

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity  
České Budějovice**



**Možnosti využití HPMPA v terapii mikrosporidiózy**

Bakalářská práce

Vypracovala: Eva Černotíková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc

Odborný poradce: Prof. RNDr. Antonín Holý Dr.Sc., Dr.h.c.

Černotíková E., 2008: Možnosti využití (S)-HPMPA v terapii mikrosporidiezy [Potencial usage of (S)-HPMPA in therapy of microsporidiosis]. 40 pp. University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

**Annotation:**

The activity of the acyclic nukleoside analogue 9-(S)-[3-hydroxy-2-phosphonylmethoxy)propyl]adenine [(S)-HPMPA] against *Encephalitozoon cuniculi* infection was examined *in vitro*, in Vero E6 cells cultures infected with *E. cuniculi* and *in vivo*, in SCID mice. The substance was tested in different concentrations in the cell-line cultivation with *E. cuniculi*. Probenecid [p-(dipropylsulfamoyl)-benzoic acid] was originally administrated to decrease cytotoxicity caused by acyclic nucleoside phosphonates. (S)-HPMPA reduced number of infected cells, but it also decreased number of host cells depending on its concentration. However, probenecid caused death of cells in both examined concentrations. *In vivo*, the drug was administrated perorally. The treatment started three days before the inoculation with *E. cuniculi* spores. Probenecid was administrated perorally before administration of (S)-HPMPA to decrease its nephrotoxicity. The results of *in vivo* experiment showed that (S)-HPMPA reduced spore numbers in the beginning of the course of infection. Nevertheless, level of parasitemia increased until the mice died. (S)-HPMPA isn't suitable drug for treatment of microsporidiosis. No positive effect of probenecid was found.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 7. ledna 2008

Eva Černotíková

.....

## **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala mému školiteli Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za to, že mi umožnil pracovat na svém oddělení, za jeho laskavý přístup, odborné rady a vedení práce, prof. RNDr. Antonínu Holému, DrSc., Dr.h.c. za poskytnutí (S)-HPMPA a cenné rady.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracovníků Laboratoře oportunních parazitóz, RNDr. Daně Květoňové, RNDr. Bohumilu Sakovi, PhD. a Ing. Martinu Kváčovi, PhD. za cenné rady, trpělivost a za vytvoření přátelské atmosféry.

Můj dík patří i prof. MVDr. Ivě Dykové, DrSc. a Marii Fučíkové za pomoc a rady při přípravě a vyhodnocování histologických preparátů, prof. RNDr. Janu Lepšovi a Mgr. Ivě Schödelbauerové za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Na závěr děkuji mojí rodině za její velikou podporu a trpělivost.

# OBSAH:

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
1.1. Mikrosporidie .....	5
1.1.1. Obecný přehled.....	5
1.1.2. Morfologie .....	5
1.1.3. <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	6
1.1.4. Terapie mikrosporidiózy .....	7
1.2. SCID myši .....	7
1.3. Acyklické nukleosidfosfáty (ANP) .....	8
1.3.1. Obecný přehled.....	8
1.3.2. ANP jako léčiva virových infekcí .....	8
1.3.3. Antiprotozoární působení ANP .....	9
1.3.3.1. Antitrypanozomální ANP .....	9
1.3.3.2. Antiplasmodiální ANP.....	10
1.3.3.3. Antischistosomiální ANP .....	10
1.3.4. (S)-HPMPA .....	11
1.4. Probenecid .....	11
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>13</b>
3.1. Spory <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	13
3.2. Příprava roztoku (S)-HPMPA .....	13
3.3. Příprava roztoku probenecidu .....	13
3.4. Myši.....	14
3.5. Příprava a průběh pokusu na tkáňové kultuře infikované <i>E cuniculi</i> .....	14
3.6. Příprava a průběh pokusu na SCID myších .....	14
3.7. Barvení spor .....	15
3.7.1. Barvení spor Calcofluorem.....	15
3.8. Histologické zpracování vzorků.....	15
3.8.1. Barvení hematoxylin-eosinem.....	17
3.8.2. Gramovo modifikované barvení .....	18
3.9. Statistická analýza .....	19
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>20</b>
4.1. Působení (S)-HPMPA a probenecidu na tkáňové kultuře infikované <i>E cuniculi</i> .....	20
4.2. Vliv (S)-HPMPA a probenecidu na průběh infekce <i>E cuniculi</i> v <i>in vivo</i> modelu, SCID myši .....	23
4.3. Vliv probenecidu na snížení cytotoxicity (S)-HPMPA.....	26
4.4. Histologické zpracování .....	26
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>27</b>
<b>6. ZÁVĚRY</b> .....	<b>31</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>32</b>
<b>8. PŘÍLOHY</b> .....	<b>37</b>

# 1. ÚVOD

## 1. 1. Mikrosporidie

### 1.1.1. Obecný přehled

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti považovaní za samostatnou skupinu protist vzniklých z hub (Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck 2005).

Kmen Microsporidia obsahuje více než 140 rodů a 1200 druhů s širokým hostitelským rozsahem. Nejvíce zástupců parazituje u hmyzu a ryb, kde způsobují významné ekonomické ztráty (Weber et al. 1994, Didier et al. 1998).

K unikátním znakům patří nepřítomnost mitochondrií, peroxizomů, hydrogenozomů a typického Golgiho aparátu. Ačkoli se mikrosporidie řadí mezi eukaryota, ribozomy svým charakterem připomínají spíše prokaryota (Vávra et Larsson 1999). Přítomnost mitochondrií u jejich dávného předka dokládá objev genu HSP70 (heat shock protein) (Peyretailade et al. 1998).

Poprvé byla pozorována mikrosporidie, *Nosema bombycis*, u bource morušového v roce 1857 (Nägeli). Infekce u savců byla zaznamenána Wrightem a Craigheadem (1922) v centrálním nervovém systému laboratorních králíků. První dostatečně podložený případ nákazy člověka byl ohlášen v roce 1959 (Matsubayashi et al.).

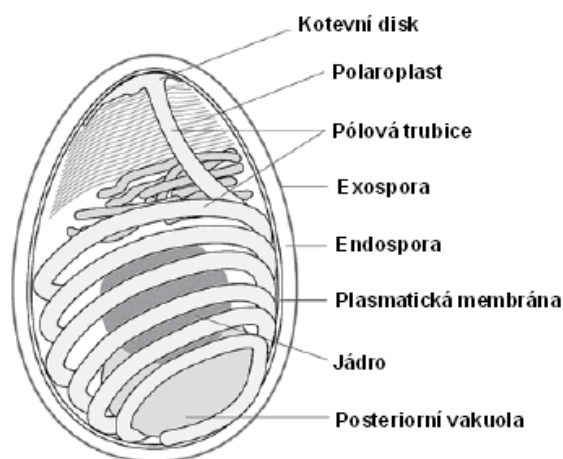
Zvýšený zájem o studium mikrosporidií je spojen s pandemií AIDS. U jedince s narušenou funkcí imunitního systému dochází k rozvoji klinicky významné infekce, která může vést až ke smrti. Jedná se o pacienty infikované virem HIV, imunosuprimované osoby po transplantaci orgánů nebo při chemoterapiích (Didier et al. 1994, Weber et Bryan 1994).

### 1.1.2. Morfologie

K charakteristickým vlastnostem mikrosporidií patří tvorba spor s jedinečnou ultrastrukturou (Franzen 2005). Spora může mít různý tvar, od kulatého po tyčinkovitý a různou velikost záviselou na druhu parazita, od 1  $\mu\text{m}$  (*Enterocytozoon bieneusi*) až po 40  $\mu\text{m}$  (*Bacillidium filiferum*) (Vávra et Larsson 1999). Stěna spory je odolná vůči vnějšímu

prostředí. Skládá se ze silné elektrondenzní proteinové exospory, elektronlucentní chitinózní endospory a plasmatické membrány. Buněčná stěna obklopuje jedno nebo dvoujaderný infekční obsah spory, sporoplasmu (Weber et al. 1994). Spora obsahuje silně pozměněný Golgiho aparát, posteriorní vakuolu a jedinečný vystřelovací aparát, který se skládá ze stočené pólové trubice končící tzv. kotevním diskem v anteriorní části spory (Vávra et Larsson 1999).

Ve vhodných podmínkách je vlivem změny pH a zvýšení osmotického tlaku vypuzena pólová trubice, která slouží k přepravě infekční sporoplasmu do hostitelské buňky.



**Obr. 1:** Schéma mikrosporidiové spóry - upraveno (Franzen 2005).

### 1.1.3. *Encephalitozoon cuniculi* (Levatidi et al. 1923)

Druh *Encephalitozoon cuniculi* byl první mikrosporidií pozorovanou u savců. Poprvé byl objeven u králíka v roce 1922 (Wright et Craighead) a pojmenován o rok později, Levatidi et al. (1923). Infekce byla zaznamenána u různých druhů savců, včetně člověka (Franzen et Müller 2001).

Zástupci rodu *Encephalitozoon* se množí uvnitř parazitoforní vakuoly. Předpokládá se, že vakuola pochází z endoplazmatického retikula hostitelské buňky (Didier et al. 1998).

*Encephalitozoon cuniculi* byl první savčí mikrosporidií úspěšně kultivovanou *in vitro*. Díky snadné kultivaci *in vitro* je *E. cuniculi* v současné době nejvíce studovanou mikrosporidií (Khan et Moretto 1999). Spora má pravidelný oválný tvar a její rozměry jsou 2,0-2,5 × 1,0-1,5 μm. Pólová trubice je stočena do pěti až sedmi závitů (Canning et Lom 1986).

Byly popsány tři genotypy *E. cuniculi* (Didier et al. 1995). Genotyp I byl původně izolován a kultivován z králíků (Shadduck 1969), genotyp II pochází z myši, ale později byl nalezen v norských polárních liškách (*Alopes lagopus*) (Didier et al. 1995) a genotyp III byl původně popsán u domácích psů (Shadduck et al. 1978). Genotyp I a genotyp III byly nalezeny u HIV-infikovaných jedinců (Didier et al. 1996).

#### **1.1.4. Terapie mikrosporidiózy**

Možnosti terapie mikrosporidiózy jsou omezené. Vzhledem k odolnosti spor a terapeutické nedostupnosti intracelulárních stádií jsou pokusy o léčbu nepříliš úspěšné.

Byly testovány inhibitory hmyzích chitináz, jež se ukázaly neúčinné (Vávra et al. 1996).

Další testovanou látkou byl Fumagilin. Pokusy *in vitro* byly částečně účinné, ale pro vysokou toxicitu tohoto léčiva byl jako potenciální adept vyloučen (Ditrich et al. 1994).

Za nejúčinnější léčivo je považován Albendazol (metyl-5-(propylthio)-2-benzimidazolkarbamát). Jeho účinnost byla ověřena v experimentech *in vitro* i *in vivo* (Ditrich et al. 1994, Koudela et al. 1994). Albendazol působí přestavbu mikrotubulů v polární trubici a tím inhibuje růst a množení spor (Ditrich et al. 1994). Nicméně rod *Enterocytozoon* zůstává proti Albendazolu rezistentní.

## **1.2. SCID myši**

SCID (Severe Combined Immunodeficient) myši jsou imbrední myši s vrozenou imunodeficiencí B a T-lymfocytů, která souvisí s genetickou autozomální recesivní mutací na genu označovaném *scid* (Bosma et al. 1983). Patří k modelovým organismům vhodným pro studium mikrosporidiózy (Koudela et al. 1993).

## 1.3. Acyklické nukleosidfosfáty (ANP)

### 1.3.1. Obecný přehled

Acyklické nukleosidfosfáty jsou chemicky modifikované nukleosidy, které tím získávají nové vlastnosti. Neztrácejí však schopnost začleňovat se do molekuly nukleové kyseliny, kde pak pozměňují jak strukturu tak i funkci. Přítomnost fosfonometylerové skupiny (=P-C-O) zajišťuje rezistenci vůči aktivitám esteráz, které defosforují běžné monofosforylované nukleotidy (Bijsterbosch et al. 1998).

K aktivaci ANP je nutná fosforylace do jejich trifosfátové formy, teprve potom se stávají biologicky účinnými (De Clerq et Holý 2005). Nejprve se v buňkách fosforují nukleotid kinázami na monofosfáty ANPp, které jsou analogy deoxynukleosiddifosfátů dNTP. Další stupeň transformace je katalysován nukleosid difosfát kinázou a poskytuje analog deoxynukleosidtrifosfátu ANPpp (Holý 2003a).

Trifosfáty ovlivňují virovou replikaci a to tak, že buď inhibují virové replikační enzymy - reversní transkriptázu, virovou DNA polymerázu - nebo terminují růst virového řetězce (De Clerq et Holý 2005).

ANP vykazují široké spektrum antivirové aktivity proti mnoha RNA a DNA virům. Antivirové působení je různé a závisí na povaze báze a charakteru acyklického postranního řetězce (Bijsterbosch et al. 1998). Byl prokázán také antiparazitický a cytostatický účinek ANP.

### 1.3.2. ANP jako léčiva virových infekcí

#### PMEA (adefovir dipivoxil), Hepsera<sup>TM</sup>

Orální profarmakum adefoviru, adefovir dipovoxil, bylo schváleno v roce 2002 pro nemocné chronickou hepatitidou typu B (Holý 2003a).

Adefovir dipivoxil byl původně vyvíjen pro léčbu HIV infekce, ale z důvodu vysoké nefrotoxicity byl tento záměr zamítnut. Při léčbě hepatitidy B se používají mnohem nižší dávky, které nevyvolávají akutní toxicitu (Holý 2003a, De Clerq et Holý 2005).

Adefovir má účinky proti některým DNA virům, ale silně inhibuje retroviry, oba kmeny HIV, opičí analog SIV, Maedi Visna virus a virus hepatitidy B (Holý 2003b).



### (S)-HPMPC (cidofovir), Vistide™

Cidofovir byl schválený pro intravenózní léčbu cytomegalovirové retinitidy u AIDS pacientů v roce 1996 (De Clerq et Holý 2005). Působí na všechny DNA viry, zahrnující polyoma-, papilloma-, adeno-, herpes- a poxviry. Je zatím nejúčinnější látkou, která inhibuje virus varioly (pravých neštovic), i jeho opičí varianty (monkeypox virus). Mechanismus působení je založen na terminaci DNA řetězce (De Clerq 2007). Nevýhodou cidofoviru je jeho značná nefrotoxicita, která ale může být potlačena současnou aplikací probenecidu (Bagnis et al. 1999).

### (R)-PMPA (tenofovir disoproxil fumarat), Viread™

Profarmakum R-PMPA, tenofovir disoproxil fumarat, se užívá orálně k léčbě AIDS, kde působí jako terminátor řetězce. Je ale také dosti aktivní proti SIV, MSV, HBV, což jsou všechno analogy viru HIV. Velmi obtížně se proti němu vytvářejí rezistentní mutanty HIV (Holý 2003a).

## **1.3.3. Antiprotozoární působení ANP**

Infekce protozoárních parazitů, zejména pak plasmodií, sužují lidstvo od pradávna. Dříve účinná léčiva podléhají narůstající parazitární rezistenci. Je tedy nutné neustále vyvíjet nové, lepší a odolnější látky.

Acyklické nukleofosfáty se řadí k látkám s potenciální účinností. Mechanismus působení je podobný jako u virů, jen s tím rozdílem, že ANP inhibují polymerázy parazitických prvků a tím zastavují jejich replikaci.

Nejúčinnější látkou proti protozoárním parazitům se ukázala být (S)-HPMPA.

### **1.3.3.1. Antitrypanozomální ANP**

Africké trypanosomy nejsou schopné syntetizovat puriny *de novo*. Tento problém obcházejí tak, že je jednoduše nahradí hostitelskými puriny. Z toho důvodu se purinové analogy jeví jako potenciální kandidáti, které mohou ovlivnit metabolismus trypanosom (Kaminsky et al. 1994).

(S)-HPMPA se ukázal jako nejaktivnější ze všech ANP. Konkrétně *in vitro* proti *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. b. gambiense* patogenních u člověka a *T. b. brucei*,

*T. congolense* a *T. evansi* napadajících zvířata. Tato látka byla účinná také *in vivo*, u myši infikovaných *T. b. brucei* (Kaminsky et al. 1998).

Růst *T. b. brucei* inhibovala *in vitro* také HPMPDAP [9-(2-hydroxy-3-(phosphonomethoxy)propyl)-2,6-diaminopurine], ale méně než (S)-HPMPA. Nejúčinnější proti *T. congolense in vitro* pak byla PMEDAP [(S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurin] (Kaminsky et al. 1994).

### 1.3.3.2. Antiplasmodiální ANP

Plasmodia způsobující malárii jsou obdobně jako trypanosomy závislé na purinech hostitelského původu. Navíc si nedokáží uchovat pyrimidinové nukleosidy z důvodu chybějících pyrimidinových nukleosid kináz. Pyrimidiny si ale nahrazují syntézou *de novo*. Nebyly nalezeny ani purinové nukleosid kinázy. Absence nukleosid kinázové aktivity by mohla bránit v použití nukleosidových analogů jako inhibitorů plasmodiálních polymeráz. Nicméně bylo zjištěno, že (S)-HPMPA nevyžaduje aktivaci nukleosid kinázami (Smeijsters et al. 1999). Mechanismus však není zcela objasněn.

I v případě plasmodií se polymerázy ukázaly jako cíle působení těchto analogů. Pro antiplasmodiální aktivitu ANP je nezbytná přítomnost purinové báze, hydroxylové skupiny ve vedlejším acyklickém řetězci a fosfát terminující acyklický řetězec (Smeijsters et al. 1999).

Jako nejvhodnější látka u *Plasmodium falciparum* a *P. berghei in vitro* se jeví (S)-HPMPA a (S)-3-deaza-HPMPA (De Vries 1991). Účinnost (S)-HPMPA *in vivo* proti *P. berghei* v myším modelu byla limitovaná na stádiu závislou inhibicí (Smeijsters et al. 1994), krátkým poločasem rozpadu (S)-HPMPA v plazmě a dávkovacím režimem závislým na nefrotoxicitě (Smeijsters et al. 1996).

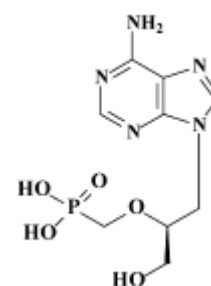
### 1.3.3.3. Antischistosomiální ANP

Použití tradičního léku proti schistosomóze, praziquantelu, je ohroženo vzrůstající rezistencí. Vývoj nové účinnější látky s antischistosomiálními účinky je tedy více než nutný (Botros et al. 2003).

Botros et al. testovali (S)-HPMPA při experimentální nákaze myši motolicí *Schistosoma mansoni*. Byl prokázán příznivý antiparazitický účinek. Při nejvhodnějším dávkovacím režimu téměř kompletně vymizela zralá i nezralá vajíčka. Byl zaznamenán také úbytek spárovaných samců (Botros et al. 2003).

### 1.3.4. (S)-HPMPA

Přenesením fosphonylmethylové skupiny PAA na DHPA [(S)-9-(2-dihydroxypropyl)adenin] vznikne fosphonylový derivát zvaný (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonmethoxy)propyl]adenin. Pouze (S)-enantiomer se ukázal být účinný, zatímco (R)-forma postrádá veškerou aktivitu. Transport ANP skrz buněčnou membránu je zásadní pro jeho biologickou aktivitu. (S)-HPMPA využívá ke vstupu do buňky endocytózu. Jedná se o děj kineticky i teplotně nezávislý (Holý 2003b). (S)-HPMPA má selektivní účinnost proti všem DNA virům, zahrnující herpes simplex virus (typ 1 i 2), virus Epstein-Baarové, varicella zoster virus, lidský cytomegalovirus, vaccinia virus a lidský adenovirus (De Clerq et al. 1986). Zajímavé je jeho působení při léčbě chorob postihujících játra. Bylo zjištěno, že je vysoce efektivní proti viru lidské a kachní hepatitidy typu B v buněčných kulturách (Bijsterbosch et al. 1998). Vykazuje ojedinělou antiparazitickou aktivitu proti *Plasmodium*, *Trypanosoma* a *Schistosoma* spp.



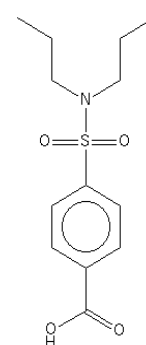
(S)-HPMPA

(De Clerq 2007)

Není dále vyvíjen jako antivirový lék, ale slouží jako prototypová složka pro řadu dalších ANP (De Clerq 2007).

### 1.4. Probenecid

Probenecid, 4-(dipropylsulfamoyl)benzoová kyselina [Benemid®, Probalan®], je urikosurikum, tzn. že zvyšuje vylučování kyseliny močové močí. Primárně se užívá při léčbě dny a hypericemie (zvýšená hladina kyseliny močové v krvi), ale běžně je užíván i jako doplněk ke zvýšení antibiotických koncentrací, kde snižuje renální vylučování antibiotik. Přesný mechanismus působení v ledvinných nefronech není znám. Ledvinový organický aniontový transporter (OAT) získává kyselinu močovou z moči a vrací ji zpět do plasmy. Probenecid se váže k OAT místo kyseliny močové a tím zabraňuje její zpětné reasorpci. Výsledkem je zvýšené vylučování kyseliny močové močí a tím snížení koncentrace kyseliny močové v plasmě. Probenecid je běžně užíván jako doprovodný lék cidofoviru pro zmírnění nefrotoxicity (Bagnis et al. 1999, Bijsterbosch et al. 1998, De Clerq et Holý 2005, Holý 2003a,b, Smeijsters et al. 1996).



Probenecid

(English Wikipedia)

## 2. CÍL PRÁCE

1. Zpracovat kriticky literární rešerši o účincích acyklických nukleofosfátů na protozoární parazity.
2. Na tkáňové kultuře infikované *Encephalitozoon cuniculi* testovat antimikrosporidiovou aktivitu (S)-HPMPA.
3. Na modelu imunodeficitních SCID myší otestovat možné účinky acyklických nukleofosfátů na *Encephalitozoon cuniculi*.
4. Pokusit se optimalizovat terapeutický režim tak, aby se snížila nefrotoxicita (S)-HPMPA.

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1. Spory *Encephalitozoon cuniculi***

K infekci byly použity spory *E. cuniculi* původně izolované Koudelou (1994) a dlouhodobě kultivované na E6 VERO buňkách v kompletním kultivačním médiu RPMI 1640 (SIGMA) s přídavkem 2,5 % bovinního séra (BOFES, ZVOS), antimykotik (ATM, SIGMA), gentamycinu (Lek. Pharmaceutical and Chemical Company d. d., Ljubljana) a neesenciálních aminokyselin (Ústav sér a očkovacích látek, Praha). Množství spor bylo stanoveno počítáním v Bürkerově komůrce. Spory byly uchovávány ve sterilním fosfátovém pufru (PBS, pH = 7,2) s přídavkem antibiotik a antimykotik (SIGMA) v ledničce při 4 °C.

#### **3.2. Příprava roztoku (S)-HPMPA**

Acyklický nukleosidfosfát (S)-HPMPA byl poskytnut v práškové formě RNDr. Antonínem Holým DrSc. z Ústavu organické chemie a biochemie v Praze. Podle výsledků Roučky (2000) je optimální dávka 5 mg/kg (S)-HPMPA v 0,2 ml PBS. Na rozdíl od jeho práce je dnes možné tuto látku rozpouštět ve vodě bez přídavku NH<sub>3</sub>OH a není nutné ji zahřívat k varu. Byl připraven zásobní roztok a skladován při laboratorní teplotě pro další účely. Z důvodu vysoké toxicity bylo s látkou manipulováno v digestoři za zvýšených bezpečnostních podmínek.

#### **3.3. Příprava roztoku probenecidu**

Probenecid (SIGMA) byl rozpuštěn ve vodě. Léčebná dávka byla 0,285 g/kg (Smeijsters et al. 1996). Připravený zásobní roztok byl skladován při laboratorní teplotě. Pro silnou toxicitu látky byla taktéž použita digestoř.

### 3.4. Myši

V pokusu byly použity SCID (Severe Combined Immunodeficient) myši, které jsou chovány v izolátorech s HEPA filtry. Izolátory, podestýlka, potrava a voda podávané myším byly před použitím sterilizovány.

### 3.5. Příprava a průběh pokusu na tkáňové kultuře infikované *E. cuniculi*

#### Kultivace:

Do každé jamky 24 jamkového panelu bylo sterilně napipetováno 1 ml infikovaných buněk (přibližně  $1 \times 10^5$  buněk *E. cuniculi* na jamku) v RPMI mediu obohaceném 2,5 % boviním sérem (BOFES), antibiotiky (ATB), antimykotiky (ATM) a esenciálními kyselinami (NEA). Po 24 hodinové inkubaci při 37 °C v 3,5 % atmosféře CO<sub>2</sub> byly neadherované buňky odstraněny a médium bylo nahrazeno 2,5 % mediem RPMI s obsahem (S)-HPMPA o koncentracích 20 µg/ml; 4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 0,16 µg/ml; 0,032 µg/ml; 0,0064 µg/ml. Byl sledován účinek probenecidu, a to jak v čistém mediu, tak v mediu obohaceném o (S)-HPMPA. Koncentrace probenecidu byla při prvním pokusu 0,285 mg/ml a při druhém 0,0285 mg/ml. Médium obohacené o (S)-HPMPA a přidávané k probenecidu mělo koncentraci 4 µg/ml.

Pokus trval sedm dní. Počátkem třetího dne od založení kultury byl sledován počet neinfikovaných buněk ku počtu buněk infikovaných v pětadvaceti zorných polích pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 400× po dobu následujících pěti dnů.

### 3.6. Příprava a průběh pokusu na SCID myších

#### Předpokus:

Účelem předpokusu bylo ověřit si působení šarže (S)-HPMPA. Čtyři pětítýdenní SCID myši byly infikovány perorálně infekční dávkou  $7 \times 10^8$  spor mikrosporidií *E. cuniculi* v 0,2 ml vody na myš. Léčba byla zahájena třetí den po nákaze a dále byla aplikována každý den ve

stejnou dobu po 40 dní. Léčebná dávka byla 5 mg/kg (S)-HPMPA [tzn. 0,15 mg (S)-HPMPA] v 0,2 ml destilované vody na myš/den. Od osmého dne po infekci byly obden odebrány a vyšetřovány vzorky trusu. K aplikaci infekčních a léčebných dávek byla použita žaludeční sonda.

#### Vlastní pokus:

Bylo použito osmnáct osmítýdenních SCID myší obou pohlaví. Všechny myši byly perorálně infikovány dávkou  $7 \times 10^8$  spor *E. cuniculi* v 0,2 ml vody na myš. Pokus trval 43 dní ve sterilním prostředí izolátoru.

Myši byly rozděleny do tří skupin podle typu terapie:

#### 1. Kontrolní infikovaná neléčená skupina

Skupina šesti myší infikovaných spory *E. cuniculi*. Myším nebyla podávána látka (S)-HPMPA. Skupina sloužila jako indikátor rozvoje infekce.

#### 2. Předléčená infikovaná léčená skupina: (S)-HPMPA

Skupina šesti myší infikovaných spory *E. cuniculi*. Myším byla podávána látka (S)-HPMPA a to tři dny před inokulací spory *E. cuniculi*. Léčebná dávka byla 5 mg/kg (S)-HPMPA [tzn. 0,15 mg (S)-HPMPA] v 0,2 ml destilované vody na myš/den.

#### 3. Předléčená infikovaná léčená skupina: (S)-HPMPA + probenecid

Skupina šesti myší infikovaných spory *E. cuniculi*. Myším byl podáván probenecid a látka (S)-HPMPA a to tři dny před inokulací spory *E. cuniculi*. Léčebná dávka byla 5 mg/kg (S)-HPMPA [tzn. 0,15 mg (S)-HPMPA] v 0,2 ml destilované vody na myš/den a 0,285 g/kg probenecidu [tzn. 8,55 mg probenecidu] v 0,2 ml destilované vody na myš/den. Probenecid byl podáván 30 minut před dávkou (S)-HPMPA pro snížení (S)-HPMPA indukované nefrotoxicity (Smeijsters et al.1996).

Léčba byla prováděna jednou denně ve stejnou dobu. Od osmého dne po infekci byly obden odebrány a vyšetřovány vzorky trusu. K nálezům i léčbě myši sloužila žaludeční sonda. Myším, které byly usmrceny dislokací vazů byl proveden peritoneální výplach roztokem PBS. Usmrceným pokusným zvířatům byly odebrány vzorky jater a ledvin pro následné histologické vyšetření.

## 3.7. Barvení spor

### 3.7.1. Barvení spor Calcofluorem (Vávra et al. 1993)

1. Rozetření vzorků trusu na podložní sklíčko.
2. Fixace methanolem a zasychání asi 2 minuty.
3. Barvení 0,1 % Calcofluorem po dobu 10 minut, opláchnutí.
5. Dobarvení 0,5 % roztokem Evansovy modře po dobu 30 sekund.
6. Opláchnutí vodou a zaschnutí.

Použité roztoky:

I. 0,5 % Evansova modř: 0,5 g ve 100 ml PBS

II. 0,1 % Calcofluor White M2 (SIGMA): 0,1 g ve 100 ml PBS

Spory *E. cuniculi* byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) pod UV světlem při zvětšení 1000×. Spory měly pravidelný oválný tvar a modře svítily.

## 3.8. Histologické zpracování vzorků

Během pokusu byly odebrány a dále histologicky zpracovány vzorky ledvin a jater z osmnácti pokusných SCID myší.

Postup:

→ fixace odebraných vzorků v 8 % formalinu

→ přenesení vzorků do zalévací kazety

→ odvodňování:

řada lázní v kyvetě : - voda.....15 min.

- 70% alkohol...60 min.

- 80% alkohol...60 min.

- 96% alkohol...60 min.

- 96% alkohol...60 min.

- aceton.....60 min.



- xylen.....60 min.
- xylen.....90 min.
- prosycení parafínem: - lázeň 1.....2-4 hodiny
  - lázeň 2.....4-6 hodin
  - lázeň 3.....8-12 hodin
- zalévání do bločků: - přenesení vzorků pinzetou z kazety do formiček s horkým parafínem, urovnání vzorků na dno formiček a nechání ztuhnout
  - okrájení vyklopených bloků zahřátým nožem, přitavení na popsané dřevěné špalíčky
- krájení řezů: - upevnění bločku do držáku mikrotomu
  - opatrné skrajování, dokud se nekrájí celý vzorek (řezy o síle 20  $\mu\text{m}$ )
  - krájení řezů s celým vzorkem (řezy o síle 7  $\mu\text{m}$ ), přenesení do předehřáté vodní lázně (45-50  $^{\circ}\text{C}$ ), kde se řezy narovnají a natáhnou
  - stáhnutí vhodných řezů na předepsaná sklíčka
  - položení sklíček na předehřátou plotýnku (40  $^{\circ}\text{C}$ ), schnutí a natažení (přes noc)
  - uložení sklíček na deskách do termostatu (42  $^{\circ}\text{C}$ )

### **3.8.1. Barvení hematoxylinem-eosinem**

1. Odparafinování v roztocích xylenu 3× 20 min.
2. Odvodnění v alkoholové řadě po 5 min. (96%, 96%, 80%, 70% alkohol).
3. Vypírání v destilované vodě 2× 5 min.
4. Barvení v Mayerovém hematoxylinu 10 min.
5. Vypírání v tekoucí vodě 10 min.
6. Barvení v eosinu 5 min.
7. Opláchnutí vodou.
8. Odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou po 2 min. (70 %, 80 % 96 %, 96% alkohol).
9. Projasnění v karboxylenech 2× 2 min.
8. Projasnění v xylenech 3× 2 min.
10. Montování řezů nakápnutím kanadského balzámu na sklíčko a přiložení krycího sklíčka.

Použité roztoky:

I. Mayerův hematoxylin: 1000 ml destilované vody; 1 g hematoxylinu; 0,2 g jodičnanu sodného; 50 g kamence draselného; 1 g kyseliny citrónové; 50 g chloralhydrátu.

II. 0,2 % Eosin: 190 ml destilované vody; 5 ml 2 % eosinu; 1 ml 1 % kyseliny octové.

Hematoxylin-eosin je základní histologické barvení, ve kterém se jádra buněk a chrupavka barví modře, kolagenové vazivo růžově a svalovina červeně.

### **3.8.2. Gramovo modifikované barvení (Brown et Brenn 1931)**

1. Odparafinování řezů v roztocích xylenu. 3× 20 min.
2. Odvodnění v alkoholové řadě po 5 min. (96%, 96%, 80%, 70% alkohol).
3. Vypírání v destilované vodě 2× 5 min.
2. Nakapání 20 kapek krystalové violeti, poté 5 kapek hydrouhličitanu sodného na vzorek, působení 1 min.
3. Opláchnutí destilovanou vodou.
4. Zalití roztokem jodu na 1 min.
5. Opláchnutí destilovanou vodou.
6. Odbarvení v roztoku eter-aceton 1:1.
7. Barvení roztokem fuchsinu 1 min.
8. Opláchnutí destilovanou vodou.
9. Diferencování v roztoku kyseliny pikrové, dokud řezy nejsou žlutavě růžové.
10. Opláchnutí v acetonu.
11. Opláchnutí ve směsi aceton-xylen 1:1.
12. Projasnění v xylenech 3× 2 min.
13. Montování řezů nakápnutím kanadského balzámu na sklíčko a přiložení krycího sklíčka.

Použité roztoky:

I. 1 % krystalová violet: 1 g krystalové violeti ve 100 ml destilované vody

II. 5 % hydrogenuhličitan sodný: 5 g hydrogenuhličitanu ve 100 ml destilované vody

III. Gramův jódový roztok: 1 g jódu; 2 g jodidu draselného; 300 ml vody

IV. nasycený roztok basického fuchsinu: 0,25 g fuchsinu ve 100 ml destilované vody

V. pracovní roztok fuchsinu: nasycený roztok ředěný vodou 1:1000

VI. 0,1 % roztok kyseliny pikrové: 0,1 g kyseliny pikrové ve 100 ml acetonu

Mikrosporidie se barví tmavě fialově, gram-pozitivní bakterie modře, gram-negativní bakterie červeně, jádra buněk červeně a ostatní tkáňové elementy žlutě.

Vzorky obou histologických barvení byly prohlíženy světelným mikroskopem při zvětšení 295× a při zvětšení 740× s použitím olejové imerze.

### **3.9. Statistická analýza**

K vyhodnocení výsledků byl použit software STATISTICA 7.0. Jde o analýzu variance pro opakovaná měření: Repeated measures ANOVA. Pro následná mnohonásobná porovnání byl použit Tukey HSD test.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Působení (S)-HPMPA a probenecidu v tkáňových kulturách infikovaných *E. cuniculi*

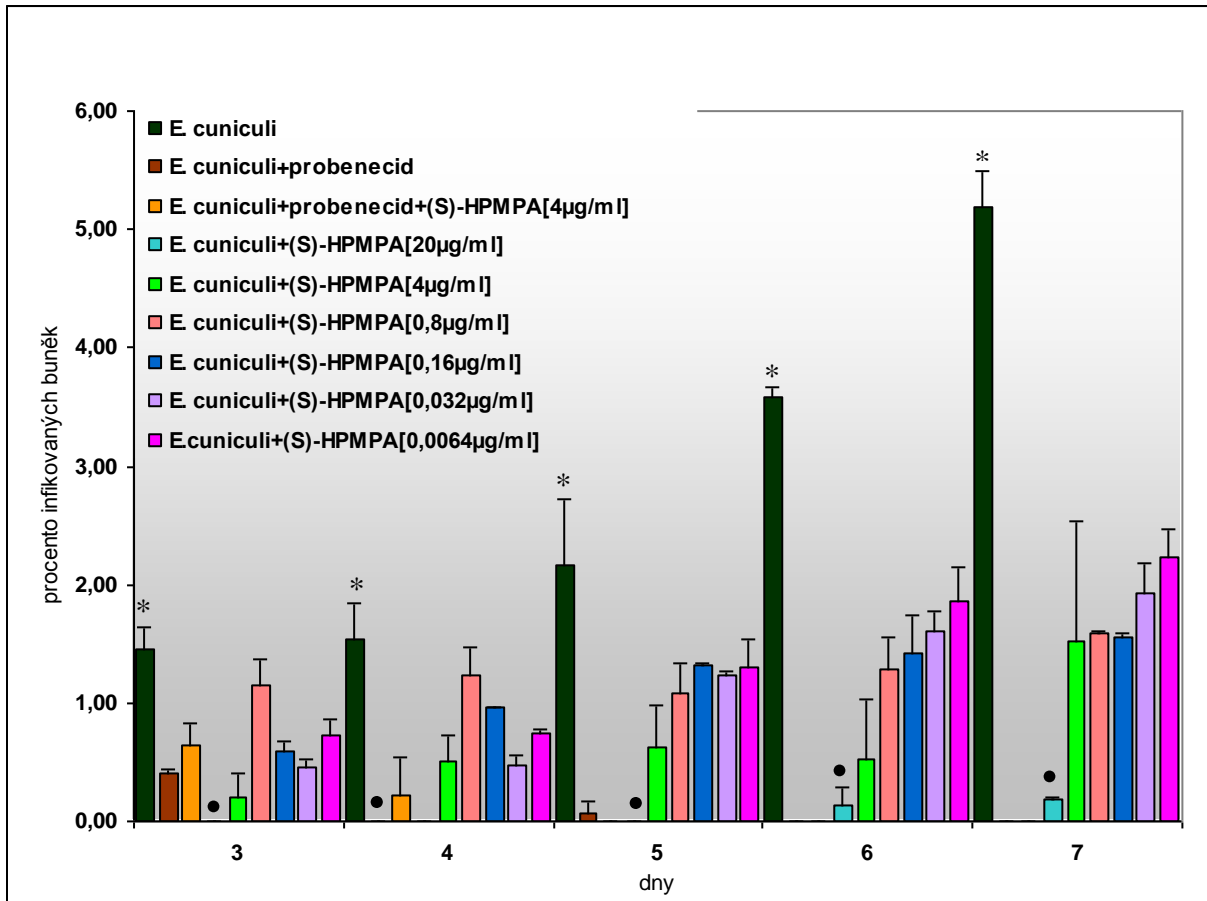
V pokusu s tkáňovými kulturami byl sledován počet infikovaných buněk a počet neinfikovaných buněk. Výsledky jednotlivých měření byly v každé sledované skupině zvlášť aritmeticky zprůměrovány a poté statisticky vyhodnoceny.

Z grafu 1 znázorňujícího procento infikovaných buněk vyplývá, že (S)-HPMPA má ve všech koncentracích jistý negativní vliv na mikrosporidiovou infekci ve srovnání s kontrolními skupinami. Směrem k nižším koncentracím látky vzrůstá procento infikovaných buněk. Procento infikovaných buněk v jamkách s probenecidem klesá v prvních dvou až třech dnech. Čtvrtý a pátý den již zde nebyla nalezena žádná infikovaná buňka. Jak ale prezentuje následující tabulka v této skupině se také snižoval počet neinfikovaných buněk.

Průměrný počet neinfikovaných buněk a průměrný počet infikovaných buněk u sledovaných skupin v jednotlivých dnech je uveden v tabulce 1. Tabulka navíc zaznamenává pokles nebo růst počtu neinfikovaných buněk. V kontrolních skupinách byly buňky infikované, neléčené. V těchto skupinách je patrný nárůst počtu neinfikovaných a infikovaných buněk s postupujícím časem (obrázek 1). Ve skupinách léčených probenecidem a probenecidem s (S)-HPMPA byl zaznamenán úbytek neinfikovaných buněk a úplné vymizení infikovaných buněk. Podle výsledků v jamkách s probenecidem hostitelské buňky nerostou. Po aplikaci (S)-HPMPA buňky přežívaly, ale méně než u kontrolní skupiny. Navíc u vyšších koncentrací (S)-HPMPA byl počet neinfikovaných buněk nižší než u koncentrací slabších (obrázek 2). V jamkách s látkou (S)-HPMPA se během pokusu zvyšoval jak počet neinfikovaných tak počet infikovaných buněk.

Test analýzy variance potvrdil, že se kontrola statisticky významně liší od léčených skupin. Dokazuje tedy, že byl zaznamenán inhibiční účinek (S)-HPMPA na mikrosporidie. Procento infikovaných buněk je oproti kontrole mnohem nižší. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi nejvyšší koncentrací (S)-HPMPA a ostatními koncentracemi, kdy je procento infikovaných buněk signifikantně menší než u nižších koncentrací.

**Graf 1:** Vliv (S)-HPMPA na průběh infekce *E. cuniculi* *in vitro* v tkáňových kulturách Vero E6. Průměrné hodnoty procenta infikovaných buněk ze tří měření + směrodatná odchylka. \* značí signifikantní rozdíl kontrolní skupiny od ostatních sledovaných skupin. • značí signifikantní rozdíl mezi použitými koncentracemi (S)-HPMPA



**Tabulka 1:** Vliv (S)-HPMPA na průběh infekce *E. cuniculi in vitro* v tkáňových kulturách Vero E6

	DPI				
	3	4	5	6	7
	počet neinfikovaných buněk/počet infikovaných buněk				
<b>KONTROLA</b>	3193/47	12907/199	17444/380	19820/732	19720/1137
<b>PROBENECID</b>	328/1,3	204/0	271/0,3	143/0	104/0
<b>PROBENECID (S)-HPMPA [4μg/ml]</b>	389/2	352/1,3	284/0	178/0	146/0
<b>(S)-HPMPA [20μg/ml]</b>	174/0	193/0	233/0	419/0,5	539/1
<b>(S)-HPMPA [4μg/ml]</b>	215/0,5	310/1,5	347/1	244/1,5	378/2
<b>(S)-HPMPA [0,8μg/ml]</b>	758/9	1202/15	4316/46	3788/49	6883/109
<b>(S)-HPMPA [0,16μg/ml]</b>	964/5,5	2953/29	3656/48	4900/70	7220/113
<b>(S)-HPMPA [0,032μg/ml]</b>	2649/6	13249/33	11363/70	14070/114	17580/174
<b>(S)-HPMPA [0,0064μg/ml]</b>	2906/21	8670/63	9670/122	12930/235	14880/327

## 4.2. Vliv (S)-HPMPA a probenecidu na průběh infekce *E. cuniculi* v *in vivo* modelu, SCID myši

Byl proveden předpokus, jehož dalším účelem bylo osvojit si práci v izolátoru a používání žaludeční sondy. Všechny pokusné myši začaly v druhé polovině pokusu vylučovat značné množství spor v trusu a následně podlely letální mikrosporidiové infekci.

Vlastní pokus byl proveden podle podobného schématu jako předpokus. Léčené myši byly na rozdíl od předpokusu předléceny 3 dny před inokulací spory *E. cuniculi* a v pokusu se navíc pracovalo s probenecidem, potenciální látkou ke snížení nefrotoxicity. Během experimentu byl sledován počet vylučovaných spor v trusu. Získané výsledky prezentují grafy 2 - 4.

Graf 2 ukazuje průběh vylučování spor SCID myši ve sledovaných skupinách v jednotlivých dnech. První spory v trusu byly nalezeny 16 DPI, a to u kontrolní skupiny i u léčené skupiny (S)-HPMPA. Ve skupině léčené (S)-HPMPA s probenecidem byly první spory zaznamenány až 20 DPI. Počínaje 28 DPI všechny myši vylučovaly značné množství spor v trusu (obrázek 3), kromě dvou ze skupiny (S)-HPMPA a (S)-HPMPA + probenecid.

Graf 3 znázorňuje vývoj mortality myši ve sledovaných skupinách v průběhu experimentu. Úhyn první myši byl zaznamenán ve skupině (S)-HPMPA 28 DPI. Tentýž den byla také usmrcena myš, které byl podáván (S)-HPMPA s probenecidem, jelikož vykazovala známky premortálního stavu. 31 DPI uhynula první myš z kontrolní skupiny. Všechny uhynulé a usmrcené myši vylučovaly krátce před smrtí velké množství spor v trusu. Příčinou jejich úmrtí byla pravděpodobně mikrosporidíóza. Výjimkou byly poslední dva přežívající jedinci ze skupiny (S)-HPMPA a (S)-HPMPA + probenecid. Tyto dvě myši 40. den po infekci vylučovaly malé množství spor v trusu a po následném usmrcení bylo pozorováno pouze malé množství spor v makrofázích.

V grafu č. 4 je zaznamenáno procento napadených makrofágů mikrosporidii. Jedná se o dva přeživší jedince ve srovnání s myši z kontrolní skupiny. Myš z kontrolní skupiny měla téměř všechny makrofágy napadené mikrosporidii (obrázek 4). U jedince, kterému byl podáván (S)-HPMPA, bylo zaznamenáno 51 procent makrofágů obsahujících spory. Peritoneální výplach myši, léčené (S)-HPMPA a probenecidem, neobsahoval žádný napadený makrofág (obrázek 5).

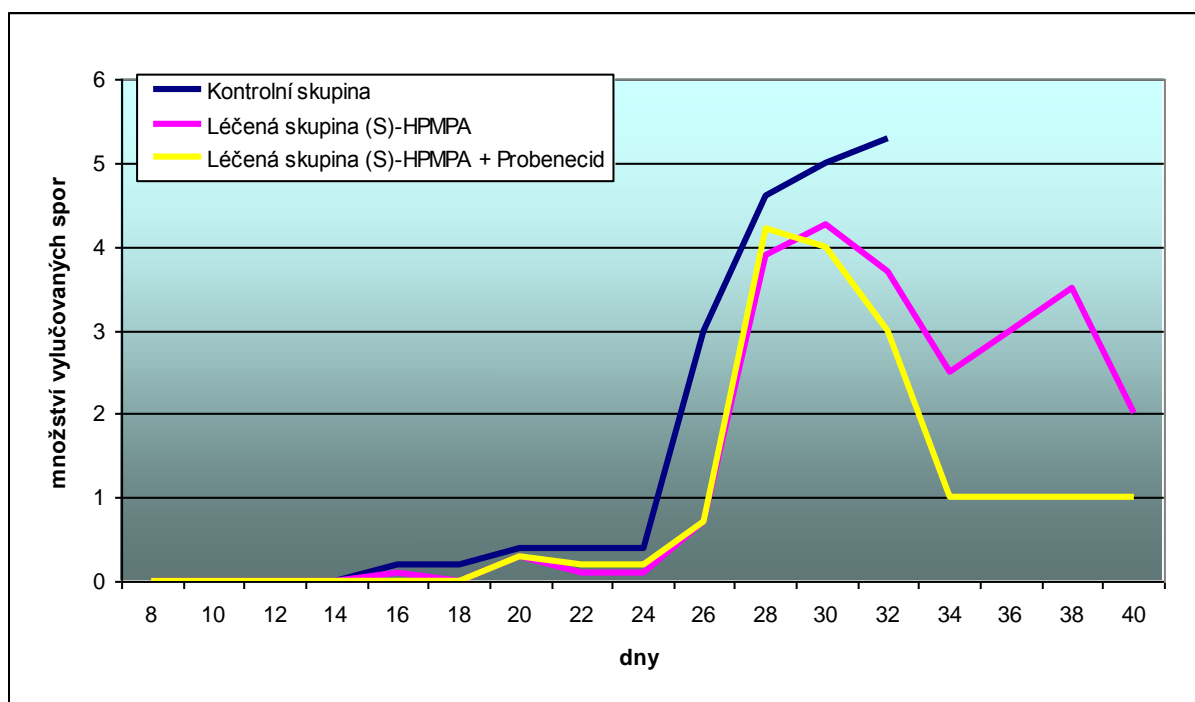
Výsledky statistického vyhodnocení počtu vylučovaných spor dokládají průkazný výsledek. Dokazují, že kontrolní skupina se směřodátně významně liší od skupin, kterým byly

podávané účinné látky. Skupina léčená (S)-HPMPA se oproti skupině, které byl podáván probenecid a (S)-HPMPA významně statisticky neliší. Pomocí statistické analýzy bylo potvrzeno, že (S)-HPMPA průkazně zpomaluje infekci *E. cuniculi*.

Vysvětlivky:

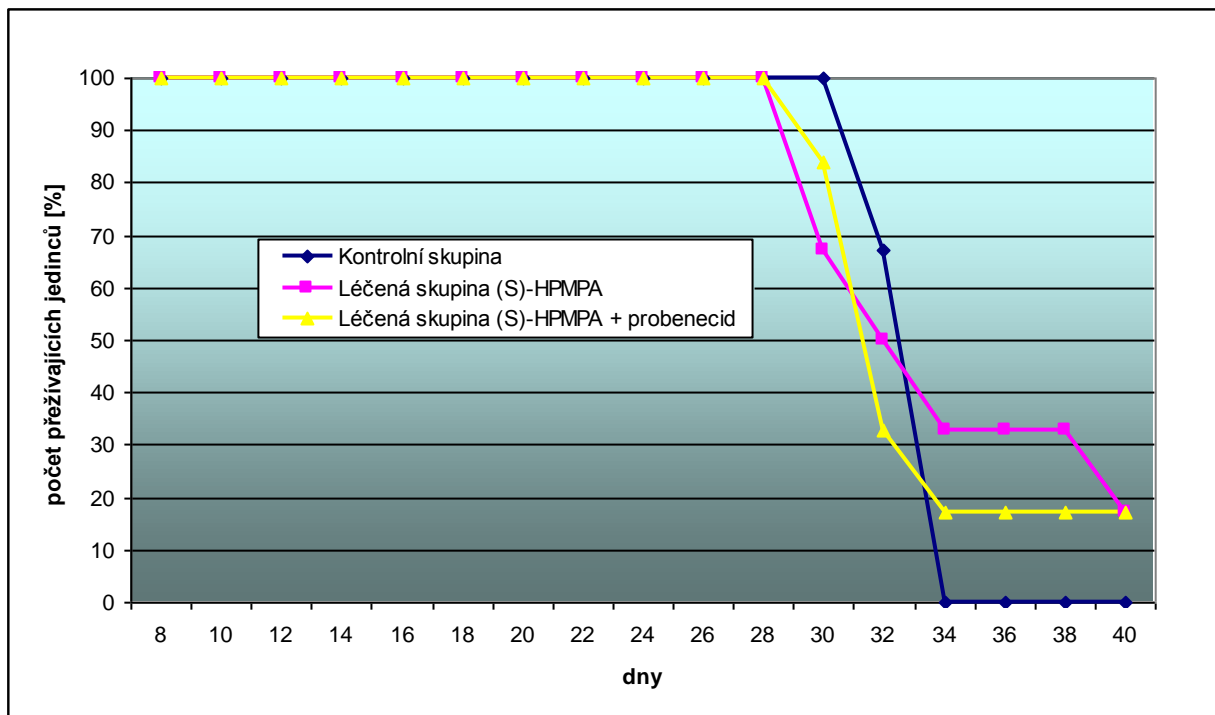
- |                     |   |                            |
|---------------------|---|----------------------------|
| 1.....1-2 spory     | } | množství vylučovaných spor |
| 2.....3-5 spor      |   |                            |
| 3.....6-10 spor     |   |                            |
| 4.....11-20 spor    |   |                            |
| 5.....21-50 spor    |   |                            |
| 6.....50 spor a víc |   |                            |

**Graf č. 2:** Množství spor vylučovaných trusem u SCID myši infikovaných *E. cuniculi* a léčených (S)-HPMPA. Průměrná hodnota ze šesti myši u každé skupiny.

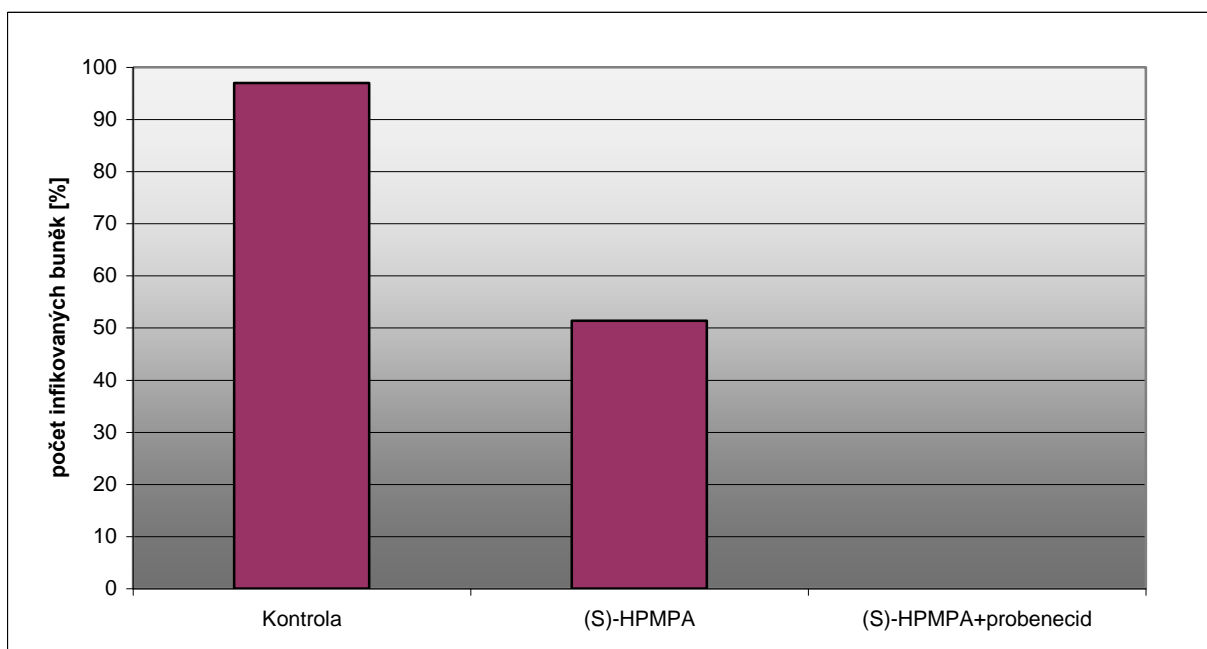




**Graf č. 3:** Přežívání SCID myši infikovaných *E. cuniculi* a léčených (S)-HPMPA. Každá skupina obsahovala šest myší.



**Graf č. 4:** Procento infikovaných makrofágů *E. cuniculi* peritoneálního náplavu přeživších léčených jedinců ve srovnání s kontrolní neléčenou SCID myší.



### 4.3. Vliv probenecidu na snížení cytotoxicity (S)-HPMPA

Z pokusu na tkáňové kultuře vyplývá, že probenecid v koncentraci 0,285 mg/ml působí inhibičně na hostitelské buňky. V koncentraci 0,0285 mg/ml působí probenecid již jen nepříznivě na neinfikované i na infikované buňky, a to jak v čistém mediu, tak v mediu s přídatkem (S)-HPMPA, kde má za následek postupný úbytek infikovaných ale i neinfikovaných hostitelských buněk. Probenecid ve sledovaných koncentracích nijak nezmírňoval cytotoxicitu, spíše naopak ji zvyšoval.

V případě experimentu *in vivo* byl aplikován probenecid o dané koncentraci 0,285 g/kg. Nebylo spolehlivě možné prokázat vliv na snížení indukované nefrotoxicity. Graf 3 ukazuje, že pět z šesti myší léčených (S)-HPMPA s probenecidem uhynulo během pokusu vlivem mikrosporidiové infekce. Jedna myš z této skupiny přežila do konce pokusu, kdy byla usmrcena. Po provedeném peritoneálním výplachu nebyl nalezen žádný napadený makrofág.

### 4.4. Histologické zpracování

Výskyt infekce byl sledován ve vzorcích jater a ledvin.

U všech myší, kromě dvou přeživších léčených jedinců, byla jaterní tkáň napadená mikrosporidii. Na obrázcích 6 a 7 jsou játra myši ze skupiny léčené (S)-HPMPA s probenecidem barvena eosin-hematoxylinem a barvením dle Brown-Brenna. Obrázky 8 a 9 představují játra jedince z kontrolní neléčené skupiny. Všechny zmíněné snímky dokládají pozitivní nález spor mikrosporidií v játrech.

Ve vzorcích ledvin nebyla detekována jediná spora u žádné z usmrcených myší.

Předmětem hodnocení se měly stát také možné známky indukované cytotoxicity (S)-HPMPA. Nefrotoxicita a hepatotoxicita vznikající působením (S)-HPMPA ale nemohly být spolehlivě potvrzeny. Z důvodu nedostatku zkušeností jsem udělala chybu při zpracování histologických preparátů, pravděpodobně při fixaci tkání či došlo k příliš dlouhé prodlevě při odběru vzorků orgánů během pitvy.

## 5. DISKUSE

Historie acyklických nukleosidfosfátů sahá až do sedmdesátých let minulého století. Objev první účinné látky DHPA [(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin] s antivirovou aktivitou nastartoval sérii úspěšných experimentů, při kterých byly vyvinuty další dokonalejší sloučeniny s mnoha příznivými účinky v oblasti virologie (De Clerq et Holý 2005). Mezi tyto preparáty se řadí také (S)-HPMPA s širokým spektrem působení od virů až k prvokům.

(S)-HPMPA úspěšně inhibuje růst malarických plasmodií, *Plasmodium falciparum*, *P. berghei* (De Vries et al. 1991, Smeijsters et al. 1996, Smeijsters et al. 1999, Smeijsters et al. 2000). Inhibiční působení této látky bylo též zaznamenáno u trypanosom, *Trypanosoma brucei rhodesinse*, *T. b. gambiensei*, *T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi* (Kaminsky et al. 1994, Kaminsky et al. 1996, Kaminsky et al. 1998). Botros et al. (2003) dokládají, že (S)-HPMPA tlumí i projevy parazita *Schistosoma mansoni*.

Roučka (1997, 2000) se pokusil zhodnotit možný terapeutický účinek acyklických nukleofosfátů na mikrosporidie. Jeho práce prokázala účinnost (S)-HPMPA v léčbě mikrosporidiózy, ale výsledky potvrdily i očekávanou silnou nefrotoxicitu.

Tato práce navazuje na Roučkovy výsledky. Snažili jsme se maximálně omezit cytotoxicitu (S)-HPMPA jednak perorálním podáváním léku místo intraperitoneálního a jednak současným podáváním dalšího preparátu na snížení indukované nefrotoxicity.

Hledali jsme vhodný preparát, který by účinně snižoval nefrotoxicitu (S)-HPMPA. Selhání činnosti ledvin je způsobeno akumulací některých acyklických nukleofosfátů (zejména (S)-HPMPA a PMEPA) v renálních proximálních tubulech jež zprostředkovává membránový transportní protein lokalizovaný v ledvinách (Andrew et al. 2000). Jako nejvhodnější se jevil probenecid, který je kompetitivní inhibitor organického aniontového transportu v proximálních tubulárních epiteliálních buňkách (Polis et al. 1995). Podle Bijsterboscha et al. (1998) aplikace probenecidu před podáním (S)-HPMPA snižuje její absorpci ledvinou i jaterní tkání o 75 %..

Smeijsters et al. (1996) se ve své práci zabývali toxickým efektem a antimalarickým působením odlišných režimů podávání (S)-HPMPA v přítomnosti a nepřítomnosti probenecidu. V první polovině experimentu byla zaznamenána redukce parazitémie i ANP indukované cytotoxicity. V druhé části se však začala hladina parazitémie zvyšovat a rostla až do konce pokusu navzdory doprovodné léčbě (S)-HPMPA. U myší léčených pouze (S)-

HPMPA se parazitémie snižovala do té doby než uhynuly v důsledku ANP indukované nefrotoxicity. Počáteční pokles hladiny parazitémie byl způsoben extrémně krátkým poločasem rozpadu (S)-HPMPA v plasmě. Náhlý nárůst hladiny parazitémie v druhé polovině pokusu zůstává zcela neobjasněn.

Acyklické nukleofosfáty se uplatňují při replikaci a transkripci virů i dalších protozoárních parazitů s krátkou generační dobou. Vzhledem k jejich krátkému poločasu rozpadu tudíž neovlivňují hostitelský organismus. V tkáňové kultuře je ale generační doba hostitelských buněk srovnatelná s generační dobou mikrosporidií. To znamená, že lze očekávat inhibiční účinek i na neinfikované buňky. Na tkáňové kultuře bylo prokázáno, že (S)-HPMPA průkazně potlačuje mikrosporidiovou infekci. Z toho byl nejvýraznější inhibiční účinek na mikrosporidie zaznamenán v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ , která je ale nevhodná pro aplikaci *in vivo*. Současně však byl zaznamenán i významný nežádoucí cytotoxický účinek na neinfikované buňky ve všech zkoumaných koncentracích.

V našem případě se probenecid v předpokusu na tkáňové kultuře projevil silně inhibičně. Proto byla koncentrace v pokusu snížena o desetinu miligramu. Tato koncentrace se již zdála vhodnější, ale nežádoucí úbytek neinfikovaných buněk byl stále významný.

V experimentu na SCID myších byla infekční dávka podávána perorálně. Při této aplikaci parazit infikuje nejprve střevní sliznice a poté diseminuje do dalších orgánů. Proto bylo zpočátku možné rozvoj infekce měřit počtem spor v trusu. Léčba byla prováděna taktéž perorálně. (S)-HPMPA tak měl zabránit počáteční infekci střevních buněk, byl ale metabolizován pomaleji než při intraperitoneální aplikaci. Perorální podávání žaludeční sondou v izolátoru je složitější a hrozí poškození jícnu, ale v případě skutečné terapeutické praxe je perorální aplikace mnohem výhodnější a šetrnější pro pacienta.

Z výsledků pokusu *in vivo* vyplývá, že (S)-HPMPA průkazně zpomalil infekci *E. cuniculi*, což se projevilo v množství vylučovaných spor v období mezi 16. DPI a 19. DPI. 20. DPI se intenzita vylučovaných spor srovnala ve všech sledovaných skupinách. Léčené myši začaly hynout dříve než myši v kontrolní skupině. Všichni uhynulí léčeni jedinci těsně před smrtí vylučovali velké množství spor v trusu. Není proto možné předpokládat, že by uhynuli následkem cytotoxicity způsobené ANP. Toto tvrzení ovšem nelze dokázat, protože histologické preparáty neumožnily vyhodnotit potenciální známky cytotoxicity. Z výsledků lze usoudit, že léčba (S)-HPMPA zpomalil průběh mikrosporidiové infekce, ale doprovodné negativní účinky této látky na samotného hostitele mohly způsobit poškození hostitelského organismu, který se tak stal oslabenější a snadněji podlehl působení parazita. 40 DPI zůstaly

naživu dvě myši, jedna ze skupiny léčené (S)-HPMPA a druhá ze skupiny léčené probenecidem a (S)-HPMPA. Důvodem by patrně mohla být hraniční koncentrace účinnosti (S)-HPMPA. Tento preparát by se ale ani za těchto okolností nejevil jako vhodný pro další chemoterapeutické účely, jelikož rozmezí účinnosti by bylo příliš malé. Jinou alternativou, jak vysvětlit přežití dvou infikovaných léčených pokusných zvířat, z nichž jedno vykazovalo velmi nízkou hladinu parazitémie, by mohl být výskyt leaky *scid* myši. Leaky *scid* myši se objevují ve 2-23 % v populaci *scid* myši. U těchto jedinců se objevuje omezený počet B a T lymfocytů, které způsobují návrat ztracené imunity (Bosma et al. 1988).

Perorální aplikace mohla snížit účinnost (S)-HPMPA v pokusu *in vivo*. De Clerq et al. (1989) ve svém výzkumu dokázali, že (S)-HPMPA je přibližně dvacetkrát aktivnější proti virové vaccinii při podávání parenterální (intraperitoneální nebo subkutánní) cestou ve srovnání s orální aplikací. Roučka (2000) i Smeijsters et al. (1996) podávali myším (S)-HPMPA ve stejné koncentraci intraperitoneálně a zaznamenali úhyn jedinců vlivem nefrotoxicity.

Na SCID myších měly být známky nefrotoxicity detekovatelné v histologicky zpracovaných vzorcích tkání. Pokusila jsem se vzorky histologicky zpracovat a vyhodnotit, ale vlivem chybné fixace a pravděpodobně dlouhé prodlevě při odebírání vzorků orgánů je nebylo možné odpovědně odečíst. Vzorky pro tentokrát slouží jen jako ilustrační. Lze v nich ale pozorovat masivní mikrosporidiovou nákazu.

Ačkoli probenecid prokázal účinnost při potlačení nefrotoxicity *in vivo* (Polis et al. 1995) a je běžně podáván současně s cidofovirem (Lacy et al. 1998, Bagnis et al. 1999), jeho užívání vyžaduje relativně vysoké dávky, které jsou často doprovázeny gastrointestinální intolerancí a dalšími nepříznivými účinky (Andrew et al. 2000). Výsledky experimentu *in vitro* potvrzují negativní vedlejší účinky probenecidu a tak podporují myšlenku ustoupit od podávání probenecidu. Andrew et al. (2000) testovali další látky ve snaze nalézt preparát, který by nevyžadoval tak vysokou léčebnou dávku jako probenecid a působil by příznivě na snižování cytotoxicity ANP. Slibné účinky byly zaznamenány u diflusinalu, ketoprofenu, flurbiprofenu, diclofenacu, ibuprofenu, indomethacinu, naproxenu. Ketoprofen a naproxen se ukázaly dvakrát až třikrát efektivnější než probenecid. Andrew et al. (2000) předpokládali další upřesnění v *in vivo* studiích, které by stanovily správné terapeutické dávky těchto preparátů.

Výsledky této práce ukázaly, že (S)-HPMPA je proti mikrosporidii *E. cuniculi* do určité míry účinný. Ne však dostatečně, jelikož způsob léčby zcela neinhiboval tohoto

parazita. Nejlepším řešením, jak efektivně léčit mikrosporidiózu, je soustředit pozornost na léčbu choroby AIDS nukleosidickými virostatiky a případně i dalšími chemoterapeutiky. Tímto způsobem by se mohlo docílit inhibice viru HIV a dojít k posílení imunitního systému, který by byl odolnější vůči oportunním parazitům jako jsou mikrosporidie.

## 6. ZÁVĚRY

1. (S)-HPMPA v *in vitro* pokusu zpomalil infekci mikrosporidie *E. cuniculi*, ale nedošlo k inhibici úplné.
2. Probenecid způsobil hynutí infikovaných i neinfikovaných buněk v tkáňové kultuře a jeho případný vliv na snížení cytotoxicity tak nemohl být prokázán.
3. U infikovaných SCID myší (S)-HPMPA zpomalil infekci, což se projevilo úbytkem spor v trusu a makrofázích. Působení tohoto acyklického nukleofosfátu ale doprovázely nepříznivé účinky na samotný hostitelský organismus vlivem kterých léčeni jedinci podlehli mikrosporidiové infekci dříve než jedinci kontrolní neléčené skupiny.
4. Acyklický nukleosidfosfát (S)-HPMPA se nejeví jako vhodné terapeutikum k léčbě mikrosporidiózy *E. cuniculi*, protože jeho koncentrace inhibující mikrosporidii se blíží koncentraci toxické pro hostitele.

## 7. LITERATURA

**Andrew S.M., Edmund S.H., Cihlar T., 2000:** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs efficiently reduce the transport and cytotoxicity of adefovir mediated by the human renal organic anion transporter 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 10-15

**Bagnis C., Izzidine H., Deray G., 1999:** Renal tolerance of cidofovir. *Therapie* 54: 689-691

**Bijsterbosch M.K., Smeijsters L.J.J.W., Berkel T.J.C., 1998:** Disposition of the Acyclic Nucleoside Phosphonate (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1146-1150

**Bosma G.C., Cluster R.P., Bosma M.J., 1983:** A severe combined deficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530

**Bosma G.C., Fried M., Custer R.P., Carroll A., Gibson D.M., Bosma M.J., 1988:** Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) *scid* mice. *J. Exp. Med.* 167: 1016-1033

**Botros S., William S., Hammam O., Zidek Z., Holý A., 2003:** Activity of 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine against *Schistosomiasis mansoni* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3853-3858

**Canning E.U., Lom J., 1986:** The microsporidia of vertebrates. Academic Press, New York. 285 pp.

**De Clerq E., 2007:** Acyclic nucleoside phosphonates: Past present and future. *Biochem. Pharmacol.* 73: 911-922

**De Clerq E., Holý A., 2005:** Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 928-940

**De Clerq E., Holý A., Rosenberg I., 1989:** Efficacy of Phosphonylmethoxyalkyl Derivates of Adenine in Experimental Herpes simplex Virus and Vaccinia Virus Infections *In Vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 185-191



**De Clerq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P.C., 1986:**

A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature* 323: 464-467

**De Vries E., Stam J.G., Franssen F.J.J., Nieuwenhuijs H., Chavalitsheewinkoon P., De Clerq E., Overdulve J.P., Vliet P.C., 1991:** Inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* by the DNA polymerase inhibitor HPMPA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47: 43-50

**Didier E.S., Varner P.W., Didier P.J., Aldras A.M., Millichamp N.J., Murphey-Corb M., Bohm R., Shadduck J.A., 1994:** Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol.* 41: 1-11

**Didier E.S., Vossbrinck C.R., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., Shadduck J.A., 1995:** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111: 411-422

**Didier E.S., Viesvara G.S., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., DeGroot M.A., Vossbrinck C.R., 1996:** A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to the *Encephalitozoon cuniculi* strain III originally isolated from domestic dogs. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2835-2837

**Didier E.S., Snowden K.F., Shadduck J.A., 1998:** Biology of Microsporidian Species Infecting Mammals. *Adv. Parasitol.* 40: 283-320

**Ditrich O., Kučerová Z., Koudela B., 1994:** In vitro sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* and *E. hellem* to Albendazole. *Gen. Euk. Microbiol.:* 37S

**Franzen C., 2005:** How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol.* 52: 36-40

**Franzen C., Müller A., 2001:** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* 3: 389-400

**Holý A., 2003a:** Acyklické nukleosidfosfonáty: Představy a skutečnost. 23 pp. (habilitační řízení)

**Holý A., 2003b:** Phosphonomethoxyalkyl analogs of nucleotides. *Curr. Pharmac. Des.* 9: 2567-2592

**Kaminsky R., Nickel B., Holý A., 1998:** Arrest of *Trypanosoma brucei thodesiense* and *T. brucei brucei* in the S-phase of the cell cycle by (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine ((S)-HPMPA). *Mol. Biochem. Parasitol.* 93: 91-100

**Kaminsky R., Schmid C., Grether Y., Holý A., De Clerq E., Naesens L., Brun R., 1996:** (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenin [(S)-HPMPA]: a purine analogue with trypanocidal activity *in vitro* and *in vivo*. *Trop. Med. Int. Health* 1: 255-263

**Kaminsky R., Zweggarth E., De Clerq E., 1994:** Antitrypanosomal activity of phosphonylmethoxyalkylpurines. *J. Parasitol.* 80: 1026-1030

**Koudela B., Vítovec J., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J., 1993:** The severe combined immunodeficient mouse as model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia parasitol.* 40: 279-286

**Koudela B., Lom J., Vítovec J., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J., 1994:** *In vivo* efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *J. Euk. Microbiol.* 41: 49-50

**Lacy S.A., Hitchcock M.J.M., Lee W.A., Tellier P., Cundy K.C., 1998:** Effect of oral Probenecid Coadministration on the Chronic Toxicity and Pharmacokinetics of Intravenous Cidofovir in Cynomolgus Monkeys. *Toxicol. Sci.* 44: 97-106

**Matsubayashi H., Koike I., Mikata I., Takei H., Higihara S., 1959:** A case of *Encephalitozoon*-like infection in a man. *Arch. Pathol.* 67: 181-187

**Nägeli K., 1857:** Über die neue Krankheit die Seidenraupe unde verxandet Organismen, *Bot. Zeitung.* 15: 760-761

**Peyretilade E., Broussolle V., Peyret P., Méténier G., Gouy M., Vivare C.P., 1998:** Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol. Biol. Evol.* 15: 683-689

**Polis M.A., Spooner K.M., Baier B.F., Manischewitz J.F., Jaffe H.S., Fisher P.E., Faloon J., Davey R.T., jr, Kovací J.A., Walker R.E., Whitcup S.M., Nussenblant R.B., Lane H.C., Masur H., 1995:** Anticytomegaloviral activity and safety of cidofovir in patients with human immunodeficiency virus infection and cytomegalovirus viraemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 882-886

**Roučka D., 1997:** Účinky acyklických nukleofosfátů na mikrosporidie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta: 25 pp. (bakalářská práce)

**Roučka D., 2000:** Působení (S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)adeninu [(S)-HPMPA] na mikrosporidie v *in vivo* modelu *Encephalitozoon cuniculi* – SCID myš. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta: 73 pp. (magisterská práce)

**Shadduck J.A., 1969:** *Nosema cuniculi*: *in vitro* isolation. *Science* 166: 516-517

**Shadduck J.A., Polley M.B., 1978:** Some factors influencing the *in vitro* infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Protozool.* 25: 491-496

**Smeijsters L.J.J.W., Franssen F.F.J., Naesens L., De Vries E., Holý A., Balzarini J., De Clercq E., Overdulve J.P., 1999:** Inhibition of the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* by acyclic nucleoside phosphonates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 12: 53-61

**Smeijsters L.J.J.W., Nieuwentuijs H., Hermsen R.C., Dorrestein G.M., Franssen F.F.J., Overdulve J.P., 1996:** Antimalarial and toxic effects of the acyclic nucleoside phosphonate (S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonylmethoxypropyl)adenine in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1584-1588

**Smeijsters L.J.J.W., Zijlstra N.M., Veenstra J., Verstrepen B.E., Heuvel C., Overdulve J.P., De Vries E. 2000:** *Plasmodium falciparum* clones resistant to (S)-9-(3-hydroxy-2-

phosphonylmethoxy-propyl)adenine carry amino acid substitutions in DNA polymerase  $\delta$ .  
Mol. Biochem. Parasitol. 106: 175-180

**Smeijsters L.J.J.W., Zijlstra N.M., De Vries E., Franssen F.F.J., Janse Ch.J., Overdulve J.P. 1994:** The effect of (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine on nuclear and organellar DNA synthesis in erythrocytic schizogony in malaria. Mol. Biochem. Parasitol. 67: 115-124

**Vávra J., Ditrich O., Koudela B., 1996:** Failure of chitin synthetase inhibitor Lufenuron to block the development and spore formation of microsporidia. Joint meeting of The American Society of parasitologist & Society of Protozoologists, Tucson, AZ, June 11-15: 262

**Vávra J., Larsson J.I.R., 1999:** Structure of the microsporidia, pp.7-84, Wittner M., Weiss L. (eds): The microsporidia and microsporidiosis. Am. Soc. Microbiol., Washington DC, 553 pp.

**Vossbrinck Ch.R., Debrunner-Vossbrinck B.A., 2005:** Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. Folia Parasitol. 40: 131-142

**Weber R., Bryan R.T., Schwartz D.A., Owen R.L. 1994:** Human Microsporidial Infections. Clin. Microb. Rev. 7: 426-461

**Wright J.H., Craighead E.M., 1922:** Infectious motor paralysis in young rabbits. J. Exp. Med. 36: 135-140

## **8. PŘÍLOHY**