

DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MODELS OF REACTIVATED
TOXOPLASMOSISRAZVOJ EKSPERIMENTALNIH MODELA REAKTIVIRANE
TOKSOPLAZMOZENeda Bauman^{1,2}, Jelena Srbljanović², Ivana Čolović Čalovski³¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija² Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Beograd, Srbija³ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju, Beograd, Srbija**Correspondence:** neda.bauman@imi.bg.ac.rs

Abstract

Toxoplasmosis is one of the most widespread zoonosis worldwide, since *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is a ubiquitous obligate intracellular protozoan parasite that infects up to one third of the human population. Although infection is usually asymptomatic in immunocompetent individuals, in vulnerable categories such as the fetus and immunocompromised patients, toxoplasmosis can lead to severe consequences, in particular congenital and reactivated toxoplasmosis (RT). Highly active antiretroviral therapy (HAART) and global increase in the number of immunocompromised patients undergoing organ and tissue transplantations, in which toxoplasmosis represents important opportunistic infection, shifted the focus of interest from HIV+ patients to transplant recipients. There is an urgent need for identifying novel potent and well-tolerated drugs, since available options for toxoplasmosis chemotherapy are limited, and associated with numerous side effects. Although potential chemotherapeutics are also investigated *in vitro*, results obtained in *in vivo* experimental models provide more valuable data. Iatrogenic immunosuppression in mice chronically infected with *T. gondii* is mostly based on administration of corticosteroids, such as dexamethasone in drinking water and hydrocortisone via subcutaneous injections. In addition, some models involve the use of cytostatics, mainly cyclophosphamide, which is among the most commonly used immunosuppressants in transplantation protocols. Large variations in dosing of immunosuppressants in models of RT call for their optimization. Cytostatics and corticosteroids, applied simultaneously in adequate doses and intervals would allow for simulation of the most frequently applied immunosuppressive regimens in human transplantation medicine. Although there is a variety of *in vivo* models of toxoplasmosis, a current trend of exponential increase in population of transplant recipients requires a better insight into possible ways of establishing a model of RT. Establishment of a sustainable model of RT would be of great importance in future studies focused on *T. gondii* infection, and above all, for conducting chemotherapy experiments oriented towards discovery of potential new candidates for the treatment of toxoplasmosis.

Keywords:reactivated toxoplasmosis,
in vivo model,
corticosteroids,
cyclophosphamide

Sažetak

Toksoplazmoza je jedna od globalno najrasprostranjenijih zoonoza, s obzirom na to da je *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ubikvitarna, striktno intracelularna protozoa koja inficira trećinu svetske populacije. Iako je kod imunokompetentnih osoba infekcija najčešće asimptomatska, kod osetljivih kategorija, kao što su fetus i imunokompromitovani pacijenti, toksoplazmoza može dovesti do klinički veoma teških posledica, pre svega kongenitalne i reaktivirane toksoplazmoze (RT). Visokoaktivna antiretrovirusna terapija (HAART) i globalno rastući broj imunosuprimiranih pacijenata koji se leče transplantacijom organa i tkiva, a kod kojih toksoplazmoza predstavlja važnu oportunističku infekciju, rezultirali su usmeravanjem istraživačkog fokusa sa pacijenata pozitivnih na virus humane imunodeficijencije (HIV) na primaoce transplantata. Postoji hitna potreba za novim, efikasnim i bezbednim antitoksoplazmatskim lekovima jer su aktuelne terapijske opcije u lečenju toksoplazmoze malobrojne i dovode se u vezu sa brojnim neželjenim efektima. Potencijalni hemioterapeutici ispituju se i u *in vitro*, ali su od većeg značaja rezultati dobijeni u *in vivo* eksperimentalnim modelima. Jatrogena imunosupresija kod miševa hronično inficiranih *T. gondii* najčešće se postiže primenom kortikosteroida, kao što su deksametazon u vodi za piće i hidrokortizon putem supkutanih injekcija. Pored kortikosteroida, u upotrebi su i citostatici, pre svega ciklofosamid, koji je ujedno i među najšire primenjivanim imunosupresivima u transplantacionim protokolima. Velike varijacije u režimu doziranja imunosupresiva u modelima RT ukazuju na potrebu za njihovom optimizacijom. Citostatici i kortikosteroidi, kombinovano primenjeni u odgovarajućim dozama i vremenskim intervalima, simulirali bi najaktuelnije imunosupresivne režime u humanoj transplantacionoj medicini. Naime, i pored raznovrsnosti *in vivo* eksperimentalnih modela toksoplazmoze, aktuelni trend eksponencijalnog porasta broja transplantiranih pacijenata zahteva bolji uvid u moguće načine za uspostavljanje modela RT. Uspostavljanje održivog modela RT bilo bi značajno za buduća ispitivanja infekcije izazvane *T. gondii*, pre svega za sprovođenje hemioterapijskih eksperimenata u cilju otkrivanja potencijalnih novih kandidata za lečenje toksoplazmoze.

Ključne reči:

reaktivirana toksoplazmoza, *in vivo* model, kortikosteroidi, ciklofosamid

Uvod

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) je ubikvitarna, striktno intracelularna protozoa sa širokim spektrom potencijalnih domaćina, uključujući sve sisare i ptice (1). Procenjuje se da je trećina čovečanstva inficirana ovom protozom, što toksoplazmozom čini jednom od globalno najrasprostranjenijih zoonoza. Rod obuhvata jednu vrstu infektivnu za sve domaćine, sa ograničenom genetskom raznolikošću na području Evrope i Severne Amerike, gde većina izolata pripada jednoj od tri klonske linije (tip I, II, III). Tip II, koji se najčešće povezuje sa humanim infekcijama u Evropi, dominantan je genotip i u našoj zemlji (2, 3).

Životni oblici *T. gondii* su brzodeleći tahizoiti, odgovorni za akutnu fazu infekcije, sporodeleći bradizoiti (unutar tkivnih cista), prisutni tokom hronične faze infekcije i sporozoiti (unutar zrelih oocista). Oocista nastaje kao produkt seksualnog razmnožavanja koje se odvija isključivo u epitelu tankog creva stalnog domaćina (životinje iz porodice *Felida*). U nukleisanim ćelijama prelaznih domaćina, među kojima je i čovek, odvija se aseksualna faza razmnožavanja, tokom koje se tahizoiti konvertuju u bradizoite. U imunokompetentnom domaćinu bradizoiti dugoročno opstaju u formi tkivnih cista, predominantno u centralnom nervnom sistemu i mišićima. Svi životni oblici su infektivni za čoveka, a najčešći put infekcije je konzumiranje nedovoljno termički obrađenog mesa inficiranih životinja koje sadrži tkivne ciste ili vode, povrća i

voća kontaminiranih oocistama (4).

Toksoplazmoza imunokompetentne osobe je najčešće asimptomatska, a kada se simptomi jave, blagi su i bez većeg kliničkog značaja. Međutim, manifestacije infekcije mogu da budu ozbiljne, a posledice veoma teške, neretko i fatalne, u osetljivim kategorijama kao što su fetus i imunokompromitovani pacijenti, usled nerazvijenog, tj. neadekvatnog imunskog odgovora (5). Kongenitalna toksoplazmoza (KT) nastaje usled transplacentalne transmisije parazita tokom akutne infekcije trudnice i može da ima širok spektar ishoda, od supkliničke toksoplazmoze, preko teških neurooftalmoloških komplikacija, do smrtnog ishoda (6,7). Tokom poslednje dve decenije XX veka, a sa početkom pandemije virusa humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus* - HIV), parazit *T. gondii* je prepoznat kao važan oportunistički infektivni agens kod imunokompromitovanih pacijenata. Usled neadekvatnog imunskog odgovora, kod ovih pacijenata može doći do oslobađanja bradizoita iz ruptuiranih cista i njihove rekonverzije u tahizoite koji su odgovorni za nastanak reaktivirane toksoplazmoze (RT). Ovi brzodeleći životni oblici *T. gondii* se oslobađanjem u krvotok dalje diseminuju, izazivajući niz kliničkih simptoma (5). Reaktivacija toksoplazmoze kod HIV+ pacijenata je primenom visokoaktivne antiretrovirusne terapije (engl. *Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) stavljena pod kontrolu u razvijenijim zemljama sveta. Usled procvata modernih dijagnostičkih i terapijskih procedura fokus je, međutim,

poslednjih godina usmeren na druge kategorije imunokompromitovanih pacijenata, pre svega na primaocce transplantata organa i tkiva.

Toksoplazmoza - aktuelni problemi

Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (engl. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation* - HSCT) i transplantacija solidnih organa danas su sve češće neizbežne procedure pri lečenju sve većeg broja oboljenja. Naime, lista indikacija za transplantaciju se konstantno proširuje, a samim tim se uvećava i broj procedura. Zapažen je eksponencijalni porast broja izvedenih transplantacija, pre svega HSCT, kako u svetu, tako i u našoj zemlji (8). Takođe, proširenjem indikacija za primenu immunosupresivne terapije značajno je povećan broj pacijenata koji su pod rizikom od oportunističkih infekcija (9). Poražavajuća je činjenica da je kod ove „*non-HIV*” kategorije imunokompromitovanih pacijenata toksoplazmoza češće diseminovana sa težim kliničkim ishodom u poređenju sa HIV+ pacijentima. Osim kao posledica reaktivacije latentne infekcije, kod recipijenta se težak oblik infekcije može razviti i kao rezultat primoinfekcije direktnim prenošenjem *T. gondii* putem transplantata inficiranog donora. Ipak, za razliku od primalaca solidnih organa, kod kojih je ovaj način nastanka infekcije čak i češći, primaoci matičnih ćelija hematopoeze u većem su riziku od reaktivacije latentne infekcije. Uprkos primenjenoj terapiji, kod pacijenata lečenih HSCT mortalitet se kreće u rasponu 38-67%. Rizik za reaktivaciju zavisi od tipa transplantata i njime uslovljenim intenzitetom i dužinom trajanja jatrogene immunosupresije. Posebno osetljiva kategorija su pacijenti koji primaju matične ćelije druge osobe, tj. davaoca (alogeni HSCT) zbog prateće intenzivne i produžene terapijske immunosupresije (10).

Značaj toksoplazmoze kao potencijalno fatalne u ovoj kategoriji pacijenata dugo je bio zanemaran. Međutim, u nekim zemljama, pa i u našoj, ovaj problem je prepoznat, te su dijagnostika i praćenje RT kod primalaca matičnih ćelija hematopoeze, zasnovani na molekularnoj detekciji *T. gondii* u perifernoj krvi, uvršćeni u transplantacione protokole (11). Organizovanim praćenjem pedijatrijskih pacijenata koji se u našoj zemlji leče HSCT zabeležen je procenat reaktivacije od čak 20%, dok je kod odraslih pacijenata kojima je transplantirano srce toksoplazmoza prenesena transplantatom ili RT detektovana u 8,1% slučajeva (12, 13).

Terapija toksoplazmoze

Pravovremeno uključivanje odgovarajuće terapije, kako kod trudnica i kongenitalno inficirane novorođenčadi, tako i kod pacijenata sa dokazanom reaktivacijom od ključnog je značaja u kontroli dva ozbiljna klinička entiteta izazvana *T. gondii* - KT i RT. Međutim, iako su prva ispitivanja potencijalnih antitoksoplazmatskih lekova počela još 1940. godine, za sada je za upotrebu u lečenju toksoplazmoze odobreno samo nekoliko lekova (14). Dostupne terapijske opcije - pirimetamin u kombinaciji sa

sulfadiazinom ili klindamicinom i monoterapija kotrimoksazolom - povezane su sa brojnim neželjenim efektima koji neretko zahtevaju i obustavu primene leka (15). Imajući u vidu da se terapija u određenim indikacijama mora primenjivati tokom dužeg vremenskog perioda, pa čak i duže od godinu dana, kao što je slučaj kod KT, obustava terapije zbog ozbiljnih neželjenih efekata može da predstavlja veliki problem. Mijelotoksičnost se ističe kao jedan od neželjenih efekata koji predstavlja životno ugrožavajuću komplikaciju za pacijente sa hematološkim malignitetima, tj. za primaocce HSCT. Odluku o započinjanju profilakse ili terapije RT donosi klinički lekar nakon pažljive procene potencijalnog rizika od reaktivacije (na osnovu nalaza laboratorijskog ispitivanja) u odnosu na poznatu opasnost od toksičnih efekata leka. Osim toga, iako se rezistencija *T. gondii* na postojeće lekove ne smatra gorućim problemom, pojedinačni prijavljeni slučajevi rezistencije na sulfadiazin i pirimetamin, kao najčešće korišćene u terapiji KT i RT, nalažu oprez (16, 17). Kako nijedan od postojećih lekova ne deluje efikasno na ciste *T. gondii*, za sada nije moguća eradikacija ovog parazita iz organizma domaćina (18). Stoga je jasna potreba za novim lekovima koji će, pre svega, biti dobro tolerisani od strane vulnerabilnih kategorija populacije kao što su trudnice, novorođenčad i imunokompromitovani pacijenti.

Brojne pretkliničke studije (*in vitro* i *in vivo*) usmerene na eksperimentalnu hemioterapiju toksoplazmoze omogućile su izdvajanje jedinjenja, potencijalnih hemioterapeutika sa obećavajućim efektom na *T. gondii*. Iako je *in vitro* faza ispitivanja korisna za proveru (engl. *screening*) velikog broja kandidata kao potencijalnih antitoksoplazmatskih lekova, hemioterapijski *in vivo* eksperimenti su neophodna spona *in vitro* i kliničkih studija, te je njihova standardizacija od esencijalnog značaja (18). Imajući u vidu porast broja immunosuprimiranih pacijenata na globalnom nivou, istraživanja su danas usmerena na otkrivanje novih kandidata za lečenje RT. Za ispitivanje potencijalnih lekova od ključnog značaja bi bilo usavršavanje modela RT koji bi simulirali klinički tok infekcije kod pomenute visokorizične populacije.

Eksperimentalni modeli toksoplazmoze

U zavisnosti od prirode istraživanja, za izučavanje toksoplazmoze su na raspolaganju različiti životinjski modeli, a najisplativiji i najpogodniji model je laboratorijski miš (19). Imajući u vidu uticaj različitih eksperimentalnih parametara, kao što su vrsta miša, soj i životni oblik *T. gondii*, veličina i način davanja infektivnog inokuluma na klinički tok infekcije, optimizacija eksperimentalnih modela toksoplazmoze je veoma zahtevna (14, 20). Sve navedeno govori o izuzetnoj kompleksnosti *in vivo* modela, a uspostavljanje standardizovane metodologije olakšalo bi statističku obradu rezultata i omogućilo njihovo preciznije poređenje između istraživačkih laboratorija (21).

Prednost životinjskih modela toksoplazmoze je u omogućavanju evaluacije efikasnosti lekova praćenjem

različitih parametara kao što su dužina preživljavanja miševa, histopatološke promene i broj cista u predilekcionim organima, kao i distribucija DNK *T. gondii* u krvi i organima. Na raspolaganju je širok dijapazon eksperimentalnih modela, od bazičnih - akutne i hronične toksoplazmoze, do kompleksnijih - očna, KT i RT, kao i koinfekcija *T. gondii* sa drugim oportunističkim patogenima (*Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium avium* kompleks) (14). Standardizacija navedenih modela je veoma važna za izvođenje sve potrebnijih hemioterapijskih *in vivo* eksperimenata. Većina istraživača se i dalje opredeljuje za ispitivanje lekova na modelima akutne i hronične toksoplazmoze (22-29). Ipak, aktuelni trend ekspanzionizacije porasta broja pacijenata koji se leče transplantacijom organa, odnosno matičnih ćelija hematopoeze, iziskuje bolji uvid u moguće načine za uspostavljanje održivih modela RT u cilju efikasnije evaluacije efekata potencijalnih hemioterapeutika usmerenih na *T. gondii*, kao i za ispitivanje kliničkog toka infekcije kod imunokompromitovanih pacijenata.

Optimizacija eksperimentalnih modela reaktivirane toksoplazmoze

Ideja u osnovi eksperimentalnih modela RT je izazivanje jatrogene imunosupresije kod miševa hronično inficiranih *T. gondii*. Očekuje se da nakon primene imunosupresivne terapije i posledično narušenog imunskog nadzora nad infekcijom kod navedenih životinja dođe do rupture cista i konverzije bradizoita u tahizoite, tj. do reaktivacije infekcije. Pored uobičajenog eksperimentalnog pristupa indukciji reaktivacije, baziranog na upotrebi imunosupresivnih lekova, neki istraživači se opredeljuju za korišćenje genetski modifikovanih miševa, kao što su miševi sa teškom kombinovanom imunodeficijencijom (engl. *Severe Combined Immunodeficiency* - SCID) ili oni kojima nedostaje neki od važnih faktora za kontrolu infekcije (30). Kako je interferon gama (IFN- γ) jedan od ključnih citokina u kontroli infekcije *T. gondii*, u nekoliko istraživanja su korišćeni miševi kojima nedostaje receptor za IFN- γ ili IFN- γ deficijenti miševi, tj. miševi koji ne poseduju neki od faktora neophodnih za stimulisanje proizvodnje IFN- γ (31-35). Nedostaci upotrebe specifične vrste miševa u modelima RT su visoka cena i ograničena dostupnost ovakve vrste laboratorijskih životinja, kao i potreba za posebnim uslovima oslobođenih patogena (engl. *pathogen free*), kako bi se sprečila infekcija drugim oportunističkim patogenima. Navedene vrste modela takođe ne simuliraju realne uslove koji postoje kod imunokompromitovanih pacijenata, što je od velikog značaja kako u interpretaciji rezultata izvedenih iz životinjskih modela, tako i u njihovoj ekstrapolaciji na humanu populaciju.

Imunosupresivni lekovi se i dalje koriste kao isplativija alternativa za uspostavljanje modela RT u različitim laboratorijama koje se bave proučavanjem toksoplazmoze (36-40). Primenom odgovarajuće kombinacije imunosupresiva, uz kontrolisano doziranje, teži se uspostavljanju održivih modela koji će rezultirati reaktivacijom uz

omogućeno preživljavanje miševa tokom trajanja eksperimenta. S obzirom na proširenje indikacija za primenu imunosupresivne terapije, dodatna prednost ovakvog pristupa je mogućnost simulacije imunosupresivnih režima u humanoj medicini. Optimizacijom pomenutih modela, tj. finim doziranjem lekova, istraživač može da kontroliše dubinu imunosupresije, što je veliki izazov u modelima zasnovanim na korišćenju imunodeficientnih miševa.

Kako je osamdesetih godina XX veka pažnja stručne javnosti bila usmerena na reaktivaciju infekcije kod rastuće populacije HIV+ pacijenata, eksperimentalni modeli su pretežno podrazumevali primenu kortikosteroida kao lekova sa imunosupresivnim efektom. Osim toga, reč je o lekovima koji imaju širok dijapazon indikacija za primenu u humanoj medicini. Kako se u kategoriji HIV+ pacijenata reaktivacija najčešće klinički ispoljava kao toksoplazmatski encefalitis (TE) (1), Hoflin (*Hofflin*) i saradnici su razvili model TE direktnom intracerebralnom inokulacijom *T. gondii* miševima koji su već bili imunosu-primirani kortizon acetatom (41). Nasuprot tome, jedan od prvih modela imunosupresije indukovane lekovima, koji je podrazumevao postizanje hronične infekcije *T. gondii* pre primene imunosupresiva, uspostavili su Nikol (*Nicolle*) i saradnici, koristeći deksametazon u vodi za piće (42). Nedugo zatim, na osnovu ovog istraživanja, u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu u našoj zemlji uspostavljen je model RT primenom dvojne kortikosteroidne terapije – deksametazona u vodi za piće i hidrokortizon acetata putem potkožnih injekcija (43). Imitacija prirodnog toka infekcije *T. gondii* postignuta je *per os* davanjem homogenata mozga miša koji sadrži ciste *T. gondii*. Prednost supkutane primene hidrokortizona ogledala se u mogućnosti preciznog doziranja leka kod svake životinje, za razliku od primene lekova u vodi za piće. Međutim, ispitivanjem efekta pojedinačnih lekova i njihove kombinacije u ovom istraživanju utvrđeno je da sam hidrokortizon nije dovoljan za izazivanje dovoljno duboke imunosupresije, te da se svakako mora koristiti u kombinaciji sa drugim lekovima. Imunosupresivni efekat primenjenih kortikosteroida je potvrđen određivanjem ukupnog broja splenocita, čije su vrednosti bile statistički značajno niže u grupi miševa koji su primali terapiju. Veliki broj cista u mozgu miševa na terapiji, koji je statistički značajno premašio broj kod kontrolnih miševa, ukazivao je na to da su primenjeni kortikosteroidi indukovali reaktivaciju hronične infekcije. Međutim, osim što je procenat smrtnosti u grupi miševa koji su primali terapiju bio visok (85%), smrtnost od 33% u kontrolnoj grupi neinficiranih miševa koji su primali deksametazon sugerisala je na visoku toksičnost ovakve terapije (43). Ipak, ovakav model, kao i njegove varijacije, primenjivan je i dalje, a deksametazon u vodi za piće postao je jedan od najčešće upotrebljivanih imunosupresiva u eksperimentalnim modelima koji su se bavili proučavanjem različitih aspekata patogeneze RT (39, 40, 44-46). Ovaj model je korišćen i u hemioterapijskim eksperimentima, između ostalog i za ispitivanje efikasnosti kombinovane primene atovakvona i klindamicina u terapiji RT, i to u laboratoriji

u kojoj je uspostavljen. Produženo preživljavanje miševa i značajno smanjenje broja cista u mozgu, koji je nastavio da se smanjuje i tokom tromesečnog praćenja, ukazali su i na trenutnu efikasnost i na produženo dejstvo ove kombinovane terapije (47).

Osim kortikosteroida, u literaturi je devedesetih godina prošlog veka opisana i primena drugih immunosupresiva, kao što su azatioprin i ciklosporin. Navedeni lekovi su izabrani kao citostatici koji se često koriste u cilju sprečavanja odbacivanja transplantata. Ova vrsta immunosupresiva, međutim, nije dovela do diseminovane toksoplazmoze ni kod jedne od tretiranih životinja, sugerisući na blag immunosupresivni efekat navedenih lekova (48). Nakon toga, u nekoliko istraživanja je opisana primena ciklofosfamida, jednog od široko korišćenih immunosupresiva u savremenim protokolima transplantacione medicine. Njegova česta primena i u drugim indikacijama, kao što su lečenje maligniteta i autoimunskih bolesti, ukazuje na značajan doprinos ovog leka povećanom riziku od oportunističkih infekcija u vulnerabilnoj kategoriji pacijenata (49). Ovaj alkilirajući agens, nakon prelaska u svoju aktivnu formu metabolisanjem u jetri, dodaje alkil grupe na DNK baze, razarajući tako DNK, a samim tim i sve aktivno replikujuće ćelije, među kojima su i ćelije koštane srži (50). Primenjen na adekvatan način i u optimalnoj dozi, navedeni lek se pokazao pogodnim za izazivanje jatrogene immunosupresije u eksperimentalnim modelima na *outbred* i *inbred* miševima (51,52). U nekoliko eksperimentalnih modela toksoplazmoze primenjen je u različitim koncentracijama, u pojedinačnoj ili u više doza, tokom dužeg ili kraćeg vremenskog perioda (36-38). Cilj primene ovog leka se takođe menjao kroz istraživanja. Naime, Zang (*Zhang*) i saradnici su ispitivali efekat ciklofosfamida na nastanak TE i pridruženih histopatoloških promena u mozgu miševa, dok je ideja Silva i saradnika bila da se ispita uticaj ciklofosfamida na podložnost reinfekciji različitim sojevima *T. gondii* (36,38). Iako su Silva i saradnici pokazali da ciklofosfamid povećava osetljivost miševa inficiranih *T. gondii* na reinfekciju virulentnim sojevima, činjenica da primena ovog immunosupresiva nije dovela do značajnog povećanja broja cista inficiranih miševa ukazala je na to da su doza

i interval davanja leka bili nedovoljni da izazovu reaktivaciju kod životinja (36). S druge strane, Zang i saradnici su kod životinja uspešno izazvali TE, koji je i histopatološki potvrđen kod svih inficiranih miševa koji su primili samo jednu dozu ciklofosfamida od 50 mg/kg (38). Ispitivana je i efikasnost imunomodulatornog leka pidotimoda na hronično inficirane miševе immunosuprimirane ciklofosfamidom. U ovom istraživanju je korišćen veoma agresivan režim davanja ciklofosfamida svakog drugog dana u trajanju od mesec dana, a parazitemija koja potvrđuje RT kod miševa do kraja eksperimenta ustanovljena je kod čak 80% životinja (37). S obzirom na to da su u navedenim istraživanjima korišćeni isti miševi (BALB/c), put infekcije (*per os*) i životni oblik parazita (ciste), potencijalni uzroci nekonzistentnih rezultata navedenih autora bi mogli da budu soj *T. gondii*, veličina inokuluma ili na različite načine evaluiran efekat immunosupresiva (brojanjem cista, histopatološkom verifikacijom TE, tj. praćenjem parazitemije) (36-38).

Velike varijacije u režimu doziranja, kao i u eksperimentalnim parametrima za praćenje immunosupresije i reaktivacije, ukazuju na potrebu za optimizacijom modela, sa akcentom na određivanju optimalne doze ciklofosfamida ili nekog drugog često korišćenog citostatika. Uporedo sa primenom odabranog citostatika, kod pacijenata koji primaju transplantat neizbežna je i upotreba kortikosteroida, kao prve linije lekova u prevenciji bolesti kalema protiv domaćina (engl. *Graft Versus Host Disease - GVHD*) (49). Kombinacijom dva leka (odabranog citostatika i kortikosteroida) na animalnom modelu mogli bi da se simuliraju najčešće primenjivani immunosupresivni režimi u humanoј transplantacionoj medicini. Ovakvi modeli omogućili bi bolji uvid u efekat citostatika, tj. izdvajanje onih koji su povezani sa većom predispozicijom za RT kod pacijenata, a samim tim i individualno prilagođavanje terapijskog režima. U budućim istraživanjima bi bilo izazovno uspostaviti eksperimentalni model RT koji bi podražavao postojeće kliničke podatke koji su pokazali da se RT registruje kod 20% HSCT pacijenata (12).

Osnovni principi, prednosti i nedostaci gore navedenih eksperimentalnih modela RT sumarno su prikazani u **tabeli 1**.

Tabela 1. Eksperimentalni modeli RT.

Eksperimentalni modeli RT	Lekovima indukovani model	Model sa genetski modifikovanim miševima
Osnovni princip indukcije reaktivacije	Jatrogena immunosupresija izazvana lekovima (kortikosteroidi, citostatici...)	Specifična vrsta miševa koji ne mogu da kontrolišu infekciju (miševi sa SCID, IFN- γ deficijentni miševi...)
Prednosti	Kontrolisano doziranje lekova Simulacija immunosupresivnih režima u humanoј medicini	Jednostavnije izvođenje eksperimenata
Nedostaci	Optimizacija modela (pronalaženje odgovarajućeg leka/kombinacije lekova, doznog režima, puta/načina primene)	Visoka cena Ograničena dostupnost <i>Pathogen free</i> uslovi Nemogućnost simulacije realnih uslova kod imunokompromitovanih pacijenata

RT – reaktivirana toksoplazmoza; SCID – teška kombinovana imunodeficijencija (engl. *severe combined immunodeficiency*).

Razvoj eksperimentalnih modela - nove perspektive

U poslednje vreme se sve više teži razvijanju novih, modernijih *in vitro* modela infektivnih bolesti koji bi mogli da zamene *in vivo* modele, a samim tim i redukuju upotrebu laboratorijskih životinja. Cilj je da se ovakvi sistemi unaprede, tj. da se okruženje u ćelijskoj kulturi sasvim približi uslovima koji vladaju u živim, *in vivo* sistemima (19). Nedavno je razvijen 3D sistem kulture ćelija, zasnovan na trofoblastima placente, koji bi mogao da se koristi za ispitivanje interakcija između placente i *T. gondii*, tj. da oponaša uslove koji vladaju u ljudskom organizmu u sklopu nastanka KT (53). Poslednju deceniju obeležio je uspon naprednih *in silico* modela, koji su bazirani na preciznim računarskim metodama modelovanja i simulacije eksperimentalnih uslova, te imaju potencijal da prevaziđu aktuelne *in vitro* i *in vivo* eksperimentalne koncepte (54). Međutim, s obzirom na to da su ovakvi modeli još uvek nedovoljno istraženi i da do sada nije uspostavljen model koji bi mogao da bude pandan *in vivo* modelima RT, i dalje postoji potreba za korišćenjem laboratorijskih životinja u ispitivanjima ove globalno rasprostranjene zoonoze. U kontekstu što vernije imitacije kliničkog toka infekcije kod transplantiranih pacijenata, interesantno je spomenuti i nedavno objavljeno istraživanje u kojem je miševima urađena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze inficiranih *T. gondii* kako bi se empirijski utvrdila stopa prenošenja infekcije putem inficiranog transplantata (55). Upravo bi kombinacija transplantacije i optimizovane jatrogene imunosupresije u *in vivo* uslovima mogla da bude temelj za nove i modernije modele RT.

Zaključak

Bez obzira na višedecenijsku primenu eksperimentalnih modela toksoplazmoze u ispitivanju potencijalnih hemioterapeutika, za sada se lečenje toksoplazmoze i dalje svodi na nekoliko terapijskih opcija, povezanih sa ozbiljnim neželjenim efektima, katkad i rezistencijom. Iako se razvojem tehnologije poslednjih godina sve više teži uspostavljanju modela koji bi simulirali uslove u živom organizmu, kao što su pomenuti *in vitro* i *in silico* modeli, za sada su *in vivo* eksperimenti i dalje nezaobilazan korak ka kliničkim studijama, tj. registraciji novih lekova. S obzirom na navedeno, usavršavanje *in vivo* eksperimentalnih modela, sa akcentom na modelima RT, omogućilo bi da se u budućnosti izdvoje lekovi koji bi bili prilagođeni terapiji RT kod rastuće populacije imunosuprimiranih pacijenata. Proširenje spektra lekova, kao i pronalaženje onih koji efikasno deluju i na ciste, omogućilo bi individualno prilagođavanje terapije, te potencijalno i potpunu eradikaciju parazita iz organizma domaćina.

Lista skraćenica

KT - kongenitalna toksoplazmoza

HIV - engl. *Human immunodeficiency virus*

RT - reaktivirana toksoplazmoza

HSCT - engl. *Hematopoietic stem cell transplantation*

SCID - engl. *Severe combined immunodeficiency*

TE - toksoplazmatski encefalitis

GVHD - engl. *Graft versus host disease*

Literatura

1. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363(9425):1965-76.
2. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995; 172(6):1561-6.
3. Uzelac A, Klun I, Ćirković V, Bauman N, Bobić B, Štajner T, et al. *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in Serbia-insight into the population structure and diversity of the species in Southeastern Europe, a region of intercontinental strain exchange. *Microorganisms*. 2021; 9(12):2526.
4. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 1998; 28(7):1019-24.
5. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 2009; 39(8):895-901.
6. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2001. p.205-346.
7. Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med*. 1974; 290(20):1110-6.
8. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*. 2016; 51(6):786-92.
9. Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, Accoceberry I, Menotti J, Cassaing S, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(5):1677-84.
10. Gajurel K, Dhakal R, Montoya JG. *Toxoplasma* prophylaxis in haematopoietic cell transplant recipients: a review of the literature and recommendations. *Curr Opin Infect Dis*. 2015; 28(4):283-92.
11. Robert-Gangneux F, Meroni V, Dupont D, Botterel F, Garcia JMA, Brenier-Pinchart MP, et al. Toxoplasmosis in transplant recipients, Europe, 2010-2014. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24(8):1497-504.
12. Štajner T, Vujić D, Srblijanović J, Bauman N, Zečević Ž, Simić M, et al. Risk of reactivated toxoplasmosis in haematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective cohort study in a setting withholding prophylaxis. *Clin Microbiol Infect*. 2022; 28(5):733.e1-733.e5.
13. Štajner T, Nestorović E, Jovanović S, Dakić Z, Srblijanović J, Terzić D, et al. Molecular monitoring of *Toxoplasma* infection after orthotopic heart transplantation. 15th International Congress of Parasitology; 2022 Aug 21-26; Copenhagen, Denmark; Abstract book (O057 / #1307)
14. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31(4):e00057-17.
15. Shammaa AM, Powell TG, Benmerzouga I. Adverse outcomes associated with the treatment of *Toxoplasma* infections. *Sci Rep*. 2021; 11(1):1035.
16. Silva LA, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC, Vitor RW. Genetic polymorphisms and phenotypic profiles of sulfadiazine-resistant and sensitive *Toxoplasma gondii* isolates obtained from newborns with congenital toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0170689.
17. Villena I, Aubert D, Leroux B, Dupouy D, Talmud M, Chemla C, et al. Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group. *Scand J Infect Dis*. 1998;

- 30(3):295-300.
18. Konstantinović N, Guegan H, Štajner T, Belaz S, Robert-Gangneux F. Treatment of toxoplasmosis: current options and future perspectives. *Food Waterborne Parasitol.* 2019; 15:e00036.
 19. Szabo EK, Finney CAM. *Toxoplasma gondii*: one organism, multiple models. *Trends Parasitol.* 2017; 33(2):113-27.
 20. Watson GF, Davis PH. Systematic review and meta-analysis of variation in *Toxoplasma gondii* cyst burden in the murine model. *Exp Parasitol.* 2019; 196:55-62.
 21. Saraf P, Shwab EK, Dubey JP, Su C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp Parasitol.* 2017; 174:25-30.
 22. Djurković-Djaković O, Nikolić T, Robert-Gangneux F, Bobić B, Nikolić A. Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(9):2240-4.
 23. Ferreira RA, Oliveira AB, Gualberto SA, Vitor RW. Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii*, in vitro and in murine models of infection. *Parasite.* 2002; 9(3):261-9.
 24. Ferreira RA, Oliveira AB, Ribeiro MF, Tafuri WL, Vitor RW. *Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Exp Parasitol.* 2006; 113(2):125-9.
 25. Mui EJ, Schiehsler GA, Milhous WK, Hsu H, Roberts CW, Kirisits M, et al. Novel triazine JPC-2067-B inhibits *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(3):e190.
 26. Doggett JS, Nilsen A, Forquer I, Wegmann KW, Jones-Brando L, Yolken RH, et al. Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(39):15936-41.
 27. El-Zawawy LA, El-Said D, Mossallam SF, Ramadan HS, Younis SS. Preventive prospective of triclosan and triclosan-liposomal nanoparticles against experimental infection with a cystogenic ME49 strain of *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 2015; 141(Pt A):103-11.
 28. El-Zawawy LA, El-Said D, Mossallam SF, Ramadan HS, Younis SS. Triclosan and triclosan-loaded liposomal nanoparticles in the treatment of acute experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol.* 2015; 149:54-64.
 29. Opsenica DM, Radivojević J, Matić IZ, Štajner T, Knežević-Ušaj S, Djurković-Djaković O, et al. Tetraoxanes as inhibitors of apicomplexan parasites *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* growth and anti-cancer molecules. *J Serb Chem Soc.* 2015; 80(11):1339-59.
 30. Johnson LL. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infect Immun.* 1992; 60(9):3719-24.
 31. Rutaganira FU, Barks J, Dhason MS, Wang Q, Lopez MS, Long S, et al. Inhibition of calcium dependent protein kinase 1 (CDPK1) by pyrazolopyrimidine analogs decreases establishment and reoccurrence of central nervous system disease by *Toxoplasma gondii*. *J Med Chem.* 2017; 60(24):9976-89.
 32. Suzuki Y, Kang H, Parmley S, Lim S, Park D. Induction of tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase fails to prevent toxoplasmic encephalitis in the absence of interferon- γ in genetically resistant BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2000; 2(5):455-62.
 33. Dunay IR, Chan WC, Haynes RK, Sibley LD. Artemisone and artemiside control acute and reactivated toxoplasmosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(10):4450-6.
 34. Schöler N, Krause K, Kayser O, Müller RH, Borner K, Hahn H, et al. Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(6):1771-9.
 35. Dunay IR, Heimesaat MM, Bushrab FN, Müller RH, Stocker H, Arasteh K, et al. Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12):4848-54.
 36. Silva LA, Brandão GP, Pinheiro BV, Vitor RW. Immunosuppression with cyclophosphamide favors reinfection with recombinant *Toxoplasma gondii* strains. *Parasite.* 2012; 19(3):249-57.
 37. Huo XX, Wang L, Chen ZW, Chen H, Xu XC, Zhang AM, et al. Preventive effect of pidotimod on reactivated toxoplasmosis in mice. *Parasitol Res.* 2013; 112(8):3041-51.
 38. Zhang YH, Chen H, Chen Y, Wang L, Cai YH, Li M, et al. Activated microglia contribute to neuronal apoptosis in Toxoplasmic encephalitis. *Parasit Vectors.* 2014; 7:372.
 39. Mahmoud ME, Ihara F, Fereig RM, Nishimura M, Nishikawa Y. Induction of depression-related behaviors by reactivation of chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Behav Brain Res.* 2016; 298(Pt B):125-33.
 40. Mokuia Mose J, Muchina Kamau D, Kagira JM, Maina N, Ngotho M, Njuguna A, et al. Development of neurological mouse model for toxoplasmosis using *Toxoplasma gondii* isolated from chicken in Kenya. *Patholog Res Int.* 2017; 2017:4302459.
 41. Hofflin JM, Conley FK, Remington JS. Murine model of intracerebral toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 1987; 155(3):550-7.
 42. Nicoll S, Wright S, Maley SW, Burns S, Buxton D. A mouse model of recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection. *J Med Microbiol.* 1997; 46(3):263-6.
 43. Djurković-Djaković O, Milenković V. Murine model of drug induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozool.* 2001; 40(2):99-106.
 44. Kang KN, Choi IU, Shin DW, Lee YH. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. *Korean J Parasitol.* 2006; 44(3):209-19.
 45. Dellacasa-Lindberg I, Hitziger N, Barragan A. Localized recrudescence of *Toxoplasma* infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Microbes Infect.* 2007; 9(11):1291-8.
 46. Takashima Y, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Unno A, Kitoh K. Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii* reactivation in brain tissue. *Int J Parasitol.* 2008; 38(5):601-7.
 47. Djurković-Djaković O, Milenković V, Nikolić A, Bobić B, Grujić J. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50(6):981-7.
 48. Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitol Res.* 1996; 82(8):681-6.
 49. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT handbook: hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies.* 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019.
 50. Chu E, Sartorelli AC. *Cancer chemotherapy.* In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology.* 9th ed. New York: Mc Graw Hill; 2004. p.898-930.
 51. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis.* 2006; 6:55.
 52. Huyan XH, Lin YP, Gao T, Chen RY, Fan YM. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(9):1293-7.
 53. McConkey CA, Delorme-Axford E, Nickerson CA, Kim KS, Sadosky Y, Boyle JP, et al. A three-dimensional culture system recapitulates placental syncytiotrophoblast development and microbial resistance. *Sci Adv.* 2016; 2(3):e1501462.
 54. Piñero J, Furlong LI, Sanz F. In silico models in drug development: where we are. *Curr Opin Pharmacol.* 2018; 42:111-21.
 55. Lopes CS, Silva TL, de Almeida JCN, Costa LVS, Mineo TWP, Mineo JR. Transmission of *Toxoplasma gondii* infection due to bone marrow transplantation: validation by an experimental model. *Front Med (Lausanne).* 2019; 6:227.