

Hivatalos bírálói vélemény

Dr. Majoros László

Antifungális szerek *in vitro* és *in vivo* hatékonyságának a vizsgálata *Candida* fajok ellen

című MTA doktora disszertációjáról

Az invazív gombafertőzések, különösen a *Candida* fajok által okozott infekciók napjainkban a betegellátás egyik jelentős kihívását jelentik. Az immunsuppresszív kezelések elterjedése, az intenzív terápiás beavatkozások gyakorisága és a széles spektrumú antibiotikumok alkalmazása következtében az opportunista kandidiázis incidenciája és klinikai súlya számottevő. Az antifungális rezisztencia fokozódása, valamint a nem-albicans *Candida* fajok előretörése tovább növeli a terápiás döntéshozatal összetettségét. Az említettek alapján kiemelt jelentőségű az antifungális szerek hatékonyságának megbízható, kísérletes modelleken alapuló vizsgálata, amely egyaránt magában foglalja az *in vitro* érzékenységi vizsgálatokat és az *in vivo* validációt. Az „Antifungális szerek *in vitro* és *in vivo* hatékonyságának a vizsgálata *Candida* fajok ellen” című értekezés olyan időszerű és tudományosan megalapozott témát dolgoz fel, amely közvetlen kapcsolatban áll a klinikai mikrobiológia és az infektológia aktuális kérdéseivel. A dolgozat témaválasztása mind tudományos, mind gyakorlati szempontból indokolt és igen nagy jelentőséggel bír.

Az értekezés formai szempontból megfelel a nagydoktori dolgozatokkal szemben támasztott követelményeknek, felépítése áttekinthető, logikusan szerkesztett és arányos. A szigorúan vett tartalmi rész 129 oldal terjedelmű, amely megfelelő részletességgel, ugyanakkor jól követhető struktúrában tárgyalja a vizsgált problémakört. A 30 oldalas irodalmi áttekintés átfogó képet ad a *Candida* fajok biológiai sajátosságairól, a fertőzések patogenezisééről és epidemiológiájáról, valamint a jelenleg alkalmazott antifungális szerek hatásmechanizmusáról és klinikai jelentőségéről. A célkitűzések világosan megfogalmazottak és reálisan megvalósíthatók, az Anyagok és Módszerek fejezet (10 oldal) tematikusan elkülönítve tárgyalja az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat, ami a módszertani áttekinthetőséget jelentősen segíti. Az Eredmények fejezet kilenc nagyobb alfejezetre tagolódik, strukturáltan és következetesen bemutatva a vizsgálatok eredményeit, míg a Megbeszélés négy fejezetben, mértéktartó és tudományosan megalapozott módon értelmezi azokat. Az új tudományos megállapításokat a szerző 10 pontban összegzi. Az eredmények szemléltetését 39 ábra és 23 táblázat segíti. A formai kivitelezés igényes, a fejezetek arányosak, a szerkesztés tudományos munkához méltó precizitást tükröz. A dolgozatban található nyelvi illetve gépelési hibák egyike sem értelemzavaró, és a dolgozat tudományos értékét sem csökkentik. A tételes felsorolásuktól eltekintenek, talán példaként néhány típushiba: 1. Az aktivitás szó helytelen írása többször előfordul, többféle toldalékkal (aktivitás 115. és 120. oldal, aktivitásának 2. és 38. oldal, aktivitásáról 118. oldal). 2. Néha hiányoznak betűk (pl. osztályokon 11. oldal, különbségek 16. oldal, populációban 28. oldal, teszközegekben 42. oldal). 3. Néha következetlen írásmód: leves-hígításos 38. oldal, máshol leveshígításos. 4. Néhol elütések: definíció 40. oldal, összhang 110. oldal, sorozathígítás 44. oldal, 5. Néhol a rövidítések nem megfelelő ragozása pl. CAS-al 116. oldal, POSA-lal.

A disszertációval kapcsolatos megjegyzéseimet és a kérdéseimet a Megbeszélés című fejezet négy alfejezetének témáját követve szeretném ismertetni.

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 görbéik 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 posakonazol a rendszerből, hogy ne zavarja a gombanövekedést?

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?

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?

4. A dolgozatban ez szerepel: „a POSA koncentrációja a szívben, a tüdőben, 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 koncentrálódik annyira a központ idegrendszerben, az agyban?

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 áttörésses kandidémiák lehetőségét.

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

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?

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?*

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?*

5. A Jelölt neutropéniás egérmodellt 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 immunszuppresszióval járó modellben?

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”?

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?

3. A dolgozat értékes *in vivo* eredményeket közöl a caspofungin hatékonyságáról neutropéniás egérmodellben több *Candida* faj esetén, valamint bemutatja, hogy a caspofungin dózisának emelése széles tartományban (alacsony–közepes–magas dózisok) nem eredményezett arányos, illetve statisztikailag is kimutatható többlethatékonyságot a veséből kitenyészthető 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?

4. Az idő–ölés vizsgálatok azt mutatták, hogy a nagy koncentrációjú caspofungin paradox módon csökkent ölü 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?

5. A vizsgálatait 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?

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

1. A *Candida auris* napjainkban leírt 6 kládjá 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?

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

Mennyiben tekinthető összevethetőnek az amfotericin B farmakokinetikája egérmódelben 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 transzlációját a hatásosság és a toxicitás értékelése során?

3. A disszeminált kandidiázis neutropéniás módelje 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, kapaszkodókhoz, 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 virulenciarangsor, 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 módel, alkalmazását az eredmények transzlációs értékének alátámasztására?

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 manifesztációra 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?

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?*

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?

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?

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?

Meggyőződésem, hogy a fent megfogalmazott kérdésekre – amelyek tudományos kíváncsiságból, és nem szakmai kétségből fakadnak – a Jelölt részéről minden tekintetben kielégítő válasz fog érkezni. Véleményem szerint az elvégzett kutatómunka kiemelkedően értékes, a dolgozat pedig gondosan kivitelezett, jól szerkesztett, és az olvasó számára élvezetes stílusban megírt munka. A disszertáció 9. fejezetében összefoglalt új tudományos eredmények mindegyikét elfogadom új tudományos eredményként, és azokat maximálisan elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez. Összességében a disszertációt kiválóan megírt, magas színvonalú munkának tartom, amely alkalmas a nyilvános vitára bocsátásra. **A Jelölt témában kifejtett tudományos tevékenysége és publikációs teljesítménye alapján javaslom számára „az MTA doktora” tudományos fokozat odaítélését.**

Szeged, 2026. 03. 13.

Burián Katalin

egyetemi tanár, az MTA doktora