-ben történt, melyekből a mikrotiter lemez meghatározott üregeibe 100 µl-t mértünk (a 11. oszlop pozitív kontrollként, míg a 12. oszlop továbbra is negatív kontrollként funkcionált). A kezelt biofilmeket 24 órán keresztül inkubáltuk, 37 °C-on. Ezt követően a mikrotiter lemezeket ismét háromszor mostuk fiziológiás sóoldattal (200 µl), majd az adott szerek iránti MIC értékek meghatározása a már korábban említett metabolikus aktivitás mérésén alapuló XTT assay segítségével történt, 492 nm hullámhosszon (Pierce és mtsai. 2008). A szesszilis sejtek esetében MIC értéknek azt a legkisebb koncentrációt tekintettük, ahol legalább 50%-os metabolikus aktivitás csökkenést tapasztaltunk, a mikrotiter lemez kezeletlen, kontroll üregeihez viszonyítva. A metabolikus aktivitás százalékos változásának kiszámításához, a korábban a planktonikus sejtek turbiditásának meghatározásához használt képletet alkalmaztuk: $A=100\% \times (A_{\text{üreg}} - A_{\text{háttér}}) / (A_{\text{gyógyszermentes üreg}} - A_{\text{háttér}})$ (Katragkou és mtsai. 2015; Kovács és mtsai. 2016).

Alkalmazott gyógyszer koncentrációk				
	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
	Planktonikus sejtek	Szesszilis sejtek	Planktonikus sejtek	Szesszilis sejtek
Echinocandinok (CAS, MICA)	0,015-8 mg/l	0,015-32 mg/l	0,015-8 mg/l	0,015-512 mg/l
NIKZ	0,06-32 mg/l	0,03-8 mg/l	0,06-32 mg/l	0,03-8 mg/l
TYR	3,9-1000 µM			

1. táblázat: A kísérletek során alkalmazott gyógyszer koncentrációk összefoglalása, a planktonikus, illetve a szesszilis *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* izolátumok esetében.

4.6. Az antifungális szerek, illetve a tyrosol között fennálló *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata

A planktonikus és szesszilis *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek esetében egyaránt az úgynevezett kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúciós assay-t alkalmaztuk az adott szerek között fennálló *in vitro* kölcsönhatások vizsgálatához (Meletiadis és mtsai. 2005; Meletiadis és mtsai. 2010; Katragkou és mtsai. 2015). A tesztelt koncentráció tartományok megegyeztek a korábban leírt MIC meghatározásnál használt koncentrációkkal.

A checkerboard mikrodilúciós módszer során a mikrotiter lemezek A sora tartalmazta a különböző TYR, illetve NIKZ koncentrációkat önmagában, míg a 10. oszlopban az egyes CAS vagy MICA koncentrációk találhatóak. A mátrix további üregeibe pedig a két gyógyszer eltérő kombinációit mértük. A plate 11. oszlopa a kezeletlen pozitív kontrollként, míg a 12. oszlopa az úgynevezett táptalajkontrollként szolgált. Az interakció természetének definiálásához a gátló koncentrációhányad indexet alkalmaztuk (Fractional Inhibitory Concentration Index - FICI), melyet az alábbi képlet alapján fejeztünk ki:

$\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = MIC_A \text{ kombinációban} / MIC_A \text{ önmagában} + MIC_B \text{ kombinációban} / MIC_B \text{ önmagában}$, ahol a MIC_A és MIC_B önmagában az A és a B gyógyszer MIC értéke önmagában, míg a MIC_A és MIC_B kombinációban a két gyógyszer MIC értéke az izoeffektív kombinációban. Minden izoeffektív kombináció esetén meghatároztuk a FIC értéket, melyek közül a legalacsonyabbat tekintettük FIC indexnek, amit végül a következőképpen interpretáltunk: szinergista interakciónak tekintettük a kölcsönhatást, ha a $FICI \leq 0,5$ értéket vett fel, indifferens hatásról $0,5 < FICI \leq 4$ esetén beszélhetünk, míg antagonizmust akkor tapasztalhatunk, ha $FICI > 4$ (Meletiadis és mtsai. 2005; Meletiadis és mtsai. 2010; Katragkou és mtsai. 2015).

4.7. A *Candida* biofilmek életképesség vizsgálata

A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek életképességét RPMI-1640-ben, és 50% humán szérummal kiegészített tápfolyadékban vizsgáltuk. A metabolikus aktivitás, illetve a biofilm tömeg eredményeit illetően mindkét *Candida* species hasonló paraméterekkel rendelkezett, így kísérleteink során egy-egy reprezentatív *C. albicans* (1544) és *C. parapsilosis* (26977) klinikai izolátumot teszteltünk. A biofilmeket a korábban ismertetett módon hoztuk létre RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben, 8 lyukú mikrotiter lemezek üregeibe helyezett kerek fedőlemezek felületén (Lab-Tek, Chamber Slide™ System, VWR,

Debrecen, Hungary). Aztán egy 24 órás inkubációs periódus következett, 37 °C-on. A *Candida* biofilmek életképességének tanulmányozása mellett az élő-holt sejtek arányát is elemeztük, ahol epifluoreszcens vizsgálatokat végeztünk LIVE/DEAD viability kit (ThermoFisher Scientific, USA) segítségével. A Basas és munkatársai által leírt protokoll alapján az egy napos biofilmeket steril fiziológiás sóoldattal mostuk (200 µl). Ezt követően a mikrotiter lemezeket fénytől védve inkubáltuk, 37°C-on, 15 percen keresztül (Basas és mtsai. 2016). Az élő sejtek festésére Syto 9-et (3,34 mmol/l dimetil-szulfoxid oldatban), míg a holt sejtek jelölésére propidium jodidot (20 mmol/l dimetil-szulfoxid oldatban) használtunk. Ennek a festési eljárásnak köszönhetően az élő szesszilis sejtek zöld, míg az elhaltak piros színűnek láthatóak az epifluoreszcens mikroszkóp által készített felvételeken, arányukból pedig az élő/holt sejt megoszlásra következtethetünk. A megfestett szesszilis sejtek elemzéséhez a Zeiss AxioScope A1 mikroszkópot (Jena, Németország), a Zeiss AxioCam ICm1 kamerát (Jena, Németország), valamint a ZEN lite 2012 (Jena, Németország) szoftvert alkalmaztuk.

A CAS, a MICA és a NIKZ kombinációjának vizsgálata során, eredményeink megerősítésének céljából szintén életképesség assay-t végeztünk, ahol egy-egy reprezentatív *C. albicans* (10431) és *C. parapsilosis* (17820) klinikai izolátumot használtunk. A biofilmek létrehozása, a festési eljárások kivitelezése, valamint a mikroszkópban látott eredmények interpretálása az előző bekezdésben leírtak szerint történt.

A szesszilis *C. albicans* sejtek kezelésekor az alábbi gyógyszer koncentrációkat alkalmaztuk: 8 mg/l NIKZ; 0,25 mg/l CAS; 0,25 mg/l MICA, illetve a két típusú szer kombinációit (8 mg/l NIKZ + 0,25 mg/l CAS/MICA). A *C. parapsilosis* biofilmek esetében pedig 8 mg/l NIKZ, 128 mg/l CAS, 128 mg/l MICA koncentrációkat, továbbá ezek kombinációit (8 mg/ NIKZ + 128 mg/l CAS/MICA) teszteltük. A kezelési stratégiát a „checkerboard” mikrodilúciós assay eredményeinek alapján dolgoztuk ki.

4.8. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

A *C. parapsilosis* biofilmek esetében az echinocandinok, illetve a TYR hatására bekövetkező esetleges strukturális változásokat pásztázó elektronmikroszkópos (scanning electron microscope - SEM) vizsgálattal kívántuk szemléltetni, ehhez pedig egy reprezentatív törzset használtunk (16977). A biofilmeket 10 mm átmérőjű kör alakú fedőlemezek felszínén hoztuk létre, melyeket egy napig 37°C-on inkubáltunk. Huszonnégy óra elteltével a mikrotiter lemezeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal (200 µl), majd az előzetes eredmények alapján a biofilmekhez az alábbi gyógyszer koncentrációkat adtuk: 256 mg/l CAS, 256 mg/l

MICA, 1 mM TYR, valamint ezek kombinációi (256 mg/l CAS + 1 mM TYR; 256 mg/l MICA + 1 mM TYR). Ismét egy 24 órás, 37 °C-on történő inkubáció következett, majd ennek végeztével steril fiziológiás sóoldattal újfent háromszor mostuk az immár kezelt biofilmeket. A továbbiakban 2%-os glutáraldehidet használtunk a fixáláshoz, majd a fixált mintákat etanolos hígítási sorban dehidratáltuk. A szárítást exsikkátor segítségével végeztük, ezt követően a SEM vizsgálat előtt a vezetőképesség fokozásának érdekében a kör alakú fedőlemezeket arannyal vontuk be (Hitachi S-4300) (Chandra és mtsai. 2008).

Az anyagok és módszerek című fejezetben bemutatott metodikák során, valamennyi kísérletben három független vizsgálattal teszteltük mindegyik izolátumot, majd az így kapott eredmények medián értékeit tüntettük fel az eredmények című fejezetben.

4.9. Statisztikai analízis

Az idő függvényében nyomon követett metabolikus aktivitás változás statisztikai elemzéséhez minden esetben Dunnett-teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízist (One-way ANOVA) alkalmaztunk, ahol szignifikánsnak tekintettük az eredményt, ha $P < 0,05$.

A CAS és a MICA által kiváltott metabolikus aktivitás változásokat 50% humán szérum jelenlétében, valamint hiányában is meghatároztuk, majd pedig páronként statisztikailag összehasonlítottuk őket, ahol a különbségek elemzésére Wilcoxon párosított t próbát használtunk. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha a $P < 0,05$. Az adatokat a GraphPad Prism 6.05 szoftver segítségével elemeztük.

5. Eredmények

5.1. A planktonikus, illetve a szesszilis *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* sejtek echinocandinokkal szembeni érzékenységének meghatározása 50% humán szérumban jelenlétében

Az érvényben lévő CLSI határértékek alapján, minden általunk tesztelt *C. albicans* és *C. parapsilosis* klinikai izolátum, illetve a referencia törzsek is érzékenyek bizonyultak a vizsgált antifungális szerek iránt, normál RPMI-1640-ben (Pfaller és mtsai. 2011).

A planktonikus, illetve a szesszilis *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek szérumban, valamint 50% humán szérumban kiegészített tápközegben tapasztalt CAS és MICA iránti medián MIC értékei a 2. táblázatban láthatóak.

Ötven százalék humán szérumban hozzáadását követően, mindkét faj klinikai izolátumai és a referencia törzsek (SC5314 és ATCC 22019) CAS iránti medián MIC értékei 4-8-szoros, míg a MICA-nal szemben mért medián MIC értékek 4-64-szeres emelkedést mutattak, a normál RPMI-1640 kapott eredményekhez viszonyítva (2. táblázat).

A *C. parapsilosis* klinikai izolátumok biofilmjei esetében magasabb CAS és MICA iránti medián MIC értékeket kaptunk, mint a *C. albicans* biofilmek vizsgálata során; az ATCC 22019 referencia törzs medián MIC értékei pedig a következőképpen alakultak: 1 mg/l (CAS) és 2 mg/l (MICA) (2. táblázat).

Ötven százalék humán szérumban expozíció hatására mindkét echinocandinnal szemben minimálisan emelkedett MIC értékeket tapasztaltunk a tesztelt *C. albicans* klinikai izolátumok szesszilis populációi esetében (2. táblázat). Az SC5314 referencia törzs biofilmjei az alábbi medián MIC értékeket mutatták 50% humán szérumban hozzáadását követően: CAS: 0,25 mg/l, MICA: 4 mg/l. Meglepő módon a *C. parapsilosis* biofilmek és az ATCC 22019 referencia törzs echinocandin iránti medián MIC értékei 0,015 mg/l-re csökkentek 50% humán szérumban jelenlétében.

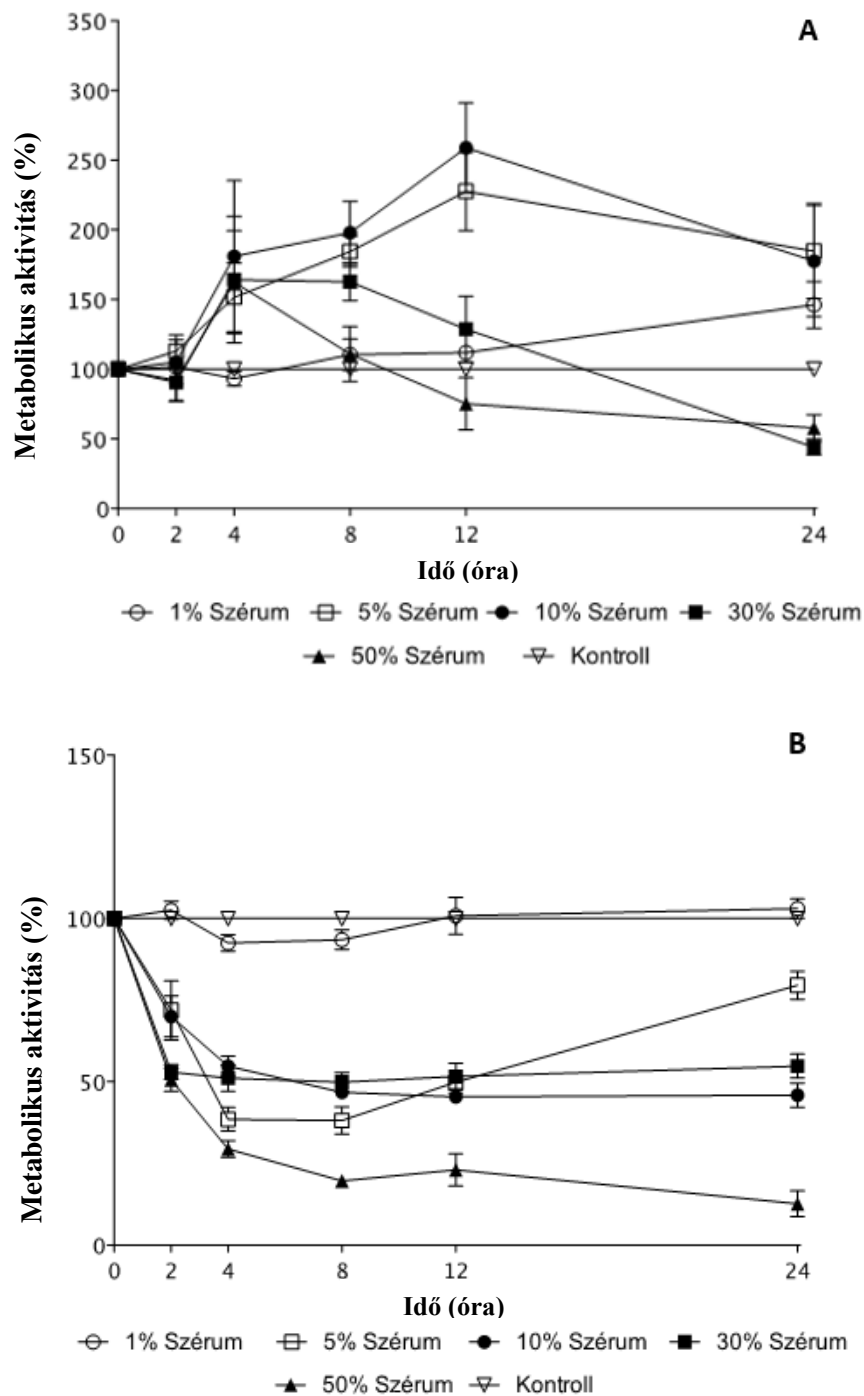
<i>C. albicans</i> (n=10)	Planktonikus sejtek medián MIC értékei RPMI-1640-ben (mg/l)	Planktonikus sejtek medián MIC értékei 50% humán szérumban jelenlétében (mg/l)	Szesszilis sejtek medián MIC értékei RPMI-1640-ben (mg/l)	Szesszilis sejtek medián MIC értékei 50% humán szérumban jelenlétében (mg/l)
CAS	0,125	0,5	0,25	0,5
MICA	0,015	1	0,03	2
<i>C. parapsilosis</i> (n=10)				
CAS	1	8	384	0,015
MICA	1	8	256	0,015

2. táblázat: A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* klinikai izolátumok planktonikus, illetve szesszilis sejtjeinek echinocandinokkal (caspofungin, micafungin) szembeni medián MIC értékei, normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérumban kiegészített tápközegben.

A vizsgálatok során 10 *Candida albicans* (1822, 2009, 456, 10431, 8568, 1544, 10072, 37181, 10763, 25784) és 10 *Candida parapsilosis* (26977, 8190, 19680, 17820, 4133, 6999, 29042, 16895, 18154, 22913) klinikai izolátumot teszteltünk.

5.2. A humán szérumban hatása a biofilm képződésére

A különböző humán szérumban koncentrációk (1%, 5%, 10%, 30% és 50%) biofilm képződésre kifejtett hatásának vizsgálatakor, az 1% humán szérumban kiegészített RPMI-1640 tápközeg nem befolyásolta szignifikánsan a szesszilis *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek metabolikus aktivitását. Az 5% és 50% közötti humán szérumban koncentrációk mindkét vizsgált *Candida* fajnál dóziszfüggő hatást gyakoroltak a biofilmek metabolikus aktivitására (7. ábra). A *C. albicans* esetében szignifikáns különbséget csak 8 (P <0,05–0,001), illetve 12 óránál (P <0,01–0,001) figyeltünk meg 5% és 30%, valamint 5% és 10% közötti humán szérumban koncentrációkon a kontroll sejtekhez viszonyítva (7/A ábra). Egy napos inkubációt követően a *C. albicans* biofilmek metabolikus aktivitása 5% és 50% közötti humán szérumban koncentráció mellett nem különbözött jelentősen az RPMI-1640-ben végzett kísérletek eredményeivel összehasonlítva (P >0,05) (7/A ábra). Ezzel szemben a szesszilis *C. parapsilosis* sejtek metabolikus aktivitását szignifikánsan gátolta az 5%-50% humán szérumban koncentráció 2 és 24 óra között a szérumbanmentes tápközegben mért értékekhez képest (P <0,05 – 0,001) (7/B ábra).



7. ábra: A *Candida albicans* (A) és a *Candida parapsilosis* (B) klinikai izolátumok esetében tapasztalt metabolikus aktivitás változások az idő függvényében, a különböző humán szérum koncentrációk (1%, 5%, 10%, 30%, 50%) alkalmazása során. Az adott időpontokban, a normál RPMI-1640-ben mért értékeket tekintettük 100%-os metabolikus aktivitásnak.

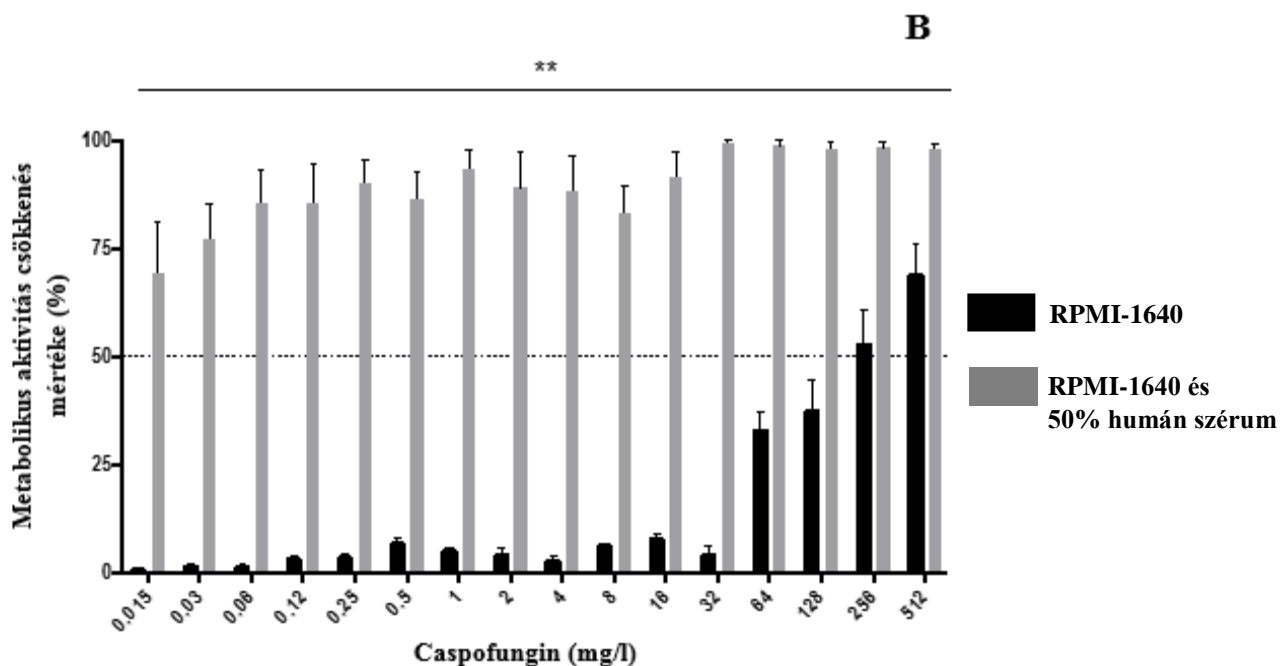
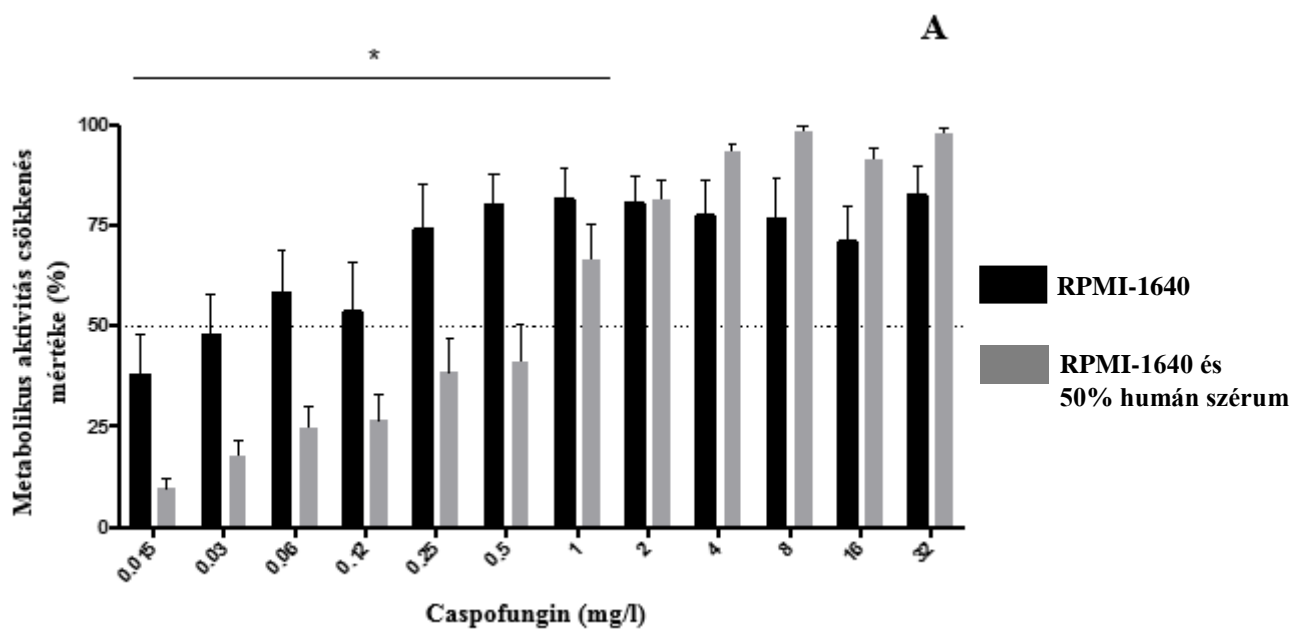
Minden időpont 10 *Candida albicans* (1822, 2009, 456, 10431, 8568, 1544, 10072, 37181, 10763, 25784) és 10 *Candida parapsilosis* (26977, 8190, 19680, 17820, 4133, 6999, 29042, 16895, 18154, 22913) klinikai izolátum metabolikus aktivitásának átlag \pm SEM értékét mutatja.

5.3. A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* biofilmek érzékenységi mintázata 50% humán szérum jelenlétében

A *C. albicans* biofilmek vizsgálata során, a 0,015 mg/l és az 1 mg/l közötti CAS koncentrációk esetében szignifikánsan magasabb metabolikus aktivitás csökkenést figyeltünk meg normál RPMI-1640-ben, mint az 50% humán szérummal kiegészített tápközegben ($P < 0,05$). Szérummentes RPMI-1640-ben 0,06 mg/l ($58\% \pm 10,51\%$ - $82,5\% \pm 10,14\%$) CAS koncentrációtól tapasztaltunk legalább 50%-os gombakárosodást, amely 50% humán szérum jelenlétében 1 mg/l ($66,63\% \pm 8,55\%$ - $98,38\% \pm 1,1\%$) CAS koncentrációtól kezdődően volt látható (8/A ábra). Ezzel szemben a CAS humán szérum expozíciót követően jelentősen magasabb aktivitást mutatott a *C. parapsilosis* biofilmek ellen, mint normál RPMI-1640-ben, ugyanis a gombakárosodás mértéke már a legalacsonyabb tesztelt koncentráción (0,015 mg/l) is meghaladta az 50% -ot ($P < 0,01-0,05$) (8/B ábra).

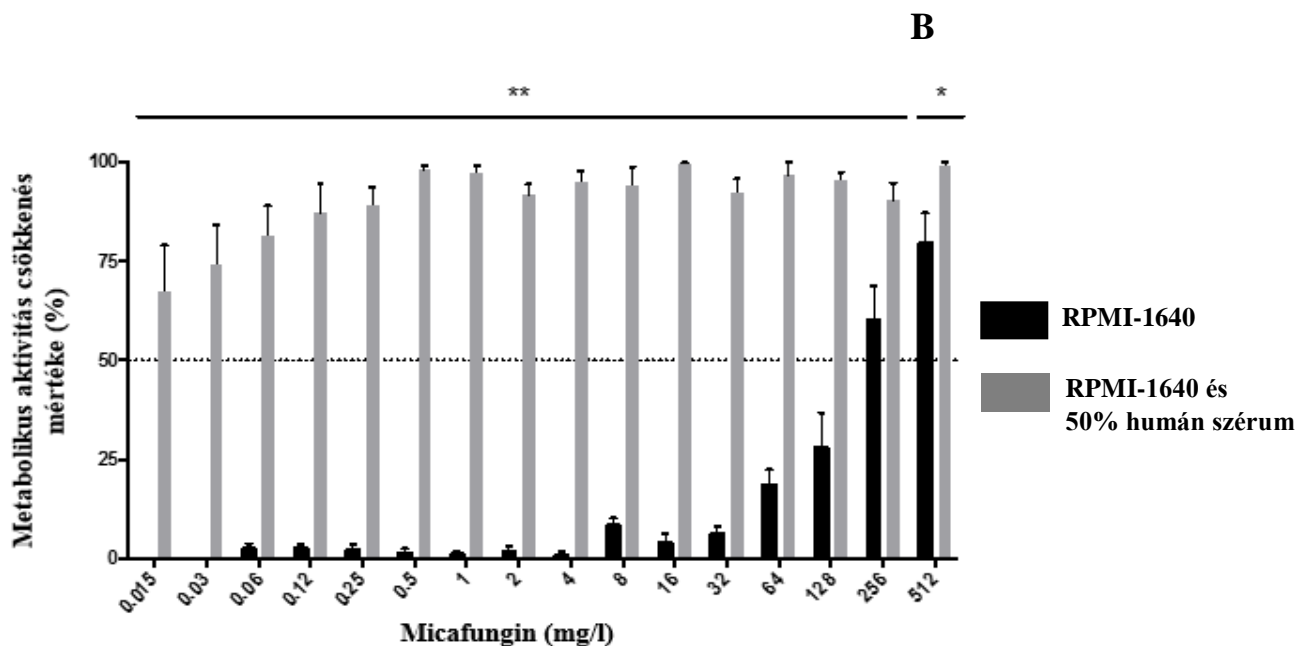
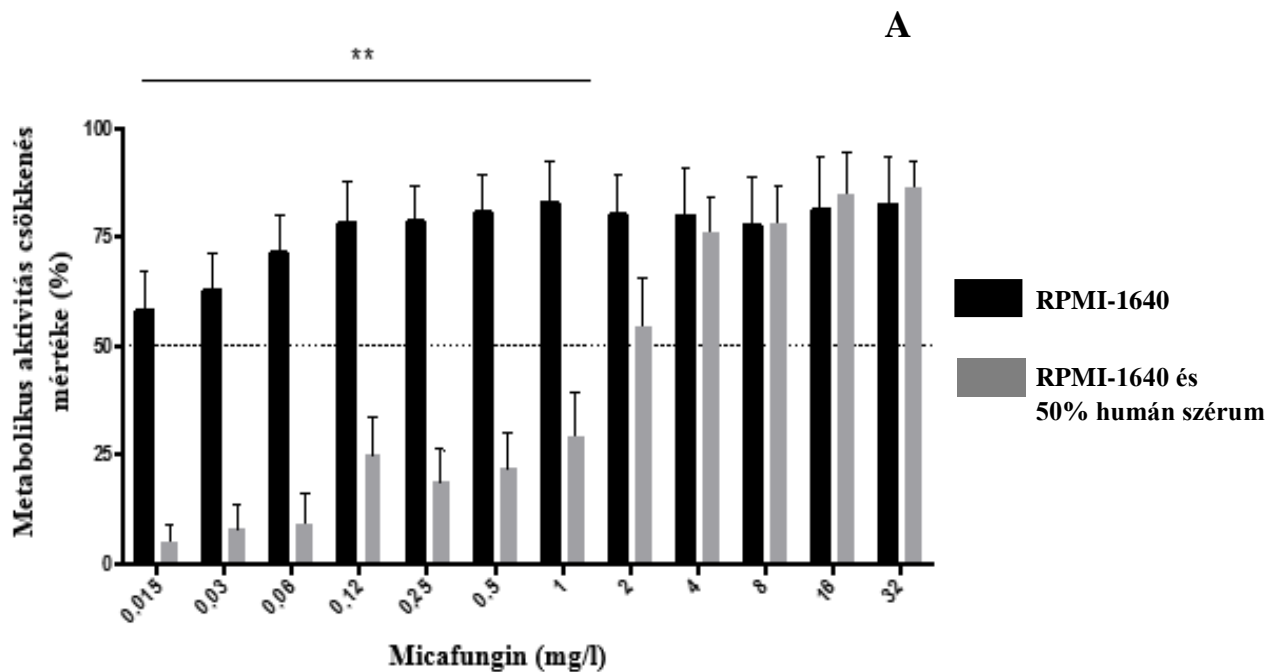
A *C. albicans* biofilmek vizsgálata során, az általunk tesztelt teljes MICA koncentráció tartományban nagyfokú metabolikus aktivitás csökkenést tapasztaltunk a szérummentes környezetben ($50,38\% \pm 13,09\%$ - $83\% \pm 9,39\%$). Ötven százalék humán szérummal kiegészített tápközegben 2 mg/l ($54,69\% \pm 10,68\%$ - $86,25\% \pm 5,98\%$) MICA koncentrációtól kezdődően észleltünk legalább 50%-os metabolikus aktivitás csökkenést, tehát az echinocandin hatékonysága ebben az esetben is csökkent a szérum expozíciót követően. Azonban a szérummal kezelt, valamint a normál RPMI-1640-ben vizsgált szesszilisz sejtek metabolikus aktivitása között nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség 1 mg/l MICA koncentráció felett ($P > 0,05$) (9/A ábra).

A CAS-hoz hasonlóan, a MICA is igen magas hatékonyságot mutatott a *C. parapsilosis* biofilmek ellen 50% humán szérum jelenlétében. A gombakárosodás mértéke a legkisebb tesztelt echinocandin koncentráción (0,015 mg/l) is meghaladta az 50%-ot (9/B ábra). Mindkét vizsgált antifungális szer esetében elmondható, hogy a teljes általunk alkalmazott koncentráció tartományon szignifikáns különbség látható a szérummal kezelt, illetve a szérummentes tápközegben mért metabolikus aktivitás között (CAS: $69,38\% \pm 11,53\%$ - $99,38\% \pm 0,63\%$; MICA: $67,63\% \pm 11,37\%$ - $99,63\% \pm 0,26\%$) (9/A és B ábra).



8. ábra: A caspofungin aktivitásának vizsgálata normál RPMI-1640-ben, illetve 50% humán szérum jelenlétében, *Candida albicans* (A) és *Candida parapsilosis* (B) biofilmek ellen.

Mindegyik oszlop 10 *Candida albicans* (1822, 2009, 456, 10431, 8568, 1544, 10072, 37181, 10763, 25784) és 10 *Candida parapsilosis* (26977, 8190, 19680, 17820, 4133, 6999, 29042, 16895, 18154, 22913) klinikai izolátum átlagos metabolikus aktivitásának csökkenését szemlélteti (átlag ± SEM). (*P<0,05; **P<0,01).

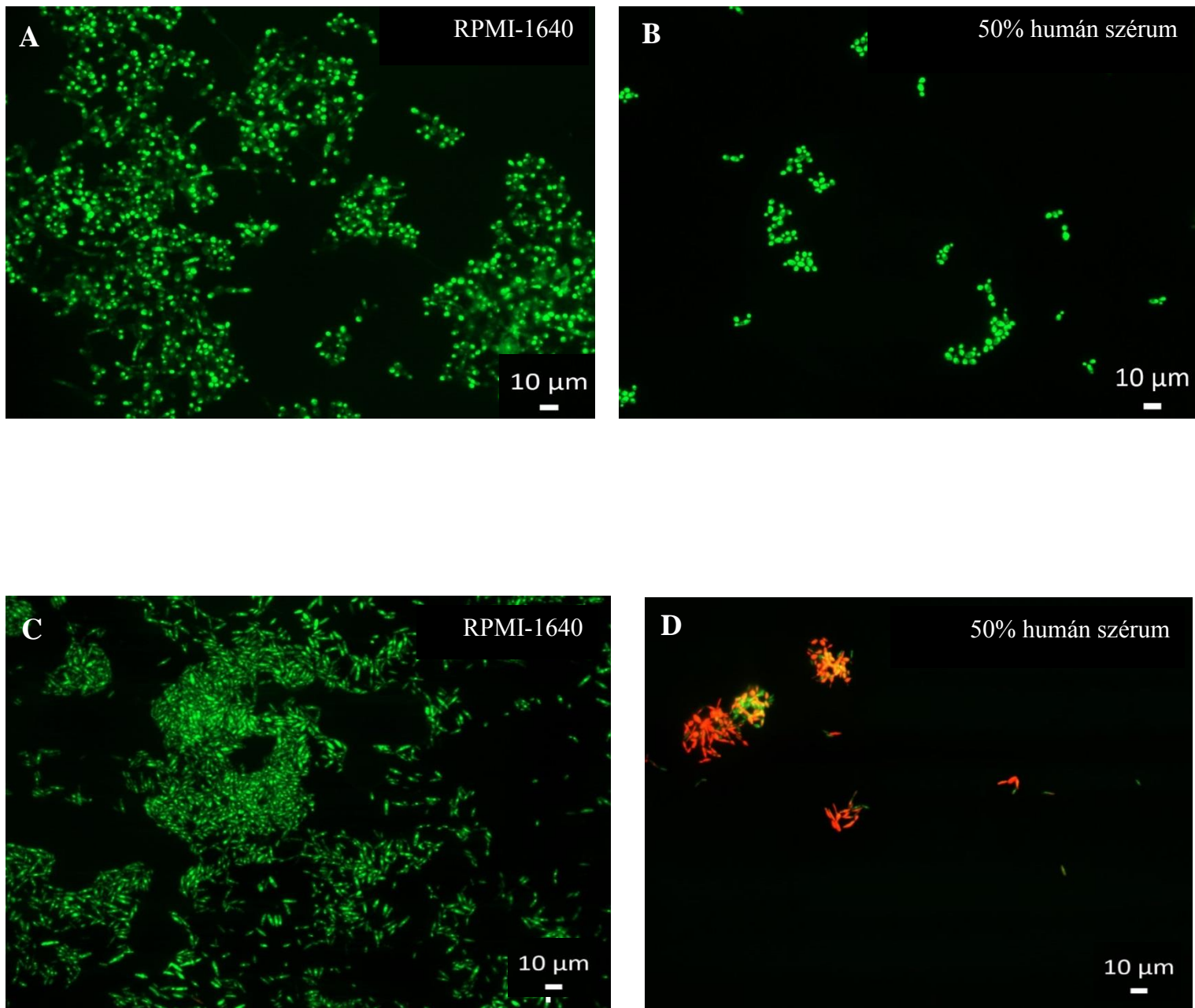


9. ábra: A micafungin aktivitásának vizsgálata normál RPMI-1640-ben, illetve 50% humán szérum jelenlétében, *Candida albicans* (A) és *Candida parapsilosis* (B) biofilmek ellen.

Mindegyik oszlop 10 *Candida albicans* (1822, 2009, 456, 10431, 8568, 1544, 10072, 37181, 10763, 25784) és 10 *Candida parapsilosis* (26977, 8190, 19680, 17820, 4133, 6999, 29042, 16895, 18154, 22913) klinikai izolátum átlagos metabolikus aktivitásának csökkenését szemlélteti (átlag ± SEM). (*P<0,05; **P<0,01).

5.4. A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* biofilmek struktúrájának és életképességének vizsgálata 50% humán szérumban jelenlétében

A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek struktúráját, valamint a szesszilis populációt alkotó élő és holt sejtek arányát epifluoreszcens mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk a szérumban, valamint az 50% humán szérumban kiegészített tápközegben (10. ábra). Huszonnégy órás inkubációt követően, sem a *C. albicans* (1544) sem pedig a *C. parapsilosis* (26977) biofilmek nem mutattak a várttól eltérő szerkezeti felépítést normál RPMI-1640-ben. Az életképesség vizsgálat során az élő sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a holt sejteké (10/A és C ábra). Az 50%-os humán szérumban expozíció a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmekben is jelentős szerkezeti változásokat okozott (10/B és D ábra). A szérumban kezelt *C. albicans* biofilmekben a sejtek jóval elszórtabban helyezkedtek el, és kizárólag élesztő forma volt jelen. Ennek ellenére az élő sejtek aránya továbbra is szignifikánsan magasabb arányt mutatott (96,83% vs. 3,17%) (10/B ábra). Ötven százalék humán szérumban hatására a *C. parapsilosis* biofilmek struktúrája rendezetlenné vált, a holt sejtek arányában pedig jelentős emelkedést tapasztaltunk, a normál RPMI-1640-ben meghatározott értékekhez képest (10/D ábra).



10. ábra: Egy reprezentatív *Candida albicans* (1544) [A, B] és *Candida parapsilosis* (26977) [C, D] klinikai izolátum szesszilis sejtjeinek életképesség vizsgálata LIVE/DEAD assay segítségével, normál RPMI-1640-ben (A, C) és 50% humán szérummal kiegészített tápközegben (B, D). Az élő sejtek zöld, míg az életképtelenek vörös színnel láthatóak az epifluoreszcens mikroszkóp segítségével készített képeken. A biofilmek létrehozásakor 1×10^6 Colony Forming Unit (CFU)/ml sejtszámot alkalmaztunk.

5.5. A caspofungin, a micafungin és a nikkomycin Z aktivitásának vizsgálata planktonikus *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* sejtek ellen

A planktonikus *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek CAS-nal, MICA-nal és NIKZ-vel szembeni MIC értékei a 3. táblázatban láthatóak. A CLSI által meghatározott érzékenységi breakpointok alapján, a vizsgálataink során használt hat *C. albicans* klinikai izolátumból öt bizonyult érzékenynek (10431, 19954, 31401, 10781, 1544) a tesztelt echinocandinok iránt. Várakozásunknak megfelelően, a DPL18 törzs az F641S mutációnak köszönhetően a CAS-nal és a MICA-nal szemben egyaránt rezisztenciát mutatott (Pfaller és mtsai. 2011) (3. táblázat).

A planktonikus *C. parapsilosis* sejtek vizsgálatakor, ötből négy klinikai izolátum (17820, 9613, 10252, 27001) érzékeny, míg a 17432 törzs mérsékelten érzékeny volt az alkalmazott echinocandinokkal szemben (Pfaller és mtsai. 2011). A planktonikus *C. parapsilosis* sejtekre 8 mg/l NIKZ koncentrációtól tapasztaltunk jelentős gátló hatást (3. táblázat).

Planktonikus <i>Candida</i> sejtek medián MIC értékei			
<i>C. albicans</i> klinikai izolátumok	CAS (mg/l)	MICA (mg/l)	NIKZ (mg/l)
10431	0,015	0,03	4
19954	0,03	0,015	4
31401	0,03	0,06	8
10781	0,015	0,03	4
1544	0,015	0,06	8
DPL18	2	2	8
<i>C. parapsilosis</i> klinikai izolátumok	CAS (mg/l)	MICA (mg/l)	NIKZ (mg/l)
17820	2	2	8
9613	1	2	8
17432	4	4	8
10252	1	2	8
27001	2	2	8

3. táblázat: A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* klinikai izolátumok planktonikus sejtjeinek echinocandinokkal (caspofungin, micafungin) és nikkomycin Z-vel szembeni medián MIC értékei.

5.6. A *Candida albicans* biofilmek echinocandinokkal és nikkomycin Z-vel szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata

A *C. albicans* biofilmek vizsgált antifungális szerekkel szembeni medián MIC értékeit, valamint az adott szerek kombinációjakor tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások természetét a 4. táblázat foglalja össze. Az echinocandin érzékeny *C. albicans* klinikai izolátumok esetében, a NIKZ-vel történő kombináció a CAS és a MICA iránti medián MIC értékek 2-16-szoros, illetve 16-128-szoros csökkenését eredményezte. A kombinációkban mért NIKZ iránti medián MIC értékek is jelentős visszaesést (8-512-szeres) mutattak az önmagában mért NIKZ MIC értékekhez viszonyítva. A DPL18 törzs CAS és MICA medián MIC értékeiben a NIKZ 64-szeres (CAS) és 4-szeres (MICA) csökkenést okozott (4. táblázat)

A *C. albicans* klinikai izolátumok többségénél (10431, 10781, 1544, DPL18) szinergizmus látható a két tesztelt echinocandin és a NIKZ kombinációja során. Érdeemes kiemelni, hogy a 19954 és a 31401 törzsek vizsgálatakor a MICA és a NIKZ kombinációja szinergista interakciót eredményezett, míg a CAS esetén indifferens kölcsönhatást detektáltunk. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy ezen klinikai izolátumok szesszilis sejtjei eleve alacsonyabb medián MIC értékeket mutattak a CAS iránt, mint a további vizsgált törzsek (4. táblázat).

Szesszilis <i>C. albicans</i> sejtek medián MIC értékei					Kölcsönhatások típusa	
Izolátum száma	Önmagában		Kombinációban		Gátló koncentrációhányad index (FICI) (Medián)	
	CAS (mg/l)	NIKZ (mg/l)	CAS (mg/l)	NIKZ (mg/l)	CAS	Interakció
10431	0,5	>8 ¹	0,03	0,03	0,063	szinergizmus
19954	0,06	8	0,015	0,5	0,625	indifferens
31401	0,06	>8 ¹	0,03	2	0,75	indifferens
10781	0,5	>8 ¹	0,03	0,03	0,183	szinergizmus
1544	0,5	>8 ¹	0,03	0,03	0,063	szinergizmus
DPL18	8	>8 ¹	0,12	1	0,245	szinergizmus
	MICA (mg/l)	NIKZ (mg/l)	MICA (mg/l)	NIKZ (mg/l)	MICA	Interakció
10431	>1 ¹	>8 ¹	0,12	0,03	0,062	szinergizmus
19954	1	8	0,06	0,03	0,075	szinergizmus
31401	>1 ¹	>8 ¹	0,015	0,06	0,061	szinergizmus
10781	1	>8 ¹	0,03	0,03	0,123	szinergizmus
1544	1	>8 ¹	0,03	0,03	0,075	szinergizmus
DPL18	4	>8 ¹	1	2	0,037	szinergizmus

4. táblázat: A caspofungin, a micafungin és a nikkomycin Z iránti MIC értékek, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z kombinációja során tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások típusa, az általunk vizsgált *Candida albicans* klinikai izolátumok szesszilis sejtjei esetében. A táblázatban a medián MIC értékek és a gátló koncentrációhányad index (FICI) medián adatai láthatóak.

¹ A vizsgált micafungin és nikkomycin Z koncentráció tartományon kívüli MIC értékei esetében (>1 mg/l és >8 mg/l), a medián MIC érték meghatározásához, a legmagasabb vizsgált koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettük MIC értéknek (2 mg/l és 16 mg/l).

5.7. A *Candida parapsilosis* biofilmek echinocandinokkal és nikkomycin Z-vel szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata

A *C. parapsilosis* biofilmek CAS, MICA, illetve NIKZ iránti medián MIC értékei, valamint az antifungális szerek kombinációjakor tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások típusai az 5. táblázatban láthatóak. Eredményeink alapján, a NIKZ expozíció hatására, a CAS és MICA iránti medián MIC értékek 2-4-szeres, illetve 2-64-szeres csökkenést mutattak, az önmagában mért echinocandin medián MIC értékekhez viszonyítva. A kombinációkban mért NIKZ iránti medián MIC értékek esetében 2-512-szeres csökkenést észleltük, az önmagában mért NIKZ iránti medián MIC értékekhez képest (5. táblázat).

A vizsgált antifungális szerek között fennálló *in vitro* kölcsönhatások tekintetében elmondható, hogy a CAS NIKZ-vel történő kombinációja indifferens interakciót (FICI: 0,502-1) eredményezett mind az öt tesztelt *C. parapsilosis* biofilm esetében. Azonban megjegyzendő, hogy az öt izolátumból háromnál, a medián FICI a szinergista küszöbértékhez igen közeli volt (FICI: 0,502-0,508). Ezzel ellentétben, a MICA és NIKZ expozíció hatására, az ötből négy *C. parapsilosis* törzs markáns szinergizmust mutatott a FICI alapján (FICI:0,017-0,5) (5. táblázat).

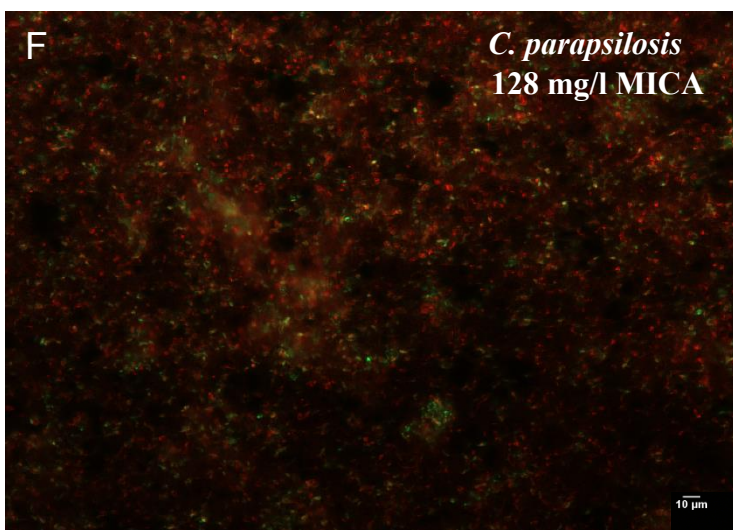
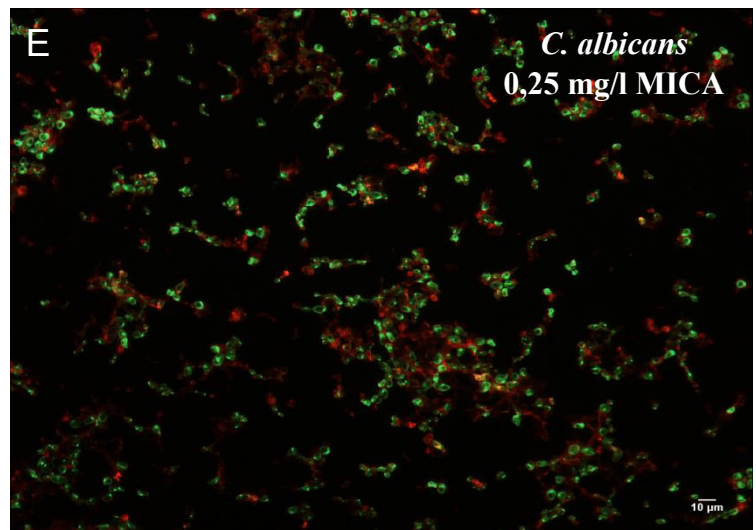
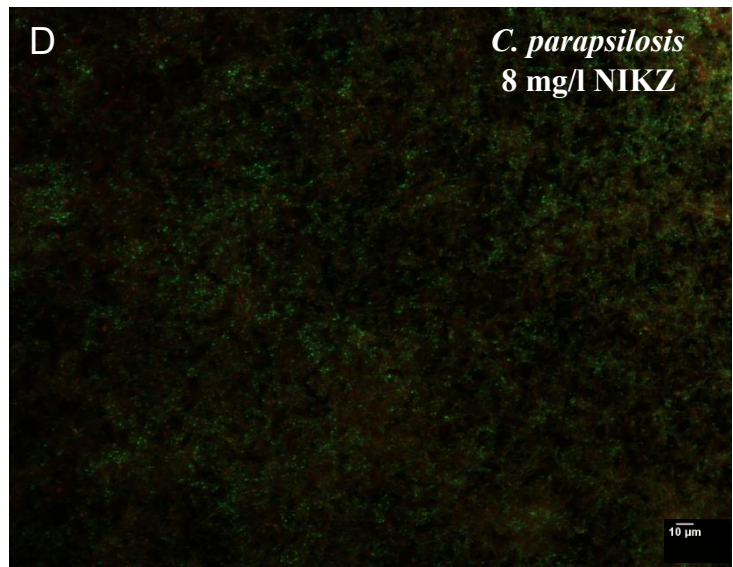
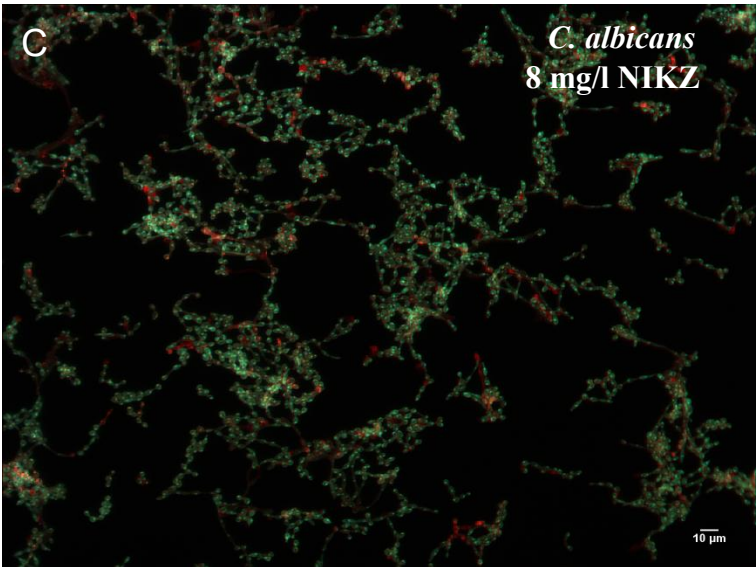
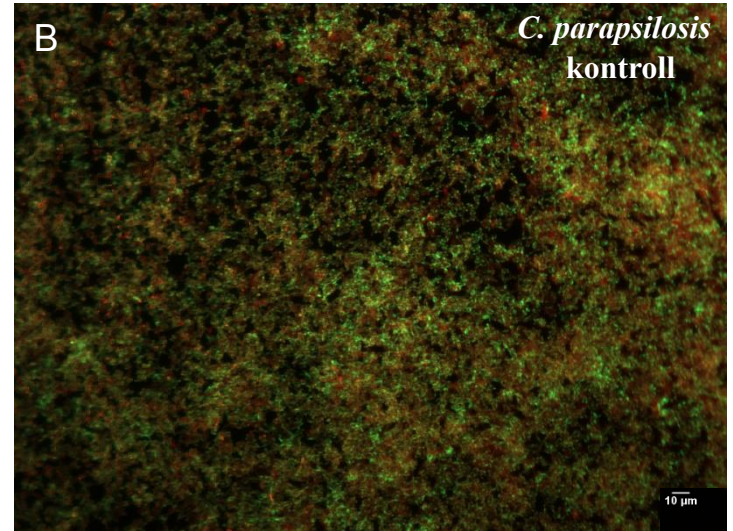
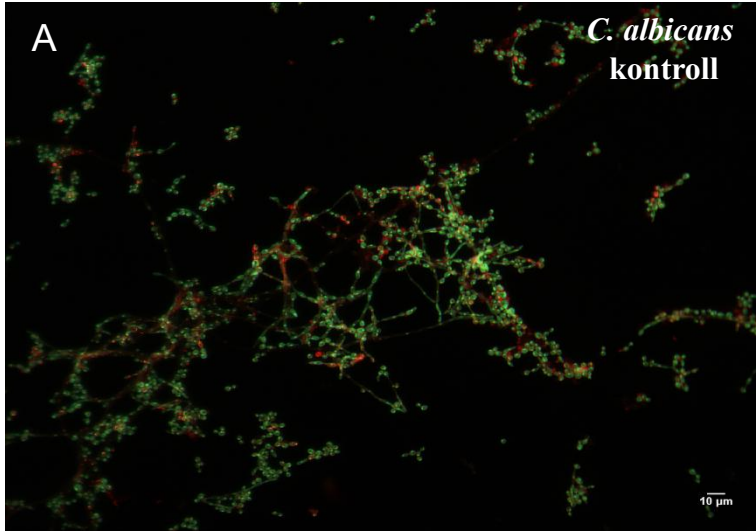
Szesszilis <i>C. parapsilosis</i> sejtek medián MIC értékei					Kölcsönhatások típusa	
Izolátum száma	Önmagában		Kombinációban		Gátló koncentrációhányad index (FICI) (Medián)	
	CAS (mg/l)	NIKZ (mg/l)	CAS (mg/l)	NIKZ (mg/l)	CAS	Interakció
17820	128	>8 ¹	64	0,12	0,508	indifferens
9613	128	>8 ¹	64	8	1	indifferens
17432	256	>8 ¹	128	0,03	0,502	indifferens
10252	128	>8 ¹	64	8	1	indifferens
27001	256	>8 ¹	64	0,03	0,502	indifferens
	MICA (mg/l)	NIKZ (mg/l)	MICA (mg/l)	NIKZ (mg/l)	MICA	Interakció
17820	>512 ¹	>8 ¹	16	0,5	0,078	szinergizmus
9613	>512 ¹	>8 ¹	32	4	0,5	szinergizmus
17432	>512 ¹	>8 ¹	512	8	1	indifferens
10252	>512 ¹	>8 ¹	16	0,03	0,017	szinergizmus
27001	>512 ¹	>8 ¹	16	0,03	0,017	szinergizmus

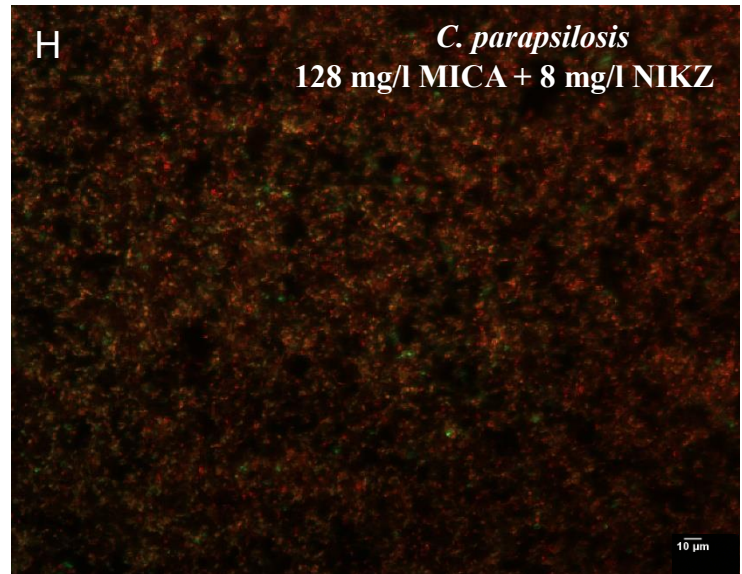
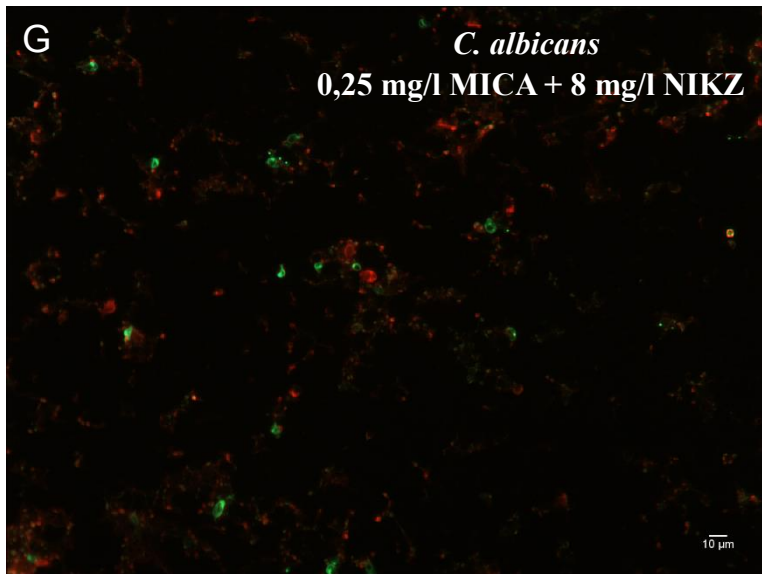
5. táblázat: A caspofungin, a micafungin és a nikkomycin Z iránti MIC értékek, valamint az echinocandinok és a nikkomycin Z kombinációja során tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások típusa, az általunk vizsgált *Candida parapsilosis* klinikai izolátumok szesszilis sejtjei esetében. A táblázatban a medián MIC értékek és a gátló koncentrációhányad index (FICI) medián adatai láthatóak.

¹ A vizsgált micafungin és nikkomycin Z koncentráció tartományon kívüli MIC értékei esetében (>512 mg/l és >8 mg/l), a medián MIC érték meghatározásához, a legmagasabb vizsgált koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettük a MIC értéknek (1024 mg/l és 16 mg/l).

5.8. A *Candida albicans* és a *Candida parapsilosis* biofilmek életképesség vizsgálata

A LIVE/DEAD életképesség assay segítségével egy-egy reprezentatív *C. albicans* (10431) és *C. parapsilosis* (17820) klinikai izolátumot vizsgáltunk, melyeknél az echinocandin és a NIKZ-expozíciót követően meghatároztuk az élő-holt sejt arányt. A Syto9 és a PI festésnek köszönhetően, az élő sejtek zöld, míg az életképtelenek piros színnel láthatóak az epifluoreszcens mikroszkóppal készített felvételeken. A kezeletlen kontroll *Candida* biofilmek esetében a várt szesszilis struktúrát tapasztaltuk, itt detektáltuk a legnagyobb élő sejt arányt (11/A és B ábra). A legmagasabb mértékű sejtpusztulást mindkét *Candida* species az echinocandinok és a NIKZ egyidejű alkalmazása során mutatta [0,25 mg/l (*C. albicans*) és 128 mg/l (*C. parapsilosis*) CAS/MICA + 8 mg/l NIKZ] (11/G és H ábra), összehasonlítva a kizárólag NIKZ (8 mg/l) (11/C és D ábra) és echinocandin [0,25 mg/l (*C. albicans*) és 128 mg/l (*C. parapsilosis*)] (11/E és F ábra) kezelésben részesülő *Candida* biofilmek életképesség vizsgálatának eredményeivel.





11. ábra: LIVE/DEAD életképesség assay egy-egy reprezentatív *Candida albicans* [10431] (A, C, E, G) és *Candida parapsilosis* [17820] (B, D, F, H) klinikai izolátum biofilmje esetében. Az élő sejtek zöld, míg az életképtelenek vörös színnel láthatóak az epifluoreszcens mikroszkóp segítségével készített felvételeken. A biofilmek létrehozásakor 1×10^6 Colony Forming Unit (CFU)/ml sejtszámot alkalmaztunk.

5.9. A planktonikus *Candida parapsilosis* sejtek echinocandinokkal és tyrosollal szembeni érzékenységének meghatározása, valamint az echinocandinok és a tyrosol közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata

A planktonikus *C. parapsilosis* sejtek CAS, MICA és TYR iránti medián MIC értékeit, illetve az echinocandinok és a TYR kombinációja során fennálló *in vitro* kölcsönhatásokat a 6. táblázat foglalja össze. A CLSI által meghatározott érzékenységi határértékek alapján, a kísérletekben vizsgált öt *C. parapsilosis* klinikai izolátum közül három (27001, 22482, 16879), valamint a referencia törzs (ATCC 22019) érzékenynek bizonyult a CAS-nal és a MICA-nal szemben. A további két *C. parapsilosis* klinikai izolátum CAS és MICA iránt mérsékelt érzékenységét tapasztaltuk (Pfaller és mtsai. 2011). A tesztelt TYR koncentrációk nem gyakoroltak gátló hatást a planktonikus sejtekre, az echinocandinok és a QS molekula közötti interakciók meghatározásakor pedig kizárólag indifferens kölcsönhatást észleltünk (6. táblázat).

Planktonikus <i>C. parapsilosis</i> sejtek medián MIC értékei					Kölcsönhatások típusa	
Izolátum száma	Önmagában		Kombinációban		Gátló koncentrációjárád index (FICI) (Medián)	
	CAS (mg/l)	TYR (µM)	CAS (mg/l)	TYR (µM)	CAS	Interakció
27001	2	>1000 ¹	2	3,9	1,003	indifferens
17820	4	>1000 ¹	2	15,62	0,847	indifferens
16977	4	>1000 ¹	4	3,9	1,011	indifferens
22482	2	>1000 ¹	1	31,25	0,687	indifferens
16879	2	>1000 ¹	2	7,8	1,003	indifferens
	MICA (mg/l)	TYR (µM)	MICA (mg/l)	TYR (µM)	MICA	Interakció
27001	2	>1000 ¹	2	62,5	0,7	indifferens
17820	2	>1000 ¹	2	125	0,859	indifferens
16977	4	>1000 ¹	2	500	0,755	indifferens
22482	2	>1000 ¹	1	1000	1,166	indifferens
16879	2	>1000 ¹	1	1000	1	indifferens

6. táblázat: A caspofungin, a micafungin és a tyrosol iránti medián MIC értékek, illetve az echinocandinok és a tyrosol kombinációja során tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások típusa, az általunk vizsgált *Candida parapsilosis* klinikai izolátumok és a tesztelt referencia törzs planktonikus sejtjei esetében. A táblázatban a medián MIC értékek, valamint a gátló koncentrációjárád index (FICI) medián adatai láthatóak.

¹ A vizsgált tyrosol koncentráció tartományon kívüli MIC értékei esetében (>1000 µM), a medián MIC érték meghatározásához, a legmagasabb vizsgált koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk a MIC értéknek (2000 µM).

5.10. A *Candida parapsilosis* biofilmek echinocandinokkal és tyrosollal szembeni érzékenységének meghatározása, illetve az echinocandinok és a tyrosol közötti *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata

A szeszilis *C. parapsilosis* sejtek echinocandinok és TYR iránti MIC érték eloszlását, továbbá a két szer között fennálló *in vitro* interakciókat a 7. táblázat szemlélteti. A *C. parapsilosis* klinikai izolátumok esetében, jelentősen magasabb (128 - \geq 512 mg/l) CAS és MICA iránti MIC értékeket tapasztaltunk, a planktonikus sejteknél megfigyelt eredményekhez képest (2-4 mg/l). A TYR-lal történő kombinációt követően, 2-16-szoros CAS, illetve 2-32-szeres MICA iránti medián MIC érték csökkenést láthatunk az önmagukban mért echinocandin iránti medián MIC értékekhez viszonyítva. Az echinocandinok és a TYR kombinációjakor, a TYR iránti MIC értékek 2-8-szoros csökkenését észleltük (7. táblázat).

A kölcsönhatások természetét illetően, a CAS és a TYR kombinációja során csupán két *C. parapsilosis* klinikai izolátum (27001, 17820) mutatott szinergista kölcsönhatást (FICI:0,312; FICI:0,298), míg a MICA és a TYR expozíciójának hatására kizárólag a 27001 számú törzs esetében tapasztaltunk szinergizmust (FICI:0,193) (7. táblázat).

Szesszilis <i>C. parapsilosis</i> sejtek medián MIC értékei					Kölcsönhatások típusa	
Izolátum száma	Önmagában		Kombinációban		Gátló koncentrációjárád index (FICI) (Medián)	
	CAS (mg/l)	TYR (μM)	CAS (mg/l)	TYR (μM)	CAS	Interakció
27001	256	>1000 ¹	32	250	0,312	szinergizmus
17820	128	>1000 ¹	8	250	0,298	szinergizmus
16977	128	>1000 ¹	64	250	0,584	indifferens
22482	512	>1000 ¹	32	1000	0,582	indifferens
16879	128	>1000 ¹	128	1000	1,02	indifferens
	MICA (mg/l)	TYR (μM)	MICA (mg/l)	TYR (μM)	MICA	Interakció
27001	512	>1000 ¹	32	250	0,193	szinergizmus
17820	>512 ¹	>1000 ¹	256	500	1,011	indifferens
16977	>512 ¹	>1000 ¹	512	1000	1,334	indifferens
22482	>512 ¹	>1000 ¹	128	1000	0,561	indifferens
16879	>512 ¹	>1000 ¹	32	500	0,53	indifferens

7. táblázat: A caspofungin, a micafungin és a tyrosol iránti medián MIC értékek, illetve az echinocandinok és a tyrosol kombinációja során tapasztalt *in vitro* kölcsönhatások típusa, az általunk vizsgált *Candida parapsilosis* klinikai izolátumok és a tesztelt referencia törzs planktonikus sejtjei esetében. A táblázatban a medián MIC értékek, valamint a gátló koncentrációjárád index (FICI) medián adatai láthatóak.

¹ A vizsgált tyrosol és micafungin koncentráció tartományon kívüli MIC értékei esetében (>1000 μM és >512 mg/l), a medián MIC érték meghatározásához, a legmagasabb vizsgált koncentrációnál egy hígítással nagyobb koncentrációt tekintettünk a MIC értéknek (2000 μM és 1024 mg/l).

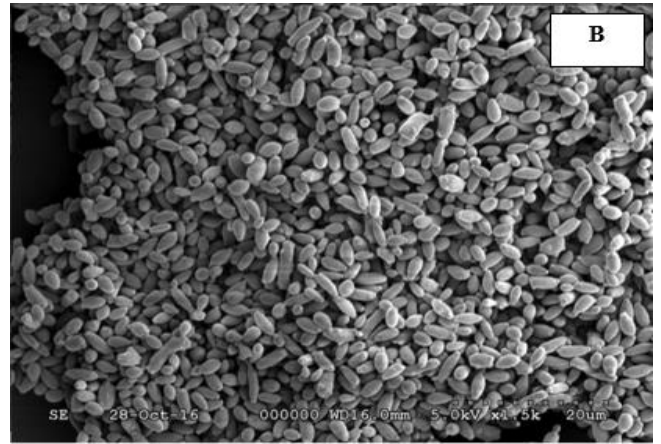
5.11. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

Kísérleteink során, a SEM vizsgálatokhoz egy reprezentatív *C. parapsilosis* klinikai izolátumot (16977) használtunk. A kezeletlen kontroll biofilm elektronmikroszkópos képén normál morfológiájú élesztő sejtek, valamint pszeudohifák láthatóak (12/A ábra). Az 1 mM-os TYR expozíció hatására a szesszilis populáció nagyobb sejtsűrűséget mutatott (12/B ábra), mint a kontroll biofilm. Az echinocandin (256 mg/l) kezelés eredményeképpen megnagyobbodott, kerek blasztospórákat figyeltünk meg ráncos felülettel, ám a sejtek egy részében nem történt morfológiai változás (12/C és E ábra). Ugyanakkor a 256 mg/l MICA/CAS + 1 mM TYR kombinációja szignifikánsan magasabb mértékű sejtkárosodást okozott (amit a kvantitatív csíraszám meghatározás is megerősített). Érdekes még megjegyezni, hogy a kizárólag echinocandin expozícióban részesülő (256 mg/l CAS/MICA) biofilm struktúrával ellentétben, jelentős számú rendellenes szerkezetű gomba sejtet detektáltunk a szesszilis populációban (12/D és F ábra).

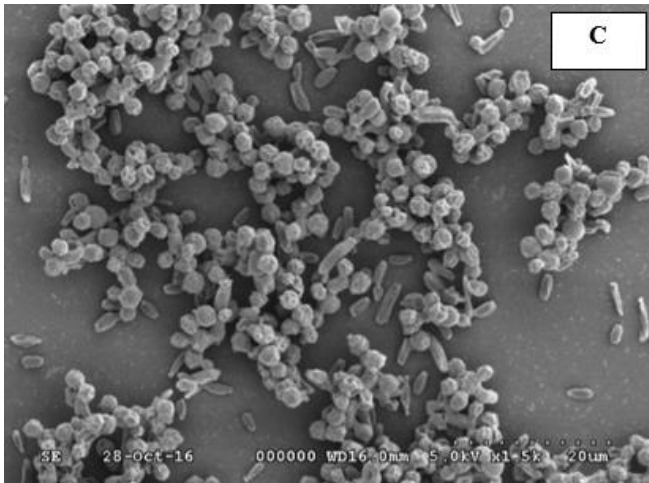
Kontroll



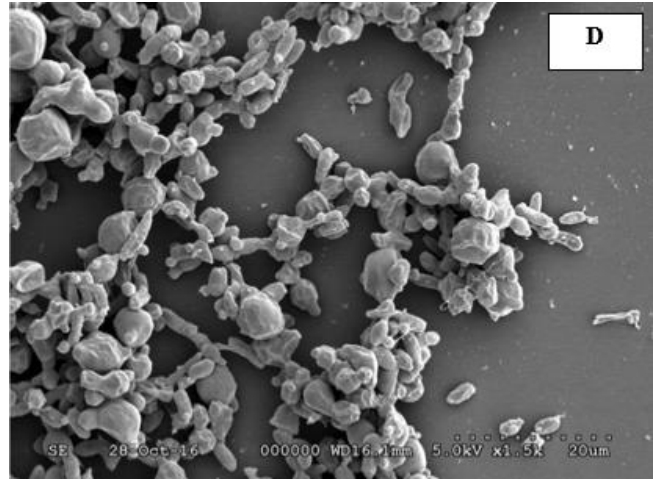
TYR (1 mM)



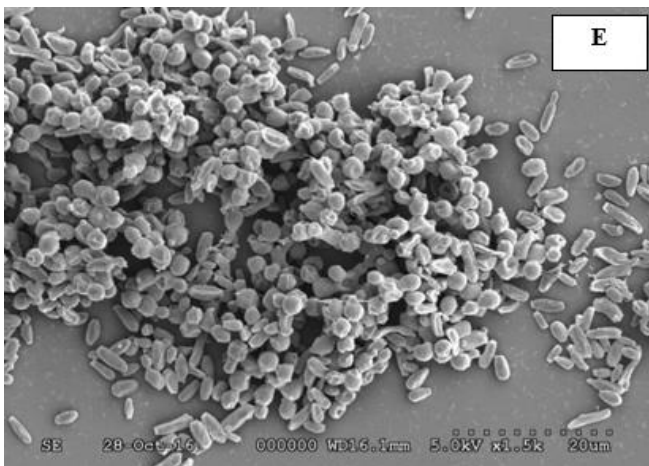
CAS (256 mg/l)



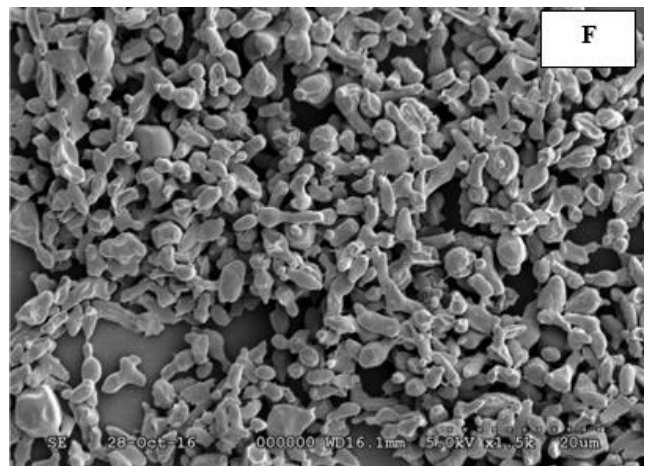
CAS (256 mg/l) + TYR (1 mM)



MICA (256 mg/l)



MICA (256 mg/l) + TYR (1 mM)



12. ábra: Egy reprezentatív *Candida parapsilosis* (16977) klinikai izolátum pásztázó elektronmikroszkópos felvételei. A biofilmek létrehozásakor 1×10^6 Colony Forming Unit (CFU)/ml sejtszámot alkalmaztunk.

5.12. A társszerzők közreműködése az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítésében

Az értekezés alapjául szolgáló három közlemény társszerzői az alábbi munkafolyamatokban vettek részt:

Nagy F, Tóth Z, Bozó A., Czeglédi, A, Rebenku I, Majoros L, Kovács R.: Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Medical Mycology*. 57 (5), 573-581, 2019.

- A kísérleti terv elkészítése: Nagy Fruzsina, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László
- A klinikai izolátumok azonosítása: Nagy Fruzsina, Bozó Aliz, Dr. Kovács Renátó
- A planktonikus és szesszilis *Candida* sejtek echinocandinok iránti MIC értékeinek a meghatározása normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérum jelenlétében: Nagy Fruzsina, Bozó Aliz, Tóth Zoltán
- A humán szérum biofilmképződésre kifejtett hatásának vizsgálata: Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán
- A *Candida* biofilmek életképességének vizsgálata epifluoreszcens mikroszkóp segítségével: Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Dr. Czeglédi András, Rebenku István
- Statisztikai analízis: Dr. Kovács Renátó
- Az eredmények összegzése: Nagy Fruzsina, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László
- Kézirat revízió: Dr. Kovács Renátó

Kovács R., Nagy F, Tóth Z, Bozó A, Balázs B, Majoros L.: Synergistic effect of nikkomycin Z with caspofungin and micafungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*. 69 (4), 271-278, 2019.

- A kísérleti terv elkészítése: Nagy Fruzsina, Dr. Kovács Renátó
- A klinikai izolátumok azonosítása: Nagy Fruzsina, Bozó Aliz, Balázs Bence

- A planktonikus és szesszilis *Candida* sejtek echinocandinokkal és NIKZ-vel szembeni MIC értékeinek meghatározása: Nagy Fruzsina, Bozó Aliz, Balázs Bence
- Az echinocandinok és a NIKZ *in vitro* kombinációjának vizsgálata „checkerboard” mikrodilúciós assay segítségével: Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán
- Az egyidejű echinocandin és NIKZ expozíció epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálata: Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Balázs Bence
- Statisztikai analízis: Dr. Kovács Renátó
- Eredmények összegzése: Nagy Fruzsina, Dr. Kovács Renátó, Tóth Zoltán, Dr. Majoros László
- Kézirat revízió: Dr. Kovács Renátó

Kovács R, Tóth Z, Nagy F, Daróczi L, Bozó A, Majoros L.: Activity of exogenous tyrosol in combination with caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* sessile cells. *Journal of Applied Microbiology*. 122 (6), 1529-1536, 2017.

- A kísérleti terv elkészítése: Nagy Fruzsina, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László
- A klinikai izolátumok azonosítása: Nagy Fruzsina, Bozó Aliz, Tóth Zoltán
- A planktonikus és szesszilis *C. parapsilosis* sejtek echinocandinokkal és tyrosollal szembeni érzékenységének meghatározása: Nagy Fruzsina, Bozó Aliz
- Az echinocandinok és a tyrosol *in vitro* kombinációjának vizsgálata *C. parapsilosis* biofilmek ellen, „checkerboard” mikrodilúciós assay segítségével: Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán
- Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok: Dr. Daróczi Lajos
- Statisztikai analízis: Dr. Kovács Renátó
- Eredmények összegzése: Nagy Fruzsina, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László
- Kézirat revízió: Dr. Kovács Renátó

6. Megbeszélés

Az epidemiológiai adatok alapján évente több, mint kétmillió véráramfertőzést regisztrálnak Európában, amelyek mortalitási aránya 13% és 20% között mozog. A véráramfertőzésben szenvedő betegek körülbelül 30%-a nem kap időben megfelelő antimikrobiális terápiát, ami jelentősen hozzájárul a kedvezőtlen prognózishoz (Pfaller és mtsai. 2020). A candidémia és az invazív candidiasisok egyéb formái vitathatatlanul a legelterjedtebb invazív mikózisok világszerte. A *Candida* speciesek évente mintegy 400.000 véráramfertőzés kialakulásáért felelősek, ahol a halálozási arány fajtól függően a felnőtteknél meghaladja a 40-50%-ot, míg gyerekek esetén elérheti akár a 30%-ot is (Du és mtsai. 2020; Kilic és mtsai. 2020). A candidémia incidenciája és prevalenciája elsősorban az immunszuppresszált betegek, valamint az intenzív terápia ellátásra szoruló páciensek körében emelkedett meg az utóbbi időben (Kilic és mtsai. 2020).

A leggyakrabban azonosított *Candida* species továbbra is a *C. albicans*, azonban a SENTRY program (Antimikrobiális Surveillance Program) eredményei alapján, a *C. albicans* által okozott invazív infekciók aránya az elmúlt 20 évben 57,4%-ról 46,4%-ra csökkent (Friedman és Schwartz 2019). Ezzel párhuzamosan, az utóbbi évtizedekben a non-*albicans* fajok (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) által kiváltott invazív megbetegedések előfordulása fokozatosan növekvő tendenciát mutat, amely többek között a nem megfelelő antifungális dozírozási stratégiának köszönhető (Du és mtsai. 2020).

A candidémia magas mortalitási arányához nagymértékben hozzájárul a különböző *Candida* fajok biofilmképző hajlama. Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy magasabb halálozási arány (51,2%) társul a biofilmképző törzsek általi véráramfertőzésekhez, mint a biofilmet nem képző *Candida* izolátumok által okozott invazív infekciókhoz (31,7%) (Tumbarello és mtsai. 2012). A biofilm képzés ténye mellett azok metabolikus aktivitása is szignifikánsan befolyásolhatja a mortalitási adatokat. Vitális és munkatársai eredményei alapján, a mérsékelt, illetve magas metabolikus aktivitással rendelkező biofilmképző törzsek a véráramfertőzés tekintetében szignifikánsan magasabb 30 napos mortalitási arányt eredményeztek az alacsony metabolikus aktivitással rendelkező *Candida* biofilmekkel összehasonlítva (Vitális és mtsai. 2020).

A különböző *Candida* speciesek a katéter-asszociált infekciók megközelítőleg 8%-áért felelősek. A *C. albicans* mellett, a *C. parapsilosis* a második legjelentősebb biofilmképző faj, többek között ez az oka annak, hogy a *C. parapsilosis* kiemelkedő szerepet játszik a katéterek és az egyéb beültethető orvosi eszközök kolonizációjában. Egy, a közelmúltban megjelent

tanulmány eredményei alapján, a *C. parapsilosis* törzsek 66,7%-a, míg a *C. albicans* izolátumok 20,8%-a bizonyult biofilmképzőnek, a vizsgált klinikai izolátumok közül. Továbbá a *C. parapsilosis* törzsek rendelkeztek a legnagyobb metabolikus aktivitással és biofilm tömeggel (Thomaz és mtsai. 2020).

A *Candida* biofilmek antifungális szerekkel szembeni csökkent érzékenységének köszönhetően a biofilm eredetű infekciók kezelése komoly kihívás lehet az egészségügy számára (Thomaz és mtsai. 2020). Az antifungális szerek limitált száma, a különböző gyógyszerek között fennálló interakciók, a toxicitás, az adagolás korlátai, valamint az eltérő rezisztencia mechanizmusok további terápiás nehézségeket jelentenek (Rauseo és mtsai 2020). Az IDSA (Infectious Diseases Society of America) jelenlegi ajánlása alapján, az invazív candidiasis kezelése során az echinocandinok tekinthetőek az első vonalbeli antifungális szereknek (Thomaz és mtsai. 2020). Korábbi *in vitro* és *in vivo* kutatások igazolták, hogy az echinocandinok és a különböző AMB készítmények (AMB lipid komplex, liposzomális AMB) képesek terápiás koncentrációt elérni a *Candida* biofilmek mátrixában, ezáltal a biofilm aktív antimikotikumok közé tartoznak, bár ez a hatékonyság a különböző *Candida* fajok ált képzett biofilmek esetében jelentősen különbözhet (Kean és Ramage 2019).

A fentebb leírt okok miatt a különböző antifungális szerek biofilm ellenes aktivitásának a vizsgálata központi fontossággal bír, hogy terápiás szempontból sikeres dozírozási stratégiát lehessen megfogalmazni a biofilm-asszociált fertőzések kezelésére. A biofilmek antifungális szerek iránti érzékenységének meghatározásához leggyakrabban az RPMI-1640 tápfolyadékot használják, amely ugyan jól modellezi az emberi szérum glükóz- és aminosav koncentrációját, de teljesen figyelmen kívül hagyja a szérumfehérjék hatását. Bár a planktonikus *Candida* sejtek antimikotikumok iránti érzékenységének vizsgálata során, az *in vivo* környezet modellezése érdekében korábban már többször is alkalmazták az 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközeget, jelenlegi ismereteink szerint nem áll rendelkezésünkre olyan szakirodalmi adat, amely az antifungális szerek *Candida* biofilmekkel szembeni hatékonyságát tesztelné humán szérum jelenlétében (Kovács és mtsai. 2021; Kovács és mtsai. 2017; Szilágyi és mtsai. 2012).

Kísérleteink során a *C. albicans* biofilmek ellen mindkét vizsgált echinocandin (CAS, MICA) a vártan megfelelően figyelemre méltó aktivitást mutatott RPMI-1640-ben. A *C. parapsilosis* biofilmek alacsonyabb érzékenységét tapasztaltuk a klinikailag releváns echinocandin koncentrációk mellett (a szérum csúcskoncentráció 50 mg CAS esetében 7,64 mg/l, míg 100

mg MICA esetében 8,8 mg/l) (Chen és mtsai. 2011), amely teljesen összhangban áll munkacsoportunk korábbi eredményeivel (Kovács és mtsai. 2016).

Korábbi tanulmányok alapján az *in vitro* biofilmképződést számos szérumkomponens befolyásolhatja. Ding és munkatársai a biofilmképződés kezdeti szakaszában (adhéziós fázis) már az alacsony szérum koncentráció (3%) mellett is szignifikáns csökkenést tapasztaltak a *C. albicans* adhéziós képességében, azonban még a magas humán szérum koncentráció (50%) sem volt hatással az adhézió iránt már elkötelezett szesszilis sejtekre másfél óra inkubáció után. Továbbá az ALS1 és ALS3 biofilm-asszociált adhéziós molekulák expressziós szintje is jelentős csökkenését mutatott humán szérum jelenlétében, amely magyarázatul szolgálhat a mérsékelt adhézióra és biofilmképződésre (Ding és mtsai. 2014). Ezzel ellentétben Samaranayake és munkatársai megfigyelték, hogy 3% humán szérum elősegíti a *C. albicans* biofilmek kialakulását (Samaranayake és mtsai. 2013). Hasonló eredményeket kapott Nikawa és kutatócsoportja, akik a humán szérummal előkezelt katéter felszíneken a *Candida* biofilmek fokozott növekedését észlelték (Nikawa és mtsai. 2000).

Eredményeink egyértelműen megerősítették a humán szérum biofilmellenes hatását. Vizsgálataink során az 50% humán szérummal kezelt *Candida* biofilmek epifluoreszcens felvételein alacsonyabb sejtsűrűséget, valamint a *C. parapsilosis* esetében jelentős mértékű holt sejt arányt detektáltunk, a szérummentes közegben tenyésztett biofilmeknél megfigyelt struktúrához képest. A tesztelt echinocandinok aktivitásában figyelemre méltó változást tapasztaltunk 50% humán szérum jelenlétében. A szesszilis *C. albicans* sejtek szignifikánsan csökkent érzékenységet mutattak az alacsony echinocandin koncentráció tartományban (0,015-1 mg/l). Ez az eredmény kulcsfontosságú lehet a gyerekek, illetve a malignus hematológiai kórképből szenvedő páciensek echinocandin terápiája során, mivel esetükben a szérumban elérhető maximális CAS és MICA koncentráció 0,5 és 1 mg/l között változhat (Walsh és mtsai. 2005; Lempers és mtsai. 2015).

A *C. parapsilosis* biofilmek ellen az általunk tesztelt echinocandinok fokozott aktivitást mutattak 50% humán szérum jelenlétében. Wiederhold és munkatársai 5% és 50% humán szérum expozíciót követően vizsgálták az ANI és a CAS hatékonyságát egy másik non-*albicans* faj a *C. glabrata* izolátumai ellen. Az ANI esetében jelentős mértékű aktivitás csökkenést tapasztaltak szérumos tápközegben, míg a CAS hatékonysága változatlan maradt, illetve az 5% humán szérum kis mértékben fokozta is azt (Wiederhold és mtsai. 2007).

Bár a CAS és a MICA egyaránt biofilm aktív antifungális szernek tekinthető, a humán szérum jelenlétében megfigyelt csökkent aktivitásuk hátterében a magas fehérjekötődési képességük

állhat (CAS: 97%; MICA: 99%) (Patil és Majumdar 2017). Mindkét vizsgált echinocandin elsősorban az albuminhoz mutat affinitást, valamint a MICA az alfa-1-glikoproteinhez is képes kapcsolódni (Paderu és mtsai. 2007). A „szabad-gyógyszer hipotézis” alapján csak a szabad gyógyszer-molekulák esetében beszélhetünk farmakológiai aktivitásról. Ennek értelmében a szérumfehérjékhez kötött echinocandin molekulák farmakológiailag inaktívak, így egy adott gombatorzs antimikotikumokkal szembeni érzékenysége jelentős mértékben csökkenhet (Ioannou és mtsai. 2016).

Az invazív gombafertőzések magas mortalitási arányának visszaszorításához, valamint az alkalmazott antifungális szerekkel szembeni tolerancia/rezisztencia terjedésének megfékezéséhez égető szükség lenne az eddigiektől eltérő gomba ellenes és biofilm ellenes kezelési módok kidolgozására. Bár jelenleg több új hatóanyag is fejlesztés alatt áll (rezafungin, ibrexafungerp, fosmanogepix, olorofim), további alternatív terápiás lehetőségek bevezetése jelentősen hozzájárulhat a terápiás kimenetel javításához. A legígéretesebb lehetőségek között kell említeni az elérhető antifungális szerek lehető legmagasabb dózisban történő alkalmazását, az antifungális „lock” terápiát (az intraluminális biofilm kezelésére magas dóziséű antimikotikumokat használnak a lezárt katéterben), illetve a kombináció alapú terápiákat (Kovács és Majoros 2020; Rauseo és mtsai 2020; Bidaud és mtsai. 2021).

A klinikai III. fázisban lévő NIKZ kitin-szintáz inhibítorként a gomba sejtfa kitin komponensét veszi célba. Korábbi kutatási eredmények már beszámoltak a NIKZ és a tradicionális antifungális szerek kombinációja során tapasztalt *in vitro* szinergista kölcsönhatásról *Candida* fajok ellen, azonban ezek a vizsgálatok kizárólag a planktonikus sejtekre fókuszáltak. Sandovsky-Losica és munkatársai, valamint Cheung és Hui eredményei alapján a CAS, a MICA, az ANI és a NIKZ kombinációja szinergista interakciót mutatott planktonikus *C. albicans* sejtek ellen (Sandovsky-Losica és mtsai. 2008; Cheung és Hui 2017). Utóbbi kutatócsoport *in vivo* is tanulmányozta az echinocandinok (MICA és ANI) és a NIKZ egyidejű alkalmazásának hatékonyságát echinocandin érzékeny, illetve rezisztens *C. albicans* törzsek esetében. A kísérletük során az echinocandin rezisztens izolátummal fertőzött egereknél a NIKZ-vel kiegészülő echinocandin terápia szignifikánsan növelte a túlélési arányt (Cheung és Hui 2017). Szilágyi és munkatársai 50% humán szérum jelenlétében szintén szinergista interakciót állapítottak meg a CAS és a NIKZ kombinációjakor (Szilágyi és mtsai. 2012). Egy 2011-es publikáció alapján, a CAS és a NIKZ egyidejű alkalmazása a véráramból származó *C. albicans* klinikai izolátumok esetében megfékezte az echinocandin által kiváltott paradox

növekedést, melynek eredményeképpen a két szer kombinációja ígéretes lehet a magas echinocandin koncentrációkat igénylő antifungális „lock” terápiában (Shields és mtsai. 2011).

Kísérleteink során, a tesztelt echinocandinok (CAS, MICA) és a NIKZ kombinációja szinergista kölcsönhatást mutatott, a *C. albicans*, valamint a *C. parapsilosis* biofilmek ellen. Jelenlegi ismereteink szerint, sajnos még nem áll rendelkezésünkre olyan összehasonlító szakirodalmi adat, amely a két gyógyszer egyidejű használatának biofilm ellenes aktivitását vizsgálná.

Az echinocandinok és a NIKZ közötti szinergista interakció hátterében feltehetőleg a sejtfal egyidejű glükán-és kitin szintézis gátlása áll, melynek fokozott ozmotikus stressz, illetve sejtlízis az eredménye (Cheung és Hui 2017). Az epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálat során tapasztalt biofilm szerkezeti változások tulajdonképpen megerősítik ezt a hipotézist, ugyanis az echinocandin és a NIKZ expozíciót követően detektáltunk legnagyobb arányban holt sejteket, továbbá a szeszilis sejtek szerkezete is ebben az esetben mutatta a legrendezetlenebb struktúrát. Érdekes módon, a MICA és a NIKZ esetében egy markánsabb szinergizmus látható, mint a CAS és a NIKZ kombinációjakor, mindkét *Candida* faj biofilmje ellen. A jelenség magyarázata lehet a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmekben megfigyelt, fokozott mértékű, MICA által indukált apoptózis. A MICA, egy a mitokondrium segítségével közvetített apoptotikus folyamatot indít el a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmekben, amely a metakaspázok proteolitikus aktivitását vonja maga után. A mitokondriális membránpotenciál összeomlásának következtében elinduló események DNS fragmentációhoz és ezáltal sejtpusztuláshoz vezetnek *Candida* sejtek esetében (Shirazi és Kontoyiannis 2015).

Az alternatív terápiás megközelítések közül az antifungális „lock” terápia egy innovatív megoldást jelenthet a jövőben a korlátozott véna készlettel rendelkező, katéter eredetű infekcióban szenvedő idősebb betegek számára, esetükben ugyanis nem megoldható az orvosi eszköz többszöri eltávolítása, valamint újra behelyezése (Mermel és mtsai. 2009). A bakteriális eredetű katéter-asszociált fertőzések kezelésére létezik az IDSA által jóváhagyott „lock” terápiás protokoll, azonban a *Candida* fajok esetében jelenleg nem rendelkezünk még hasonlóval (Walraven és Lee 2013). Az *in vitro*, illetve az *in vivo* adatok alapján, az echinocandinok és az AMB készítmények tűnnek a legígéretesebb kombináció alapú vagy gomba ellenes „lock” terápiás oldatnak (Kovács és Majoros 2020). Figyelembe véve azonban az antifungális szerek korlátozott számát, a tudomány egyre inkább olyan alternatív terápiás lehetőségek vizsgálata felé orientálódik, ahol a tradicionális antimikotikumokat, úgynevezett „nem gomba ellenes” szerekkel kombinálják (Rossato és mtsai. 2021).

Egy kifejezetten újszerű és innovatív terápiás megközelítés lehet a mikroorganizmusok QS rendszerébe történő beavatkozás. Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy a gombák által szekretált QS molekulák szuprafiziológiás koncentrációban történő alkalmazása negatívan befolyásolhatja a biofilmben jelenlévő sejtek közötti „kommunikációt”, ami a szesszilis sejtek csökkent szaporodását és növekedést vonja maga után (Kovács és Majoros 2020). Közelmúltbeli tanulmányokban már beszámoltak a FAR és a tradicionális antifungális szerek (AMB, FLU, echinocandinok) kombinációja esetén tapasztalt *in vitro* szinergista kölcsönhatásokról, a különböző *Candida* speciesek planktonikus és szesszilis sejtjei ellen (Cordeiro és mtsai. 2015; Katragkou és mtsai. 2015; Monteiro és mtsai. 2015; Kovács és mtsai. 2016). Az echinocandinok és a TYR kombinációjakor fennálló esetleges interakciókról azonban ezidáig nem rendelkezünk túl sok információval, ráadásul a *C. parapsilosis*-ra fókuszáló kombinációs vizsgálatok száma is erősen korlátozott.

Cordeiro és munkatársai korábban leírták, hogy a szuprafiziológiás koncentrációjú exogén TYR (2,5-5 mM/l) gátolja a planktonikus *C. albicans* és *C. tropicalis* sejtek növekedését (Cordeiro és mtsai. 2015). Kísérleteinkben a TYR nem akadályozta meg a planktonikus *C. parapsilosis* sejtek szaporodását, azonban megjegyzendő, hogy az általunk tesztelt legmagasabb TYR koncentráció (1000 μ M) is jelentősen alacsonyabb volt a Cordeiro és kutatócsoportja által alkalmazottnál. Cordeiro a tanulmányában arról is beszámolt, hogy az exogén TYR fokozza az a FLU és az AMB hatékonyságát a planktonikus és szesszilis *C. albicans*, illetve *C. tropicalis* sejtek ellen (Cordeiro és mtsai. 2015). Ezzel ellentétben, az echinocandinok (CAS, MICA) és a TYR kombinációjának vizsgálata során nem észleltünk szinergista kölcsönhatást a planktonikus *C. parapsilosos* sejtekkel szemben. A *C. parapsilosis* biofilmek esetében törzsfüggő szinergizmust tapasztaltunk az echinocandinok és a TYR expozíciójának hatására (a CAS-nál hatból kettő, míg a MICA-nál hatból egy izolátum esetében).

Shanmughapriya és munkatársai eredményei alapján, az önálló 40 μ M-os és 80 μ M-os TYR kezelés 25% és 50%-kal csökkentette az intrauterin fogamzásgátló eszközről származó *C. krusei* és *C. tropicalis* biofilmek képződését. Továbbá az AMB (4 mg/l), a TYR (80 μ M) jelenlétében megközelítőleg 90%-ban gátolta e két *Candida* species szesszilis populációjának kialakulását (Shanmughapriya és mtsai. 2014). Cordeiro és kutatócsoportja is hasonló eredményekről számoltak be, ugyanis a 125-250 mM közötti TYR koncentráció 24%-kal, valamint 30%-kal csökkentette a *C. albicans* és a *C. tropicalis* biofilmek metabolikus aktivitását, azonban ez erőteljesebb mértékű volt AMB-vel történő kombináció alkalmazásakor (35%) (Cordeiro és mtsai. 2015). A SEM segítségével végzett vizsgálataink során az 1 mM-os

TYR expozíció fokozta a biofilmben látható sejtsűrűséget a kontrollhoz viszonyítva, míg az echinocandinok (256 mg/l) és a TYR (1 mM) kombinációja okozta a legnagyobb mértékű sejtkárosodást, amelyet kvantitatív csíraszám meghatározással is sikerült megerősítenünk. A TYR gomba ellenes aktivitásának hátterében a fokozott oxidatív stressz mellett a virulenciához kapcsolódó gének repressziója, továbbá a növekedés, valamint a riboszóma biogenezis gátlása állhat (Kovács és Majoros 2020).

Kutatásaim egy részében, az invazív candidiasisok - ezáltal a biofilm eredetű infekciók-terápiája során is alkalmazott echinocandinok (CAS, MICA) aktivitását vizsgáltuk 50% humán szérumban jelenlétében, két klinikailag releváns, a katéter-asszociált fertőzésekben élenjáró *Candida* faj esetében. Megállapítottuk, hogy míg az echinocandinok *C. albicans* biofilmek elleni hatékonysága csökkent a humán szérumban expozíciót követően, addig a szeszilis *C. parapsilosis* sejtekkel szemben mindkét echinocandin fokozott aktivitást mutatott. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy az echinocandinok (CAS és MICA) hatékonysága növelhető-e a NIKZ-vel és TYR-lal történő kombinációnak köszönhetően, a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek ellen. Eredményeink alapján, mindkét vegyület potenciális adjuváns lehet a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által okozott katéter eredetű infekciók alternatív terápiája során (pl. antifungális „lock” terápia). Eredményeink megerősítéséhez a jövőben nélkülözhetetlenek az *in vivo* katéter-modell vizsgálatok, melyek alátámaszthatják *in vitro* kísérleteinket.

A kísérletek során kapott új eredményeink:

1. Ötven százalék humán szérumban jelenlétében a szeszilis *C. albicans* sejtek esetében a CAS és a MICA jelentős aktivitás csökkenést mutatott, míg a *C. parapsilosis* biofilmekkel szembeni echinocandin aktivitás meglepetésre fokozódott.
2. Az echinocandinok (CAS, MICA) NIKZ-vel történő kombinációjakor szinergista kölcsönhatást észleltünk a tesztelt *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek ellen.
3. Az echinocandinok (CAS, MICA) és a TYR egyidejű alkalmazása során törzsfüggő szinergizmust tapasztaltunk az egyik legjelentősebb, non-*albicans* faj, a *C. parapsilosis* biofilmjei ellen. Eredményeink, valamint az irodalmi adatok alapján a TYR szinergizáló aktivitása faj- illetve törzsfüggő módon jelenhet meg az egyes *Candida* fajok esetében.

7. Összefoglalás

A biofilm-asszociált infekciók terápiás nehézségei olyan innovatív kezelési stratégiák kidolgozását teszik indokolttá, amelyek segítségével a későbbiekben a szeszilis populáció eradikálása hatékonyabban történhet. A caspofungin és a micafungin biofilm ellenes aktivitását 50% humán szérummal kiegészített tápközegben vizsgáltuk *Candida albicans* és *C. parapsilosis* biofilmekkel szemben. A *C. albicans* biofilmek esetében az 50%-os humán szérum expozíció hatására csökkent echinocandin aktivitást figyeltünk meg 0,015-1 mg/l közötti koncentráció tartományban ($P < 0,05$). Ezzel ellentétben az echinocandinok fokozott *C. parapsilosis* biofilm elleni hatékonyságot mutattak szérum jelenlétében, már a legalacsonyabb tesztelt gyógyszer koncentrációtól kezdődően (0,015 mg/l). További kísérleteink során a kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúció segítségével a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmek caspofungin, micafungin, nikkomycin Z, valamint tyrosol elleni érzékenységét vizsgáltuk önmagukban, illetve kombinációkban. Az *in vitro* kölcsönhatások megállapítására a gátló koncentrációhányad indexet alkalmaztuk (FICI). A nikkomycin Z expozíció hatására a caspofungin és a micafungin iránti medián minimális gátló koncentráció (MIC) értékek 2-16-szoros, illetve 2-128-szoros csökkenést mutattak az önmagában mért MIC értékekhez viszonyítva. Az echinocandinok és a tyrosol kombinációja során a *C. parapsilosis* biofilmek caspofungin és micafungin iránti medián MIC értékei 128-512 mg/l és 512->512 mg/l között változtak. A tyrosollal történő egyidejű alkalmazást követően ezek a medián MIC értékek 8-128 mg/l-re és 32-512 mg/l-re csökkentek. A caspofungin és a nikkomycin Z kombinációja minden *C. parapsilosis* klinikai izolátum esetében indifferens interakciót (FICI: 0,502-1), míg a micafungin és a nikkomycin Z expozíció a legtöbb törzsnél szinergizmust (FICI: 0,017-0,5) eredményezett. A *C. albicans* biofilmek vizsgálatakor az echinocandinok és a nikkomycin Z egyidejű alkalmazása során többnyire szinergista kölcsönhatást tapasztaltunk (FICI: 0,037-0,245). Az echinocandin és a tyrosol expozíció hatására törzsfüggő módon észleltünk szinergizmust (FICI: 0,193-0,312), amelyeket pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is megerősítettünk. Eredményeinket összefoglalva a humán szérum jelenlétében végzett biofilm érzékenységi vizsgálatok jobban modellezik az *in vivo* környezetet, ezért alkalmazásuk abszolút indokolt lehet a farmakodinámiai vizsgálatokban. A kombináció alapú kísérleteink alapján, a jövőben a nikkomycin Z és a tyrosol egy potenciális adjuváns lehet a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által kiváltott biofilm-asszociált fertőzések alternatív terápiája során, azonban ennek megerősítéséhez további *in vivo* vizsgálatokra van szükség.

8. Summary

The therapeutic difficulties of biofilm-associated infections highlight the importance of the development of innovative treatment strategies to eradicate effectively these sessile population. The anti-biofilm activity of caspofungin and micafungin against *Candida albicans* and *C. parapsilosis* biofilms was investigated in RPMI-1640 with 50% human serum. In the case of *C. albicans* biofilms, reduced echinocandin activity was observed in the presence of serum at concentrations ranging from 0.015 to 1 mg/l ($P < 0.05$). In contrast, echinocandins showed increased activity against *C. parapsilosis* biofilms in the presence of serum from the lowest drug concentration tested (0.015 mg/l). In further experiments, the susceptibility of *C. albicans* and *C. parapsilosis* biofilms to caspofungin, micafungin, nikkomycin Z and tyrosol alone or in combination was investigated using two-dimensional "checkerboard" microdilution. The nature of the *in vitro* interactions was evaluated using fractional inhibitory concentration index (FICI) determination. Nikkomycin Z resulted in 2- to 16-fold and 2- to 128- fold decrease of the median median minimum inhibitory concentration values (MICs) for caspofungin and micafungin respectively. When echinocandins and tyrosol were combined, tyrosol caused 1–16- fold and 2–32-fold decrease in median caspofungin and micafungin MICs respectively. The combination of caspofungin and nikkomycin Z yielded an indifferent interaction against all *C. parapsilosis* isolates (FICI: 0.502-1). Based on FICI values, a striking synergistic interaction was observed for four out of five *C. parapsilosis* isolates after micafungin with nikkomycin Z exposure (FICI: 0.017–0.5). Synergistic interaction was observed for most of the concomitant applications of echinocandins and nikkomycin Z (FICI: 0.037-0.245) against *C. albicans*. Synergism was observed in a strain-dependent manner upon exposure to echinocandin and tyrosol (FICI: 0.193-0.312), which was confirmed by scanning electron microscopy too. In summary, our results suggest that biofilm susceptibility studies in the presence of human serum can mimick the *in vivo* environment and therefore its application in pharmacodynamic studies are absolutely justified. Based on our combination-based experiments, nikkomycin Z and tyrosol could be a potential adjuvant in the alternative therapy of biofilm-associated infections caused by *C. albicans* and *C. parapsilosis*; nevertheless, further *in vivo* studies are absolutely needed to confirm these *in vitro* results.

9. Irodalomjegyzék

Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol.* 2012, 50(4):337-45.

Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell.* 2006, 5(10):1770-9.

Anter J, Tasset I, Demyda-Peyrás S, Ranchal I, Moreno-Millán M, Romero-Jimenez M, Muntané J, Luque de Castro MD, Muñoz-Serrano A, Alonso-Moraga Á. Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product "alperujo", hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014, 15;772:25-33.

Babich H, Visioli F. *In vitro* cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Farmacol.* 2003, 58(5):403-7.

Basas J, Morer A, Ratia C, Martín MT, Del Pozo JL, Gomis X, Rojo-Molinero E, Torrents E, Almirante B, Gavaldà J. Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an antifungal-lock technique. *J Antimicrob Chemother.* 2016, 71(10):2895-901.

Ben-Ami R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. *J Fungi (Basel).* 2018, 4(3):97.

Bhatt M, Sarangi G, Paty BP, Mohapatra D, Chayani N, Mahapatra A, Das P, Sahoo D. Biofilm as a virulence marker in *Candida* species in Nosocomial blood stream infection and its correlation with antifungal resistance. *Indian J Med Microbiol.* 2015, 33:112-4.

Bidaud AL, Schwarz P, Herbreteau G, Dannaoui E. Techniques for the Assessment of *In Vitro* and *In Vivo* Antifungal Combinations. *J Fungi (Basel).* 2021, 7(2):113.

Bigagli E, Cinci L, Paccosi S, Parenti A, D'Ambrosio M, Luceri C. Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2017, 43:147-155.

Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front Med (Lausanne)*. 2018, 13;5:28.

Cernáková L, Light C, Salehi B, Rogel-Castillo C, Victoriano M, Martorell M, Sharifi-Rad J, Martins N, Rodrigues CF. Novel Therapies for Biofilm-Based *Candida* spp. Infections. *Adv Exp Med Biol*. 2019, 1214:93-123.

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.

Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008, 3(12):1909-24.

Chandra J, McCormick TS, Imamura Y, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun*. 2007, 75(5):2612-20.

Chaudhary PM, Tupe SG, Deshpande MV. Chitin synthase inhibitors as antifungal agents. *Mini Rev Med Chem*. 2013, 13(2):222-36.

Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs*. 2011,1;71(1):11-41.

Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101(14):5048-52.

Cheung YY, Hui M. Effects of Echinocandins in Combination with Nikkomycin Z against Invasive *Candida albicans* Bloodstream Isolates and the fks Mutants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017, 61(11):e00619-17.

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.

Cordeiro RA, Teixeira CE, Brilhante RS, Castelo-Branco DS, Alencar LP, de Oliveira JS, Monteiro AJ, Bandeira TJ, Sidrim JJ, Moreira JL, Rocha MF. Exogenous tyrosol inhibits

planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Res.* 2015, 15(4):fov012.

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.

Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb Pathog.* 2018, 117:128-138.

de la Puerta R, Martínez Domínguez ME, Ruiz-Gutiérrez V, Flavill JA, Hoult JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitroergic neurotransmission. *Life Sci.* 2001, 69(10):1213-22.

Desai JV, Mitchell AP, Andes DR. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014, 4(10):a019729.

De Sordi L, Mühlischlegel FA. Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Res.* 2009, 9(7):990-9.

Ding X, Liu Z, Su J, Yan D. Human serum inhibits adhesion and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* 2014, 14:80.

Donlan RM, Pipes WO, Yohe TL. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. *Water Res.* 1994, 28:1497-1503.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003,11(1):30-6.

Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.* 2020, 22;16(10):e1008921.

Fernández-Rivero ME, Del Pozo JL, Valentín A, de Diego AM, Pemán J, Cantón E. Activity of Amphotericin B and Anidulafungin Combined with Rifampicin, Clarithromycin, Ethylenediaminetetraacetic Acid, N-Acetylcysteine, and Farnesol against *Candida tropicalis* Biofilms. *J Fungi (Basel).* 2017, 3(1):16.

Free SJ. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet.* 2013, 81:33-82.

Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J Fungi (Basel)*. 2019, 5(3):67.

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.

Gonzalez-Lara MF, Ostrosky-Zeichner L. Invasive Candidiasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020, 41(1):3-12.

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011, 10(2):112-22.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016, 18(5):310-321.

Hawksworth DL, Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol. Spectr*. 2017, 5(4).

Holland LM, Schröder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grózer Z, Gácsér A, Ames L, Haynes K, Higgins DG, Butler G. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2014, 10(9):e1004365.

Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001, 67(7):2982-92.

Höfken T. In book: *Microbial pathogenesis: Infection and immunity* (pp.33) Chapter: *Candida* and candidiasis. Springer. 2013.

Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol*. 2016, 54(3):149-69.

Ioannou P, Andrianaki A, Akoumianaki T, Kyrmizi I, Albert N, Perlin D, Samonis G, Kontoyiannis DP, Chamilos G. Albumin Enhances Caspofungin Activity against *Aspergillus*

Species by Facilitating Drug Delivery to Germinating Hyphae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, 7;60(3):1226-33.

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.

Jakab Á, Tóth Z, Nagy F, Nemes D, Bácskay I, Kardos G, Emri T, Pócsi I, Majoros L, Kovács R. Physiological and Transcriptional Responses of *Candida parapsilosis* to Exogenous Tyrosol. *Appl Environ Microbiol.* 2019, 85(20):e01388-19.

Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A, *Candida auris* Incident Management Team, Manuel R, Brown CS. *Clin Microbiol Rev.* 2017, 31(1):e00029-17.

Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C, Meletiadis J, Jabra-Rizk MA, Petraitis V, Roilides E, Walsh TJ. *In vitro* interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2015, 70(2):470-8.

Katragkou A, Kruhlak MJ, Simitsopoulou M, Chatzimoschou A, Taparkou A, Cotten CJ, Paliogianni F, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, Walsh TJ, Roilides E. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J Infect Dis.* 2010, 201(12):1941-9.

Kean R, Ramage G. Combined antifungal resistance and biofilm tolerance: the global threat of *Candida auris*. *mSphere.* 2019, 31;4(4).

Kilic AU, Basaga SM, Cevahir F, Cakir O, Doganay M, Alp E. Risk prediction for candidemia in surgical intensive care unit patients. *North Clin Istanb.* 2020, 7(4):348-353.

Kim MK, Park HS, Kim CH, Park HM, Choi W. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast.* 2002, 19(4):341-9.

Koehler P, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild MJGT, Bohlius J, Wisplinghoff H, Vehreschild JJ. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. 2019, 25(10):1200-1212.

- Kovács R, Bozó A, Gesztelyi R, Domán M, Kardos G, Nagy F, Tóth Z, Majoros L.** Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2016, 47(4):304-10.
- Kovács R, Majoros L.** Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms. *J Fungi (Basel)*. 2020, 6(3):99.
- Kovács R, Saleh Q, Bozó A, Tóth Z, Gesztelyi R, Kardos T, Kardos G, Takacs I, Majoros L.** Killing Activity of Micafungin Against *Candida albicans*, *C. dubliniensis* and *Candida africana* in the Presence of Human Serum. *Mycopathologia*. 2017, 182(11-12):979-987.
- Kovács R, Tóth Z, Locke JB, Forgács L, Kardos G, Nagy F, Borman AM, Majoros L.** Comparison of *In Vitro* Killing Activity of Rezafungin, Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against Four *Candida auris* Clades in RPMI-1640 in the Absence and Presence of Human Serum. *Microorganisms*. 2021, 9(4):863.
- Kruppa M.** Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*. 2009, 52(1):1-10.
- Larkin EL, Dharmaiah S, Ghannoum MA.** Biofilms and beyond: expanding echinocandin utility. *J Antimicrob Chemother*. 2018, 73:i73-i81.
- Larwood DJ.** Nikkomycin Z-Ready to Meet the Promise?. *J Fungi (Basel)*. 2020, 6(4):261.
- Lempers VJ, Schouten JA, Hunfeld NG, Colbers A, van Leeuwen HJ, Burger DM, Verweij PE, Pickkers P, Brüggemann RJ.** Altered Micafungin Pharmacokinetics in Intensive Care Unit Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015, 59(8):4403-9.
- Lewis RE.** Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc*. 2011, 86(8):805-17.
- Lewis K.** Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*. 2007, 5(1):48-56.
- Loh BS, Ang WH.** "Illuminating" Echinocandins' Mechanism of Action. *ACS Cent Sci*. 2020, 6(10):1651-1653.
- Lone SA, Ahmad A.** *Candida auris*-the growing menace to global health. *Mycoses*. 2019, 62(8):620-637.

Magill SS, O’Leary E, Janelle SJ, Thompson DL, Dumyati G, Nadle J, Wilson LE, Kainer MA, Lynfield R, Greissman S, Ray SM, Beldavs Z, Gross C, Bamberg W, Sievers M, Concannon C, Buhr N, Warnke L, Maloney M, Ocampo V, Brooks J, Oyewumi T, Sharmin S, Richards K, Rainbow J, Samper M, Hancock EB, Leaprot D, Scalise E, Badrun F, Phelps R, Edwards JR, Emerging Infections Program Hospital Prevalence Survey Team. Changes in Prevalence of Health Care-Associated Infections in U.S. Hospitals. *N Engl J Med.* 2018, 379(18):1732-1744.

Mallick EM, Bennett RJ, Sensing of the microbial neighborhood by *Candida albicans*. *PLoS Pathogens.* 2013, 9(10):e1003661.

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.

Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet.* 2013, 59(4):251-64.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013,4(2):119–28.

Mehmood A, Liu G, Wang X, Meng G, Wang C, Liu Y. Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. *Molecules.* 2019, 24(10):1950.

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.

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.

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.

Modrzewska B, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol.* 2015, 61(1):3-9.

Monteiro DR, Feresin LP, Arias LS, Barao VA, Barbosa DB, Delbem AC. Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. *Med Mycol.* 2015, 53(7):656-65.

Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015, 6(4):338-46.

Mroczynska M, Brillowska-Dabrowska A. Review on Current Status of Echinocandins Use. *Antibiotics (Basel).* 2020, 9(5):227.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003, 67(3):400-28.

Nagy F, Vitális E, Jakab Á, Borman AM, Forgács L, Tóth Z, Majoros L, Kovács R. *In vitro* and *in vivo* Effect of Exogenous Farnesol Exposure Against *Candida auris*. 2020, 20;11:957.

Nash EE, Peters BM, Palmer GE, Fidel PL, Noverr MC. Morphogenesis is not required for *Candida albicans-Staphylococcus aureus* intra-abdominal infection-mediated dissemination and lethal sepsis. *Infect Immun.* 2014, 82(8):3426-35.

Nikawa H, Nishimura H, Makihira S, Hamada T, Sadamori S, Samaranayake LP. Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses.* 2000, 43:139–143.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev of Microbiol.* 2015, 69:71–92.

O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp.* 2011, 30;(47):2437.

Padder SA, Prasad R, Shah AH. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiol Res.* 2018, 210:51-58.

Paderu P, Garcia-Effron G, Balashov S, Delmas G, Park S, Perlin DS. Serum differentially alters the antifungal properties of echinocandin drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51(6):2253-6.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018, 11;4:18026.

Patil A, **Majumdar** S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol*. 2017, 69(12):1635-1660.

Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*. 2007, 10(3):121-30.

Pfaller MA, Carvalhaes CG, Smith CJ, Diekema DJ, Castanheira M. Bacterial and fungal pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2012-2017). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020, 97(2):115016.

Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS; CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat*. 2011, 14(3):164-76.

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.

Polke M, Leonhardt I, Kurzai O, Jacobsen ID. Farnesol signalling in *Candida albicans* - more than just communication. *Crit Rev Microbiol*. 2018, 44(2):230-243.

Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*. 2015, 91:139-235.

Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev. Iberoam. Micol*. 2014, 31(1):42-48.

Rauseo AM, Coler-Reilly A, Larson L, Spec A. Hope on the Horizon: Novel Fungal Treatments in Development. *Open Forum Infect Dis*. 2020, 7(2):ofaa016.

Rigacci S, **Stefani** M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Int J Mol Sci*. 2016, 17(6):843.

Rodrigues CF, Cernáková L. Farnesol and Tyrosol: Secondary Metabolites with a Crucial quorum-sensing Role in *Candida* Biofilm Development. *Genes (Basel)*. 2020, 11(4):444.

Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014, 33(5):673-88.

Rossato L, Camargo Dos Santos M, Vitale RG, de Hoog S, Ishida K. Alternative treatment of fungal infections: Synergy with non-antifungal agents. *Mycoses*. 2021, 64(3):232-244.

Roux D, Gaudry S, Dreyfuss D, El-Benna J, de Prost N, Denamur E, Saumon G, Ricard JD. *Candida albicans* impairs macrophage function and facilitates *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rat. *Crit Care Med*. 2009, (3):1062-7.

Samaranayake YH, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK, Samaranayake LP. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PLoS One*. 2013, 8(5):e62902.

Sandovsky-Losica H, Shwartzman R, Lahat Y, Segal E. Antifungal activity against *Candida albicans* of nikkomycin Z in combination with caspofungin, voriconazole or amphotericin B. *J Antimicrob Chemother*. 2008, 62, 62(3):635-637.

Sebaa S, Boucherit-Otmani Z, Courtois P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. *Mol Med Rep*. 2019, 19(4):3201-3209.

Shanmughapriya S, Sornakumari H, Lency A, Kavitha S, Natarajaseenivasan K. Synergistic effect of amphotericin B and tyrosol on biofilm formed by *Candida krusei* and *Candida tropicalis* from intrauterine device users. *Med Mycol*. 2014, 52(8):853-61.

Shareck J, Belhumeur P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryot Cell*. 2011, 10(8):1004-12.

Shields RK, Nguyen MH, Du C, Press E, Cheng S, Clancy CJ. Paradoxical effect of caspofungin against *Candida* bloodstream isolates is mediated by multiple pathways but eliminated in human serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 55(6):2641-7.

Shirazi F, Kontoyiannis DP. Micafungin triggers caspase-dependent apoptosis in *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms, including caspofungin non-susceptible isolates. *Virulence*. 2015, 6(4):385-94.

Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2009/a, 299(1):1-8.

Shirtliff 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/b, 53(6):2392-401.

Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. Mycoses. 2014, 57(1):1-11.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012, 36(2):288-305.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Med Mycol. 2009, 47(7):681-9.

Simitsopoulou M, Peshkova P, Tasina E, Katragkou A, Kyrpitzis D, Velegaki A, Walsh TJ, Roilides E. Species-specific and drug-specific differences in susceptibility of *Candida* biofilms to echinocandins: characterization of less common bloodstream isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2013, 57(6):2562-70.

Sudbery S, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004, 12(7):317-24.

Szilágyi J, Földi R, Bayegan S, Kardos G, Majoros L. Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology. J Chemother. 2012, 24(1):18-25.

Talapko J, Juzbaši M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Čučić, Kotris I, and Škrlec I. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. J Fungi (Basel). 2021, 22;7(2):79.

Thomaz DY, Melhem MSC, de Almeida Júnior JN, Benard G, Del Negro GMB. Lack of efficacy of echinocandins against high metabolic activity biofilms of *Candida parapsilosis* clinical isolates. Braz J Microbiol. 2020, 51(3):1129-1133.

Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011, 10(9):1173-82.

Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi 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.

Vitális E, Nagy F, Tóth Z, Forgács L, Bozó A, Kardos G, Majoros L, Kovács R. *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. 2020, 63(4):352-360.

Vrioni G, Matsiota-Bernard P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J Infect*. 2001, 42(1):50-6.

Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, Wilson D, Hube B. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One*. 2012, 7(5):e36952.

Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*. 2011, 6(2):e17046.

Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2019, 52:1-6.

Walraven CJ, Lee SA. Antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013, 57(1):1-8.

Walsh TJ, Adamson PC, Seibel NL, Flynn PM, Neely MN, Schwartz C, Shad A, Kaplan SL, Roden MM, Stone JA, Miller A, Bradshaw SK, Li SX, Sable CA, Kartsonis NA. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of caspofungin in children and adolescents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49(11):4536–4545.

Westwater C, Balish E, Schofield DA. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot Cell*. 2005, 4(10):1654-61.

Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, Molina D, Olivo M, Graybill JR. *In vivo* efficacy of anidulafungin and caspofungin against *Candida glabrata* and association with *in vitro* potency in the presence of sera. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51(5):1616-20.

Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol.* 2016, 56(5):440-7.

Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014, 13;10:95-105.



Nyilvántartási szám: DEENK/357/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

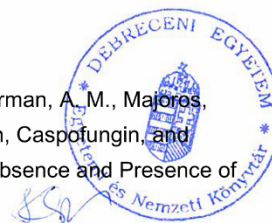
Jelölt: Nagy Fruzsina
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10063834

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, F.**, Tóth, Z., Bozó, A., Czeglédi, A., Rebenku, I., Majoros, L., Kovács, R. L.: Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.
Med. Mycol. 57 (5), 573-581, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy108>
IF: 2.822
2. Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Bozó, A., Balázs, B., Majoros, L.: Synergistic effect of nikkomycin Z with caspofungin and micafungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.
Lett. Appl. Microbiol. 69 (4), 271-278, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13204>
IF: 2.173
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 *Candida parapsilosis* sessile cells.
J. Appl. Microbiol. 122 (6), 1529-1536, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13452>
IF: 2.16

További közlemények

4. Kovács, R. L., Tóth, Z., Locke, J. B., Forgács, L., Kardos, G., **Nagy, F.**, Borman, A. M., Majoros, L.: Comparison of In Vitro Killing Activity of Rezafungin, Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against Four *Candida auris* Clades in RPMI-1640 in the Absence and Presence of Human Serum.
Microorganisms. 9 (4), 1-12, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9040863>
IF: 4.152 (2019)





5. **Nagy, F.**, Tóth, Z., Nyikos, F., Forgács, L., Jakab, Á., Borman, A. M., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro and in vivo interaction of caspofungin with isavuconazole against *Candida auris* planktonic cells and biofilms.
Med. Mycol. [Epub ahead of print], 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myab032>
IF: 2.822 (2019)
6. Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Forgács, L., Tóth, L., Váradi, G., Tóth, G. K., Vadászi, K., Borman, A. M., Majoros, L., Galgóczy, L.: The Neosartorya fischeri Antifungal Protein 2 (NFAP2): a New Potential Weapon against Multidrug-Resistant *Candida auris* Biofilms.
Int. J. Mol. Sci. 22 (2), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020771>
IF: 4.556 (2019)
7. Balázs, B., Tóth, Z., **Nagy, F.**, Kovács, R. L., Tóth, H., Nagy József, B., Tóth, Á., Szarka, K., Majoros, L., Kardos, G.: The Role of Uniform Meropenem Usage in *Acinetobacter baumannii* Clone Replacement.
Antibiotics. 10 (2), 1-12, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10020127>
IF: 3.893 (2019)
8. Vitális, E., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Forgács, L., Bozó, A., Kardos, G., Majoros, L., Kovács, R. L.: *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia.
Mycoses. 63 (4), 352-360, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/myc.13049>
IF: 3.575 (2019)
9. Nemes, D., Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Tóth, Z., Herczegh, P., Borbás, A., Kelemen, V., Pfliegler, V. P., Rebenku, I., Hajdu, P., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivatives.
Eur. J. Pharm. Sci. 143, 1-9, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105162>
IF: 3.616 (2019)
10. Forgács, L., Borman, A. M., Prépost, E., Tóth, Z., Kardos, G., Kovács, R. L., Székely, A., **Nagy, F.**, Kovács, I., Majoros, L.: Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model.
Emerg. Microbes Infect. 9 (1), 1160-1169, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1771218>
IF: 5.776 (2019)
11. **Nagy, F.**, Vitális, E., Jakab, Á., Borman, A. M., Forgács, L., Tóth, Z., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro and in vivo effect of exogenous farnesol exposure against *Candida auris*.
Front. Microbiol. 11, 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00957>
IF: 4.235 (2019)





12. Tóth, Z., Forgács, L., Kardos, T., Kovács, R. L., Locke, J. B., Kardos, G., **Nagy, F.**, Borman, A. M., Adnan, A., Majoros, L.: Relative Frequency of Paradoxical Growth and Trailing Effect with Caspofungin, Micafungin, Anidulafungin, and the Novel Echinocandin Rezafungin against *Candida* Species.
J. Fungi. 6 (3), 1-9, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof6030136>
IF: 4.621 (2019)
13. Prépost, E., Tóth, Z., Perlin, D., Gesztelyi, R., Kardos, G., Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Forgács, L., Majoros, L.: Efficacy of humanized single large doses of caspofungin on the lethality and fungal tissue burden in a deeply neutropenic murine model against *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
Infect Drug Resist. 12, 1805-1814, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S198764>
IF: 2.984
14. **Nagy, F.**, Tóth, Z., Daróczy, L., Székely, A., Borman, A. M., Majoros, L., Kovács, R. L.: Farnesol increases the activity of echinocandins against *Candida auris* biofilms.
Med. Mycol. 2019, 1-4, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myz057>
IF: 2.822
15. Tóth, Z., Forgács, L., Locke, J. B., Kardos, G., **Nagy, F.**, Kovács, R. L., Székely, A., Borman, A. M., Majoros, L.: In vitro activity of rezafungin against common and rare *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Antimicrob. Chemother. 74 (12), 3505-3510, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz390>
IF: 5.439
16. Jakab, Á., Tóth, Z., **Nagy, F.**, Nemes, D., Bácskay, I., Kardos, G., Emri, T., Pócsi, I., Majoros, L., Kovács, R. L.: Physiological and transcriptional response of *Candida parapsilosis* to exogenous tyrosol.
Appl. Environ. Microbiol. 85 (20), e01388-e01419, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01388-19>
IF: 4.016
17. Tóth, Z., Kardos, T., Kovács, R. L., Kardos, G., **Nagy, F.**, Prépost, E., Barta, Z., Takács, I., Majoros, L.: Comparison of Killing Activity of Micafungin Against Six *Candida* Species Isolated from Peritoneal and Pleural Cavities in RPMI-1640, 10 and 30% Serum.
Mycopathologia. 183 (6), 905-912, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-018-0302-5>
IF: 2.278





18. Nemes, D., Kovács, R. L., **Nagy, F.**, Mező, M., Poczkó, N., Ujhelyi, Z., Pető, Á., Fehér, P., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Interaction between Different Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms: assessment of Cytotoxicity and Antimicrobial Activity.
Molecules. 23 (7), 1-19, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071827>
IF: 3.06
19. **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. 56 (4), 493-500, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx062>
IF: 2.851
20. Kardos, T., Kovács, R. L., Kardos, G., Varga, I., Bozó, A., Tóth, Z., **Nagy, F.**, Majoros, L.: Poor in vivo efficacy of caspofungin, micafungin and amphotericin B against wild-type *Candida krusei* clinical isolates does not correlate with in vitro susceptibility results.
J. Chemother. 30 (4), 233-239, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/1120009X.2018.1487150>
IF: 1.599
21. 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

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 73,757

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,155

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

Debrecen, 2021.06.09.



10. Tárgyszavak-Keywords

biofilm, echinocandinok, humán szérum, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, kitin-szintáz inhibitor, quorum-sensing, szinergizmus, antifungális „lock” terápia

biofilms, echinocandins, human serum, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, chitin synthase inhibitor, quorum-sensing, synergy, antifungal-lock therapy

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Kovács Renátónak tartozom köszönettel. Hálás vagyok szakmai támogatásáért, végtelen türelméért, illetve tanácsaiért. Köszönettel tartozom, amiért bevezetett a mikológia laboratórium kutatómunkáiba, és mindvégig bíztatott.

Köszönet illeti, Prof. Dr. Kónya József intézetigazgatót, aki lehetővé tette számomra, hogy az Orvosi Mikrobiológián végezhessem a PhD tanulmányaimat és az ehhez szükséges laboratóriumi kísérleteket.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Majoros Lászlónak, a mikológia laboratórium vezetőjének, az iránymutatásaiért és szakmai javaslataiért.

Külön szeretnék köszönetet mondani Tóth Zoltán, illetve Balázs Bence PhD hallgatóknak, akikhez az elmúlt években bármikor fordulhattam szakmai tanácsért és segítségért, valamint mindig biztosították a jó hangulatot a közös munka során.

Köszönöm Dr. Daróczy Lajosnak, a Szilárdtest Fizikai Tanszék egyetemi docensének, az elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségét.

Köszönet illeti a mikológia laboratórium korábbi és jelenlegi PhD hallgatóit, Dr. Bozó Alizt és Forgács Lajost, a kísérletes munkákban való közreműködésükért.

Hálával tartozom Aszalós Antalnénak és Hartman Zsoltnak, az Orvosi Mikrobiológia munkatársainak, akik a kutatásainkhoz szükséges táptalajok gyors elkészítésével nagyban hozzájárultak a kísérleteink időben történő kivitelezéséhez.

Továbbá köszönöm az Orvosi Mikrobiológia valamennyi dolgozójának, akik segítették PhD kutató munkámat az elmúlt években.

Köszönöm az Emberi Erőforrások Minisztériuma, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Új Nemzeti Kiválóság Programnak (ÚNKP-18-3, ÚNKP-19-3, ÚNKP-20-3), illetve az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 „Az orvos-, egészségtudományi-és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése” projektnek a kutató munkám kivitelezéséhez nyújtott támogatásukat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a szüleim, a Párom, valamint a barátaim támogatását. Köszönöm a türelmüket, és a bíztatásukat. Továbbá hálás vagyok, hogy egy kiegyensúlyozott háttér biztosításával nagyban hozzájárultak PhD tanulmányaim elvégzéséhez.

12. Fűggelék