

Válasz Prof. Burián Katalin opponensi véleményére

Köszönöm Burián Katalin professzor Asszonynak, hogy értekezésem bírálatát elvállalta, valamint nagyon köszönöm elismerő szavait és pozitív értékelését.

Kérdéseire sorrendjük szerint válaszolok.

Megjegyzések és kérdések a „Posakonazol *in vitro* hatékonysága *Candida* fajok ellen” fejezetet illetően:

1. A Jelölt ezt írja: „Az MFC meghatározás eredményei a *C. parapsilosis* kivételével, kitűnő korrelációt mutattak az idő-ölés görbék által kapott eredményekkel. *C. parapsilosis* esetén a diszkrepancia oka az lehetett, hogy miután az üregek tartalmát Sabouraud táptalajra kicseppentettük majd hagytuk megszáradni, a kaccsal való szélesztés során a gombákat nem sikerült teljes mértékben eltávolítani a gyógyszer, azaz a POSA forrásától. Így a gombák növekedése még 48 óra után is gátolt volt, ezért a táptalajon (tévesen) nem észleltünk gombanövekedést.”

Ezzel kapcsolatban az a kérdés merült fel bennem, mint bírálóban, hogy milyen módszerrel lehetne eltávolítani vagy jelentősen csökkenteni a posakonazolt a rendszerből, hogy ne zavarja a gombanövekedést?

Válasz: Klepser és munkatársai a bakteriológiában használatos módszereket adaptálták az antifungális szerek fungicid vagy fungisztatikus hatásának a meghatározására az idő-ölés görbék vizsgálatával (<https://doi.org/10.1128/aac.42.5.1207>). A módszer kitűnően használhatónak bizonyult, de munkagényessége miatt Cantón és munkatársai egy könnyebben kezelhető, és egyszerre nagyobb számú gomba vizsgálatát lehetővé tevő módszert fejlesztettek ki, a minimális fungicid koncentráció (MFC) meghatározását (doi: 10.1128/AAC.48.7.2477-2482.2004.). Az MFC módszer nem helyettesíti a nagy pontosságú idő-ölés görbék felvételét, a leghelyesebb tehát, ha a nagyobb számú MFC meghatározást kiegészítjük néhány izolátom esetében az idő-ölés görbék felvételével is. Diszkrepancia esetén természetesen az idő-ölés görbék eredményét kell elfogadni.

A posakonazol eltávolításának legegyszerűbb módja, ha az üregek tartalmát (200 µL) egy 5 vagy 10 mL-es fiziológiás sóoldatot/desztillált vizet tartalmazó csőbe töltjük, majd vákuum filtráció (pórus méret 0,45 µm) után a filtrert Sabouraud agarra helyezzük, és inkubáljuk.

2. A disszertáció szerint a korábbi kutatások a pulmonáris epitél sejtek sejt-organellumaiban, főleg az endoplazmatikus retikulumban és az alveoláris makrofágokban a posakonazol akkumulációját észlelték.

Milyen hipotézisek fogalmazhatók meg arra vonatkozóan, hogy a posakonazol sejten belüli akkumulációja mely fertőzési helyek (tüdő, vér stb.) esetében jelenthet terápiás előnyt vagy hátrányt?

Válasz: Blennow és munkatársai hét, graft-versus-host betegségben elhunyt betegnél határozták meg a szérumban és a belső szervekben a posakonazol koncentrációját per os profilaxis után (posakonazol szuszpenzió) (doi: 10.1128/AAC.03252-14.). A posakonazol koncentráció tartományok a szérumban 0,01-0,39 mg/L, az agyban 0,04-0,32 mg/gramm, a vesékben 0,28-4,6 mg/gramm, a májakban 0,26-7,46 mg/gramm, a szívekben 0,18-1,79 mg/gramm, míg a tüdőkben 0,11-4,53 mg/gramm értékek voltak. Ezek alapján az agy kivételével magasnak számító koncentrációk miatt, terápiás sikert

várhatunk vese-, máj-, szív-, és tüdő érintettséggel járó invazív gombafertőzések esetén. Megjegyzést érdemel, hogy 14 nap intravénás posakonazol adagolás után, a szérumban mérhető $C_{\max}$ értéke 2,5 mg/L, míg a $C_{\min}$ 1,5 mg/L voltak, jelezve, hogy a posakonazol a szérumban is akkumulálódik (doi: 10.1128/AAC.02686-13.). Ráadásul, egy COPD-ben szenvedő 69 éves, 37 kg-os nőbetegnél 300 mg-os tabletta szedése után 9 nappal 10,1 mg/L-es posakonazol szintet mértek. Ez bőven a toxikus szint felett volt, ami reverzibilis látási hallucinációban, posturális hipotenzióban, diszfágiában és a kognitív funkciók romlásában nyilvánult meg (<https://doi.org/10.1128/aac.02739-15>).

3. A három magas posakonazol MIC-et mutató izolátumnál (egy *C. albicans* és kettő *C. glabrata*) történt-e rezisztencia-mechanizmus vizsgálat (pl. szekvenálással), vagy, ha nem, mi lehet a legvalószínűbb magyarázata a magas MIC-nek?

Válasz: Rezisztencia-mechanizmus vizsgálatot nem végeztünk.

Mindkét faj esetén a lanoszterol demetiláz enzim, a target megváltozása (ERG 11 gén) és túlműködése szerepet játszhat a rezisztencia kialakulásában. Az ERG 11 gén mutációja *C. glabrata* esetén ritkábban fordul elő. Az ERG3 gén (a Δ -5,6-deszaturáz enzimet kódolja) pontmutációi miatt a sejtmembrán ergoszterol tartalma csökken, illetve nem jön létre a toxikus intermedier, a 14-metilergoszta-dién-diol.

Jelentős rezisztencia mechanizmusok az efflux pumpák is. *C. albicans* esetén az ABC típusú transzporterek közül a Cdr1 (Candida drug resistance 1) és Cdr2 szerepe meghatározó, míg *C. glabrata* esetén az Snq2 transzporternek is szerepe van. Az MFS típusú transzporterek (major facilitator superfamily) közül az Mdr1 megnövekedett expressziója *C. albicans* esetén vezet triazol rezisztenciához (doi: 10.1093/jacamr/dlaf106.).

4. A dolgozatban ez szerepel: „a POSA koncentrációja a szívben, a tüdőkben, a májban és a vesékben (de az agyban nem) 5-10-szeresei voltak a szérumban mérhető POSA koncentrációknak.”

A Jelölt szerint mi lehet annak hátterében, hogy a posakonazol nem koncentrálik annyira a központ idegrendszerben, az agyban?

Válasz: Folytatva Blennow és munkatársainak a vizsgálati eredményeinek az elemzését (2. kérdés és válasz), a hét betegből öt beteg 19-199 napig kapott per os profilaktikus terápiát, és náluk az agyszövetben 0,04-0,32 mg/gramm posakonazolt mértek (doi: 10.1128/AAC.03252-14.). Ezeknek a betegeknek a per os táplálása, beleértve a posakonazol adagolást is nagyon nehéz volt, ennek ellenére az agyszövetben mért értékek a *Candida* fajok MIC értékei közelében voltak. Hasonlóan alacsony posakonazol koncentrációkat mértek leukémiás gyerekek esetében is per os posakonazol terápia esetén. (doi: 10.1093/jac/dkae005.). Ezzel ellentétben Lelièvre és munkatársai patkány modellben a fertőzött állatokban sokkal magasabb posakonazol koncentrációkat mértek a nem fertőzött állatokhoz képest: a $C_{\max}$ fertőzött állatoknál 2,72 mg/gramm, míg nem fertőzött állatoknál 0,35 mg/gramm voltak, miközben a felezési idő 40 órától 61,8 órára növekedett (doi: 10.1016/j.biopha.2025.118918.). Ezen adatok alapján a posakonazol koncentrációja az agyszövetben csak gyulladás esetén növekszik a terápiás szint környékére, ami elég lehet a gombák okozta meningoencephalitis kezelésére. Mindazonáltal, a liquorban akár 15-20 g/L fehérje is mérhető, ami pedig csökkenti a nagy fehérje-kötődéssel rendelkező posakonazolnál a szabad, azaz aktív gyógyszer szintjét.

Megjegyzések és kérdések az „Antifungális szerek *in vitro* és *in vivo* hatékonysága a „psilosis” csoport ellen” fejezetet illetően.

1. A dolgozatban a Jelölt említi az echinocandin kezelés során kialakuló áttöréses kandidémiák lehetőségét.

Ezzel kapcsolatban az lenne a kérdésem, hogy a Jelölt szerint mely tényezők a legfontosabbak áttöréses (breakthrough) kandidémia kialakulásában a „psilosis” csoport esetén (pl. katéter, biofilm, suboptimális expozíció, FKS mutációk?), és ezek közül melyek köthetők közvetlenül az echinocandin farmakodinámiás sajátosságaihoz?

Válasz: Breakthrough candidemia alapvetően két esetben fordul elő. Az egyik lehetőség, hogy az akár több hetes echinocandin profilaxis után észlelünk invazív *Candida* fertőzést. A másik lehetőség, hogy egy már meglévő (pl. *C. glabrata* okozta) candidémiát sikeresen kezeltünk (a hemokultúrák tenyésztési eredményei negatívak), és a gomba eradikálása után következik be egy másik gomba által okozott véráram fertőzés (doi: 10.1016/j.cmi.2015.09.029.). A breakthrough candidemia kialakulásában a katéterek (és ezzel összefüggésben a biofilm) mind a két esetben szerepet játszanak. Az elsődleges candidemia kezelésénél, ha a kórokozót elimináltuk, akkor az echinocandin expozíció valószínűleg elégséges volt (legalábbis a vér esetén). Az áttöréses candidemia-t okozó gomba származhat a bőrről vagy a bélrendszerből, de elég nagy mennyiségben kerül be a véráramba, hogy a hemokultúrák pozitívvá váljanak, illetve a beteg állapota rosszabbodjon. Különösen a hasüreg esetén gyakori, hogy suboptimális echinocandin koncentráció mérhető, ezért a bélrendszerben kolonizálódó gombáknak jelentős a szerepe a breakthrough candidemia kialakulásában. Breakthrough candidemia-t bármelyik *Candida* faj okozhat (hasonlóan a primer candidémiák-hoz), és a *C. parapsilosis* általában a leggyakrabban izolálható kórokozók között szerepel (doi: 10.3324/haematol.11149., <https://doi.org/10.1038/s44259-025-00173-5>). Ha az alapbetegség miatt (pl. immunszuppresszió vagy sebészeti műtétek utáni varratelégeltelenség) nem sikerül megszüntetni a kolonizációs területől történő transzlokációt a vérbe, a prognózis rossz. A breakthrough candidemia kialakulásában ezért a perzisztens kolonizáció, a katéter használata és a suboptimális echinocandin koncentrációk egyaránt számítanak, de a klasszikus, az FKS mutáción alapuló rezisztenciának a nincs benne szerepe (doi: 10.1016/j.tim.2024.09.008.).

2. Az echinocandinok biofilmekkel szembeni aktivitása a klinikai gyakorlatban az alkalmazásuk mellett szólhat. A Jelölt tapasztalatai alapján mennyiben befolyásolja a biofilm-képzés, különösen CVC-asszociált infekcióban, a „psilosis” csoport terápiás megítélését, és milyen érvek szólnak echinocandin vagy flukonazol választás mellett vagy ellen ilyen esetekben?

Válasz: Tíz-tizenöt évvel ezelőtt az echinocandinok magas ára egyértelműen korlátozta a használatukat, még indokoltnak tűnő esetekben is. Napjainkban a napi ár már nem korlátozó tényező, ezért az echinocandinokat minden indokolt esetben megkapják a betegek. A „psilosis” csoportnál a klinikusok tisztában vannak az echinocandinok biofilm ellenes hatásával, ezért általában már az echinocandinokra esik a választás, még klinikailag jó állapotban lévő betegeknél is.

3. A Jelölt többféle *in vitro* módszert alkalmaz (MIC, MFC, idő-ölés) az *in vitro* kísérletei során. Mely *in vitro* paramétert tartja a legjobb prediktornak a klinikai hatékonyság előrejelzésére a „psilosis” csoport esetében (MIC, MFC, idő-ölés, esetleg PK/PD index),

és találtak-e olyan mértékű korrelációt, amely gyakorlati következtetések levonását is lehetővé teszi?

Válasz: A vizsgálatokban használt izolátumokkal antibiotikum médium 3 (AM3), RPMI-1640 és 50% szérumot tartalmazó táptalajokban elvégzett MIC, MFC és idő-ölés görbék meghatározása alapján, AM3 tesztközeg esetén felül, míg 50% szérummal végzett vizsgálatainkban alul volt becsülve a caspofungin *in vitro* aktivitása. Az idő-ölés görbék eredményei RPMI-1640 és 50% szérum tápközegek esetén egyértelműen mutatták, hogy a caspofungin a szérumban elérhető koncentrációk mellett fungisztatikus hatású a „psilosis” csoport ellen. A *C. parapsilosis sensu stricto* ellen az echinocandinok fungisztatikus hatása már korábban ismert volt, de vizsgálatainkkal sikerült bizonyítani, hogy a normál dózisban adagolt caspofungin hatékony a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* ellen is. A sok elvégzett munka alapján/ellenére jelenlegi tudásunk alapján az RPMI-1640 tápközegben meghatározott caspofungin MIC érték önmagában is jó prediktor mindhárom faj esetében a caspofungin (és általában az echinocandinok) *in vivo* hatékonyságára a „psilosis” csoport tagjai által okozott invazív fertőzések esetén. Természetesen a rutin diagnosztikai munkában a caspofungin érzékenységi eredményét az anidulafungin vagy a micafungin MIC értékek alapján kell interpretálni.

4. A Jelölt *in vitro* adatai alapján a caspofungin iránt a *C. parapsilosis sensu stricto* a legkevésbé érzékeny, ugyanakkor a klinikai eredmények szerint az echinocandin kezelés nem feltétlenül rontja a terápia kimenetelét.

A kérdésem az, hogy miképp értelmezhető és magyarázható a „psilosis” csoport echinocandin MIC emelkedése (különösen *C. parapsilosis sensu stricto* esetén) a klinikai kimenetel tükrében, illetve milyen tényezők járulhatnak hozzá ahhoz, hogy a laboratóriumi érzékenység és a klinikai hatékonyság nem mutat szoros összefüggést?

Válasz: Egy terápia sikerességében a MIC érték csupán egy azon tényezők közül, amelyek befolyásolják a végkimenetelt. Jól ismert, hogy a *C. albicans* esetén a legfőbb antifungális szerek MIC értékei nagyon alacsonyak, az átlagos halálozás a legvirulensebb *Candida* faj esetében 40% körül van, de az intenzív terápiás osztályokon 50-60% is lehet (saját adatok is!). A *C. parapsilosis sensu stricto* virulenciája saját adataink és a nemzetközi irodalom szerint is sokkal kisebb, mint a *C. albicans* esetén (doi.org/10.1093/mmy/myt019). Katéter-asszociált *C. parapsilosis* candidemia-nál, ha a betegnél nem alakul ki szeptikus sokk, illetve a bélrendszerben a gomba nincs jelen, ahonnan folyamatos lehet a véráramba való beáramlás, akkor a katéter eltávolításával és a megfelelő antifungális terápiával a beteg gyógyulási esélyei javulnak (<https://doi.org/10.1093/cid/ciu158>). Ennek megfelelően a normál, vagy az emelt dózisú echinocandin terápia a véráramra korlátozódó *Candida parapsilosis sensu lato* fertőzések kezelésénél, a relatíve magas echinocandin MIC értékek ellenére mikrobiológiailag is teljesen hatékony lehet.

5. A Jelölt neutropéniás egérmodell alkalmazott az antifungális szerek *in vivo* hatékonyságának vizsgálatához, miközben klinikailag invazív *C. parapsilosis sensu lato* infekciókban a neutropénia nem mindig a legfontosabb rizikófaktor.

Milyen transzlációs korlátokat hordoz a neutropéniás modell alkalmazása a „psilosis” csoport terápiás megítélése szempontjából, és mennyiben várható eltérés más típusú immunsuppresszióval járómodellben?

Válasz: A monocitáknak, a makrofágoknak, a neutrofil granulocitáknak és a T-sejteknek egyaránt fontos szerepe van a gombafertőzések elleni védekezésben. A ciklofoszfamid indukálta leukopénia gyakorlatilag az összes, az immunválaszban résztvevő sejt működését gátolja, különösen az általunk használt tartósan neutropeniás modellben. Érdekes, hogy ez a modell nem mindig elégséges *C. glabrata* okozta szisztémás fertőzés esetén, ahol érdemes az immunszuppressziót kiegészíteni glükokortikoiddal is (doi: 10.33696/immunology.4.130.).

A glükokortikoidok okozta leukopénia nagyon hasonló a ciklofoszfamid okozta leukopéniához, de limfocitopénia esetén fokozott Th2 és csökkent Th1-es típusú immunválasszal is számolni kell. A neutrofil granulociták működése szintén súlyosan károsodik, beleértve a csökkent fagocitózist, a degranulációt és a szabad gyökök képződését. Az apoptózis gátlása miatt paradox módon neutrofiliiát tapasztalunk a diszfunkcionális neutrofil granulociták miatt (doi: 10.1038/cmi.2016.39.).

A T-sejtek, de kisebb mértékben a neutrofil granulociták működését cyclosporin A kezeléssel is gátolhatjuk. Ez utóbbi két esetben feltételezhetjük, hogy a szervekből kitenyésztett gombák száma alacsonyabb lehet, a ciklofoszfamiddal összehasonlítva (doi: 10.1038/cmi.2016.39.).

Függetlenül az immunszuppresszió okától az egerekbe intravénásan bejuttatott gomba, a virulenciájától függően az embernél előforduló szepszis klinikai képét fogja utánozni. Mivel a „psilosis” csoport tagjainak a virulenciája alacsony ezért relatíve nagy dózissra volt szükségünk az átmenetileg neutropeniás kísérleti modellünkben ($2-5 \times 10^7$ CFU/egér). Ráadásul nőstény egereket használtunk (éppen az állt rendelkezésünkre), amelyeknek az immunrendszere a nem teljes neutropénia miatt hatékonyabb a gombák ellen. Nagyobb dózist alkalmazása nem volt lehetséges, mivel az előkísérleteknél 1-2 nap alatt az egerek jó része elpusztult (valószínűleg embolizáció miatt) (6.7.1.). A teljes neutropénia esetén sikerült tehát reprodukálható módon elvégezni a kísérleteinket.

Tisztelt Bíráló által felvetett transzlációs problémák valósak, hiszen a sok hasonlóság ellenére jelentős különbségek vannak az egérmodellek és a humán fertőzések között. Hiszen a kísérletekbe bevont egerek általában fiatal, alapbetegségben nem szenvedő egerek, amelyek egy jól meghatározott kórokozóval, egyetlen alkalommal lesznek fertőzve és a fertőzés lefolyása is gyorsabb, mint embernél. Az emberi fertőzéseknel egyszerre akár több kórokozó (baktériumok) is jelen lehet az általában idősebb, gyengült immunrendszerrel rendelkező egyén esetén, és a kórokozó beáramlása a normálisan steril testtájukba (pl. véráram) is a többször is előfordulhat. Természetesen humán fertőzések esetén a kimenetelt nagymértékben javítja az intenzív terápiás ellátás, amely az egérmodellekben gyakorlatilag hiányzik.

Megjegyzések és kérdések „Az echinocandinok hatékonyságának a korlátai a *Candida* fajok ellen” című fejezetet illetően

1. A CLSI és az EUCAST ajánlásai szerint a *Candida* fajok antifungális érzékenységét 24 órás inkubáció után kell értékelni, ami a gyakorlatban csökkenti annak esélyét, hogy a paradoxical growth (PG) vagy a trailing effect (TE) jelenségeket észleljék. A vizsgálatok során azonban több ritkábban izolált faj esetén a gyenge 24 órás növekedés miatt szükség volt a 48 órás leolvasásra is.

A PG és TE erősen inkubációidő-függőnek tűnik. Hogyan igazolta a Jelölt, hogy a 24h és 48h között megjelenő különbségek nem a növekedési kinetika (lassú növekedésű törzsek) következményei?

Az izolátumoknál tapasztalt „gyenge növekedés” miatt történt 48 órás leolvasás. Milyen objektív küszöböt használtak a laborban annak eldöntésére, hogy a 24 órás leolvasás „nem értékelhető”?

Válasz: Először a kérdés második részével kezdeném a választ. A „nem értékelhető” azt jelentette, hogy még a kontroll üregben sem volt vagy csak éppen sejthető volt a növekedés. *C. lipolytica*-nál a 48 órás leolvasásnál is csak minimális, bár látható növekedést észleltünk. *C. lipolytica* esetén ezért elvégeztük két izolátummal az idő-ölés görbék felvételét is, amit a kézirat első változatában említettünk is.

A PG és a TE, ahogy a dolgozatban kitértem rá, erősen idő-függő jelenség volt. Igazából, saját korábbi eredményeink esetén is a leghihetőbb megerősítés a két jelenségre az idő-ölés görbék felvétele volt, amit ebben az esetben (több száz izolátum versus négy echinocandin) nem lehetett alkalmazni. A MIC teszt sztrip, pontosan a Bíráló által feltett kérdésre adja meg a választ, hiszen saját magunk is meggyőződhattunk (illetve meg is nyugodhattunk) a szemmel látható növekedésről már 24 óra múlva, legyen az PG vagy TE (10. ábra).

2. A PG és TE definíciók illetve reprodukálhatóság kapcsán a bírálóban az alábbi kérdések merültek fel.

Milyen definíció alapján különítették el a PG-t a TE-től, pl. milyen vizuális vagy kvantitatív kritériumok szerint, és az eredményt értékelő munkatárs szubjektivitásának elkerülésére történt-e értékelés egy másik kolléga által?

A PG és a TE detektálása mennyire függött a használt tápközegtől, inokulumtól, lemez típusától vagy leolvasási módszertől?

Válasz: Mivel a kísérletek során végig a CLSI által leírt módszert alkalmaztuk, ezért a táplemez üregei U alakúak voltak, és vizuálisan (szabad szemmel való MIC leolvasás) határoztuk meg a MIC értékeket. A PG jelenségét már 2003-ban észleltük, amikor a caspofunginnal elkezdtük a kísérleteinket. Mint minden új antifungális szer esetén először *C. albicans* izolátumokkal végeztünk MIC meghatározást. Utólag bár szégyenkezve, de be kell, hogy valljam nem tulajdonítottunk nagyobb jelentőséget észlelésünknek. Korábbi PhD hallgatóimmal a későbbiekben már alaposan vizsgáltuk a jelenséget több *Candida* faj nagyszámú izolátumai esetén mind a MIC, mind az MFC, mind pedig az idő-ölés görbék segítségével. Echinocandinok esetén ha MFC meghatározást végeztünk, akkor mindig emelt csíraszámot (10^5 CFU/mL) használtunk, de a standard csíraszámú MIC meghatározással összehasonlítva (10^3 CFU/mL) a PG és a TE jelenségei nem voltak gyakoribbak. A folyamatosságot én képviseltem az évek alatt, és Dr. Kovács Renátó valamint Dr. Tóth Zoltán kollégáimnak átadtam a megfelelő tudást a jelenségek felismerésére, ezért hárman egymástól függetlenül és egymást ellenőrizve kategorizáltuk az egyes izolátumok növekedésénél a PG vagy a TE jelenségét.

A PG leggyakrabban RPMI-1640 tápközegben fordult elő, de ugyanazon izolátumoknál általában nem fordult elő antibiotikum medium 3 (AM3) tápközegben. Ha RPMI-1640 tápközegben a TE jelenségét észleltük, akkor AM3-ban gyakran fedeztük fel a PG-ét. Mivel az AM3 nem egy standardizált tápközeg, ezért a későbbiekben már nem használtuk. Ötven százalék szérum esetén a mikrodilúciós módszer nehezen volt használható, mert a szérum opálossága miatt maga a MIC leolvasás is nehéz volt, ezért a makrodilúciós módszert alkalmaztuk.

3. A dolgozat értékes *in vivo* eredményeket közöl a caspofungin hatékonyságáról neutropéniás egérmodellben több *Candida* faj esetén, valamint bemutatja, hogy a caspofungin dózisének emelése széles tartományban (alacsony–közepes–magas dózisok) nem eredményezett arányos, illetve statisztikailag is kimutatható többlethatékonyságot a veséből kitenyészhető gombaszám csökkenésében. Ez a megfigyelés fontos gyakorlati következtetéshez vezethet, miszerint a caspofungin dózisznövelése bizonyos *Candida* fajok esetén nem jár terápiás előnnyel, ami klinikai szempontból a költséghatékonyság kérdését is felveti.

Nem lehetséges-e, hogy a súlyos neutropéniás egérmodell „plafonhatása” (magas és perzisztáló gombaterhelés, jelentős immunszuppresszió) elfedi a dózis–válasz összefüggést, és emiatt a caspofungin dózisemelésének potenciális előnye ebben a modellben nem mutatható ki?

Válasz: A Tisztelt Bírálónak teljes mértékben igaza van. Ez az egyik tényező abban, hogy a dózis további növelésének nincs értelme. Egyéb tényezők közé tartozik, hogy nem tudjuk (mivel nem vizsgáltuk), hogy az egyéb belső szervekben, beleértve a központi idegrendszert mennyi volt a gombák száma a kísérlet során. Ezekből a szervekből a gombák folyamatosan be(vissza)kerülhettek a véráramba, majd a vér által bármelyik szervbe, beleértve a veséket, is szepszis metasztázis hozva létre. A különböző belső szervekben a vérben lévő gyógyszer mennyiségnek csupán a töredéke található, ami a nagymértékű fehérje kötődés miatt csökkenti a kórokozó eliminációját. A klinikumban ez a szituáció gyakran fordul elő, és a hosszabb ideig tartó antifungális kezeléssel az esetek egy részében terápiás siker érhető el.

4. Az idő–ölés vizsgálatok azt mutatták, hogy a nagy koncentrációjú caspofungin paradox módon csökkent öltő hatása nikkomicin jelenlétében megszűnt, gyakran szinergista módon, és a nikkomicin még a MIC alatti koncentrációkban is fokozta az echinocandinok fungicid aktivitását. Hasonló szinergizmust figyelt meg anidulafungin és micafungin kombinációk esetén is, különösen bizonyos *C. auris* izolátumoknál.

A nikkomicin *in vitro* tolerálható és szelektív, milyen farmakokinetikai illetve farmakológiai akadályai vannak annak, hogy ez klinikailag reális kombináció legyen?

Folynak-e jelenleg klinikai kísérletek a nikkomicin hatásának vizsgálatára, ha igen, milyen gomba fertőzésekben tesztelik?

Válasz: Nix és munkatársai a közelmúltban publikálták a humán, első fázisú kísérletek folytatásának az eredményeit (<https://doi.org/10.1128/aac.00395-25>). Napi 3x750 mg nikkomycin Z per os adagolása esetén 14 nap után a C_{max} értéke 6.89 ± 1.59 mg/L, illetve az AUC_{0-24h} 107 mg·h/mL értékeknek bizonyultak. A dolgozat 14-dik és 15-dik táblázataiban feltüntetett különböző fajok izolátumainak a MIC értékei általában nagyobbak voltak a Nix és munkatársai által közölt csúcskoncentrációnál, így monoterápiában az *in vivo* hatékonyság nem valószínű. Echinocandinokkal kombinációban azonban nem zárható ki a szinergista hatás. Az önkénteseken végzett vizsgálatok alapján ritkán fejfájást, hasmenést és ájulás-szerű tüneteket tapasztaltak, ezért akár további nikkomycin Z dózisemelés is lehetséges.

A klinikai hatékonyságra jelenleg nincs adat, de a preklinikai vizsgálatokban *Coccidioides immitis*-el fertőzött egerek és kutyák kezelésében az eredmények biztatóak.

5. A vizsgálatai szerint 50% szérumban a caspofungin aktivitása csökken és koncentráció-függetlenné válik, miközben paradox effekt nem volt megfigyelhető.

Hogyan értelmezné farmakodinámiás szempontból azt a megfigyelést, hogy 50% szérumban a caspofungin aktivitása csökken és koncentráció-függetlenné válik? Milyen szerepet játszhat ebben a szérumfehérje-kötődés, és hozzájárulhat-e ez az *in vitro* eredmények és a klinikai dózisemelés korlátozott hatékonysága közötti különbséghez?

Válasz: Az echinocandinok nagymértékű kötődése a szérumban lévő fehérjékhez csökkenti a szabad, azaz biológiailag aktív gyógyszer mennyiségét, ami *in vitro* a MIC emelkedésében nyilvánul meg. A szérumban mért MIC érték nagyon sokszor átfedésben van azzal a koncentrációkkal, ahol RPMI-1640-ben a paradox növekedést észleltük. A további gyógyszer koncentráció növekedésénél pl. 2, 8, 16 és 32 mg/L esetén 99%-os fehérjekötődéssel számolva a szabad gyógyszer szintek körülbelül 0,02, 0,08, 0,16 és 0,32 mg/L értékek lesznek, amelyek valószínűleg túl alacsonyak ahhoz, hogy a kompenzatórikus kitin szintéziséhez vezetve, a gombáknak a jól látható növekedését eredményezze. Ez a szabad echinocandin koncentráció hatásos lehet a véráramban lévő gombák eradikálásához, de bizonyos szervek esetén (pl. hasüreg, pleurális tér, izületek) a csökkent echinocandin penetrancia (10-20%-os penetrancia) miatt a belső szervekben található gombák elpusztítása nem megy végbe.

Megjegyzések és kérdések a „*Candida auris* kládok virulenciája és amfotericin B iránti érzékenysége neutropéniás egérmodellben” fejezetet illetően

1. A *Candida auris* napjainkban leírt 6 kládja között jól dokumentált fenotípusos különbségek figyelhetők meg például a biofilm-képzésben, a stressz toleranciában, az antifungális válaszban és a gazdával való kölcsönhatásban.

A legújabb kutatások alapján milyen mechanizmusok magyarázhatják ezeket az eltéréseket? Milyen sejtfal-szerkezethez, stressz válaszhoz vagy szabályozó jelátviteli rendszerekhez köthető folyamatok merülnek fel lehetséges magyarázatként, és mennyiben tekinthetők ezek bizonyított mechanizmusnak, illetve még hipotézisnek a klád-specifikus virulencia különbségek értelmezésében?

Válasz: A *C. auris* hetekig képes fennmaradni a kórházi környezetben, a tengervíznél is nagyobb sókoncentrációt is tűri, illetve 42 °C-on is képes növekedni. A négy fő (I-IV) klád esetén az Als4112 adhezinnak bizonyított szerepe van a keratinocitákhoz és a lamininhez való erős kötődésben (<https://doi.org/10.1038/s41467-025-60876-1>). A kolonizációban és az intradermális perzisztenciában további szabályozó szerepe lehet a *Hog1* mitogén-aktivált protein kináz útvonalnak is. A legerősebb és legvastagabb biofilm képződést az I. és a III. kládok esetén figyelték meg, de a biofilm képződés izolátum-függő is (doi: 10.1186/s12929-026-01230-5.). Fayed vizsgálatai alapján a biofilm kialakulásának a kezdeti szakaszában és a maturációban szerepet játszó ALS5 és KRE6, illetve számos az antifungális rezisztencia kialakulásában szerepet játszó gének (*ERG2*, *ERG6*, *ERG11*, *FKS1*, *CHS1*, *CHS2*, *CDR1* és *MDR1*) overexpressziója is kimutatható volt (doi: 10.1186/s12866-025-04055-8.). Az ALS5 és KRE6 gének fokozott expressziója stressz és tápanyaghiányos közegben is megfigyelhető, de klinikai jelentősége jelenleg nem ismert.

A 42 °C-on is aktív szekretált aszpartil proteinázok (főleg a SAP3) az I., a III. és a IV. kládok esetén fokozottabb mennyiségben termelődnek, jól magyarázva ezen kládok fokozott képességét a szisztémás fertőzések kialakítására. Zheng és mtsai. a négy fő kládnál (I-IV) nagy lipid-cseppeket mutattak ki *C. auris* sejtekben (giant lipid droplet=

gLD), amely sejtek megvastagodott sejtfa­la több kitint tartalmaz, a mitokondriális aktivitás fokozott és fokozott az acil-koA és triglicerid szintézis is (doi.org/10.1038/s42003-025-08204-7). A gLD-t tartalmazó gombasejtek fokozottabb mértékben kolonizálják a bőrt és tapadnak az orvosi műszerek felszínéhez, ellenállnak a környezeti stresszoroknak, beleértve az antifungális szereket is. A nemrégiben felfedezett reverzibilis fehér-barna telepmorfológia váltás környezeti stresszhatások, a hőmérséklet és a szénforrás ellátottság változásai hatására következik be, az első öt kládnál figyelhető meg. A barna teleptípus a feltételezések szerint a bőr csökkent kolonizációs képességével lehet kapcsolatban (DOI: [10.1016/j.celrep.2025.115976](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.115976)).

2. A Jelölt állatkísérletei során vizsgálta az amfotericin B hatását.

Mennyiben tekinthető összevethetőnek az amfotericin B farmakokinetikája egérmodellben az emberi viszonyokkal? Milyen különbségek ismertek a clearance, a felezési idő, a szöveti akkumuláció és a plazmafehérje-kötődés tekintetében, és ezek hogyan befolyásolhatják az egérkísérletek eredményeinek klinikai translációját a hatásosság és a toxicitás értékelése során?

Válasz: Az amphotericin B deoxikolát főbb, a kérdésben szereplő farmakokinetika paramétereit feltüntetve világos, hogy emberben (doi: 10.1128/AAC.13.2.271.) és egérben (doi: 10.1080/mmy.41.1.15.19.) a gyógyszer főbb paraméterei teljes mértékben összevethetők (doi.org/10.1007/s15010-017-1042-z). Kapott eredményeink megerősítik a CDC ajánlását, hogy nem az amphotericin B az ajánlott antifungális szer invazív *C. auris* okozta fertőzések kezelésben (<https://www.cdc.gov/candida-auris/hcp/laboratories/antifungal-susceptibility-testing.html>). Elméletileg fokozhatjuk az amphotericin B dózisát, de ez a megközelítés nem működött a vizsgálatainkban, mivel már a napi 1,5 mg/kg amphotericin B-vel oltott egereken is a toxicitás súlyos jeleit észleltük (szem kidülledése, rángatózás stb.).

	CL (mL/h/kg)	T _{1/2} (h)	C _{max} (mg/L)	Vd (L/kg)	plazmafehérje- kötődés (%)
Egér	82-116	11,2	0,4-1,2	2,34	>90-95
Ember	10-30	15-27	1,7–2,8	0,5–2,0	95–99

3. A disszeminált kandidiázis neutropéniás modellje jól ismert és elfogadott megközelítés invazív kandidiázis vizsgálatokban, ugyanakkor a *Candida auris* klinikai epidemiológiája alapján a fertőzések jelentős része nem klasszikus hematológiai neutropéniához kötődik, hanem intenzív osztályos ellátáshoz, invazív eszközökhöz, kapaszkodókhöz, bőrkolonizációhoz. Ez alapján feltételezhető, hogy a neutropéniás állapot a gazdaszervezet-kórokozó kölcsönhatást és az antifungális kezelés hatását is jelentősen torzíthatja. Általánosíthatók-e a Jelölt eredményei (klád-specifikus virulencia-rangsor, szervtropizmus, amfotericin B hatás) a betegpopulációk szélesebb körére, illetve mennyiben tekinthető a neutropénia olyan domináns tényezőnek, amely a kládok közötti különbségeket akár felerősítheti vagy elfedheti? A Jelölt szakmailag indokoltnak tart-e immunkompetens, illetve alternatív immunszuppressziós modellek, pl. kortikoszteroid, katéter modell, alkalmazását az eredmények translációs értékének alátámasztására?

Válasz: A gazdaszervezet-kórokozó kölcsönhatást két az I. kládba tartozó *C. auris*, és egy-egy darab *C. albicans*, *C. glabrata* illetve *C. haemulonii* törzsekkel Fakhim és munkatársai vizsgálták ICR, nőstény, ép immunrendszerű egerekben, 10^5 , 10^6 és 10^7 CFU/mL per egér fertőző dózissal. A 30 napos letalitási kísérletekben, illetve a szöveti perzisztencia vizsgálatokban a vizsgált 4 faj, 5 izolátumai esetén statisztikailag szignifikáns különbséget a különböző dózissal oltott egerek között nem találtak. Az eredmény nem meglepő annak az ismeretében, hogy az ICR egerek nem beltenyésztett egerek és az immunrendszerük kiválóan működik. Az immunkompetens ICR egerek (és más egerek is) kiválóan alkalmasak az immunválasz tanulmányozására, de vajmi keveset árulnak el egy gyógyszernek a kórokozókra gyakorolt tiszta, egyedüli hatásáról. Nagyon nehezen, de modellezhető a katétereken kialakult biofilm és a biofilmről leváló gombasejtek disszeminálódása a különböző belső szervekbe (DOI: 10.3791/65307), ami a klinikumban gyakran előfordul. A nem-neutropéniás egérmodellel kapott eredményeket a klinikumba transzlálva megállapítható, hogy *a fertőzés kimenetele szempontjából az immunrendszer állapota az elsődleges fontosságú.*

Ezen kérdéscsoport első kérdésére adott válaszaim alapján korábban nagyon sok virulencia faktort azonosítottak és tanulmányoztak *in vitro* és *in vivo* is, több különbséget felfedezve az egyes kládok, és kládon belül az egyes izolátumok között. Véleményem szerint a nagyszámú tudományos eredmények részletei nagyobb valószínűséggel állhatnak össze komplex egésszé egy jól megválasztott emlősmodellben. A neutropéniás modell előnye lehet, hogy a keringés által a belső szervekből a kórokozók folyamatosan disszeminálódhatnak egyéb szervekbe, mintegy modellezve a biofilmről folyamatosan leszakadó kórokozót. Neutropéniás egérmodellünk valóban elfedhet bizonyos klád-specifikus virulencia különbségeket, de arra is felhívja a figyelmet, hogy egy kis virulenciájúnak tartott kórokozó az antifungális kezelés ellenére is elpusztíthatja a kísérleti állatot, és mint a klinikumban gyakran előfordul, a beteg is elhalálozhat. Az általunk alkalmazott modell abban is hasznosnak bizonyult, hogy választ tudtunk adni arra a nehezen hihető feltételezésre, hogy a *C. auris* virulenciája hasonló, mint a *C. albicans* virulenciája.

4. A Jelölt azt tapasztalta, hogy az amfotericin B kezelés mellett jelentkeztek ataxiás tünetek és magas agyi perzisztencia, miközben a szív és vese „sterilizálódott”.

Hogyan bizonyítaná, hogy az amfotericin B hatástalan a központi idegrendszerben, és nem csupán arról van szó, hogy az amfotericin B meghosszabbította az egerek túlélését, így a központi idegrendszeri manifestációra idő nyílt? Milyen hatást várna az amfotericin B-től, ha intratekálisan adagolná?

Hogyan magyarázná a jelölt, hogy az utóbbi időben megjelent közleményekben a humán központi idegrendszer *Candida auris* eredetű fertőzéseiben az amfotericin B-t hatásosnak találták?

Válasz: Egyet értek a Bírálóval, én is azt gondolom, hogy az amfotericin B meghosszabbította az egerek túlélését, így a központi idegrendszeri manifestációra idő nyílt. Ez tulajdonképpen várható, hiszen a gyulladt meninxeken keresztül 1 mg/L-nél biztosan alacsonyabb koncentrációjú amphotericin B kerül be a liquorba, ami nem elég a gombasejtek elpusztításához (doi.org/10.1007/s15010-017-1042-z). Az amphotericin B koncentrációt nem mértük kísérleteink során. Saját vizsgálatainkban az öt nap amfotericin B kezelés, még ha statisztikailag szignifikáns módon is csökkentette a gombasejtek számát az agyban, még így is legalább 100 ezres mennyiségben maradt az agyban gomba.

A klinikumban az amfotericin B deoxikolát és a liposzómás amphotericin B a legelfogadottabb terápiák (doi.org/10.1007/s15010-017-1042-z). Mivel egyidejűleg más testtájokról is gyakran kitenyészik a *C. auris* (jellemzően a vérből), ezért egyidejű echinocandin kezelés is szükséges. Az irodalmi adatok alapján az 5-fluorocitozin (alacsony MIC érték esetén) a központi idegrendszer fertőzéseinél szinte minden esetben a kombinációs terápia részeként szerepelt a kezeléseknél. Magas amfotericin B MIC értékeknél vorikonazol, micafungin vagy caspofungin szerepeltek a kombinációs kezeléseknél. A közelmúltban összegzett központi idegrendszeri *C. auris* fertőzéseknél az előbb említett terápiák mellett 12 betegből 8 beteg kezelése sikeres volt, de szinte minden esetben a kombinációs terápiák vezettek sikerre (doi: 10.1016/j.wneu.2025.124775.). Számos esetben a liquorban mért amfotericin B, vorikonazol vagy posakonazol koncentrációk mérhetetlenül alacsonyak voltak. Az intratekális caspofungin (10 mg/kg) vagy a liposzómás amfotericin B (0,125-0,25 mg, másnaponta, 2 gramm kumulatív dózissal) terápiák számos esetben sikeresnek bizonyultak (doi: 10.1007/s40263-024-01065-4.). Bár az intratekális vagy intraventrikuláris adagolási módok rendkívüli körülmények között igényelnek, az elért eredmények támogatják ezeket az adagolási módokat (doi: 10.1016/j.wneu.2025.124775.).

5. A nagy PAS-pozitív multiplex gomba-aggregátumokat a Jelölt újszerű észlelésként írja le.

Milyen bizonyíték szól amellett, hogy ez tényleges virulenciafaktor, és nem csak a neutropénia és magas inokulum következménye?

Válasz: Korábbi vizsgálatok alapján az aggregáció döntően a III. kládra jellemző, bár az I. és a II. kládok esetén is megfigyelték. A legújabb vizsgálatok alapján az aggregációnak két, indukálható típusa van (doi: 10.1371/journal.ppat.1012076.). Az első típus tápanyagban gazdag közegben figyelhető meg, és az ALS gének (ALS4112 gén) overexpressziója figyelhető meg (főleg a III. klád esetén). A második típus echinocandin jelenlétéhez kötött, és a sejtek nem képesek egymástól teljesen elválni. Mindkét típus esetén a makrofágok nem képesek fagocitálni az aggregátumokat (doi: 10.1371/journal.ppat.1012076.). Ez már önmagában is virulencia faktornak számít, hiszen az aggregátumok a további fertőzés rezervoárjai lehetnek, így szoros összefüggésbe hozhatók a perzisztens fertőzésekkel is.

6. Az egérmodellben a szív kiemelt célszervként jelenik meg, miokardiális túlsúllyal és kontrakciós sáv nekrozissal.

Hogyan különítené el a Jelölt, hogy ezek a megfigyelések valódi, kórokozó-specifikus szervtropizmust tükröznek, vagy inkább terminális agonális jelenségek következményei?

Válasz: A neutropéniás egerek oltása *C. auris*-sal vagy bármely más gombával szepszist és/vagy szeptikus sokkot okoz és a kialakuló többszervi elégtelenség miatt a mortalitás magas. Vizsgálatainkban újdonság volt a szív kifejezett érintettsége, amit az irodalom szeptikus kardiomiopátiának nevez és a szeptikus betegek 10-70%-ban fordul elő (doi: 10.7150/ijbs.111288). Természetesen nemcsak gombák, hanem baktériumok is a kiváltó okok között lehetnek. Normál immunrendszer esetében a gyulladásos mediátorok és a vazoaktív anyagok miatt (NO, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 és a TNF- α) a szívizomrostok érzékenysége csökken a Ca²⁺ iránt, interstitialis ödéma és kontrakciós-sáv nekrosis figyelhető meg, miközben a szívizomrostok katekolaminok iránti érzékenység is csökken (doi: 10.1097/SHK.0b013e318289376b.). A szív szisztolés és diasztolés működése a

pitvari aritmiák és a kamrák csökkent kontrakciós képessége miatt súlyosan károsodik. A szívizomsejtek non-iszkémiás eredetű károsodása nagymértékű Ca^{2+} beáramlást majd irreverzibilis hiperkontrakciót eredményez (kontrakciós-sáv nekrozis, ami már 10 perccel az akut károsodás után megfigyelhető) (doi.org/10.1007/s00414-025-03479-1).

Fertőzött, nem moribund egér szívének az eltávolítása után a kamrák válaszkészségét noradrenalinra mérni lehet. Ha a válaszkészség csökkent, illetve szövettani vizsgálattal a nagyszámú gomba mellett a kontrakciós sáv nekrozis is kimutatható, akkor egyértelműnek tűnik a kórokozó (gomba vagy baktérium) szervspecifikus hatása. A szeptikus kardiomiopátia patogenezise alapján a szívizomsejtek károsodása nem jelent feltétlenül agóniát, bár a prognózis szegényes. Eredményeink segíthetnek a nem-*C. albicans* fajok okozta szeptikus miokarditisz patogenezisének a tanulmányozásában.

7. Az amfotericin B rezisztencia kutatása napjainkban kiemelkedően fontos.

A legújabb kutatások alapján hogyan járul hozzá a szén-dioxid-érzékelő jelátviteli útvonal (carbonic sensing pathway) a *Candida auris* amfotericin B rezisztenciájához?

Válasz: Phan-Canh és munkatársai (doi.org/10.1038/s41564-025-02189-z) eredményei alapján tápanyaghiányos környezetben a CO_2 fokozza a négy fő (I-IV) és az V-ös kládba tartozó izolátumok növekedését. Emelkedett CO_2 hatására a Ras1-cAMP szignalizációs útvonal az *efg1* által szabályozza a citrát-kör működést. Az *efg1* a citrát körön keresztül feedback mechanizmussal szabályozza a szénsav anhidráz enzimét, amelyet az Rca1 transzkripciós faktor szabályoz. A Szerzők vizsgálatai alapján a reaktív oxigén gyökökön keresztül a CSP-nek (=carbonic sensing pathway) szerepe van az amphotericin B rezisztencia kialakításában is. A *C. auris* a bőrön és a szőrtüszők környékén (ahol a CO_2 koncentráció relatíve nagy) megtalálható, jól magyarázva bizonyos esetekben a bőr folyamatos kolonizációját. A bőrön esetlegesen jelenlévő ureáz pozitív baktériumok (*Proteus* és *Klebsiella* fajok) által termelt CO_2 ezek alapján hozzájárulhat a kolonizációhoz és az amphotericin B rezisztenciához is. Elméleti alapon *C. auris* esetén az amphotericin B MIC meghatározásnál az anaerob viszonyokat is figyelembe kellene venni. Klinikai jelentősége a CSP-vel összefüggő amphotericin B rezisztenciának jelenleg nem ismert, hiszen a belső szervekben a CO_2 koncentráció nem magas.

8. Végül a bíráló utolsó kérdése (minden bizonnyal a témában való járatlanságát tükrözi).

Az egérkísérletekben miért amfotericin B-t (az Anyagok és Módszerek fejezetben az szerepel, hogy amfotericin B-t a Sigma-tól szerezte be, és a cég honlapján találtak szerint ez egyszerű amfotericin B) használt és miért nem lipid komplexben levő vagy liposzomás amfotericin B-t?

Válasz: A Tisztelt Bíráló kérdése teljesen jogos. A kísérleteink első részében a sokkal alacsonyabb beszerzési ár volt a döntő fontosságú. A későbbiekben pedig konzekvensek akartunk lenni, azaz az eredmények összehasonlíthatósága miatt maradtunk a hagyományos, amfotericin B deoxikolát mellett.

Debrecen, 2026. június 07.

Dr. Majoros László