

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



## **Mechanismus účinku antihelmintik proti motolicím**

Mode of action of antihelminthics against trematodes

Bakalářská práce

Pavλίna Lípová

Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

2009

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat svému skvělému kamarádovi Radkovi za pomoc se stylistikou. Velký dík patří i mé rodině a mému příteli za jejich podporu po dobu mého studia.

## **Abstrakt**

Motolice jsou skupinou bezobratlých živočichů z kmene Platyhelminthes. Tito paraziti způsobují u lidí a zvířat závažná onemocnění, jakými jsou schistosomóza a fasciolóza. Ve své práci shrnuji dostupné poznatky o mechanismu účinku vybraných antihelminetik proti motolicím.

Mechanismy účinku jednotlivých léků se velmi liší. Praziquantel způsobuje paralýzu svalů parazita a navozuje morfologické změny tegumentu, díky kterým může zaútočit imunitní systém hostitele. Vápníkové kanály mohou být molekulární cíl léku. Oxamniquine nevratně inhibuje syntézu nukleových kyselin. Alkylace DNA způsobuje postupné blokování dělení buněk a syntézy proteinů. Ke smrti parazita proto nedochází okamžitě. Benzimidazoly, jako triclabendazol, jsou účinné proti motolicím, které neodpovídají na léčbu praziquantelem (např. *Fasciola hepatica*). Triclabendazol se váže na  $\beta$ -tubulin motolic a způsobí depolymeraci mikrotubulů. Tímto dojde k narušení mnoha buněčných procesů, u kterých hrají mikrotubuly důležitou roli (např. mitóza, vezikulární transport apod.). Artemether – derivát artemisininu – je velmi pomalu aktivován. Po jeho podání dochází u schistosomul k inhibici alkalické fosfatázy a ke snížení obsahu glykogenu, které se zdá být spojené s inhibicí glykolýzy. Artemether zřejmě ovlivňuje i metabolismus nukleových kyselin schistosom, protože po aplikaci léku dochází ke snížení podílu RNA.

### **Klíčová slova:**

Motolice; antihelmintika; mechanismus účinku; praziquantel; oxamniquine; triclabendazol; artemisininy

## **Abstract**

Trematodes are a group of parasitic invertebrates from the phylum Platyhelminthes. These parasites are important causative agents of serious diseases of people and animals like schistosomiasis and fasciolosis. In my thesis I have summarized available data on mode of action of selected anthelmintics against trematodes.

The modes of action of particular drugs are different. Praziquantel causes paralysis of the musculature of parasite and induces morphological changes of the tegument. Due to these changes, the immune system of host can attack the parasite. Calcium channels are possible targets of the drug. Oxamniquine causes irreversible inhibition of nucleic acid synthesis.

Alkylation of DNA leads to a progressive blocking of cell division and protein synthesis. Parasite death does not occur immediately. Benzimidazoles like triclabendazole are effective against trematodes which are non-susceptible to the treatment with praziquantel (e.g. *Fasciola hepatica*). Triclabendazole binds  $\beta$ -tubulin of trematodes and causes depolymerization of microtubules. This leads to the disruption of some cell processes, in which microtubules plays important role (e.g. mitosis, vesicle transport etc.). Artemether – derivate of artemisinin – is slowly activated. Its administration causes inhibition of alkaline phosphatase and decrease of glycogen content . It seems to be associated with inhibition of glycolysis. Arthemether also appears to affect nucleic acid metabolism of schistosomes. Its application causes decrease of RNA content.

### **Key words:**

Trematodes; anthelmintics; mode of action; praziquantel; oxamniquine; triclabendazole; artemisinins

# Obsah

1 Úvod.....	5
2 Charakteristika motolic.....	6
2.1 Morfologie motolic.....	6
2.2 Ontogenetický vývoj motolic.....	7
2.3 Prevence a léčba nemocí způsobených motolicemi.....	8
3 Antihelmintika.....	9
3.1 Praziquantel.....	9
3.1.1 Historie.....	9
3.1.2 Chemické složení a vlastnosti.....	9
3.1.3 Farmakokinetika a metabolismus.....	10
3.1.4 Specifická aktivita.....	11
3.1.5 Mechanismus účinku.....	11
3.1.6 Vedlejší příznaky a toxicita.....	16
3.1.7 Výrobci, balení, doporučené dávkování.....	16
3.1.8 Hromadná léčba – příklady kontrolních léčebných programů.....	17
3.1.9 Rezistence.....	19
3.1.10 Účinek pzq na ptačí schistosomy.....	19
3.2 Oxamniquine.....	20
3.2.1 Historie.....	20
3.2.2 Chemické složení.....	20
3.2.3 Farmakokinetika.....	21
3.2.4 Mechanismus účinku.....	21
3.2.5 Vedlejší příznaky a toxicita.....	22
3.2.6 Doporučené dávkování, balení.....	22
3.2.7 Hromadná léčba – příklady hromadných kontrolních programů.....	23
3.2.8 Rezistence.....	24
3.3 Další léky používané k léčbě trematodóz.....	24
3.3.1 Triclabendazol.....	24
3.3.2 Deriváty artemisininu.....	26
3.4 Nové léky.....	28
4 Závěr.....	29
5 Použitá literatura.....	30
5.1 Přímé citace.....	30
5.2 Nepřímé citace.....	35

# 1 Úvod

Motolice jsou významní původci závažných onemocnění, která jsou důležitá jak z lékařského, tak veterinárního hlediska. Mezi nejnebezpečnější onemocnění způsobené motolicemi patří schistosomóza. Tuto nemoc zařazuje Světová zdravotnická organizace mezi nejzávažnější lidské parazitémie (<http://www.who.int/tdr/svc/diseases/schistosomiasis>). Z veterinárního hlediska je důležitá fasciolóza.

Popsání a pochopení mechanismu účinku používaných léků nám může dopomoci odhalit např. fyziologické procesy, strukturu cytoskeletu a dráhy syntézy různých makromolekul parazita. Dále může poskytnout informace o mechanismu rezistence k lékům. Popis těchto mechanismů nám umožňuje pochopit biologii parazitů a jejich vztah k hostiteli. Zároveň se otevírá prostor pro vývoj nových léků a vakcín, ještě cíleněji zaměřených proti jednotlivým skupinám parazitů

V této práci shrnuji dostupné poznatky o mechanismu účinku nejběžněji používaných léků proti motolicím, jejich využití v praxi a dále se krátce věnuji otázce možné rezistence. Krátká zmínka na konci patří novým lékům, jejichž účinnost se teprve experimentálně ověřuje.

## 2 Charakteristika motolic

Motolice (Trematoda) jsou třídou bezobratlých živočichů z kmene Platyhelminthes a podkmene Neodermata. Tuto třídu dále můžeme rozdělit na dvě podtřídy: Apidogastrea a Digenea.

Podtřída Apidogastrea je poměrně malá skupina, jejíž zástupci parazitují u měkkýšů, paryb, kostnatých ryb a želv. V této práci se chci věnovat především zástupcům podtřídy Digenea, kteří jsou významnými původci chorob lidí a zvířat.

Motolice jsou většinou endoparaziti obratlovců (výjimečně ektoparaziti). Napadají prakticky všechny orgánové soustavy, hlavně trávicí systém, krevní řečiště, nervovou soustavu, dýchací systém a další orgánové soustavy.

### 2.1 Morfologie motolic

Motolice mají bilaterálně souměrné, většinou dorzoventrálně zploštělé tělo, nejčastěji oválného tvaru. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od několika desetin milimetru až do několika centimetrů, výjimečně do velikosti několika metrů. Typickými orgány motolic jsou přísavky na ventrální straně těla. Nejčastěji jsou dvě – ústní a břišní (acetabulum), které mají přichytávací funkci. U zástupců různých skupin mohou přísavky zcela chybět (např. *Sanguinicola inermis*) nebo mohou být nahrazeny jinými strukturami (např. dospělci rodu *Notocotylus* mají na ventrální straně řady žlázových papil). Povrch těla dospělých motolic je tvořen syncytiem (neodermis), ze kterého často vystupují trny.

Trávicí soustava je dobře vyvinutá. Začíná ústním otvorem, který bývá obklopen ústní přísavkou. Střevo má nejčastěji dvě větve, které mohou být zakončeny slepě nebo se mohou v zadní části spojovat a vytvořit okruh. Ze střeva dále mohou vybíhat postranní slepé výběžky (např. *Fasciola hepatica*). Absorpce živin může probíhat i přes tegument.

Vylučovací soustava je protonefridiálního typu. Plaménkové buňky filtrují tělní tekutinu z parenchymového prostoru. Filtrát je odváděn soustavou exkretčních kanálků, které se spojují do exkretčního měchýře, z něhož je tekutina odváděna na povrch exkretčním pórem.

Nervová soustava je orthogonálního typu. Na přední straně těla se nachází párové cerebrální ganglium, ze kterého vychází krátké nervové provazce k přednímu konci těla a další nervové provazce, které jsou spojené v intervalech příčnými komisurami ke konci zadnímu.

Svalová soustava má tři vrstvy. První vrstvou je okružní svalovina, pod ní se nachází vrstva podélné svaloviny a nejbazálnější vrstvou je šikmá svalovina. Dýchací a oběhový systém není vyvinutý, dále u všech motolic chybí tělní dutina.

## 2.2 Ontogenetický vývoj motolic

Většina motolic jsou hermafroditická, samčí i samičí orgány nalezneme v jednom jedinci. Vývojové cykly motolic podtřídy Digenea jsou nepřímé, zahrnují většinou dva a více mezihostitelů. Dospělé motolice produkují vajíčka, která v sobě mohou uchovávat vyvinutou larvu (miracidium) už v době vyloučení z hostitele. Miracidium opouští vajíčko, volně plave ve vodě a aktivně vyhledává prvního mezihostitele, kterým je nejčastěji měkkýš. Během této doby nepřijímá potravu. K orientaci využívá receptory, kterými rozpoznává světlo, látky vylučované plžem a směr gravitačního zrychlení. Pokud miracidium najde hostitele, tak do něj penetruje a následně uvnitř hostitele dochází k přeměně na mateřskou sporocystu. Ta poté produkuje dceřiné sporocysty nebo redie (ty se vyskytují u větší části motolic). Dceřiné sporocysty a redie vytvářejí další dceřiné sporocysty či další dceřiné redie, které začnou v určité fázi produkovat cercárie. To jsou stadia, která většinou opouští tělo prvního mezihostitele a to buď aktivně nebo pasivně. Další vývoj motolic se může ubírat několika směry. V případě dvouhostitelského cyklu cercárie opustí prvního mezihostitele, a poté mohou přímo penetrovat do definitivního hostitele (čeleď Schistosomatidae). V dalších možnostech dvouhostitelského cyklu cercárie mohou přisednout k pevnému podkladu, odhodit ocásek a pomocí cystogenních žlázek kolem sebe utvořit cystu, která je odolná vůči vlivům vnějšího prostředí – vzniká tzv. metacercárie. Ta poté může být pozřena definitivním hostitelem (např. čeleď Fasciolidae). U tříhostitelských cyklů cercárie pronikají do druhého mezihostitele (aktivně nebo mohou být pozřeny) a až zde se tvoří metacercárie. Pokud je druhý mezihostitel pozřen definitivním hostitelem, dochází k vývoji dospělých motolic a cyklus se uzavírá (např. čeleď Paragonimidae). V případě čtyřhostitelských cyklů se vyskytuje stadium mezocercárie, které se nachází mezi stadii cercárie a metacercárie. Cercárie pronikne do druhého mezihostitele a změní se v mezocercárii, metacercárie se pak vyvíjí až ve třetím mezihostiteli nebo v definitivním hostiteli, kde následně vzniká dospělec. (např. čeledi Diplostomatidae, Strigeidae).

Při penetraci do druhého mezihostitele či definitivního hostitele cercárie odvrhují ocásek. U některých zástupců mají tato stadia, která aktivně migrují tělem hostitele do doby, než se přemění v dospělce, různá označení (např. stadium schistosomuly u čeledi



Schistosomatidae). Životní cykly motolic jsou velmi komplikované a mohou probíhat nejen popsánymi způsoby.

### **2.3 Prevence a léčba nemocí způsobených motolicemi**

Prevence nemocí způsobených těmito parazity se může uskutečňovat několika způsoby. Velmi dobrým řešením se ukázala výstavba kanalizací, která značně omezila rozšiřování vajíček schistosom. Šíření vajíček je ještě možné omezit dezinfekcí výkalů, popřípadě jejich chemickou úpravou nebo spalováním. Jinou alternativou je snižování populace meziphostitelských měkkýšů. Nejčastějším řešením je vysoušení vodních ploch nebo vhodný chemický zásah. Většina doposud používaných chemických prostředků není šetrná k životnímu prostředí. V současné době se začínají prosazovat přírodní látky izolované z rostlin (např. čeled' Euphorbiaceae nebo Phytolaccaceae). Tyto látky mají taktéž moluskocidní účinek, jsou však narozdíl od syntetických chemikálií šetrné k životnímu prostředí. Životní cyklus parazita je dále možné přerušit tím, že je mu znemožněn přenos na definitivního hostitele. Často se parazit dostane do svého hostitele společně se špatně omytou nebo nedostatečně tepelně upravenou potravou. Proto je velmi důležité dodržovat přísné hygienické zásady, především v oblastech výskytu nebezpečných druhů parazitů. V případě schistosom, penetrujících kůží hostitele, je třeba se vyvarovat kontaktu s vodními plochami, v nichž se vyskytují meziphostitelští plži (Volf a kol. 2007).

Na léčbu trematodóz je na trhu dostupné velké množství léků. Pro účely této práce jsem si vybrala některé léky, které se používají na léčbu schistosomózy (praziquantel, oxamniquine, deriváty artemisininu) a fasciolózy (triclabendazol).

## 3 Antihelmintika

Antihelmintika jsou léčiva, která se používají na léčbu nemocí způsobených helminty různých skupin.

### 3.1 Praziquantel

Praziquantel (dále jen pzq) je v současné době nejpoužívanějším antihelmintikem na léčbu schistosomózy. Dále je účinným lékem proti různým druhům tasemnic, nemá téměř žádný účinek proti nematodům. Mezi jeho hlavní klady patří nedostatek vážných krátkodobých a dlouhodobých vedlejších příznaků, možnost podat lék v jedné dávce orální cestou a relativně nízká cena (Cioli a kol. 1995).

#### 3.1.1 Historie

Pyrazinoisochinolinový kruh, jádro struktury pzq, byl původně prozkoumán společností Merck jako možný zdroj pro vývoj trankvilizérů (léky odstraňující chorobnou úzkost a strach). Na počátku 70. let společnost Bayer odhalila v pzq antiparazitické vlastnosti, tudíž další vývoj směřoval od trankvilizérů k antihelmintikům (Groll 1984, cit. podle Cioli a kol. 1995). Posléze došlo k syntéze a testování nových sloučenin, mezi kterými byl praziquantel, původně pojmenovaný „EMBAY 8440“ (Seubert a kol. 1977). Nejdříve se používal hlavně jako lék proti tasemnicím, ale později byl testován pro svou schistosomicidní aktivitu na zvířatech (Gönnert a Andrews 1977) a následně i na lidských dobrovolnících (Leopold a kol. 1978).

#### 3.1.2 Chemické složení a vlastnosti

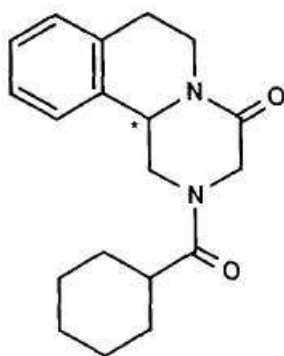
Vzorec pzq je 2-cyklohexylkarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isochinolin-4-on. Jedná se o bílý krystalický prášek hořké příchuti. Teplota tání je 136-140 °C, při této teplotě zároveň dochází k rozkladu látky. Pzq je za normálních podmínek stabilní, je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu a dobře rozpustný v organických rozpouštědlech jako je chloroform a dimethylsulfoxid (Cioli a Pica-Mattoccia 2003).

Pzq má asymetrické centrum na pozici 11b (viz obrázek 1, centrum asymetrie je označeno \*). V komerčních přípravcích jde o racemickou směs, která obsahuje stejným dílem (+)- a (-)-izomery. Pzq byl pacientům podán buď jako (-)-enantiomer (léčebná dávka 20 mg/kg) nebo jako směs obou izomerů (léčebná dávka 40 mg/kg). Po vyhodnocení bylo

zjištěno, že není statisticky žádný významný rozdíl mezi těmito dvěma způsoby léčby. Navíc při léčbě (-)-enantiomerem se u pacientů vyskytovalo méně vedlejších příznaků. Dále (-)-pzq mohl být použit v polovičním množství léčebné dávky než pzq, který obsahoval racemickou směs (Wu a kol. 1991).

### 3.1.3 Farmakokinetika a metabolismus

Pzq podaný perorálně je velmi rychle absorbován. Vrchol koncentrace v séru je dosažen za 1-2 hodiny po podání 50 mg/kg tělesné hmotnosti u zdravých dospělých lidí (Leopold a kol. 1978, Pearson a Guerrant 1983). Metabolické zpracování je také velmi rychlé, pzq projde výraznou přeměnou v játrech. Poločas rozpadu nezměněné látky je kolem 1,5 hodiny a pro metabolické vedlejší produkty kolem 4-6 hodin (King a Mahmoud 1989, Pearson a Guerrant 1986). Metabolity jsou nejčastěji reprezentovány monohydroxylovaným pzq, v menším rozsahu dihydroxylovaným pzq a velmi malé množství představuje trihydroxylovaný metabolit. Mezi hlavní metabolity patří 4-hydroxycyklohexylkarbonylový analog, který představuje až dvě třetiny metabolitů v moči (Cioli a kol. 1995). (-)-izomer tohoto metabolitu vykazuje stejný účinek jako (-)-izomer nezměněného pzq (Staud a kol. 1992). Vyloučení léku probíhá z 80 % močí, zbytek nalezneme ve žluči a ve stolici. Pzq byl nalezen i v mateřském mléce, ale v nepatrném množství. Pouze velmi malé procento nezměněné látky je vyloučeno (méně než 1 % celkové dávky). Kolem 80 % celkové látky bylo odstraněno z léčené krysy během 24 hodin a po 4-5 dnech nebyly po přípravku nalezeny žádné stopy (Cioli a kol. 1995).



Obrázek 1: Chemická struktura praziquantelu (podle Cioli a kol. 1995).

### 3.1.4 Specifická aktivita

Pzq je účinný proti schistosomám, které infikují člověka, např.: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* a *S. mekongi* (Abdul-Ghani a kol. 2009).

Účinek pzq je závislý na dospělosti, na pohlaví červů a dále na tom, jestli jsou spárovaní či nikoliv. U nedospělých stadií schistosom dochází k dramatickému snížení citlivosti k pzq. Nespárované samice i samci jsou méně citlivé k účinkům pzq než spárovaní jedinci stejného stáří (Pica-Mattoccia a Cioli, 2004). Běžně se udává, že samci schistosom jsou citlivější k účinku pzq než samice kvůli zjevnějšímu poničení tegumentu. Nicméně právě samice schistosom jsou těmi, které jsou preferenčně zabíjeny pzq (Fallon a kol. 1994).

Pzq se dále používá na léčbu dalších nemocí způsobených motolicemi, např.: *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus* spp., *Fasciolopsis buski*, *Metagonimus yokogawai* a *Heterophyes heterophyes* (Abdul-Ghani a kol. 2009). Léčba těchto infekcí se obvykle uskutečňuje v dávkách 25 mg/kg po dobu tří dnů (Cioli a Pica-Mattoccia 2003).

### 3.1.5 Mechanismus účinku

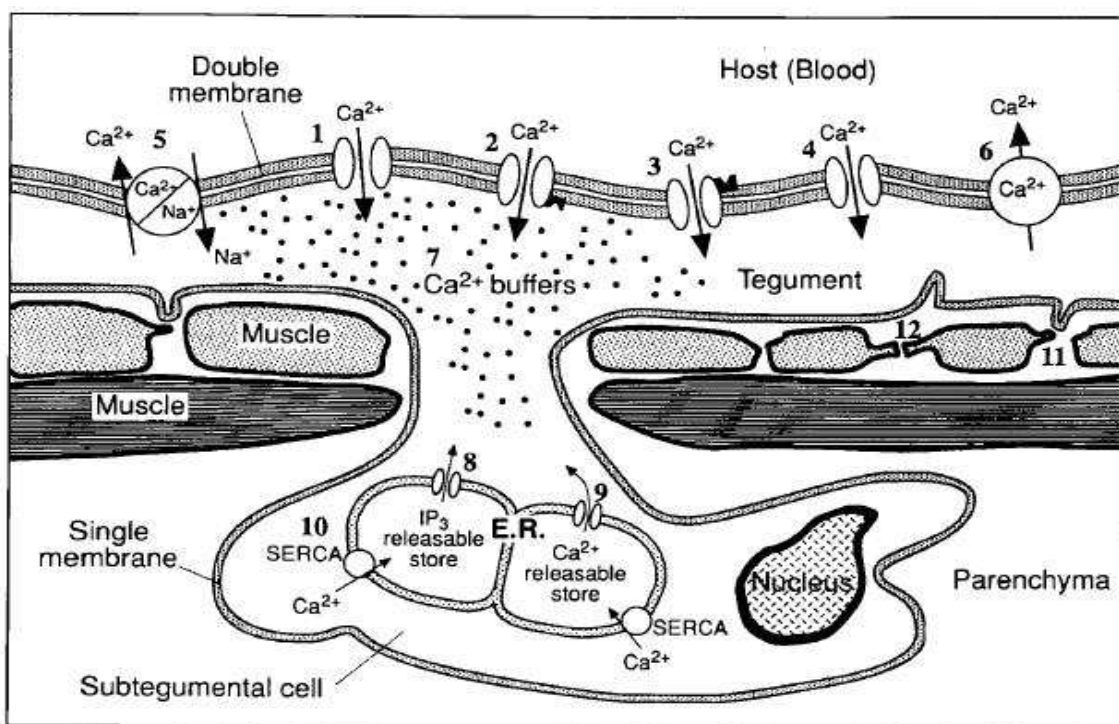
Navzdory značnému úsilí stále není přesný mechanismus účinku pzq plně objasněn. Přestože experimenty probíhají několik let, stále se ještě nepodařilo identifikovat charakter a lokalizaci molekulárních cílů léku (Redman a kol. 1996, Cioli a Pica-Mattoccia 2003).

#### *Intracelulární zvýšení koncentrace vápníku, svalová kontrakce*

Jedním z nejvýznamnějších účinků je výrazné zvýšení intracelulárního vápníku v parazitovi, které je následně doprovázené svalovou kontrakcí. Tato kontrakce je způsobena již mikromolární koncentrací pzq. Kontrakce nenastane, pokud červa necháme dlouho v médiu bez  $\text{Ca}^{2+}$ , nebo pokud je v médiu příliš vysoký poměr  $\text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+}$ . Kontrakce může nastat, pokud je preinkubace v médiu bez vápníku příliš krátká (méně než 1 minuta), ale v tomto případě dojde ke kontrakci se zpožděním (cca 10 min). Předpokládá se, že ke zvýšení svalového napětí je zapotřebí čerpat  $\text{Ca}^{2+}$  ze zásobáren parazita a k udržení kontrakce je nutné odebírat vápníkové ionty z prostředí. Pzq snižuje pronikání  $\text{K}^+$  do těla samců schistosom, vtékání  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$  je však urychleno, přičemž  $\text{Na}^+$  vtéká pomaleji. Dále bylo zjištěno, že pzq nemá vlastnosti ionoforu (Pax a kol. 1978). Svalovou kontrakci můžeme také zvrátit, a to buď odstraněním pzq nebo pzq může být blokován  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ , ale nikoli  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  a inhibitorem  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů D-600 (D-600, methoxyverapamil inhibuje savčí vápníkové kanály L-typu;

Fetterer a kol. 1980). Cunha a Noël (1997) popsali, že 100  $\mu\text{M}$  pzq nemá žádný vliv na ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ) ATPázu schistosom nebo na ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) ATPázovou aktivitu.

Pokud aplikujeme pzq do preparátu z hladkých svalů plže, pzq napodobuje aplikaci kofeinu. Po aplikaci kofeinu do svalů plže dojde k odstranění efektu pzq (Gardner a Brezden 1984). Některé experimenty odhalily, že kofein a pzq mohou mít stejné místo působení (Martin a kol. 1997). V hladkých svalech obratlovců kofein stimuluje otevírání velkých kationtových kanálů v sarkoplazmatickém retikulu, známých pod zkratkou CICR (Calcium-Induce Calcium Release, Herrmann-Frank a kol. 1991). Tyto kanály jsou aktivovány cytosolickým vzestupem  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP a kofeinu a jsou inhibovány  $\text{Mg}^{2+}$  (Grégoire a kol. 1993). Velké kationtové kanály, které mohou být podobné CICR kanálům, byly již pozorovány v membráně schistosom (Day a kol. 1992). Pokud by kofein měl stejné místo působení jako pzq, na obrázku 2 by působil ve fázi 9.



Obrázek 2: Struktura tělní stěny *S. mansoni*, obrázek zobrazuje možná místa účinku pzq a mechanismus transportu  $\text{Ca}^{2+}$  dovnitř a ven tegumentu (Martin 1997).

Vysvětlivky k obrázku 2: 1: napětově řízený  $\text{Ca}^{2+}$  kanál; 2: intracelulární přenašeč, který aktivuje  $\text{Ca}^{2+}$  kanály; 3: extracelulární receptor působící na  $\text{Ca}^{2+}$  kanály; 4: neselektivní kationtový kanál, který dovoluje vstup  $\text{Ca}^{2+}$ ; 5:  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pumpa; 6:  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáza, která odčerpává vápník ven; 7: intrategumentální vápníkové ionty; 8: zásoby  $\text{IP}_3$  v sarkoplazmatickém retikulu; 9: CICR kanály; 10:  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáza; 11: elektrické spojení mezi svalovými buňkami a tegumentem; 12: elektrické spojení mezi svalovými buňkami

Napětově řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály jsou možným cílem pzq. Tyto kanály jsou kritickým místem vstupu extracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a hrají důležitou roli v regulaci intracelulární úrovně vápenatých iontů (Greenberg 2005a).

### *Struktura a funkce napětově řízených $\text{Ca}^{2+}$ kanálů*

Napětově řízené vápníkové kanály jsou základem elektrické dráždivosti buněk. Otevírají se v odpověď na změny membránového potenciálu, selektivně dovolí iontům proudit po směru elektrochemického gradientu přes membránu. Tyto kanály dále napomáhají při intracelulárních dějích, jako jsou kontrakce, sekrece, synaptické přenosy apod. (Randall a Benham 1999). Napětově řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály se skládají z póru, který je formován  $\alpha_1$  podjednotkou a dalšími asociovanými podjednotkami, které utváří aktivitu kanálu.  $\alpha_1$  podjednotka  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu se skládá ze čtyř opakujících se domén, každá z nich obsahuje šest transmembránových segmentů (S1-S6). Tato podjednotka určuje fyziologické a farmakologické vlastnosti  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu. Intracelulární  $\beta$  podjednotka je představována  $\alpha$  šroubovicemi, ale žádným transmembránovým segmentem, zatímco  $\gamma$  podjednotka je glykoprotein se čtyřmi transmembránovými segmenty.  $\alpha_2$  podjednotka má mnoho glykosylovaných míst a několik hydrofobních sekvencí. Biosyntetické studie ukázaly, že je to extracelulární, membránový protein připojený pomocí disulfidických můstků k  $\delta$  podjednotce (Caterall 2000).

U bezobratlých živočichů a u obratlovců byly nalezeny a popsány 2 třídy  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů – LVA (Low voltage activated; jsou aktivovány slabou depolarizací plazmatické membrány) a HVA (High voltage activated). HVA kanály můžeme dále rozdělit na L-typ, který se vyskytuje u obratlovců a je citlivý k dihydropyridinovým  $\text{Ca}^{2+}$  kanálovým inhibitorům, jako je např. nifedipin, nimodipin a na non-L-typ, který je nesenzitivní k dihydropyridinům. LVA kanály jsou otevírány  $\text{Ca}_v3$   $\alpha_1$  podjednotkou (Perez-Reyes 2003). L-typ a non-L-typ HVA kanálů jsou otevírány  $\text{Ca}_v1$   $\alpha_1$ , respektive  $\text{Ca}_v2$   $\alpha_1$  podjednotkami. V bezobratlých živočiších byly nalezeny LVA i HVA subtypy (Jeziorski a kol. 2000).

V HVA  $\text{Ca}^{2+}$  kanálech je  $\alpha_1$  podjednotka spojena s dalšími pomocnými podjednotkami, kterými jsou  $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotky.  $\beta$  podjednotka  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu ( $\text{Ca}_v\beta_s$ ) je poměrně dobře prozkoumaná. Má velký vliv na několik biofyzikálních vlastností kanálu, např. napětovou závislost aktivace kanálu, stálý stav inaktivace, rychlost inaktivace apod. (Dolphin 2003). Primární místo vazby  $\alpha_1$  podjednotky na  $\text{Ca}_v\beta_s$  je AID (Alpha Interaction Domain), oblast s osmnácti aminokyselinami v intracelulární smyčce mezi doménou I a II  $\alpha_1$  podjednotky (Pragnell a kol. 1994). Několik důkazů naznačuje, že vysoce konzervované

místo s přibližně třiceti aminokyselinami v  $\text{Ca}_v\beta_s$ , nazývané BID (Beta Interaction Domain) slouží jako primární místo pro interakci  $\beta$  podjednotky s  $\alpha_1$  podjednotkou (De Waard a kol. 1994). Nicméně současné krystalické struktury tuto hypotézu příliš nepotvrzují, jelikož BID region je skrytý uvnitř  $\beta$  podjednotky, proto je tedy nepravděpodobné, že by se přímo účastnil interakce protein-protein, jako je tomu u vazby s AID (Greenberg 2005b).

#### *Podjednotky vápníkových kanálů u schistosom*

Struktura  $\alpha_1$  a  $\beta$  podjednotky vápníkových kanálů schistosom se začíná objasňovat (Kohn a kol. 2001a,b). U dospělých schistosom najdeme tři HVA  $\text{Ca}^{2+}$  kanály s  $\alpha_1$  podjednotkovými subtypy. Na základě určení struktury dva náleží do třídy non-L-typů a jeden do třídy L-typů (Kohn a kol. 2001a). Schistosomy dále mají ještě nejméně dva subtypy  $\text{Ca}_v\beta_s$ , jeden byl získán expresí ze *S. japonicum* ( $\text{SjCa}_v\beta$ ) a druhý ze *S. mansoni* ( $\text{SmCa}_v\beta\text{A}$ ). Strukturní motivy těchto dvou podjednotek se liší od ostatních známých  $\beta$  podjednotek například tím, že jsou větší než ostatní  $\beta$  podjednotky – obsahují prodloužené sekvence v C-terminální oblasti. Další rozdíl je v BID – dva konzervované serinové zbytky, které reprezentují potenciální fosforylační místa v BID, jsou zaměněny za jiné aminokyselinové zbytky (Kohn a kol. 2001b, 2003). Jedna ze zajímavých vlastností těchto  $\text{Ca}_v\beta$  schistosom je, že pokud jsou koexprimovány v oocytu žáby *Xenopus*, například s  $\alpha_1$  podjednotkou medúzy ( $\text{CyCa}_v1$ ) nebo člověka ( $\text{Ca}_v2.3$ ), dojde k dramatickému snížení úrovně toku kanálem. Může dojít až k posunutí poměru tok/napětí  $\alpha_1$  podjednotky při hyperpolarizačním vedení. Dále mohou  $\text{Ca}_v\beta_s$  schistosom udělit senzitivitu jinak pzq-insenzitivním savčím  $\alpha_1$  podjednotkám ( $\text{Ca}_v2.3$ ). Pokud exprimujeme savčí  $\text{Ca}_v2.3$  samotné v oocytu žáby *Xenopus*, nedojde k žádné odpovědi na 100 nM pzq. Ale pokud koexprimujeme  $\text{Ca}_v2.3$  s jedním z  $\text{Ca}_v\beta_s$  schistosomy, vrchol  $\text{Ca}^{2+}$  toku je 1,5-2x zvýšen v přítomnosti 100 nM koncentrace pzq (Kohn a kol. 2001b). Toto pzq-závislé zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  vtoku bylo nalezeno u vápníkových kanálů skládajících se z různých variant  $\beta$  podjednotek, které jsou shodné s účinkem léku na  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázu schistosom a zahrnují různé  $\text{Ca}_v\beta_s$  schistosom (Greenberg 2005b).

Mezi další nové poznatky patří možnost ovlivnění účinku pzq pomocí cytochalasinu D (CyD, způsobuje narušení aktinového skeletu). Vliv cytoskeletu na vápníkové kanály byl zjištěn u mnoha buněčných typů (např. u buněk neuronů, buněk myokardu, svalové buňky). Pokud byly schistosomy preinkubovány při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  CyD a vyšší, došlo ke kompletnímu potlačení letálních účinků pzq. Autoři to vysvětlují tím, že rozrušení aktinového cytoskeletu blokuje funkci vápníkových kanálů. To naznačuje, že vápníkové kanály jsou

zapojeny v aktivitě pzq. Dalším možným vysvětlením je, že CyD může kompetovat s pzq o tatáž vazebná místa. Tato teorie však není příliš podporována, protože pokud byla zvýšena koncentrace pzq, CyD byl přesto schopen inhibovat schistosomicidní aktivitu pzq. Inhibiční efekt CyD nastane pouze tehdy, pokud byl aplikován před pzq, což naznačuje, že CyD blokuje pouze časné účinky pzq. CyD navíc nenarušuje paralýzu svalů způsobenou pzq, pravděpodobně díky uvolnění vápníku z vnitřních zásobáren, které nejsou pod kontrolou cytoskeletu (Pica-Mattocchia a kol. 2007).

Pica-Mattocchia a kol. (2008) zjistili, že jejich výsledky nekorelují s všeobecným názorem, že zvýšení vtoku  $Ca^{2+}$  je klíčovým faktorem aktivity pzq. Vtok vápníku způsobený pzq nezpůsobuje smrt parazita nejméně ve dvou případech: (a) pokud jsou schistosomy preinkubovány s CyD a (b) pokud je zásah veden proti nedospělým stádiím.

#### *Morfologické změny, vystavení antigenů a imunitní odpověď hostitele*

Pzq způsobuje porušení povrchu parazita a v důsledku toho dojde k obnažení a vystavení jeho antigenů, které slouží jako cíl hostitelské imunitní odpovědi. Tím dojde k zesílení účinku pzq.

Po podání léčebné dávky pzq dochází během jedné hodiny k rychlému přesunu červa do jater. V této době u samců dochází k rozsáhlé vakuolizaci bazální části tegumentu. „Puchýřky“ na povrchu zřejmě odráží postup vakuolizace z vnitřní části tegumentu směrem k vnější. Intenzivní vakuolizace byla pozorována na tegumentu již 15 minut po podání léčiva. Buňky obranného systému hostitele adherovaly na tegument a začaly penetrovat dovnitř parazita přibližně čtyři hodiny po zahájení léčby. Již po sedmnácti hodinách byli červi fixováni prostřednictvím fibroblastů ke stěně cév a jejich vnitřní struktura byla značně zničena hostitelskými buňkami. Po 14 až 18 dnech byly nalezeny zbytky parazita v centru granulomů (Mehlhorn a kol. 1981). Schistosomy léčené subletální dávkou mohou obnovit narušený tegument, ale tento proces je velmi pomalý (Shaw a Erasmus 1987). Podáním nižšího množství pzq než léčebné dávky došlo u samic schistosom během 24 hodin k morfologickým změnám vitelárií a germárií, což vedlo až k zastavení produkce vajíček. Nicméně pokud se spárovaly se samci, byly schopné obnovy a mohly znovu začít produkovat vajíčka (Shaw a Erasmus 1988).

Myši bez B buněk slabě odpovídaly na terapii pzq (asi 20% účinnost), ale pokud jim byla podána injekce s imunním sérem, došlo ke zvýšení účinku léku (Brindley a Sher 1987). Léčba pzq zvyšuje vystavení antigenů schistosom na jejich povrchu (Harnett a Kusel 1986). Mezi takové antigeny patří např. alkalická fosfatáza (Fallon a kol.1994), aktin a



acetylcholinesteráza (Redman a kol. 1996). Tyto antigeny se zřejmě připojují k membráně přes glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvu a mohou být experimentálně uvolněny z povrchu parazita pomocí bakteriální fosfatidylinositol-specifické fosfolipázy C (Espinoza a kol. 1991). Aktivita specifické GPI fosfolipázy D (GPIPLD) byla nalezena u *S. mansoni*. Redman a kol. (1996) znázornili tři příklady možných cest, při kterých dojde k obnažení antigenů, přičemž jednou z nich je, že po podání pzq dojde ke zvýšení toku  $Ca^{2+}$  do parazita. To způsobí svalovou kontrakci a zároveň může dojít k aktivaci buněčné signální dráhy, např. přes adenylát cyklázu a GPIPLD, což způsobí zvýšení hladiny cAMP a diacylglycerolu v tegumentu. Díky tomuto zvýšení dojde ke změně ve struktuře proteinů a dojde k vakuolizaci tegumentu a následnému obnažení antigenů.

### 3.1.6 Vedlejší příznaky a toxicita

Vedlejší příznaky se vyskytují u poměrně velkého procenta pacientů (30-60 % případů), ale většinou jsou jen mírné a krátkodobé. K prvním příznakům dochází téměř okamžitě, přibližně 0,5-1 hodinu po podání léčiva. Mezi nejčastější obtíže patří bolest břicha, nevolnost, zvracení, nechutenství, průjem. Mezi další příznaky patří horečka, únava, bolest hlavy, závrať, ospalost, svědění kůže (Berhe a kol. 1999).

Frekvence a vážnost vedlejších příznaků většinou přímo koreluje s intenzitou infekce. Mezi závažnější komplikace patří krvavý průjem a kopřivka s otoky (Polderman a kol. 1984). Pokud zvážíme všechny okolnosti, pzq je velmi dobře tolerovaný lék, který potřebuje minimální lékařský dohled, a proto je vhodný pro hromadné léčebné programy.

Testy na zvířatech ukázaly, že toxicita pzq je velmi nízká, a to jak v akutních, tak i v dlouhodobých experimentech (Frohberg 1984). V mutagenních studiích na bakteriálních, kvasinkových a savčích systémech se neprokázalo žádné riziko genotoxicity (Kramers a kol. 1991, cit. podle Cioli a Pica-Mattoccia 2003).

### 3.1.7 Výrobci, balení, doporučené dávkování

Pro klinické použití je pzq na trhu dostupný pod značkami různých firem. Nejprve ho začala prodávat firma Bayer pod jménem Biltricid, používaný pro léčbu lidí a Droncit, který se využívá pro veterinární účely. Samozřejmě existuje mnoho dalších značek, které jsou dostupné v různých zemích, např. Bilharzid (Pharco, Egypt), Prazitel (Cosmos, Keňa) aj. (Cioli a Pica-Mattoccia 2003). Pro srovnání bylo shromážděno 34 vzorků od odlišných výrobců z různých zemí a byla na nich provedena kvantitativní analýza, která zjišťovala aktivní složky látky, čistotu a zda se látka rozpouští a rozkládá. Výsledky byly dobré, protože

většina značek splňovala standard. Ale dva vzorky od stejného výrobce neobsahovaly vůbec žádný pzq (Sulaiman a kol. 2001).

Pzq se obvykle dodává v podlouhlých tabletách, každá obsahuje 600 mg aktivní látky. Tablety mívají většinou tři až čtyři drážky, díky kterým se pzq snadno rozdělí na části obsahující 150, respektive 200 mg. V Číně je pzq znám pod značkou Pyquiron a je distribuován v kulatých pilulkách obsahujících 200 mg aktivní látky. Někteří výrobci (např. EIPICO) dodávají pzq jako sirup, který obsahuje 600 mg pzq na 5 ml. Trvanlivost pzq je čtyři roky v mírných podmínkách, tři roky v horkém a vlhkém podnebí (Cioli a Pica-Mattoccia 2003).

Optimální léčebná dávka je 40-60 mg/kg tělesné hmotnosti, menší množství (40 mg/kg) se obecně používá pro *S. mansoni* a *S. haematobium*. Vyšší dávky, které jsou většinou dvě a jsou podané odděleně během několika hodin, jsou doporučeny pro *S. japonicum* a *S. mekongi*. Pzq spolehlivě léčí 60-90 % pacientů. Měsíc po léčbě se doporučuje vyšetřit moč a stolici, kvůli zhodnocení účinnosti léku. Pokud jsou po tomto vyšetření nalezena u pacienta životaschopná vajíčka, doporučuje se přeléčení stejnou léčebnou dávkou. Druhá léčba bývá obvykle úspěšná (Ross a kol. 2002).

### 3.1.8 Hromadná léčba – příklady kontrolních léčebných programů

Hromadná léčba schistosomózy se v současnosti uskutečňuje hlavně pomocí kontrolních léčebných programů. Tyto programy se věnují mnoha aspektům, např. integraci primárního systému zdravotní péče a spolupráci mezi zdravotnickými sektory. Dále se věnují určení závažnosti a dopadu chorob, uskutečnitelnosti terapeutických zásahů, zhodnocení účinnosti léčby atd. (Kumar a Gryseels 1994).

#### *Afrika*

V jižní Africe v provincii KwaZulu-Natal byli léčeni žáci základní školy. Přibližně 68 % zkoumané populace bylo nakaženo *S. haematobium*. V základním průzkumu bylo léčeno 852 dětí jednou dávkou 40 mg pzq na kg tělesné hmotnosti. Tři týdny po léčbě byla vyhodnocena účinnost 57,9 %. 41 týdnů po léčbě se tato hodnota zvýšila na 80,7 %. Reinfekce *S. haematobium* byla 53 týdnů po léčbě nízká (u 16,8 % dětí). Vedlejší účinky byly velmi mírné (Saathoff a kol. 2004).

Další studie byly uskutečněny v několika vesnicích v severním Egyptě v deltě Nilu. Vyšetřeno bylo celkem 1629 lidí. Prevalence infekce způsobené *S. mansoni* se v jednotlivých vesnicích pohybovala mezi 8-13,4 %. 161 pacientů bylo léčeno standardní léčebnou dávkou 40 mg/kg. Po třech týdnech byli pacienti vyšetřeni a druhá léčebná dávka (40 mg/kg) byla

dána 25 pozitivním případům. Po dalších 4-6 týdnech byli tito lidé znovu vyšetřeni a osmi pacientům byla dána ještě třetí dávka (60 mg/kg). Úspěšnost první léčby byla 84,5% (rozpětí se pohybovalo mezi 73,8-92,3 % v jednotlivých vesnicích). Úspěšnost druhé léčby u 25 pacientů byla 68 %. U zbylých 8 pacientů, kteří byli přeléčeni 60 mg/kg, dále nebyla nalezena žádná životaschopná vajíčka (Botros a kol. 2005).

#### *Pobřeží slonoviny*

Studie byla uskutečněna ve vesnici Zouatta II, která se nachází v západní části Pobřeží slonoviny. V této oblasti bylo zaznamenáno ohnisko výskytu *S. mansoni* již v 70. letech (Doumenge a kol. 1987, cit. podle Raso a kol. 2004). Tři po sobě jdoucí vzorky stolice byly získány od dětí i dospělých (celkem 545 vzorků) a následně byly vyšetřeny. Celková prevalence *S. mansoni* byla 40,9 %. Jedincům, kteří byli infikováni (z 223 nakažených bylo léčeno 200 pacientů), byla podána léčebná dávka 40 mg/kg. Šest týdnů po infekci byla zhodnocena účinnost pzq, a to 60,9 %. Tento výsledek je až na spodní hranici obvykle udávané účinnosti léčby (60-90 %; Ross a kol. 2002). Procento pacientů, u kterých se vyskytly vedlejší příznaky, bylo relativně malé (12,5 %). Mezi nejčastější vedlejší příznaky patřila bolest břicha, závrať a průjem (Raso a kol. 2004).

#### *Niger*

Účinek pzq na poškození močových cest, které způsobuje *S. haematobium*, byl zhodnocen pomocí ultrasonografického vyšetření v endemické oblasti v Nigeru. Léčeno bylo 149 pacientů, u kterých bylo po deseti měsících vyhodnoceno, zda léze ustoupily. Účinnost léku byla 87 %. Procento „ústupu“ u poškození močového měchýře bylo 68% a u renálních lézí 73 %. Pokud pacienti měli oba druhy poškození, tak byl ústup renální léze méně patrný (Devidas a kol. 1989).

#### *Filipíny*

Na filipínském ostrově Leyte bylo léčeno 102 lidí infikovaných *S. japonicum*. Třikrát jim byla podána léčebná dávka 20 mg/kg. 52 pacientů bylo vyšetřováno každé tři měsíce ultrasonografií břišní dutiny po celkovou dobu 17 měsíců. Po šesti měsících bylo u pacientů pozorováno ztlustění stěny portální žíly. Dále ve 42 případech došlo ke snížení splenomegalie. Nicméně „ústup“ lézí nenastal u pacientů, kteří byli klasifikováni jako typ 3 s vážnou jaterní fibrózou, způsobenou dlouhotrvající infekcí (Ohmae a kol. 1992).

### 3.1.9 Rezistence

První alarmující hlášení o snížení účinnosti léčby pzq přišlo ze severního Senegalu. Účinnost pzq byla velmi nízká (18 %; Stelma a kol. 1995). Tento fakt byl nejprve přičítán vysoké intenzitě infekce v Senegalu. Pokud by byl lék z 99 % účinný, stejně by přežil dostatečný počet schistosom, který by vysvětlil vylučování vajíček po léčbě. Nicméně toto vysvětlení nesouhlasí s předchozími zkušenostmi z léčby vysoce infikovaných populací. Dalším vysvětlením bylo, že v této oblasti dochází k velkému přenosu parazitů, tudíž pacienti mohou být opakovaně infikováni 4-5 týdnů před léčbou. V době podání léku by v sobě měli nedospělé schistosomy. Toto by mohlo vysvětlovat trvalé vylučování vajíček, nicméně data byla získána od několika skupin pacientů, kteří byli léčeni v různém období. Pzq používaný v Senegalu byl testován na zvířatech a výsledky ukázaly, že jeho aktivita není snížena. U senegalských pacientů nebyly provedeny žádné farmakokinetické studie. Je nepravděpodobné, že by tento specifický problém existoval pouze v lokální populaci, která je etnicky heterogenní (Cioli 1998).

Další podobné případy byly zaznamenány v Egyptě a následně v dalších zemích. Z genetického a biochemického pozadí rezistence na pzq je dostupné jen omezené množství informací.

Ismail a kol. (1999) provedli laboratorní pokus s izoláty *S. mansoni* získanými od egyptských pacientů, u kterých se objevila snížená citlivost. Těmito izoláty byly následně infikovány myši. Přibližně 45 dní po infekci byly některé myši léčeny různými dávkami pzq: 25, 50, 100 a 200 mg/kg denně. Poté byly vyhodnoceny výsledky. Studie ukázala, že 4 izoláty *S. mansoni*, které vyvolaly u myší infekci, normálně odpovídaly na léčbu pzq. Osm izolátů *S. mansoni*, které byly rezistentní k léčbě pzq u lidí, také vyvolaly rezistentní infekci u myší.

### 3.1.10 Účinek pzq na ptačí schistosomy

Vodní ptáci jsou definitivními hostiteli ptačích schistosom, které způsobují u člověka cercáriovou dermatitidu.

V létě 1991 a 1992 byly odchyceny divoké kachny (*Anas platyrhynchos*) v severním a jižním jezeře Leelanau v Michiganu. Všichni ptáci starší čtyř týdnů byli označeni, dále byl zaznamenán jejich věk, pohlaví a přesné místo odchyty. Všem kachnám byl odebrán trus a následně jim byl perorálně podán pzq v dávce 34 mg/kg. Prevalence nákazy byla 16,7 %. V roce 1992 bylo znovu chyceno 14,8 % kachen z roku 1991. Pouze u 1,8 % kachen léčených v roce 1991 byla znovu zjištěna infekce (Reimink a kol. 1995).

Další pokus byl uskutečněn s morčáky velkými (*Mergus merganser*). Celkem bylo odchyceno na jezeře Douglas v Michiganu 51 ptáků (8 samic a jejich mláďata). Od každého jedince byl odebrán vzorek trusu. Během několika hodin po odchycení byl morčákům podán pzq. Ptákům byly náhodně přiřazeny následující léčebné dávky: 40 mg/kg intramuskulárně, 40 mg/kg perorálně, 200 mg/kg intramuskulárně. Čtvrtý, kontrolní vzorek neobsahoval žádné množství léčiva. Po léčbě byli morčáci opět vypuštěni na jezero blízko místa jejich původního odchycení. Deset dní po léčbě byla mláďata znovu odchycena a byly vyhodnoceny výsledky. Pzq podaný v dávce 40 mg/kg, buď intramuskulárně nebo perorálně, měl pouze malý účinek na morčáky. Pouze u nejvyšší dávky (200 mg/kg) došlo k viditelné redukci schistosom. Ukázalo se, že u morčáků se objevuje mnohem vyšší prevalence a intenzita nákazy než u kachen. Kachnám stačí 5x menší dávka, aby došlo k účinnému snížení infekce. Tento rozdíl se vysvětluje anatomickými rozdíly mezi těmito druhy. Kachny mají delší trávicí trakt a jejich strava se skládá především z rostlin a mikroorganismů. Morčáci jsou především karnivoři a jejich trávicí trakt je kratší. Přijatá potrava tedy stráví méně času v zažívací trubici, a tím se sníží doba, po kterou může být pzq vstřebán (Blankespoor a kol. 2001).

## 3.2 Oxamniquine

Oxamniquine (dále jen oxa) je účinný pouze proti *S. mansoni*. Druhy *S. haematobium* a *S. japonicum* jsou vůči této látce poměrně málo vnímavé (Cioli a kol. 1995). V současné době se používá na léčbu schistosomózy hlavně v Brazílii nebo v oblastech, kde léčba pzq selhala.

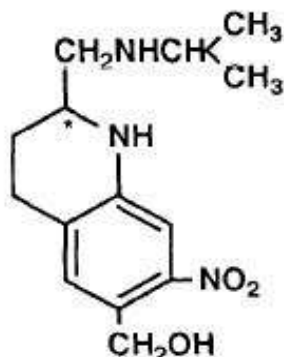
### 3.2.1 Historie

Oxa byl poprvé popsán v roce 1972 jako metabolit látky UK-3883. Tento metabolit byl nalezen v moči léčených zvířat a ukázal se být aktivní proti infekci *S. mansoni* u myší a opic. Zprvu byl připravován mikrobiologickou oxidací UK-3883 pomocí *Aspergillus sclerotiorum*. Původní název byl UK-4271, později byl přejmenován na oxa. Oxa je podobný hykantonu – látce, která se dříve používala na léčbu schistosomózy. Při léčbě hykantonem se vyskytovaly vážné vedlejší příznaky. Látka měla navíc vysoký karcinogenní potenciál a v současné době se tedy již nepoužívá (Cioli a kol. 1995).

### 3.2.2 Chemické složení

Vzorec oxa je 6-hydroxymethyl-2-N-isopropylaminomethyl-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydrochinolin, má asymetrické centrum (viz obrázek 3, centrum asymetrie je označeno

\*) V komerčních přípravcích se dodává jako racemická směs obsahující (+)- a (-)-izomery (Cioli a kol. 1995).



Obrázek 3: Chemická struktura oxamniquinu (podle Cioli a kol. 1995).

### 3.2.3 Farmakokinetika

Oxa je po perorálním podání velmi rychle absorbován, metabolizován a následně vyloučen. Vrchol koncentrace v plazmě je dosažen za jednu až čtyři hodiny po podání. Poločas rozpadu látky v plazmě je 2,2 hodiny (Kokwaro a Taylor 1991). Hlavní metabolit vzniká oxidací 6-hydroxymethyl skupiny na 6-karboxy oxa, který je inaktivní. Vyloučení látky probíhá především močí. Pouze 0,4-1,9 % nezměněného oxa bývá vyloučeno (Kaye a Woolhouse 1976, cit. podle Abdul-Ghani a kol. 2009).

### 3.2.4 Mechanismus účinku

První hypotéza o mechanismu účinku oxa předpokládala anticholinergní efekt léku (Hillman a Senft 1975, cit. podle Cioli a kol. 1995), při němž dochází ke snížení pohybové činnosti parazita. Tento účinek měl přerušit přijímání potravy. Ke smrti parazita nedochází okamžitě po podání léku. Předpokládalo se, že ke smrti parazita dojde až po jeho vyhladovění. Nicméně tato hypotéza byla později vyvrácena (Pica-Mattocchia a Cioli 1986). V současnosti se za mechanismus účinku oxa považuje nevratná inhibice syntézy nukleových kyselin.

Oxa se přeměňuje na reaktivní ester pomocí enzymu schistosom, který chybí u rezistentních druhů. Tento ester spontánně disociuje a elektrofilní složka je schopná alkylace DNA schistosom. Tato reakce je velmi rychlá, ester je pravděpodobně velmi reaktivní a nestabilní. Schistosomy tedy mohou být vystaveny oxa velmi krátce. Alkylace nukleových kyselin vede k postupnému blokování dělení buněk a syntézy proteinů, proto k odumření parazita dojde až

za několik málo dní po podání léku (Cioli a Pica-Mattocchia 2005). V současné době se předpokládá, že aktivní je sulfátový ester a aktivační enzym je sulfotransferáza (Pica-Mattocchia a kol. 2006). Sulfotransferázy jsou enzymy, které přenáší sulfátovou skupinu z molekuly donoru na hydroxylovou skupinu akceptoru. Oxa může sloužit jako akceptor sulfátové skupiny. Aktivační sulfotransferáza není přítomná ve stejné úrovni mezi oběma pohlavími a také mezi různými vývojovými stadii, proto citlivost k léku je u jednotlivých stadií jiná. Fakt, že nedospělé schistosomy mají velmi nízkou hladinu aktivačního enzymu, může být vysvětlen tím, že v tomto stadiu může být zpožděna exprese odpovídajícího genu (Cioli a Pica-Mattocchia 2005).

Senzitivní a rezistentní druhy schistosom byly *in vitro* vystaveny oxa, který byl značený tritiem. Z homogenátu červů byly získány části DNA. U schistosom, které byly citlivé k oxa, došlo k tomu, že lék mohl vytvořit stabilní kovalentní vazby s DNA červa. Toto se nestalo u rezistentních červů a také u schistosom, které neodpovídají na léčbu oxa, jako je *S. haematobium* a *S. japonicum* (Pica-Mattocchia a kol. 1989).

### **3.2.5 Vedlejší příznaky a toxicita**

Vedlejší příznaky jsou obvykle mírné a krátkodobé. Mezi nejčastější obtíže patří závrať, ospalost a bolest hlavy. Dále se objevují bolesti břicha, zvracení a průjem. Tyto příznaky se většinou projevují 1-5 hodin po podání léčebné dávky oxa, ale velmi rychle vymizí. Mezi příznaky spojené se smrtí parazita patří horečka a eosinofilie. Epileptická křeč byla zaznamenaná pouze u pěti případů z celkových 250 000 léčených pacientů, z toho u čtyř pacientů bylo podezření na již existující epilepsii (Cioli a kol. 1995). Oranžové až červené zbarvení moči se může objevit několik dní po léčbě (Olds a Dasarathy 2001).

Akutní toxicita je u myší, křečků a králíků velmi nízká. Nicméně u krys je oxa více toxický, z toho samice jsou 8-10x citlivější než samci. U krys oxa způsobuje hlavně jaterní nekrózu a proliferaci žlučového kanálku. U myší a krys nebyla pozorována žádná mateřská toxicita ani teratogenita (schopnost látky vyvolat vrozenou vývojovou vadu plodu; Chvédoff a kol. 1984).

### **3.2.6 Doporučené dávkování, balení**

Doporučená dávka 15-20 mg/kg se používá v Jižní Americe, západní Africe a v oblasti Karibiku. V těchto oblastech se dosahuje poměrně vysokého procenta účinku (kolem 80-90 %). Vyšší dávka (až 60 mg/kg) podaná během 2-3 dnů se používá v centrální a východní

Africe a na Arabském poloostrově (Utzinger a kol. 2003). Oxa léčí s účinností kolem 70–80% (Olds a Dasarathy 2001).

Oxa prodává například firma Pfizer pod názvy Mansil (Jižní Amerika) nebo Vansil (Afrika), a to ve formě oranžových 250 mg pilulek. Dále je oxa dostupný jako sirup obsahující 250 mg oxa na 5 ml. Trvanlivost pro pilulky je 5 let, pro sirup 3 roky (Cioli a kol. 1995).

### 3.2.7 Hromadná léčba – příklady hromadných kontrolních programů

V současné době se oxa používá na léčbu schistosomózy hlavně v Brazílii, popřípadě tam, kde selhala léčba pzq.

V roce 1975 byl zaveden speciální program pro kontrolu schistosomózy, který objektivně kontroluje nemoc v šesti severovýchodních státech Brazílie. Později byl tento program modifikován a začal kontrolovat výskyt nemoci i v neendemických oblastech. Ve dvou brazilských státech, Bahia a Minas Gerais, byl tento program spuštěn v roce 1979, respektive 1983 (Katz 1998). Navzdory úspěchům je zde snaha, aby byl oxa nahrazen pzq, a to hlavně kvůli nižší ceně pzq (Utzinger a kol. 2003).

#### *Súdán*

Obyvatelé Súdánu byli léčeni proti infekci způsobenou *S. mansoni* buď 30 mg/kg, 40 mg/kg nebo 60 mg/kg oxa. Šest měsíců po léčbě byl pacientům odebrán vzorek stolice. Absence životaschopných vajíček ve stolici byla 68,9 % u pacientů léčených 30 mg/kg, 78,8 % u lidí s léčebnou dávkou 40 mg/kg a 94,9 % u jedinců léčených 60 mg/kg. Léčba byla pacienty velmi dobře tolerována. Nežádoucí účinky byly minimální, mezi nejběžnější obtíže patřila závrať (Omer 1978).

#### *Minas Gerais – stát Brazílie*

V endemické oblasti Peri-Peri bylo vyšetřeno 591 obyvatel na možnou infekci způsobenou *S. mansoni*. Prevalence infekce byla 43,7 %. Po klinických vyšetřeních bylo 220 lidí rozděleno do tří skupin: skupina 1 (19 dětí ve věku 2-15 let, léčeni jednou dávkou 20 mg/kg oxa podanou perorálně), skupina 2 (47 dětí, léčeny perorálně dvěma dávkami 10 mg/kg oxa, interval mezi oběma dávkami byl 6-8 hodin), skupina 3 (154 dospělých, léčeni jednou dávkou 15 mg/kg oxa perorálně). Účinnost léčby byla 73,7 % ve skupině 1, 62,2 % ve skupině 2 a 82,4 % u skupiny 3. Mezi nejčastější vedlejší příznaky patřila závrať, ospalost a bolest hlavy. U skupiny dospělých byly vedlejší příznaky častější (Katz a kol. 1977).



## *Etiopie*

V Etiopii byla udělaná srovnávací studie účinku pzq a oxa. Pacienti byli rozděleni na 4 skupiny. Dvě skupiny byly léčeny 40 mg/kg pzq a další dvě skupiny byly léčeny 15 mg/kg oxa. Po 1, 3 a 6 měsících byla vyhodnocena účinnost léků. Pro pzq byla účinnost 96 %, 95 % a 89 %, zatímco odpovídající účinnost pro oxa byla 98 %, 96 % a 88 % v jednom, ve třech a v šesti měsících. Není žádný statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma druhy léčby. Vedlejší příznaky byly u obou léků poměrně mírné, vyskytovala se např. závrať, bolest břicha a průjem. Pouze u léčby oxa se vyskytl epileptický záchvat. Pzq se obecně více doporučuje k hromadné léčbě, protože je účinný proti dalším formám schistosomózy a jeho vedlejší účinky jsou mírnější (Taddese a Zein 1988).

### **3.2.8 Rezistence**

Rezistence na oxa byla velmi brzy popsána v laboratoři a následně i v terénu. K objasnění rezistence na oxa přispěly nejvíce genetické studie. Provedením genetických křížení mezi senzitivními a rezistentními druhy schistosom mohlo být určeno, že rezistence je recesivního charakteru. Jedna senzitivní samice a jeden rezistentní samec a naopak, byly kanylou zavedeni do mezenterických cév myši. Po zavedení se schistosomy brzy spářily a došlo k následné produkci hybridních vajíček. Dospělci získaní z těchto vajíček byli vystaveni účinku oxa *in vitro*. Všechny hybridní schistosomy první generace (F1) byly citlivé k účinku oxa, bez ohledu na to, zda byl rezistentní rodič samec nebo samice (Cioli a kol. 1992). Autosomálně recesivní dědičnost potvrdila, že v F2 generaci bylo 25 % potomstva rezistentní, při zpětném křížení s rodičovskou generací byl poměr rezistentního potomstva 50 %. Rezistentním schistosomám zřejmě chybí některé faktory, které jsou nezbytné, aby se účinek oxa projevil (Cioli a Pica-Mattoccia 2005).

## **3.3 Další léky používané k léčbě trematodóz**

Mezi další léky, které se používají proti motolicím, patří např. benzimidazoly a deriváty artemisininu.

### **3.3.1 Triclabendazol**

Triclabendazol (dále jen tcbz) patří do skupiny benzimidazolů, kterých je na trhu velké množství (např. albendazol, oxibendazol, mebendazol, fenbendazol aj.). Na léčbu trematodóz se však nejvíce používá tcbz, proto v této práci budu charakterizovat pouze tento lék.

Vzorec tcbz je 5-chloro-6-[2,3,-dichlorofenoxy]-2-methylthio-1H-benzimidazol (viz obrázek 5). Tcbz je účinný proti *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* a *F. magna* (Fairweather a Boray 1999) a ničí jak nedospělé motolice, tak i dospělce. Při podání léčebné dávky 10 mg/kg tcbz ovcím došlo až k 99 % redukci nedospělých i dospělých motolic (Smeal a Hall 1983).

Benzimidazoly se váží na  $\beta$ -tubulin na vazebném místě pro kolchicin a způsobí depolymeraci cytoplazmatických mikrotubulů. Mikrotubuly napomáhají různým životním funkcím organismů, jako je mitóza, transport a pohyb. Hrají rozhodující roli v mnoha buněčných procesech. Pokud dojde k jejich destrukci vlivem aplikace léku, může dojít až k smrti parazita. Princip vysoké selektivní toxicity benzimidazolových léků není zcela objasněn. Zdá se, že je to především díky silnější a nevratné vazebné interakci léku s tubulinem motolic ve srovnání s tubulinem savčím (Lacey 1988, cit. podle Köhler 2001).

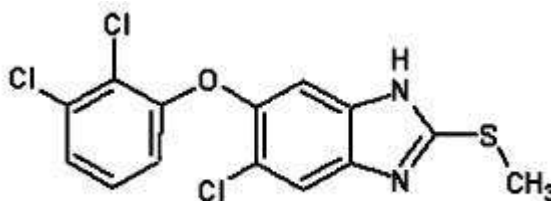
Změny tegumentu juvenilních motolic u ovcí byly viditelné již 42 hodin po zahájení léčby. Léčebná dávka 10 mg tcbz na kg tělesné hmotnosti hostitele způsobila po 42 hodinách tvorbu „puchýřků“ a narušení tegumentu kolem ústní přísavky. Po dvaasedmdesáti hodinách léčby byly všechny motolice zlikvidovány. Morfologické změny tegumentu byly různé, od vážného otékání až po ztrátu tegumentálního syncytia. Na několika izolovaných místech tegumentu (přibližně uprostřed těla) byla morfologie nezměněna. Do čtyř dnů došlo k rozsáhlému narušení tegumentu. Ztráta tegumentu byla patrná u všech motolic, syncytiální vrstva byla odstraněna. Léze se tvořily i na odhalené bazální lamině (Halferty a kol. 2008).

Sulfoxidový metabolit tcbz je aktivní látka. Pokud inkubujeme motolice s 15  $\mu$ g/ml tohoto metabolitu *in vitro*, způsobuje zduření bazální části syncytia a rozsáhlou tvorbu „puchýřků“ v zadní a střední části těla motolice. Dále způsobuje destrukci trnů na povrchu tegumentu, především ve střední části těla (Halferty a kol. 2009).

Účinek tcbz na schistosomy byl již testován u lidí a zvířat. Výsledky studií uskutečněných na zvířatech jsou poněkud rozporuplné. El Sayed a Allam (1997) naznačili, že tcbz má účinek na *S. mansoni*, zatímco Keiser a kol. (2006a) popsali, že tcbz a jeho metabolity nemají dostatečnou aktivitu proti *S. mansoni* u myši.

V deltě Nilu, v endemické oblasti se *S. mansoni* a *Fasciola* spp., bylo léčeno několik lidí. Tito pacienti byli infikováni jak *S. mansoni*, tak *Fasciola* spp. Každému pacientovi byla podaná dávka 10 mg/kg tcbz. Vzorek stolice každého léčeného člověka byl odebírán ve dvoutýdenních intervalech po dobu tří měsíců. Po třetím vyšetření stolice 7 nemocných lidí stále vylučovalo vajíčka *S. mansoni*, ale nenalezla se žádná vajíčka *Fasciola* spp. Tento výsledek představuje 100% léčebnou účinnost proti *Fasciola* spp. Po šestém vyšetření byla u čtyř z pěti léčených lidí nalezena vajíčka *S. mansoni*, ale u žádného z pěti pacientů nebyla

nalezena vajíčka *Fasciola* spp. (Barduagni a kol. 2008). Tyto výsledky vyvrátily hypotézu, že jedna dávka tcbz (10 mg/kg) může být účinná při infekci *S. mansoni*.



Obrázek 4: Chemická struktura triclabendazolu (podle Halferty a kol. 2008).

### 3.3.2 Deriváty artemisininu

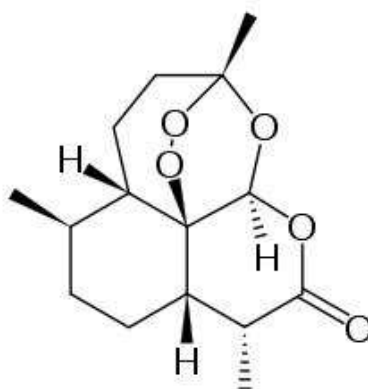
Artemisinin, seskviterpen lakton s endoperoxidovou skupinou, je získáván z listů rostliny *Artemisia annua*. Endoperoxidová skupina je důležitá pro aktivitu léku. Jeho polosyntetické deriváty, artemether a artesunate, jsou používány při kontrole a léčbě malárie (Xiao a Catto 1989). Chemická struktura artemisininu je zobrazena na obrázku 5. Deriváty artemisininu, jsou aktivní proti všem druhům schistosom infikujících člověka (Utzinger a kol. 2003). Narozdíl od pzq a oxa, artemether má vyšší úroveň aktivity proti 1-3 týdny starým stadiím motolic. Cerkárie a dospělci jsou k léku naopak méně citliví (Xiao a kol. 2002). Rozdíl je také ve vnímavosti parazita k léku mezi jednotlivými pohlavími. Samice schistosom jsou k účinku artemetheru citlivější než samci (Lescano a kol. 2004).

Přesný mechanismus účinku artemisininů není doposud znám. Artemether je velmi pomalu aktivován. U schistosomul, které jsou staré 7 až 35 dní, dojde po podání léčebné dávky 300 mg/kg ke snížení obsahu glykogenu a inhibici alkalické fosfatázy (Xiao a kol. 2000). Alkalická fosfatáza je důležitý tegumentální enzym motolic s antigenními vlastnostmi. Snížení obsahu glykogenu je zřejmě spojené s inhibicí glykolýzy. Enzymy fosfofruktokináza, fosfoglycerát kináza a pyruvát kináza jsou patrně důležité cíle léku (Xiao a kol. 1998). Xiao a kol. (1999) zjistili, že lék inhibuje laktát dehydrogenázu a ATPázy schistosom (především  $Mg^{2+}$ -ATPáza a  $Na^+-K^+$ -ATPáza). Artemether zřejmě ovlivňuje i metabolismus nukleových kyselin schistosom. Myši léčené artemetherem měly výrazně nižší podíl RNA než neléčené myši.

Po podání artemetheru dochází u schistosomul k rozsáhlým morfologickým změnám. Tegument je značně ztenčený, dochází ke zduření a lyzi. Senzorické struktury tegumentu jsou zničeny (Xiao a kol. 1996).

Účinek artemetheru na egyptský druh *S. mansoni* zaznamenali Mahmoud a Botros (2005). Jedna dávka 400 mg/kg artemetheru podaná myši 4 a 6 týdnů po infekci účinkovala z 59 %, respektive 55 %. Pokud byl artemether podaný ve dvou dávkách 4 a 5 týdnů po infekci, účinnost léku byla 63 %, respektive 85 %.

De Clercq a kol. (2000) zaznamenali účinek artesunatu v kombinaci s pzq. Tyto léky byly podány pacientům se *S. mansoni*. Celkem bylo léčeno 110 pacientů různého věku (od 1 do 60 let). Tito lidé byli rozděleni do několika skupin. Pacienti ve skupině A byli léčeni artesunatem (celkem 35 lidí; léčebná dávka 12 mg/kg tělesné hmotnosti; dospělí celkově dostali první den 200 mg a po další 4 dny dostávali 100 mg artesunatu). Pacienti ve skupině P (36) byli léčeni 40 mg/kg pzq; pokud byli tito pacienti pozitivní také na malárii (celkem 5 pacientů), byla jim během 3 dnů podána ještě dávka 25 mg/kg chlorochinu. Pacienti ve skupině A + P (39) byli léčeni artesunatem i pzq léčebnými dávkami popsány výše. Vzorky stolice byly odebrány 5, 12 a 24 týdnů po léčbě. U skupiny A byla léčba účinná z 23 %, 19 %, 40 %; u skupiny P byla účinnost léčby 44 %, 49 %, 50 % a u skupiny A + P byla účinnost 69 %, 49 % a 48 % po 5, 12 a 24 týdnech po léčbě. Léčebná kombinace artesunatu a pzq významně zvýšila počet vyléčených jedinců pět týdnů po léčbě. Po 12 týdnech léčby byla kombinace těchto dvou léků výrazně účinnější pouze oproti léčbě samotným artesunatem. Po 24 týdnech již nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl mezi těmito třemi léčenými skupinami.



Obrázek 5: Chemická struktura artemisininu.

### 3.4 Nové léky

V současnosti je testováno poměrně mnoho látek s potenciálním schistosomicidním účinkem (např. meclonazepam, oxadiazoly, K11777 – inhibitor cysteinové proteázy aj.). Pro účely mé práce jsem si vybrala pouze dvě látky a krátce je shrnula.

Mezi nové látky s možným schistosomicidním účinkem patří např. oxadiazol 2-oxid. Ten inhibuje aktivitu thioredoxin-glutathion reductázy. U schistosom je tato reductáza zodpovědná za udržení glutathionu a thioredoxinu v redukovaném stavu, a tím snižuje toxické účinky kyslíkových radikálů (Alger a Williams 2002). Thioredoxin-glutathion reductáza je nezbytná pro přežití schistosom. Dodání oxidu dusnatého je podmínkou aktivity oxadiazolu. Látka je zatím velmi dobře tolerovatelná u myší, její cytotoxicita je velmi nízká (Sayed a kol. 2008).

Sekundární ozonidy jsou zcela syntetické endoperoxidové látky. Keiser a kol. (2006b) popsali účinek této látky (OZ78) proti *Echinostoma caproni* a *F. hepatica*. Účinky této látky byly vysoké. U myši infikované *E. caproni* byla podána jedna dávka 1000 mg/kg OZ78 a účinnost byla 100 %. U infekce s *F. hepatica* byla kryse podána dávka 100 mg/kg tělesné hmotnosti. Účinnost byla u nedospělých i dospělých motolic opět 100 %. Xiao a kol. (2007) popsali účinky těchto látek (OZ78, OZ209 a OZ288) na schistosomy. Látky jsou vysoce účinné jak proti juvenilním, tak proti dospělým jedincům *S. mansoni*. Účinek byl také zaznamenán proti dospělcům *S. japonicum*. Látky mají dobré farmakokinetické vlastnosti, jsou stabilní a jejich cytotoxicita je velmi nízká.

## 4 Závěr

Schistosomóza je závažné onemocnění, které se vyskytuje přibližně u 207 milionů lidí a dalších 779 miliónů lidí je touto nemocí ohroženo (Steinman a kol. 2006 ). Navzdory všem pokrokům v kontrole je tato nemoc stále velmi rozšířená. Současně dostupné léky jako např. praziquantel, se používají k léčbě schistosomózy přes 20 let. V současné době jsou experimentálně testovány nové léky, u nichž se předpokládají schistosomicidní účinky (např. sekundární ozonidy, oxadiazoly). Z hlediska dlouhodobé prevence je nutné vyvinout vakcíny, které zatím nejsou dostupné. Testy s antigeny – potenciálními kandidáty na vakcíny (např. glutathion-S-transferáza, paramyosin, triózafosfát izomeráza) přinesly rozporuplné výsledky. Nicméně proteomické studie by mohly dopomoci objevit nové vakcíny (DeMarco a Verjovski-Almeida 2009). Zatímco schistosomóza je rozšířeným onemocněním spíše u člověka, fasciolóza se vyskytuje převážně u skotu. K léčbě tohoto onemocnění se využívá především tcbz, protože na léčebný účinek pzq fascioly neodpovídají.

Tato práce shrnuje dostupné poznatky o mechanismu účinku vybraných antihelmintik proti motolicím. Do objasnění mechanismu účinku léků bylo vloženo mnoho úsilí, výsledky však nejsou příliš uspokojivé. Mnoho otázek zůstává stále nezodpovězeno, např. charakter a lokalizace molekulárních cílů léků a vznik rezistence.

Podle cílového místa působení léku můžeme mechanismus účinku rozdělit do dvou skupin. První skupina léků působí přes iontové kanály, které se nacházejí v membráně parazita. Jejich účinek je obvykle velmi rychlý. Do této skupiny můžeme například zařadit praziquantel. Druhou skupinou jsou léky, které mají molekulární cíle jiné než iontové kanály. Jejich působení je mnohem pomalejší. Do této skupiny patří např. triclabendazol, jehož cílové místo účinku je  $\beta$ -tubulin nebo oxamniquine, který inaktivuje syntézu nukleových kyselin (Martin a kol. 1997).

Rozvoj rezistence na současně používané léky je velkým problémem, který může mít závažný dopad pro miliony lidí. Proto je zapotřebí intenzivně pracovat na vývoji nových léků, jež tak na trhu nahradí léky dosud používané, u nichž se vlivem narůstající rezistence snižuje léčebný účinek.

## 5 Použitá literatura

### 5.1 Přímé citace

- Abdul-Ghani R., Loutfy N., Sahn A.E., Hassan A. (2009):** Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. *Parasitology Research* 104: 955-965
- Alger H.M., Williams D.L. (2002):** The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Molecular & Biochemical Parasitology* 121: 129-139
- Barduagni P., Hassanein Y., Mohamed M., El Wakeel A., El Sayed M., Hallaj Z., Curtale F. (2008):** Use of triclabendazole for treatment of patients co-infected by *Fasciola* spp. and *S. mansoni* in Behera Governorate, Egypt. *Parasitology Research* 102: 631-633
- Berhe N., Gundersen S.G., Abebe F., Birrie H., Medhin G., Gemetchu T. (1999):** Praziquantel side effects and efficacy related to *Schistosoma mansoni* egg loads and morbidity in primary school children in north-east Ethiopia. *Acta Tropica* 72: 53-63
- Blankespoor C.L., Reimink R.L., Blankespoor H.D. (2001):** Efficacy of praziquantel in treating natural schistosome infection in common mergansers. *Journal of Parasitology* 87: 424-426
- Botros S., Sayed H., Amer N., El-Ghannam M., Bennett J.L., Day T.A. (2005):** Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *International Journal for Parasitology* 35: 787-791
- Brindley P.J., Sher A. (1987):** The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *Journal of Immunology* 139: 215-220
- Caterall W. (2000):** Structure and regulations of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 521-555
- Cioli D. (1998):** Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitology Today* 14: 418-422
- Cioli D., Pica-Mattoccia L. (2003):** Praziquantel. *Parasitology Research* 90: S3-S9
- Cioli D., Pica-Mattoccia L. (2005):** Current and future anti-schistosomal drugs. In: *World Class Parasites: Schistosomiasis*. Springer.
- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Archer S. (1995):** Antischistosomal drugs: past, present ... and future? *Pharmacology & Therapeutics* 68: 35-85
- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Moroni R. (1992):** Hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. *Experimental Parasitology* 75: 425-432
- Cunha V.M.N., Noël F. (1997):** Praziquantel has no direct effect on (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPases and (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPases of *Schistosoma mansoni*. *Life Sciences* 60: PL289-PL294
- Day T.S., Bennett J.L., Pax R.A. (1992):** *Schistosoma mansoni*: patch-clamp study of non-selective cation channel in outer tegumental membrane of females. *Experimental Parasitology* 74: 348-356
- De Clercq D., Vercruyse J., Verlé P., Kongs A., Diop M. (2000):** What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? *Tropical Medicine and International Health* 5: 744-746
- DeMarco R., Verjovski-Almeida S. (2009):** Schistosomes – proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discovery Today* 14: 472-478
- Devidas A., Lamothe F., Develoux M., Mouchet F., Sellin B. (1989):** Ultrasonographic assessment of the regression of bladder and renal lesion due to *Schistosoma*

- haematobium* after treatment with praziquantel. *Annales de la Societe Belge de Medicine Tropicale* 69: 57-65
- De Waard M., Pragnell M., Campbell K.P. (1994):** Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron* 13: 495-503
- Dolphin A.C. (2003):**  $\beta$  subunit of voltage-gated calcium channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 35: 599-620
- El Sayed M.H., Allam A.F. (1997):** Effect of triclabendazole on tegument of *Schistosoma mansoni*: a scanning electron microscopic study. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 27: 143-152
- Espinoza B., Silman I., Arnon R., Tarrab-Hazdai R. (1991):** Phosphatidylinositol-specific phospholipase C biosynthesis of acetylcholinesterase via diacylglycerol in *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Biochemistry* 195: 863-870
- Fairweather I., Boray J.C. (1999):** Fasciolicides: Efficacy, actions, resistance and its management. *Veterinary Journal* 158: 81-112
- Fallon P.G., Smith P., Nicholls T., Modha J., Doenhoff M.J. (1994):** Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. *Parasite Immunology* 16: 529-535
- Fetterer R.H., Pax R.A., Bennett J.L. (1980):** *Schistosoma mansoni*: characterization of the electrical potential from the tegument of adult males. *Experimental Parasitology* 49: 353-365
- Frohberg H. (1984):** Results of toxicological studies on praziquantel. *Arzneimittel-forschung* 31: 555-565
- Gardner D.R., Brezden B.L. (1984):** The sites of action of praziquantel in a smooth muscle of *Lymnaea stagnalis*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 62: 282-287
- Gönnert R., Andrews P. (1977):** Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 52: 129-150
- Greenberg R.M. (2005a):** Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *International Journal for Parasitology* 35: 1-9
- Greenberg R.M. (2005b):** Ca<sup>2+</sup> signalling, voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and praziquantel in flatworm musculature. *Parasitology* 131: S97-S108
- Grégoire G., Loirand G., Pacaud P. (1993):** Ca<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> entry induced Ca<sup>2+</sup> release from the intracellular Ca<sup>2+</sup> store in smooth muscle cells of rat portal vein. *Journal of Physiology* 474: 483-500
- Halferty L., Brennan G.P., Hanna R.E.B., Edgar H.W., Meaney M.M., McConville M., Trudgett A., Hoey L., Fairweather I. (2008):** Tegumental surface changes in juvenile *Fasciola hepatica* in response to treatment *in vivo* with triclabendazole. *Veterinary Parasitology* 155: 49-58
- Halferty L., Brennan G.P., Trudgett A., Hoey L., Fairweather I. (2009):** Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 159: 126-138
- Harnett W., Kusel J.R. (1986):** Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. *Parasitology* 93: 401-405
- Herrmann-Frank A., Darling E., Meissner G. (1991):** Functional characterization of the Ca<sup>2+</sup> gated Ca<sup>2+</sup> release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 418: 353-359
- Chvédoff M., Faccini J.M., Gregory M.H., Hull R.M., Monro A.M., Perraud J., Quinton R.M., Reinert H.H. (1984):** The toxicology of the schistosomicidal agent oxamniquine. *Drug Development Research* 4: 229-235



- Ismail M., Botros S., Metwally A., William S., Farghally A., Tao L.F., Day T.A., Bennett J.L. (1999):** Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 932-935
- Jeziorski M.C., Greenberg R.M., Anderson P.A.V. (2000):** The molecular biology of invertebrate voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of Experimental Biology* 203: 841-856
- Katz N. (1998):** Schistosomiasis control in Brazil. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 33-35
- Katz N., Zicker F., Pereira J.P. (1977):** Field trials with oxamniquine in a schistosomiasis mansoni-endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26: 234-237
- Keiser J., El Ela N.A., El Komy E., El Lakkany N., Diab T., Chollet J., Utzinger J., Barakat R. (2006a):** Triclabendazole and its two main metabolites lack activity against *Schistosoma mansoni* in the mouse model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 287-291
- Keiser J., Utzinger J., Tanner M., Dong Y., Vennerstrom J.L. (2006b):** The synthetic peroxide OZ78 is effective against *Echinostoma caproni* and *Fasciola hepatica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 1193-1197
- King C.H., Mahmoud A.A. (1989):** Drugs five years later: praziquantel. *Annals of Internal Medicine* 110: 290-296
- Köhler P. (2001):** The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology* 155: 49-58
- Kohn A.B., Anderson P.A.V., Roberts-Misterly J.M., Greenberg R.M. (2001b):** Schistosome calcium channel  $\beta$  subunits: unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. *Journal of Biological Chemistry* 276: 36873-36876
- Kohn A.B., Lea J.M., Roberts-Misterly J.M., Anderson P.A.V., Greenberg R.M. (2001a):** Structure of three high voltage activated calcium channel  $\alpha_1$  subunits from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 123: 489-497
- Kohn A.B., Roberts-Misterly J.M., Anderson P.A.V., Khan N, Greenberg R.M. (2003):** Specific sites in the beta interaction domain of a schistosome Ca<sup>2+</sup> channel  $\beta$  subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel. *Parasitology* 127: 349-356
- Kokwaro G.O., Taylor G. (1991):** Oxamniquine pharmacokinetics in healthy African volunteers. *East African Medical Journal* 68: 359-364
- Kumar V, Gryseels B. (1994):** Use of praziquantel against schistosomiasis: a review of current status. *International Journal of Antimicrobial Agents* 4: 313-320
- Leopold G., Ungethum W., Groll E., Diekmann H.W., Nowak H., Wegner D.H.G. (1978):** Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. *European Journal of Clinical Pharmacology* 14: 281-291
- Lescano S.Z., Chieffi P.P., Canhassi R.R., Boulos M., Amato Neto V. (2004):** Antischistosomal activity of artemether in experimental schistosomiasis mansoni. *Revista de Saúde Pública* 38: 71-75
- Mahmoud M.R., Botros S.S. (2005):** Artemether as adjuvant therapy to praziquantel in murine Egyptian schistosomiasis mansoni. *Journal of Parasitology* 91: 175-178
- Martin R.J. (1997):** Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary Journal* 154: 11-34

- Martin R.J., Robertson A.P., Bjorn H. (1997):** Target sites of anthelmintics. *Parasitology* 114: S111-S124
- Mehlhorn H., Becker B., Andrews P., Thomas H., Frenkel J.K. (1981):** *In vivo* and *in vitro* experiments on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. *Arzneimittel-forschung* 31: 544-554
- Ohmae H., Tanaka M., Hayashi M., Matsuzaki Y., Kurosaki Y., Blas B.L., Portillo G.G., Sy O.S., Irie Y., Yasuraoka K. (1992):** Improvement of ultrasonographic and serologic changes in *Schistosoma japonicum*-infected patients after treatment with praziquantel. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46: 99-104
- Olds R.G., Dasarathy S. (2001):** Recent advances in schistosomiasis. *Current Infectious Disease Report* 3: 59-67
- Omer A.H. (1978):** Oxamniquine for treating *Schistosoma mansoni* infection in Sudan. *British Medical Journal* 2: 163-165
- Pax R., Bennett J.L., Fetterer R. (1978):** A benzodiazepine derivate and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 304: 309-315
- Pearson R.D., Guerrant R.L. (1983):** Praziquantel: a major advance in anhelminthic therapy. *Annals of Internal Medicine* 99: 195-198
- Perez-Reyez E. (2003):** Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiological Reviews* 83: 117-161
- Pica-Mattoccia L., Carlini D., Guidi A., Cimica V., Vigorosi F., Cioli D. (2006):** The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristic of a sulfotransferase. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 307-312
- Pica-Mattoccia L., Cioli D. (1986):** Lack of correlation schistosomicidal and anticholinergic of hycanthone and related drugs. *Journal of Parasitology* 72: 531-539
- Pica-Mattoccia L., Cioli D. (2004):** Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *International Journal of Parasitology* 34: 527-533
- Pica-Mattoccia L., Cioli D., Archer S. (1989):** Binding of oxamniquine to the DNA of schistosomes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 373-376
- Pica-Mattoccia L., Orsini T., Basso A., Festucci A., Liberti P., Guidi A., Marcatto-Maggi A.L., Nobre-Santana S., Troiani A.R., Cioli D., Valle C. (2008):** *Schistosoma mansoni*: lack of correlation between praziquantel-induced intra-worm calcium influx and parasite death. *Experimental parasitology* 119: 332-335
- Pica-Mattoccia L., Valle C., Basso A., Troiani A.R., Vigorosi F., Liberti P., Festucci A., Cioli D. (2007):** Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. *Experimental Parasitology* 115: 344-351
- Polderman A.M., Gryseels B., Gerold J.L., Mpamila K., Manshande J.P. (1984):** Side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in Maniema, Zaire. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 752-754
- Pragnell M., De Waard M., Mori Y., Tanabe T., Snutch T.P., Campbell K.P. (1994):** Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha_1$ -subunit. *Nature* 368: 67-70
- Randall A., Benham C.D. (1999):** Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Molecular and Cellular Neurosciences* 14: 255-272
- Raso G., N'Goran E.K., Toty A., Luginbühl A., Adjoua C.A., Tian-Bi N.T., Bogoch I.I., Vounatsou P., Tanner M., Utzinger J. (2004):** Efficacy and side effects of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in community of western Côte d'Ivoire. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 18-27

- Redman C.A., Robertson A., Fallon P.G., Modha J., Kusel J.R., Doenhoff M.J., Martin R.J. (1996):** Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitology Today* 12: 14-20
- Reimink R.L., DeGoede J.A., Blankespoor H.D. (1995):** Efficacy of praziquantel in natural populations of mallards infected with avian schistosomes. *Journal of Parasitology* 81: 1027-1029
- Ross A.G.P., Bartley P.B., Sleight A.C., Olds G.R., Yuesheng L., Williams G.M., McManus D.P. (2002):** Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine* 346: 1212-1220
- Saathoff E., Olsen A., Magnussen P., Kvalsvig J.D., Becker W., Appleton C.C. (2004):** Patterns of *Schistosoma haematobium* infection, impact of praziquantel treatment and re-infection after treatment in a cohort of schoolchildren from rural KwaZulu-Natal/South Africa. *BMC Infectious Diseases* 4: 40
- Sayed A.A., Simeonov A., Thomas C.J., Inglese J., Austin C.P., Williams D.L. (2008):** Identification of oxadiazoles as new drug leads for control of schistosomiasis. *Nature Medicine* 14: 407-412
- Seubert J., Pohlke R., Loebich F. (1977):** Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes. *Experientia* 33: 1036-1037
- Shaw M.K., Erasmus D.A. (1987):** *Schistosoma mansoni*: structural damage and tegumental repair after *in vivo* treatment with praziquantel. *Parasitology* 94: 243-254
- Shaw M.K., Erasmus D.A. (1988):** *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. *Experimental Parasitology* 65: 31-42
- Smeal M.G., Hall C.A. (1983):** The activity of triclabendazole against immature and adult *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Australian Veterinary Journal* 60: 329-331
- Staud U., Schmahl G., Blaschke G., Mehlhorn H. (1992):** Light and scanning electron microscopy studies on the effects of the enantiomers of praziquantel and its main metabolite on *Schistosoma mansoni in vitro*. *Parasitology Research* 78: 392-397
- Steinmann P., Keiser J., Bos R., Tanner M., Utzinger J. (2006):** Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases* 6: 411-425
- Stelma F.F., Talla I., Sow S., Kongs A., Niang M., Polman K., Deelder A.M., Gryseels B. (1995):** Efficacy and side effects of praziquantel in an endemic focus of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 167-170
- Sulaiman S.M., Traoré M., Engels D., Hagan P., Cioli D. (2001):** Counterfeit praziquantel. *Lancet* 358: 666-667
- Taddese K., Zein Z.A. (1988):** Comparison between the efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections on a sugar estate in Ethiopia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 82: 175-180
- Utzinger J., Keiser J., Xiao S.H., Tanner M., Singer B.H. (2003):** Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 1487-1495
- Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J. (2007):** Paraziti a jejich biologie. Triton.
- Wu M.H., Wei C.C., Xu Z.Y., Yuan H.C., Lian W.N., Yang Q.J., Chen M., Jiang Q.W., Wang C.Z., Zhang S.J. (1991):** Comparison of therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 345-349

- Xiao S.H., Booth M., Tanner M. (2000):** The prophylactic effects of artemether against *Schistosoma japonicum* infections. *Parasitology Today* 16: 122-126
- Xiao S.H., Catto B.A. (1989):** *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33: 1557-1562
- Xiao S.H., Keiser J., Chollet J., Utzinger J., Dong Y., Endriss Y., Vennerstrom J.L., Tanner M. (2007):** *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosomes species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 1440-1445
- Xiao S.H., Shen B.G., Horner J., Catto B.A. (1996):** Tegument changes of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in mice treated with artemether. *Acta Pharmacologica Sinica* 17: 535-537
- Xiao S.H., Tanner M., N'Goran E.K., Utzinger J., Chollet J., Berquist R., Minggang C., Jiang Z. (2002):** Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Tropica* 82: 175-181
- Xiao S.H., You J.Q., Guo H.F., Jiao P.Y., Mei J.Y., Yao M.Y., Feng Z. (1998):** Effect of artemether on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, and pyruvate kinase of *Schistosoma japonicum* harbored in mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 19: 279-281
- Xiao S.H., You J.Q., Guo H.F., Mei J.Y., Jiao P.Y., Yao M.Y., Zhuang Z.N., Feng Z. (1999):** Effect of artemether on phosphorylase, lactate dehydrogenase, adenosine triphosphatase, and glucosephosphate dehydrogenase of *Schistosoma japonicum* harbored in mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 20: 750-754

## 5.2 Nepřímé citace

- Doumenge J.P., Mott K.E., Cheung C., Villenave D., Chapuis O., Perrin M.F., Reaud-Thomas G. (1987):** Atlas of the global distribution of schistosomiasis. World Health Organization. Presses Universitaires de Bordeaux, Geneva.
- Groll E. (1984):** Praziquantel. *Advances in Pharmacology & Chemotherapy* 20: 219-238
- Hillman G.R., Senft A.W. (1975):** Anticholinergic properties of the antischistosomal drug hycanthone. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24: 827-834
- Kaye B., Woolhouse N.M. (1976):** The metabolism of oxamniquine – a new schistosomicide. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 70: 323-328
- Kramers P.G.N., Gentile J.M., Gryseels B.J.M., Jordan P., Katz N., Mott K.E., Mulvihill J.J., Seed J.L., Frohberg H. (1991):** Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology? Report of a task group on mutagenic antischistosomals. *Mutation Research* 257: 49-89
- Lacey E. (1988):** The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* 18: 885-936