

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



**Testování účinků *o*-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů proti
leishmaniím**

Magisterská diplomová práce 2010

Autor: Bc. Linda Matoušová

Školitel: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Školitel specialista: Prof. RNDr. Antonín Holý, DrSc., dr.h.c. mult.

Matoušová L., 2010: Testování účinků analogů *o*-fosfonatomethylcholinu proti leishmaniím. [Testing of effects of the *o*-phosphonomethylcholine and its analogues against *Leishmania*. Mgr. Thesis, in Czech] – 46 pp., Faculty of Science, The University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The term leishmaniasis can be used to define a group of diseases caused by the *Leishmania* genus. Human infection may be entirely unapparent or sub-clinical or it may display a spectrum of manifestations ranging from cutaneous involvement through to the late destruction of the mucous membranes and on to a generalised systemic visceral disease with a fatal outcome. Phosphatidylcholine is the most abundant phospholipid in this parasite's membranes. The metabolic pathways leading to biosynthesis are likely to play a critical role in the parasite's development and survival and may offer a good target for antileishmanial chemotherapy. Phosphatidylcholine synthesis requires the transportation of a choline precursor from the host. This choline transportation into *Leishmania* is highly specific for choline and is inhibited by phosphocholine analogues and choline analogues. The aim of this study was to test the effects of the analogues of *o*-phosphonomethylcholine and the analogues of phosphocholine for antileishmanial activity.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a rad školitele.

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Bc. Linda Matoušová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Petru Volfovi, CSc. a Mgr. Lucii Ječné z Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy za poskytnutí materiálu, odborné konzultace a všestrannou pomoc.

Můj velký dík patří i Prof. RNDr. Antonínu Holému, DrSC., dr.h.c. mult. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze, který mi laskavě poskytl analogy *o*-fosfonatomethylcholinu potřebné k uskutečnění pokusů. Zároveň bych ráda poděkovala i skupině jeho spolupracovníků, kteří mi byli ochotně připraveni pomoci. Jmenovitě pak Bc. Elišce Procházkové.

Neméně bych pak chtěla poděkovat Mgr. Janu Okrouhlíkovi za pomoc se statistickým zhodnocením dat a jejich interpretací.

Dále bych ráda poděkovala kolektivu laboratoře Veterinární a lékařské parazitologie v Českých Budějovicích v Biologickém centru Akademie věd České republiky, jmenovitě pak RNDr. Daně Květoňové, doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. a RNDr. Bohumilu Sakovi Ph.D., za podnětné a přátelské pracovní prostředí. Můj dík patří i doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za cenné rady a čas, který věnoval mojí práci.

Nakonec bych ráda poděkovala rodině a přátelům za dlouhodobou podporu a pomoc při studiu.

Obsah:

1. Cíl práce	6
2. Úvod	7
2.1. Rod <i>Leishmania</i>	7
2.2. Životní cyklus leishmanií	7
2.3. Geografické rozšíření	9
2.4. Vektoři leishmaniózy	10
2.5. <i>Leishmania major</i>	10
2.6. Patogeneze	11
2.6.1. Leishmanióza	11
2.6.2. Klinické příznaky	12
2.6.3. Infekce a role imunitního systému	13
2.7. Diagnóza	14
2.7.1. Etiologická diagnóza	14
2.7.2. Sérologická diagnóza	14
2.8. Léčba a prevence	15
2.8.1. Vakcíny a INF- γ	15
2.8.2. Chemoterapie	15
2.8.2.1. Sloučeniny pětímocného antimonu	15
2.8.2.2. Amfotericin B	16
2.8.2.3. Pentamidin	17
2.8.2.4. Paromomycin	17
2.8.2.5. Fluconazol	18
2.8.2.6. Miltefosin	18
2.8.2.7. Kombinovaná léčba	19
2.8.2.8. Analogy <i>o</i> -fosfonatomethylcholinu	21
2.9. Inhibiční koncentrace	22
3. Použitý materiál a metody	23
3.1. Použité organismy	23
3.2. Použité chemikálie	23
3.3. <i>In vitro</i> kultivace <i>Leishmania major</i>	24
3.4. <i>In vivo</i> kultivace <i>Leishmania major</i>	25
3.5. Zmrazování promastigotů	25

3.6. Testování cytotoxicity analogů <i>o</i> -fosfonatomethylcholinu	26
3.6.1. Stanovení IC ₅₀ pomocí přímého počítání v Bürkerově komůrce	26
3.6.2. Nepřímé stanovení IC ₅₀ pomocí konverze XTT	26
3.6.3. Stanovení IC ₅₀	27
3.7. Statistické vyhodnocení	27
4. Výsledky	28
4.1. Stanovení IC ₅₀ pomocí přímého počítání v Bürkerově komůrce	28
4.2. Nepřímé stanovení IC ₅₀ pomocí konverze XTT	30
5. Diskuze	35
6. Závěr	40
7. Seznam použitých zkratk	41
8. Literatura	42

1. Cíl práce

Cílem této práce bylo prozkoumat antileishmaniální účinky *o*-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů a pro účinné látky určit IC_{50} , tedy koncentraci mající za následek padesátiprocentní snížení růstu kultury ve vztahu ke kontrolnímu vzorku.

Tato aktivita byla testována *in vitro* na promastigotech *Leishmania major* u *o*-fosfonatomethylcholinu (H-3488) a jeho pěti analogů (H-3504, H-3508, H-3519, H-3521 a H-3565) získaných od prof. RNDr. Antonína Holého, DrSc., dr.h.c. mult. z ÚOCHB AV ČR. U těchto látek se na základě jejich chemického složení, které se velmi podobá současně užívanému léku miltefosinu (tj. hexadecylesteru fosfocholinu), předpokládalo, že budou mít antileishmaniální účinek.

2. Úvod

Rod *Leishmania* zahrnuje organismy cirkulující mezi obratlovci a přenašeči, kterými jsou flebotomové. Leishmanie způsobují parazitární infekci, která začíná v kůži, kde může být lokalizována po celou dobu onemocnění (kožní leishmaniózy), nebo přestupuje do sliznic (leishmaniózy kožně-slizniční, muko-kutánní) nebo zasahuje vnitřní orgány - mízní uzliny, slezinu, játra a kostní dřeň (leishmaniózy útrobní, viscerální).

Ačkoli viscerální leishmanióza není zařazena mezi významné infekce způsobující globálně ohrožující onemocnění, jde v endemických oblastech o život ohrožující onemocnění značného zdravotnického, společenského a ekonomického významu. Způsobuje epidemie u neimunních obyvatel, zejména těch, kteří již trpí následky válek, sucha, hladomoru a ekonomické migrace (Guerin *et al.* 2002).

Leishmanióza je rozšířena v tropických a subtropických oblastech. Nakaženo je 12 milionů lidí, přičemž asi 1,5 milionu nových případů přibývá každým rokem (Agrawal *et al.* 2006). Vzhledem k nástupu rezistence na již používaná léčiva a jejich značným vedlejším účinkům je nutné vyvíjet nové látky, které by potencionálně mohly být použity jako lék proti leishmaniózám.

2.1. Rod *Leishmania*

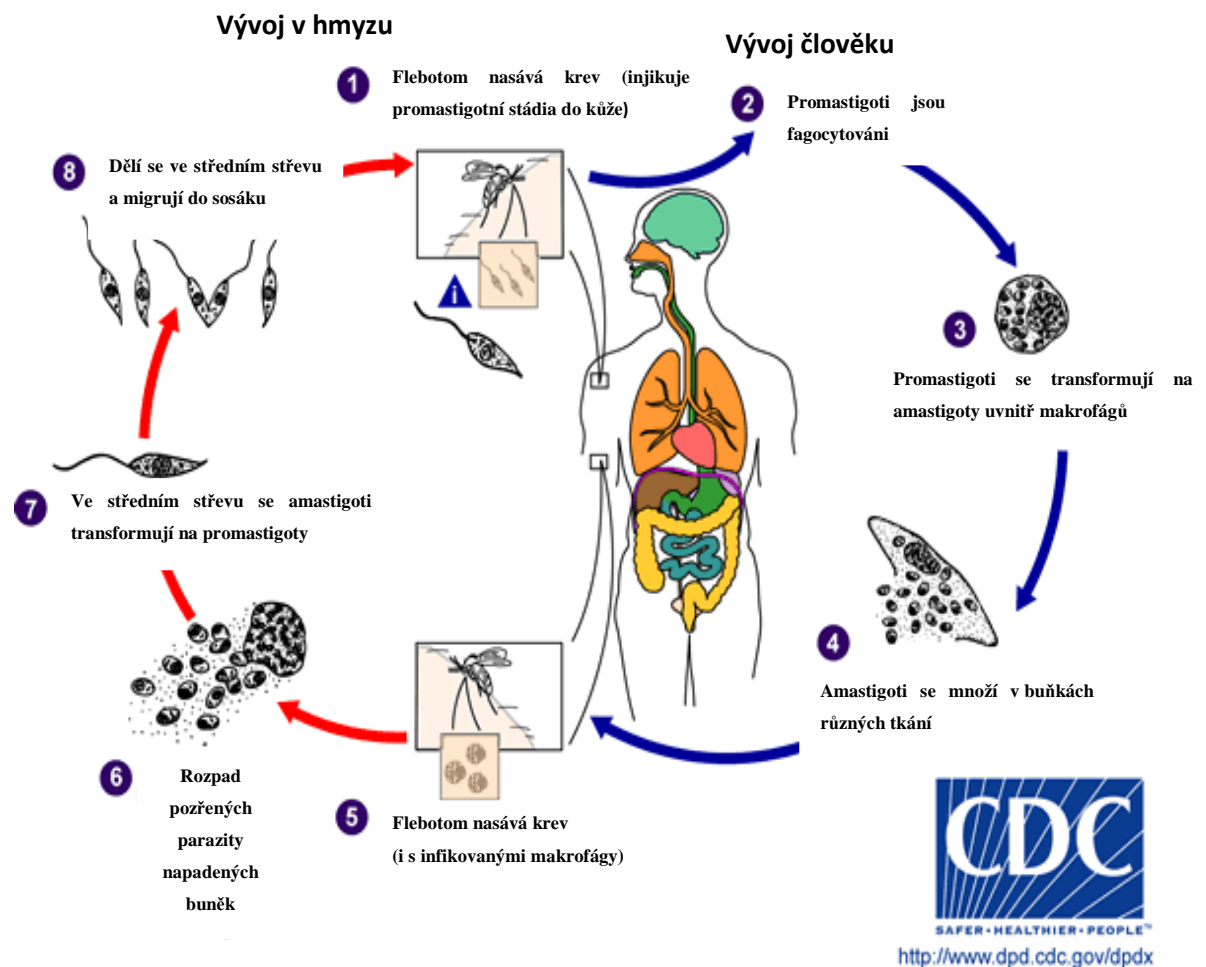
Leishmania (česky ničivka) je rod parazitických prvoků z řádu Trypanosomatida patřící do třídy Kinetoplastida, což je třída eukaryotních diploidních organismů patřících do kmene Euglenozoa. Svůj název získala díky charakteristické jediné protáhlé mitochondrii zvané kinetoplast. Do této skupiny trypanosomatid patří dva parazitologicky významné rody: *Trypanosoma* a *Leishmania* (Čepička *et al.* 2007).

Leishmania je metagenetický parazit, který se vyskytuje jako bičíkatý, extracelulární promastigot v hmyzím hostiteli a jako nepohyblivý, intracelulární amastigot uvnitř makrofágů a retikuloendoteliálních buněk savčího hostitele (Boitz *et al.* 2006). Jak uvádí Handman, amastigoti mají velikost 2 - 4 μm , zatímco promastigoti přibližně 20 μm (Handman 2001).

2.2. Životní cyklus leishmanií

Rezervoárem nákazy jsou lidé (antroponotický cyklus) a domestikovaná nebo divoká zvířata (zoonotický cyklus), (Dejseux 1992). Když se na nich krev sající hmyz čeledi

Psychodidae (*Phlebotomus* a *Lutzomyia*) začne krmit, infikuje se parazity v krevním řečišti nebo makrofágy z kůže (Alvar *et al.* 1997), (Obr. 1).



Obr. č. 1. Životní vývojový cyklus leishmanií (upraveno podle www.dpd.cdc.gov/dpdx 3.11.2009).

Transformace amastigotů na promastigoty začíná během několika hodin po nasátí flebotomem. Ke kompletní transformaci dochází v průběhu 24 - 48 hodin. Dále probíhá binární dělení.

Zralá metacyklická stádia se následně hromadí ve středním a předním střevu hmyzu. Flebotom přenáší infekci během dalšího krmení krví na stejném nebo jiném hostitelském druhu (Sharma *et al.* 2008). Savčí hostitel může působit jako přenašeč bez toho, aby se u něj projevil příznaky onemocnění (Alvar *et al.* 2006).

K nákaze dochází jak při sání krve, tak při tzv. probingu, kdy během snahy o nalezení kapiláry vypouští hmyz do kůže spolu s malým množstvím slin také infekční stádia leishmanií (Mirhál *et al.* 2005). Samičky infikované leishmaniemi mají potíže

s polykáním potravy, proto v průběhu krmení krví provádějí probing několikrát (Molyneux *et al.* 1986).

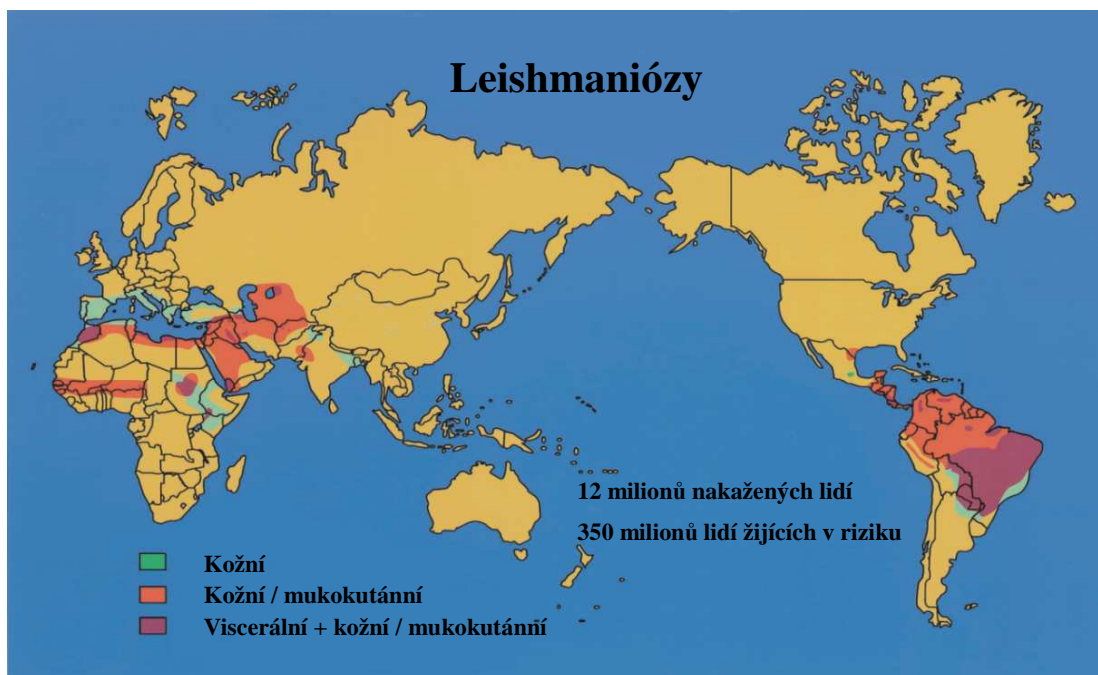
Metacyklická stádia jsou po vyvrhnutí flebotomem pohlcována makrofágy, dendritickými nebo jinými buňkami (Real *et al.* 2008). Uvnitř těchto buněk pak dochází k rychlé transformaci z promastigotního do amastigotního stádia. Promastigoti se transformují na amastigoty během 12 - 24 hod po inokulaci (Sharma 2008).

Fagozom, ve kterém je amastigot v makrofágu uzavřen, pak fúzuje s lysozomy za vzniku fagolysozomu. Amastigoti jsou odolní proti zničení ve fagolysozomu (enzymaticky inhibují produkty respiračního vzplanutí, jako je peroxid vodíku, superoxid aj.), optimum jejich růstu je při nízkém pH. V makrofágu dochází k jejich množení (Čepička *et al.* 2007). Po jeho rozpadu jsou amastigotní stádia uvolněny a napadají další makrofágy (Bogan *et al.* 1999).

Většina leishmanióz jsou zoonózy, kde lidé jsou jen náhodnými hostiteli v životním cyklu patogenního parazita (Grimaldi *et al.* 1993).

2.3. Geografické rozšíření

Leishmaniózy jsou rozšířené v 88 zemích světa, postihují odhadem 12-14 milionů lidí se zhruba 1,5-2 miliony nových případů ročně (Alvar *et al.* 2006), (Obr.2.)



Obr. 2. Mapa světa znázorňující oblasti s kožní, viscerální a mukokutánní leishmaniózou (Handman 2001).

V současnosti mají leishmaniózy nepochybně širší geografickou distribuci než dříve a jsou hlášeny z předtím neendemických oblastí (Weekly epidemiological report WHO 2008). Ve střední Evropě je toto parazitární onemocnění popisováno převážně u lidí, kteří pobývali v endemických oblastech (Středozevní moře, Itálie, Španělsko aj.) (Mirhál *et al.* 2005).

2.4. Vektoři leishmaniózy

Hmyzími přenašeči jsou flebotomové rodu *Phlebotomus* a *Lutzomyia* (Čepička *et al.* 2007). Je známo přibližně 700 druhů flebotomů, ale jen 10 % z nich slouží jako vektor pro leishmanie (Rassi *et al.* 2009). Samičky flebotomů potřebují krev proto, aby získaly proteiny důležité pro vývoj vajíček (Sharma *et al.* 2008).

V hmyzím vektoru, v němž jsou leishmanie vázány na trávicí trakt, se transformují řadou fyziologicky a morfologicky odlišných fází. K přeměně dochází v průběhu migrace z trávené krevní potravy k ektoperitrofickému prostoru a pak dopředu z břišní části středního střeva ke stomodeální valvě (Ječná *et al.* 2009).

Anatomie trávicího ústrojí přenašeče a lokalizace vývoje parazita v rámci traktu hrají důležitou roli. Trávicí trubice hmyzu je tvořena třemi částmi: přední, střední a zadní střevo. Spojení mezi předním a středním střevem se nachází v místě, kde je epitel středního střeva spojen se stěnou jícnu. U dvoukřídlých, kam patří i komáři a flebotomové, se tato složitá struktura nazývá kardia a skládá se ze stomodeální valvy a většiny přední části středního střeva. Hlavní úlohou stomodeální valvy je zajistit jednosměrný pohyb potravy během krmení a prevenci poruchy motility střevního obsahu. Paraziti kolonizující přední části střeva omezují tok trávené krve a způsobují zpětný pohyb potravy obsahující metacyklická stádia a ve výsledku jejich vyvržení do kůže hostitele. Kromě toho se paraziti v oblasti kardiie zachycují a tvoří viskózní gelu podobnou zátku, která se podílí na blokaci stomodeální valvy (Volf *et al.* 2004).

2.5. *Leishmania major*

Leishmania major je původcem zoonotické kožní leishmaniózy (vlhký vřed). Vyskytuje se v Africe, Asii, na Blízkém a Středním východě. Typickým místem, kde se lze nakazit, jsou aridní, polopouštní oblasti s řídkou vegetací obývané norovými hlodavci. Onemocnění se projevuje jako mokvající vřed, který se vyhojí za 3-6 měsíců.

Rezervoárem onemocnění jsou drobní hlodavci (např. pískomilové), v jejichž norách se flebotomové vyvíjejí (Čepička *et al.* 2007).

2.6. Patogeneze

2.6.1. Leishmanióza

V lidských nálezích leishmaniemi se uplatňují komplexy 6-7 druhů s 15-20 poddruhy (Čepička *et al.* 2007), (Tabulka 1).

Kožní léze, jež se samy vyléčí, jsou způsobeny druhy *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* a několika poddruhy *L. mexicana*. Nicméně kmeny, které jsou běžně dermatotropické, mohou migrovat do spádových lymfatických uzlin a mohou dokonce visceralizovat (Handman 2001). Faktory ovlivňující, zda infekce zůstane asymptomatická nebo progreduje do obrazu viscerální leishmaniózy, nejsou dodnes kompletně objasněny (Mirhál *et al.* 2005).

Kromě výše zmíněných existují tři druhy leishmanií vyznačující se nekompenzačním hojením kutánního onemocnění: *L. tropica*, *L. aethiopica* a *L. mexicana amazonensis* (Handman 2001).

Tabulka 1. Druhy leishmanií patogenní pro člověka, jejich vektorů, hostitelů a projev onemocnění (Handman 2001).

druh	Spektrum hostitelů	Hlavní vektor	Prezentace onemocnění
<i>L. donovani</i> komplex	pes, hlodavci žijící v savaně, člověk	<i>P. argentipes</i> , <i>L. longipalpis</i>	viscerální (kala-azar)
<i>L. major</i>	hlodavci žijící v poušti a savaně: <i>Rhombomys</i> , <i>Psammomys</i> , <i>Arvicanthis</i>	<i>P. papatasi</i>	kutánní
<i>L. tropica</i>	člověk	<i>P. sergenti</i>	kutánní, viscerální
<i>L. aethiopica</i>	daman skalní	<i>P. longipes</i>	kutánní, difúzní kutánní
<i>L. braziliensis</i> komplex	lenochod, pes	<i>L. umbratilis</i> mnoho dalších	kutánní, muko-kutánní
<i>L. mexicana</i> komplex	hlodavci žijící v lese	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. olmeca</i>	kutánní, difúzní kutánní

2.6.2. Klinické příznaky

Klinické spektrum leishmanióz zahrnuje subklinické (inaparentní infekce) a symptomatické infekce (kožní, slizniční nebo viscerální). Symptomatické infekce mohou probíhat subakutně nebo chronicky a výsledné projevy mohou být rozmanité (Murray *et al.* 2005). Leishmanie mohou stimulovat různé typy zánětlivých reakcí a to způsobem, který vyvolává různé klinické a patologické formy nemoci (Grimaldi *et al.* 1993).

Infekce vždy začíná v kůži, kde může být lokalizovaná po celou dobu onemocnění (kožní leishmaniózy) nebo přestupuje do sliznic (leishmaniózy kožně-slizniční, muko-kutánní), či po prakticky zanedbatelné kožní fázi leishmanie zasahují vnitřní orgány: mízní uzliny, slezinu, játra, kostní dřeň (leishmaniózy útrobní, viscerální).

Mezi základními vyjmenovanými leishmaniózami existuje mnoho přechodných forem, daných často vlastnostmi určitého kmene parazita a momentální souhrou onemocnění s obrannými mechanismy hostitele (Čepička *et al.* 2007).

Viscerální leishmanióza (VL) způsobuje v méně rozvinutých zemích mnoho úmrtí (Guerin *et al.* 2002). Jestliže je neléčená, končí skoro vždy fatálně jako následek přidružené infekce. Celosvětově tvoří přibližně polovinu pacientů s viscerální leishmaniózou děti (Bhattacharya *et al.* 2004).

Podle oficiálních údajů se globální úmrtnost na VL odhaduje na 59 000 lidí ročně (35 000 mužů a 24 000 žen), (Desjeux 2004). Všeobecně je uznáváno, že jsou tato čísla podhodnocena a to z toho důvodu, že hlášení nemoci jsou povinná pouze v jedné třetině zemí s endemickým výskytem onemocnění (Alvar *et al.* 2006).

Na každý klinicky se manifestující případ viscerální leishmaniózy připadá 30-100 subklinických infekcí (Guerin *et al.* 2002). Souhrnně zůstávají klinicky aparentní leishmaniální infekce většinou lokalizované v kůži nebo přilehlých lymfatických uzlinách. Nicméně některé druhy unikají do orofaryngeální nosní sliznice, množí se v přilehlých lymfatických uzlinách nebo v játrech, slezině a v odlehlých lymfatických uzlinách (Murray *et al.* 2005).

V závislosti na druhu leishmanií se objevuje několik klinických forem kožní leishmaniózy. Tyto formy zahrnují lokalizovanou kožní leishmaniózu (LCL-localized cutaneous leishmaniasis), která se často zhojí bez léčby, difúzní kožní leishmaniózu (DCL-diffuse cutaneous leishmaniasis), která je velmi obtížně léčitelná

a nakonec slizniční leishmaniózu (MCL-mucocutaneous leishmaniasis), která je nejméně závažnější formou nemoci, jelikož tvoří znetvořující léze a zohavení v obličeji (Alvar J. *et al.* 2008). Je to chronický zánětlivý proces postihující nosní sliznici, sliznici hltanu a hrtanu, což může vést k rozsáhlé destrukci tkáně (Ahluwalia *et al.* 2004).

Typická inkubační doba viscerální leishmaniózy se pohybuje od 3 do 8 měsíců, i když byly zaznamenány delší periody dosahující až několik let. Častými klinickými příznaky jsou horečka (intermitentní, střídavá denní horečka se dvěma píky nebo dokonce kontinuální), kachexie, pancytopenie, hypergamaglobulinémie, hepatomegalie a výrazná splenomegalie (Lagler *et al.* 2006). Laboratorní testy tedy ukazují anémii, trombocytopenii, leukopenii, hypergamaglobulinémii a potlačení buněčné imunitní odpovědi (Stefaniak *et al.* 2003).

Hlavními komplikacemi nemoci jsou: anémie (z důvodů kombinace hemoragického krvácení, hemolýzy, úbytek kostní dřeně a zvětšení sleziny) a sekundární bakteriální infekce. Většina pacientů s viscerální leishmaniózou umírá na tyto přidružené infekce, popřípadě na tuberkulózu (Langer *et al.* 2006).

2.6.3. Infekce a role imunitního systému

Leishmanióza způsobuje klinické a histologické projevy, které jsou závislé na stavu imunitního systému hostitele (Fernández-Guerro *et al.* 2004).

Úspěšnost infekce leishmaniemi závisí na schopnosti parazita vyhnout se hostitelské nespecifické imunitě, uchytit se na hostitelských buňkách, být fagocytován a přežít ve fagolyzozomu makrofágů.

Bylo potvrzeno, že patogeneze je vázána na T-buněčnou cytotoxicitu a zvládnutí viscerální leishmaniózy imunitním systémem hostitele závisí na zdatnosti pomocných Th1 lymfocytů a včasné multicytokinové odpovědi v průběhu infekce (Mirhál *et al.* 2005). Svou nezastupitelnou roli v imunitní odpovědi hrají NK buňky, které jsou první hodiny infekce hlavním zdrojem cytokinů včetně INF- γ (Korbel *et al.* 2004).

V průběhu progresu leishmaniózy se u myší zvyšuje počet Th2 CD4+ T-buněk a sekrece interleukinu 4, což vede k polyklonální aktivaci B-buněk (Mirhál *et al.* 2005).

U imunokompromitovaných pacientů je leishmanióza závažné život ohrožující onemocnění charakterizované diseminací, viscerálními komplikacemi, a typickými projevy s nižší odpovědí na léčbu (Fernández-Guerro *et al.* 2004).

Koinfekce s HIV mění projevy nemoci a představuje problém pro diagnostiku a péči o jednotlivé případy (Guerin 2002). I když je koinfikovaný pacient správně léčen, dochází opakovaně k relapsu a výsledek bývá často fatální (Control of leishmaniasis WHO 2006).

2.7. Diagnostika

2.7.1. Etiologická diagnóza

Diagnostické metody používané k detekci leishmanií mají své meze. Proto je vhodné užití nejméně jedné izolační metody (kultivace nebo inokulace experimentálních zvířat) v kombinaci s mikroskopickým vyšetřením tkáně, krevního nátěru nebo histologických řezů biologických materiálů (barvené Giemsou, hematoxylin-eosinem nebo jinými barvivy), (Alvar *et al.* 1997).

Leishmanie mohou být identifikovány nebo kultivovány z aspirátu sleziny, kostní dřeně, lymfatických uzlin a jater (Guerin *et al.* 2002). Vyšší záchytnost má detekce leishmanií v aspirátu ze sleziny, než z kostní dřeně, jater nebo lymfatických uzlin (pozitivitu vykazuje až 98 % aspirátů ze sleziny, 85 % aspirátů z kostní dřeně a 60 % z jater), (Mirhál *et al.* 2005).

2.7.2. Sérologická diagnóza

V průběhu let bylo vyvinuto mnoho serologických technik k prokázání humorální imunitní odpovědi vyvolané infekcí leishmaniemi (Alvar *et al.* 1997).

Přímý aglutinační test, založený na obarvení parazity aglutinovaných protilátek ze séra pacienta, je velmi oblíbený v Iránu a Africe. Avšak vysoká cena komerčně dostupného antigenu je často limitujícím faktorem pro širší použití.

V Indii a částečně i Evropě a Africe se používá rychlý papírkový "strip test" pro průkaz sérových protilátek vůči rekombinantnímu antigenu rK39 (uchovaný antigen z *L. infantum*), jímž je papírek impregnován (Mirhál *et al.* 2005).

Používány jsou i molekulární techniky zaměřující se na různé geny. Polymerázová řetězová reakce je úspěšně používána k diagnostice a diferenciaci druhů (Bari 2006).

Zavedení Western blottingových metod pro diagnostiku viscerálních leishmanióz má velkou perspektivu. Tato metoda využívá 65 kDa antigenní komponentu přítomnou u 100 % vzorků sér od pacientů s klinicky a parazitologicky potvrzenou viscerální leishmaniózou.

Detekce leishmaniového antigenu v moči pomocí latex aglutinačního testu (Katex) se jeví velmi nadějně pro diagnózu i pro určení prognózy (Mirhál *et al.* 2005).

2.8. Léčba a prevence

2.8.1. Vakcíny a INF- γ

Proti leishmanióze je dnes testováno mnoho vakcín, avšak žádná z nich není zatím rutinně využívána v klinické praxi (Mirhál *et al.* 2005). Regulování této nemoci tedy závisí výhradně na chemoterapeutikách (Choudhury *et al.* 2008).

Jako vakcíny jsou používány usmrcené nebo živé oslabené (atenuované) leishmanie, nebo rekombinované komponenty (antigeny, peptidy) odvozené od DNA, které byly testovány se střídavým úspěchem.

Podávání samotného INF- γ mělo na lidskou viscerální leishmaniózu pouze omezenou účinnost (Mirhál *et al.* 2005).

2.8.2. Chemoterapie

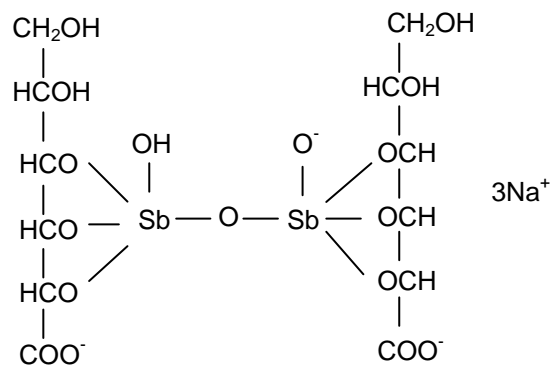
2.8.2.1. Sloučeniny pětímocného antimonu

Léky používané k léčbě jak viscerální, tak kožní leishmaniózy, sloučeniny pětímocného antimonu, se poprvé objevily před 60-ti lety (Croft *et al.* 2006). Jedná se o sloučeniny obsahující pětímocný antimon, který je navázán kovalentní vazbou na organickou skupinu (Jíra 2009).

Mechanismus účinku sloučenin pětímocného antimonu nebyl stále zcela objasněn. Předpokládá se, že zasahují do bioenergetické aktivity buněk parazita, což vede k jejich smrti (Amato *et al.* 2008). Zřejmě fungují tak, že vyčerpají intracelulární hladiny ATP díky interferenci glykolýzy a β -oxidaci mastných kyselin (Van Voorish *et al.* 1990).

Sloučeniny pětímocného antimonu mají značné vedlejší účinky. To může být způsobeno tím, že jsou v těle pacientů přeměněny na toxičtější trojmocné formy, které mohou tyto vedlejší účinky vyvolávat (Balana-Fouce *et al.* 1998).

V endemických oblastech se používají dvě hlavní sloučeniny pětímocného antimonu: stiboglukonát sodný (Pentostam), (Obr. 3) a meglumin antimonát (Glucantime), (Mirhál *et al.* 2005).



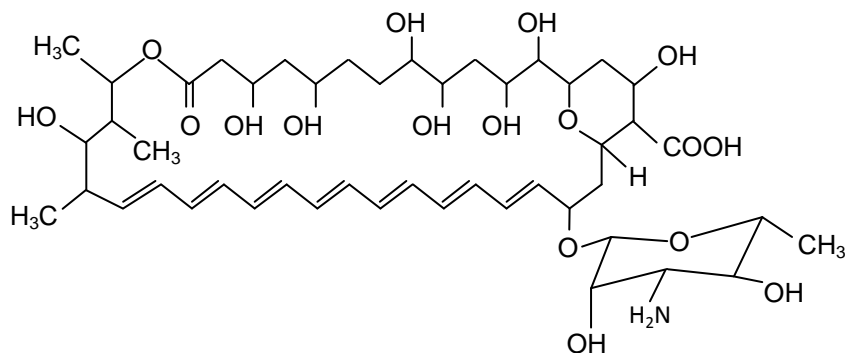
Obr. 3. Chemická struktura pentosamu.

Snížení účinnosti, administrativní problémy a zvýšení frekvence nežádoucích účinků sloučenin pětimocného antimonu podněcují hledání nových antileishmaniálních léků (Soto *et al.* 2006).

2.8.2.2. Amfotericin B

Amfotericin B (Obr. 4) je polyenové antibiotikum, které je používáno jako lék druhé volby pro leishmaniózu již od šedesátých let. Tato sloučenina má selektivní účinky proti houbám, stejně jako proti leishmaniím a trypanosomě cruzi. Selektivita je způsobena vyšší afinitou amfotericinu B k ergosterolu, převládajícího sterolu v těchto parazitech, než afinitou k cholesterolu, převládajícího sterolu v savčím hostiteli (Croft *et al.* 2001 a).

Amfotericin B zvyšuje propustnost buněčné membrány parazitů pro ionty a tím způsobí jejich smrt (Ellis 2002).



Obr. 4. Chemická struktura amfotericinu.

Jeho nevýhodou jsou vysoké náklady, v některých oblastech omezená dostupnost a zejména toxicita související s vedlejšími účinky infuze (horečka, zimnice, bolesti kostí, tromboflebitida, hypokalémie, snížená funkce ledvin a anémie), (Guerin *et al.* 2002). Riziko nefrotoxicity a hypokalémie vyžaduje v průběhu léčby hospitalizaci nejlépe s biochemickým monitorováním, čehož je obtížné dosáhnout v prostředí pro tyto možnosti nedostačujícím (Alvar *et al.* 2008).

Poté co byla u antifungálních látek prokázána vysoká nefrotoxicita, byly do klinického použití úspěšně zavedeny koloidní a tukové formulace amfotericinu B (Mirhál *et al.* 2005).

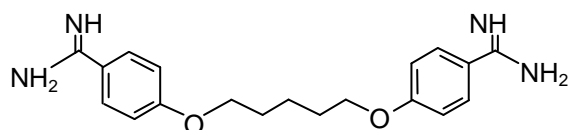
Nové formulace amfotericinu B poskytují významnou možnost při zachování stejné účinnosti léku snížit dobu trvání léčby kala-azaru. Tyto formulace umožňují výrazně vyšší denní dávky léku a zároveň se zdá, že se cíleně zaměřují na infikované tkáňové makrofágy pomocí zvýšeného fagocytárního vychytávání (Murray 2001).

2.8.2.3. Pentamidin

Pentamidin (Obr. 5) patří do skupiny aromatických diaminů (Balana-Fouce *et al.* 1998). Byl užíván k léčbě VL hlavně v Indii, ale nyní bylo od jeho používání upuštěno vzhledem ke špatné účinnosti a závažnosti jeho vedlejších účinků (Alvar *et al.* 2008).

Mechanismus účinku pentamidinu je sporný a ne zcela pochopený (Balana-Fouce *et al.* 1998).

Nežádoucí účinky (myalgie, nauzea, bolest hlavy a hypoglykémie) byly při doporučené dávce poměrně časté. Výjimečně byl pozorován i rozvoj nezvratné cukrovky (Mirhál *et al.* 2005).



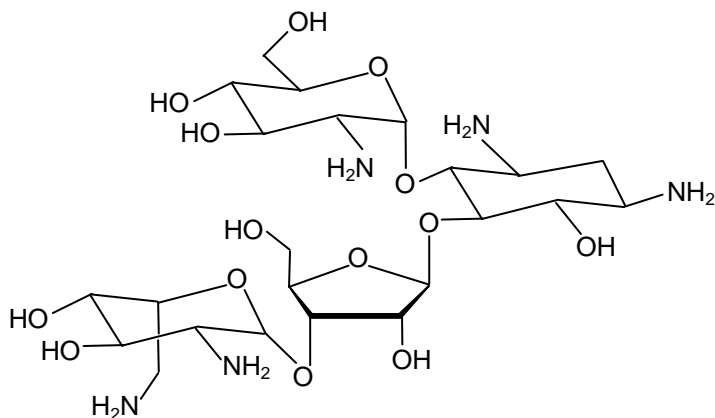
Obr. 5. Chemická struktura pentamidinu.

2.8.2.4. Paromomycin

Paromomycin (Obr. 6), původně orálně podávaný aminoglykosid, užívaný proti střevním infekcím, se ukázal být účinným pro léčbu tropické kožní leishmaniózy již

v roce 1985, jako parenterální lék pro viscerální leishmaniózu se užívá od roku 1990 (Croft 2005).

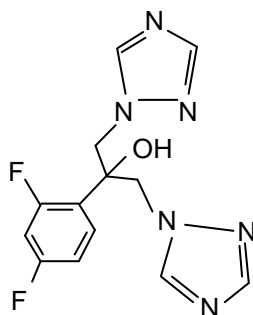
Mechanismus jeho působení spočívá v inhibici metabolismu parazitů kompeticí s adenosintrifosfátem (Jíra 2009).



Obr. 6. Chemická struktura paromomycinu.

2.8.2.5. Fluconazol

U kožní leishmaniózy vyvolané leishmanií větší (*Leishmania major*) lze použít triazolové antimykotikum fluconazol (Obr 7.), (Jíra 2009).



Obr. 7. Chemická struktura fluconazolu.

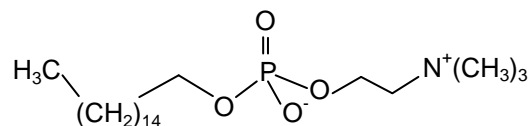
2.8.2.6 Miltefosin

Miltefosin (miltefosine, hexadecylfosfocholin), (Obr. 8) byl původně vyvinut jako protinádorový lék (Alvar *et al.* 2006). Patří do skupiny alkylfosfocholinů, cytotoxických analogů odvozených od membránových eterlysofosfolipidů (Mirhál *et al.* 2005).

Miltefosin má díky interferenci v metabolických drahách parazita a následné indukci apoptózy silný antileishmaniální účinek (Soto *et al.* 2006). U leishmanií působí na buňky signálních drah a inhibuje biosyntézu fosfolipidů a sterolů (Soto *et al.* 2001). Miltefosin inhibuje translokaci fosfocholin-cytidyltransferázy, klíčového enzymu

fosfocholinové biosyntézy. Zabraňuje translokaci z jeho neaktivní cytosolové formy do aktivní s membránou spojené formy (Croft *et al.* 2003).

Miltefosin má potenciál k léčbě všech klinických projevů leishmaniózy (Soto *et al.* 2006) a je účinný na všechna vývojová stádia parazita (Mirhál *et al.* 2005).



Obr. 8. Chemická struktura miltefosinu.

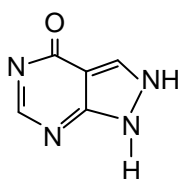
2.8.2.7. Kombinovaná léčba

Zvyšující se neúčinnost standardních antileishmaniálních léků naléhavě vyžaduje hledání nových protiparazitárních sloučenin a zavádění kombinované léčby proti leishmanióze (Sundar *et al.* 2000). Panuje shoda, že kombinační terapie pro VL by měla být urychleně zavedena, aby se minimalizoval rozvoj rezistentních kmenů (Alvar *et al.* 2008).

Alternativní léčby kombinují sloučeniny antimonu s allopurinolem, paromomycinem (aminosidinem) nebo IFN- γ (Alvar *et al.* 1997).

a) Allopurinol v kombinaci se sloučeninami pětimocného antimonu

Allopurinol (Obr. 9) je strukturální analog hypoxantinu. V buňkách leishmanií je hydrolyzován na alopurinol ribosid a poté inkorporován do RNA, kde interferuje se syntézou proteinů (Alvar *et al.* 1997).



Obr. 9. Chemická struktura allopurinolu.

b) Paromomycin (Aminosidin) v kombinaci se sloučeninami pětimocného antimonu

Paromomycin je *in vitro* účinnější než Sb^V , a dohromady s ním má synergistický efekt. (Alvar *et al.* 1997).

c) Kombinace sloučenin pětimocného antimonu s imunomodulací

Pacienti s viscerální leishmaniózou mají potlačenou T-buněčnou imunitní odpověď na leishmaniální antigeny a pokles produkce INF- γ a IL 2 (Alvar *et al.* 1997). Denní aplikace rekombinačního INF- γ v kombinaci s pětimocným antimonem vedla ke zlepšeným léčebným výsledkům asi u 2/3 lidských pacientů s rezistencí na sloučeniny antimonu (Mirhál *et al.* 2005).

Tabulka 2 shrnuje současně používanou léčbu viscerální a kožní leishmaniózy.

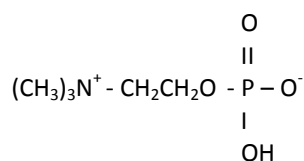
Tabulka 2. Současně užívaná léčba s antileishmaniální aktivitou (upraveno podle Alvar *et al.* 2006)

Leishmanióza	Lék	Dávka
Viscerální (<i>L. donovani</i> a <i>L. infantum</i>)	SGG (Pentostam®; generic SGG), Meglumin antimonát (Glucantime®)	20 mg Sb ^V /kg/den, 4 týdny
	Amfotericin B-liposomální (Ambisome®)	2 mg/kg/den \times 5 dávek po 10 dní
	Amfotericin B-deoxycholate (Fungizone®)	2 mg/kg/den po 4 týdny nebo 1 mg/kg/den \times 15 dávek obden po 4 týdny
	Miltefosin (Miltex®)	2,5 mg/kg/den po 21-28 dní
	Pentamidin (Pentacarinat®)	4 mg/kg/den, 15-20 dávek obden
	Paromomycin (Paromycin®, Humatin®, Aminosidin®)	15 mg/kg/den, 21 dní
Kožní (<i>L. braziliensis</i> a <i>L. guyanensis</i>)	SGG (Pentostam®) Meglumin antimonát (Glucantime®)	lokální terapie jednotlivých lézí, injekce 1-5 ml do okraje léze do jejich vyhojení
	Miltefosin (Miltex®)	orální podání 2,5 mg/kg/den po 21-28 dní
	Fluconazol	orální podání 2mg/kg/den, 6 týdnů
	Paromomycin (jiné způsoby aplikace)	aplikace delší než 28 dní
	Termoterapie	Lokální terapie jednotlivých lézí, opakované aplikace 50 °C po 30 s

2.8.7. Analogy *o*-fosfonatomethylcholinu

Parazitičtí prvoci jsou obklopeni membránovými strukturami, které mají rozdílné složení lipidů a bílkovin než hostitelské buňky (Vial *et al.* 2003). Jednotlivé druhy leishmanií se mezi sebou liší v membránových sterolech i obsahem lipidů a je tedy možné, že toto biochemické složení může ovlivnit aktivitu léčiv (Escobar *et al.* 2002).

Fosfolipidy jsou hlavními komponenty parazitární membrány. Ačkoli mnoho parazitů odčerpává tyto fosfolipidy ze svých hostitelů, většina si je syntetizuje *de novo* nebo je alespoň modifikuje (Vial *et al.* 2003). Leishmanie mají v plasmatické membráně vysoký obsah fosfolipidů (65–80 % z celkového obsahu lipidů) hlavně fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu a difosfatidylglycerolu (Escobar *et al.* 2002). Metabolické cesty vedoucí k biosyntéze fosfatidylcholinu hrají s vysokou pravděpodobností rozhodující roli ve vývoji parazitů a jejich přežití, čímž nabízí dobrý cíl pro antileishmaniální chemoterapii. Syntéza fosfatidylcholinu vyžaduje transport prekurzorů cholinu z hostitele. Tento transport je vysoce specifický a je inhibován analogy fosfocholinu (Obr. 10) a cholinu (Zufferey *et al.* 2002).

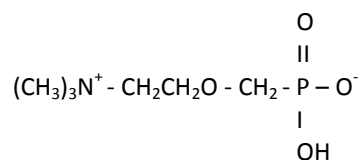


Obr. 10. Chemická struktura fosfocholinu.

Kvůli jejich amfifilním vlastnostem jsou fosfolipidové sloučeniny přímo absorbovány do plasmatické membrány parazita (Wieder *et al.* 1999).

O-fosfonatomethylcholin (Obr. 11), isopolární fosfocholinový analog, který má fosfomonoesterový zbytek nahrazený fosfomethyletherovou skupinou, je antimetabolitem fosfocholinu.

Antimetabolity jsou chemicky modifikované molekuly metabolitů. Jejich působení je vždy spojeno s inhibicí určité enzymové reakce. Ta může být inhibována modifikovanou látkou působící jako analog substrátu přechodového stavu nebo produktu katalyzované reakce. Dalším způsobem inhibice může být kovalentní navázání inhibitoru na enzym a jeho následná inaktivace či poskytnutí produktu reakce, který je neschopný účasti v dalším metabolickém ději nebo má vlastnosti pozměněny do té míry, že se projeví změnou fyzikálně-chemických parametrů (např. po inkorporaci analogu nukleotidu do NK), (Holý 2003).



Obr. 11. Chemická struktura *o*-fosfonatomethylcholinu.

2.10. Inhibiční koncentrace

Podstatou testů účinnosti je zjištění střední účinné (efektivní) koncentrace EC₅₀, popř. LC₅₀ (letální koncentrace) či IC₅₀ (inhibiční koncentrace), která představuje koncentraci zkoušené látky mající za následek 50% úhyn či 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku (Říhová-Ambrožová 2007).

Polovina maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀) je měřítkem účinnosti látky v inhibici biologických a biochemických funkcí. Toto kvantitativní měřítko ukazuje, kolik testované látky (inhibitoru) je potřeba pro inhibici daného biologického procesu právě na polovinu. Je běžně používaným měřítkem účinnosti antagonistů ve farmakologickém výzkumu.

3. Materiál a metody

3.1. Použité organismy

Ke kultivaci *in vitro* byl použit kmen *Leishmania major* LV 561 (MHOM/67/LRC-L137 Jericho II), izolovaný z člověka nakaženého kožní leishmaniózou, laskavě poskytnutý prof. RNDr. Petrem Volfem, CSc. z Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Pro kultivaci *in vivo* byly použity myši BALB/c, samice, 8 týdnů staré (ANLAB). Myši byly chovány ve standardních podmínkách ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích.

3.2. Použité chemikálie

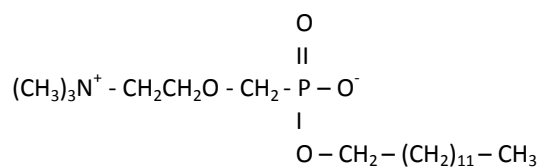
Ke kultivaci promastigotů bylo použito RPMI-1640 Modified medium (Sigma, R7509), bovine foetal serum (Gibco), glutamin (Sigma, G 8541), BME vitamins solution (Sigma, B6891), amikin (Bristol Myers Squibb), gentamycin 80 (Lek Pharmaceuticals d.d.).

Ke kultivaci amastigotů byl použit krevní agar Bacto Neopeptogene (DIFCO), Bacto Agar (DIFCO), NaCl a k zamezení kontaminace byl použit gentamycin (LEK Pharmacentricals d.d.).

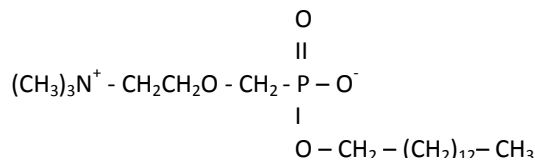
Látkami testovanými na antileishmaniální aktivitu byly analogy *o*-fosfonatomethylcholinu H-3504 (Obr. 12), H-3508 (Obr. 13), H-3519 (Obr. 14), H-3521 (Obr. 15), H-3565 (Obr. 16), samotný *o*-fosfonatomethylcholin H-3488 (Obr 17.), (Tab. 3) a miltefosine (Axxora Europe).

Tabulka 3. Přehled lipofilních esterů *o*-fosfonatomethylcholinu obecného vzorce $(\text{CH}_3)_3\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OR})(\text{O})$.

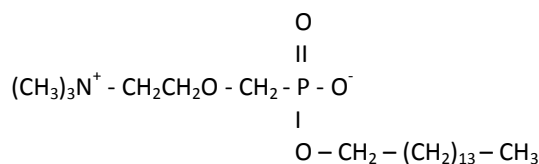
Studovaná látka	Počet uhlíkových atomů v lineárním řetězci esterově vázaného alkoholu, R	Molekulová hmotnost
H-3519	C 13	383,55
H-3508	C 14	393,5
H-3521	C 15	407,57
H-3504	C 16	421,6
H-3488	<i>o</i> -fosfonatomethylcholin, R'=H	197,3 / dihydrat 233,3
H-3565		223,2



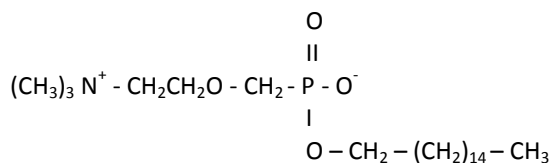
Obr. 12. Chemická struktura analogu *o*-fosfonatomethylcholinu H-3519.



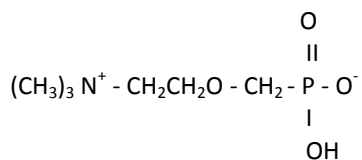
Obr. 13. Chemická struktura analogu *o*-fosfonatomethylcholinu H-3508.



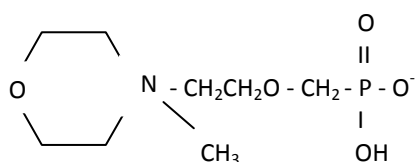
Obr. 14. Chemická struktura analogu *o*-fosfonatomethylcholinu H-3521.



Obr. 15. Chemická struktura analogu *o*-fosfonatomethylcholinu H-3504.



Obr. 16. Chemická struktura *o*-fosfonatomethylcholinu H-3488.



Obr. 17. Chemická struktura *o*-fosfonatomethylcholinu H-3565.

3.3. *In vitro* kultivace *Leishmania major*

Promastigotní stádia *L. major* byla kultivována v 25 cm² kultivačních lahvích (TPP) v RPMI médiu obohaceném 10% fetálním bovinním sérem (100 μl/ml),

1% glutaminem, 1% vitamíny (BME vitamins solution), amikinem (250 µg/ml), 1% přefiltrovanou lidskou močí a gentamycinem (80 µg/ml).

Kultury byly pravidelně přeočkovány při dosažení koncentrace 10^7 - 10^8 buněk/ml. Ředěny byly v takovém poměru, aby jejich výsledná koncentrace byla 10^6 buněk/ml.

Kultivace probíhala při teplotě 23 °C.

3.4. *In vivo* kultivace *Leishmania major*

Pro udržení vitality kultury byli promastigotní stádia z šestidenních kultur inokulovány do myši BALB/c. Inokulační dávka 10^7 promastigotů byla dvakrát promyta ve fyziologickém roztoku a následně subkutánně inokulována ke kořeni ocásku. Po vytvoření léze (3-5 týdnů) byly z jejího okraje izolovány leishmanie na krevní agar připravený z báze a tekuté složky. Báze sestávala ze 100 ml destilované vody s přísadkou Bacto Neopeptogenu (20 µg/ml), Bacto Agar (20 µg/ml), a NaCl (6 µg/ml). Následně byl roztok autoklávován po dobu 20 min při 125 °C. Po zchladnutí agar na 45 °C byla přidána sterilní defibrinovaná myší krev (250 µl/ml) a báze byla rozplněna do zkumavek po 1 ml a ponechána ztuhnout v šikmé poloze v chladničce.

Před vlastním použitím byl krevní agar umístěn do termostatu, aby dosáhl požadované teploty 23 °C.

Kapalná složka krevního agaru byla připravována stejným způsobem jako pevná, ovšem bez přidání Bacto Agar. Následně byl do kapalné fáze přidán gentamycin (5 µl/ml).

Pro přenesení amastigotů z okraje léze na pevnou bázi agaru byla použita sterilní mikrobiologická klička. Pevná báze s leishmaniemi byla poté převrstvena 0,5 ml tekuté fáze.

Z krevního agaru byla kultura po pomnožení převedena do používaného RPMI média.

3.5. Zamrazování promastigotů

Vitalita kultury *L. major* po 48 hod kultivace byla mikroskopicky zkontrolována. Následně byly buňky centrifugovány (150 g po 10 min při 20 °C). Po stočení byl odpipetován supernatant a sediment byl resuspendován a rozplněn do kryozkumavek po 750 µl.

Následně bylo přidáno 600 μ l fetálního bovinního séra. Těsně před zmrazením bylo přidáno 150 μ l DMSO. Následně byly kryozkumavky umístěny do tekutého dusíku, kde mohou být dlouhodobě skladovány.

3.6. Testování cytotoxicity analogů *o*-fosfonatomethylcholinů

3.6.1. Stanovení IC₅₀ pomocí přímého počítání v Bürkerově komůrce

Pro stanovení aktivity byly nejprve kultury promastigotů *L. major* testovány v médiu s jednotlivými analogy *o*-fosfonatomethylcholinu a *o*-fosfonatomethylcholinem a to v koncentracích 50; 25; 10; 5 a 2,5 mM. Počáteční koncentrace buněk byla 1×10^6 na ml média. Promastigoti byli kultivováni v termostatu při 23 °C v 5 ml média. Pokus byl prováděn v triplikátech.

Počet buněk byl poté po 12, 24, 36, 48, 60 a 72 hod počítán v Bürkerově komůrce. Jako pozitivní kontrola byly použity kultury s přidavkem miltefosinu. Pro rozlišení životaschopných buněk bylo použito barvení trypanovou modří.

3.6.2. Nepřímé stanovení IC₅₀ pomocí konverze XTT

Pro testování cytotoxicity byl užit Cell Proliferation Kit II (XTT), který v kolorimetrickém testu založeném na metabolické aktivitě buněk analyzuje počet životaschopných promastigotů v kultuře na základě jejich štěpení žluté tetrazoliové soli tetrazolium bromidu (XTT). Ta je štěpena životaschopnými (metabolicky aktivními) buňkami na oranžový ve vodě rozpustný formazan. Vyšší počet žijících buněk tak ve výsledku znamená celkovou větší aktivitu mitochondriální dehydrogenázy. Tento vzrůst odpovídá množství vzniklého oranžového formazanu.

Množství oranžového formazanu bylo kolorimetricky stanoveno multifunkčním modulárním readerem TECAN INFINITE 200 při 480 nm, referenční vlnová délka byla 690 nm. Jako blank bylo použito médium s fosfocholiny a XTT.

Jak uvádí Williams hodnoty IC₅₀ získané metodou XTT s amfotericinem B a miltefosinem odpovídaly těm, které byly dříve prokázány jinými metodami (Williams *et al.* 2003).

Pro tento pokus byly leishmanie kultivovány ve 100 μ l média v 96 jamkových sterilních destičkách v počáteční koncentraci $1,5 \times 10^5$ buněk. Do jamek mikrotitrační destičky bylo ihned, po 21 a 45 hod kultivace s analogy *o*-fosfonatomethylcholinu a *o*-fosfonatomethylcholinem při 23 °C v termostatu přidáno 50 μ l XTT. Promastigotní

stádia *L. major* byla 3 hodiny kultivována s Cell Proliferation Kit II (XTT), poté byla spektrofotometricky stanovena absorbance roztoku formazanu, tedy po 3, 24 a 48 hod kultivace s *o*-fosfonatomethylcholinem a jeho analogy.

Koncentrace *o*-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů byly 50; 25; 10; 5; 2,5 a 1 μM . Pokus byl prováděn v triplicátech. K porovnání aktivity analogů fosfocholinů byl jako pozitivní kontrola použit miltefosin, který má k promastigotům *L. major* senzitivitu v rozmezí IC_{50} 4,8-13,1 μM (Escobar *et al.* 2002).

Z naměřených absorbancí byly sestaveny růstové křivky a grafy.

3.6.3 Stanovení IC_{50}

Pro stanovení IC_{50} byla použita data získaná z nepřímého stanovení počtu živých promastigotních stádií *L. major* pomocí konverze XTT po 48 hod kultivace s *o*-fosfonatomethylcholinem a jeho analogy. Tato data byla vztažena ke kontrole bez inhibitoru (100 % promastigotů).

Z přepočtených hodnot byla sestrojena dose-response křivka a data byla proložena pomocí nelineární regrese křivkou podle rovnice:

$$N = (100 - y_0) e^{-bx} + y_0$$

kde N je % přeživších promastigotů a b, y_0 jsou regresní koeficienty.

Úpravou a dosazením do rovnice bylo vyjádřeno IC_{50} takto:

$$\text{IC}_{50} = \frac{\ln[(50 - y_0) / (50 - y_0)]}{-b}$$

3.7. Statistické vyhodnocení

Statistické analýzy byly prováděny pomocí SigmaPlot 9.0 Systa Software, Inc. V programu Microsoft Excel byly vypočteny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, které byly poté použity v grafech.

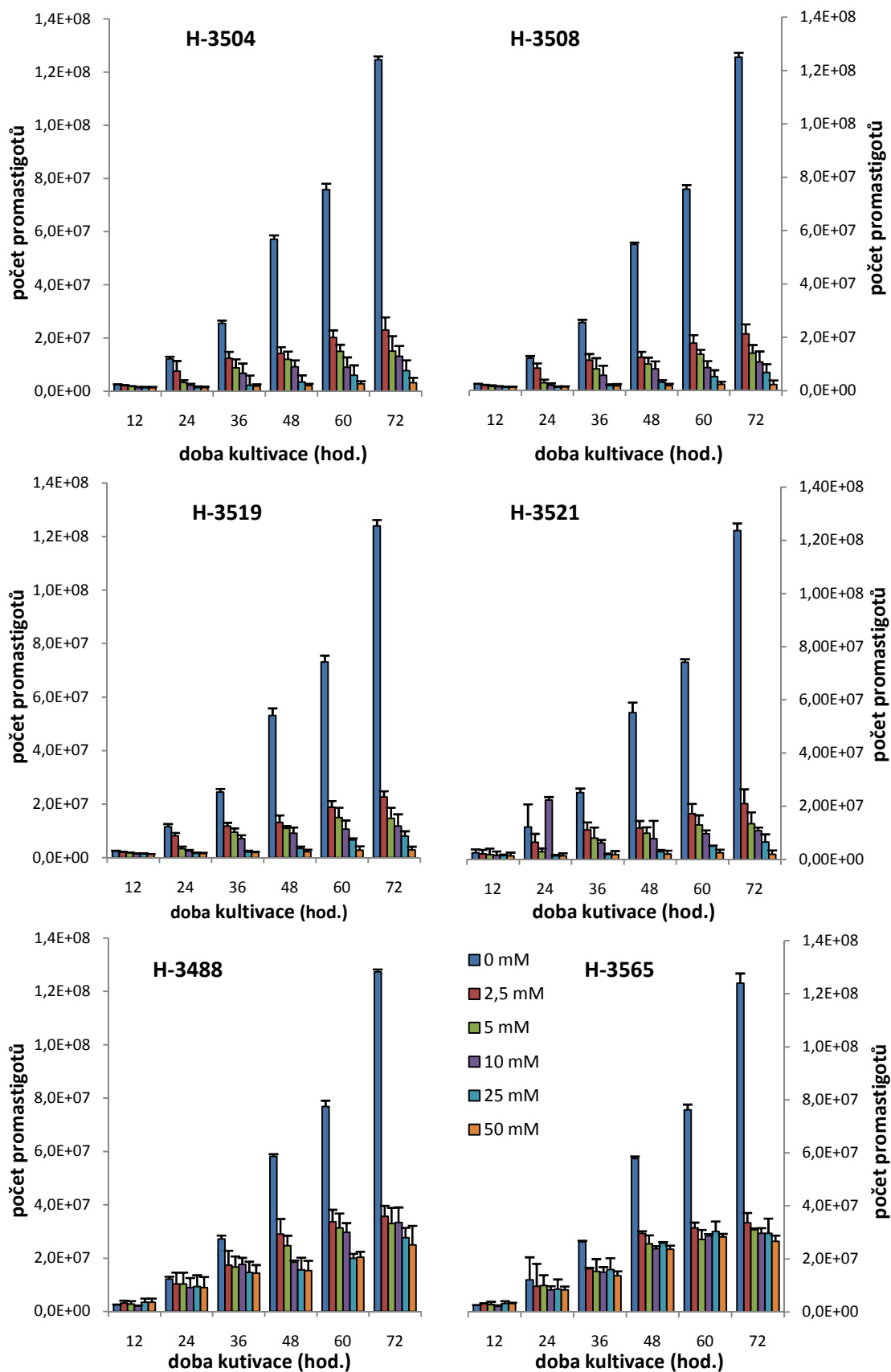
4. Výsledky

4.1. Stanovení IC₅₀ pomocí přímého počítání v Bürkerově komůrce

Všechny testované látky byly v námi zkoušených koncentracích 50; 25; 10; 5; 2,5 mM vůči promastigotům *L. major* účinné, avšak účinnost se u jednotlivých analogů lišila (graf 1).

Nejúčinnější byly H-3504, H-3508, H-3519 a H-3521. Při koncentraci 2,5 mM byl nejučinnější analog H-3508, který inhiboval růst oproti kontrole 5,82× (počet promastigotů $2,13 \times 10^7 / 72$ hod) a při nejvyšší koncentraci 50 mM byl nejučinnější H-3521, který inhiboval růst 53,91× (počet promastigotů $2,30 \times 10^6 / 72$ hod) oproti kontrole (promastigotů $1,24 \times 10^8 / 72$ hod).

O-fosfonatomethylcholin H-3488 a jeho analog H-3565 byly také účinné, ale jak vyplývá z grafu, tak v mnohem vyšších koncentracích než ostatní analogy. V koncentraci 2,5 mM inhiboval *o*-fosfonatomethylcholin H-3488 růst 3,76× (počet promastigotů $3,36 \times 10^7 / 72$ hod) a v koncentraci 50 mM inhiboval H-3565 49,8× (počet promastigotů $2,90 \times 10^6 / 72$ hod).



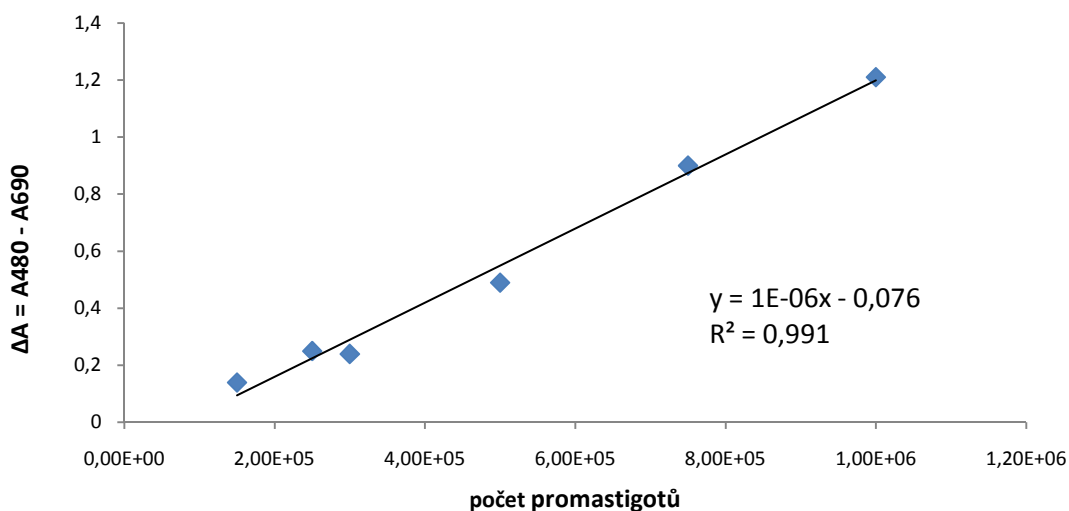
Graf 1. Počty promastigotních stádií *L. major* v 12 hod intervalech kultivace s testovanými látkami pro jednotlivé koncentrace (koncentrace 0 označuje kontrolu).

4.2. Nepřímé stanovení IC₅₀ pomocí konverze XTT

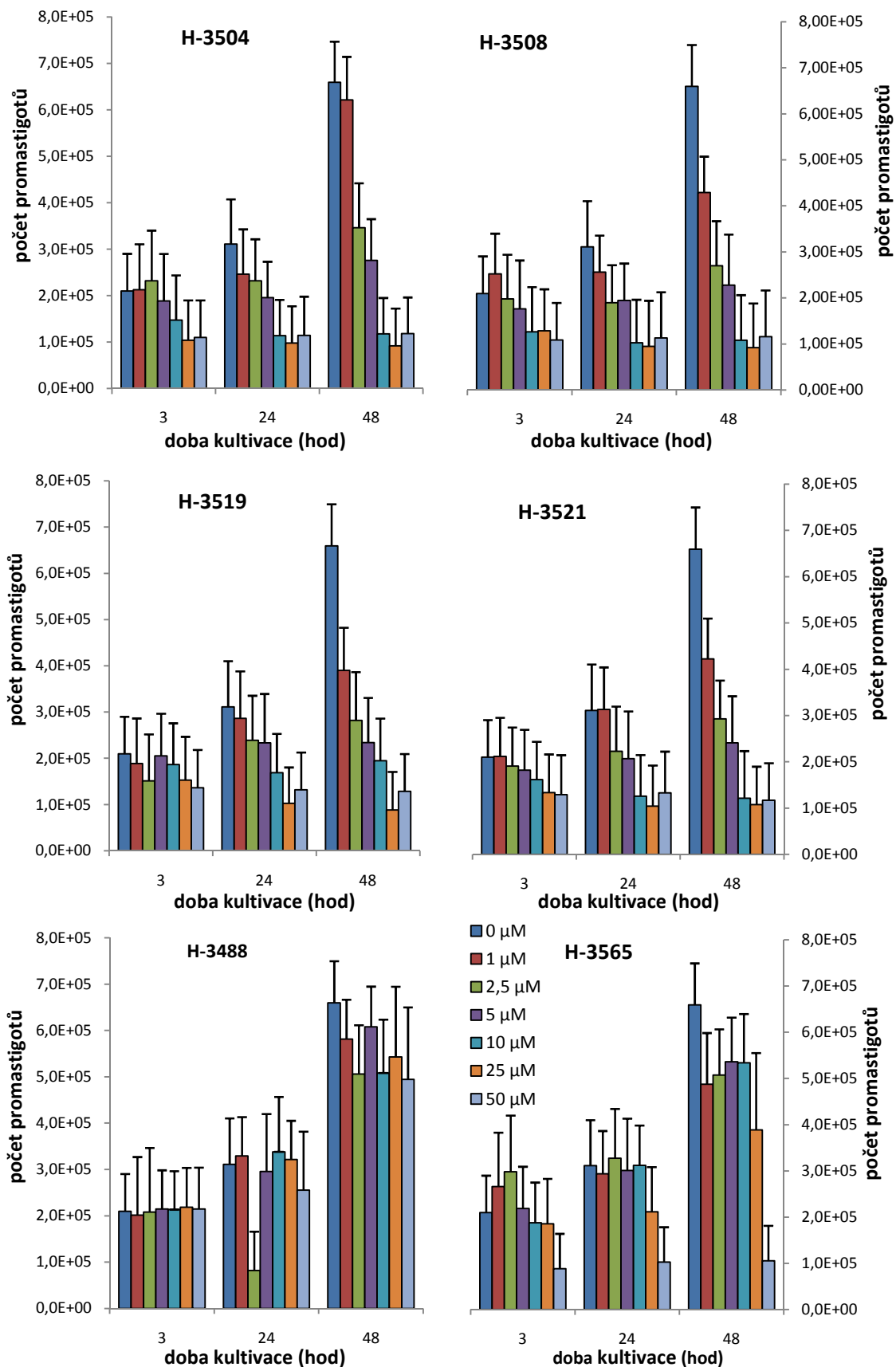
Výsledky měření pomocí nepřímého stanovení počtu živých promastigotů pomocí konverze XTT pro analogy *o*-fosfonatomethylcholinu H-3504, H-3508, H-3519, H-3521, H-3565 a *o*-fosfonatomethylcholin H-3488 v koncentracích 50; 25; 10; 5; 2,5 a 1 μM a v časech 3, 24 a 48 hod kultivace s analogy *o*-fosfonatomethylcholinu shrnuje graf 3.

Analogy *o*-fosfonatomethylcholinu H-3504, H-3508, H-3519 a H-3521 inhibovaly růst leishmanií při nejnižší použité koncentraci 1 μM a nejlépe pak analog H-3519, který inhiboval růst 1,68× (počet promastigotů 3,90×10⁵/48 hod) a při nejvyšší koncentraci 50 μM pak analog H-3508, který inhiboval růst 5,15× (počet promastigotů 1,28×10⁵/48 hod) oproti kontrole (promastigotů 6,59×10⁵/48 hod). Analog H-3565 a *o*-fosfonatomethylcholin H-3488 inhibovaly ve vyšších koncentracích než ostatní analogy. V koncentraci 1 μM inhiboval analog H-3565 růst 1,35× (počet promastigotů 4,87×10⁵/48 hod) a 50 μM H-3565 6,27× (počet promastigotů 1,05×10⁵/48 hod).

Kalibrační křivka relativního počtu promastigotů *L. major* byla sestrojena na základě rozdílu absorbancí naměřených při 480 nm a 690 nm (graf 2).



Graf 2. Závislost absorbance měřené metodou konverze XTT na počtu jedinců měřených počítáním v Bürkerově komůrce, proloženo lineární regresí.



Graf 3. Počty promastigotních stádií *L. major* v časových intervalech 3, 24 a 48 hod kultivace s testovanými látkami pro jednotlivé koncentrace (koncentrace 0 označuje kontrolu).

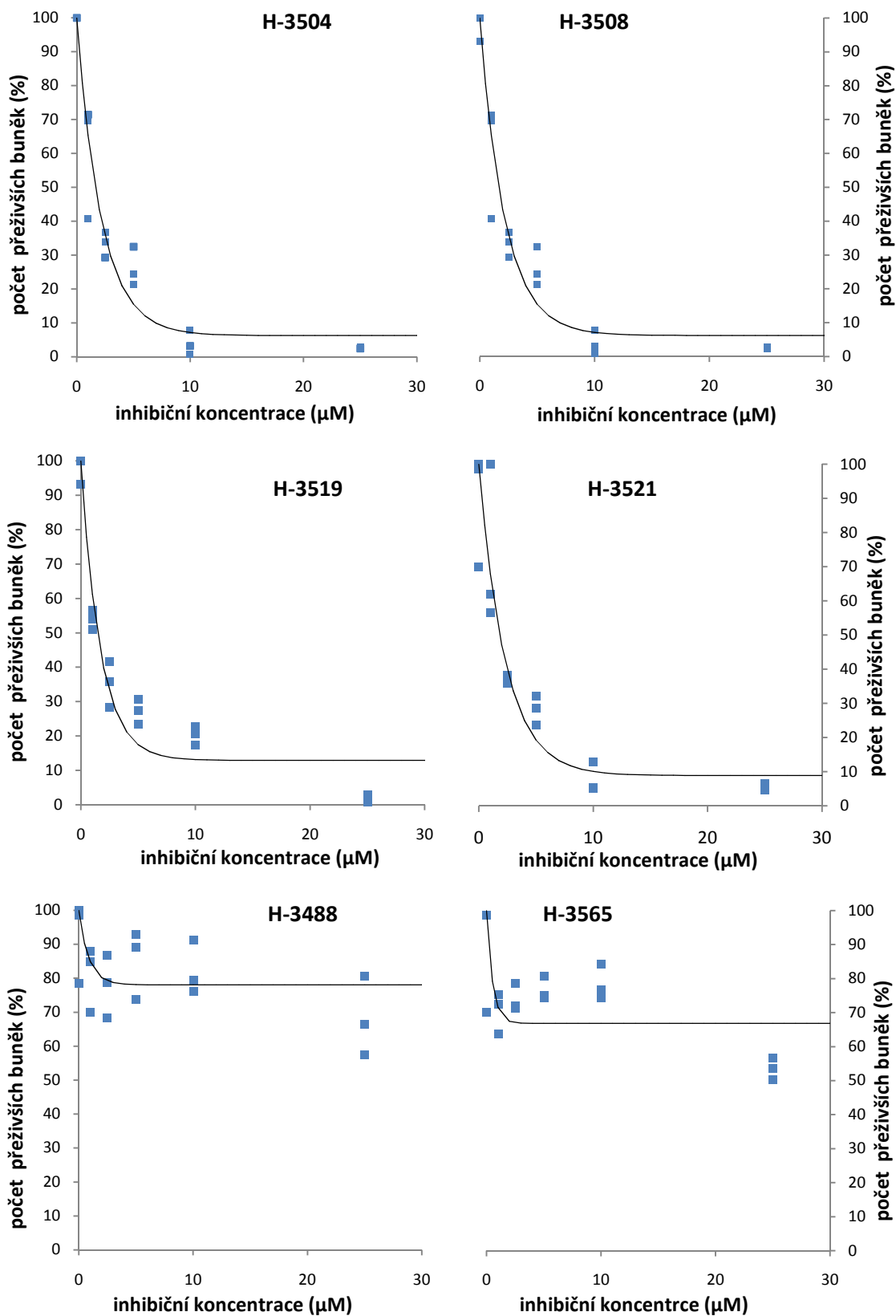
Statistickým zhodnocením účinnosti analogů *o*-fosfonatomethylcholinu byly dopočítány hodnoty IC₅₀ pro H-3504 2,66 μM, H-3508 1,65 μM, H-3519 1,45 μM a pro H-3521 1,81 μM.

O-fosfonatomethylcholin H-3488 a jeho analog H-3565 mají na základě výsledků v námi zvolených koncentracích malý a statisticky neprůkazný účinek. Data získaná zhodnocením účinnosti shrnuje tabulka 4.

Tabulka 4. Hodnoty IC₅₀ a parametry regrese dose-response křivky, kde y_0 a b jsou regresní koeficienty dose-response křivky ve tvaru $N = (100 - y_0) e^{-bx} + y_0$ (N - u daných látek nelze ze získaných dat statistickou analýzou průkazně dopočítat IC₅₀).

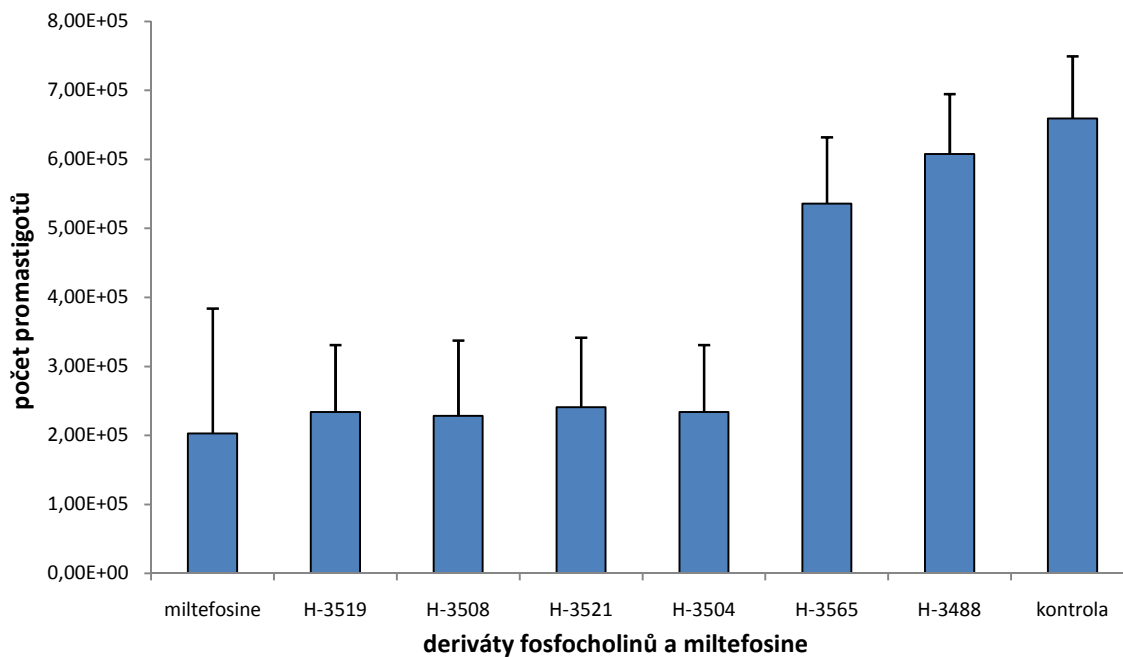
Studovaná látka	IC ₅₀ μM	y_0	b	R ²
H-3504	2,66	4,30	0,278	0,94
H-3508	1,65	6,23	0,46	0,93
H-3519	1,45	12,93	0,59	0,92
H-3521	1,81	8,09	0,43	0,89
H-3488	N	78,04	1,17	0,00
H-3565	N	66,83	1,96	0,02

Z dat získaných statistickým zhodnocením dále vypočítány dose-response (dávka-účinek) křivky pro jednotlivé analogy *o*-fosfonatomethylcholinu. Dose-response křivky shrnuje graf 4.



Graf 4. Dose-response křivka pro analogy *o*-fosfonatomethylcholinu proložená nelineární regresní křivkou podle rovnice $N = (100 - y_0) e^{-bx} + y_0$

Z výsledků získaných ze statistického zhodnocení lze říci, že některé analogy *o*-fosfonatomethylcholinu mají účinnost srovnatelnou s miltefosinem. Porovnání jejich účinnosti při koncentraci 5 μM shrnuje graf 5.



Graf 5. Provnání účinnosti *o*-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů (seřazených podle účinnosti) s miltefosinem (koncentrace 5 μM).

5. Diskuze

Terapie leishmaniózy není doposud zcela uspokojivě vyřešena. Ačkoli jsou sloučeniny pětimocného antimonu, amfotericin B a paromomycin drahé a toxické (Croft *et al.* 2006 a), jsou stále nejdůležitějším nástrojem léčby leishmaniózy a to jak kožní, tak viscerální (Alvar *et al.* 2006).

Přestože v posledních deseti letech došlo k pokroku zahrnujícím zavedení nových léčebných látek, a to liposomálního amfotericinu, orálně užívaného miltefosinu a paromomycinu, nejedná se stále o ideální léčebné látky. Proto jsou hledány méně toxické a levnější chemoterapeutika (Alvar *et al.* 2006). Kromě toho je nyní rozšířeným jevem vznik rezistence vůči sloučeninám pětimocného antimonu a téměř všechna standardně používaná léčiva jsou neefektivní proti koinfekci leishmaniózy a HIV (Croft *et al.* 2006 b).

Pacienti často žijí v odlehlých venkovských oblastech bez přístupu k lékařské péči. Navíc je léčba drahá a dlouhodobě vyčerpává rodinný rozpočet. Následkem toho pacienti nedokončují léčebnou kúru (je-li vůbec zahájena), což vytváří situaci, která může napomoci rozvoji rezistence na používané léky (Alvar *et al.* 2006). Kromě toho nejsou pacienti informováni, jak vypadají prvotní příznaky nemoci. Přitom leishmaniózy, jak kožní tak viscerální, reagují lépe na léčbu v počátečních fázích nemoci (Alvar *et al.* 2006). Z tohoto důvodu by mělo být zvýšeno povědomí o této chorobě v ohrožené populaci a zároveň by bylo vhodné se zaměřit na možnosti poskytnutí kvalitnější lékařské péče.

Léčba nemoci finančně nevyčerpává jen pacienta, ale i zdravotnické zařízení, které léčbu poskytuje. VL, která je léčena klasickými injekčně podávanými léky, vyžaduje hospitalizaci kvůli monitorování léčby i možných vedlejších účinků. Po ukončení chemoterapie následuje až půlroční sledování zdravotního stavu pacienta. Proto je nutné k ceně léků připočítat i obnos za pobyt v nemocnici a ztrátu financí za dobu, kdy pacient není schopný pracovat. Jak uvádí Alvar (Alvar 2006), tak se konečná suma za úspěšně vyléčeného pacienta pohybuje od 175 \$ (přibližně 3 300 Kč) při léčbě miltefosinem, 467 \$ (přibližně 8 800 Kč) při léčbě amfotericinem B a 1 613 \$ (přibližně 30 400 Kč) při léčbě liposomálním amfotericinem. Předpokládáme-li, že se ročně vyskytne 100 000 nových případů ve státu Bihar v Indii, kde se jako lék první volby používá miltefosin a jako lék druhé volby amfotericin B, pak se suma za léčbu všech pacientů vyšplhá na 11 000 000 \$ (přibližně 207 250 000 Kč), (Alvar *et al.*

2006). Přitom je nutné si uvědomit, že finanční příjmy jsou v těchto oblastech mnohem nižší.

Zvláště komplikovaná je léčba u HIV pozitivních pacientů. V posledních dvou desetiletích bylo hlášeno více jak 2 000 koinfekcí leishmaniózy a HIV z oblastí jižní Evropy (Desjeux 2001). To se týká především Itálie, Francie, Portugalska a Španělska (Alvar *et al.* 1997). Tato koinfekce je více než pouhou souhrou dvou patogenů. Oba sdílejí stejné hostitelské buňky usnadňující jejich vlastní replikaci (parazita a viru) a oba vyvolávají T-buněčnou odpověď (Alvar *et al.* 2006).

Koinfekce zvyšuje mortalitu na 20-25 % v průběhu léčby a velká část pacientů umírá v průběhu 1-2 let po několika relapsech nemoci. Délka života infikovaných pacientů je o třetinu nižší než u pacientů s AIDS, kteří nemají leishmaniózu (Alvar *et al.* 2006). Hlavním problémem parazitární infekce je fakt, že může vyvolat aktivaci latentního HIV viru (Alvar *et al.* 2008).

Z klinického hlediska se koinfekce leishmaniózy a HIV projevuje téměř stejně jako VL s tím rozdílem, že mohou být napadeny i neobvyklé orgány, jako například plíce, hrtan, střevo a jiné. Ve většině případů dochází k relapsu i přes regulérní léčbu a více jak 40 % koinfikovaných pacientů nemá protilátky proti leishmaniím, ačkoli mají parazity přítomny v kostní dřeni i slezině (Alvar *et al.* 2006)

Z těchto důvodů by měla být chemoterapie zlepšena vývojem nových účinných, levnějších, dostupných a méně toxických léků (Rakotomanga *et al.* 2007). Jak vyplývá z předpokládaných účinků *o*-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů by mohl být možnou variantou pro řešení tohoto problému.

Výsledky získané pomocí přímého počítání v Bürkerově komůrce ukazují, že analogy *o*-fosfonatomethylcholinu jsou na promastigotní stádia *L. major* v koncentracích 50; 25; 10; 5; 2,5 mM účinné. Avšak interpretace výsledků je díky vzniklým deformitám buněk promastigotů velmi složitá a stává se značně subjektivní. Jednoznačnému rozlišení hynoucích promastigotů nepomohlo ani užití trypanové modře. Získaná data mají velké směrodatné odchylky, což je velmi pravděpodobně zapříčiněno právě touto subjektivitou měření.

Proto bylo přímé počítání v Bürkerově komůrce nahrazeno objektivnější a efektivnější metodou, určováním počtu promastigotů pomocí konverze tetrazolium bromidu, který je promastigoty metabolizován a výsledný metabolický produkt je následně měřen. Výsledky měření tedy nejsou ovlivněny tvarovou deformitou buněk.

Účinnost analogů *o*-fosfonatomethylcholinu je v koncentracích 50; 25; 10; 5; 2,5 mM zřejmá, proto byla pro pokus nepřímým stanovením počtu živých promastigotů pomocí konverze XTT zvolena koncentrace nižší, a to 50; 25; 10; 5; 2,5 a 1 μM , tedy koncentrace přibližně podobné účinným koncentracím pro miltefosine.

Výsledky pokusů ukazují, že všechny námi zkoušené analogy *o*-fosfonatomethylcholinu mají inhibující účinek na promastigotní stádia *L. major*. Ze získaných dat také vyplývá, že účinek posledního analogu *o*-fosfonatomethylcholinu H-3565 je v námi zvolených koncentracích neprůkazný, avšak jak vyplývá z přímého počítání, účinek má, ale až v koncentracích, které jsou pro medicínské účely příliš vysoké. Samotný *o*-fosfonatomethylcholin H-3488 také působí v koncentracích řádu mM jako inhibitor transportu cholinu do leishmanií, avšak tento účinek již není v koncentracích řádu μM tak jednoznačný.

Jak vyplývá z našich výsledků, čtyři z pěti analogů *o*-fosfonatomethylcholinu mají srovnatelnou účinnost s miltefosinem, který jak uvádí Escobar, působí proti *L. major* v rozmezí IC_{50} 4,8-13,1 μM (Escobar *et al.* 2002). Toto poměrně široké rozpětí účinnosti se projevuje i na velikosti chybové úsečky, která má u miltefosinu oproti zkoušeným analogům vyšší hodnotu.

Účinnost všech látek není stejná. Podle statistické analýzy mají analogy *o*-fosfonatomethylcholinu H-3504, H-3508, H-3519 a H-3521 odlišné hodnoty IC_{50} . Pro H-3504 je IC_{50} 2,66 μM , pro H-3508 IC_{50} 1,65 μM , H-3519 IC_{50} 1,45 μM a pro H-3521 je IC_{50} 1,81 μM .

Z tohoto vyplývá, že analogem, který má IC_{50} nejnižší je H-3519. Proto bychom k pokusům *in vivo* na myších doporučili hlavně H-3519, dále pak H-3504, H-3508 a H-3521. Je známo, že účinnost chemických látek na promastigoty je 2-10 \times vyšší než na amastigoty (Escobar *et al.* 2002). Dá se tedy předpokládat, že účinná koncentrace na amastigoty bude 2-10 \times vyšší.

Na základě naměřených hodnot se dá usuzovat, že délka alifatického CH_2 řetězce hraje v účinnosti analogů značnou roli. Nejvyšší účinnost má analog H-3519. Tato látka má nejkratší alifatický řetězec ($\text{O} - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{CH}_3$). S rostoucí délkou tohoto řetězce se zdá, že účinnost klesá. Příkladem může být H-3504, který má tento řetězec nejdelší ($\text{O} - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3$). Na druhou stranu *o*-fosfocholin H-3488, který tento alifatický řetězec postrádá, je proti leishmanií v koncentracích použitelných k medicínským účelům neúčinný. Optimální analog *o*-fosfonatomethylcholinu pro

inhibici leishmanií by tedy měl mít postranní řetězec, avšak ne příliš krátký a maximálně tak dlouhý jako u analogu H-3519 (tedy $O - CH_2 - (CH_2)_{11} - CH_3$).

Je nutné si uvědomit, že účinnost látek v *in vitro* testování nezaručuje jejich účinnost v modelech *in vivo*. Ačkoli byla u mnoha sloučenin prokázána aktivita v *in vitro* pokusech, jen málo z nich uspělo v důkladném testování na hlodavcích. Jen malá část z nich pak prokázala antileishmaniální účinnost v jiných než myších modelech (Croft. *et al.* 2006 b).

Z pokusů *in vitro* tedy nelze odhadovat možnou toxicitu analogů *o*-fosfonatomethylcholinu pro játra a ledviny či možnou nežádoucí interakci s některou metabolickou drahou v organismu živočichů. Před zavedením do lékařské praxe je nutné vyzkoušet účinky těchto látek v *in vivo* modelech. V současnosti jsou tyto problémy předmětem dalšího zkoumání vědeckých pracovníků spolupracujících s Prof. RNDr. Antonínem Holým, DrSc., dr.h.c. mult.

Problém s vedlejšími účinky má i miltefosin, který prošel důkladným *in vivo* testováním. Hlavním úskalím miltefosinu je jeho potenciální teratogenní vliv, který brání jeho použití u těhotných či kojících žen a u žen ve fertilním věku, jež neužívají antikoncepci (Alvar *et al.* 2008). To znamená, že ženy ve fertilním věku musí v průběhu léčby i další dva měsíce po léčbě užívat kontraceptiva a to kvůli dlouhému biologickému poločasu miltefosinu ($t_{1/2} = 120$ hod), (Alvar *et al.* 2006).

Pro naše experimenty byl vybrán druh *L. major* na základě jeho nejvyšší odolnosti vůči hexadecylfosfocholinu a amphotericinu B ze zkoumaných druhů leishmanií *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana* a *L. panamensis* (Escobar *et al.* 2002). Vycházeli jsme tedy z předpokladu, že budou-li námi testované analogy *o*-fosfonatomethylcholinu působit jako inhibitory pro *L. major*, budou tak působit i na ostatní leishmanie. Pro potvrzení této hypotézy byly provedeny experimenty s analogy *o*-fosfonatomethylcholinu i na nepatogenních *Leishmania tarentolae*, proti kterým byly tyto analogy taktéž účinné.

Zvolená metoda konverze XTT fungovala bez problémů, kromě *o*-fosfonatomethylcholinu H-3488, kdy po 24 hod kultivace v koncentraci 2,5 μ M promastigoti nenarostli na námi očekávané hodnoty. Získanou odchýlenou hodnotu si vysvětlujeme laboratorní chybou. Tento pokus jsme již znovu neopakovali, jelikož promastigotní stádia *L. major* dosáhla v ostatních koncentracích očekávaných hodnot. Navíc data získaná po 24 hod kultivace s analogy *o*-fosfonatomethylcholinu nebyla využita pro statistické vyhodnocení a následné dopočítání IC_{50} .

Metoda konverze tetrazolium bromidu se stala jedním z nejčastěji používaných nástrojů pro měření metabolicky aktivních buněk v buněčné biologii, a to od buněk savců až po mikroby (Berridge *et al.* 2005). Tato práce navíc ukázala možnost využití metody XTT pro pokusy s promastigoty leishmanií. Prokázala, že jde o metodu, která je objektivnější, rychlejší a efektivnější než přímé počítání buněk.

Z výsledků také vyplývá, že promastigotní stádia *L. major* nejsou analogy *o*-fosfonatomethylcholinu přímo zabíjena, ale působí na ně jako inhibitor růstu. Účinek analogů *o*-fosfonatomethylcholinu tedy není cidní, ale statický.

Dalším zajímavým zjištěním plynoucím ze získaných dat je fakt, že pro koncentraci 50 μM byly u všech analogů *o*-fosfonatomethylcholinu očekávány nižší počty přeživších promastigotů, avšak jejich počty převyšují počty v koncentraci 25 μM . To může být způsobeno dosud blíže neurčenými kinetickými vlastnostmi těchto zkoumaných látek.

Závěrem je vhodné dodat, že nebezpečí leishmaniózy nemusí být pro naši zeměpisnou polohu tak vzdálené, jak by se mohlo zdát. Vzhledem k postupnému globálnímu oteplování by se oblast vhodná pro přežití flebotomů mohla přesunout více na sever, až k našim hranicím (Mirhál *et al.* 2005).

6. Závěr

Testováním *in vitro* účinku lipofilních esterů *o*-fosfonatomethylcholinu pro potencionální antileishmaniální aktivitu na promastigotech *Leishmania major* byl potvrzen předpokládaný účinek čtyř ze šesti zkoumaných látek a to v koncentraci, která je srovnatelná se současně používaným lékem miltefosinem (tj. hexadecylesteru fosfocholinu) a zároveň je přijatelná pro *in vivo* použití. I v tomto případě zřejmě jde o modifikaci buněčné membrány vlivem silně hydrofobní iontové sloučeniny.

Pro H 3504 je IC_{50} 2,66 μ M, pro H 3508 je IC_{50} 1,65 μ M, H 3519 je IC_{50} 1,45 μ M a pro H 3521 je IC_{50} 1,81 μ M. *O*-fosfonatomethylcholin H-3488 nebyl dostatečně účinný. Náhradou trimethylamoniové funkce v *o*-fosfonatomethylcholinu kvartérní skupinou N-methylpyrrolidiniovou u látky H 3565 se její účinnost podstatně nemění.

Z výsledků měření vyplývá, že předmětem dalšího zkoumání v *in vivo* testech by měly být analogy *o*-fosfonatomethylcholinu H 3504, H 3508, H 3519 a H 3521.

7. Seznam použitých zkratk

CL	cutaneous leishmaniasis - kožní leishmanióza
DCL	diffuse cutaneous leishmaniasis - difúzní kožní leishmanióza
DMSO	dimethylsulfoxid
INF γ	interferon γ
IC ₅₀	inhibiční koncentrace
IL-2	interleukin 2
HIV	human immunodeficiency virus - virus lidské imunitní nedostatečnosti
H-3488	<i>o</i> -fosfonatomethylcholin
H-3504	analog <i>o</i> -fosfonatomethylcholinu – postranní alifatický řetězec s 16 C
H-3508	analog <i>o</i> -fosfonatomethylcholinu – postranní alifatický řetězec s 14 C
H-3519	analog <i>o</i> -fosfonatomethylcholinu – postranní alifatický řetězec s 13 C
H-3521	analog <i>o</i> -fosfonatomethylcholinu – postranní alifatický řetězec s 15 C
H-3565	analog <i>o</i> -fosfonatomethylcholinu – záměna trimethylamonia za kvartérní N-methylpyrrolidin
LCL	localised cutaneous leishmaniasis - lokalizovaná kožní leishmanióza
MCL	mucocutaneous leishmaniasis - slizniční leishmanióza
SGG	sloučeniny pětímocného antimonu
VL	visceral leishmaniasis - útrobní leishmanióza
XTT	tetrazolium bromid

8. Literatura

- Agrawal V. K., Singh B. Z.**, 2006: Miltefosine: First Oral Drug for Treatment of Visceral Leishmaniasis, *Med. J. Armed. Forces India* 62: 66—67.
- Ahluwalia S., Lawn S.D., Kanagalingam J., Grant H., Lockwood D. N. J.**, 2004: Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers and South America, *BMJ Publishing group* 9:329: 842—844.
- Alvar J., Canavate, Gutiérrez-Solar C. B., Jiménez M., Laguna F., López-Veléz R., Molina R., Moreno J.**, 1997: *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years, *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 298—319.
- Alvar J., Croft S., Olliaro P.**, 2006: Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis, *Advances Parasitol.* 61: 224—261.
- Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Boer M. D., Canavate C., Dedet J. P., Gradoni L., Horst R. T., López-Veléz R., Moreno J.**, 2008: Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 Years, *Clin. Microbiol. Rev.*, 21: 334—359.
- Amato V. S., Toun F. F., Bacha H.A., Neto V. A., Nicodemo A. C.**, 2008: Mucosal leishmaniasis Current cenário and prospects for treatment, *Acta Tropica* 105: 1—9.
- Balana-Fouce R., Reguera R. M., Cubría J. C., Ordonez D.**, 1998: The Pharmacology of Leishmaniasis, *Gen. Phar.* 4: 435—443.
- Bari A. U.**, 2006: Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease, *J. Pakistan Assoc. Dermatol.*, 16: 24—27.
- Berridge M. V., Hers P. M., Tan A. S.**, 2005: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnol. Annu. Rev.* 11., 127—152.
- Bhattacharya S. K., Jha T. K., Sundar S., Thakur C. P., Engel J., Sindemann H., Junge K., Karbwang J., Bryceson A. D. M., Berman J. D.**, 2004: Efficacy and Tolerability of Miltefosine for Childhood Visceral Leishmaniasis in India, *Clin. Infect. Dis.* 15; 38: 217—221
- Bogan C., Rollinghoff M.**, 1999: How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today* 5: 22—7.
- Boitz J. M., Ullman B.**, 2006: *Leishmania donovani* signify deficient in HGPRT, APRT or XPRT are viable in vitro and within mammalian macrophages, *Mol. Biochem. Parasitol.* 148: 24—30.

- Croft S.L., Yardley V.**, 2001: Chemotherapy of leishmaniasis, *Curr. Pharm. Des.* 8: 319–342.
- Croft S. L., Sundar S., Fairlamb A. H.**, 2006a: Drug resistance in Leishmaniasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 111–126.
- Croft S. L., Seifetr K., Yardley**, 2006b: Current scenario of drug development for leishmaniasis, *Indian J Med Res* 123: 399–410.
- Croft S. L., Seifetr K., M. Duchene**, 2003: Antiprotozoal activities of phospholipid analogues, *Mol. Biochem. Parasitol.* 126: 165–172
- Croft S. L., Barrett M. P., Urbina J. A.**, 2005: Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis, *Trends Parasitol.* 21: 508–512
- Čepička I., Lukeš J., Vávra J.**, 2007: Protozoologie. In: Volf P, Horák P., *Parazité a jejich biologie.* 50–137.
- Desjeux P.**, 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects *World Health Stat Q.*, Division of Control of Tropical Disease, World Health Organization, Geneva. 45: 267-75.
- Desjeux P.**, 2001: The increase risk factors for leishmaniasis worldwide, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 239–243.
- Desjeux P.**, 2004: Leishmaniasis: current situation and new perspectives, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 305–318.
- Ellis D.**, Amphotericin B: spektrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 7–10.
- Escobar P., Matu S., Marques C., Croft S.L.**, 2002: Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3), (eldefosine) and amphotericin B, *Acta Trop.* 81: 151–7.
- Fernández-Guerrero M. L., Robles P., Riva P., Mójer F., Muníz G., Górgolas M.**, 2004: Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis, *Acta Trop.* 90: 11–16.
- Grimaldi G. J. R., Tesh R. B.**, 1993: Leishmaniasis of New World: Current Concepts and Implications for Future Research, *Clin. Microbiol.* 6: 230–250.
- Guerin J.P., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S. L., Desjeux P., Wasuma M. K., Bryceson A. D. M.**, 2002: Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda, *Lancet Infect. Dis.* 2: 494–501.

- Handman E.**, 2001: Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development, Clin. Microbiol. Rev. 14 : 229—243.
- Holý A.**, 2003: Acyklické nukleosidfosfonáty: představy a skutečnost, Habilitační řízení, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouci
- Holý A., Otová B., Buděšínský M., Emerson D., Wiles M. E.**, 2001: 0-Phosphonomethylcholine, Its Analogues, AlkylEsters, and Their Biological Activity, J. Med. Chem. 44: 4462—7.
- Choudhury K., Zander D., Kube M., Reinhardt R., Clos J.**, 2008: Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and Sb^{III}, International J. Parasitol. 38: 1411—1423.
- Ječná L., Svárovská A., Besteiro S., Mottram J.C., Coombs G.H., Volf P.**, 2009: Inhibitor of Cysteine Peptidase Does Not Influence the Development of *Leishmania Mexicana* in *Lutzomyia longipalpis*, J. Med. Entomol. 46: 605—609.
- Jíra J.**, 2009: Antiprotozoika používaná k terapii leishmaniózy a trypanosomózy, In Remedia Compendium, 451—452.
- Korbel D. S., Finney C., Riley E. M.**, 2004: Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens, Int. J. Parasit. 34: 1517—1528.
- Lagler H., Matt U., Sillaber Ch., Winkler S., Graninger W.**, 2006: Successful treatment leishmaniasis with liposomal amphotericin B, Acta. Biomed. 2: 22—25.
- Mírhál V., Pospíšilová D., Suová M., Starý J.**, 2005: Pokrok v léčbě viscerální leishmaniózy, Klin. Farmakol. Farm. 19: 100—105.
- Molyneux D. H., Jefferies D.**, 1986: Feeding behaviour of pathogen infected vectors, Parasitology 92: 721—736.
- Murray H. W.**, 2001: Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2185—2197.
- Murray H. W., Berman J. D., Davies C. R., Saravin N. C.**, 2005: Advances in leishmaniasis, Lancet 366: 1562-1577.
- Rakotomanga M., Blanc S., Gaudin K., Chaminade P., Loiseau P. M.**, 2007: Miltefosine Affects Lipid Metabolism in *Leishmania donovani* Promastigotes, Antimicrob. Agents Chemother, 51: 1425—1430.

- Rasii Y., Javadian E., Nadim A., Rafizadeh S., Zahraii A., Azizi K., Mohebbali M.,** 2009: *Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus*, a Vector of *Leishmania infantum* in Northwestern Iran, J. Med. Entomol. 46: 1094—1098.
- Real F., Pouchelet M., Rabinovitch M.,** 2008: *Leishmania (L.) amazonensis*: Fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages, Exper. Parasitol. 119: 15—23
- Říhová-Ambrožová J.,** 2007: Efektivní koncentrace EC₅₀, letální koncentrace LC₅₀, inhibiční koncentrace IC₅₀, Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník, Praha, VŠCHT http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=E000, [cit. 2010-04-15].
- Sharma U., Singh S.,** 2008: Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control, Vector Borne Dis. 45: 255—272.
- Soto J., Soto P.,** 2006: Miltefosine oral treatment of leishmaniasis, Expert. Rev. Infect. Ther. 4: 177—85.
- Soto J., Toledo J., Gutierrez P., Nicholls R. S., Padilla J., Engel J., Fischer C., Voss A., Berman J.,** 2001: Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent, Clin. Infect Dis. 1;33: 57—61.
- Stefaniak J., Paul M., Kacprzak E., Skoryna-Karcz B.,** 2003: Visceral leishmaniasis, Parazitol. Epidemiol. 57: 341—8.
- Sundar S, More D. K., Singh M. K., Singh V. P., Sharma S., Makharia A., Kumar P. C. and Murray H. W.,** 2000: Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic, Clin. Infect. Dis. 31: 1104—1107.
- Van Voorish W. C.,** 1990: Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections, Drugs. 40: 176—202.
- Vial J., Eldin P., Tielens A G. M., van Hellemond J. J.,** 2003: Phospholipids in parasitic protozoa, Molec. Biochem. Paras. 126: 143-154
- Volf P., Hajmová M., Sadlová J., Votýpka J.,** 2004: Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models, Int. J. Parasitol. 34: 1221—1227.
- Wieder T., Reutter W., Orfanos C.E., Geilen C. C.,** 1999: Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds, Progress in Lipid Research 38: 249—259.

- Williams C., Espinosa O. A., Montenegro H., Cubilla L., Capson T. L., Ortega-Barría E., Romero L. I.,** 2003: Hydrosoluble formazan XTT: its applications to natural products drug discovery for *Leishmania*, *J. Microbial. Methods.* 55: 813—816.
- World Health Organization,** 2006: Control of leishmaniasis, Report by the Secretariat, Executive Board 118/4, Provisional agenda item 5.1
- World Health Organization,** 2008: Weekly epidemiological record, NO 44
- Zufferey R., Mamoun C. B.,** 2002: Choline transport in *Leishmania* major promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs, *Molecul. Biochem. Parazitol.*, 125: 127—134.