

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

**Kémia Doktori Iskola**

**Mannich-ke-tonok antifungális hatásának vizsgálata  
és antimikotikum-érzékenység meghatározása  
chip-alapú módszerekkel**

**PhD értekezés tézisei**

**Bouquet Orsolya**

**Témavezetők:  
Dr. Lóránd Tamás  
Dr. Kocsis Béla**



**PÉCS, 2014**

## 1. Bevezetés

Az életet veszélyeztető, invazív gombás fertőzések számának növekedése világszerte probléma. A leggyakoribb kórokozó továbbra is a *Candida albicans*, de egyre több a *non-albicans Candida* fertőzés, valamint növekszik az *Aspergillus sp.* okozta megbetegedések száma is.

A rendelkezésre álló antifungális szerek között évtizedek óta használt, klasszikus szerek mellett a legutóbbi évtizedben bevezetésre került hatóanyagcsalád is található. Mégis a fertőzések növekvő száma, a rezisztencia terjedése, a kedvezőbb farmakokinetikai és mellékhatás-profil kialakítása miatt a gomba-ellenes szerek kutatása továbbra is aktuális terület. Ugyanezen okok miatt a hagyományos kimutatási módszerekhez képest gyorsabb, kisebb idő- és munkaigényű diagnosztikai és antimikotikum-érzékenységi vizsgálatok fejlesztése is időszerű kérdés.

Az áramlási citometriát már régebb óta használják mikrobiológiai vizsgálatokra, baktériumok, gombák, antimikrobiális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálatára. Napjainkban egyre jellemzőbb a lab-on-a-chip rendszerek terjedése, ezeknél a rendszereknél chip-alapon, mikrométerben, kis mintaigénnyel, gyorsan valósíthatók meg különböző analitikai feladatok. Az áramlási citometria elvére épülő, chip-alapú mikrobiológiai vizsgálatokra azonban egyelőre kevés adat áll rendelkezésre.

Munkám során *Candida sp.* antimikotikum-érzékenységének vizsgálatát valósítottam meg hagyományos és mikrofluidikai áramlási rendszerben. A klasszikus antimikotikumok mellett potenciális citotoxikus, antibakteriális és antifungális hatással rendelkező Mannich-vegyületek *Candida*-ellenes hatását vizsgáltam chip-alapú áramlási citometriás és chip-alapú kapilláris gélelektroforézis módszerek felhasználásával.

## 2. Célkitűzések

Munkám során *Candida* törzsek analitikai, elválasztás-technikai módszerekkel való vizsgálata volt a célom. Ezen igen tág témán belül az alábbi vizsgálati irányokat terveztem megvalósítani:

- *Candida* sejtek vizsgálata áramlási citometriás módszerrel, elsősorban az antimikotikum-érzékenység meghatározása (irodalmi adatok alapján).
- Különböző antimikotikumok vizsgálata, *Candida albicans* és *non-albicans* törzseken.
- Ezen eredményekre alapozva hasonló elven működő, de chip-alapú antimikotikum-érzékenység meghatározás tervezése, mivel ilyen célú felhasználását nem találtam ezeknek a rendszereknek.
- A hagyományosan használt antimikotikumok mellett más típusú, gombaellenes hatással is rendelkező vegyületek, a Mannich-ke-tonok vizsgálata.
- *Candida albicans* fehérjeprofiljában a Mannich-ke-tonok hatására bekövetkező minőségi és mennyiségi változások vizsgálata chip-alapú elektroforézis módszer felhasználásával.
- Különböző típusú Mannich-ke-tonok vizsgálata, a fehérje összetételre gyakorolt hatás és a vegyületek szerkezete közti összefüggések elemzése.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Anyagok

Kísérleteim során nemzetközi standard *Candida* törzseket vizsgáltam: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 90874, *Candida glabrata* 90030, *Candida krusei* 30068.

Az áramlási citometria elvén alapuló vizsgálatoknál különböző **fluoreszcens festékeket** használtam. Az elölt sejtek jelölésére alkalmas nem-permeábilis nukleinsav-festékek a propidium-jodid (gerjesztési/emissziós max. 535/617 nm) és a Sytox Green (504/523 nm). A Syto 60 (652/678) az élő és elölt sejteket egyaránt jelöli.

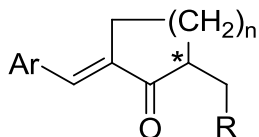
Az érzékenység-vizsgálatok során két különböző hatásmechanizmusú **antifungális szer** vizsgáltam. Az **amphotericin B** egy heptaén makrolid antimikotikum. Kísérleteimben Fungizone injekcióhoz való por formájában használtam (ez, az oldódást segítő, nátrium-dezoxikolatot is tartalmaz). Az amphotericin B fungicid hatású szer, a gomba-sejtmembrán ergoszterin komponenséhez kötődve pórusokat képez és a sejt pusztulását okozza. A **flukonazol** egy fungisztatikus hatású triazol vegyület, vizsgálataimban Mycosyst infúzióhoz való oldat formában használtam. Az ergoszterin-bioszintézis több lépését gátolja, így a gombasejtek szaporodását akadályozza.

#### 3.2. Mannich-kezonok

A gyógyszervegyületek szintézisében gyakran használnak Mannich-bázisokat például a vízóldékonyság növelésében vagy intermedierként reaktív  $\alpha$ -metilén-kezonok előállítására. Számos biológiai hatással rendelkeznek, kiemelném a citotoxikus, antibakteriális és antifungális hatású Mannich-vegyületeket.

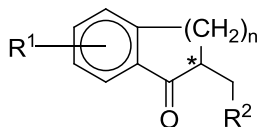
A kísérleteim során használt Mannich-kezonokat témavezetőm, Dr. Lóránd Tamás szintetizálta a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében. A klasszikus Mannich-reakció során etanolos közegben sósav katalizátort használtak, a szintézis első lépésében 2-arilidencikloalkanon köztes termékek keletkeztek bázis-katalizált aldol-kondenzációban. A Mannich-kezonokat a megfelelő 2-arilidencikloalkanon, szekunder amin és paraformaldehid reakciójából sósavas sóként izolálták, a szekunder-amint a kompetitív aldolkondenzáció visszaszorítására feleslegben alkalmazták.

A különböző vizsgálataimban tesztelt **telítetlen és kondenzált vázas Mannich-kezonokat az 1. és 2. táblázat** tartalmazza.



Vegyület	n	Ar	R	<i>C. albicans</i> MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	1	4'-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-morfolil	3,125
2	1	2'-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1-piperidil	6,25
3	3	fenil	1-piperidil	50

### 1. táblázat – Telítetlen Mannich-ke-tonok



Vegyület	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	<i>C. albicans</i> MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
4	1	H	1-piperidil	3,125
5	1	H	1-pirrolidil	0,8
6	1	5-OCH <sub>3</sub>	1-piperidil	3,125
7	2	H	1-piperidil	12,5
8	2	H	1-pirrolidil	12,5
9	2	H	4-morfolil	3,125
10	2	H	2-(1,2,3,4-tetrahydro)-izokinolil	6,25
11	2	5-OCH <sub>3</sub>	1-piperidil	12,5
12	2	6-OCH <sub>3</sub>	1-pirrolidil	100
13	2	6-OCH <sub>3</sub>	4-morfolil	25
14	2	6-OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	4-morfolil	25
15	2	7-OCH <sub>3</sub>	1-piperidil	6,25
16	2	7-OCH <sub>3</sub>	4-morfolil	12,5
17	3	H	1-piperidil	6,25
18	3	H	4-morfolil	12,5

### 2. táblázat- Kondenzált Mannich-ke-tonok

### 3.3. Módszerek

**Áramlási citometria:** eljárás vagy mérési módszer, amellyel folyadékáramban, önálló részecskék tulajdonságait vizsgálhatjuk.

A szuszpenziós formában levő sejtekről hidrodinamikai fókuszálást, majd lézeres megvilágítást követően detektálható optikai jelek:

- előre irányuló szórás = forward scatter (FSC): a sejt méretét jellemzi
- oldalirányú szórás = side scatter (SSC): a sejt belső strukturáltságáról informál
- fluoreszcencia: a sejtek speciális jellemzőiről ad tájékoztatást, a mért emissziós intenzitás arányos a sejtekhez kötött fluorofór mennyiségével.

Kísérleteimhez a Becton Dickinson FACS Calibur áramlási citométerét használtam (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A készülék egy 15 mW (488 nm) argonion lézerrel és egy vörös dióda lézerrel (~635 nm) is fel van szerelve. Az adatgyűjtés log/log módban történt, a fluoreszcencia intenzitás mellett az előre, ill. oldalra irányuló fényszórást detektáltam (FSC ill. SSC).

**Mikrofluidikai áramlási citometria (sejt-chip):** chip-alapú, az áramlási citometria elvein alapuló módszer. Méréseimhez az Agilent 2100 Bioanalyzer áramlási citometriás blokkját használtam, itt az elválasztás 25x75 µm-es kapillárisokban, nyomásvezérelt rendszerben zajlik. A készülékbe egy kék LED (470/525 nm) és egy vörös lézer (630/680 nm) van beépítve, így fluoreszcens detektálásra képes két tartományban. A mérésekhez a sejteket pufferben szuszpendáljuk, a mérés előtt a chip kapillárisait egy vizes oldattal, míg az egyik csatornát egy fluoreszcens festékkel töltjük fel, a mérés során ez szolgál referenciaként az optikai rendszer számára. A rendszer  $2 \times 10^6$  sejt/ml-es koncentrációig ideális.

**Chip-alapú elektroforézis:** a kapilláris gélelektroforézis elvein alapuló módszer. Itt is az Agilent lab-on-a-chip rendszerét használtam, de az elektroforézis blokkot, a Protein 80 és 230 elválasztási protokollokkal. A kapillárisokat egy nem keresztkötött poliakrilamid-származékkal töltjük fel, az elválasztás méret alapján történik. Fluoreszcens detektálást alkalmazunk, a festék a fehérjékhez SDS-en keresztül a chipen kötődik.

## 4. Eredmények és következtetések

### 4.1. Áramlási citometriás és sejt-chip eredmények: élő és elölt *Candida* sejtek detektálása, *Candida* törzsek megkülönböztetése

Az áramlási citometriát régóta használják *Candida* törzsek vizsgálatára. A sejt-chip rendszerrel azonban kevés gomba-vizsgálatot végeztek eddig. Kísérleteim során áramlási citometriás eredményekből kiindulva terveztem meg a chipes vizsgálatokat, ezért az eredményeket is így mutatom be.

Az **élő és elölt gombasejtek** megkülönböztetésére propidium-jodid (PI), Sytox Green és Syto 60 nukleinsav-festékeket használtam. Az **áramlási citometriás** vizsgálatoknál a PI és Sytox Green festékekkel jelölve az élő és az elölt *Candida albicans* sejtek a megfelelő tartományban detektált fluoreszcencia alapján egyértelműen elkülöníthetőek voltak.

A **sejt-chip** rendszerben csak fluoreszcens jeleket gyűjtünk, így csak előzetesen festett sejtek vizsgálhatók. A Syto 60 festék az élő és elölt *C. albicans* sejteket is jelölte, összsejtszám meghatározásra volt alkalmas. Az élő és elölt sejtek elkülönítését Sytox Green festékekkel valósítottam meg sikeresen (a PI nem kompatibilis a rendszerrel).

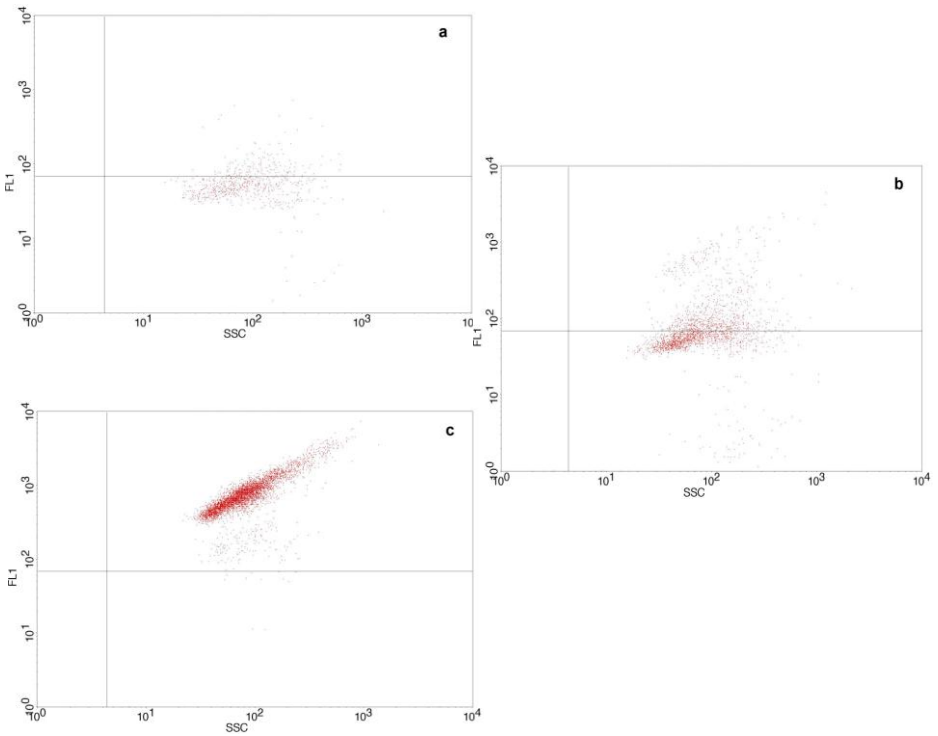
A vizsgálatokba **különböző *Candida* törzseket** is bevontam. Mindegyik törzs esetén egyértelműen elkülöníthetőek voltak az élő és elölt sejtek mindkét módszer esetén. A különböző törzsek egymástól nem voltak elkülöníthetőek.

### 4.2. Antimikotikum-érzékenység meghatározása

Az antimikotikum-érzékenység meghatározását az élő és elölt sejtek elkülönítésére alapozva végeztem. Az antimikotikum-érzékenység jellemzésére a **minimális gátló koncentrációt (MIC)** használtam, ez az antifungális szer azon legkisebb koncentrációja, mely képes gátolni a gomba növekedését. Az áramlási citometriás és sejt-chip vizsgálatokat a standard makrodilúciós módszerhez hasonlítottam.

Az antimikotikumokból felező hígítási sort készítettem, az előkészített *Candida* törzsoldatokból 10-10 µl-t adtam a sor minden csövéhez. 24 órás inkubációt követően a minták felét festettem, a másik felét a festés előtt hőkezelésnek vettem alá, majd mindegyik mintát megmértem.

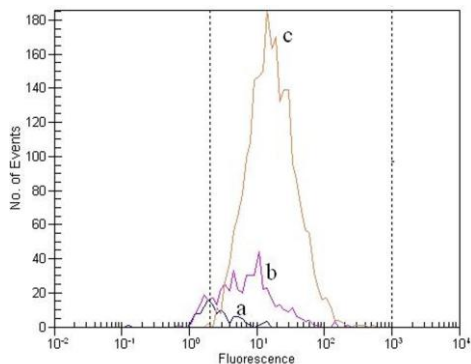
Áramlási citometriás eredményekre példaként az **I. ábrán** *C. albicans* különböző amphotericin B koncentrációval kezelt mintáinak eredményeit mutatom be.



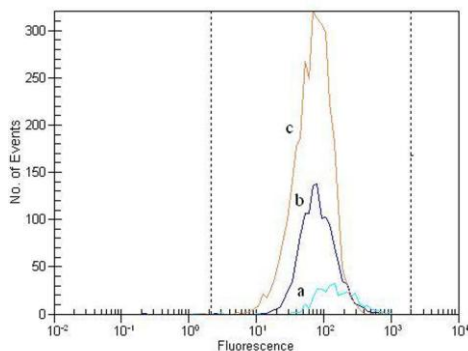
**I. ábra** - *C. albicans* amphotericin B hígítási sor áramlási citometriás képe, Sytox Green festéssel, hőkezelt minták, a fluoreszcenciát az SSC függvényében megjelenítve. Az amphotericin B koncentráció az **a** ábrán 0.625 µg/ml, **b** ábrán 0.312 µg/ml, míg **c** ábránál 0.156 µg/ml.



Az áramlási citometriás eredményekre alapozva a **mikrofluidikai sejt-chip** rendszere is adaptáltam a módszert. Az eredményekre példaképp a **2. és 3. ábrán** mutatom be *C. albicans* amphotericin B-, ill. flukonazol-érzékenységi vizsgálatát.



**2. ábra - *C. albicans* amphotericin B hígítási sor sejtchip eredményei,** hőkezelt minták, Sytox Green jelöléssel. Az amphotericin B koncentrációja: **a** 0.625 µg/ml, **b** 0.312 µg/ml, **c** 0.156 µg/ml.



**3. ábra - *C. albicans* flukonazol hígítási sor sejtchip eredményei,** hőkezelt minták, Sytox Green jelöléssel. A flukonazol koncentrációja **a** 1 µg/ml, **b** 0.5 µg/ml, **c** 0.25 µg/ml.

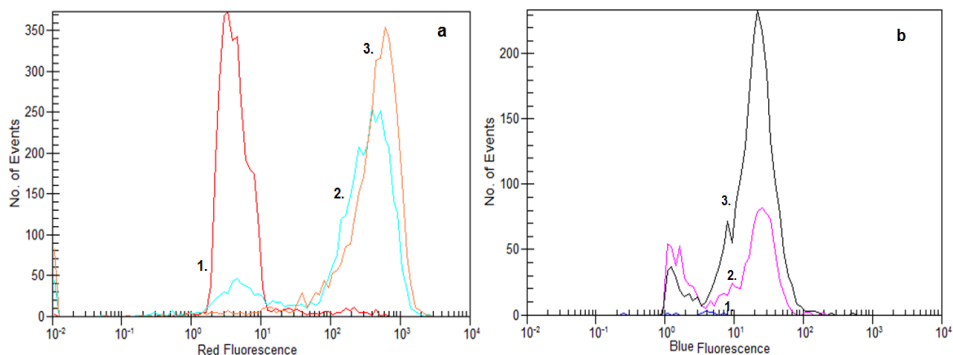
Az antimikotikum nagyobb koncentrációjánál a gombák növekedése akadályozott, a mintában viszonylag kevés sejt látható, azok nagy része nem él. MIC alatti koncentrációnál a gombák növekedése nem akadályozott, a mintákban sok sejt található, ezek jó része élő sejt, Sytox Green festésnél ezért hőkezelés után láthatók. **MIC értékek** azt a koncentrációt határoztam meg, ahol az élő sejtek aránya szignifikánsan (min.50%) csökkent az antimikotikummal nem kezelt, pozitív kontrolhoz képest. Az amphotericin B esetén élesebb váltás tapasztalható, mint a flukonazolnál. A különbség egyik lehetséges oka, hogy az amphotericin B fungicid, míg a flukonazol fungisztatikus hatású szer.

A **4 *Candida* törzs különböző módszerekkel meghatározott, amphotericin B- és flukonazol-érzékenységi eredményeit (MIC[µg/ml]) a 3. táblázatban** foglalom össze.

	Amphotericin B			Flukonazol		
	Csőhíg.	FC	Sejt-chip	Csőhíg.	FC	Sejt-chip
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,312	0,312- 0,625	0,312- 0,625	1	1	0.5
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	0,625	0,625	0,625	>64	>64	>32
<i>C. krusei</i> ATCC 30068	0,312	0,312	0,156	>64	>64	>64
<i>C. tropicalis</i> ATCC 90874	0,156	0,156	0,156	>64	>64	>64

**3. táblázat - *Candida* törzsek csőhígítással, áramlási citometriával és sejt-chip módszerrel meghatározott MIC értékei (µg/ml).**

A fenti, sejt-chipes módszer egy továbbfejlesztett változatával, Syto 60 és Sytox Green fluoreszcens jelöléssel **telítetlen Mannich-keton** vegyületek MIC értékeit is meghatároztam, *C. albicans* törzsrre. Az eredmények jól korreláltak a standard módszerekkel, az **1** vegyület eredményeit **4. ábrán** demonstrálom.



**4. ábra - 1 Mannich-keton MIC meghatározása *C. albicans*ra sejt-chippel, Syto 60 (a ábra) és Sytox Green (b) festéssel. Az 1 vegyület koncentrációja: 1. 3,125 µg/ml, 2. 1,56 µg/ml, 3. 0,78 µg/ml.**

### 4.3. Mannich-keetonok hatása *C. albicans* fehérjeprofilijára

Kísérleteimben **15 kondenzált vázas Mannich-keeton** hatását vizsgáltam *C. albicans* fehérje-profiljára. Változásnak értékeltem új fehérje-csúcs megjelenését az elektroferogramon, meglevő fehérje mennyiségének növekedését vagy csökkenését (a kontrollhoz képest min. 20 %).

A nagy mennyiségű (400ml) tápoldatban termelt *Candida* sejteken a Mannich-keetonokat két különböző koncentrációban alkalmaztam, 1 órás kezelési idővel, párhuzamosan minden anyaghoz készítettem antimikotikum-mentes kontrollt. A fehérjéket 0,37 M tris-HCl (pH=7,5), 1mM EDTA, 5mM 2-merkaptotanol, 1% Triton X-100 és 1mM fenil-metil-szulfonil-fluorid összetételű extrakciós pufferrel vontam ki a sejtekből.

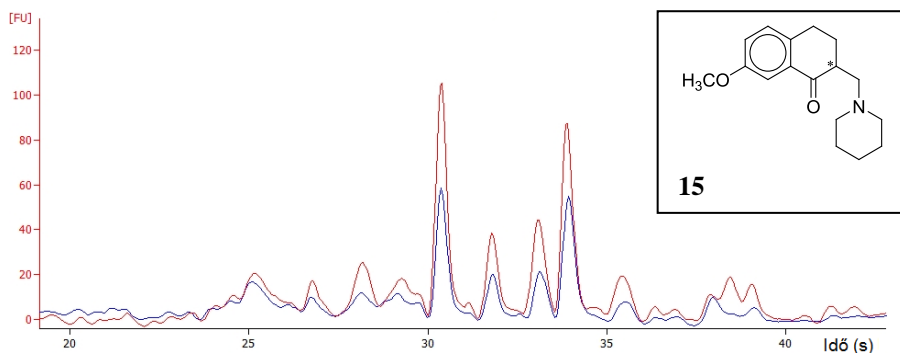
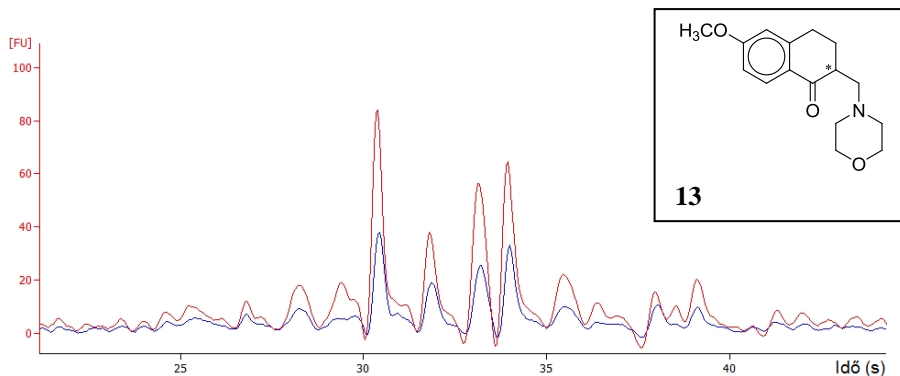
A fehérje mintákat, a szokványos poliakrilamid-gélelektroforézis mellett, a **kapilláris gélelektroforézis elvén működő chip-alapú rendszerrel** teszteltem. Az elválasztás itt méret alapján történik, köszönhetően a felhasznált redukálószernek és az SDS-nek, a kapott elektroferogramokon a fluoreszcenciát a migrációs idő függvényében ábrázoljuk. A módszer belső és külső standardok használatával kvalitatív és szemikvantitatív analízisre is alkalmas.

A kondenzált Mannich-keetonok vizsgálata alapján kijelenthető, hogy egyes vegyületek hatással vannak a *C. albicans* fehérjéire.

Az általam vizsgált 15 anyag közül 4: az **5, 11, 13, 15** anyagok okoztak értékelhető változást. Új fehérje megjelenését nem sikerült kimutatnom egyik mintánál se, a hatás adott fehérjék mennyiségének növekedésében jelentkezett, a 30-70 kDa közti tartományban.

Az **5. ábrán** a **13** és **15** Mannich-keetonok *C.albicans* fehérjéire gyakorolt hatását mutatom be az elektroferogram kiemelt részletén, a fluoreszcencia intenzitást az idő függvényében ábrázolva. A chip-alapú elektroforézissel nyert elektroferogramon a kontrol mintát kék, a megfelelő anyag 2xMIC koncentrációjával kezelt mintát piros színnel ábrázoltam.

A fehérjék azonosítására MS vizsgálatokat végeztünk, melynek során egy- és kétdimenziós elektroforézis eredményeképp nyert gélekből is vettünk mintát. Egyelőre nem sikerült azonosítani a fehérjéket, sem új fehérje megjelenését igazolni a kezelés hatására, itt további vizsgálatok szükségesek.



**5. ábra** – *C. albicans* **13** ill. **15** Mannich-vegyülettel kezelt mintáinak **chip-alapú elektroforézissel** nyert elektroferogramjának részlete, a **kontrollt kék**, a **2xMIC Mannich-ketonnal kezelt fehérjemintát piros** színnel ábrázolva.

A **15** vizsgált **kondenzált Mannich-ke-ton** fenti eredményei alapján általános összefüggéseket a vegyületek szerkezete és a *C. albicans* fehérjéire gyakorolt hatás között nem tudtam levonni.

Az eredményeim és a vegyületek logP értéke között professzor Prókai László (Department of Pharmacology & Neuroscience, University of North Texas, Health Science Center at Fort Worth, USA) által végzett QSAR számítások alapján úgy tűnik, hogy a fehérjepofilra gyakorolt hatás szempontjából ideális logP érték 1,8-2,5 közt van, míg a túl lipofil (logP > 2,5) vegyületeink nincsenek hatással a fehérjepofilra [Prókai L. nem publikált eredmények].

## 5. Összefoglalás

Kísérleteim során **Candida sejtek áramlási citometriás antimikotikum-érzékenység meghatározását valósítottam meg.** A vizsgálatban két klinikai gyakorlatban használt antimikotikumot, egy fungicid és egy fungisztatikus hatású szert is bevontam. Az érzékenység-vizsgálatot *Candida albicans* és *non-albicans* törzseken teszteltem.

Ezen eredményeket adaptáltam egy hasonló célra eddig nem használt, mikrofluidikai áramlási rendszerre. Így elsőként **sikerült kifejlesztenem egy gyors, könnyen kivitelezhető chip-alapú áramlási citometriás diagnosztikai módszert antimikotikum-érzékenység meghatározására.**

Ezt követően a klasszikus antifungális szerek mellett egy érdekes, gombaellenes hatással is rendelkező vegyületcsalád, a Mannich-keetonok vizsgálatára koncentráltam. A kifejlesztett mikrofluidikai módszer egy változatával **meghatároztam néhány telítetlen Mannich-keeton standard *C. albicans* törzs elleni hatékonyságát (MIC).**

A **Mannich-keetonok** citotoxikus és antimikrobiális hatása több tényezőre vezethető vissza. Elsődleges a célsejt tiol-csoportjainak alkilálása, emellett azonban más tényezők, mint a fehérje-szintézis gátlása és gombáknál az ergoszterin- és kitin-bioszintézis gátlása is fontos lehet. Ezek közül a mechanizmusok közül a fehérje-összetétel megváltoztatását választottam ki. Ennek monitorozására egy korszerű, chip-alapú gélelektroforézis technikát használtam.

A **mikrochip elektroforézis** alkalmasnak bizonyult *Candida albicans* fehérjéinek elválasztására. Célom volt a *C. albicans* fehérjeprofiliájában Mannich-kezon kezelés hatására fellépő minőségi és mennyiségi változások megfigyelése; és ilyen értelmű szerkezet-hatás összefüggések felállítása.

A **Mannich-kezonok közül a kondenzált vázas vegyületek egy csoportját (15 vegyület)** teszteltem. Megállapítottam, hogy a vegyületcsalád egyes tagjai az alkalmazott egy órás kezelési idő mellett is befolyásolták a fehérjeprofiljt, a hatás egyes fehérjék mennyiségének növekedésében jelentkezett. Szerkezet-hatás összefüggések levonásához egyelőre nem sikerült elég eredményt gyűjtenem.

Vizsgálataim alapján megállapítható, hogy a mikrofluidikai citometriás és elektroforézis rendszerek alkalmasak egyes élesztőgombák vizsgálatára.

## 6. Megjelent közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

**Bouquet O**, Kocsis B, Kilár F, Lóránd T, Kustos I.: Amphotericin B and fluconazole susceptibility of *Candida* species determined by cell-chip technology. *Mycoses* 2012, 55 (3): e90-96. IF: 1,278

**Bouquet O**, Kocsis B, Kilár F, Kustos I.: Application of chip-based flow cytometry for amphotericin B and fluconazole susceptibility testing on *Candida* strains.

*Methods in Molecular Biology* 2013, 968: 149-154.

Rossignol T, Kocsis B, **Bouquet O**, Kustos I, Kilár F, Nyul A, Jakus PB, Rajbhandari K, Prókai L, d'Enfert C, Lóránd T.: Antifungal activity of fused Mannich ketones triggers an oxidative stress response and is Cap1-dependent in *Candida albicans*.

*PLoS One* 2013, 8(4): e62142.

IF: 3,73

## **Az értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok**

**Bouquet O**, Kustos I, Kocsis B, Lóránd T, Kilár F.: Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry and cell-chip method. 7th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS project. 10-15 June, 2007, Pécs, Hungary. Abstract Book, p.16.

**Bouquet O**, Kustos I, Lóránd T, Kilár F, Kocsis B.: Determination of amphotericin B susceptibility of *Candida albicans* by cell-chip method. ISAAC XXIV International Congress. 17-21 May, 2008. Budapest, Hungary. Abstract Book p.253.

**Bouquet O**, Kustos I, Lóránd T, Kilár F, Kocsis B: Application of cell-chip method to rapid susceptibility testing. 9th International Symposium on Instrumental Analysis. 29 June – 2 July, 2008, Pécs, Hungary. Abstract Book p.55.

**Bouquet O**, Kustos I, Kocsis B, Kilár F, Lóránd T.: Effect of fused Mannich ketones on the protein profile of *Candida albicans*. The Fungal Cell, Annual Scientific Meeting of the British Mycological Society, 1-4 September, 2009, Dundee, UK. Abstract Book p.25.

**Bouquet O**, Kustos I, Kocsis B, Kilár F, Lóránd T.: Examination of the protein profile of *Candida albicans* - effect of fused Mannich ketons. 6<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. 5-8 November, 2009, Pécs, Hungary. Abstract Book p.41.

**Bouquet O.**: Különböző antifungális vegyületek hatása *Candida albicans* fehérjeprofiljára. Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécsi Akadémiai Bizottság Biológiai Tudományok Szakbizottságának rendezvénye, Pécs, 2009. november 12-13. előadás