

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Caspofungin *in vitro* és *in vivo* hatékonysága *Candida albicans*, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* izolátumok ellen

Dr. Berényi Réka

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2014

Caspofungin *in vitro* és *in vivo* hatékonysága *Candida albicans*, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* izolátumok ellen

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

Írta: Dr. Berényi Réka gyógyszerész

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

Témavezető: Dr. Majoros László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Somogyvári Ferenc, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

2014. október 13. 11 óra, Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék Könyvtár

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Papp Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Papp Tamás, PhD
Dr. Somogyvári Ferenc, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

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

BEVEZETÉS

A gombafertőzések klinikai fontosságát a múlt század második felében ismerték fel, ami szoros kapcsolatban állt az invazív diagnosztikus és terápiás eszközök széleskörű elterjedésével. A *Candida* fajokat a véráramfertőzések negyedik leggyakoribb nozokomiális kórozójaként tartják számon az (általános) kórházi betegpopulációban. A leggyakrabban izolálható faj még mindig a *C. albicans*, amit a *C. glabrata*, a *C. parapsilosis*, a *C. tropicalis* és a *C. krusei* követnek.

A *C. parapsilosis sensu lato* a világ több régiójában súlyos nozokomiális fertőzést okoz és a második leggyakrabban izolált véráram fertőzést okozó *Candida* faj Dél-Amerikában és Európa déli országában. Tavanti és munkatársainak (2005) a vizsgálatai alapján a *C. parapsilosis sensu lato* három genotípusa három különböző faj, a *C. parapsilosis sensu stricto* (korábbi I. genotípus), a *C. orthopsilosis* (korábbi II. genotípus), és a *C. metapsilosis* (korábbi III. genotípus).

A *C. parapsilosis* gyakori, bőrön található szaprofita, az egészségügyben dolgozók a tenyerükön és a körmük alatt tünetmentesen hordozzák. Gyakran kapcsolódnak katéterhez vagy intravénás táplálás során alkalmazott eszközökhöz, így okozva candidemiát, ami a megtapadási képességnek és az intravaszkuláris eszközök felszínén létrejövő biofilmnek köszönhető. A *C. orthopsilosis-t* ascitesből, tályogokból, katéterekről, agygerincvelői folyadékból, köpetből illetve hörgőből izolálták. A *C. metapsilosis* szintén izolálható tályogokból, ascitesből, hörgőből és ízületi folyadékból.

A három genetikailag közel álló faj pontos elkülönítésére több munkát találunk az irodalomban. Első kéziratunk benyújtása idején (2012 máj.) semmilyen információ nem állt rendelkezésre a nemzetközi irodalomban a „psilosis” komplex mindhárom tagja ellen alkalmazható antifungális szerek *in vivo* hatékonyságára vonatkozóan, leszámítva egy másik, éppen bírálat alatt lévő kéziratunkat.

In vitro adatokból ismert volt, hogy a „psilosis” csoport egyes tagjai különböznek egymástól az antifungális szerek iránti érzékenységet illetően. A *C. parapsilosis sensu stricto* echinocandinok iránti MIC értékei magasabbak, míg a fluconazol iránti MIC értékei alacsonyabbak voltak, mint a csoport két másik tagjának.

Echinocandinok

Az echinocandinok (caspofungin, micafungin és anidulafungin) az antifungális szerek legújabb csoportja, jelenleg elsőként választandó szerek disszeminált candidiasis kezelésében. Az echinocandinok az 1,3- β -D-glükán szintáz nem kompetitív inhibitorai, ami a gomba sejtfal esszenciális alkotórésze. Az emlős sejt nem tartalmaz 1,3- β -D-glükánt, ezért az echinocandinok hatása szelektív a gombák ellen .

Az echinocandinok MIC₉₀ értékei a „psilosis” csoport tagjai ellen magasabbak tehát, mint a másik négy leggyakrabban előforduló fajé (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei*). Ennek oka az, hogy a „psilosis” csoport mindhárom tagja esetén a glükán-szintáz enzimjének Fks1 alegységében a 660-adik aminosav esetén a prolint alanin helyettesíti. *C. orthopsilosis* esetén a „második forró területen” izoleucin-valin csere is megfigyelhető, de annak jelentősége jelenleg nem ismert.

Louie és munkatársai (2005) vizsgálatai alapján AUC/MIC érték (a görbe alatti terület per a MIC érték) az a farmakodinámiai paraméter, amelyet a caspofungin klinikai hatékonyságával összefüggésbe hozhatunk. Vizsgálataik azt is kimutatták, hogy a caspofungin a belső szervekben, mint rezervoárookban felhalmozódik, majd onnan visszaáramlik a vérbe.

Az echinocandinok nagymértékben kötődnek a fehérjékhez, ez caspofungin esetén 96%, micafunginnál 99,8% és anidulafunginnál 99%. Elméleti megfontolások alapján a nagymértékű fehérjekötődés miatt az echinocandinok aktivitása a különböző *Candida* fajok ellen csökkennie kell.

Az antifungális érzékenységi vizsgálatokat RPMI-1640 alapú tesztközegben végezzük, míg az antifungális szerek fehérje alapú közegben (vér, szövetek) fejtik ki a hatásukat. A fehérje kötődés hatására a szabad echinocandin koncentráció csökken, így a vártnál jóval kevesebb gyógyszer jut a kórokozó gátlására, így terápiás sikertelenség következhet be.

Az állati és humán szérum nemcsak abban tűnik fontosnak, hogy segítenek jobban megismerni az antifungális szerek valódi hatását, de segíthetnek kimutatni azokat a rezisztens izolátumokat, amelyek echinocandin terápia során alakulnak ki.

CÉLKITŰZÉS

A nemzetközi irodalomban ellentmondásos adatok álltak rendelkezésre az echinocandinok *in vivo* hatékonyságát illetően a *Candida parapsilosis sensu stricto* ellen, illetve a *Candida orthopsilosis* és a *Candida metapsilosis* fajok ellen adatok nem is álltak rendelkezésre.

Célul tűztük ki:

- a caspofungin *in vitro* hatékonyságának összehasonlítását a „psilosis” csoportba tartozó három faj esetén a standard RPMI-1640 illetve RPMI-1640 +50% humán szérum tesztközegekben a minimális gátló koncentrációk és az idő-ölés görbék segítségével.
- terápiás alternatívát keresve neutropéniás egérmodellben összehasonlítottuk a caspofungin *in vivo* hatékonyságát naponta, egyszer adagolt kisebb dózisok illetve egyszeri, nagydózissal kezelt állatokban (ugyanolyan összdózist alkalmazva)
- Minden esetben, összehasonlításként, több caspofungin iránt érzékeny *Candida albicans* klinikai izolátumot és egy caspofungin iránt rezisztens izolátumot is használtunk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A felhasznált gombafajok eredete

A magyarországi törzseket a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet Diagnosztikai Laboratóriumában izoláltuk és azonosítottuk hagyományos módszerekkel. Egy darab caspofungin rezisztenciával rendelkező DPL20 (F645P) és két caspofungin iránt érzékeny (10920 és 17433-as számú) *C. albicans* izolátumot használtunk. Korábbi eredményeink alapján, a két *C. parapsilosis sensu stricto* (896/1 és 9150), a CP25-ös *C. orthopsilosis* és a CP92-es *C. metapsilosis* izolátumok ellen a caspofungin ≤ 16 mg/l koncentrációkon fungisztatikus volt. A CP85 és CP125 *C. orthopsilosis* izolátum ellen a caspofungin ≥ 2 és 16 mg/l koncentrációkon fungicid hatású volt. A CP5 és CP86 *C. metapsilosis* izolátumok ellen a caspofungin ≥ 1 és ≥ 8 mg/l koncentrációkon szintén fungicid hatású volt.

In vitro érzékenységi vizsgálatok

A caspofungin MIC értékeinek meghatározása a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M27-A3 dokumentum előírása alapján történt, RPMI- 1640 és RPMI- 1640 +50% humán szérum (férfi, AB típusú, Sigma, Budapest) tápközegekben, 0,06-32 mg/l koncentráció határok között.

Az idő-ölés görbék felvétele RPMI-1640+50% humán szérumban

A gomba izolátumokból 10^5 CFU/ml kiindulási csíraszámú gomba szuszpenziót készítettünk RPMI-1640+50% humán szérum tápközegekben.

A hozzáadott caspofungin koncentrációk 0,5-16 x MIC értékek voltak. Mivel a napi 100, 150 és 200 mg-os dózisok embernél 21,5-40,6 mg/l csúcskoncentrációt eredményeznek ezért a legnagyobb vizsgált koncentráció 32 mg/l volt.

A csövekből 100-100 µl folyadékot távolítottunk el 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óra után, és fiziológiás sóoldatban 1:10-es léptékben hígítottuk, majd 4x30 µl mintát Sabouraud agar felszínére oltottunk. Negyvennyolc óra múlva, az élő gombasejtek számát meghatároztuk a hígítási adatok segítségével. Fungicidnek akkor tekinthető a szer, ha a csíraszámában legalább 99,9%-os (3-log_{10}) csökkenés tapasztalható a kiindulási inokulumhoz képest.

***In vivo* vizsgálatok I.**

A kísérletünket BALB/c típusú hím egerekkel végeztük, melyek súlya 23-25 gramm között volt. Az állatok tartása a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című Irányelv szerint történt. Az egereket csoportokra osztottuk, a különböző csoportokban az egerek létszáma 7-9 darabszám között változott. Kísérleti engedély szám: 10/2008 DE MÁB.

A tartósan neutropéniás állapot kialakítása és fenntartása ciklofoszfamiddal való kezelés által történt (4 alkalommal a kísérlet során).

Egerek fertőzése

Az egereket a farkuk oldalsó vénáján keresztül fertőztük meg az immunszuppressziójukat követő negyedik napon, (0,2 ml/egér). *C. albicans* izolátumoknál az oltóanyag csíraszám 8x10⁴ CFU/egér, míg a „psilosis” csoport esetén 6x10⁶ CFU/egér volt.

Antifungális kezelés

Az egereket napi 1, 2 és 5 mg/kg dózisú caspofunginnal (Cancidas[®]) kezeltük. A kezelés az oltás utáni második napon kezdődött, az egerek a dózisokat 0,5 ml térfogatban a hasüregbe kapták. A kontroll csoportok fiziológiás sóoldatot kaptak.

Kvantitatív csíraszám meghatározás

A hetedik napon, az egereket cervikális diszlokációval leöltük, és mindkét vesét eltávolítottuk. A veséket elhomogenizáltuk, majd egy ml steril fiziológiás sóoldattal szuszpenziót készítettünk. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk.

Statisztikai adatelemzés

A táptalajon vesékből kitenyésztett gombák esetén a szignifikancia számításhoz a Kruskal-Wallis tesztet használtuk. Szignifikánsnak a $P < 0,05$ értékeket tekintettük.

***In vivo* vizsgálatok II.**

A kísérleti elrendezés hasonló volt az előző fejezethez, ezért ebben a fejezetben csak a különbségeket emelem ki.

A kísérleteket BALB/c típusú nőstény egerekkel (19-21 gramm) végeztük. Négy egeret minden izolátum esetén a kezelés előtt felboncoltunk, és veséikből meghatároztuk az élő gombasejtek számát, hogy a kezelések hatékonyságáról még több információt gyűjthessünk. Ebben a kísérletben, az egyszeri, nagydózisú caspofungin *in vivo* hatékonyságát vizsgáltuk,

ezért ugyanolyan összdózisban a napi, alacsonyabb dózis hatékonyságát is vizsgáltuk. Az egereket öt napig kezeltük intraperitoneálisan *C. albicans* (17433, 10920), *C. orthopsilosis* (CP85, CP125) és *C. metapsilosis* (CP5, CP86) izolátumok esetén 1, 2 és 3 mg/kg napi, valamint 5, 10 és 15 mg/kg egyszeri dózissal. A *C. parapsilosis sensu stricto* (896/1, 9150) izolátumoknál 3 és 4 mg/kg napi illetve 15 és 20 mg/kg egyszeri dózisokat használtunk. A rezisztens *C. albicans* (DPL20) izolátumnál 4 és 16 mg/kg napi illetve 20 és 80 mg/kg egyszeri adagolást alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

Minimális gátló koncentráció eredményei RPMI-1640 közegben

A fajspecifikus határértékek alapján a *C. albicans* (MIC= 0,015 mg/L) és a *C. parapsilosis sensu stricto* (MIC= 1 mg/L) klinikai izolátumok RPMI-1640 tápközegben érzékenyek voltak a caspofungin iránt, míg a DPL20-as izolátum (MIC= 4 mg/L), rezisztens volt. A *C. orthopsilosis* (MIC= 0,12 mg/L) és a *C. metapsilosis* (MIC= 0,25-0,5 mg/L) izolátumok esetén fajspecifikus határérték jelenleg nincs megállapítva, de a CP92-es izolátum kivételével a *C. albicans* esetén megállapított 0,25 mg/l értéket nem haladta meg.

Minimális gátló koncentráció eredményei RPMI-1640+50% szérumban

Ötven százalék humán szérumot tartalmazó tápközegben, mind a négy vizsgált faj esetén a MIC értékek emelkedtek, az emelkedés mértéke 2-32-szeres volt az RPMI-1640-es tápközegben mérthez képest. *C. albicans* és *C. parapsilosis sensu stricto* esetén mindkét izolátumnál a MIC értékek 0,25 mg/L illetve 8 mg/L voltak. *C. orthopsilosis* esetén 2-4, míg, *C. metapsilosis* esetén a MIC értékek 1-4 mg/L értékekre emelkedtek.

Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640+50% szérumban

Minden izolátum jól növekedett RPMI-1640+50% szérumban. A négy faj, minden izolátuma esetén 0,5 x MIC értéken az idő-ölés görbék a kontroll görbéhez hasonló lefutást mutattak, azaz gátló hatást nem tapasztaltunk. A caspofungin fajtól függetlenül, minden izolátum ellen 1-2xMIC értékeken már fungisztatikus hatást mutatott. A kezdő csíraszámhoz képest a

csökkenés *C. albicans* esetén 1,35-2,67 log CFU/ml, míg *C. parapsilosis sensu stricto* esetén 0,05-1,41 log CFU/ml voltak.

C. orthopsilosis izolátumok esetén 24 óra múlva 8-16x MIC (16-32 mg/l) értékeken, míg 48 óra múlva 2-4x MIC (4-8 mg/l) értékeken a hatás fungicid volt. Hasonló ölési görbéket tapasztaltunk a *C. metapsilosis* izolátumok esetén is.

Az *in vivo* érzékenységi vizsgálatok eredményei I.

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. albicans* ellen

Mindkét klinikai izolátum ellen a caspofungin mindhárom dózisa legalább 2 nagyságrenddel csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát ($P < 0,001-0,05$).

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. parapsilosis sensu stricto* ellen

Mindkét klinikai izolátum ellen a caspofunginnak csak a legmagasabb (5 mg/kg) dózisa volt hatásos ($P < 0,001-0,01$), bár a 896/1-es számú izolátum ellen a napi 2 mg/kg is hatékony volt ($P < 0,05$).

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. orthopsilosis* ellen

A napi 1 mg/kg dózis egyik esetben sem csökkentette szignifikánsan a vesékből kitenyészett gombák számát, de a 2 és 5 mg/kg-os dózisok minden esetben hatékonyak voltak ($P < 0,001-0,05$).

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. metapsilosis* ellen

Eredményeink hasonlóak a *C. orthopsilosis* esetén kapott eredményekhez, de a napi 5 mg/kg-os dózisok legalább 2 nagyságrenddel csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát a kontrollokhoz képest.

Az *in vivo* érzékenységi vizsgálatok eredményei II.

Kezdő csíraszám a kezelés megkezdésekor

A kezdő csíraszám az egyes fajok esetén hasonló volt, annak ellenére, hogy a vénás fertőzés során lényegesen kisebb dózist kaptak a *C. albicans* izolátumokkal fertőzött egerek. *C. albicans* esetén $8,1 \times 10^4$ - $7,4 \times 10^5$, *C. parapsilosis sensu stricto* esetén $8,5 \times 10^4$ - $4,7 \times 10^5$, *C. orthopsilosis* esetén $3,9 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^6$ míg *C. metapsilosis* esetén $9,1 \times 10^4$ - $7,7 \times 10^5$ CFU/gramm volt a kontroll egerek veséiből a kezelés kezdetén kitenyészett gombák száma. A kezelési periódus végére a kontroll egerek esetén *C. albicans*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok esetén egy nagyságrenddel nagyobb, de 2 nagyságrenddel kevesebb volt a növekedés az egerek veséiben. A két *C. parapsilosis sensu stricto* illetve a DPL20, echinocandin rezisztens *C. albicans* izolátumok esetén a növekedés kisebb volt egy nagyságrendnél.

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. albicans* ellen

A klinikai izolátumok ellen mind a hatféle kezelés statisztikailag is szignifikáns módon csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombák számát, a hatodik napi kontrollhoz képest ($P < 0.05$ - 0.01), de az első napi

kontrollhoz képest csak minimális csökkenés, jóval kisebb, mint egy nagyságrendi csökkenés fordult elő. Az egyes kezelések között egyik esetben sem volt statisztikailag is szignifikáns különbség ($P > 0,05$). A DPL20-as számú izolátum esetén hatékony dózis nem volt ($P > 0,05$). Ráadásul az összes kezelési séma esetén az első napi kontrollhoz képest növekedés volt megfigyelhető, még a legnagyobb dózisok esetén is.

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. parapsilosis sensu stricto* ellen

Mindkét klinikai izolátum esetén a napi 3 mg/kg dózis nem, de a napi 4 mg/kg illetve az 15 és 20 mg/kg dózisok statisztikailag is szignifikánsan csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát ($P < 0.05-0.01$).

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. orthopsilosis* ellen

A CP85-ös számú izolátum ellen a legkisebb napi dózis (1 mg/kg) és az ezzel korrespondáló egyszeri dózis (5 mg/kg) nem voltak hatékonyak, de a többi kezelési séma szignifikánsan csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát ($P < 0.05-0.001$). A napi 3 mg/kg-os illetve egyszeri 15 mg/kg-os dózisok még az első napi kontrollhoz képest is legalább 1 nagyságrenddel csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát. A CP125-ös izolátum esetén, csak a napi 3 mg/kg illetve az egyszeri 10 és 15 mg/kg-os napi dózisok voltak statisztikailag is szignifikáns módon hatékonyak ($P < 0.05-0.001$).

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. metapsilosis* ellen

Az összes alkalmazott dózis, kivéve a napi 1 mg/kg-ot, a CP86-os számú izolátumnál, szignifikáns módon csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát. Az első napi kontrollokhoz képest, kevesebb, mint egy nagyságrendnyi csökkenést észleltünk. Az egyes terápiás dózisok között szignifikáns különbség nem volt ($P > 0,05$).

MEGBESZÉLÉS

Az invazív *Candida* fertőzések jelentős problémát okoznak a különböző egészségügyi intézményekben, megnövelve a kórházi tartózkodást, és a jelentős költségnövekedés ellenére a mortalitás igen magas. A leggyakoribb *Candida* faj még mindig a *C. albicans*, de a nem *C. albicans* fajok okozta invazív fertőzések száma az utóbbi 3 évtizedben növekszik. Ebben részben a fluconazolnak az 1991-es bevezetése éppúgy közrejátszik, mint az első echinocandinnak, a caspofunginnak a 10 évvel későbbi bevezetése a terápiás gyakorlatba.

Vizsgálatainkban a legvirulensebb (*C. albicans*) és a legkevésbé virulens (*C. parapsilosis*) *Candida* fajok *in vitro* és *in vivo* érzékenységét vizsgáltuk a legkorábban bevezetett caspofungin iránt. Választ kerestünk arra, hogy az RPMI-1640-ben mért MIC értékek milyen mértékben emelkednek RPMI-1640+50% szérumban jelenlétében, és a két tápközegben mennyire érvényesül a caspofungin ölő hatása *C. albicans* és a „psilosis” komplex tagjai ellen. Ugyanazon vizsgált izolátumokat kétféle terápiás stratégiát alkalmazva neutropénia egérmódelben is vizsgáltuk, és összefüggést kerestünk az *in vitro* és *in vivo* eredmények között.

C. albicans izolátumok esetén a MIC értékek RPMI-1640+50% szérumban tesztközegben, bár emelkedtek, már alacsony ($\geq 0,25$ mg/l) koncentrációkon is kitűnő fungisztatikus hatást figyeltünk meg az idő-ölés kísérletekben. *In vivo* eredményeink nagymértékben korrelálnak az *in vitro* eredményekkel, hiszen már a napi 1 mg/kg-os dózis is mindkét izolátum ellen, mindkét kísérletben, szignifikáns mértékben csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát. Mivel a farmakodinámiás target (a

gomba) mind a kísérleti állatban mind, pedig emberben azonos, ezért ha a görbe alatti területek illetve a csúskoncentrációk megegyeznek, akkor hasonló *in vivo* hatékonyságot várhatunk állatban és emberben egyaránt. A napi 1 mg/kg-is dózis egérben 3,6-5,04 mg/l csúskoncentráció értéket illetve 35,49-53,59 mg·h/l görbe alatti területet (AUC) eredményez. Az egérkísérletben alkalmazott napi 1 mg/kg-os dózis emberben napi 35 mg/kg-os dózissal felel meg, ami 5,97 mg/l csúskoncentrációt és 54,9 mg·h/l görbe alatti területet (AUC) eredményez. Hasonlóan az egérnél alkalmazott napi 2 és 5 mg/kg kezelés emberben napi 50 mg illetve 70 mg-os dózissal felel meg.

Hasonlóan választottuk az egyszeri, nagydózisban alkalmazott kezeléseket is, hogy a görbe alatti területek és/vagy a C_{max} értékek hasonló értékeket vegyenek fel. Ezek alapján a 10920-as és a 17433-as *C. albicans* izolátumok ellen az egyszeri 5, 10 és 15 mg/kg-os dózisok éppúgy hatékonyak voltak, mint a napi 1, 2 és 3 mg/kg-os dózisok. Eredményeink megegyeznek az irodalomban található hasonló kísérleti modellek eredményeivel. Feltűnő, hogy az első napi kontrollhoz képest csak szerény mértékű csíraszám csökkenést tapasztaltunk. Ez az eredmény felhívja a figyelmet arra, hogy neutropéniás egyének esetén az echinocandin terápia nem biztos, hogy eliminálja a kórokozót, azaz a kezelés során is csak fungisztatikus hatást érhetünk el. Így, a normál dózissal történő kezelés idő előtti megszakításakor a belső szervekben még sok kórokozó található, amelyek az antifungális szer hiányában gyors növekedésnek indulva a beteg halálát okozhatják.

Az echinocandin rezisztens, homozigóta mutációval rendelkező DPL20-as törzs esetén semmilyen dózis nem volt hatékony, ráadásul az első napi

kontrollhoz képest bármilyen kezelési séma esetén növekedést tapasztaltunk. A két érzékeny izolátumhoz képest a hatodik napon a kontroll egerekből kitenyészett élő gombasejtek száma alacsonyabb volt, jelezve, hogy a virulenciája kisebb a másik két (vad) izolátumhoz képest.

A „psilosis” csoport tagjai ellen a caspofungin *in vitro* aktivitása 50% szérumban csökkent, ahogy a MIC értékeket és az idő-ölés görbék eredményét megvizsgáljuk. A szérumban kapott eredmények a klinikailag elérhető caspofungin koncentrációknál elsősorban a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok esetén teszik kérdéssé a caspofungin *in vivo* hatékonyságát, bár a napi 4 mg/kg-os dózisoknál egérben 16-18,4 mg/l *C_{max}* értékeket lehet mérni. A napi 5 mg/kg dózis azonban mindkét izolátumnál hatékony volt (embernél ez napi 70 mg-os dózisnak felel meg). Első *in vivo* kísérleti elrendezésünk megerősíti azokat az eredményeket, amelyek alapján a „psilosis” csoport tagjai ellen a caspofungin még neutropéniás állapotban is hatékony lehet.

A „psilosis” csoport tagjai ellen a második *in vivo* kísérleti elrendezésünk esetén a legfontosabb eredmény, az, hogy ugyanolyan összdózis esetén az egyszeri, nagydózisban adagolt caspofungin hatékonyabb lehet, mint a naponta adagolt, kisebb dózisú terápia. Ennek oka a következő lehet:

Az echinocandinok egyedi farmakokinetikája lehetővé teszi, hogy a belső szervek mintegy echinocandin rezervoárokként működjenek az intravénás kezelés után. Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a szövetekből a vérbe visszaáramló caspofunginnak fontos szerepe van a tartósan magas szérum echinocandin szint biztosításában. Annak ellenére, hogy a caspofungin nagymértékben fehérjéhez kötődik a szérumban, a klinikai

hatékonyságban nemcsak a vér szérumszintjének, de a szövetekben megtalálható, akár kötött formában lévő caspofunginnak van a legfontosabb szerepe. A kórokozók eliminációja szempontjából ez nagyon fontos, hiszen a különböző kórokozók nemcsak a vérben vannak jelen, hanem a vérből bármelyik szervbe beléphetnek, disszeminált fertőzést idézve elő, ami sokkal súlyosabb mintha a kórokozó csak a vérben lenne jelen. Ezért, fontos, hogy a szövetekben is nagy koncentrációban legyen jelen a gyógyszer. Egyszeri, nagydózisú kezelés esetén a C_{max} értéke magasabb lesz, illetve a görbe alatti terület (ami az összdózist reprezentálja) sokkal hamarabb kialakul. Mivel ötnapos kezelésünk esetén a görbe alatti terület (AUC) kialakításához a negyedik illetve ötödik alkalommal adagolt kisebb, napi dózisok nem biztos, hogy teljes mértékben hozzá tudnak járulni, ezért lehet előnyösebb az egyszeri, nagydózisú caspofungin a „psilosis” csoport tagjai ellen ugyanolyan összdózis esetén a kisebb, napi dózissal összehasonlítva. Klinikai hatékonysága az egyszeri, nagydózisú echinocandin terápiának kevésbé ismert. A fellelhető kéziratok ebben a témában döntően az echinocandinok profilaktikus alkalmazásáról szólnak, és az egyszeri nagydózisú echinocandin terápia ugyanolyan klinikai hatékonyságot mutatott, mint a napi kisebb dózisú terápia.

Az invazív candidasis célzott illetve empirikus terápiájában az echinocandinoknak van jelenleg a legnagyobb szerepe. A klinikai tünetek, és az anamnézis alapján fel kell, hogy merüljön az esetleges gombafertőzés gyanúja a nagy rizikó faktorral rendelkező egyének esetén, így a megfelelő mintavételek után (vér, torok, sebváladék stb.) be kell indítani a fluconazonon vagy valamelyik echinocandinon alapuló terápiát. Az

echinocandinok kitűnő *in vivo* hatékonysága gyakorlatilag az összes *Candida* faj ellen, illetve a mellékhatások csekély száma lehetővé teszi az egyszeri, nagy dózisú vagy a naponta nagyobb dózisban történő adagolást.

Bár az echinocandinok nem az elsőként ajánlott szerek *C. parapsilosis sensu stricto* ellen, a legújabb ajánlások az empirikus terápia során adott echinocandin terápia folytatását javasolják, ha a beteg klinikailag javult. Ezért, fontos, hogy a „psilosis” csoport esetén is megfelelő *in vitro* és *in vivo* kísérletek álljanak rendelkezésre az echinocandin terápia hatékonyságának a megjósolására.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánkban meghatároztuk a caspofungin *in vitro* és *in vivo* aktivitását a „psilosis” csoportba tartozó három faj (*Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* és a *Candida metapsilosis*) és a legvirulensebb faj, a *C. albicans* ellen.

A caspofungin *in vitro* aktivitásának a 2-32-szeres csökkenését tapasztaltuk RPMI-1640 +50% humán szérum tesztközegben a standard RPMI-1640 tesztközeghez képest, a MIC értékek emelkedése és az idő-ölés görbék felvétele során kapott eredmények alapján. Neutropéniás egérmodellben, már a napi 1 mg/kg caspofungin is hatékony volt *C. albicans*, a napi 2 mg/kg a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis*, míg a napi 5 mg/kg a *Candida parapsilosis sensu stricto* izolátumok ellen. *C. albicans* esetén az egyszeri 5, 10 és 15 mg/kg caspofungin dózisok hatékonysága nem volt rosszabb a napi 1, 2 és 3 mg/kg dózishoz képest, de a caspofungin rezisztens izolátum esetén a napi 16 mg/kg, és az egyszeri 80 mg/kg dózisok is hatástalanok voltak. *Candida parapsilosis sensu stricto* esetén az egyszeri 15 és 20 mg/kg-os illetve a napi 4 mg/kg dózisok hatékonyak voltak. *C. orthopsilosis* ellen az egyszeri 10 és 15 mg/kg-os dózisok és a napi 3 mg/kg dózis, míg a *C. metapsilosis* ellen az egyszeri 5, 10 és 15 mg/kg-os dózisok illetve a napi 2 és 3 mg/kg dózisok statisztikailag szignifikáns módon csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát.

Korábbi, *C. albicans*-ra vonatkozó ismereteinket megerősítve, az egyszeri, nagydózisú caspofungin *in vivo* hatékonysága nem rosszabb, mint az ugyanolyan összdózisban adagolt kisebb, napi dózisokban adott caspofungin. Bár a „psilosis” csoport esetén az egyszeri, nagydózisú

caspofungin többször hatékonyabb volt, mint a napi kisebb dózisok (ugyanolyan összdózis esetén), további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az egyszeri, nagydózisú echinocandin terápiát érdemes-e alkalmazni candidemiában szenvedő betegek kezelésére.



Iktatószám: DEENKÉTK/196/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Berényi Réka

Neptun kód: J4KQE8

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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)
2. 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





További Közlemények

3. 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)
4. 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)
5. 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,163

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,092

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

Debrecen, 2014.08.28



Poszterek

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. Misztó and G. Kardos Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against *C. dubliniensis*, *C. lusitanae*, *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)

Konferencia előadások

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. IF: 0,646

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