

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A caspofungin farmakodinámiájának vizsgálata *Candida albicans*, *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen

Kovács Renátó László

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2014

**A caspofungin farmakodinámiájának vizsgálata *Candida albicans*, *C. krusei*
és *C. inconspicua* izolátumok ellen**

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

Írta: Kovács Renátó László okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti tudományok doktori iskolája
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Majoros László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Urbán Edit, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

2014. október 7. 11 óra, Debreceni Egyetem ÁOK, Infektológia és
Gyermekimmunológiai tanszék, PR szoba

Az értekezés bírálói:

Dr. Belák Ágnes, PhD
Dr. Zsuga Judit, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Dr. Belák Ágnes, PhD
Dr. Zsuga Judit, PhD
Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Urbán Edit, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2014. október 7. 13 óra, Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A"
épületének tanterme

BEVEZETÉS

Az életet veszélyeztető fertőzések 15%-ért a különböző gombafajok tehetőek felelőssé. Az egyes *Candida* specierek a gomba okozta szisztémás infekciók 70-90%-át, míg az *Aspergillus* fajok a fertőzések 10-20%-át okozzák.

Az elmúlt néhány évtizedben a nozokomiális gomba infekciók gyakorisága drámaian megnőtt. A növekedés oka elsősorban a tartós neutropénia (<500 neutrofil granulocita/ μ l), a különböző tumor típusok prevalenciájának a növekedése, a széles spektrumú antibiotikumok gyakori használata, az immunszuppresszív terápia, a sebészeti beavatkozások számának emelkedése, az égési sérülések, a hosszú kórházi tartózkodás, valamint a fejlett országok egyre inkább előregedő populációja.

A különböző *Candida* fajok a 4. leggyakoribb nozokomiális véráramfertőzést okozó mikróbák az Amerikai Egyesült Államokban, ezzel szemben Európában a 6-10. leggyakrabban izolált *genus*.

A fertőzések növekvő tendenciáját jól szemlélteti, hogy az USA-ban az 1995 és 2002 közötti időszakban a *Candida* pozitív hemokultúrák aránya 8%-ról 12%-ra emelkedett.

Az invazív *Candida* fertőzések okozta mortalitás 30-60%, ami függ az adott *Candida* fajtól, a földrajzi elhelyezkedéstől, valamint az alapbetegségtől.

Bár még mindig a *C. albicans* a leggyakrabban izolálható *Candida* species (40-50%) a 90-es évektől a terápiás és profilaktikus fluconazol (FLU) használat következtében egyre gyakrabban diagnosztizálnak primer FLU rezisztenciával vagy csökkent FLU érzékenységgel rendelkező úgynevezett non-*albicans* fajokat (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. inconspicua*).

A gombaellenes kemoterápia egyik legújabb mérföldköve a gombák sejtfalszintézisét gátló echinocandinok (casporfungin (CAS), micafungin (MICA), anidulafungin (ANI)) bevezetése volt, melyek kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai jellemzőik miatt invazív candidiasisban és aspergillózisban egyaránt alkalmazható szerek.

Kémiaiilag az echinocandinok ciklikus lipopeptid molekulák, melyek non-kompetitív módon gátolják a β -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplexet. Ennek következtében felborul a gomba sejtfaI integritása, ami ozmolitikus instabilitáshoz, majd a sejt halálához vezet.

Az echinocandinok a legtöbb *Candida* faj ellen fungicid még az *Aspergillus* specíesek ellen fungisztatikus hatást mutatnak. EzenkívuI aktívak még *Pneumocystis jirovecii* ellen. *Zygomycetes*, *C. neoformans*, valamint *Fusarium* fajok ellen hatástalanok a klinikailag releváns koncentrációkon.

Az echinocandinok tipikusan koncentrációfüggő módon ható szerek. Az ilyen típusú antifungális szerekre a C_{max}/MIC (C_{max} : a gyógyszer szérumban mérhető maximális koncentrációja/minimális gátlókoncentráció), valamint az AUC/MIC (AUC: a u n d e r c u r v e, koncentráció-idő függvény alatti terület) farmakodinámiás paraméter a jellemző.

A CAS, mint az echinocandin család legidősebb tagja 2001-ben került bevezetésre a terápiás gyakorlatba. A többi echinocandinnal egyetemben az elsőként választandó antifungális szer az invazív *Candida* infekciók empirikus kezelésére. A jelenleg alkalmazott dozírozási stratégia CAS esetében egyszeri 70 mg-os telítő dózis utáni napi 50 mg fenntartó dózisokat ír elő.

Korábbi tanulmányok alapján a jelenleg alkalmazott normál napi dózis akár négyszerese sem okoz komolyabb mellékhatásokat. Ennek ellenére a klinikai vizsgálatok jelenleg még nem támasztják alá, hogy a terápiás kimenetel a nagyobb dózisú CAS esetén hatékonyabb lenne, mint a jelenleg elfogadott standard napi terápia.

Az echinocandinok további jellegzetessége az *in vitro* RPMI-1640-ben mért relatíve hosszú posztantifungális hatás (PAFE). A PAFE időtartama a gyógyszer eltávolítása után a kezelt törzs, valamint a kontroll izolátum egy nagyságrendnyi növekedéséhez szükséges idő különbsége. Korábbi tanulmányokban a CAS által kifejtett RPMI-1640-ben mért PAFE >12 óra volt a MIC fölötti koncentrációkon.

Több jelentős tanulmány eredményei alapján az echinocandin rezisztencia relatíve ritka a *Candida* fajok körében (2,9-3,1%). Az echinocandin rezisztencia leggyakoribb oka az FKS1 gén mutációja, ami aminosav szubsztitúcióhoz vezet az Fks1p alegység két úgynevezett „hot-spot” (HS) régiójában.

Az echinocandinok nagymértékben képesek kötődni szérumfehérjékhez. A „szabad gyógyszer hipotézis” értelmében csak a szabad gyógyszer-molekulák rendelkeznek farmakológiai aktivitással. A gyógyszerkötődés mértéke CAS esetben 96,5%. CAS esetén a szérum jelenlétében mért MIC érték 1-16x magasabb, mint a normál RPMI-1640-ben mért értékek. MICA-nál ugyanez az arány 32-128x-os, míg ANI-nál 8-256x-os volt.

A vizsgálatainkban is alkalmazott idő-ölés kísérletek fontos információkat szolgáltatnak az antifungális szer ölő aktivitását, valamint farmakodinámiás tulajdonságait (posztantifungális hatás, dózis-hatás) illetően. Ezek az adatok nagymértékben elősegítik a gomba, valamint a gyógyszer között fennálló dinamikus kapcsolat megértését.

Kísérleteink során célunk volt, hogy az *in vitro* vizsgálatokból kapott eredményeket *in vivo* adatokkal kombinálva, illetve harmonizálva hatékonyabb CAS alapú terápiát lehessen kidolgozni nemcsak a *C. albicans*, hanem a ritkábban izolálható, de még klinikailag releváns *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumokkal szemben.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során a caspofungin *in vitro*, valamint *in vivo* hatékonyságát vizsgáltuk három klinikailag releváns *Candida* faj esetében.

Vizsgálatainkban célunk volt:

- a caspofungin hatékonyságának *in vitro* vizsgálata *C. albicans*, *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen idő-ölés kísérletek segítségével normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben
- a caspofungin posztantifungális hatásának vizsgálata *C. albicans* izolátumok ellen normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérum jelenlétében
- a caspofungin által kifejtett ölési ráta meghatározása az idő-ölés kísérletek során nyert adatokból *C. albicans*, *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen
- az ölési ráta ismeretében az 50; 90; 99; 99,9%-os CFU csökkenéshez szükséges idő kiszámítása a *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok esetében
- a caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata 1, 2, 3, 5 és 15 mg/kg napi gyógyszerdózisokat alkalmazva *C. krusei*-vel és *C. inconspicua*-val fertőzött neutropéniás egérmodellben

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált izolátumok

A CAS *in vitro* hatékonyságának a vizsgálatához 3 *Candida* faj (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. inconspicua*) 10 klinikai izolátumát, 2 ATCC tesztörzset (American Type Culture Collection), valamint *C. albicans* és *C. krusei* esetében egy-egy echinocandin rezisztens izolátumot használtunk (DPL20, DPL45). Az összes vizsgált *C. albicans* (183, 3666, 10920, 12132), *C. krusei* (4363, 5029, 27393) és háromból egy *C. inconspicua* klinikai törzs (20114) vérből származott. A *C. inconspicua* 22027 izolálása peritoneális mintából történt, míg a 12060-as *C. inconspicua* izolátum sebből lett azonosítva. A két echinocandin rezisztens izolátum (DPL45, FKS F645F/C; DPL20, FKS F645P) David S. Perlin laboratóriumából származott (Public Health Research Institute, New Jersey Medical School-Rutgers, Newark, New Jersey, USA).

A *C. albicans* és *C. krusei* izolátumok azonosításához APID32C panel és MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) tömegspektrométert használtunk, míg a *C. inconspicua* törzsek azonosítása korábban már molekuláris biológiai módszerekkel megtörtént.

A caspofungin minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása

A CAS iránti MIC értékek meghatározása standard makrodilúciós módszerrel történt a CLSI által elfogadott M27-A3-as dokumentum alapján normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal (AB vércsoportú humán férfi, Sigma, Budapest, Magyarország) kiegészített tápközegben, legalább két alkalommal.

A MIC meghatározást 0,015-32 mg/L tartományban végeztük. Az egyes izolátumok MIC értékét 24 óra után olvastuk le. MIC értéknek azt a koncentrációt tekintettük, ahol legalább 50%-os növekedés csökkenés volt megfigyelhető a gyógyszermentes kontrollhoz képest.

Idő-ölés (time-kill) görbék felvétele

Az idő-ölés kísérletek során a Klepser és munkatársai által leírt módszert követve a CAS *in vitro* aktivitását vizsgáltuk normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben. A legalacsonyabb vizsgált koncentráció minden izolátum esetén 0,5 x MIC érték, míg a legmagasabb vizsgált koncentráció 32 mg/L volt. Előkísérleteink során a szérumban tapasztalt magasabb MIC értékek miatt mindhárom faj (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. inconspicua*) esetén csak azokat az adatokat ábráztuk, ahol a CAS-nak mindkét tápközegben mérhető aktivitása volt. Ezek az értékek a *C. albicans* esetében 0,25, 1, 4, 8, 16 és 32 mg/L, míg a *C. krusei* és *C. inconspicua* esetén 1, 2, 4, 8, 16 és 32 mg/L CAS koncentrációk voltak, koncentrációnként 10 mL-es végtérfogatban.

A vizsgálatok során MIC értéktől függetlenül 32 mg/L volt a legnagyobb vizsgált CAS koncentráció, mivel klinikai tanulmányokból tudjuk, hogy a napi nagy dózisú CAS (150-200 mg) használata 30,4-40,6 mg/L-es szérumszükszámot eredményez emberben.

A kísérlet során Sabouraud dextróz agaron (SDA) tenyésztett gomba sejtekből 0,5 McFarland (McF) sűrűségű gombaszuszpenziót készítettünk. Ez az érték gombasejtek esetén $\sim 10^5$ CFU (Colony Forming Unit) sejtet jelent milliliterenként.

A vizsgálat folyamán a *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok esetében 0, 4, 8, 12, 24 és 48 h elteltével a különböző gyógyszerkoncentrációkat tartalmazó csövekből mintát vettünk (100 μ l), majd az egyes mintákból tízes alapú tova futó hígítási sorozatot készítettünk. Ezt követően az egyes hígításokat tartalmazó csövekből 4x30 μ L-t oltottunk ki SDA táptalajra. A táptalajokat 48 óráig 35°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után a kinőtt telepeket megszámláltuk, majd a kapott értékeket (CFU/mL) ábráztuk az idő függvényében. A *C. albicans* törzsek esetében 24 h-ig vizsgáltuk a gombasejtszám változást.

Minden izolátum, illetve médium esetén legalább két párhuzamos vizsgálatot végeztünk. Az idő-ölés görbéket GraphPad Prism 4.03 Windows szoftver segítségével ábráztuk.

A posztantifungális hatás vizsgálata

Előkísérleteinkben az 5, 10, 30 perces CAS expozíció, valamint az alacsonyabb koncentrációk (0,5-2 mg/L) nem eredményeztek jelentős PAFE-t 50% humán szérumban jelenlétében, ezért vizsgálataink során 4, 16 és 32 mg/L koncentrációkon vizsgáltuk a CAS által kifejtett PAFE-t 60 perces gyógyszer expozíciós időt alkalmazva normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérumban kiegészített RPMI-1640-ben.

Az idő-ölés kísérletekhez hasonlóan ebben az esetben is $\sim 10^5$ sejt/mL kiindulási csíraszámot alkalmaztunk. Egy óráig tartó 35°C-on történő inkubáció után centrifugálás segítségével összegyűjtöttük a gombasejteket (10 perc 1500 g), majd steril fiziológiás sóoldatban még háromszor mostuk őket. Ezt követően a sejteket ismételtén felvettük 10 mL meleg gyógyszermentes RPMI-1640-be, valamint 50% humán szérumban kiegészített RPMI-1640-be.

Az egyes csövekből 0, 4, 8, 12 és 24 h elteltével mintát vettünk (100 μ L), majd a mintákból tízes alapú hígítási sorozatot készítettünk. Az egyes hígításokból kioltottunk SDA táptalajra (4x30 μ L), melyeket 35°C-on 48 h-ig inkubáltuk.

Az *in vitro* adatok elemzése

Fungicidnek tekintettünk egy adott koncentrációt, ha a kezdő csíraszámhoz összehasonlítva 99,9%-os vagy nagyobb csíraszám csökkenés volt megfigyelhető.

Az idő-ölés kísérletek során nyert adatokat felhasználva matematikai összefüggés segítségével a vizsgált koncentrációkon kiszámoltuk a CAS aktivitásának ölési kinetikáját normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérumban kiegészített tápfolyadékban. Az ölési kinetikát az alábbi exponenciális egyenlet segítségével számítottuk ki: $N_t = N_0 \times e^{-kt}$, ahol a N_t az élő

sejtek száma adott időpontban, az N_0 a kísérlet kezdetén mért élő sejtszám, a k az ölési ráta a t pedig az inkubációs idő. A pozitív k érték a gombasejtek ölését, míg a negatív k érték azok növekedését jelenti. Az illesztés jóságának vizsgálatát az r^2 használatával ellenőriztük ($>0,8$).

A kiindulási csíraszámokkal összehasonlítva az 50; 90; 99; 99,9%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges időt (h) a k értékek alapján számoltuk ki a vizsgált *C. krusei* és *C. inconspicua* törzsek, valamint az egyes CAS koncentrációk esetén ($T_{50}=0,30103/k$; $T_{90}=1/k$; $T_{99}=2/k$; $T_{99,9}=3/k$).

A különböző izolátumok és koncentrációk közötti eltéréseket a Tukey-féle teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) vizsgáltuk mindkét tápközegben. Ugyanazon CAS koncentrációk különböző médiumban kapott értékeinek összehasonlítását T-próbával végeztük. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket, ha $P<0,05$.

In vivo kísérletek

A kísérletben felhasznált egerek

A kísérletek során 21-23 g tömegű BALB/c típusú nőstény egereket alkalmaztunk, melyeket a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című útmutatóban leírtak szerint tartottunk. A vizsgált csoportokban 7-9 egér volt. Az *in vivo* kísérletek engedélyszáma: 12/2008 DE MÁB.

A vizsgálat alatt a kísérletben felhasznált egereket cyclophosphamid intraperitoneális adagolásával immunszuppresszáltuk az alábbi protokoll szerint: a fertőzést megelőző negyedik nap 150 mg/kg, a fertőzés előtti első nap 100 mg/kg, a fertőzést követő második és ötödik nap adott 100 mg/kg.

A fertőzés menete

Az oltóanyag készítéshez a vizsgált *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumokat két egymást követő napon SDA agarra kioltottuk, majd a felfrissített törzseket 3-4 SDA felületére szélesztettük. 24 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt gombapázsitot a táptalajok felszínéről steril vattatamponnal eltávolítottuk és

steril fiziológiás sóoldatba elszuszpendáltuk. Ezt követően a szuszpenziókat 3000 g fordulaton 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A leülepedett gombasejtekhez 25 mL steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk és újabb 10 percen át centrifugáltuk. Ezután a mosási folyamatot további két alkalommal megismételtük, majd a felülúszó eltávolítása után 8 mL fiziológiás sóoldatot adtunk a gombasejtekhez. Ezután a szuszpenzióból két lépésben 1:10 arányú hígítást készítettünk a Bürker-kamrában történő számoláshoz. A csíraszám beállítást kvantitatív kioltással ellenőriztük.

Az egereket a laterális farokvénán keresztül fertőztük (0,2 mL gombaszuszpenzió/egér). Előzetes kísérleteink alapján a fertőző dózis, *C. krusei* esetén 4×10^6 , míg *C. inconspicua* esetében 2×10^7 CFU/egér volt. Ezek a dózisok nem okoztak elhullást.

Antifungális terápia

Az egereken a fertőzést követő 24 h-val az alábbi intraperitoneális CAS kezelési protokollt alkalmaztuk öt napig: 1, 2, 3, 5, 15 mg/kg/nap. A fertőzést követő hatodik napon az egereket cervikális diszlokációval elpusztítottuk, majd felboncoltuk. A kvantitatív csíraszám meghatározás céljából a veséket eltávolítottuk, majd lemérésük után steril dörzscsészében, steril pistillussal elhomogenizáltuk. Ezt követően a homogenizátumhoz 1 mL steril fiziológiás sóoldatot adtunk, majd az egyes mintákból 1:10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk. A különböző hígításokból 100 μ L-t oltottunk ki SDA táptalajra, majd 48 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt telepeket megszámláltuk. A kimutatás alsó határa 50 sejt/szövet (g).

Statisztikai elemzés

A táptalajon kitenyészett gombák szignifikancia vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk (GraphPad Prism 4.03, Windows). Szignifikánsnak tekintettük az eredményt ha $P < 0,05$.

EREDMÉNYEK

A caspofungin iránti érzékenység meghatározása makrodilúciós módszerrel

Normál RPMI-1640-ben az összes általunk vizsgált *C. albicans*, *C. krusei* és *C. inconspicua* tesztörzs és klinikai izolátum érzékenynek bizonyult CAS ellen a 2011-ben módosított fajspecifikus CLSI határértékeket figyelembe véve. A DPL20 és a DPL45-ös izolátum egyaránt rezisztensnek minősült CAS iránt.

50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tesztközegben minden vizsgált *Candida* izolátum MIC értéke növekedett. *C. albicans* esetében 4-16x-os, *C. krusei* esetén 4-8x-os, míg a *C. inconspicua* izolátumok vizsgálatakor 4x-es MIC érték növekedést tapasztaltunk.

Az idő-ölés kísérletek és posztantifungális hatás vizsgálatok eredményei RPMI-1640-ben *Candida albicans* izolátumok ellen

Idő-ölés kísérleteink alapján látható, hogy a CAS $\geq 1-2 \times$ MIC (0,03 mg/L) koncentrációkon fungisztikus hatást fejtett ki normál RPMI-1640-ben a különböző *C. albicans* klinikai izolátumok, valamint az ATCC 10231-es referencia törzs ellen. Ez a kiindulási csíraszámmal összehasonlítva <99,9%-os sejtszámcsökkenést jelent. A rezisztens izolátum esetében (DPL20) RPMI-1640-ben az első 4 h-ban sikerült jelentősebb szaporodásgátlást elérni (8-32 mg/L). A PAFE vizsgálatok eredményei alapján normál RPMI-1640-ben a 4, 16 és 32 mg/L-es CAS koncentrációk 4,89- >19,34; 13,84- >19,88 és 7,65- >19,88 óráig gátolták mind a klinikai izolátumok, mind az ATCC 10231-es törzs újránövekedését.

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

Általánosságban elmondható, hogy a szérum jelentősen csökkentette a CAS *in vitro* aktivitását mind az idő-ölés, mind a PAFE kísérletekben a vizsgált *C. albicans* izolátumok ellen. A CAS $\geq 1-2 \times$ MIC értékeken fungisztikus hatást

fejtett ki a klinikai izolátumok és az ATCC tesztörzs ellen. A DPL20-as izolátum esetében 50% humán szérum jelenlétében 32 mg/L-es CAS koncentráción 4 óra után minimális csíraszámcsökkenést tapasztaltunk, de ezt követően a legmagasabb vizsgált koncentráció idő-ölés görbéje is a kontrollal megegyező lefutást mutatott.

A PAFE időtartama 50% szérum jelenlétében jelentősen lecsökkent a vizsgált 4, 16 és 32 mg/L CAS koncentrációkon. A legalacsonyabb vizsgált CAS koncentráción (4 mg/L) a 3666-os és 10920-as izolátum esetében nem tapasztaltunk PAFE-t a szérumos tápközegben. A PAFE kísérletek eredményei alapján 50% szérummal kiegészített RPMI-1640-ben a 4, 16 és 32 mg/L-es CAS koncentrációk 0–2,27; 0,24–10,14 és 1,01– >18,79 óráig gátolták mind a klinikai izolátumok, mind az ATCC 10231-es törzs újránövekedését. A szérummentes tápközeghez hasonlóan a DPL20-as izolátum esetében ebben az esetben sem volt mérhető PAFE.

A PAFE kísérletek eredményei alapján a legtöbb vizsgált izolátum növekedést mutatott a szérumos tápközegben. Négy óra elteltével csupán elvéve detektáltunk csekély mértékű csíraszámcsökkenést. A 183-as izolátum 16 és 32 mg/L, valamint a 3666-os számú törzs 32 mg/L-es CAS koncentrációk jelenlétében mutattak elhanyagolható sejtszámcsökkenést.

Fontos kiemelni, hogy a gyógyszermentes tápközegben lévő sejtek egy nagyságrendnyi növekedéséhez szükséges idő mindkét tápközegben hasonló volt, azaz a szérum nem csökkentette szignifikánsan a kontroll gombasejtek növekedését.

Az idő-ölés, valamint a posztantifungális hatás vizsgálatokban bekövetkező sejtszámváltozások összehasonlítása a *Candida albicans* izolátumok esetében

A két különböző tesztközeg ugyanazon koncentrációit összehasonlítva elmondható, hogy az idő-ölés kísérletekben 50% humán szérum jelenlétében az

izolátumok többségénél nagyobb mértékű csíraszámcsökkenés volt megfigyelhető, különösen 32 mg/L-es CAS koncentráción.

Ezzel ellentétben a PAFE kísérletek során az ölési aktivitás minden izolátumnál jóval homogénebb volt a vizsgált médium szempontjából. Az összes CAS koncentráción a sejtszámcsökkenés szignifikánsan magasabb volt normál RPMI-1640-ben ($P < 0,05-0,001$).

A kísérletek során ugyanazon koncentrációhoz tartozó sejtszámok vizsgálatokor hasonló bizonyos esetekben pedig nagyobb mértékű csökkenést (a 10920-as és 3666-os izolátumok esetében) tapasztaltunk a rövid CAS expozíciót modellező PAFE vizsgálatokban, mint a 24 h-ás gyógyszer expozíciót demonstráló idő-ölés kísérletekben. Fontos azonban kiemelni, hogy az 50% szérum az összes izolátum esetében szignifikánsan csökkentette a normál RPMI-1640-ben tapasztalható ölést a PAFE kísérletek során ($P < 0,01-0,001$).

A caspofungin által kifejtett ölési ráta vizsgálata *Candida albicans* izolátumok ellen

A CAS idő-ölés kísérletekben tapasztalt ölési aktivitása RPMI-1640-ben szignifikánsan gyengébb volt 16-32 mg/L koncentrációkon, mint 0,25, 1, 4 vagy 8 mg/L-es értékeken ($P < 0,05-0,001$). Ez a jelenség a mini-paradox hatással magyarázható. Azonban 50% humán szérum jelenlétében a CAS 1-32 mg/L koncentrációkon tipikusan koncentráció független módon viselkedett az érzékeny izolátumok ellen. A DPL20-as törzs esetében a vizsgált médiumtól függetlenül negatív k értékeket detektáltunk, ami a gombák növekedésére utalt. A PAFE során vizsgált ölési ráta a klinikai izolátumok és az ATCC 10231-es törzs ellen is izolátum- és koncentrációfüggő volt (k érték: $-0,111- +1,019$ 1/h). Szérumos tápközegben jóval szűkebb intervallumban mozgott a CAS által kifejtett ölési ráta ($-0,017- -0,185$ 1/h).

A caspofungin *in vitro* hatékonyságának meghatározása idő-ölés kísérletekkel RPMI-1640-ben *Candida krusei* és *Candida inconspicua* izolátumok ellen

Szérumentes, RPMI-1640 tápközegben a CAS 24 h után fungisztikus aktivitást mutatott $\geq 0,25$ mg/L koncentrációkon a *C. krusei* klinikai izolátumok ellen, bár a 4363-as törzs esetében újránövekedést figyeltünk meg 0,25-4 mg/L-es értékeken. 16 és 32 mg/L-es gyógyszerkoncentrációkon a CAS mindhárom *C. krusei* klinikai izolátum ellen fungicid hatást mutatott $3,75 \pm 0,71$, valamint $4,64 \pm 0,33$ h után. Az ATCC 6258-as tesztörzs esetén az ölés már ≥ 1 mg/L-es CAS koncentrációkon 12-24 h után bekövetkezett. A rezisztens izolátum esetében az első 12 h-ban ≥ 4 mg/L gyógyszerkoncentrációkon fungisztikus hatást tapasztaltunk, majd 24-48 h elteltével újránövekedést figyeltünk meg. A 32 mg/L-es CAS koncentráció a DPL45-ös törzs ellen viszont fungicidnek bizonyult.

C. inconspicua esetében a CAS már 0,06 mg/L koncentrációkon is fungisztikus volt RPMI-1640-ben. 24 h-ra mindhárom klinikai izolátumnál a CAS fungicidnek bizonyult $\geq 0,5$ mg/L koncentrációkon.

A caspofungin *in vitro* hatékonyságának meghatározása idő-ölés kísérletekkel RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében *Candida krusei* és *Candida inconspicua* izolátumok ellen

Szérum jelenlétében bár az első 4 h-ban a CAS 1 mg/L-es koncentráción mindhárom *C. krusei* klinikai izolátum növekedését gátolta, 12-24 h elteltével az idő-ölés görbék a kontroll izolátuméhoz hasonló lefutást mutattak. 2-4 mg/L koncentrációkat vizsgálva a CAS fungisztikus hatást mutatott a *C. krusei* klinikai izolátumok ellen, 24 h elteltével azonban újránövekedést tapasztaltunk. A CAS 16 és 32 mg/L koncentrációkon $6,47 \pm 3,48$, illetve $7,42 \pm 5,91$ óra alatt fungicid hatású volt a *C. krusei* klinikai izolátumok ellen. A rezisztens izolátum vizsgálata során a maximális csíraszámcsökkenést csak a legnagyobb 16-32

mg/L-es CAS koncentrációkon tapasztaltuk, azonban 24-48 h elteltével ebben az esetben is a kontroll sejtszámához közelítő újránövekedés volt megfigyelhető.

Az első 24 h-ban az összes általunk vizsgált *C. inconspicua* izolátum csíraszama a fungicid határérték alá csökkent. A *C. inconspicua* izolátumok esetében szérumban jelenlétében jelentősen korábban sikerült elérni a fungicid hatást 1-32 mg/L CAS koncentrációkon, mint a szérumbanmentes normál RPMI-1640 tápközegben.

A caspofungin által kifejtett ölési ráta vizsgálata *Candida krusei* és *Candida inconspicua* izolátumok ellen

A *C. krusei* klinikai izolátumok vizsgálata során a legmagasabb ölési rátát 4 mg/L koncentráción tapasztaltuk normál RPMI-1640-ben. Ez szignifikánsan magasabb volt, mint a 2 és 32 mg/L-es CAS koncentrációkon tapasztalt k értékek ($P < 0,05$).

50% humán szérumban jelenlétében a hatékony CAS koncentrációkon (4-32 mg/L) az átlagos k értékek (0,42–0,57 1/h) között nem volt szignifikáns különbség ($P > 0,05$). Az 1, 2 és 4 mg/L CAS által kifejtett ölési ráta szignifikánsan magasabb volt normál RPMI-1640-ben összehasonlítva a szérumban tartalmazó tápközeggel ($P < 0,01-0,005$).

A *C. krusei* ATCC 6258 referencia izolátum esetében 2-32 mg/L CAS koncentráción a mért k értékek 0,46–0,96 1/h között változtak RPMI-1640-ben. Ezzel szemben az ölési ráta 0,87–1,37 1/h-re változott 50% humán szérumban jelenlétében. A tesztörzs vizsgálata során a 8 és 16 mg/L-es CAS koncentrációkon mért ölési ráta szignifikánsan magasabb volt a szérumban tartalmazó tápközegben mint normál RPMI-1640-ben ($P < 0,01$).

A CAS rezisztens izolátum esetében a 32 mg/L CAS koncentráción RPMI-1640-ben mért öléstől (1,12 1/h) eltekintve sem RPMI-1640-ben sem a humán szérumban kiegészített tápközegben nem tapasztaltunk ölést.

A *C. krusei* klinikai izolátumokkal ellentétben, az 50% humán szérumban szignifikánsan fokozta a CAS ölési aktivitását az összes tesztelt koncentráción a vizsgált *C. inconspicua* izolátumok ellen ($P < 0,0003$).

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

In vivo kísérleteinkben két *C. krusei* klinikai izolátumot (5029, 27393), valamint egy echinocandin rezisztens törzset vizsgáltunk (DPL45). Bár az általunk használt CAS dózisok mindegyike csökkentette a veséből kinőtt csíraszámot a kontroll csoporttal összehasonlítva, szignifikáns gombasejtszám csökkenést csak a 3, 5 és 15 mg/kg napi CAS dózis eredményezett ($P < 0,05-0,001$). Az 1 és 2 mg/kg napi CAS dózis nem volt hatékony. Fontos kiemelni, hogy a terápia szempontjából hatékony dózisok között nem volt szignifikáns különbség.

A rezisztens izolátum esetében a kontroll csoporttal összevetve csak a legnagyobb CAS dózis (15 mg/kg/nap) csökkentette szignifikánsan az élő gombasejtek számát ($P < 0,01$).

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

Az általunk tesztelt két *C. inconspicua* izolátum esetében (20114, 22027) az összes alkalmazott dózis szignifikánsan és legalább két nagyságrenddel csökkentette a vesékből kitenyészett élő sejtek számát a kontroll csoporttal összehasonlítva ($P < 0,05-0,001$). A 20114-es *C. inconspicua* törzs esetében a vesékből kitenyészett gombák száma legalább négy nagyságrendnyi csökkenést mutatott az 5 és 15 mg/kg napi CAS dózissal kezelt egerek vizsgálata során. A hatékony terápiák között statisztikailag szignifikáns különbséget ezekben az esetekben sem tapasztaltunk ($P > 0,05$).

MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt három évtizedben, a különböző gombák okozta fertőzések jelentik talán a legnagyobb egészségügyi kihívást az immunszuppresszált betegek, valamint a súlyos alapbetegséggel rendelkező hospitalizált páciensek körében.

Bár még mindig a *C. albicans* a leggyakrabban izolálható humán patogén gomba a terápiás, illetve profilaktikus FLU használat következtében egyre inkább nő a kockázata a generikus, valamint a szerzett FLU rezisztenciával rendelkező *Candida* fajok (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. inconspicua*) okozta fertőzéseknek.

A szisztémás *Candida* fertőzések kezelésére a 2000-es évek elején egy új antimikotikum család került bevezetésre a klinikumba, az echinocandinok. Az echinocandinok jelenleg az elsőként választandó szerek a kritikus állapotban lévő, klinikailag instabil, illetve FLU profilaxisban részesült betegek körében, továbbá olyan *Candida* infekciókban, ahol a patogén ágens csökkent FLU érzékenységgel rendelkezik.

A dózis növeléséből származó klinikai hatékonyságot az echinocandinok, köztük a CAS nagyfokú fehérjekötődése jelentősen befolyásolja. *In vitro* kísérleteinkben ezen hatás demonstrálására 50% humán szérumot alkalmaztunk. Fontos kiemelni, hogy ezek a vizsgálatok jobban demonstrálhatják az *in vivo* lezajló folyamatokat.

A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a CAS *in vivo*, illetve klinikai hatékonyságát két fő tényezőnek tulajdonítják. Az egyik a normál RPMI-1640-ben mért relatív hosszú PAFE, míg a másik tényező a CAS szöveti perzisztenciája. A PAFE fontosságát támasztotta alá Clancy és munkatársai által 2006-ban publikált *in vitro* tanulmány. Eszerint a PAFE tehető felelőssé az ölés jelentős részéért, mivel mind a rövid CAS expozíció (PAFE kísérlet) mind pedig a tartós CAS expozíció (idő-ölés kísérlet) esetén 100%-ig hasonló volt az ölés

mértéke RPMI-1640-ben, továbbá a vizsgált *C. albicans* izolátumok újranoelkedése legalább 24 h-ig gátolva volt.

Ezek alapján, kísérleteink során megvizsgáltuk a rövid ideig tartó (1 h), illetve a folyamatosan jelenlévő (24 h) CAS által kifejtett ölési rátát a leggyakoribb *Candida* faj, a *C. albicans* ellen normál RPMI-1640-ben illetve 50% humán szérummal kiegészített tápközegben. *C. albicans*-szal végzett idő-ölés, illetve PAFE kísérleteinkben a gombasejtszám csökkenés hasonló volt RPMI-1640-ben. Fontos azonban kiemelni, hogy a 16 és 32 mg/L CAS koncentráción csökkent az ölési ráta mértéke normál RPMI-1640-ben, ami valószínűsíthetően a magas echinocandin koncentráción izolátumfüggő módon megfigyelhető kompenzatórikus kitinszintézis eredménye (paradox növekedés).

Humán szérum jelenlétében, PAFE kísérleteinkben mindhárom vizsgált CAS koncentráción (4, 16 és 32 mg/L) szignifikánsan csökkent az ölési ráta a normál RPMI-1640-ben kapott értékekkel összehasonlítva. Míg a folyamatos 24 h-ás CAS expozíciót jelentő idő-ölés kísérletekben ≥ 1 mg/L-es koncentrációkon nagy, koncentráció független módon fennálló ölési rátát detektáltunk. Előkísérleteink alapján 0,5-2 mg/L-es CAS koncentrációkat vizsgálva az 1 h-ás gyógyszer expozíció 50% humán szérum jelenlétében nem elég hosszú ahhoz, hogy akár kismértékű növekedés gátlást eredményezzen, ellentétben az RPMI-1640-ben kapott eredményekkel.

Louie és munkatársai 2005-ben publikált eredményei alapján a szövetek egyfajta gyógyszer rezervoárként szolgálnak, melyekből lassú, folyamatos gyógyszer felszabadulás történik a vérbe.

In vitro eredményeink alapján 50% szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben a PAFE megszűnik, annak ellenére, hogy korábban a szérummentes tápközegben már 5 perc CAS expozíció is jelentős PAFE-t eredményezett.

Az 50% szérum jelenlétében megfigyelt elhanyagolható PAFE rámutat a tényre, miszerint az *in vitro* RPMI-1640-ben tapasztalt relatíve hosszú PAFE kevésbé

játszik kulcsszerepet a klinikai kimenetel szempontjából, legalábbis a *C. albicans* ellen.

Ezt követően két klinikailag relevánsnak mondható, primer FLU rezisztenciával bíró *Candida* faj (*C. krusei*, *C. inconspicua*) *in vitro* érzékenységet hasonlítottuk össze a már fentebb említett kétféle tesztmédiumban.

Kísérleteinkben a 32 mg/L-es gyógyszerkoncentráción 4,64 h alatt értük el a fungicid határt.

Humán szérum jelenlétében jelentős (4-8-szoros) MIC érték emelkedést tapasztaltunk a vizsgált *C. krusei* izolátumok esetében. Az ölési ráta a hatékony CAS koncentrációkon (4-32 mg/L) koncentráció független volt a *C. krusei* klinikai izolátumok vizsgálata során. Szérum jelenlétében az RPMI-1640-ben tapasztalt fungicid hatáshoz szükséges idő 32 mg/L-es CAS koncentráción 7,42 h-ra növekedett.

A klinikai izolátumokkal ellentétben a *C. krusei* referencia törzs kissé különbözött, ami valószínűsíthetően az eltérő eredetnek köszönhető. Míg a vizsgálatainkban használt izolátumok vérből származtak addig az ATCC 6258-as tesztörzs köpetből származik.

In vitro eredményeinket sikerült neutropéniás egérmodellben is megerősíteni. Az *in vivo* vizsgálatainkban alkalmazott 1 mg/kg/nap megfelel 35 mg-os humán dózisnak, a 2 mg/kg/nap 50 mg-os naponta adagolt humán dózissal ekvivalens. A 3 és 5 mg/kg-os egérdózisok az AUC értékek alapján megfelelnek az egyszeri 70 mg majd napi 50 mg-os, valamint a napi 70 mg-os humán dózissal elért emberben mért AUC értékeknek.

Mind az *in vitro* mind pedig az *in vivo* eredményeink azt mutatják, hogy a naponta alkalmazott nagyobb dózisú CAS adagolása nem eredményez olyan mértékű terápiás sikert, ami indokolná a nagyobb dózisok klinikai alkalmazását. Az echinocandin rezisztenciával rendelkező *C. krusei* törzsek ellen viszont hatékony lehet. Kísérleteinkben a DPL45-ös heterozigóta mutáns törzs ellen *in vivo* csak a legnagyobb vizsgált dózis (15 mg/kg/nap) csökkentette

szignifikánsan a vesékből kitenyészett gombák számát a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ez az AUC értékek alapján megfelel 150 mg-os humán napi dózisnak.

Érdekes módon a *C. inconspicua* a *C. krusei*-től eltérően viselkedett. Habár 50% szérumban jelenlétében a CAS iránti MIC értékek négyszeres növekedést mutattak, a szérumban jelenléte 1-32 mg/L-es CAS koncentrációkon fokozta az ölési rátát. Ez a jelenség nem egyedüli eset az irodalomban. 2000-ben Chiller és munkatársai hasonló eredményekről számoltak be. Kísérletükben *A. fumigatus* esetében vizsgálták a CAS *in vitro* hatékonyságát normál RPMI-1640-ben, illetve 0,05-5% szérumban jelenlétében. 0,1 és 0,05 mg/L CAS koncentrációkat vizsgálva az alkalmazott humán szérumban koncentráció fokozta a CAS aktivitását.

Kísérleteinkben a *C. inconspicua*-nál tapasztalt ölési aktivitás a *C. krusei*-hez hasonlóan koncentráció független volt, azonban 50% szérumban jelenlétében már 1 mg/L koncentráción is pozitív *k* értéket kaptunk, ami a sejtek ölését jelentette. A *C. inconspicua* klinikai izolátumok esetében az egyes koncentrációkon a >99,9%-os sejtszám csökkenéshez szükséges idő is rövidebb volt 1-32 mg/L CAS koncentrációk között (2,09-2,67 h), összehasonlítva a *C. krusei* klinikai törzseknél kapott értékekkel. *In vivo* vizsgálatainkban az összes általunk használt dózis szignifikánsan csökkentette a vesékből kinőtt élő gombasejtek számát a kontroll csoporttal összehasonlítva a vizsgált *C. inconspicua* törzsek ellen.

Kísérleteinkben elsőként hasonlítottuk össze a CAS által kifejtett ölési rátát normál RPMI-1640-ben, illetve 50% humán szérumban kiegészített RPMI-1640-ben három klinikailag releváns *Candida* faj ellen. Szérumban tápközegben a folyamatos, 24 h-ig fennálló CAS expozíció relatíve magas ölési rátát eredményezett a vizsgált *C. albicans* izolátumokkal szemben. Ezzel ellentétben az 1 h-ás CAS expozíció nem eredményezett ölést a szérumban kiegészített tápközegben. Ezek alapján kijelenthető, hogy az eddig érvényben lévő

elméletekkel ellentétben, a CAS által kifejtett PAFE-nak csak minimális szerepe lehet az echinocandinok kitűnő klinikai hatékonyságában.

Kísérleteink második szakaszában a vizsgált *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok CAS iránti MIC értéke jelentősen megnövekedett 50% szérumban jelenlétében. Szérumban tápközegben az ölési ráta, a hatékony CAS koncentrációkon koncentráció független volt a *C. krusei* klinikai izolátumok vizsgálata során. A CAS ölési aktivitása szérumban kiegészített tápközegben koncentráció független és szignifikánsan magasabb volt a *C. inconspicua* izolátumok ellen az RPMI-1640-ben mért értékekkel összehasonlítva.

In vitro és *in vivo* eredményeink alapján a dózisznövelés nem biztos, hogy jobb terápiás hatást eredményez a jelenleg elfogadott dozírozási ajánlással összehasonlítva, ráadásul felesleges költségnövekedést is eredményezhet a két FLU rezisztenciával bíró *Candida* faj ellen.

Az új évezred elején bevezetett antifungális szerek alkalmazása ellenére a *Candida* fajok mortalitása még napjainkban is fajtól függően 30-60%. A szérumban kiegészített *in vitro*, illetve az *in vivo* farmakodinámiás vizsgálatok segíthetnek, hogy egy hatékonyabb echinocandin alapú terápiát lehessen kidolgozni a jövőben a különböző *Candida* fajok ellen, remélhetőleg ezzel is csökkentve a modern kor egyik legveszélyesebb népegészségügyi problémáját.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során egyrészt vizsgáltuk a caspofungin által kifejtett ölési rátát, valamint a posztantifungális hatás időtartamát normál RPMI-1640-ben és 50% humán szérummal kiegészített tápközegen *C. albicans* izolátumok ellen. Ugyancsak meghatároztuk a caspofungin által kifejtett ölési rátát a fentebb említett kétféle tápközegben *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen. Végül különböző dózisokat (1, 2, 3, 5, 15 mg/kg/nap) alkalmazva vizsgáltuk a caspofungin *in vivo* hatékonyságát a *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok esetében neutropéniás egérmodellben.

A caspofungin nagyfokú fehérjekötődése miatt (96,5%) csökkent aktivitással bír a szérummal kiegészített tápközegben. Tesztmediumtól függetlenül mindkét közegben fungisztikus hatást tapasztaltunk a *C. albicans* klinikai izolátumok és a referencia törzs esetében ($\geq 0,03$ mg/L RPMI-1640-ben, $\geq 0,25-0,5$ mg/L 50% szérum jelenlétében). Ezzel szemben a *C. krusei* és *C. inconspicua* klinikai törzsek vizsgálatakor fungicid hatást detektáltunk ($\geq 0,5-8$ RPMI-1640-ben, $\geq 0,5-16$ mg/L 50% szérum jelenlétében). A *C. albicans* vizsgálata során szérum jelenlétében az 1 h-ás caspofungin expozíció nem okozott ölést. Az ölési ráta vizsgálatakor, *C. albicans* esetén csak a folyamatos caspofungin expozíció eredményezett mérhető ölési rátát 50% szérumban, ezért valószínűsíthető, hogy a posztantifungális hatásnak minimális szerepe van a klinikai hatékonyság szempontjából. A *C. krusei* klinikai izolátumok esetében 50% szérumban koncentráció független ölést tapasztaltunk (4-32 mg/L). Humán szérum jelenlétében 1-32 mg/L tartományban koncentráció független és szignifikánsan nagyobb ölést figyeltünk meg a vizsgált *C. inconspicua* törzseknél az RPMI-1640-ben tapasztalt értékekkel összehasonlítva. *In vitro* és *in vivo* eredményeink alapján a dóziseszkaláció klinikai relevanciája megkérdőjelezhető a *C. krusei* és *C. inconspicua* klinikai izolátumok ellen.



Iktatószám: DEENKÉTK/190/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

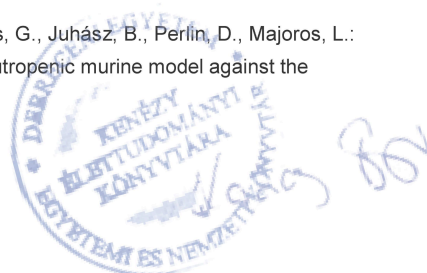
Jelölt: Kovács Renátó László
Neptun kód: HEOGB8
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10036819

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, R.**, Gesztelyi, R., Perlin, D.S., Kardos, G., Domán, M., Berényi, R., Majoros, L.: Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum.
Mycopathologia. "accepted by publisher" (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9799-4>
IF:1.545 (2013)
2. **Kovács, R.**, Gesztelyi, R., Berényi, R., Domán, M., Kardos, G., Juhász, B., Majoros, L.: Killing rates exerted by caspofungin in 50 % serum and its correlation with in vivo efficacy in a neutropenic murine model against *Candida krusei* and *Candida inconspicua*.
J. Med. Microbiol. 63 (2), 186-194, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.066381-0>
IF:2.266 (2013)

További Közlemények

3. Berényi, R., **Kovács, R.**, Domán, M., Gesztelyi, R., Kardos, G., Juhász, B., Perlin, D., Majoros, L.: Efficacy of single large doses of caspofungin in a neutropenic murine model against the "psilosis" group.
New Microbiol. 37 (3), 355-362, 2014.
IF:1.603 (2013)





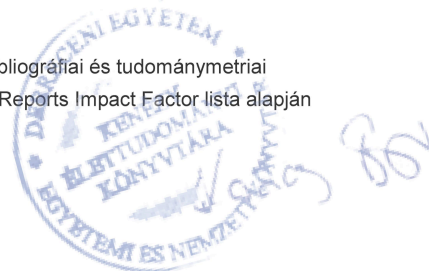
4. **Kovács, R.**, Czudar, A., Horváth, L., Szakács, L., Majoros, L., Kónya, J.: Serum interleukin-6 levels in murine models of *Candida albicans* infection. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 61 (1), 61-69, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.1.6>.
IF:0.78 (2013)
5. Földi, R., **Kovács, R.**, Gesztelyi, R., Kardos, G., Berényi, R., Juhász, B., Szilágyi, J., Mózes, J., Majoros, L.: Comparison of In Vitro and Vivo Efficacy of Caspofungin Against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia.* 174 (4), 311-318, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9554-7>
IF:1.489
6. Földi, R., Szilágyi, J., Kardos, G., Berényi, R., **Kovács, R.**, Majoros, L.: Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73 (4), 338-342, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.011>
IF:2.26
7. Bayegan, S., Majoros, L., Kardos, G., Kemény-Beke, Á., Miszti, C., **Kovács, R.**, Gesztelyi, R.: In vivo studies with a *Candida tropicalis* isolate exhibiting paradoxical growth in vitro in the presence of high concentration of caspofungin. *J. Microbiol.* 48 (2), 170-173, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-010-9221-y>
IF:1.266

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11.209

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3.811

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, 2014.08.13



Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája

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

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

Berényi Réka, Földi Richárd, Szilágyi Judit, Kardos Gábor, **Kovács Renátó**, Majoros László: A micafungin antifungális hatása 50% humán szérum jelenlétében nyolc *Candida* faj ellen az idő-ölésgörbék felvétele esetében. V. Magyar Mikológiai Konferencia 2012. május 23-25. Budapest Magyarország

R. Földi, J. Szilágyi, **R. Kovács**, R. Berényi, G. Kardos, L. Majoros Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. 2nd workshop Medical Mycology: From basic science to clinical needs. December 8-10. 2011, Vienna, Austria (poster: PP-13)

L. Majoros, **R. Kovács**, R. Berényi, J. Szilágyi, R. Földi, R. Gesztelyi, G. Kardos, B. Juhász In vitro and in vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. 2nd workshop Medical Mycology: From basic science to clinical needs. December 8-10. 2011, Vienna, Austria (poster: S6-02)

Bayegan S, Szilágyi J, Gesztelyi R, Kardos G, Mózes J, Kemény-Beke Á, Szabó Z, **Kovács R**, Majoros L. Correlation between postantifungal effect and the efficacy of the single 5 and 10 mg/kg caspofungin doses for treatment of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* in a neutropenic mouse model. 2nd Central European Forum for Microbiology (CEFOM). October 7-9. 2009, Keszthely, Hungary (poster: MP 19). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* (56) Suppl.2 126. o.

Fontosabb előadások listája

Kovács Renátó, Berényi Réka, Domán Marianna, Majoros László

A caspofungin *in vitro* hatékonyságának vizsgálata *Candida krusei*, *C. inconspicua* és *C. albicans* klinikai izolátumok ellen

Tavaszi Szél Konferencia, 2013 május 31-június 2. Sopron

Kovács Renátó, Berényi Réka, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, Juhász Béla, Majoros László

In vitro and *vivo* efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi nagygyűlése, 2012. október 24-26. Keszthely Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (60)Suppl.1 38. o.

Berényi Réka Renáta, **Kovács Renátó**, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, Juhász Béla, Majoros László

In vitro and *in vivo* efficacy of caspofungin against fluconazole resistant *Candida krusei* and *C. inconspicua* clinical isolate

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi nagygyűlése, 2012 október 24-26. Keszthely Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (60)Suppl.1 7-8. o.

Kovács Renátó, Majoros László, Berényi Réka, Szilágyi Judit, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor és Juhász Béla: Caspofungin *in vivo* és *in vitro* hatékonyságának összehasonlító vizsgálata *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. albicans* izolátumok esetén

V. Magyar Mikológiai Konferencia 2012. május 23-25. Budapest

László Majoros, **Renátó Kovács**, Réka Berényi, Judit Szilágyi, Richárd Földi, Rudolf Gesztelyi, Gábor Kardos, Béla Juhász: *In vitro* and *vivo* efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*

2nd workshop Medical Mycology December 8-10. 2011, Vienna, Austria

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a **TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001** azonosító számú “Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.