

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**Antimykotický účinek selektivních inhibitorů zpětného
vychytávání serotoninu**
(diplomová práce)

Hradec Králové, 2007

Helena Marečková

Chtěla bych poděkovat svému školiteli PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za jeho odborné vedení, pomoc, cenné poznatky a vědomosti získané během vypracování diplomové práce. Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc., za pomoc při provádění praktické části, paní Idě Dufkové, za přípravu materiálu a vždy usměvavou pomoc při laboratorním testování a odečtech výsledků. Děkuji Vám všem za Váš čas, spolupráci a za to, že jsem se na Vás vždy mohla s důvěrou obrátit s jakýmkoliv problémem.

OBSAH

1	Použité zkratky.....	3
2	Úvod.....	4
3	Teoretická část.....	5
3.1	Deprese	5
3.2	Serotonin a deprese.....	5
3.3	Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI).....	7
3.3.1	Stereochemie těchto látek	9
3.3.2	Farmakokinetika SSRI	10
3.3.3	Farmakodynamické vlastnosti SSRI	16
3.4	Protimikrobní aktivita netradičních antibiotik	18
3.4.1	Rezistence jako indukční faktor k hledání nových léčiv s protimikrobní aktivitou	18
3.4.2	Nalezení netradičních antibiotik.....	19
3.5	SSRI jako netradiční antibiotika	21
3.5.1	Změna antimikrobní aktivity antibiotik, antimykotik a jiných chemoterapeutik pomocí SSRI	22
3.5.2	Imunomodulační a protivirový účinek SSRI	23
3.5.3	Přímý antibakteriální účinek SSRI a ovlivnění fyziologie a patogenity mikroorganismů	25
3.5.4	SSRI a Plasmodium falciparum	30
3.5.5	Přímý antifungální účinek SSRI a ovlivnění fyziologie a patogenity mykotických organismů.....	32
3.6	Antimykotika	42
3.6.1	Obecná charakteristika	42
3.6.2	Antimykotická antibiotika	43
3.6.3	Azolové deriváty	44
3.6.4	Allylaminy	44
3.6.5	Thiokarbamáty	45
3.6.6	Ostatní antimykotika	45
3.6.7	Použitá antimykotika pro metodu checkerboard	46
4	Experimentální část	49
4.1	Stanovení citlivosti mykotických organismů k SSRI	49
4.1.1	Materiál.....	49
4.1.2	Pracovní postup.....	51
4.2	Metoda checkerboard	53
4.2.1	Materiál.....	54
4.2.2	Pracovní postup.....	55
4.2.3	Hodnocení výsledků experimentu.....	62
4.3	Vyhodnocení experimentální části	65
4.3.1	Stanovení citlivosti mykotických organismů k SSRI.....	65
4.3.2	Metoda checkerboard	67
5	Diskuse	82
6	Závěr.....	88
7	Souhrn	90
8	Abstract.....	92
9	Seznam použité literatury.....	93

1 Použité zkratky

AMB	amfotericin B
ATB	antibiotika
ATCC	American Type Culture Collection
CNS	centrální nervový systém
CYP	cytochromoxidázový jaterní systém cytochromu P 450
FIC	frakční inhibiční koncentrace
FLZ	flukonazol
IC50	50% maximální inhibiční koncentrace
MDR	„multi drug rezistence“ efluxní pumpa
MFC	minimální fungicidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MOPS	Na ⁺ sůl morfolinosulfonové kyseliny
NA	noradrenalin
PG	prostaglandiny
p.o.	perorální podání léčiva
P-SSRI	fenylpiperidinové deriváty SSRI
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium 1640
SAP	kandidou produkovaná aspartát proteáza
SERT	ATP (Na ⁺ /Cl ⁻) závislý serotoninový transportér
spp.	species–v textu není striktně rozlišeno, zda se jedná o jeden určitý nebo více různých druhů
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TXB2	tromboxan B2
5-HT	serotonin
5FC	5-fluorcytosin (flucytosin)

2 Úvod

Žijeme ve světě plném mikroorganismů. Naprostá většina z nich pro nás není nebezpečná, naopak, některé mikroorganismy jsou pro náš život nezbytné (např. mikroflóra našeho těla), pomáhají nám (biotechnologická příprava některých jinak těžko dosažitelných léků - např. inzulínu) nebo nám jej usnadňují (výroba mléčných produktů - např. jogurtů, sýrů; výroba piva, vína, pekárenského zboží).

Existují také mikroorganismy, které jsou pro lidský makroorganismus nebezpečné či jejich působení není žádoucí. Proti těmto původcům humánních (popř. veterinárních) infekcí se snažíme od nepaměti bojovat. Teprve v nedávné historii je náš boj alespoň z části úspěšný. Vývojem účinných antibiotik, antimykotik či jiných chemoterapeutik se podařilo zachránit nespočet lidských životů a vyléčit, nebo alespoň zmírnit, mnoho zdravotních problémů. V kombinaci s prevencí a očkováním proti nejzávažnějším původcům se snížil počet úmrtí na onemocnění, která v minulosti působila velké ztráty na lidských životech.

Bohužel s vývojem protimikrobních látek se objevila schopnost mikroorganismů přizpůsobovat se a vyvíjet mechanismy, jak přežít. Tento jev zvaný rezistence je momentálně jedním z největších problémů farmakoterapie infekčních onemocnění. Proto se farmaceutický výzkum intenzivně věnuje hledání nových léčiv s protimikrobním účinkem. Nová účinná látka se nenachází snadno. Další cestou může být sledování, zkoumání a přehodnocení potenciálu již nalezených léčiv používaných v jiných indikacích. Některá z nich vykazují protimikrobní efekt jako vedlejší účinek původního záměru terapie.

V naší práci se snažíme potvrdit výsledky nedávných studií, kde bylo zjištěno, že selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu mají vedle účinku antidepresivního i účinek antimikrobiální. Studovali jsme *in vitro* aktivitu paroxetinu a fluoxetinu proti mykotickým kmenům a dále i jejich kombinaci s některými antimykotiky.

Pokusili jsme se zhodnotit, zda by tyto látky mohly být využity v praxi jako alternativa nebo doplněk stávajících terapeutických postupů při léčbě infekčních onemocnění.

3 Teoretická část

3.1 Deprese

Deprese je spojena s apatií, smutkem, pesimistickým náhledem se sebeobviňováním a pocitem bezmocnosti, ztrátou zájmu a motivace. Často se objevují sklony k impulsivnímu jednání se sebevražednými, někdy i vražednými tendencemi. (Lincová a Fargahali, 2002)

Etiologie této poruchy není zatím přesně objasněna. Zvažovány jsou příčiny genetické, vlivy prostředí, faktory endokrinní a biochemické. Nejpropracovanější je tzv. monoaminová teorie deprese, která se objevila v polovině 60.let minulého století. (Lincová a Fargahali, 2002)

3.2 Serotonin a deprese

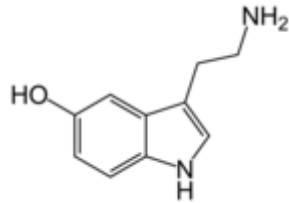
Deprese je podle výše zmiňované monoaminové teorie výsledkem nedostatku serotoninu nebo noradrenalinu, popř. i dopaminu v centrálním nervovém systému (CNS). Serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) je syntetizován jak v CNS, tak na periférii, nepřechází však hematoencefalickou bariéru. (Lincová a Fargahali, 2002)

V nervových zakončeních je 5-HT přítomen ve vezikulách i extravezikulárně, po uvolnění do synapse je významně zpětně vychytáván do presynaptických nervových zakončení nebo odbouráván monoaminoxidázami. Známe několik podtypů 5-HT receptorů, lišící se vzájemně podle lokalizace v organismu a jejich funkce. (Tilšer, 2005)

Snížení hladin těchto neurotransmiterů se projevuje adaptací organismu zvýšením počtu receptorů, tzv. up-regulací. Velikost této změny koreluje s hloubkou deprese, takže je označována i za příčinu jejího vzniku. (Lincová a Fargahali, 2002)

Nástup účinku antidepresiv je většinou značně opožděn (o několik dnů i týdnů), přestože biochemické změny jsou detekovatelné mnohem dříve. Tato skutečnost svědčí právě pro terapeutický vliv zpětných sekundárních adaptačních změn nastupujících v trasmiterových systémech až po zvýšené nabídce příslušného monoaminu, jako např. zpětná desenzitizace receptorového systému (tzv. down-regulace). (Lincová a Fargahali, 2002)

U deprese byly s určitostí prokázány změny ve smyslu up-regulace β -adrenergních a 5-HT receptorů a po určité době podávání antidepresiv jejich zpětná down-regulace. (Lincová a Fargahali, 2002)

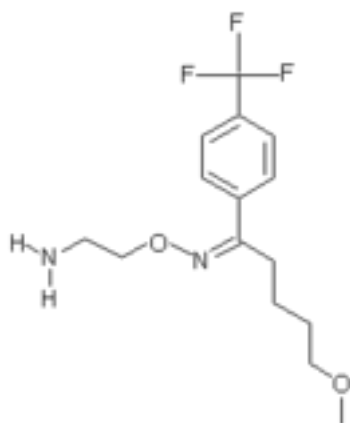


serotonin

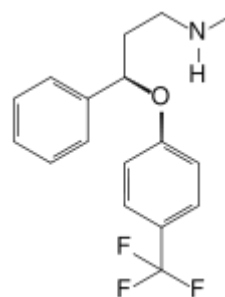
3.3 Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)

Někdy bývají nazývány thymoleptika III. generace nebo-li 3.generace antidepresiv. Léky tohoto typu (např. fluvoxamin, fluoxetin, paroxetin, sertralin, citalopram) se po svém zavedení do klinické praxe rychle staly hojně využívanými antidepresivy. (Lincová a Fargahali, 2002) Vyznačují se dobrou tolerancí a relativní bezpečností. (Baumann, 1996)

První člen této skupiny, fluvoxamin, byl představen roku 1983 v Anglii, následován fluoxetinem roku 1989 tentokrát v USA. (De Vane a kol., 1999)

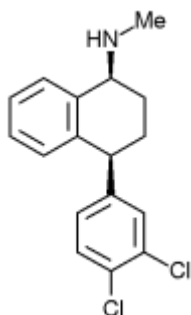


fluvoxamin

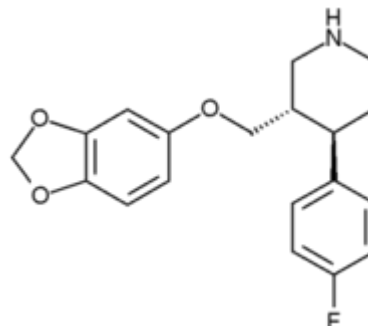


fluoxetin

Dále na trh a do širokého klinického použití postupně vstoupil sertralin a paroxetin. (De Vane a kol., 1999)

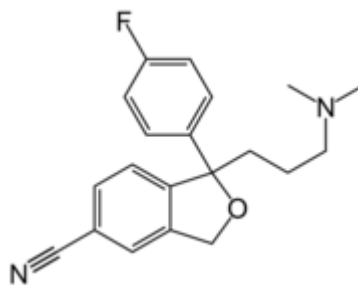


sertralin



paroxetin

Jako poslední roku 1997 byl v USA uveden citalopram. (De Vane a kol., 1999) Dnes, jako nejnovější látka, je dostupný i jeho levotočivý stereoizomer - escitalopram.



citalopram

3.3.1 Stereochemie těchto látek

Důležitost stereochemie při zkoumání SSRI spočívá v poznání, že některé z těchto látek, podávané jako racemické směsi (fluoxetin a citalopram) nesou velice různorodé farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti jako jednotlivé enantiomery. Rozdílnost v odpovědi na léčbu u jednotlivých pacientů může být částečně zapříčiněna odlišným metabolismem enantiomerů. (De Vane a kol., 1999)

U fluoxetinu, jeho (-)-(R)-fluoxetin i (+)-(S)-fluoxetin (enantiomery) se přibližně shodují v psychotropním (antidepresivním) účinku, ale (+)-(S)-fluoxetin je 6krát aktivnější inhibitor cytochromoxidázového jaterního systému cytochromu P 450 (CYP) podtypu 2D6. Hlavním metabolickým produktem je opět opticky aktivní sloučenina, norfluoxetin. (S)-norfluoxetin inhibuje vychytávání serotoninu přibližně stejně jako samotná předlohovlá látka, na rozdíl od jeho (R)-stereoizomeru, který je v této aktivitě asi 22krát slabší. Oba mají stejnou účinnost na jaterní enzymový systém. (De Vane a kol., 1999)

Pro citalopram je tento rozdíl ještě větší. (S)-enantiomer nese mnohem výraznější aktivitu jako inhibitor vychytávání serotoninu než (R)-enantiomer. (Baumann, 1996) Z tohoto důvodu byl později do klinické praxe zaveden (S)-citalopram jako samostatná aktivní látka.

3.3.2 Farmakokinetika SSRI

Absorpce a vazba na plazmatické proteiny

Podávají se perorálně (p.o.) s dobrou absorpcí, injekčně se podává pouze citalopram. (Lincová a Fargahali, 2002)

Rozsah p.o. absorpce u většiny látek této skupiny není snížen přítomnou potravou, pouze je ovlivněna její rychlost. Výjimkou je sertralin. Současně podaná potrava zvýší pík plazmatické koncentrace asi o 25% a zkrátí čas dosažení maximální koncentrace. Vysvětlení by mohlo být následující. Potrava zvýší rychlost průtoku krve játry a následně více léčiva unikne tzv. first-pass efektu (metabolismu prvního průchodu játry, kdy je krev obsahující právě absorbovanou látku vedena do jater, zde proběhne detoxikace a rozklad části vstřebané látky). Interakce látek s potravou pravděpodobně není klinicky významná, jelikož bylo zjištěno, že terapeutické ani vedlejší účinky SSRI nejsou v korelaci s píkem dosažené koncentrace. (De Vane a kol., 1999)

Kvantitativní stanovení SSRI a jejich metabolitů v krvi jsou založeny na jejich separaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo plynové chromatografie (GC). (Baumann, 1996)

S vysokou afinitou se váží na krevní bílkoviny v plazmě (v průměru až 90%), nejvíce sertralin, pak fluoxetin a paroxetin, na což je nutné pamatovat při kombinované léčbě s jinými léky soutěžícími o tuto vazbu (např. salicyláty, perorálními antidiabetiky, atd.). (De Vane a kol., 1999) a (Lincová a Fargahali, 2002)

Biologická dostupnost a plazmatické koncentrace jednotlivých látek

Tabulka 1: Biologická dostupnost a průměrné vybrané plazmatické koncentrace léčiv v ustáleném stavu (De Vane a kol., 1999)

Léčivo	Biologická dostupnost léčiva v %	Průměrná denní dávka [mg]	Průměrná ustálená koncentrace léčiva v plazmě [$\mu\text{g/l}$]
Citalopram	95	10 – 40	40 - 300 (max. 600)
Fluoxetin	80	20 – 80	90 - 300 (max.1000)
Fluvoxamin	53	100 - 300	20 - 500
Paroxetin	64	20 – 50	10 - 600
Sertralin	44	50 – 200	20 – 200

Z tabulky 1 je patrné, že se látky od sebe značně liší. Biologická dostupnost v rozmezí 95% - 44% samozřejmě znamená velké rozdíly v dosažitelných koncentracích. Fluoxetin navíc podléhá vysokému first-pass efektu, proto se jeho maximálně dosažitelné koncentrace velmi liší, i když je jeho biologická dostupnost relativně vysoká. (De Vane a kol., 1999)

Koncentrace SSRI (zejm. sertralínu) v mozku a cerebrospinální tekutině je asi 40x vyšší než koncentrace v krvi. (Lass-Flörl a kol., 2001a)

Zajímavý jev vykazuje fluvoxamin v dávkách nad 300mg za den, a to nelineární farmakokinetiku. Tzn. že ve skutečnosti dostaneme vyšší koncentrace než bychom analogií předpokládali z dávek nižších. (De Vane a kol., 1999)

Tyto koncentrace jsou také spojeny s mnohem větším výskytem nežádoucích účinků (poruchy spánku, změny chuti a snížení libida). Dokonce, jako u jediné látky, byla stanovena plazmatická koncentrace při intoxikaci fluvoxaminem - okolo 650 $\mu\text{g/l}$, ačkoli vyvolávající p.o. dávka není přesně známa. (Baumann, 1996)

Léčiva mají tak široké rozmezí tolerovaných dávek, že toxicita není vůbec obvyklá. Nejvíce studií vztahu koncentrace - efekt/ vedlejší účinek se provedlo s fluoxetinem. Většina z nich nenalezla vztah mezi jejich koncentrací a účinkem, popř. vedlejším účinkem. (De Vane a kol., 1999)

Montgomery a kol. (1990) a Keck a McElroy (1992) našli zvláštnost pro koncentrace fluoxetinu a norfluoxetinu vyšší než 500µg/l. Paradoxně totiž způsobují horší farmakologickou odpověď než koncentrace nižší. (De Vane a kol., 1999)

Některé závažné nežádoucí účinky se mohou objevit při náhlém vysazení léčiva pacientem, ale ani ty se nezdají být spojeny s plazmatickými koncentracemi. (Baumann, 1996)

Metabolismus a eliminace

Všechny SSRI se silně metabolizují v játrech a některé z metabolitů vykazují farmakologickou aktivitu. Také proto se někdy významně liší délky jejich působení. (De Vane a kol., 1999)

Primární metabolity jsou ve většině produkty oxidačních reakcí. (De Vane a kol., 1999) U některých SSRI se předpokládá tzv. stereoselektivní metabolismus, tzn. jeden enantiomer je odbouráván rychleji než druhý. Jako příklad slouží metabolismus fluoxetinu, kdy (R)-fluoxetin se metabolizuje a eliminuje mnohem rychleji než opačný (S)-enantiomer. (Baumann, 1996)

Mají poměrně nízkou renální exkreci a obecně méně než 12% každého SSRI se vylučuje močí v nezměněné podobě. (De Vane a kol., 1999)

Citalopram

Jediný terciární amin mezi SSRI je citalopram. Ostatní základní sloučeniny jsou sekundární nebo primární aminy. Dva metabolity citalopramu, demethylcitalopram a didemethylcitalopram, patří rovněž mezi SSRI. V důsledku jejich nízkých plazmatických hladin ale k výslednému efektu citalopramu moc nepřispívají. (Baumann, 1996)

Citalopram je asi 100x selektivnější než fluoxetin ve zpětném vychytávání serotoninu. (Taylor a kol., 2000)

Fluoxetin

Vysoce metabolizované léčivo. Podléhá ve velké míře first-pass efektu. Norfluoxetin identifikován jako jediný aktivní metabolit, vykazující účinnost srovnatelnou s mateřskou sloučeninou. Pomocí p.o. podání radioaktivně značeného ¹⁴C-fluoxetinu do lidského organismu bylo zjištěno, že okolo 75% radioaktivního uhlíku se v průběhu 30 dnů vyloučí močí a asi 10% stolicí. Z toho 11% jako nezměněný fluoxetin, 7% jako norfluoxetin, 7% jako konjugáty fluoxetinu a 8% jako konjugáty norfluoxetinu. Dále více než 20% vyloučeno jako kyselina hippurová. (De Vane a kol., 1999)

Eliminace fluoxetinu a norfluoxetinu probíhá pomalu. Příčinou je velký distribuční objem obou sloučenin (poločas eliminace pro fluoxetin: 1-6 dní, průměr 1,9 dne; norfluoxetin v rozmezí 4-16 dnů). Díky dlouhému eliminačnímu poločasu a velkému metabolismu prvního průchodu játry výše zmiňovaných látek se předpokládá, že při chronickém podávání stejně velkých dávek, dojde k jejich akumulaci v plazmě v časovém horizontu 4-5 týdnů nebo déle. (De Vane a kol., 1999)

Paroxetin

Opět vysoce metabolizované léčivo. Metabolity ale nemají významnou farmakologickou aktivitu. Léčivo nejprve metabolizováno na nestabilní katecholový meziprodukt, část molekul pak následně konjugována s glukuronovou kyselinou nebo sulfátem a vyloučena.

Po jednorázovém podání vylučován v nezměněné podobě renální exkrecí méně než ze 2%. (De Vane a kol., 1999)

Vliv některých SSRI na speciální populační skupiny (staré pacienty, kojící ženy, pacienty s poruchou eliminačních orgánů)

Velice zajímavým zjištěním je mírná rozdílnost píku plazmatické hladiny SSRI (sertralinu), plochy pod křivkou závislosti koncentrace na čase po jednorázovém podání a eliminačního poločasu mezi mladými muži a ženami (18-45 let). U mužů byly zmíněné první dva sledované jevy nižší a eliminace delší než u žen. I když jsou rozdíly statisticky významné, bohužel, zatím nevedl tento fakt k doporučení úpravy dávkovacího schématu v závislost na pohlaví pacienta. (De Vane a kol., 1999)

Farmakokinetické vlastnosti fluoxetinu se neodlišují u starých pacientů ani u žen s menstruačním cyklem. Fluoxetin a norfluoxetin se nachází v mateřském mléku v přibližně 25% koncentraci oproti hladině v krvi. (De Vane a kol., 1999)

Na rozdíl od fluoxetinu, plazmatická koncentrace paroxetinu je u starých osob asi o 70-80% vyšší než u mladších pacientů. Ačkoli plazmatická koncentrace není v korelaci s vedlejšími účinky SSRI, vedou tyto výsledky k varování a k potřebě snížit dávkování léčiv pro tuto skupinu pacientů. (De Vane a kol., 1999)

Onemocnění ledvin významně nemění hladiny SSRI při clearance kreatininu vyšší než 10ml/min., pod touto hranicí je již úprava dávek vhodná.

Onemocnění jater významně prodlužuje eliminační poločas fluoxetinu z 2,8 na 7,6 dní. Jaterní cirhóza působí důležitou změnu hladin. (De Vane a kol., 1999)

Interakce

Kromě citalopramu, ostatní SSRI kompetitivně inhibují *in vitro* a *in vivo* některé isoenzymy cytochromoxidázového jaterního systému cytochromu P 450 (CYP) (1A2, 2C, 2D6, 3A4). Někdy mohou být interakce tohoto typu prospěšné. Lze dosáhnout snížení dávkování léčiva, jehož metabolismus a vylučování blokuje. Lepší účinnost (De Vane a kol., 1999), biologickou dostupnost (Baumann, 1996) a méně nežádoucích účinků dosáhla kombinace klozapinu s fluvoxaminem, oproti podávání klozapinu samotného. (De Vane a kol., 1999) Nebo může být kombinace vzájemně či jednostranně se ovlivňujících léčiv naopak ke škodě. (De Vane a kol., 1999)

Výchozí sloučeniny SSRI a některé metabolity jako kompetitivními inhibitory CYP mohou způsobit změnu metabolismu jednak vlastního, jednak dalších běžně podávaných léků metabolizovaných stejnou cestou. Přitom jednotlivá antidepresiva nemají stejnou afinitu ke všem isoenzymům CYP. (Lincová a Fargahali, 2002) Co se týče inhibice CYP 2D6, klesá jejich aktivita od paroxetinu, norfluoxetinu, fluoxetinu, sertralinu až k citalopramu a fluvoxaminu. (Baumann, 1996)

Účinek na CYP může mít klinický význam při podávání některých SSRI (mnoho zpráv pro fluoxetin) např. s tricyklickými antidepresivy při kombinační léčbě těžkých depresí. Fluoxetin pozměňuje jejich farmakokinetické vlastnosti, nejvýznamněji metabolizaci, tzn. hydroxylaci a demethylaci. (Baumann, 1996) Dále interaguje s alprazolamem, midazolamem a karbamazepinem, zodpovědnost zde nese jiný isoenzym (CYP 3A). (Baumann, 1996)

Schopnost ostatních léků ovlivňovat metabolismus a farmakokinetiku SSRI není zatím dostatečně prozkoumána. (Baumann, 1996)

3.3.3 Farmakodynamické vlastnosti SSRI

Mechanismus účinku SSRI spočívá ve vysoce selektivní inhibici zpětného vychytávání serotoninu ze synaptických štěrbin zpět do serotoninergních nervových zakončení. (Lincová a Fargahali, 2002) Toto není pro psychotropní léčiva nový cíl účinku, neboť většina antidepresiv ovlivňuje metabolismus monoaminů. To, co je nové na této skupině léků, je způsob modifikace množství serotoninu v prostoru synapse a právě značná selektivita jejich aktivity. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Váží se na adenosintrifosfátu (ATP) závislý proteinový transportér na synaptické membráně (tzv. SERT - spojený s Na^+/Cl^- pumpou), přítomný právě jen v membránách serotoninergních nervových buněk. (Muñoz-Bellido a kol., 2000) (Taylor a kol., 2000) Při blokádě tohoto transportéru zůstává uvolněný 5-HT ve větším množství v synaptické štěrbině, a tudíž k dispozici pro působení na postsynaptické 5-HT receptory. (Lincová a Fargahali, 2002)

Díky vysoké selektivitě těchto látek nepůsobí na jiné receptorové systémy (α i β -adrenergní, dopaminové ani histaminové), a proto vykazují i méně nežádoucích účinků než dříve známá antidepresiva. Přitom jejich antidepresivní účinnost je zcela srovnatelná s tricyklickými antidepresivy. Léčebně úspěšně se uplatňují u celé řady dalších psychiatrických diagnóz, nejen deprese, ale i anxiety, posttraumatické poruchy, sociální fobie, premenstruální dysforie, bulimie (Lincová a Fargahali, 2002), záchvatů panického strachu (Baumann, 1996) a dalších poruch. (Lincová a Fargahali, 2002)

Premenstruační syndrom s mírnými příznaky vyskytující se u 95% žen v reprodukčním věku se ve vzrůstající míře stává indikací právě pro SSRI jako pro léky první volby. (Lass-Flörl a kol., 2001a)

SSRI se zdají být využitelné i pro doplňkovou terapii, např. u alkoholismu. Konkrétně fluvoxaminu se využívá pro zmírnění depresivních symptomů u pacientů léčených methadonem při odvykání opioidním analgetikům. Tato kombinace navíc vede ke zvýšení plazmatických hladin a ke sníženému dávkování methadonu. (Baumann, 1996)

Účinek SSRI při léčbě deprese a strachu nastává až po dlouhodobém užívání. (De Vane a kol., 1999) Mohou se podávat samostatně nebo v kombinaci s jinými antidepresivy, zejm. v případech těžkých depresivních poruch. (Baumann, 1996)

Přes všechny výše uvedené výhody SSRI se i při jejich podávání setkáváme s některými nežádoucími účinky. Pramení většinou z aktivace různých podtypů postsynaptických 5-HT receptorů mozku, ale také gastrointestinálního traktu. (Lincová a Fargahali, 2002)

- Stimulace 5-HT_{1A}-receptorů bývá spojována s účinky antidepresivními, anxiolytickými a antipyretickými.
- Stimulace 5-HT₂-receptorů s účinky antidepresivními, anxiolytickými (zejména v počáteční fázi léčby), antipyretickými, antibulimickými, ale i s insomnií, sexuálními dysfunkcemi a halucinacemi.
- Stimulace 5-HT₃-receptorů je příčinou zvýšené motility trávicího ústrojí s bolestivými spasmy a průjemem, nauzeou a snížením chuti k jídlu.

Nejzávažnějším nežádoucím důsledkem vystupňovaného serotoninergního vlivu na postsynaptických receptorech může být tzv. serotoninový syndrom, který se však objevuje zejména při nevhodném kombinování SSRI např. s inhibitory monoaminoxidázy. Symptomy jsou jak centrální (zmatenost, mánie, třes, svalové záškuby), tak projevující se na periferních orgánových systémech (abdominální křeče, meteorismus, průjem, pocení, atd.). (Lincová a Fargahali, 2002) Kombinace citalopramu nebo klomipraminu s moklobenidem se ukázala jako letální. Naopak syndrom nebyl popsán v případě použití fluvoxaminu s moklobenidem, úspěšně sloužícího k léčbě refrakterních depresí. (Baumann, 1996)

3.4 Protimikrobní aktivita netradičních antibiotik

3.4.1 Rezistence jako indukční faktor k hledání nových léčiv s protimikrobní aktivitou

Důvodem k hledání protimikrobního účinku v této skupině léčiv, je stále zvyšující se výskyt rezistence mikroorganismů, tzn. schopnosti odolávat inhibičním koncentracím antimikrobních látek. V případě odolnosti vůči více antibiotikům (ATB) se může jednat buď o multirezistenci (ke 3 až 6 ATB) nebo polyrezistenci (k více jak 7 ATB). (Buchta a kol., 1998)

Rezistenci dále dělíme na:

- Primární (přirozenou)–mikroorganismy nejsou působením daného antibiotika ovlivněny, nespádají tudíž do spektra jeho účinku (způsobeno nepřístupností nebo absencí cílové struktury pro dané antibiotikum) např. β -laktámová ATB nepůsobí na houby, protože ty nemají ve své stěně peptidoglykan.
- Sekundární (získanou)–tedy proces vzniku rezistentního kmene mikroba, který byl původně k danému antibiotiku citlivý. (Buchta a kol., 1998)

Trvání rezistence může mít dlouhodobý, trvalý charakter (např. tetracykliny, chloramfenikol, sulfonamidy), u jiných mikrobů naopak jde o jev přechodný, tzn. relativně krátkodobý (tzv. Welsův fenomén). (Buchta a kol., 1998)

Rezistence vzniká dvěma základními způsoby:

- Fenotypickou adaptací–přechodné přizpůsobení mikroba změnám jeho vnitřního (metabolismu) nebo vnějšího prostředí (přítomnost antibiotika)
- Změnou genetického vybavení mikroorganismu-a to buď přímo změnou genomu, tzv. chromozomální rezistence, nebo přenosem genetické informace (pomocí mimojaderné DNA-plasmidy nebo transpozony) a tedy i rezistence k ATB, tzv. extrachromozomální rezistence

U chromozomálně založené rezistence se uplatňuje především mechanismus mutace, u plasmidového typu, jde o genetickou rekombinaci. (Buchta a kol., 1998)

Existuje celá řada mechanismů navození rezistence k antibiotikům:

- Nepochůbnost (impermeabilita) ATB, které tím ztrácí přístup k cílové struktuře.
- Alterace nebo náhrada cílové struktury
- Inaktivace nebo modifikace ATB, nejčastěji enzymaticky (Buchta a kol., 1998)

Velice důležitým mechanismem rezistence je systém efluxních pump. Jejich hlavním účelem je přenést léčivo ven z bakteriální buňky, dříve než zasáhne na svých farmakologických cílech. (Kaatz a kol., 2003)

Bakteriální systém efluxních pump nepřímým způsobem přispívá k rozvoji dalších druhů rezistence, jelikož expozice bakterie subterapeutickým koncentracím léků vyvolává selekci a expresi vysokoúrovňových adaptačních mechanismů jako např. vznik mutací, což vede k přizpůsobení bakterie a k indukci obranných mechanismů jako jsou změna či náhrada cílové struktury.

Konstitutivní exprese těchto pump u některých patogenů významně přispívá k jejich multirezistenci. Proto se intenzivně studují možnosti inhibitorů pump, které by v kombinaci s ATB mohly obnovit antibiotickou účinnost a snížit výskyt mutacemi způsobených rezistencí. (Wei a kol., 2004)

3.4.2 Nalezení netradičních antibiotik

Antimikrobní aktivita syntetických sloučenin nepoužívaných jako chemoterapeutika (např. methylenová modř) je známa od dob Ehrlicha (1854-1915). (Kristiansen a Amaral, 1997) Roku 1886 tento vědec dokázal antiparazitární účinek neurotrofních léčiv, zejména fenothiazinů. (Kristiansen a Hansen, 2000)

V roce 1959 byla poprvé popsána antimikrobní aktivita u další psychotropní látky-chlorpromazinu. Od té doby se ukázalo, že mnoho

neantibiotických léčiv, tzn. léčiv primárně nepoužívaných k antimikrobní terapii, má vliv na různé mikroorganismy a parazitární onemocnění. (Muñoz-Bellido a kol., 2000) (Kaatz a kol., 2003)

Do rodiny netradičních antibiotik dále patří: jiná psychotropní léčiva - thioxantiny, fenylpiperidiny; mukolytika, antihypertenziva-reserpin, blokátory kalciového kanálu-verapamil; inhibitory protonové pumpy-omeprazol; nesteroidní antiflogistika-diklofenak; cytostatika, atd.

Synergismus je v praxi velice výhodný jev, nejde pouze o sumu účinků jednotlivých komponent kombinace. Není vyžadován, pokud obě složky účinkují v používaných koncentracích. Naopak, pokud jedna ze složek je potencionálně toxická, můžeme snížením koncentrací potřebných k její aktivitě umožnit používání tohoto léčiva v praxi. Naneštěstí většina *in vitro* nalezených synergických účinků léčiv již nebyla potvrzena *in vivo*. Za speciální typ synergismu může být považován tzv. „zvrát rezistence“. Kombinací β -laktámových antibiotik, ke kterým jsou některé mikroorganismy primárně rezistentní, a fenothiazinů docílili vědci tohoto typu synergismu. Např. methicilin rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (MIC 100mg/ml) se staly citlivými k methicilinu, pokud kultivační médium obsahovalo chlorpromazin (MIC 6,2 μ g/ml). Deriváty chlorpromazinu dokázaly snížit MIC ještě více až na 1,6 μ g/ml. Stejný efekt vykazuje kombinace penicilinu s chlorpromazinem na penicilin rezistentní kmeny *Corynebacterium*. (Kristiansen a Amaral, 1997)

Zvýšení antibiotického účinku netradičními antibiotiky není závislé na existenci citlivosti vůči samotnému antibiotiku. Což dokazují případy uvedené výše. (Kristiansen a Amaral, 1997)

Mechanismus, kterým nastává synergismus mezi antibiotiky a netradičními antibiotiky není zatím přesně znám. (Kristiansen a Amaral, 1997)

Nejvyšší protimikrobní účinnost našli vědci u skupiny léčiv, která se antimikrobním účinek neprokazovala nikdy před tím, a to u tzv. 3. generace antidepresiv- selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), jmenovitě u paroxetinu, fluoxetinu a sertralinu (Muñoz-Bellido a kol., 2000) a dalších.

Bohužel přesný mechanismus, kterým působí SSRI na mikroorganismy není zatím znám.

3.5 SSRI jako netradiční antibiotika

Tato jejich schopnost se může projevit různými způsoby:

- Změnou antimikrobní aktivity antibiotik, antimykotik a jiných chemoterapeutik
- Stimulací imunitního systému a zvýšení obranyschopnosti makroorganismu.
- Ovlivněním fyziologie a patogenity mikroorganismů
- Nebo dokonce přímou protimikrobní účinností. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

3.5.1 Změna antimikrobní aktivity antibiotik, antimykotik a jiných chemoterapeutik pomocí SSRI

Předpokládá se, že stejně jako u lidských buněk inhibují SSRI některé pumpy, mohou stejně účinkovat na efluxní pumpy mikrobů. Důležitost tomuto zjištění vyneslo až poznání, že jde o velice důležitý mechanismus rezistence, zodpovědný za selhání terapie u mnoha bakterií. Zmiňovanou aktivitou se rovněž vysvětluje synergní efekt s některými ATB (tetracykliny a fluorochinolony), projevující se snížením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) protimikrobních látek, např. pro *Corynebacterium urealyticum*. (Muñoz-Bellido a kol., 2000) (Heller a kol., 2004) Snížením MIC (okolo 50%) u chinolon-rezistentních kmenů může dojít k tzv. zvratu rezistence, kdy kmeny původně rezistentní se stanou kmeny citlivými. (Heller a kol., 2004) (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Léčiva, zejména sertralin, jsou tedy schopna zvyšovat účinnost některých antibiotik. (Muñoz-Bellido a kol., 2000) Na druhou stranu ale neovlivňují aktivitu všech ATB, např. účinky β -laktámových ATB (ani v kombinaci s inhibitory β -laktamázy), gentamicinu, kombinace trimethoprimu se sulfamethoxazolem a další zůstávají beze změny. (Muñoz-Bellido a kol., 1996)

Heller a kol. (2004) zkoumali vliv serotoninu a sertralinu v kombinaci s antimykotiky pro kmeny *Aspergillus* spp. Kombinace 5-HT a amfotericinu B vykazala 100% synergní účinek.

SSRI mají také schopnost ovlivňovat normální fyziologii některých mikroorganismů. Bohužel ani zde není přesně znám mechanismus působení. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Hlavní faktory zhoršující možnost jejich využití jsou nízké dosažitelné sérové koncentrace – maximálně kolem 1 μ g/ml a jejich vliv na CNS. Tyto koncentrace sice dostačují pro synergní efekt s některými antibiotiky a k ovlivnění metabolismu, ale skoro vždy jsou nižší než ty, nutné k inhibici právě nejcitlivějších kmenů. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Z výše deklarovaného vyplývá, že i když SSRI asi nenaleznou využití jako samostatná netradiční antibiotika, mohlo by se ale uvažovat o jejich kombinaci s chemoterapeutiky, výhodné po stránce zlepšení nebo umožnění jejich účinku.

3.5.2 Imunomodulační a protivirový účinek SSRI

Eikosanoidy - metabolické produkty kyseliny arachidonové zahrnují:

- Prostaglandiny (PG)
- Leukotrieny (LT)
- Prostacyklin (PG I₂)
- Tromboxan B2 (TXB2)
- Lipoxiny (hydroxy-mastné kyseliny)

Eikosanoidy samoregulují každou buňku včetně těch podporujících imunitní funkce a náladu. (Lieb, 2004)

Za syntézu prostaglandinů je zodpovědný enzym zvaný cyklooxygenáza. Mají různé funkce v humorální i buněčné imunitě zahrnující modulaci aktivity NK buněk (natural killer), přenos signálu aktivující T-lymfocyty, indukce dendritických buněk, kontrola supresorových buněk, aktivace B lymfocytů a úprava makrofág-T lymfocytové interakce a podílí se na řízení osy hypothalamus - hypofýza - nadledviny. (Lieb, 2004)

PG tedy regulují imunitní děje, zánětlivé procesy, ale i náladu a emoce. Při depresi jsou hladiny některých z nich zvýšeny nebo sníženy. PGE1, jeho množství je u pacientů s depresí sníženo, naopak u manických poruch zvýšeno. PGE2 a TXB2, jejich hladiny jsou zvýšeny u depresivních pacientů. Nadměrná syntéza a nadbytek PG zřejmě negativně působí na činnost CNS. (Lieb, 2004)

Proto antidepressivní (a částečně i antimikrobní) účinek SSRI (zejm. fluoxetinu) může být podpořen jejich antiprostaglandinovou aktivitou. Právě fluoxetin inhibuje syntézu 2 sérií prostaglandinů. (Lieb, 2004)

Bakterie, houby a paraziti syntetizují eikosanoidy a mají schopnost indukovat jejich syntézu v hostitelské buňce. Prostaglandiny regulují fyziologii, imunitu, reprodukci a toxicitu mikroorganismů a rezistenci hostitele. Např. u PG obsažených v parazitárním metabolismu a fyziologii (u protozoí), jejich uvolnění hraje důležitou roli v penetraci, imunosupresi, zánětu a ovlivnění hemostázy hostitele. (Lieb, 2004)

Dále byl zkoumán vztah mezi PG a HIV viry. HIV virus je schopen konvertovat arachidonovou kyselinu na PGE2. Pacienti s AIDS demencí, která se u nich často stává hlavním problémem, mají významně zvýšenou hladinu

tohoto PG v mozkomíšním moku. PGE2 navozuje aktivaci virové DNA v T-lymfocytech a může být částečně zodpovědný za imunosupresi, která je hlavním znakem onemocnění AIDS. (Lieb, 2004)

Fenylpiperidinové deriváty SSRI odvozené od paroxetinu a femoxetinu, jejich předlokové látky, enantiomery a citalopram byly testovány jako inhibitory HIV replikace. Femoxetin a příslušný enantiomer vykazovaly malou anti-HIV aktivitu při koncentraci 4µg/ml. Většina jejich analogů, včetně paroxetinu, účinkovala přibližně stejně při podobných koncentracích. Toxické účinky léčiv byly pozorovány při koncentracích vyšších než 20µg/ml. Další testovaná látka z rodiny SSRI, citalopram, byla neaktivní. (Kristiansen a Hansen, 2000)

Výzkumy ukazují, že mikroorganismy s vysokou afinitou k nervovému systému jsou velmi citlivé k neurotropním léčivům. Viry, zejm. ty napadající mozek a periferní nervový systém (např. virus planých neštovic, chřipky, zarděnek a herpetické viry) bývají citlivější vůči tomuto typu léčiv a jejich stereoizomerů. (Kristiansen a Hansen, 2000) Antidepresiva na druhou stranu jsou svou schopností ovlivňovat hladiny PG paradoxně schopna aktivovat spící viry. (Lieb, 2004)

Dále ve své práci Lass-Flörl a kol. (2001b) zkoumali vliv SSRI na obranu makroorganismu při infekci kmeny *Candida* spp. Samozřejmě vrozená, humorální a buňkami zprostředkovaná imunita je zapojena do této obrany. Ačkoliv příspěvek každé z nich má svou důležitost, u systémových kandidóz nese převažující podíl vrozená imunita zprostředkovaná polymorfonukleáry - neutrofilů a makrofágů. (Lass-Flörl a kol., 2003a) Sertralin indukuje tzv. oxidativní vzplanutí monocytů odvozených od makrofágů vystavených tomuto léčivu. Takže působí přímo na mykotické organismy, ale i nepřímo, právě pomocí zvýšení imunitních reakcí. (Lass-Flörl a kol., 2001b)

Současné poznatky tedy naznačují, že antimikrobiální účinek SSRI, lze rozdělit do několika úrovní, které spolu úzce souvisí. Antidepresiva působí přímo na mikroby a dále ovlivňují fyziologické pochody, jimiž se organismus sám brání proti infekci.

3.5.3 Přímý antibakteriální účinek SSRI a ovlivnění fyziologie a patogenity mikroorganismů

Mnoho studií se zabývalo jejich účinkem samostatně nebo v kombinaci proti různým bakteriálním kmenům, zejm. těm multi- nebo poly-rezistentním. Vykazují aktivitu hlavně vůči Gram pozitivním bakteriím. Excelentně účinné jsou na rody *Staphylococcus* a *Enterococcus*, ačkoli nemají žádný vliv na kmeny streptokoků, obvykle vnímavých k antibiotické léčbě - *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* a *S. agalactiae*. Vůči penicilin citlivým i rezistentním pneumokokům nesou nízkou aktivitu. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Rovněž inaktivní jsou proti enterobakteriím s výjimkou rodu *Citrobacter* a *Pseudomonas aeruginosa*. Překvapivě účinkují na rody *Haemophilus influenzae*, *Morganella catarrhalis*, *Camphylobacter jejuni* a dokonce na některé tak problémové kmeny jako je *Acinetobacter*. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Z anaerobních kmenů je citlivý *Bacteroides fragilis*. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Jejich aktivita není závislá na vnímavosti nebo multirezistenci exponovaných kmenů vůči jednotlivým antibiotikům. Např. účinnost vůči koaguláza pozitivním nebo negativním stafylokokům nekoresponduje s jejich citlivostí k methicilinu. Zjistilo se, že v kombinaci s některými antibiotiky působili i na rezistentní mikroorganismy včetně *Corynebacterium urealyticum* - původce močových infekcí a cystitid. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Corynebacterium urealyticum

Obvykle bakterie rezistentní k mnoha antibiotikům. Často k většině běžně užívaných ATB, kromě glykopeptidů, které mají významné vedlejší účinky. Specifický mechanismus rezistence není znám, ale předpokládá se, že je zprostředkován systémem efluxních pump. (Muñoz-Bellido a kol., 1996)

Ve studii Muñoz-Bellido a kol., (1996) sledovali aktivitu antibiotik a netradičních antibiotik SSRI (sertralínu, paroxetinu a fluoxetinu), chlorpromazinu a risperidonu, popř. jejich kombinace, proti 31 kmenům *Corynebacterium urealyticum*. Pouze vankomycin a teikoplanin z 11 testovaných ATB účinkovali na všechny kmeny. Naopak k amoxicilinu vykazovaly kmeny 100% rezistenci a

z 90% k cefotaximu a gentamicinu. Fluorované chinolony účinkovaly proti 19,4-32,3% a tetracykliny proti 38,7% kmenů. (Muñoz-Bellido a kol., 1996)

Všechna psychotropní léčiva byla aktivní proti *C. urealyticum*. Nejvíce sertralin, jehož MIC byla dokonce nižší než MIC pro testovaná ATB s výjimkou glykopeptidů. Aktivita fluoxetinu, chlorpromazinu a paroxetinu je srovnatelná s tetracykliny, někdy i mírně lepší. (Muñoz-Bellido a kol., 1996)

Sertralin v žádné koncentraci neovlivňoval aktivitu amoxicilinu, amoxicilinu potencovaného klavulánovou kyselinou, cefotaximu, gentamicinu ani kombinaci trimethoprimu se sulfamethoxazolem. Při koncentraci 1/2 až 1/16 MIC zvyšoval aktivitu tetracyklinu proti všem kmenům v průměru 4-krát (v rozmezí 2-32krát). Kombinací s ciprofloxacinem zvýšil jeho účinnost opět v průměru 4-krát (v rozmezí 4-64krát). (Muñoz-Bellido a kol., 1996)

V kombinaci testovaných ATB a SSRI nebyl pozorován antagonismus v žádném z případů. (Muñoz-Bellido a kol., 1996)

***Staphylococcus aureus* a jeho systém efluxních pump**

Obecně rychle vyvíjející se rezistence na β -laktámová antibiotika a glykopeptidy se stává velkým problémem při terapii stafylokokových infekcí. Příčinou je systém efluxních pump. (Hendricks a kol., 2003)

Kaatz a kol. (2003) ve své práci sledovali *in vitro* ovlivnění dvou typů membránových efluxních pump, NorA a non-NorA, u *Staphylococcus aureus* fenylypiperidinovými SSRI (P-SSRI), paroxetinem a femoxetinem a jejich stereoizomery.

NorA protein přenáší hydrofilní fluorochinolony, monokationická barviva a dezinfekční prostředky ven z mikrobiální buňky a je odpovědný za výskyt zhruba 10% methicilin rezistentních kmenů *S. aureus*. Dalšími substráty pro eflux mohou být i tetracykliny a makrolidy. (Kaatz a kol., 2003)

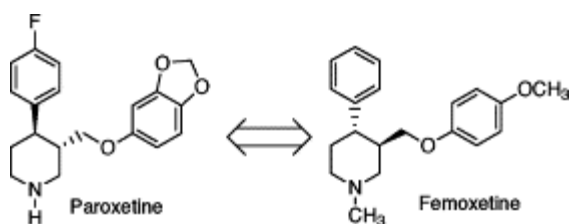
Většina efluxních pump pro léčiva u Gram pozitivních bakterií má strukturu polypeptidů nebo proteinů ukotvených v bakteriální membráně a využívají jako zdroj energie přenos protonu. Patří do rodiny MFS proteinů (major facilitation superfamily) a mohou přenášet pouze jednu skupinu (např. TetK u *Staphylococcus aureus*) nebo více skupin léčiv (tzv. rodina MDR pump - NorA *S.aureus*, Bmr *Bacillus subtilis*). (Kaatz a kol., 2003)

Inhibitory NorA proteinů zahrnují množství přírodních i syntetických sloučenin. Jako příklady mohou sloužit - reserpin, omeprazol a verapamil, ale koncentrace potřebné k inhibici jsou moc vysoké, než aby byly klinicky využitelné. Navíc samy nejsou antibakteriálně aktivní. (Wei a kol., 2004)

P-SSRI inhibují funkci dvou jedinečných „multi drug resistance“ (MDR) efluxních pump kmene *Staphylococcus aureus* a mohou tak znovuobnovit účinnost antimikrobních látek, které jsou substráty pro tyto proteiny. (Kaatz a kol., 2003)

Wei a kol. (2004) si připravili řadu strukturních derivátů odvozených od základních fenylpiperidinových sloučenin, aby dokázali vliv strukturních prvků a substituentů na schopnost inhibice efluxních pump. Aktivitu jednotlivých sloučenin testovali na dvou kmenech *Staphylococcus aureus*: SA 1199B s norA proteinem a kmenu SA K2068 s non-NorA fenotypem. Jako substrát efluxu pro obě pumpy v experimentu sloužil ethidium bromid. Výsledky vyjadřovali v koncentraci potřebné k 50% inhibici těchto efluxních pump. (Wei a kol., 2004)

Strukturální rozdíly mezi paroxetinem a femoxetinem zodpovídají za nestejnou inhibici výše zmiňovaných pump. Tato aktivita nevykazuje stereochemickou specifitu, oba izomery (jak paroxetinu, tak femoxetinu) působily skoro stejně. Paroxetin se ukázal jako účinnější (2-10krát nižší koncentrace potřebná pro 50% inhibici obou typů efluxních pump než pro femoxetin). (Wei a kol., 2004)



Derivát paroxetinu s odstraněným atomem fluoru inhiboval eflux ethidium bromidu skoro stejně jako samotný paroxetin. Fluoridový atom navázaný na aryl tedy není zodpovědný za rozdílnou inhibiční aktivitu paroxetinu a femoxetinu. Za tyto rozdíly zodpovídá N-substituce piperidinového cyklu a schopnost nést kladný náboj. N-acetylované i N-methylované deriváty paroxetinu, které nemohou nést po delší dobu kladný náboj, mají aktivitu přibližně shodnou

s femoxetinem, zejm. pro kmen SA 1199B. Zdá se být pravděpodobné, že nesubstituovaná N-H skupina paroxetinu bude důvodem jejich rozdílné aktivity. Může totiž tvořit vodíkový můstek, který asi sehrává nějakou roli v účinku, nebo je N-substituce méně stericky výhodná. Obdobné výsledky pozorovány i u kmene SA K2068. (Wei a kol., 2004)

Rozdílné substituenty na fenyletherové části molekuly hrají důležitou roli v inhibici efluxních pump pouze pro kmen s non-NorA fenotypem, ale ne pro kmen s NorA proteinem. (Wei a kol., 2004)

Zvýšení protimikrobní aktivity se zdá být výsledkem inhibice efluxní pumpy, jelikož vlastní antistafylokoková aktivita fenylypiperidinových derivátů SSRI je nízká. (Wei a kol., 2004) Pozorování této schopnosti nastává v koncentraci mnohem nižší, než je ta, potřebná k antimikrobnímu působení, a proto se usuzuje, že jde o nezávislé procesy. (Kaatz a kol., 2003)

Identifikace a vývoj bezpečných a účinných inhibitorů bakteriálních efluxních pump je do budoucna nezbytný. (Kaatz a kol., 2003) (Wei a kol., 2004) Bude třeba pokračovat ve zkoumání vztahu strukturních změn a aktivity. Nalezené výsledky by mohly vést k přípravě účinnějších inhibitorů efluxních pump se sníženou CNS aktivitou a látek využitelných v praxi. (Wei a kol., 2004)

***Brucella* spp.**

Brucelóza, intracelulární infekce, je jedním ze zdravotních problémů zejména v určitých oblastech (např. pro Středomořské státy). Ve své práci Muñoz-Bellido a kol., 1996 srovnávali účinek nesteroidních antiflogistik, psychotropních léčiv (mezi nimi i sertralinu) s aktivitou antibiotik streptomycinu, tetracyklinu a rifampicinu proti 62 kmenům *Brucella* spp. *in vitro*.

Sertralin vykazoval nejvyšší aktivitu z testovaných netradičních antibiotik. Rozmezí MIC stanoveno mezi 8-16 μ g/ml. (Citlivost kmenů k ATB vyjádřeno jako rozmezí MIC-streptomycin 0,2-4 μ g/ml, tetracyklin 0,06-0,2 μ g/ml, rifampicin 0,1-2 μ g/ml)

Koncentrace sertralinu v cerebrospinální tekutině se blíží MIC pro kmeny *Brucella* spp. a mohl by být využitelný k léčbě málo častých, ale velice závažných, neurologických komplikací brucelózy. (Muñoz-Criado a kol., 1996)

Enterobakterie-*Proteus* spp.

Proteus spp. (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*) a příbuzné druhy (*Morganella*, *Providencia*) jsou charakterizovány jako Gram negativní oportunní tyčky. Původce litiázy spojené s infekcí močových cest lze jednoduše rozeznat díky plazivému růstu v neselektivním médiu (jako je krevní agar). Jejich skupinový pohyb (přítomnost „bičků“) je spojen s patogenními možnostmi bakterie. Vzestupná urinární infekce spojená s litiázou bývá častěji pozorována u kmenů s tímto fenoménem, také větší invazivita k epitelu močových cest a dále ureázová aktivita. (Muñoz-Criado a kol., 1998)

Sertralin vykazoval malé inhibiční působení na růst bakterií (MIC v rozmezí 64-512 μ g/ml), ale z testovaných sloučenin projevoval nejvyšší aktivitu proti skupinovému pohybu už při koncentraci 32 μ g/ml (pro všechny kmeny).

Velice zajímavé zjištění bylo, že pro všechny kmeny koncentrace potřebná k inhibici skupinového pohybu byla stejná, nezávislá na jednotlivých MIC. (Muñoz-Criado a kol., 1998)

3.5.4 SSRI a *Plasmodium falciparum*

V průběhu jednoho roku se 300 miliónů lidí nakazí malárií, okolo 2 miliónů na toto onemocnění ročně umírá. Rezistence plasmodií na nejběžněji užívané antimalarikum chlorochin je popisována ve většině oblastí s výskytem nákazy. Mechanismus této rezistence je stále neznámý. (Taylor a kol., 2000)

Zprávy o schopnosti některých látek zvrátit rezistenci plasmodií *in vitro* byly zveřejňovány od roku 1987, kdy bylo objeveno první léčivo s touto potenci- verapamil. Chlorochinová rezistence je charakterizována snížením kumulace léčiva v buňce protozoí a zvýšením 50% maximální inhibiční koncentrace (IC50) chlorochinu. (Taylor a kol., 2000)

Příklady dalších látek oslabujících rezistenci plasmodií jsou: blokátory kalciových kanálů – výše zmíněný verapamil, nitrendipin; antidepresiva (tricyklická a nově i SSRI); antihistaminika a antipsychotika. Některé z nich nesou malou vzájemnou strukturální podobnost a také se zdá, že zvyšují prostupnost chlorochinu do rezistentních parazitů, ale žádná z nich nemá vlastní antimalarický účinek. (Taylor a kol., 2000)

Antidepresiva (včetně SSRI- zde zkoumán vliv fluoxetinu) působí díky své schopnosti zvyšovat koncentrace různých neurotransmiterů v synaptické štěrbině, zprostředkované díky ABC (ATP-binding cassette) transportního proteinu na membránách synaptických buněk (u SSRI – SERT). Transportní protein, který se nachází v buněčné membráně plasmodií, patří také do skupiny ABC proteinů (P-glykoprotein- označený Pgh1). (Taylor a kol., 2000)

Zkoušely se antidepresiva s inhibicí zpětného vychytávání různých neurotransmiterů (amitriptilin-pro noradrenalin (NA) a 5-HT; oxaprotilin-mnohonásobně selektivnější k NA; citalopram-5-HT; nomifensin-dopamin). Poslední testovanou látkou byl verapamil (blokátor kalciového kanálu), jehož farmakologický cíl je odlišný oproti antidepresivům.

Cílem této studie bylo stanovit, zda specifita jednotlivých antidepresiv pro neurotransmitery je spojena s jejich schopností zvyšovat akumulaci a citlivost plasmodií k chlorochinu. (Taylor a kol., 2000)

Taylor a kol. (2000) testovali výše jmenované látky na dvou kmenech *P. falciparum* – citlivém kmeni D10 a chlorochin-rezistentním kmeni RSA11.

Sledovali vliv podání léčiv na kumulaci chlorochinu v buňkách plasmodií a také schopnost látek snižovat rezistenci vůči chlorochinu – hodnotu IC_{50} .

Všechna léčiva zvyšovala v průměru asi 4,2 - 4,5krát kumulaci chlorochinu u kmene RSA11 oproti kontrole pouze s chlorochinem. Všechna antidepresiva prokázala schopnost zvrátit rezistenci kmene *P. falciparum* RSA11. Jak se předpokládalo, žádný účinek tohoto typu (zvrát rezistence ani ovlivnění akumulace) nebyl prokázán u citlivého kmene D10.

Pro rezistentní kmen RSA11 posun IC_{50} byl nejpatrnější v případě citalopramu. Původní hodnoty IC_{50} pro samotný chlorochin se pohybovaly kolem 360,7 nM, po přidání citalopramu se snížily na 11,29 nM (pro vyšší koncentraci citalopramu) a 17,3 nM (pro nižší koncentraci antidepresiva).

Některé strukturální aspekty mohou hrát důležitou roli při zvratu rezistence. Např. přítomnost planárního (benzenového) seskupení, sekundární nebo terciární dusík a kationický náboj. Také lipofilita se zdá být důležitá. (Taylor a kol., 2000)

Autoři předpokládají, že vlastnosti, díky kterým SSRI působí zvrát chlorochinové rezistence, přímo nesouvisí se s jejich schopností inhibovat zpětné vychytávání, zejm. s jejich selektivitou. (Taylor a kol., 2000)

Vědci potvrdili roli SSRI ve zvýšení akumulace chlorochinu a přeměně rezistentního plasmodia na citlivé, bohužel zatím jen *in vitro*. Proto je potřeba potvrdit výsledky testy *in vivo* a stanovit využitelnost pro budoucí použití. Naneštěstí v mnoha případech jiných netradičních antibiotik se prokázalo, že tyto poznatky využít nelze, jelikož dávkování by bylo pro pacienty toxické nebo se původně deklarovaný účinek *in vitro*, *in vivo* nepotvrdil (např. desipramin). (Taylor a kol., 2000)

3.5.5 Přímý antifungální účinek SSRI a ovlivnění fyziologie a patogenity mykotických organismů

Antidepresiva třetí generace účinkují proti kvasinkám i aspergilům - na konidie i hyfy. (Lass-Flörl a kol., 2003a) Jak rod *Aspergillus* (Hyphomycetes) tak rod *Candida* (Blastomycetes) patří mezi Fungi Imperfecti (Deuteromycetes). (Buchta a kol., 1998)

Výše zmíněné mykotické organismy způsobují u imunoalterovaných jedinců sekundární (oportunní) mykózy. Pro zdravého, imunokompetentního jedince, nepředstavují oportunní houby reálné nebezpečí. Nejčastěji se s nimi setkáváme jako s nozokomiálními nákazami (hospitalismy), které jsou obtížně diagnostikovatelné, nezdědka vyžadují empirickou antimykotickou terapii a vyznačují se vysokou úmrtností. V našich podmínkách mohou být vyvolávány nejen kandidami a aspergily, ale i kryptokoky a zygomycetami. (Buchta a kol., 1998)

Rod *Candida*

Původci onemocnění kandidózy (kandidiázy) jsou kvasinky rodu *Candida*, nejčastěji (50-90% všech kandidóz) *C. albicans*, dále tzv. non-albicans druhy: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*. (Buchta a kol., 1998)

C. albicans a v menší míře i většina non-albicans kmenů je součástí přirozené mikroflóry člověka, a proto i většina kandidových onemocnění je endogenního původu, i když může nastat i interhumánní přenos kontaktem. (Buchta a kol., 1998)

U predisponovaných a rizikových skupin pacientů (dlouhodobá léčba širokospektrými antibakteriálními antibiotiky, glukokortikoidy, pacienti s krevními malignitami - leukémie, lymfomy; imunosupresivní terapie, chemoterapie, diabetes mellitus, imunodeficience, věk - novorozenci, staří lidé; intravaskulární nebo močová katetrizace, celková parenterální výživa, popáleniny, injekční aplikace drog, endokrinopatie, bakteriální sepse atd.) se může kandidóza projevit jako nespecifické onemocnění, často s velice pestrým klinickým obrazem. (Buchta a kol., 1998) a (Hartl a kol., 2006)

Převládají slizniční formy- orofaryngeální (sór) a vulvovaginální. Dalšími projevy mohou být onychomykóza, keratitida, chronická mukokutánní kandidóza (hlavně u defektů T-buněčné imunity a endokrinopatií), endokarditis, meningitis, osteomyelitis, kandidémie, kandidurie a sepse. (Buchta a kol., 1998)

Terapie závisí na klinické formě infekce a stavu imunity hostitele:

- Lékem volby je u většiny forem flukonazol.
- U kožních a slizničních projevů se osvědčují i další, většinou topické preparáty: imidazolové deriváty (klotrimazol, mikonazol, ekonazol, ketokonazol aj.) a nystatin.
- U systémových onemocnění, hlavně u imunoaterovaných pacientů má přednost razantní léčba systémovými antimykotiky: lékem první volby zůstává flukonazol, alternativou, zvláště při léčbě infekcí způsobených některými rezistentními kmeny kandid (*C. krusei*, *C. glabrata*) je amfotericin B (samostatně nebo v kombinaci s flucytosinem) nebo itrakonazol. (Buchta a kol., 1998)

Působení SSRI na rod *Candida*

Jeden z největších problémů u infekcí způsobených kmeny *Candida* je nárůst rezistence k antimykotickým lékům, zejm. u pacientů chronicky vystaveným protihoubové terapii (pacienti s HIV infekcí). Proto je nezbytné objevovat nová léčiva s potenciálem pomoci v terapii mykóz. (Silvestri a kol., 2004)

Schopnost *Candidy albicans* procházet morfologickými změnami je velice důležitý virulentní faktor. Hyfy zvyšují přilnavost k epitelovým buňkám a napadání tkání s vyšší schopností uvolňovat proteolytické enzymy. (Lass-Flörl a kol., 2003a)

Výrazné rozdíly v nárůstu hyf byly pozorovány na kandidách po expozici SSRI (sertralínu - koncentrace mezi 0,35-0,75µg/ml, tedy velmi blízké koncentracím dosažitelným v tkáních *in vivo*), a to jak u *C. albicans*, tak u non-*albicans* kmenů. (Lass-Flörl a kol., 2003a)

Jejich schopnost inhibice růstu hyfových vláken je pravděpodobně zodpovědná za zlepšení u pacientek s vulvovaginální kandidózou, u kterých se

tato léčiva začala široce uplatňovat. Vulvovaginální kandidóza je slizniční infekce způsobená kmeny *Candida albicans* u 85-90% z celkového počtu nemocných a *Candida glabrata* a *tropicalis* ve zbylých 10-15% případů. (Lass-Flörl a kol., 2001a)

Použitá antimykotická terapie, a to jak lokální tak systémová, při dlouhodobém podávání slábne ve svém účinku. Pokud byla léčba doplněna o SSRI (např. p.o. sertralin, 50mg denně po dobu 5-8 menstruačních cyklů), pacientky neměly opakující se epizody vulvovaginální kandidózy a byly úplně bez klinických příznaků. Až po ukončení podávání antidepresiv nastal relaps. (Lass-Flörl a kol., 2001a)

Proto Lass-Flörl a kol. (2001a) testovali časově a dávkově závislý účinek sertralinu na růst různých kmenů *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) pomocí mikrodiluční metody, směsi pak inkubovali při teplotě 35°C a výsledky odečetli po 48 hodinách. Stanovili minimální fungicidní koncentrace (MFC)-definované jako nejnižší koncentrace léčiva, které zabíjí 99% inokula.

Sertralin vykazoval rychlou fungicidní aktivitu u všech testovaných kmenů hub. MFC v rozmezí 3-29µg/ml pro jednotlivé kmeny *Candida* spp. po 48 hodinové inkubaci. (Lass-Flörl a kol., 2001a)

Nejen morfologická přeměna, ale i produkce některých enzymů je považována za důležitý virulentní faktor kandid.

Lass-Flörl a kol., (2003a) našli efekt sertralinu na produkci SAP (kandidou produkované aspartát proteázy). Isoformy SAP jsou zapojeny do adherence a tak reprezentují jeden z hlavních virulentních faktorů oportunních kvasinek *C.albicans*. Většinu těchto SAP sekretují kvasinky adherované k epitelovým buňkám. Bylo zjištěno, že koncentrace sertralinu nutné k inhibici enzymů jsou skoro o jeden řád nižší než ty, potřebné k zastavení mykotického růstu. Maximální snížení produkce SAP nastalo při koncentraci 118µg/ml antidepresiva, která prakticky neovlivňovala růst kandid. Účinek je pravděpodobně založen na snížení produkce enzymů a pouze částečně se jedná o přímý účinek na SAP. (Lass-Flörl a kol., 2003a)

Podobný pokus provedli Lass-Flörl a kol., (2003b) se samostatným serotoninem. Zkoumali vliv 5-HT na růst a morfologii *Candida* spp. Jak víme, tato léčiva zvyšují koncentraci serotoninu, který sám nese významnou antimykotickou aktivitu. (Lass-Flörl a kol., 2003b)

Serotonin účinkuje na své receptory, jejichž různé podtypy jsou v organismu široce zastoupeny. Ke zjištění, které z těchto receptorů mohou způsobovat protimykotickou aktivitu, zkoumali vědci dostupné antagonisty 5-HT receptorů *in vitro*. Risperidon (5-HT_{2A}), cyproheptadin (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}) a tropisetron (5-HT₃). Způsob účinku je ale stále nejasný, neboť testování antagonisté serotoninových receptorů neovlivňovali *in vitro* výsledky. (Lass-Flörl a kol., 2002)

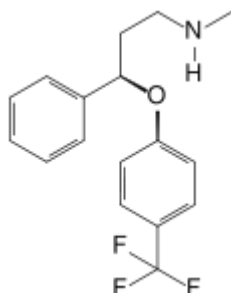
Změny v nárůstu kmenů *Candida* spp. závisely na koncentraci a době inkubace. A přestože fungicidní účinek je pozorován až u vyšší koncentrace 5-HT, imunomodulační a různé účinky ovlivňující virulenci mykotických organismů nastávají již při nižších koncentracích a jsou zaznamenávány u pacientů *in vivo*. Nakonec může při léčbě pacienta SSRI vymizet virulence kmenů *Candida* spp. úplně nebo alespoň částečně. (Lass-Flörl a kol., 2003b)

Imidazolové analogy fluoxetinu jako nová skupina protikvasinkových léčiv - *Candida* spp.

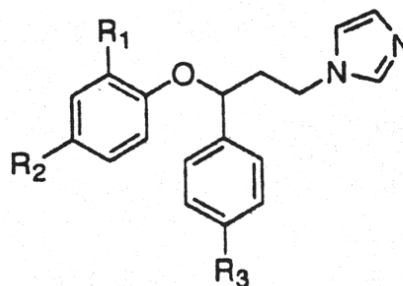
Náhradou koncové methylamino- skupiny u předlokové látky fluoxetinu za imidazolový kruh došlo k výraznému zvýšení protikandidové účinnosti. Další substitucí základní struktury (nikoliv imidazolového kruhu) byly získány vysoce aktivní sloučeniny, dokonce s aktivitou vyšší než u mikonazolu a dalších antimykotických látek. (Silvestri a kol., 2004)

Nejvýhodnější se ukázala být trisubstituce atomem chlóru, sloučenina je asi dvakrát aktivnější (MFC 1 – 8 μ g/ml) a mnohem méně toxická než mikonazol (MFC 4 – 32 μ g/ml).

Výhodnost substituce obecně klesala v pořadí:



fluoxetin



imidazolový analog fluoxetinu

Tato studie naznačuje, že SSRI a jejich analogy mohou být nadějí a příslibem pro nalezení nových antimykotických, popřípadě antimikrobiálních látek. Detailnější prozkoumání vztahu struktura - účinek a ověření jejich aktivity *in vivo* je však nezbytné.

***Aspergillus* spp. (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*)**

Vláknité hyfomycety rodu *Aspergillus* jsou původci alergických a infekčních onemocnění jako výsledek expozice (inhalace, u kutánních forem kontakt) vnímavého hostitele spórami, přičemž kontaminace vzduchu vyšším počtem spór (ventilace, stavební práce) je významný rizikový faktorem. (Buchta a kol., 1998)

U imunokompetentních hostitelů se nejčastěji setkáváme s alergickými projevy: astma a alergická bronchopulmonální aspergilóza, dále s onychomykózou a otomykózou. U traumatizovaných a oslabených jedinců mohou způsobit pulmonální aspergilózu, vzácněji aspergilom, primární kutánní aspergilózu, keratitis, endokarditis, atd. (Buchta a kol., 1998)

Lékem volby u závažných forem je amfotericin B (AMB) (samostatný nebo v kombinaci s flucytosinem, popř. chirurgickým zákrokem), alternativou je itraconazol. Alergické projevy se léčí kortikosteroidy (prednison). (Buchta a kol., 1998) Klinická účinnost léčby AMB invazivní aspergilózy se pohybuje pod 60%. (Te Dorsthorst a kol., 2002)

Úmrtnost na invazivní infekce způsobené *Aspergillus* spp. je stále vysoká. Za hlavní důvody se považuje těžká diagnostikovatelnost těchto infekcí, refrakterní přetrvávající onemocnění a omezená účinnost antifungálních látek. (Te Dorsthorst a kol., 2002)

Lass-Flörl a kol. zkoumali fungicidní aktivitu SSRI proti *Aspergillus* spp. (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*) a *Candida parapsilosis*. Testovanými látkami byly m.j. citalopram, paroxetin, fluoxetin a sertralin. Ve studii byly použity i další druhy SSRI, seroxate a reboxetin. Účinek byl sledován pomocí bujónového mikrodilučního testu a vyjádřen hodnotami MFC. Vědci také sledovali tzv. post-antibiotický efekt SSRI u konidií a hyf *Aspergillus* spp. (Lass-Flörl a kol., 2001b)

Sertralin, následovaný fluoxetinem a paroxetinem, byl nejúčinnější látkou *in vitro* proti hyfám (MFC 3-59 μ g/ml) i konidiím (MFC 3-237 μ g/ml) *Aspergillus* spp. po 48 hodinové inkubaci. MFC pro *C. parapsilosis* byla 29-59 μ g/ml. Ostatní SSRI vykazovaly řádově podobnou aktivitu, ačkoliv se pohybovaly ve vyšších hodnotách než sertralin. Rozdíl mezi hodnotami MFC po inkubaci 24 nebo 48 hodin nebyl významný. (Lass-Flörl a kol., 2001b)

Post-antibiotický efekt SSRI byl sledován při MFC koncentracích, stanovených v předchozí části experimentu (MFC po 48-mi hodinách) a nižších. Konidie byly vystaveny působení SSRI po 4 hodiny a pozastavení jejich růstu u některých izolovaných kmenů dosahovalo 8 až 24 hodin. Sertralin byl opět nejúčinnější látkou, ale nevykazoval pozastavení nárůstu po 1 hodinovém působení jako některé jiné zkoumané látky (fluoxetin, paroxetin, reboxetin a citalopram). Rozsah tohoto účinku závisí tedy na koncentraci a době inkubace. Maximálního opoždění nárůstu bylo dosaženo při použití koncentrací podobných MFC, ale zároveň expozicí kratší, než je potřebná doba k usmrcení mykotických organismů. (Lass-Flörl a kol., 2001b)

Látky na kmeny aspergilů působí ve 2 krocích, nejprve dochází k reverzibilním účinkům a až po prodloužení doby inkubace dochází k ireverzibilním změnám vedoucím ke ztrátě životaschopnosti. (Lass-Flörl a kol., 2001b)

In vitro MFC jsou stále nad dosažitelnými hladinami SSRI *in vivo*. Mohou však postačovat k ovlivnění virulentních faktorů a patogenity hub. Plazmatické koncentrace SSRI se však mohou v některých případech MFC přiblížit, např. kumulace v mozkové tkáni. Nadějí pro terapeutické využití SSRI jako antimykotických látek může být také jejich lokální aplikace. (Lass-Flörl a kol., 2001b)

Je potřeba ověření výsledků pokusy na zvířecích modelech. Identifikace mechanismu účinku by mohla pomoci při výzkumu a vývoji nových protimikrobních látek. (Lass-Flörl a kol., 2001b)

Podobný pokus provedli Lass-Flörl a kol. (2002) se samotným serotoninem. 5-HT ničí buněčné stěny hyf *Aspergillus fumigatus* a usmrcuje tento houbový organismus. Předpokládá se přímý účinek serotoninu na mykotické kmeny a nepřímý pomocí zvýšení imunitních reakcí.

Opět v jiné studii potvrdili Heller a kol., (2004) vliv přímo serotoninu na kmeny *Aspergillus* spp. (pro srovnání použity také kmeny *C. albicans* a *C. parapsilosis*). Zjištění, že serotonin narušuje membrány buněk, vedlo ke spekulaci, že by mohl zvýšit účinek AMB. Vědci potvrdili hypotézu, když našli potenciaci v účinku (vzájemný synergní efekt) kombinace 5-HT s AMB u

100% zkoumaných kmenů *Aspergillus* spp. (50% silný synergní efekt, 50% slabší synergní efekt) pomocí metody checkerboard. (Heller a kol., 2004)

Výsledky hodnoceny pomocí indexu FIC (frakční inhibiční koncentrace) - počítán jako suma jednotlivých FIC pro každou látku. (Heller a kol., 2004) (Tento způsob hodnocení použit i v naší diplomové práci, takže bude důkladněji vysvětlen v části experimentální).

Předpokládá se, že za synergní efekt ($FIC < 1$) zodpovídá zvýšení průniku antifungální látky do buňky následně po účinku serotoninu. (Heller a kol., 2004)

Dále studovali kombinaci 5-HT nebo sertralinu s AMB nebo itrakonazolem (ITRA). Serotonin vykazoval v kombinaci s AMB nebo ITRA antagonismus ($FIC > 2$) u kmene *C. parapsilosis*, ale kombinace sertralinu s AMB nebo s ITRA byla pro tento kmen indiferentní ($FIC = 1-2$). U dalších kmenů zaznamenány velké rozdíly v působení od synergismu a adice ($FIC = 1$), přes indiferenci, až po antagonismus.

Nejnižší FIC vykazovaly kmeny *Aspergillus fumigatus*, u některých stanovili silný synergní efekt kombinace AMB s 5-HT. Ostatní kombinace se pohybovaly v rozmezí pro slabý synergismus nebo indiferenci. Při kombinaci sertralinu s ITRA jeden kmen *A. fumigatus* vykazoval antagonismus. (Heller a kol., 2004)

Pravděpodobný mechanismus antibakteriálního a antifungálního účinku SSRI

SSRI ovlivňují zpětné vychytávání serotoninu v synaptické štěrbině nervové buňky člověka, analogicky se předpokládá, že ovlivňují činnost bakteriální membrány, zejména vypuzení - eflux látek z bakterie. Mohou působit jako inhibitory pump přenášejících molekuly léčiv vně z bakteriální buňky. Tato hypotéza sice může vysvětlovat jejich synergické působení při kombinaci s antibiotiky, stěží však jejich vlastní antimikrobiální aktivitu. (Muñoz-Bellido a kol., 2000)

Zjištění, že SSRI poškozují množství procesů probíhajících v buňkách bakterií, např. syntéza slizu a skupinový pohyb *Proteus* spp., nás mohou vézt k úvaze, že tato léčiva působí na úrovni metabolických procesů bakterií (Muñoz-Bellido a kol., 2000).

V úvahu připadá i nepřímé působení SSRI prostřednictvím aktivace imunitního systému (Lieb, 2004) a zvýšení hladiny serotoninu v organismu (Lass-Flörl a kol., 2003b).

Mechanismus, kterým působí SSRI na růst a morfologii hub není rovněž přesně znám. Předpokládá se, že antifungální aktivita je výsledkem interakce antidepresiva s transportním systémem mykotické membrány, to se ale zatím nepodařilo vyvrátit ani potvrdit. (Lass-Flörl a kol., 2003a)

Young a kol. (2003) nesdílejí výše zmíněný názor. SSRI totiž inhibují Na⁺ závislý serotoninový transportér (SERT). Velice zajímavé je, že houby nemají obdobu tohoto proteinu. Podle týmu vědců jejich účinek tedy pravděpodobně není spojen s ovlivněním původního farmakologického cíle. (Young a kol., 2003)

Lipofilita hraje důležitou roli v antifungálním účinku. Čím vyšší stupeň lipofility tím je sloučenina aktivnější, navíc ve vysokých koncentracích působí cytotoxicky. Předpokládá se, že toxicita, mnohem pravděpodobněji než specifický inhibiční mechanismus, řídí jejich antimykotický účinek. Aby potvrdili tuto domněnku, Young a kol. (2003) zkoumali cytotoxickou aktivitu jednotlivých sloučenin SSRI. Nechali je působit po dobu 72 hodin na buňky HeLa (human epithelial cell line). Všechny látky se ukázaly cytotoxické v koncentracích nižších než MIC. V souladu s původními hypotézami, pozorovali dobrou korelaci

mezi nalezenými CC_{50} (poloviční maximální cytotoxickou koncentrací) SSRI a jejich protifungální aktivitou. Nejvíce cytotoxické sloučeniny vykazovaly nejlepší protihoubový účinek. Podobnost CC_{50} sertralinu, jeho enantiomeru a dvou diastereoizomerů, odrážející jejich podobné antifungální vlastnosti, vedl opět k podpoře hypotézy nspecifického (spíše toxického) mechanismu účinku spojeného s jejich lipofilitou. Stanovili tedy, že v koncentracích vyžadovaných pro antifungální působení jsou toxické pro lidské buňky. (Young a kol., 2003)

Kolektiv těchto vědců se domnívá, že SSRI nejsou vhodnými léčebnými látkami oportunních mykotických infekcí a ani nepředstavují nadějnou skupinu léčiv pro hledání a vývoj nových, potenciálně účinných antimykotických preparátů se specifickým mechanismem účinku. Takže nejspíše nebudou využity v praxi. (Young a kol., 2003)

3.6 Antimykotika

V naší práci velice důležitou skupinou léčiv jsou právě antifungální látky. Proto bych si dovolila je alespoň částečně uvést, popsat jejich účinek a mechanismus působení nejprve obecně a následně se zaměřením na námi použité sloučeniny.

3.6.1 Obecná charakteristika

Antifungální látky specificky působí na houbové organismy (kvasinky a vláknité houby), interferují s cílovými strukturami houbové buňky, což vede buď k inhibici jejího růstu (fungistatický účinek) nebo k její smrti (fungicidní) účinek. Prakticky jedinými antimykotiky s fungicidním účinkem jsou polyenová ATB (amfotericin B) a u topických preparátů má podobné parametry u části druhového spektra také terbinafin. (Hartl a kol., 2006)

Podle mechanismu účinku můžeme rozdělit antifungální látky na:

- Inhibitory syntézy ergosterolu
- Inhibitory syntézy buněčné stěny
- Inhibitory na úrovni jádra
- Ostatní inhibitory (Hartl a kol., 2006)

V klinické praxi našly uplatnění převážně látky působící na ergosterol, nezbytnou komponentu plazmatické membrány hub. Biosyntetická dráha ergosterolu se velice podobná syntéze cholesterolu u savců. Ergosterol je základní složkou plazmalemy (plazmatické membrány), která prostřednictvím fluidity membrány ovlivňuje její funkčnost. Existují dvě hlavní skupiny látek působící na ergosterol:

- Polyeny - vážou se na ergosterol z vnějšku
- Azolové, allylaminové a morfolinové deriváty, thiokarbamáty- vstupují do buňky a interferují s enzymy ergosterolové dráhy. (Hartl a kol., 2006)

Výsledkem je změna složení plazmatické membrány, kde je ergosterol neadekvátně nahrazen jiným steroidem, a tím poškozena její funkčnost, včetně enzymové aktivity na ní vázané (např. chitinsynthasa). To se projeví

zpomalením až zástavou růstu buňky a může vést i k její smrti. V případě amfotericinu B se jeho navázáním na ergosterol tvoří póry, které jsou následně odpovědné za nekontrolovatelný únik elektrolytů, iontů a malých molekul a ireverzibilní změny vedoucí ke smrti houbové buňky. (Hartl a kol., 2006)

Fungální buněčná stěna je ideálním místem účinku pro vývoj a výzkum nových antifungálních látek. Několik enzymů, které se podílejí na biosyntéze buněčné stěny jsou specifické pouze pro houby a nevyskytují se v savčích buňkách. Z tohoto hlediska jsou vhodnými místy zásahu pro antimykotika. Jedná se zejména o enzymy nezbytné pro syntézu chitinu a glukanu. (Hartl a kol., 2006)

3.6.2 Antimykotická antibiotika

Látky produkované bakteriemi nebo houbami, které jsou schopny zastavit nebo tlumit růst jiných mikroorganismů, popř. i hub. (Hartl a kol., 2006)

➤ **Polyenová antibiotika-** antifungálně aktivní makrolidy

s charakteristickým 26-40ti členným makrocyclickým laktonovým kruhem. Mají fungicidní vlastnosti a nejširší spektrum účinnosti z používaných látek, zatímco antibakteriální účinek je zanedbatelný. Po perorální aplikaci se nevstřebávají a po parenterálním podání jsou značně toxická (poruchy funkce jater a ledvin, anémie, alergie). Systémově se používá pouze amfotericin B ve formě koloidní suspenze s deoxycholovou kyselinou nebo sulfátovaným cholesterolem, které plní funkci solubilizátorů. Pro nystatin a natamycin je z důvodu jejich vysoké toxicity vyhrazeno pouze lokální použití. Nověji se upravují do lipozomálních lékových forem nebo komplexů s lipidy, které se vyznačují vyšší tolerancí a nižším výskytem nežádoucích účinků. Podle počtu konjugovaných dvojných vazeb je dále dělíme:

- Tetraeny (nystatin a natamycin)
- Pentaeny
- Hexaeny
- Heptaeny (amfotericin B) (Hartl a kol., 2006)

- **Griseofulvin**-mechanismus účinku této látky pravděpodobně spočívá v inhibici biosyntézy chitinu, RNA a bílkovin. Používá se prakticky jen proti původcům dermatofytóz, zevně či perorálně, v mikronizované podobě a akumuluje se v keratinizovaných tkáních. (Hartl a kol., 2006)

3.6.3 Azolové deriváty:

Antifungálně účinné látky obsahující jeden nebo dva heterocykly. Heterocykl musí obsahovat atomy dusíku v poloze 3 nebo 4, které se účastní vazby na atom železa obsažený v enzymu syntézy ergosterolu, čímž inhibují jeho syntézu ve fázi demethylace. Nevýhodou je, že mohou ovlivňovat i savčí cytochrom P-450, to může vést k ovlivnění endokrinního systému (pokles hladiny testosteronu a glukokortikoidů). Další nevýhoda azolů spočívá ve vzniku rezistence při dlouhodobém podávání, která může být způsobena nadprodukcí původně inhibovaného enzymu. (Hartl a kol., 2006)

Podle centrálního pětičlenného heterocyklu je dělíme na:

- **Imidazoly**- mikonazol, ekonazol, isokonazol, tiokonazol, sertakonazol, sulkonazol, omokonazol, ketokonazol, krokonazol, lanokonazol a další.
- **Triazoly**- terkonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol. (Hartl a kol., 2006)

3.6.4 Allylaminy

Totálně syntetické látky, inhibitory skvalenepoxidasy, používané zejm. na infekce kůže a nehtů.

- Naftifin
- Terbinafin
- Butenafin (Hartl a kol., 2006)

3.6.5 Thiokarbamáty

Topická antimykotika (zejm. onychomykózy a mykózy vlasů), inhibitory skvalenepoxidasy.

- Tolnaftát
- Tolciclát
- Liranaftát (Hartl a kol., 2006)

3.6.6 Ostatní antimykotika

- Ciklopirox
- Amorolfín
- Flucytosin (Hartl a kol., 2006)

Mezi léčiva nových struktur patří:

echinikandiny, pneumokandiny a papulakandiny. Tyto látky nekompetitivně inhibují syntézu β -(1,3)-glukanů. A jelikož glukany tvoří hlavní součást houbové buněčné stěny, inhibice jejich syntézy vede k poruchám funkce této organely.

- Kaspofungin (Hartl a kol., 2006)

3.6.7 Použitá antimykotika pro metodu checkerboard

- **Amfotericin B (AMB)** - po p.o. podání se nevstřebává, vysoce se váže na plazmatické bílkoviny a jeho distribuční prostor je obrovský, což souvisí rovněž s vysokou vazbou na membránové struktury (cholesterol). Špatně proniká do hůře prokrvených tkání a tělesných tekutin, nejvyšší koncentrace dosahuje v játrech a slezině (přibližně 40% dávky), v tělesných tekutinách jsou koncentrace poloviční proti plazmě. Nízkých koncentrací dosahuje v bronchiálním sekretu, koncentrace v moči a mozkomíšním moku jsou prakticky nulové. Metabolity nejsou známy, vylučování se předpokládá pomalé přes biliární systém do stolice. Může existovat zkřížená rezistence s ostatními polyenovými antimykotiky. Nežádoucí účinky jsou jak akutní (horečka, třesavka, nauzea, alergické-anafylaktické reakce, atd.), tak chronické (projevy nefrotoxicity, neurotoxicity a anémie). (Lincová a Fargahali, 2002)

Synergismus s flucytosinem umožňuje snižovat dávky amfotericinu B při léčbě aspergilózy, těžkých forem kandidózy, kryptokokózy. V případě aspergilózy lze použít i trojkombinaci s tetracyklinem a rifampicinem. Kombinace s azolovými antimykotiky se obecně nedoporučuje (*in vitro* převážně antagonismus účinku). (Lincová a Fargahali, 2002)

AMB se terapeuticky používá u nemocných s mykotickými infekcemi, jestliže vyvolávající agens je citlivé na jeho účinky a infekce je progresivní, potenciálně život ohrožující. Profylakticky se podává nemocným převážně po protinádorové léčbě, po transplantaci orgánů-jater, srdce, ledvin a kostní dřeně; s horečkami a granulocytopenií, kteří jsou léčeni širokospektrými antibiotiky. Může se podávat i intravenózně, ale i celou řadou dalších aplikačních cest (do tělních dutin, endobronchiálně, aj.). (Lincová a Fargahali, 2002)

- **Flukonazol (FLZ)** - je novější systémové triazolové antimykotikum vhodné pro systémové parenterální i perorální podání. Od ostatních azolových derivátů se liší farmakokinetikou (je hydrofilní), má nejvyšší

terapeutický index (poměr mezi dávkou letální nebo toxickou a efektivní, vyjadřuje poměr mezi účinností a bezpečností podávané látky. Čím je uvedený poměr vyšší, tím vyšší je bezpečnost látky.), tzn. má nejméně nežádoucích účinků a lékových interakcí. (Lincová a Fargahali, 2002)

Inhibicí syntézy buněčné stěny omezuje kolonizaci sliznic a adhezi kandid na endotel a umělé povrchy (katetry, chlopenní a kloubní náhrady, apod.). Antimikrobní spektrum (*Candida* spp., ale primárně rezistentní je *C. krusei*, získaná rezistence nalézána u *C. glabrata*.; *Cryptococcus* spp., dermatofyty-*Microsporum* spp., *Trichophyton* spp.; *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsularum* a další. (Lincová a Fargahali, 2002)

Po p.o. podání se rychle a téměř úplně vstřebává, takže koncentrace jsou podobné po p.o. i nitrožilním způsobu aplikace. Vazba na plazmatické bílkoviny je nízká, dobře proniká do všech tělních tekutin včetně likvoru, placenty a mateřského mléka. V moči a kůži jsou jeho koncentrace 10krát vyšší, 2-3krát vyšší ve fagocytujících buňkách; v kůži a nehtech tvoří dlouhodobý depot. Z 80% vylučován ledvinami v nezměněné formě. (Lincová a Fargahali, 2002)

Nežádoucí účinky jsou většinou nezávažné dyspeptické obtíže, dále bolesti hlavy a kožní projevy. Vzácně může dojít k závažnému toxickému poškození jaterní buňky s rizikem letálního zakončení, a to nezávisle na dávce. (Lincová a Fargahali, 2002)

Interakce jsou četné: zvýšení účinku současně podávaných léků s nutností redukce jejich dávky dochází u derivátů sulfonylurey, warfarinu, midazolamu, aj.

Snížení účinku flukonazolu nastává při současném podávání rifampicinu. Synergický účinek vykazuje s flucytosinem a mikonazolem, převážně antagonistický s amfotericinem B (ale u některých kmenů došlo i k synergickému účinku, takže nutnost opatrného hodnocení). Používá se k léčbě i k profylaxi u rizikových pacientů (dospělých i dětí). (Lincová a Fargahali, 2002)

- **Flucytosin (5-fluorcytosin) (5FC)**-fluorpyrimidinový derivát, který byl původně vyvinut jako antineoplastikum antimetabolitového typu. Později se zjistilo, že neúčinkuje na nádorové buňky, ale inhibuje citlivé kmeny *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium* a *Cryptococcus*; proti aspergilům účinný pouze v kombinaci. Dnes má výhradní použití jako perorální a parenterální antimykotikum, může však být využito též jako topické léčivo. (Lincová a Fargahali, 2002)

Mechanismus účinku spočívá v antimetabolitovém působení, tzn. že je do mRNA a tRNA vestavěný falešný (fluorovaný) stavební kámen (po deaminaci vzniká z 5-fluorcytosinu vzniká toxický 5-fluoruracil). Malé procento 5-fluorcytosinu je činností střevních bakterií konvertováno na 5-fluoruracil, který po resorpci může způsobovat myelotoxicitu.

Nutnost intracelulární deaminace je příčinou úzkého spektra, blokáda transportu a několikastupňového procesu intracelulární konverze v účinné léčivo jsou příčinami vysokého výskytu sekundární rezistence.

Ačkoli flucytosin působí fungicidně, má poměrně úzké spektrum účinku a rychle se k němu vyvíjí rezistence. Tyto nevýhody lze zčásti odstranit kombinací látky s amfotericinem B. (Hartl a kol., 2006) V terapeutických dávkách působí fungistaticky, v nižších blokuje adhezivní schopnost kandid k sliznicím. Flucytosin je hydrofilní, méně než 10% se váže na plazmatické bílkoviny, proniká do všech tkání včetně likvoru, placenty a předpokládá se, že i do mateřského mléka. Vylučuje se prakticky úplně do moči, kde jsou jeho koncentrace 100krát vyšší než v plazmě. Z nežádoucích účinků je nejvýznamnější granulocytopenie. V monoterapii je indikován jen výjimečně ke krátkodobé léčbě mykotických infekcí močových cest. V kombinaci (s amfotericinem B nebo azolovými deriváty) se používá k terapii orgánových kandidóz, kryptokokózy (i nitrolební) a blastomykózy. Závažné lékové interakce nejsou známy, toxicitu zvyšují všechny látky omezující jeho renální vylučování. (Lincová a Fargahali, 2002)

Klinicky významná je jeho synergní interakce s amfotericinem B a azolovými antimykotiky (ketokonazol, mikonazol, itrakonazol, flukonazol). (Lincová a Fargahali, 2002)

4 Experimentální část

4.1 STANOVENÍ CITLIVOSTI MYKOTICKÝCH ORGANISMŮ K SSRI

4.1.1 MATERIÁL

POUŽITÉ KMENY MYKOTICKÝCH ORGANISMŮ

Candida albicans ATCC 44859

Candida albicans ATCC 90028

Candida albicans 8797/03 RVVK

Candida albicans 26508/03 RVVK

Candida albicans 26736

Candida albicans 25188/97

Candida albicans 750

Candida albicans CM8215

Candida glabrata 20/l.

Candida krusei ATCC 6258

Candida krusei E 28

Candida lusitaniae 2446/l.

Candida parapsilosis ATCC 22019

Candida tropicalis 156

Saccharomyces cerevisiae 7802/03

Trichosporon beigelii 1188

POMŮCKY

laminární box

skleněné a plastové sterilní zkumavky, Erlenmeyerovy baňky

analytické váhy, automatické pipety

speciální vanička pro naředění látek

mikrotitrační destičky

mikrobiologický inkubátor Binder

LÉČIVA, ROZTOKY, MÉDIA

paroxetin (Pliva – Lachema a.s., Brno)

fluoxetin (Zentiva a.s., Praha)

dimethylsulfoxid (DMSO)

destilovaná voda

testovací médium RPMI a MOPS

hydroxid sodný

(suspenze mikroorganismů – viz. výše)

4.1.2 PRACOVNÍ POSTUP

Příprava roztoků zkoumaných látek:

Základní roztoky paroxetinu a fluoxetinu jsme připravili rozpuštěním navážky 50,0mg v 1ml DMSO. Výsledná koncentrace roztoku byla 50,0mg/ml.

Příprava média:

Navážili jsme 34,5g sodné soli morfolinosulfonové kyseliny (MOPS) a rozpustili v 1000ml destilované vody. Potřebné množství nechali vysterilizovat v parním autoklávu při teplotě 121°C po dobu 15 minut.

RPMI médium (Roswell Park Memorial Institute médium 1640) je k dispozici v 5-ti násobné koncentraci než je zapotřebí, proto bylo před vlastním pokusem naředěno na požadovanou koncentraci a to tímto způsobem: ke 4 objemovým dílům sterilního roztoku MOPS jsme přidali 1 objemový díl sterilního kultivačního média RPMI. Dále zneutralizovali na pH okolo 7 roztokem hydroxidu sodného.

Vlastní postup experimentu:

Připravili jsem si řadu 11 zkumavek pro každou z látek (paroxetin i fluoxetin). První zkumavka obsahovala vždy neředěný základní roztok léčiva (příprava viz výše). Do dalších zkumavek jsme nanесли po 0,5ml DMSO a postupným geometrickým ředěním si připravili klesající řadu koncentrací daného léčiva. A to tak, že k připraveným 0,5ml DMSO jsme automatickou pipetou přidávali vždy z předchozí zkumavky po 0,5ml roztoku léčiva.

Dále jsme potřebovali speciální vaničku - pro každou látku jednu. Do této vaničky se 12 oddělenými prostory jsme napipetovali 1,980ml média do každého z nich. Přidali do posledního dvanáctého prostoru 20 μ l DMSO, tento prostor pouze s rozpouštědlem účinné látky slouží jako kontrola. Bylo nezbytně nutné, aby výsledný roztok obsahoval maximálně 1% DMSO, jelikož je sám nositelem antimikrobního (v našem případě antimykotického) účinku. Proto roztoky obsahující vyšší než 1% koncentraci DMSO by pokus mohly zatížit chybou, zjištěný protimikrobní (protimykotický) účinek by mohl být způsoben právě touto látkou.

Dále jsme postupně od jedenáctého prostoru až k prvnímu přidávali po 20 μ l naředěného léčiva tak, aby v 1.prostoru byla koncentrace nejvyšší. Pomocí multipipety jsme z těchto připravených roztoků přenesli 200 μ l do mikrotitrační destičky, tak aby koncentrace klesala v řadě a ve sloupci byla stejná. Dvanáctý sloupec sloužil jako kontrola.

Pro každou z látek byla zapotřebí samostatná mikrotitrační destička.

Po tomto naředění byla koncentrace v 1. jamce 500 μ g/ml a dále vždy o polovinu klesající. Viz Tabulka 2: Přibližné výsledné koncentrace antidepresiv v mikrotitrační destičce

Tabulka 2: Přibližné výsledné koncentrace antidepresiv v mikrotitrační destičce [μ g/ml]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K
A	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0
B	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0
C	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0
D	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0
E	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0
F	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0
G	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0
H	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	2	1	0,5	0

Do každé jamky v jedné řadě jsme inokulovali 10 μ l suspenze mikroorganismů. Tudíž jsme připravili mikrotitrační destičku s osmi různými kmeny v osmi řadách (A-H).

Nechali jsme inkubovat 48 hodin při teplotě 35°C a vyhodnotili. Předběžný odečet nárůstu byl stanovován po 24 hodinách.

Výsledky jsme vyjádřili pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC) a sloužily k výběru vhodných kmenů pro metodu checkerboard.

Viz. Tabulka 3: Stanovení citlivosti mykotických organismů pro jednotlivé SSRI

4.2 METODA CHECKERBOARD

Tato metoda se zabývá testováním kombinovaného účinku dvou léčiv. V našem případě antidepresiv paroxetinu nebo fluoxetinu s antimykoticky účinnou látkou (amfotericinem B, flukonazolem či flucyctosinem).

Existují čtyři základní výsledky kombinace dvou léčiv:

- **synergismus**- je nejideálnější výsledek, neboť dochází ke vzrůstu účinku a to nad pouhý součet samostatných účinků léčiv
- **adice**- je opět výhodným jevem, dochází při ní právě k součtu účinků léčiv
- **indiference**- v podstatě znamená, že dané dvě látky se více méně navzájem neovlivňují
- **antagonismus**- je charakterizován jako nevýhodný jev, znamenající snížení účinku léčiv při jejich vzájemné kombinaci.

Z výše deklarovaného je patrné, že při farmakoterapii se snažíme dosáhnout prvních dvou jevů, aby tato kombinace znamenala nějaký přínos. Při dosažení antagonismu je zjištění pro praxi rovněž důležité, neboť se můžeme vyvarovat této nevýhodné kombinaci.

Pro metodu checkerboard jsme použili:

4.2.1 MATERIÁL

POUŽITÉ KMENY MYKOTICKÝCH ORGANISMŮ

Pomocí stanovení citlivosti na SSRI vybrány tyto kmeny:

Candida albicans ATCC 90028

Candida albicans 8797/03 RVVK

Saccharomyces cerevisiae 7802/03

Dále přidány 3 kmeny auxotrofní:

Candida albicans SC 5 314 (CA-SC)

Candida albicans BWP 17 (CA-BWP)

Candida albicans BWOZ 13-81 (CA-BWOZ)

V kombinaci s flukonazolem testovány i flukonazol rezistentní kmeny:

Candida albicans 20 25 346/00

Candida albicans 26 26 450/00

Candida glabrata 7248/02

Candida krusei 7698/02

Candida krusei 1 ATCC 6258

Candida norvegensis 4 26 389II/00

POMŮCKY

Viz. Kapitola Stanovení citlivosti mykotických organismů na SSRI

LÉČIVA, ROZTOKY, MÉDIA

Viz. Kapitola Stanovení citlivosti mykotických organismů na SSRI

amfotericin B (AMB)

flukonazol (FLZ)

flucytosin (5FC)

uridin

4.2.2 PRACOVNÍ POSTUP

Pro tuto metodu platí velmi důležité specifikum, které je nutno mít neustále na paměti. Při přípravě mikrotitrační destičky se vzájemně obě látky ředí v poměru 50:50, tudíž je potřeba si na samém počátku připravit dvojnásobně vyšší koncentrace obou látek tak, aby výsledné zředěné koncentrace odpovídaly našim požadavkům.

Příprava roztoků zkoumaných látek:

Základní roztoky paroxetinu a fluoxetinu jsme připravili rozpuštěním 51,2mg navážky v 0,5ml DMSO. Výsledná koncentrace roztoku byla 102,4mg/ml.

Příprava roztoků antimykoticky účinných látek:

- Amfotericin B - rozpuštění navážky ve vypočteném množství DMSO v 1. zkumavce, dále se v ostatních zkumavkách opět sestupné geometrické ředění stejným dílem rozpouštědla (DMSO) a roztokem léčiva z předchozí zkumavky. Takto se připraví celkově 10 koncentrací.
- Flukonazol a flucytosin - navážku jsme přímo rozpouštěli ve zkumavce v médiu RPMI+MOPS a určitá část s přesnou koncentrací se přenesla do 1. Erlenmeyerovy baňky. Tam se naředila do požadovaného objemu, proběhlo opět dvojkové ředění v ostatních Erlenmeyerových baňkách na celkových 10 sestupných koncentrací.

Příprava média:

Stejná jako v předchozím experimentu.

Jestliže byl testován auxotrofní kmen, do média jsme navíc přidávali vypočtené množství uridinu, jelikož jejich růst je na něm závislý.

Vlastní postup experimentu:

Obdobně jako u předchozího postupu jsme si připravili speciální vaničky a odebrali určitou část připravených základních roztoků a přidali do stanoveného potřebného množství média. Poté jsme rozpipetovali tyto roztoky do mikrotitračních destiček. Do každé jamky jsme dali po 100 μ l od obou léčiv, čímž jsme získali žádaný objem 200 μ l v každé jamce a roztoky se navzájem zředily

na požadovanou koncentraci. V našem případě vždy v řadě klesala koncentrace antimykotika a ve sloupci koncentrace antidepresiva.

Výsledné koncentrace viz. Mikrotitrační destička 1 až 5

Jamka H 11 a tmavší značené jamky jsou kontroly. První trojce jamek ve sloupci K (jamky A, B a C) byly kontroly média společně s příslušným vypočteným množstvím DMSO a jamky E, F a G obsahovaly médium samotné. Kontrolní roztoky s DMSO jsme připravovali vždy s ohledem na koncentraci rozpouštědla ve výsledné destičce. V případě kontroly s AMB, který se rovněž rozpouští v DMSO, bylo množství přidaného DMSO vyšší než pro FLZ a 5FC. Na takto připravené mikrotitrační destičky obsahující kombinaci jednoho antimykotika s jedním antidepresivem jsme pak inokulovali suspenzi mikroorganismu. Vždy pouze jeden kmen na celou destičku.

Mikrotitrační destička 1: Rozmístění konečných koncentrací při kombinaci **amfotericinu B** s SSRI po naředění

Výsledná koncentrace SSRI [$\mu\text{g/ml}$]

Výsledná koncentrace AMB [$\mu\text{g/ml}$]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K
A	512 16	512 8	512 4	512 2	512 1	512 0,5	512 0,25	512 0,12	512 0,06	512 0,03	512 0	
B	256 16	256 8	256 4	256 2	256 1	256 0,5	256 0,25	256 0,12	256 0,06	256 0,03	256 0	
C	128 16	128 8	128 4	128 2	128 1	128 0,5	128 0,25	128 0,12	128 0,06	128 0,03	128 0	
D	64 16	64 8	64 4	64 2	64 1	64 0,5	64 0,25	64 0,12	64 0,06	64 0,03	64 0	
E	32 16	32 8	32 4	32 2	32 1	32 0,5	32 0,25	32 0,12	32 0,06	32 0,03	32 0	
F	16 16	16 8	16 4	16 2	16 1	16 0,5	16 0,25	16 0,12	16 0,06	16 0,03	16 0	
G	8 16	8 8	8 4	8 2	8 1	8 0,5	8 0,25	8 0,12	8 0,06	8 0,03	8 0	
H	0 16	0 8	0 4	0 2	0 1	0 0,5	0 0,25	0 0,12	0 0,06	0 0,03	0 0	

Mikrotitrační destička 2: Rozmístění konečných koncentrací při kombinaci **flucytosinu** se SSRI po naředění

Výsledná koncentrace SSRI [µg/ml]

Výsledná koncentrace 5FC [µg/ml]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K
A	512 4	512 2	512 1	512 0,5	512 0,25	512 0,12	512 0,06	512 0,03	512 0,015	512 0,0075	512 0	
B	256 4	256 2	256 1	256 0,5	256 0,25	256 0,12	256 0,06	256 0,03	256 0,015	256 0,0075	256 0	
C	128 4	128 2	128 1	128 0,5	128 0,25	128 0,12	128 0,06	128 0,03	128 0,015	128 0,0075	128 0	
D	64 4	64 2	64 1	64 0,5	64 0,25	64 0,12	64 0,06	64 0,03	64 0,015	64 0,0075	64 0	
E	32 4	32 2	32 1	32 0,5	32 0,25	32 0,12	32 0,06	32 0,03	32 0,015	32 0,0075	32 0	
F	16 4	16 2	16 1	16 0,5	16 0,25	16 0,12	16 0,06	16 0,03	16 0,015	16 0,0075	16 0	
G	8 4	8 2	8 1	8 0,5	8 0,25	8 0,12	8 0,06	8 0,03	8 0,015	8 0,0075	8 0	
H	0 4	0 2	0 1	0 0,5	0 0,25	0 0,12	0 0,06	0 0,03	0 0,015	0 0,0075	0 0	

Mikrotitrační destička 3: Rozmístění konečných koncentrací při kombinaci **flucytosinu** se SSRI pro auxotrofní kmeny po naředění

Výsledná koncentrace SSRI [µg/ml]

Výsledná koncentrace 5FC [µg/ml]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K
A	512 32	512 16	512 8	512 4	512 2	512 1	512 0,5	512 0,25	512 0,12	512 0,06	512 0	
B	256 32	256 16	256 8	256 4	256 2	256 1	256 0,5	256 0,25	256 0,12	256 0,06	256 0	
C	128 32	128 16	128 8	128 4	128 2	128 1	128 0,5	128 0,25	128 0,12	128 0,06	128 0	
D	64 32	64 16	64 8	64 4	64 2	64 1	64 0,5	64 0,25	64 0,12	64 0,06	64 0	
E	32 32	32 16	32 8	32 4	32 2	32 1	32 0,5	32 0,25	32 0,12	32 0,06	32 0	
F	16 32	16 16	16 8	16 4	16 2	16 1	16 0,5	16 0,25	16 0,12	16 0,06	16 0	
G	8 32	8 16	8 8	8 4	8 2	8 1	8 0,5	8 0,25	8 0,12	8 0,06	8 0	
H	0 32	0 16	0 8	0 4	0 2	0 1	0 0,5	0 0,25	0 0,12	0 0,06	0 0	

Mikrotitrační destička 4: Rozmístění konečných koncentrací při kombinaci **flukonazolu** se SSRI po naředění

Výsledná koncentrace SSRI [$\mu\text{g/ml}$]

Výsledná koncentrace FLZ [$\mu\text{g/ml}$]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K
A	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	
B	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	
C	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	
D	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	
E	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	
F	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	
G	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0	

Mikrotitrační destička 5: Rozmístění konečných koncentrací při kombinaci **flukonazolu** se SSRI pro flukonazol rezistentní kmeny po naředění

Výsledná koncentrace SSRI [µg/ml]

Výsledná koncentrace FLZ [µg/ml]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K
A	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
B	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
C	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
D	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
E	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
F	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
G	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	

4.2.3 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ EXPERIMENTU:

V řadě mikrotitrační destičky bylo 10 různých koncentrací antimykotika, jedenáctá koncentrace byla nulová, což sloužilo k odečtení MIC antidepresiva v rámci jedenáctého sloupce. Pro stanovení MIC antimykotika naopak sloužil řádek H, kde bylo přítomno samostatně. V ostatních jamkách byl posuzován vliv kombinace těchto látek na nárůst mikroorganismů.

Vzájemné ovlivnění léčiv jsme vyhodnotili pomocí tzv. FIC indexu (fractional inhibitory concentration).

FIC index (frakční inhibiční koncentrace):

Metoda výpočtu FIC indexu dle vzorce:

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC}_{\text{A+B}}}{\text{MIC}_{\text{A}}} + \frac{\text{MIC}_{\text{B+A}}}{\text{MIC}_{\text{B}}}$$

Kde:

MIC_{A}minimální inhibiční koncentrace látky A

MIC_{B}minimální inhibiční koncentrace látky B

$\text{MIC}_{\text{A+B}}$minimální inhibiční koncentrace látky A v přítomnosti látky B

$\text{MIC}_{\text{B+A}}$minimální inhibiční koncentrace látky B v přítomnosti látky A

Hodnocení, pokud FIC index je:

- Synergismus $\leq 0,5$
- Adice $> 0,5 - \leq 1,0$
- Indiference $> 1,0 - \leq 2,0$
- Antagonismus $> 2,0$

FIC je nejčastěji používaným způsobem hodnocení interakce dvou léčiv. Výsledky nezáleží pouze na stupni interakce látek mezi sebou, ale také na volbě konečného bodu - zvolení odečtu MIC (inhibice nárůstu $\geq 95\%$, $\geq 75\%$ nebo $\geq 50\%$). Tento problém je nejvýznamnější u vláknitých hub jako jsou kmeny *Aspergillus* spp. (Te Dorsthorst a kol., 2002)

Významnost problému vzrůstá, jestliže jsou použity 2 látky, u nichž se MIC odečítá jinak. Např. u AMB se bere za MIC 100% inhibice nárůstu, pro itraconazol je MIC jen 50% inhibice. (Te Dorsthorst a kol., 2002)

Způsob hodnocení se liší v různých experimentech. Stanovená rozmezí nejsou ve všech pracech stejná.

Např.

- Kaatz a kol., 2003 použili toto hodnocení:

Synergismus $\leq 0,5$; adice do 1,0; indiference do 2,0; antagonismus $\geq 4,0$

- Heller a kol., 2004:

Silný synergismus $\leq 0,5$; slabý synergismus < 1 ; adice =1; indiference 1-2, antagonismus $> 2,0$

Tato metoda sice má určité nedostatky, ale zároveň mnoho výhod. Provedení je relativně rychlé a technicky méně náročné. Nabízí možnost srovnání naměřených výsledků s jinými týmy vědeckých pracovníků na mezinárodní úrovni.

V praxi by vypadal modelový nárůst mikroorganismů asi takto:

[$\mu\text{g/ml}$]

	indiference					
16						
8			■	■	■	■
4			■	■	■	■
2			■	■	■	■
1			■	■	■	■
0			■	■	■	■
	16	8	4	2	1	0

	adice					
16						
8						■
4				■	■	■
2			■	■	■	■
1			■	■	■	■
0		■	■	■	■	■
	16	8	4	2	1	0

[$\mu\text{g/ml}$]

	antagonismus					
16						
8		■	■	■	■	■
4		■	■	■	■	■
2			■	■	■	■
1				■	■	■
0				■	■	■
	16	8	4	2	1	0

	synergismus					
16						
8						■
4					■	■
2				■	■	■
1			■	■	■	■
0		■	■	■	■	■
	16	8	4	2	1	0

4.3 VYHODNOCENÍ EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

4.3.1 STANOVENÍ CITLIVOSTI MYKOTICKÝCH ORGANISMŮ NA SSRI

Touto metodou jsme stanovili minimální inhibiční koncentraci (MIC) pro příslušné kmeny a dané látky. Mykotické organismy inkubovány při teplotě 35°C, výsledky odečteny předběžně po 24 hodinách, konečný odečet po 48 hodinách. Srovnání účinnosti jsme provedli pouze na úrovni konečného odečtu.

Naměřené MIC byly přibližně stejné pro paroxetin i fluoxetin. Látky nevykazovaly mezi sebou významné rozdíly v účinku. Viz. Tabulka 3: Stanovení citlivosti mykotických organismů pro jednotlivé SSRI

Pouze pro kmen *Candida albicans* 26508/03 RVVK jsme stanovili významnější rozdíl v MIC obou látek. Paroxetin byl v tomto případě látkou účinnější (MIC 62,5µg/ml) oproti fluoxetinu (MIC 250µg/ml).

Jako nejcitlivější se ukázal kmen *Saccharomyces cerevisiae* 7802/03, vůči němu naopak vykazoval mírně lepší aktivitu fluoxetin (MIC 15,6µg/ml), paroxetin (MIC 31,25µg/ml). Další kmeny s dobrou citlivostí jsou *Candida krusei* ATCC 6258, *C. krusei* E 28 a *C. lusitaniae* 2446/l., pro paroxetin je nalezená MIC 62,5µg/ml shodná pro všechny kmeny, pro fluoxetin dosahuje stejné hodnoty, pouze u kmene *C. krusei* E 28 klesla na 31,25µg/ml.

Naopak nejméně citlivé jsou 3 kmeny *C. albicans* (označené jako 25188/97, 750 a CM8215) a *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Námi stanovená citlivost u paroxetinu byla 500µg/ml a fluoxetinu v rozmezí 500-250µg/ml.

Nalezené výsledky tedy sloužily k výběru vhodných kmenů pro metodu checkerboard. Námi vybrané kmeny (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida albicans* 8797/03 RVVK a *Saccharomyces cerevisiae* 7802/03) měly citlivost přibližně stejnou pro obě dvě látky v námi požadovaném koncentračním rozmezí.

Tabulka 3: Stanovení citlivosti mykotických organismů pro jednotlivé SSRI

Testované kmeny	MIC [$\mu\text{g/ml}$] pro PAROXETIN po 48 hod.	MIC [$\mu\text{g/ml}$] pro FLUOXETIN po 48 hod.
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	125	250
<i>Candida albicans</i> 2 ATCC 90028	250	250
<i>Candida albicans</i> 8797/03 RVVK	250	250
<i>Candida albicans</i> 26508/03 RVVK	62,5	250
<i>Candida albicans</i> 26736	250	250
<i>Candida albicans</i> 25188/97	500	500
<i>Candida albicans</i> 750	500	250
<i>Candida albicans</i> CM8215	500	250
<i>Candida glabrata</i> 20/l.	125	62,5
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	62,5	62,5
<i>Candida krusei</i> E 28	62,5	31,25
<i>Candida lusitaniae</i> 2446/l.	62,5	62,5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	500	500
<i>Candida tropicalis</i> 156	125	62,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 7802/03	31,25	15,6
<i>Trichosporon beigelii</i> 1188	125	250

4.3.2 METODA CHECKERBOARD

Touto metodou jsme se pokusili stanovit vliv jednotlivých antidepresiv v kombinaci s některými používanými antimykotiky na růst kmenů *Candidy albicans* a jednoho kmene *Saccharomyces cerevisiae*. Mezi kmeny *C.albicans* byly zastoupeny i auxotrofní kmeny, závislé na uridinu, označeny jako CA-BWOZ, CA-BWP a CA-SC.

Směsi jsme inkubovali při teplotě 35°C, MIC jsme odečítali rámcově po 24 hodinové inkubaci, vlastní výsledky až po 48 hodinách. Z těchto pak vypočteny FIC indexy pro jednotlivé kmeny a látky.

Nejprve jsme sledovali vliv SSRI na aktivitu AMB. Koncentrace SSRI se pohybovaly v rozmezí 512-8µg/ml, koncentrace AMB 16-0,03µg/ml viz. Mikrotitrační destička 1. Naměřené hodnoty jsou doloženy v tabulkách 4 a 5, opakované stanovení pak v tabulkách 6 a 7. Výsledné průměrné FIC indexy včetně slovního vyjádření obsaženy v tabulce 8.

Paroxetin i fluoxetin vykazovali srovnatelný účinek. Byl nalezen adiční vliv kombinace AMB a obou SSRI pro všechny kmeny (FIC indexy od 0,6 do 1,0), s výjimkou kmene CA 2 ATCC 90028, kde kombinace paroxetinu a AMB byla dokonce synergní (FIC index=0,5). Je ale vidět, že tento efekt je úplně na pomezí hodnocení synergního účinku, fluoxetin vykazoval velmi obdobný vliv (FIC index=0,6) pro sledovaný kmen, ale do hodnotících kritérií pro synergismus se už nevešel. Takže tento vliv paroxetinu a AMB bychom spíše považovali za velmi slabý synergní až adiční efekt.

Dále testována kombinace SSRI a 5FC. Koncentrační rozmezí pro SSRI zůstalo stejné, pro 5FC od 4-0,0075µg/ml viz. Mikrotitrační destička 2 a pro kmeny auxotrofní byla potřeba zvýšit koncentraci antimykotika 5FC od 32-0,06µg/ml viz. Mikrotitrační destička 3. Naměřené hodnoty a opakované testy doloženy v tabulkách 9-12. Výsledné průměrné FIC indexy včetně slovního vyjádření obsaženy v tabulce 13.

Auxotrofní kmeny po expozici kombinace SSRI a 5FC nevykazovaly kvantitativní rozdíly v nárůstu ani po 48 hodinách, a to ani při opakovaném

stanovení. Tudíž nebylo možné vypočítat jejich FIC indexy, v tabulce zaznamenáno slovem-není. Pouze pro kmen *CA-SC* se podařilo FIC index přibližně stanovit, a to jak pro paroxetin (FIC index=0,8), tak pro fluoxetin (FIC index=1,0). Jejich efekt je tedy adiční.

V původním experimentu nastaveno špatné koncentrační rozmezí pro kmen *SC 7802/03*, výsledný FIC index vypočten až z opakovaného stanovení, kde byly upraveny i koncentrace SSRI (128-2µg/ml) speciálně pouze pro tento kmen. Stanoven indifferenční účinek pro obě SSRI (pro paroxetin FIC index=1,6, pro fluoxetin FIC index=1,3). Pro ostatní kmeny nalezen indifferenční účinek této kombinace, pro kmen *CA 2 ATCC 90028* u fluoxetinu nebyl brán do průměru opakovaný pokus, jedná se evidentně o chybný výsledek.

Významnější rozdíl v účinku mezi paroxetinem a fluoxetinem zaznamenán pouze u kmene *CA RVVK 8797*, kde oba výsledné FIC indexy sice jsou v rozmezí pro indifferenční účinek, ale pro paroxetin spíše na hranici s adičním účinkem (FIC index=1,1) a pro fluoxetin na pomezí s antagonismem (FIC index=1,8).

Kombinace antimykotika FLZ a SSRI ukázala největší variabilitu v účinku. Koncentrace SSRI opět v rozmezí 512-8µg/ml, pro FLZ 32-0,06µg/ml viz. Mikrotitrační destička 4. Naměřené hodnoty a opakované testy doloženy v tabulkách 14-17. Výsledné průměrné FIC indexy včetně slovního vyjádření uvádíme v tabulce 18.

Pro auxotrofní kmeny se ukázala tato kombinace jako antagonistická nebo indifferenční. Antagonismus v účinku obou SSRI a FLZ se ukázal u kmene *CA-SC*, pro paroxetin FIC index= 2,4 a pro fluoxetin FIC index=2,2. Pro *CA-BWOZ* antagonismus nalezen pouze u fluoxetinu FIC index=2,1 a paroxetin vykazoval interakci indifferenční FIC index=1,5. Výsledky u kmene *BWP* se pohybovaly významně na hranici indiference a antagonismu (paroxetin FIC index=1,9 a fluoxetin FIC index=1,8).

Pro ostatní kmeny bez auxotrofních vlastností jsme našli indiferenci v účinku SSRI a FLZ, pouze pro kmen *CA RVVK 8797* u antidepresiva fluoxetinu adici (FIC index=0,9) na pomezí s indiferencí.

Pro flukonazol-rezistentní kmeny koncentrace FLZ 128-0,25µg/ml viz. Mikrotitrační destička 5. Naměřené hodnoty a opakované testy uvedeny v tabulkách 19-22. Výsledné průměrné FIC indexy včetně slovního vyjádření obsaženy v tabulce 23.

Flukonazol-rezistentní kmeny po vystavení účinku FLZ a SSRI ukázaly indiferentní (kmeny *CG 7248/02*, *CNO 4 26 389II/00* a *CK 1 ATCC 6258*) nebo adiční účinek (*CA 20 25 346/00* a *CA 26 26 450/00*). Malý rozdíl v účinku zaznamenán u kmene *CK 7698/02*, pro paroxetin adiční (FIC index=0,9) a fluoxetin indiferentní (FIC index=1,1). Pro kmeny vykazující indiferenci (*CNO 4 26 389II/00* a *CK 1 ATCC 6258*) nebyl pokus pro nezajímavost opakován, výsledné hodnoty tedy počítány z prvního stanovení.

Kombinace SSRI a antimykotika – **AMFOTERICINU B (AMB)**:

tabulka 4: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **AMFOTERICINU B (AMB)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro AMB po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro AMB po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	1	512	2	512	0,4609
CA RVVK 8797	1	256	2	256	0,6343
SC 7802/03	1	32	2	32	0,9133
CA-BWOZ	1	256	2	256	0,6499
CA-BWP	1	256	2	256	0,6499
CA-SC	1	256	2	256	0,6342

tabulka 5: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **AMFOTERICINU B (AMB)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro AMB po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro AMB po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	1	256	2	256	0,5922
CA RVVK 8797	1	256	1	256	0,7755
SC 7802/03	1	16	2	16	1,0800
CA-BWOZ	1	256	2	256	0,6811
CA-BWP	1	256	2	256	0,7436
CA-SC	1	256	2	512	0,4643

Opakované stanovení citlivosti:

tabulka 6: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **AMFOTERICINU B (AMB)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro AMB po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro AMB po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	0,5	512	1	512	0,6180
CA RVVK 8797	0,25	512	0,5	512	0,7030
SC 7802/03	1	64	1	64	0,9725
CA-BWOZ	0,5	256	1	256	0,6326
CA-BWP	1	512	1	512	0,5869
CA-SC	0,5	512	0,5	512	0,7380

tabulka 7: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **AMFOTERICINU B (AMB)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro AMB po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro AMB po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	1	512	1	512	0,6180
CA RVVK 8797	0,5	512	1	512	0,4377
SC 7802/03	1	32	1	32	0,9420
CA-BWOZ	0,5	256	1	256	0,8041
CA-BWP	0,5	256	0,5	512	0,5921
CA-SC	0,5	512	0,5	512	0,8305

Kombinace SSRI a antimykotika – **AMFOTERICINU B (AMB)**:

tabulka 8: Výsledné FIC indexy (před a po zaokrouhlení) pro jednotlivá SSRI v kombinaci s amfotericinem B včetně slovního vyjádření

kmeny	Průměrný FIC index pro paroxetin	Slovní hodnocení interakce	Průměrný FIC index pro fluoxetin	Slovní hodnocení interakce
CA 2 ATCC 90028	0,5395 ≈ 0,5	synergismus	0,6051 ≈ 0,6	adice
CA RVVK 8797	0,6687 ≈ 0,7	adice	0,6066 ≈ 0,6	adice
SC 7802/03	0,9429 ≈ 0,9	adice	1,0110 ≈ 1,0	adice
CA-BWOZ	0,6413 ≈ 0,6	adice	0,7426 ≈ 0,7	adice
CA-BWP	0,6184 ≈ 0,6	adice	0,6679 ≈ 0,7	adice
CA-SC	0,6861 ≈ 0,7	adice	0,6474 ≈ 0,6	adice

Kombinace SSRI a antimykotika – **FLUCYTOSINU (5FC)**:

tabulka 9: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **FLUCYTOSINU (5FC)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro 5FC po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro 5FC po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	0,12	256	0,5	256	1,3884
CA RVVK 8797	0,12	128	0,25	256	1,0975
SC 7802/03	nelze	32	nelze	32	není
CA-BWOZ	nelze	256	nelze	256	není
CA-BWP	nelze	256	nelze	256	není
CA-SC	1	128	16	256	0,8463

tabulka 10: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **FLUCYTOSINU (5FC)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro 5FC po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro 5FC po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	0,12	256	0,5	256	1,6741
CA RVVK 8797	0,12	256	0,12	256	1,9938
SC 7802/03	nelze	8	nelze	16	není
CA-BWOZ	nelze	256	nelze	256	není
CA-BWP	nelze	256	nelze	256	není
CA-SC	1	128	8	128	1,0428

Opakované stanovení citlivosti:

tabulka 11: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **FLUCYTOSINU (5FC)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro 5FC po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro 5FC po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	0,25	256	2	256	1,6218
CA RVVK 8797	0,12	512	0,25	512	1,0944
SC 7802/03	0,03	32	0,06	32	1,6055
CA-BWOZ	nelze	512	nelze	512	není
CA-BWP	nelze	512	nelze	512	není
CA-SC	nelze	256	nelze	256	není

tabulka 12: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **FLUCYTOSINU (5FC)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro 5FC po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro 5FC po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	0,25	128	1	128	2,6600
CA RVVK 8797	0,12	256	0,25	256	1,5929
SC 7802/03	0,03	16	0,06	32	1,2590
CA-BWOZ	nelze	256	nelze	256	není
CA-BWP	nelze	256	nelze	256	není
CA-SC	nelze	256	nelze	256	není

Kombinace SSRI a antimykotika – **FLUCYTOSINU (5FC)**:

tabulka 13: Výsledné FIC indexy (před a po zaokrouhlení) pro jednotlivá SSRI v kombinaci s flucytosinem včetně slovního vyjádření

kmeny	Průměrný FIC index pro paroxetin	Slovní hodnocení interakce	Průměrný FIC index pro fluoxetin	Slovní hodnocení interakce
CA 2 ATCC 90028	1,5051 ≈ 1,5	indiference	1,6741 ≈ 1,7	indiference
CA RVVK 8797	1,0960 ≈ 1,1	indiference	1,7934 ≈ 1,8	indiference
SC 7802/03	1,6055 ≈ 1,6	indiference	1,2590 ≈ 1,3	indiference
CA-BWOZ	není	není	není	není
CA-BWP	není	není	není	není
CA-SC	0,8463 ≈ 0,8	adice	1,0428 ≈ 1,0	adice

Kombinace SSRI a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**:

tabulka 14: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	2	256	4	256	1,3596
CA RVVK 8797	1	256	2	512	0,7444
SC 7802/03	8	32	8	32	1,1934
CA-BWOZ	1	128	2	128	1,7670
CA-BWP	0,5	256	1	256	1,7899
CA-SC	1	256	1	256	1,4332

tabulka 15: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	1	256	8	256	1,0800
CA RVVK 8797	1	256	2	256	0,9933
SC 7802/03	8	16	8	16	1,1864
CA-BWOZ	0,5	256	0,5	256	1,9900
CA-BWP	0,5	256	1	256	1,7899
CA-SC	1	256	0,5	512	2,2844

Opakované stanovení citlivosti:

tabulka 16: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	0,5	512	8	512	1,0809
CA RVVK 8797	0,5	512	1	512	1,0460
SC 7802/03	není	není	není	není	není
CA-BWOZ	2	512	2	512	1,1768
CA-BWP	2	256	1	256	1,9899
CA-SC	0,25	256	0,5	256	2,3839

tabulka 17: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CA 2 ATCC 90028	2	512	4	512	1,4591
CA RVVK 8797	1	256	1	256	1,3899
SC 7802/03	není	není	není	není	není
CA-BWOZ	2	512	1	512	2,2429
CA-BWP	2	512	1	512	1,8104
CA-SC	0,5	512	0,5	512	2,1686

Kombinace SSRI a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**:

tabulka 18: Výsledné FIC indexy (před a po zaokrouhlení) pro jednotlivá SSRI v kombinaci s flukonazolem včetně slovního vyjádření

kmeny	Průměrný FIC index pro paroxetin	Slovní hodnocení interakce	Průměrný FIC index pro fluoxetin	Slovní hodnocení interakce
CA 2 ATCC 90028	1,2203 ≈ 1,2	indiference	1,2696 ≈ 1,3	indiference
CA RVVK 8797	0,8952 ≈ 0,9	adice	1,1916 ≈ 1,2	indiference
SC 7802/03	1,1934 ≈ 1,2	indiference	1,1864 ≈ 1,2	indiference
CA-BWOZ	1,4719 ≈ 1,5	indiference	2,1165 ≈ 2,1	antagonismus
CA-BWP	1,8899 ≈ 1,9	indiference	1,8002 ≈ 1,8	indiference
CA-SC	2,3839 ≈ 2,4	antagonismus	2,2265 ≈ 2,2	antagonismus

Kombinace SSRI a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**:

Flukonazol rezistentní kmeny:

tabulka 19: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)** pro flukonazol rezistentní kmeny

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CK 7698/02	64	128	128	128	0,8435
CG 7248/02	8	128	64	128	0,9434
CA 20 25 346/00	16	64	256	128	0,6318
CA 26 26 450/00	256	256	256	256	0,8098
CNO 4 26 389II/00	32	32	32	32	1,1936
CK 1 ATCC 6258	32	64	64	64	1,0872

tabulka 20: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)** pro flukonazol rezistentní kmeny

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CK 7698/02	64	64	64	64	1,0872
CG 7248/02	16	64	64	64	0,9871
CA 20 25 346/00	32	32	256	32	1,0069
CA 26 26 450/00	256	256	256	512	0,8833
CNO 4 26 389II/00	32	32	32	32	1,1936
CK 1 ATCC 6258	32	64	64	64	1,1701

Kombinace SSRI a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)**:

Opakované stanovení citlivosti - flukonazol rezistentní kmeny:

tabulka 21: Kombinace paroxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)** pro flukonazol rezistentní kmeny

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro PAROXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CK 7698/02	64	64	128	128	0,9942
CG 7248/02	8	128	32	128	1,1754
CA 20 25 346/00	4	64	8	64	1,8715
CA 26 26 450/00	256	256	256	512	0,8641

tabulka 22: Kombinace fluoxetinu a antimykotika – **FLUKONAZOL (FLZ)** pro flukonazol rezistentní kmeny

kmeny	MIC [µg/ml] pro FLZ po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 24 hod.	MIC [µg/ml] pro FLZ po 48 hod.	MIC [µg/ml] pro FLUOXETIN po 48 hod.	FIC vypočten po 48 hod.
CK 7698/02	64	64	128	64	1,0794
CG 7248/02	8	64	32	128	1,1754
CA 20 25 346/00	8	64	256	128	0,7760
CA 26 26 450/00	256	512	256	512	0,9218

Kombinace SSRI a antimykotika – **FLUKONAZOLU (FLZ)** pro flukonazol rezistentní kmeny:

tabulka 23: Výsledné FIC indexy (před a po zaokrouhlení) pro jednotlivá SSRI v kombinaci s flukonazolem pro flukonazol rezistentní kmeny včetně slovního vyjádření

kmeny	Průměrný FIC index pro paroxetin	Slovní hodnocení interakce	Průměrný FIC index pro fluoxetin	Slovní hodnocení interakce
CK 7698/02	0,9189 ≈ 0,9	adice	1,0833 ≈ 1,1	indiference
CG 7248/02	1,0594 ≈ 1,1	indiference	1,0813 ≈ 1,1	indiference
CA 20 25 346/00	0,6318 ≈ 0,6	adice	0,8915 ≈ 0,9	adice
CA 26 26 450/00	0,8370 ≈ 0,8	adice	0,9026 ≈ 0,9	adice
CNO 4 26 389II/00	1,1936 ≈ 1,2	indiference	1,1936 ≈ 1,2	indiference
CK 1 ATCC 6258	1,0872 ≈ 1,1	indiference	1,1701 ≈ 1,2	indiference

5 Diskuse

V naší práci jsme potvrdili, že paroxetin a fluoxetin, látky ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), mají antifungální účinek *in vitro* proti *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*) a některým dalším houbovým organismům – dermatofytu *Trichosporon beigelii* a ascomycetě *Saccharomyces cerevisiae*. Námi nalezené hodnoty MIC pro obě antidepresiva se pohybují pro všechny mykotické organismy v desítkách-stovkách $\mu\text{g/ml}$. Nejcitlivější se ukázal být kmen *Saccharomyces cerevisiae*, pro něj fluoxetin vykazoval mírně lepší aktivitu (MIC 15,6 $\mu\text{g/ml}$) než paroxetin (MIC 31,25 $\mu\text{g/ml}$). Jinak se zdá být aktivita obou látek přibližně stejná.

Hodnoty MIC jsou mnohem vyšší v porovnání s průměrnými plazmatickými hladinami paroxetinu (10 - 600ng/ml) a fluoxetinu (90 - 300, max.1000ng/ml). Za určitých podmínek, např. při kumulaci v centrálním nervovém systému nebo při zpomalení eliminace látek z organismu, se mohou koncentrace *in vivo* blížit námi stanoveným MIC *in vitro*.

Dále jsme se zaměřili na kombinaci paroxetinu a fluoxetinu s používanými antimykotiky. Pro kombinaci amfotericinu B (AMB) s oběma antidepresivy jsme našli adiční efekt vůči všem testovaným kmenům (FIC indexy v rozmezí 0,6-1,0), dokonce vůči kmenu *Candida albicans* 2 ATCC 90028 vykazovala kombinace AMB s paroxetinem účinek synergní (FIC index $\leq 0,5$).

Kombinace SSRI s flucytosinem (5FC) je pro všechny kmeny indiferentní, pouze pro auxotrofní kmen CA-SC adiční.

Posledním testovaným antimykotikem byl flukonazol (FLZ). Námi stanovené výsledky byly nejvíce variabilní právě u této antifungální látky, a to od adice (FIC index $> 0,5 - \leq 1,0$) přes indiferenci (FIC index $> 1,0 - \leq 2,0$) až po antagonismus (FIC index $> 2,0$). Velmi zajímavé je zjištění, že pro flukonazol rezistentní kmeny dosahuje tato kombinace spíše adičního a indiferentního účinku. Nalezená indiference těchto kmenů je navíc na hranici hodnocení pro adiční účinek. Takže SSRI, zejm. paroxetin, jsou částečně schopny zvrátit rezistenci u některých flukonazol rezistentních kmenů (pro kmen CA 20

25 346/00 námi nalezený FIC index=0,6 pro paroxetin a 0,8 pro fluoxetin, pro kmen CA 26 26 450/00 FIC index=0,9 pro paroxetin i fluoxetin). Způsob jakým je účinek dosažen není znám.

Ukázalo se tedy, že kombinace SSRI s AMB a FLZ by mohly být velice výhodné pro léčbu rezistentních kmenů. Popřípadě vyvarování se spolupodání FLZ a SSRI u auxotrofních kmenů díky nalezenému antagonismu v jejich účinku.

Samozřejmě námi nalezené výsledky by měly využití v praxi v případě, že bychom byli schopni dosáhnout těchto hladin v lidském organismu. Toho bohužel zatím nejsme schopni. SSRI mají vysokou schopnost kumulovat se v mozkové tkáni, díky své lipofilitě a také se zde nachází jejich původní farmakologický cíl při léčbě deprese a příbuzných neurologických onemocnění (SERT transportér). Přípravou derivátů se sníženou CNS aktivitou dosahujících vyšších plazmatických hladin by se daly SSRI využít k terapii nebo ještě lépe k potenciaci účinku jiných antimikrobních látek. Bohužel komplikací je, že právě lipofilita hraje důležitou roli v antifungálním účinku. Young a kol. (2003) stanovili, že čím vyšší stupeň lipofility sloučenina má, tím je aktivnější. Navíc ve vysokých koncentracích působí cytotoxicky. Předpokládá se, že toxicita, mnohem pravděpodobněji než specifický inhibiční mechanismus, řídí jejich antimykotický účinek. Tým autorů tedy stanovil, že v koncentracích vyžadovaných pro antifungální působení jsou toxické pro lidské buňky. (Young a kol., 2003)

Právě díky těmto výsledkům se k samostatnému použití SSRI jako antimykoticky a antibakteriálně účinných látek stavíme velmi rezervovaně. Lokální aplikace přípravků s potřebnou mikrobi-/fungi-cidní nebo mikrobi-/fungi-statickou koncentrací SSRI by být mohla nadějnou cestou výzkumu, je však nutné dříve provést dermatologické zkoušky opět s ohledem na jejich cytotoxicitu.

Plazmatické hladiny však mohou stačit k ovlivnění patogenity hub a bakterií. Procházet morfologickými změnami je důležitý virulentní faktor některých mykotických i bakteriálních organismů, zejm. pro *Candida* spp. Hyfy zvyšují přilnavost k epitelovým buňkám a napadání tkání s vyšší schopností uvolňovat proteolytické enzymy. U pacientek s vulvovaginální kandidózou byl prokázán vliv SSRI *in vivo*. Předpokládá se, že je založen právě na inhibici

růstu hyfových vláken. Výrazné rozdíly v nárůstu hyf byly pozorovány na kandidách po expozici SSRI (sertralinu - koncentrace mezi 0,35-0,75 μ g/ml, tedy velmi blízké koncentracím dosažitelným v tkáních *in vivo*), a to jak u *C. albicans*, tak u non-*albicans* kmenů. Pokud byla systémová a lokální léčba doplněna o SSRI (např. p.o. sertralin, 50mg denně po dobu 5-8 menstruačních cyklů), pacientky neměly opakující se epizody vulvovaginální kandidózy a byly úplně bez klinických příznaků. Až po ukončení podávání antidepresiv nastal relaps. (Lass-Flörl a kol., 2001a) Navíc u žen (18-45 let) našli vědci rozdílnost píku plazmatické hladiny SSRI (sertralinu), plochy pod křivkou závislosti koncentrace na čase po jednorázovém podání a eliminačního poločasu oproti mužům. U žen byl dosažitelný koncentrační pík a plocha pod křivkou větší a eliminace kratší než u mužů. (De Vane a kol., 1999) Zjištěné výsledky mohou mít vliv právě i na účinek proti kandidám u vulvovaginální kandidózy, dosažením vyšší koncentrace právě v ženském organismu.

Dalším důležitým virulentním faktorem kandid je produkce některých enzymů. Lass-Flörl a kol. (2003a) našli efekt sertralinu na produkci SAP (kandidou produkované aspartát proteázy). Většinu těchto SAP sekretují kvasinky adherované k epitelovým buňkám. Isoformy SAP jsou samy zapojeny do adherence kandid k epitelu. Vědci zjistili, že koncentrace sertralinu nutné k inhibici enzymů jsou skoro o jeden řád nižší než ty, potřebné k zastavení mykotického růstu. Takže by tyto poznatky mohly být využitelné v praxi.

Dále Muñoz-Bellido a kol. (2000) stanovili, že SSRI poškozují množství procesů probíhajících v buňkách bakterií, např. syntéza slizu a skupinový pohyb bakterie *Proteus* spp. To může vést k úvaze, že tato léčiva působí na úrovni metabolických procesů bakterií.

Také nepřímý vliv SSRI na imunitu člověka hraje důležitou roli. U systémových kandidóz nese převažující podíl na obraně makroorganismu vrozená imunita zprostředkovaná polymorfonukleáry - neutrofilů a makrofágů. (Lass-Flörl a kol., 2003a) Sertralin indukuje tzv. oxidativní vzplanutí monocytů odvozených od makrofágů vystavených tomuto léčivu. Výše popsáný účinek může být podpořen antiprostaglandinovou aktivitou SSRI (fluoxetin inhibuje syntézu 2 sérií prostaglandinů). Bakterie, houby a paraziti syntetizují eikosanoidy a mají schopnost indukovat jejich syntézu v hostitelské buňce.

Prostaglandiny regulují fyziologii, imunitu, reprodukci a toxicitu mikroorganismů a parazitů a dále i rezistenci hostitele. (Lieb, 2004) Antiprostaglandinová aktivita tedy může ovlivňovat nejen antidepresivní, ale i antimikrobní účinek SSRI.

Mechanismus účinku SSRI na mikroby a parazity je, jak vidíte, velice sporný a dost možná je i komplexem více aktivit. Jeho přesná identifikace by mohla pomoci ve vývoji látek s novým selektivním cílem účinku. Ve vědecké společnosti panují nejednotné názory právě na mechanismus účinku SSRI. Young a kol. (2003) se domnívají, že je antifungální účinek založen na nespecifické cytotoxicitě těchto látek, naproti tomu Lass-Flörl a kol. (2003a) jej předpokládají jako výsledek interakce antidepresiva s transportním systémem mykotické membrány. SSRI totiž inhibují Na⁺ závislý serotoninový transportér (SERT). Zajímavé ale je zjištění Young a kol. (2003), podle něhož houby nemají obdobu tohoto proteinu. Takže se zdá být pravděpodobné, že pro mykotické organismy asi nepůjde o mechanismus inhibice transportních systémů. Více informací a experimentálních stanovení je potřeba k nalezení přesného mechanismu účinku.

V úvahu totiž připadá i nepřímé působení SSRI prostřednictvím aktivace imunitního systému (Lieb, 2004) a zvýšení hladiny serotoninu v organismu (Lass-Flörl a kol., 2003b). Zjištění, že serotonin narušuje membrány buněk *Aspergillus* spp., sám nese antifungální aktivitu vůči aspergilům (Lass-Flörl a kol., 2002) a kandidám (Lass-Flörl a kol., 2003b) a nepřímým efektem ovlivňuje imunitní děje, vede k zamyšlení, jak asi může ovlivnit protihoubový účinek SSRI. Možná se v organismu může sčítat vlastní antimykotický účinek SSRI s účinkem serotoninu vyplaveného aktivitou antidepresiv.

Předpokládá se, že za synergní efekt kombinace 5-HT a amfotericinu B pro kmeny *Aspergillus* spp. zodpovídá právě zvýšení průniku antifungální látky do buňky následně po účinku serotoninu. (Heller a kol., 2004)

SSRI ovlivňují zpětné vychytávání serotoninu v synaptické štěrbině nervové buňky člověka. Analogicky se vyvozuje stejné ovlivnění činnosti mikrobiální membrány, zejm. jde o vypuzení - eflux léčiv vně z buňky. Kaatz a kol. (2003) ve své práci sledovali *in vitro* účinek na systém efluxních pump u *Staphylococcus aureus* fenylpiperidinovými SSRI (P-SSRI). Bylo potvrzeno, že

látky působí jako inhibitory těchto pump a mohou tak znovuobnovit účinnost antimikrobních látek, které jsou substráty pro tyto proteiny.

Ovlivněním činnosti efluxních pump bakterií se vysvětluje jejich synergické působení při kombinaci s antibiotiky (tetracykliny a fluorochinolony), projevující se snížením minimálních inhibičních koncentrací protimikrobních látek. (Muñoz-Bellido a kol., 2000) (Heller a kol., 2004) Snížením MIC (okolo 50%) u chinolon-rezistentních kmenů může dojít k tzv. zvratu rezistence, kdy kmeny původně rezistentní se stanou kmeny citlivými. (Heller a kol., 2004) (Muñoz-Bellido a kol., 2000) Jejich aktivita navíc není závislá na vnímavosti exponovaných kmenů vůči jednotlivým antibiotikům. Pro bakterie se tedy zdá být pravděpodobný mechanismus účinku pomocí ovlivnění efluxních transportérů a snížením patogenních možností bakterie, stejně jako ovlivnění metabolických procesů odehrávajících se uvnitř bakteriální buňky.

P-SSRI jsou dále schopny ovlivnit replikaci HIV viru.

Další zajímavou vlastností SSRI je působení zvratu chlorochinové rezistence u *Plasmodium falciparum*. Vědci ale předpokládají, že tato schopnost přímo nesouvisí s jejich schopností inhibovat zpětné vychytávání, zejm. s jejich selektivitou. Mechanismus účinku nebyl zatím zjištěn. (Taylor a kol., 2000) Potvrdili ale roli SSRI ve zvýšení akumulace chlorochinu a přeměně rezistentního plasmodia na citlivé, bohužel zatím jen *in vitro*.

Možnost využití SSRI v kombinaci s antibiotiky a antimykotiky, popř. s chlorochinem se tedy jeví perspektivněji. Opět je limitujícím faktorem dosažitelná plazmatická koncentrace. Proto je třeba důkladně prozkoumat chemickou strukturu látek a možnosti obměn na základním skeletu. Identifikovat skupiny potřebné k antimikrobnímu (popř. antiprotozoálnímu) účinku a inhibici efluxních pump a následně se pokusit syntetizovat látky se zvýšenou protimikrobní aktivitou v dosažitelných koncentracích *in vivo*.

Jestliže nyní používaná léčiva mají svá omezení a jejich antimikrobiální vlastnosti nejsou dostačující je potřeba hledat látky účinnější. V dnešním světě regulovaném pomocí financí je nezbytně důležité zvážit i ekonomické hledisko. Vzhledem ke své ceně a prozatím zdrženlivě hodnoceným antimikrobiálními účinkům se SSRI zřejmě ještě nestanou léky volby např. při terapii vulvovaginální kandidózy. Mohly by se ale stát vyhrazenými alternativami u

těžších případů, kde opakovaná a neúspěšná aplikace levnějších antimykotik nepřináší žádaný úspěch. Domníváme se tedy, že jedině komplexním přístupem k terapii (nejen) infekčních onemocnění můžeme dosáhnout vytyčeného cíle, tedy plné a rychlé uzdravení pacienta. K tomu je ovšem nutné nahlédnout do spletitostí vztahů a zákonitostí mezi funkcemi centrálního nervového, imunitního systému, jejich interakcemi s mikroorganismy a možnostmi ovlivnění pomocí farmakoterapie.

Výsledky dosud získané u této skupiny léčiv podporují zaměření výzkumu následujícími směry:

- Ověření vlivu na fyziologii mikrobů, zejména na charakteristické vlastnosti spojené s jejich patogenitou. Tato jejich aktivita se zdá být dosažitelná při normálních plazmatických koncentracích a jeví se nejperspektivněji pro nové klinické použití SSRI, zejm. u pacientek s vulvovaginální kandidózou.
- Nalezení molekul s vystupňovanou antimikrobní aktivitou na úkor neurologickým efektům v koncentracích nevykazujících cytotoxicitu.
- Zkoumání jejich funkce inhibitorů efluxních pump. Tato jejich schopnost by mohla vést ke kombinaci SSRI s antibiotiky, obdobně jako jsou již existující kombinace β -laktámových antibiotik s inhibitory β -laktamáz.
- Pokusit se využít synergní a adiční efekt SSRI s antibiotiky a antimykotiky. Dále i možnosti využití při zvratu rezistence (jak bakterií, tak *Plasmodium falciparum*) a k ovlivnění HIV replikace.
- Přesné stanovení mechanismu účinku.
- Zkoumání aktivity *in vivo*, jak na modelech zvířecích, tak vlastní účinek v lidském organismu.
- Hledání možností formulace topických forem.
- Testovat vliv na mikroflóru při běžném podávání SSRI.
- Stanovit vliv serotoninu na vlastní účinek SSRI, atd.

Je tedy nezbytné pokračovat v experimentech a testování, SSRI se jeví jako nadějná skupina léčiv, je jen potřeba stanovit rozsah možností jejího nového využití.

6 Závěr

Cílem naší práce bylo potvrdit *in vitro* antifungální aktivitu paroxetinu a fluoxetinu, látek ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) proti *Candida* spp. a některým dalším houbovým organismům – *Trichosporon beigelii* a *Saccharomyces cerevisiae*. Námi nalezené hodnoty MIC pro obě antidepresiva se pohybují pro všechny mykotické organismy v desítkách-stovkách $\mu\text{g/ml}$.

Dále jsme se zaměřili na kombinaci paroxetinu a fluoxetinu s používanými antimykotiky. Pomocí metody checkerboard jsme vypočetli FIC indexy pro jednotlivé kombinace. Při kombinaci amfotericinu B (AMB) s oběma antidepresivy jsme našli adiční efekt vůči všem testovaným kmenům, dokonce vůči jednomu kmenu *C. albicans* vykazovalo současné působení AMB s paroxetinem účinek synergní. Kombinace SSRI s flucytosinem je pro všechny kmeny indiferentní, pouze pro auxotrofní kmen CA-SC adiční. Posledním testovaným antimykotikem byl flukonazol (FLZ). Námi stanovené výsledky byly nejvíce variabilní právě u této antifungální látky, a to od adice přes indiferenci až po antagonismus. Velmi zajímavé je zjištění, že pro flukonazol rezistentní kmeny dosahuje spolupodání FLZ se SSRI spíše adičního a indiferentního účinku. Takže můžeme pomocí těchto látek zvrátit rezistenci některých kmenů k FLZ.

Průměrné plazmatické koncentrace SSRI se pohybují v řádech desítek až stovek ng/ml (De Vane, 1999). Tento rozdíl se zdá být omezením pro praktické použití těchto látek *in vivo*. Koncentrací podobných MIC nalezených *in vitro* se dá dosáhnout zatím jen díky kumulaci látek v mozkové tkáni nebo při poškození či zablokování eliminace. Zdá se ale, že jsou spojeny s cytotoxicitou na lidské buňky. Více informací a potvrzení cytotoxicity sloučenin by bylo potřeba pro predikci vývoje v této oblasti. Proto se také stavíme k samostatnému použití SSRI jako antimikrobiálních či antimykotických léčiv velmi skepticky.

Zjištění, že SSRI jsou schopny potencovat účinek klasických antibiotik, antimykotik a chlorochinu, tím vrátit mikroorganismy dříve rezistentní do skupiny senzitivních se zdá být perspektivnější pro výzkum a vývoj klinicky použitelných

látek. (Taylor a kol., 2000) SSRI působí také nepřímo antimikrobiálně a inhibicí tvorby prostaglandinů ovlivňují patogenitu mikrobů. (Lieb, 2004) Funkci imunitního systému ovlivňují jednak díky vlastní aktivity a také zvýšením hladiny serotoninu v těle. (Lass-Flörl a kol., 2002) Působení na imunitu a patogenitu mikrobů (na jejich morfologii a fyziologii) je pozorováno *in vivo*. Vyžaduje však detailnější prozkoumání vzájemných vztahů mezi účinkem, koncentrací SSRI a možnostmi zvýšení či ovlivnění této aktivity. Navíc ani vztah zvýšených koncentrací serotoninu a jeho příspěvek k účinku SSRI není zatím dostatečně prozkoumán. Je tedy třeba ještě uskutečnit mnohá pozorování a výzkumy (jak *in vitro* tak *in vivo*) a ujít dlouhou cestu, než budeme schopni posoudit, zda jsou selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu vhodnou skupinou látek pro uplatnění v léčbě infekčních onemocnění.

7 Souhrn

V naší práci jsme potvrdili, že paroxetin a fluoxetin, látky ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) mají antimykotický účinek proti *Candida* spp. a některým dalším houbovým organismům – *Trichosporon beigelii* a *Saccharomyces cerevisiae*. Námi nalezené hodnoty MIC pro obě antidepresiva se pohybují pro všechny mykotické organismy v desítkách-stovkách $\mu\text{g/ml}$.

Hodnoty MIC jsou vyšší v porovnání s průměrnými plazmatickými hladinami paroxetinu a fluoxetinu (desítky až stovky ng/ml). Za určitých okolností, např. při kumulaci v centrálním nervovém systému nebo poruchách či blokaci eliminace se mohou koncentrace *in vivo* blížit MIC stanoveným *in vitro*.

Pomocí metody checkerboard (výsledky vyjádřeny jako FIC indexy pro jednotlivé kmeny a kombinace) jsme testovali vliv SSRI na používaná antimykotika. Při kombinaci amfotericinu B (AMB) s oběma antidepresivy jsme našli adiční efekt vůči všem testovaným kmenům, vůči jednomu z nich dokonce účinek synergní. Spolupodání SSRI s flucytosinem je pro všechny kmeny indiferentní, opět pouze v jednom případě adiční. Posledním testovaným antimykotikem byl flukonazol (FLZ). Námi stanovené výsledky byly nejvíce variabilní právě u této antifungální látky, a to od adice přes indiferenci až po antagonismus. Velmi zajímavé je, že pro flukonazol rezistentní kmeny dosahuje kombinace FLZ se SSRI spíše adičního a indiferentního účinku. Takže můžeme při kombinaci těchto látek zvrátit rezistence kmenů pro flukonazol. Opět omezením použití v praxi jsou vysoké koncentrace antidepresiv, při kterých byly tyto výsledky nalezeny.

Plazmatické hladiny SSRI však mohou stačit k ovlivnění patogenity mikroorganismu. SSRI vykazují aktivitu i proti širokému spektru bakterií, působí na replikaci virů HIV, zvýšením hladiny serotoninu v těle a inhibicí tvorby prostaglandinů ovlivňují a podporují činnost imunitního systému. Tyto látky jsou schopny potencovat účinek klasických antibiotik a antimykotik, dokonce zvrátit rezistenci některých odolných mikroorganismů a protozoí (jak bakterií, tak chlorochin rezistentní *Plasmodium falciparum*).

SSRI mohou být nadějnou skupinou pro léčbu infekčních nemocí, mohou se stát užitečným doplňkem a alternativou stávajícím terapeutickým postupům, je však nutné je podrobit dalším a detailnějším výzkumům.

8 Abstract

Several years ago antimicrobial activity was described for psychotropic drugs against wide groups of microorganisms. Recently it was found that one class of them, known as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), has *in vivo* and *in vitro* antifungal activity. In this study the minimal inhibitory concentrations (MIC) of two SSRI (paroxetine and fluoxetine) against various strains of *Candida* spp. (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*), *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichosporon beigellii* using a broth microdilution test were investigated. The most susceptible fungal organism was *Saccharomyces cerevisiae* - fluoxetine (MIC 15,6µg/ml) and paroxetine (MIC 31,25µg/ml). In the second part of our study we tested combination of some antifungal agents (amphotericin B, fluconazole and flucytosine) with paroxetine and fluoxetine using checkerboard method. Activity was measured against two strains *Candida albicans*, one strain *Saccharomyces cerevisiae* and three auxotrophic strains *Candida albicans* (CA-SC, CA-BWOZ, CA-BWP), dependent on uridine. For fluconazole testing we used six fluconazole-resistant strains *Candida* spp. in addition. The fractional inhibitory concentration (FIC) indexes ranged between 0,5 and 2,4 for the various combinations and various strains. Combination studies with amphotericin B and both SSRI showed additive activity (FIC between 0,6 and 1,0), only for one strain *Candida albicans* there were found synergism (FIC ≤ 0,5). Combination of antidepressants and flucytosine was indifferent (FIC between 1,0 and 2,0) in all cases with one exception of additive effect. Combination studies with fluconazole and SSRI showed different activities for strains tested, including additivity, indifference and antagonism (FIC > 2,0). We obtained very interesting results for fluconazole-resistant strains. For some of them the combination with SSRI they showed an additive effect.

9 Seznam použité literatury:

- BAUMANN, P.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.*, 1996, roč. 31, č. 6, s. 444-469.
- BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, s. 34-36, 146-147, 155-156. ISBN 80-7184-565-5.
- DE VANE, C.L.: Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Cell. Molec. Neurobiol.*, 1999, roč. 19, č. 4, s. 443-466.
- GUNICS, G., MOTOHASHI, N., AMARAL, L., FARKAS, S., MOLNÁR, J.: Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, roč. 14, s. 239-242.
- HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V., ZIMČÍK, P.: *Farmaceutická chemie IV*. 1.vyd. Praha: Karolinum, 2006, s. 35-48. ISBN 80-246-1169-4.
- HELLER, I., LEITNER, S., DIERICH, M.P., LASS-FLÖRL, C.: Serotonin (5-HT) enhances the activity of amphotericin B against *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2004, roč. 24, s. 401-404.
- HENDRICKS, O., BUTTERWORTH, T.S., KRISTIANSEN, J.E.: The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003, roč. 22, s. 262-264.
- KAATZ, G.W., MOUDGAL, V.V., SEO, S.M., HANSEN, J.B., KRISTIANSEN, J.E.: Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003, roč. 22, s. 254-261.
- KECK, P.E., McELROY, S.L.: Ratio of plasma fluoxetine to norfluoxetine concentrations and associated sedation. *J.Clin.Psychiatry*, 1992, roč. 53, s. 127-129. Převzato z De Vane a kol., 1999.
- KRISTIANSEN, J.E., AMARAL, L.: The potential management of resistant with non-antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997, roč. 40, s. 319-327.
- KRISTIANSEN, J.E., HANSEN, J.B.: Inhibition of HIV replication by

- neuroleptic agents and their potential use in HIV infected patients with AIDS related dementia. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, roč. 14, s. 209-213.
- LASS-FLÖRL, C., DIERICH, M.P., FUCHS, D., SEMENITZ, E., LEDOCHOWSKI, M.: Antifungal activity against *Candida* species of the selective serotonin-reuptake inhibitor, sertraline. *Clin. Infect. Dis.*, 2001a, roč. 33, s. 135-136.
- LASS-FLÖRL, C., DIERICH, M.P., FUCHS, D., SEMENITZ, E., JENEWEIN, I., LEDOCHOWSKI, M.: Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001b, roč. 48, s. 775-779.
- LASS-FLÖRL, C., WIEDAUER, B., MAYR, A., KIRCHMAIR, M., JENEWEIN, I., LEDOCHOWSKI, M., DIERICH, M.P.: Antifungal properties of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Aspergillus* spp. in vitro. *J. Medic. Microbiol.*, 2002, roč. 291, s. 655-657.
- LASS-FLÖRL, C., FUCHS, D., LEDOCHOWSKI, M., SPETH, C., DIERICH, M.P., WÜRZNER, R.: Antifungal properties of 5-hydroxytryptamine (serotonin) against *Candida* species in vitro. *J. Medical. Microbiol.*, 2003b, roč. 52, s. 169-171.
- LEDOCHOVSKI, M., FUCHS, D., SPETH, C., KACANI, L., DIERICH, M.P., FUCHS, A., WÜRZNER, R.: Interaction of sertraline with *Candida* species selectively attenuates fungal virulence in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003a, roč. 35, s. 11-15.
- LIEB, J.: The immunostimulating and antimicrobial properties of lithium and antidepressants. *J. Infect.*, 2004, roč. 49, s. 88-93.
- LINCOVÁ, D., FARGAHALI, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. 1.vyd. Praha: Galén a Karolinum, 2002, s. 34, 168-174, 470-478. ISBN 80-7262-168-8 (Galén), ISBN 80-246-0538-4 (Karolinum).
- MONTGOMERY, S.A., BALDWIN, D., SHAH, A., GREEN, M., FINEBERG, N., MONTGOMERY, D.: Plasma level response relationships with fluoxetine and zimelidine. *Clin. Neuropharmacol.*, 1990, roč. 13, suppl. 1, s. S71-S73. Převzato z De Vane a kol., 1999.
- MUÑOZ-BELLIDO, J.L., MUÑOZ-CRIADO, S., GARCÌA-RODRÌGUEZ, J.A.: In-vitro activity of psychiatric drugs against *Corynebacterium urealyticum*

- (Corynebacterium group D2). *J. Antimicrob. Chemother.*, 1996, roč. 37, s. 1005-1009.
- MUÑOZ-BELLIDO, J.L., MUÑOZ-CRIADO, S., GARCÌA-RODRÌGUEZ, J.A.: Antimicrobial activity of psychotropic drugs selective serotonin reuptake inhibitors. *Int. J. Antimikrob. Agents*, 2000, roč. 14, s. 177-180.
- MUÑOZ-CRIADO, S., MUÑOZ-BELLIDO, J.L., GARCÌA-RODRÌGUEZ, J.A.: In vitro activity of nonsteroidal anti-inflammatory agents, phenothiazines, and antidepressants against *Brucella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1996, roč. 15, s. 418-420.
- MUÑOZ-CRIADO, S., MUÑOZ-BELLIDO, J.L., ALONSO-MANZANARES, M.A., GUTIÉRREZ-ZUFIAURRE, M.N., GARCÌA-RODRÌGUEZ, J.A.: Psychotropic drugs inhibit swarming in *Proteus* spp. and related genera. *Clin. Microbiol. Infect.*, 1998, roč. 4, č. 8, s. 447-449.
- SILVESTRI, R., ARTICO, M., LA REGINA, G., DI PASQUALI, A., DE MARTINO, G., D'AURIA, F.D., NENCIONI, L., PALAMARA, A.T.: Imidazole analogues of fluoxetine, a novel class of anti-candida agents. *J. Med. Chem.*, 2004, roč. 47, s. 3924-3926.
- TAYLOR, D., WALDEN, J.C., ROBINS, A.H., SMITH, P.J.: Role of the neurotransmitter reuptake-blocking activity of antidepressants in reversing chloroquine resistance in vitro in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, roč. 44, č. 10, s. 2689-2692.
- TE DORSTHORST, D.T.A., VERWEIJ, P.E., MEIS, J.F.G.M., PUNT, N.C., MOUTON, J.W.: Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, roč. 46, č. 3, s. 702-707.
- TILŠER, I.: ústní sdělení, 2005 (Přednášky a semináře z farmakologie pro rok 2005).
- WEI, P., KAATZ, G.W., KERNS, R.J.: Structural differences between paroxetine and femoxetine responsible for differential inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, roč. 14, s. 3093-3097.

YOUNG, T.J., OLIVER, G.P., PRYDE, D., PERROS, M., PARKINSON, T.:
Antifungal activity of selective serotonin reuptake inhibitors attributed to non-specific cytotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, roč. 51, s. 1045-1047.