

Obecnie stosowane leki przeciwko rzęsistkowicy kotów oraz nowe perspektywy leczenia

Joanna Dąbrowska, Jacek Sroka, Tomasz Cencek

z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

T*ritrichomonas foetus* (rzęsistek bydlęcy) to pasożytniczy pierwotniak z rodziny Trichomonadidae, z rzędu Trichomonadorida, zaliczany do typu Sarcocystidophora. Mikroorganizm przyjmuje kształt wrzecionowaty lub kulisty, w zależności od fazy rozwojowej i osiąga wymiary 10–25 µm × 3–15 µm. Charakterystyczną cechą tego pasożyta jest obecność jednej długiej wici skierowanej ku tyłowi, połączonej z błoną falującą oraz trzech krótkich wici skierowanych w kierunku przednim. W cyklu życiowym występują tylko trofozoity (brak formy cysty), rozmnażanie zachodzi przez podział podłużny, a transmisja tego pasożyta następuje bezpośrednio między gospodarzami (1). Obecność *T. foetus* została wykazana u różnych gatunków zwierząt, w tym u bydła, kotów i świń. Ponadto pierwotniak był wykrywany także u ludzi z wielochorobowością i niedoborami

odporności (2). *T. foetus* jest powszechnie uznawany za główny czynnik etiologiczny wywołujący tritrichomoniazę, rzęsistkowicę – chorobę dróg moczowo-płciowych u bydła oraz chorobę układu pokarmowego u kotów. Należy podkreślić, że ze względu na różnice genetyczne pasożyta obecnie przyjmuje się istnienie dwóch genotypów, tj. szczep koci i bydlęcy pierwotniaka w zależności od gospodarza (3).

Rzęsistkowica kotów

Tritrichomonas foetus u kotów został opisany po raz pierwszy 23 lata temu jako przyczyna przewlekłych biegunek (4). Należy podkreślić, iż rzęsistkowica kotów różni się znacząco objawami i przebiegiem od choroby przenoszonej drogą płciową występującej u bydła. Badania mikroskopowe,

Currently used treatment of tritrichomoniasis in cats and new therapeutic perspectives

Dąbrowska J., Sroka J., Cencek T., National Veterinary Research Institute in Puławy

Tritrichomonas foetus is a parasitic protozoan that has been detected in cats for over two decades. It is responsible for a challenging and often refractory disease known as tritrichomoniasis, characterized by large bowel chronic diarrhea. This disease predominantly affects young cats under one year of age, particularly those living in close proximity, as multicat households, particularly pedigree breeding catteries. Tritrichomoniasis has a global presence, with prevalence rates ranging from 2% to 59%. Currently, there is no established effective treatment, and veterinary practitioners rely on their clinical experience for this disease management. This article provides an overview of the currently employed therapeutic approaches for treating tritrichomoniasis. Furthermore, it highlights recent advancements in genetics, proteomics, and transcriptomics that offer promising strategies for the development of effective treatment strategies in cats.

Keywords: *Tritrichomonas foetus*, cats, treatment, drugs.

immunohistochemiczne i molekularne przeprowadzone u kotów rasowych ze stwierdzoną rzęsistkowicą nie wykazały obecności pasożytów na ich narządach płciowych. Przypadek występowania *T. foetus* w ropsym wysięku z macicy kota został opisany jedynie raz, natomiast nie wiadomo, czy było to zakażenie pierwotne, czy wtórne (5). Obecność rzęsistków stwierdzana jest głównie w końcowym odcinku układu pokarmowego kotów, w jelicie grubym. W początkowej fazie inwazji pasożyty lokalizują się na powierzchni błony śluzowej i rzadziej w świetle krypt. Ich występowanie w jelicie grubym powoduje łagodnie lub ostre limfocytarne zapalenie okrężnicy, a także hiperplazję komórek nabłonka krypt, zwiększoną aktywność mitotyczną i utratę komórek kubkowych. W miarę rozwoju choroby rzęsistki preferencyjnie zasiedlają powierzchnię nabłonka oraz krypty kątnicy i okrężnicy. Pierwsze objawy choroby pojawiają się już po 2–9 dniach od zarażenia, zaś czas trwania nieleczzonej rzęsistkowicy waha się od kilku dni do nawet kilku lat (6). U większości kotów głównym symptomem jest przewlekła biegunka. Kał wówczas ma konsystencję półpłynną, o żółtozielonym kolorze i silnym, nieprzyjemnym zapachu. Co ciekawe, 59% właścicieli kotów zgłasza, że biegunka u zwierząt występowała od początku ich życia lub od adopcji kota. Podczas wywiadu lekarskiego często stwierdzano również typowe objawy zapalenia okrężnicy, takie jak obecność świeżej krwi i śluzu w kale, nietrzymanie stolca, bolesne parcie oraz wzdęcia. Ponadto, koty cierpiące na tritrichomoniazę mogą wykazywać utratę apetytu, wymioty, a także spadek masy ciała. Jednak w większości przypadków chore zwierzęta zachowują normalny apetyt i dobrą ogólną kondycję zdrowotną, co prawdopodobnie wynika z ograniczenia występowania stanu zapalnego jedynie do okrężnicy. Objawy kliniczne utrzymują się przez 5–24 miesiące (mediana 9 miesięcy) od momentu diagnozy, zaś u ponad

połowy kotów będących w fazie klinicznej remisji obecność pasożytów jest nadal stwierdzana. Rzęsistkowica kotów może występować jako tzw. współzakażenie najczęściej z innymi pierwotniakami, np. z rodzaju *Giardia* lub kokcydiami, co często utrudnia diagnozę (4, 7). Transmisja *T. foetus* odbywa się drogą oralno-fekalną między zwierzętami zdrowymi a chorymi poprzez korzystanie z tej samej kuty i w trakcie wzajemnych zabiegów pielęgnacyjnych. Ponadto, żywność i woda mogą również stanowić ważne źródło zarażenia. Potwierdziły to badania, w których dowiedziono, że rzęsistki mogą przetrwać ponad trzy godziny w moczu kota i zanieczyszczonym kocim jedzeniu, i tylko ok. pół godziny w wodzie kranowej lub destylowanej (8). Ryzyko zarażenia rzęsistkowicą jest większe w środowiskach, gdzie w jednym miejscu żyje kilka osobników, np. hodowle kotów. Tritrichomoniazę może dotyczyć kotów prowadzących wolny tryb życia, jak i przebywających w domu, a także w schroniskach. Inwazja występuje zazwyczaj u kotów rasowych w wieku poniżej jednego roku. Prawdopodobnie związane to jest z niedojrzałością ich układu odpornościowego. Dlatego też starsze zwierzęta są bardziej odporne, jednak również i ich może dotyczyć występowanie długo utrzymujących się epizodów biegunkowych (4).

Obecnie przypadki tritrichomoniazę u kotów raportowane są na całym świecie, z prevalencją wynoszącą od 2 do 59%. W aspekcie geograficznym choroby występuje na terenie czterech kontynentów, tj. Europy (Austria, Finlandia, Francja, Niemcy, Grecja, Włochy, Holandia, Norwegia, Polska, Hiszpania, Szwecja, Szwajcaria i Wielka Brytania), Ameryki Północnej (Kanada i USA), Australii/Oceanii (Australa i Nowa Zelandia) oraz Azji (Japonia, Korea Południowa, Chiny, Tajlandia). Należy podkreślić, że z niektórych regionów dostępne są jedynie dane odnośnie do liczby przypadków, podczas gdy w innych miejscach prowadzono szersze analizy dotyczące prevalencji *T. foetus* (6). W Polsce podczas badań przesiewowych wykonanych w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych PIWet-PIB zostało przebadanych 117 próbek kału od kotów z dziewięciu województw za pomocą testów molekularnych. Wyniki dodatnie w kierunku *T. foetus* otrzymano u 20,5% zwierząt (9). Rzęsistkowica kotów może prowadzić do znacznych strat finansowych hodowców i właścicieli kotów. Związane to jest z długim czasem niezbędnym do uzyskania pełnej diagnozy i różnorodnymi badaniami. Ponadto koszty samego leczenia są dość wysokie i często ze względu na brak pożądanego efektów stosowanych jest kilka leków. Dlatego też znaczne dodatkowe nakłady finansowe są ponoszone w celu poszerzenia zakresu diagnostyki i przedsięwzięcia odpowiednich działań terapeutycznych, mających na celu eliminację tej choroby. Znaleźnienie skutecznych środków leczniczych przeciw rzęsistkowicy jest trudne i nawet w przypadku, gdy niektóre z nich prowadzą do tymczasowej poprawy stanu klinicznego, pełne wyleczenie tej parazytozy często pozostaje nieosiągalne. Dlatego też leczenie tej choroby wciąż stanowi duże wyzwanie

dla lekarzy weterynarii. Obecnie w Polsce nie ma zarejestrowanych leków, a także wytycznych dotyczących metod terapii, które mogłyby być stosowane do leczenia rzęsistkowicy kotów. Sposoby postępowania często opierają się na praktycznym doświadczeniu w konkretnych przypadkach klinicznych. Istnieje kilka preparatów leczniczych, które są zalecane przez lekarzy weterynarii i używane przez hodowców z różnym powodzeniem.

Artykuł stanowi przegląd obecnie stosowanych środków leczniczych, a także nowych kierunków badań w zakresie opracowania skutecznego leku przeciwko rzęsistkowicy kotów z zastosowaniem najnowszych metod biologii molekularnej, proteomiki i genetyki.

Środki lecznicze

Dane literaturowe podają, że najbardziej skutecznym środkiem stosowanym do przyczynowego leczenia rzęsistkowicy kotów jest ronidazol, czyli chemioterapeutyk należący do grupy 5-nitroimidazolowych leków przeciwpierwotniakowych (10). Lek ten w postaci proszku jest powszechnie używany do leczenia rzęsistkowicy ptaków domowych oraz giardiozy psów i kotów. Ronidazol jest wchłaniany w proksymalnej części jelita cienkiego, gdzie przedostaje się do krwiobiegu, a następnie jest metabolizowany i wydalany przez wątrobę i nerki (4). Należy podkreślić, że dane literaturowe nie podają wystarczających informacji na temat leczenia chorych kotów, zaś ponad połowę publikacji stanowią opisy badań prowadzonych na niereprezentatywnej grupie zwierząt, a także eksperymenty *in vitro*. Jednakże pośród dostępnej literatury istnieje kilka publikacji, które dostarczyły wiedzy na temat skuteczności tego leku (10, 11, 12, 13). Wyniki większości eksperymentów dowodzą, że ronidazol wpływa na ustąpienie biegunki u kotów w ciągu kilku dni, a następnie po ok. dwutygodniowym okresie leczenia reguluje rytm wypróżnień. Jednakże obserwacje lekarzy i właścicieli zwierząt wskazują na to, że nie u wszystkich leczonych kotów następuje poprawa i w niektórych przypadkach objawy utrzymują się przez wiele tygodni po zakończeniu leczenia. Dzieje się tak szczególnie, gdy na skutek obecności rzęsistków dodatkowo występuje ciężkie zapalenie okrężnicy (1, 7). Ponadto, autorzy badań raportują, że biegunka często wraca po zaprzestaniu podawania leku, ponieważ całkowite wyeliminowanie pasożytów nie zawsze jest możliwe (11, 14). Szacuje się, że dzieje się tak u ok. 40% kotów (4), zaś rzęsistkowica zostaje wyleczona dopiero po wielu cyklach przyjmowania chemioterapeutyku (11). Ponadto miejsce wchłaniania leku prawdopodobnie predysponuje do wystąpienia u niektórych kotów groźnego efektu ubocznego, neurotoksyczności leku (14, 15). Dlatego też ze względu na możliwość wystąpienia działań niepożądanych w trakcie kuracji tym środkiem bardzo ważne jest ustalenie odpowiedniego trybu przyjmowania leku, gdyż wyniki badań dowodzą, że efekty neurotoksyczne zależą od dawki i mogą być przypisane długiemu okresowi półtrwania leku.

W przeszłości zalecana dawka ronidozalu wynosiła 30–50 mg/kg m.c., podawana 2 razy dziennie przez 14 dni. Jednakże przyjmowanie tak wysokich dawek wiązało się z możliwością wystąpienia silnych efektów ubocznych, takich jak wspomniana wcześniej neurotoksyczność. Należy podkreślić, że zmiany te często pojawiały się co najmniej trzy dni po zaprzestaniu podawania leku i ustępowały w ciągu jednego do czterech tygodni (16). Dlatego też obecnie rekomendowana i bezpieczna dawka ronidozalu wynosi 30 mg/kg m.c., *p.o.*, raz dziennie przez 14 dni (11). Co więcej, badania farmakokinetyki chemioterapeutyku nie wykazały, że wyższe dawki, częstsze podawanie lub dłuższy okres stosowania leku wpływają na większą skuteczność leczenia. Niemniej konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu potwierdzenia tych wyników. Należy podkreślić, że ronidazol nie jest bezpiecznym lekiem i mimo podawania zalecanej obecnie mniejszej dawki u kotów nadal mogą występować działania niepożądane, tj. drżenie, brak koordynacji ruchów, silne zmęczenie, utrata apetytu, letarg, niezbornosć, osłabienie kończyn miedniczych, a czasem nawet drgawki (15, 16). Mimo że ronidazol jest krótko działającym lekiem i powinien przestać być wykrywalny w organizmie w ciągu 24 godz., skutki uboczne mogą być dłuższe u zwierząt z chorobami wątroby lub nerek. Zwierzęta mogą wówczas wymagać dodatkowej intensywnej opieki weterynaryjnej (1). Oprócz tego w sytuacji pojawienia się działań niepożądanych wskazane jest przerwanie leczenia ze względu na ryzyko śmierci. Badanie retrospektywne opisuje przypadek przerwania stosowania ronidazolu u 5% kotów ze względu na wystąpienie objawów neurologicznych i utratę apetytu (17). Dlatego też sugerowana jest ciągła obserwacja zwierzęcia. Ponadto kuracja ronidazolem nie powinna być wprowadzana u kotów z chorobami ogólnoustrojowymi, które mogłyby utrudnić rozpoznanie działań niepożądanych, a także u kotek ciężarnych lub karmiących ze względu na możliwe działanie teratogenne na płód (4). Należy również zachować szczególną ostrożność podczas podawania ronidazolu poprzez stosowanie np. rękawiczek ochronnych, ponieważ lek ten jest substancją mutagenną i rakotwórczą dla ludzi (18).

Bardzo często po stwierdzeniu rzęsistkowicy wielu lekarzy wdraża do terapii początkowej popularny lek, metronidazol. Podobnie jak ronidazol lek ten należy do 5-nitroimidazoli i jest stosowany w kuracji zakażeń powodowanych przez mikroorganizmy beztlenowe (1). Wybór tego środka leczniczego jako leku pierwszego wyboru wiąże się m.in. z popularnością, dostępnością, szerokim spektrum działania. Należy podkreślić, że choroba wywoływana przez rzęsistki u kotów jest często mylona z dolegliwościami powodowanymi przez inne pasożyty, tj. *Giardia* spp. lub *Pentatrichomonas hominis*, które są wrażliwe na ten lek (4, 19). Dane literaturowe nie podają jednoznacznie, jaka dawka metronidazolu jest skuteczna w leczeniu rzęsistkowicy kotów. Według Gookin i wsp. lek okazał się nieskuteczny w hamowaniu wzrostu *T. foetus* w stężeniach ≤ 10 mg/ml, zaś

wg Kather i wsp. optymalna dawka tego chemioterapeutyku, która była zdolna do zabicia komórek pasożyta podczas 24-godz. hodowli, wahała się w granicach od 1,25 do 2,5 mg/ml (11, 19). W tych samych badaniach porównywano również „minimalne stężenie bójcze” (MLC) dla rzęsistków, w doświadczeniu przeprowadzonym na dwóch izolatach *T. foetus* pochodzących od kota, podczas 24-godz. inkubacji z metronidazolem i ronidazolem. Wyniki eksperymentu wskazują na to, że osiągnięcie stężenia bójczego dla pierwotniaków nastąpiło po 24 i po 8 godz. dla pierwszego i drugiego izolatu *T. foetus*, podczas gdy w przypadku ronidazolu nastąpiło to już po 6–8 godz. Należy podkreślić, że skuteczność metronidazolu *in vitro* nie przekłada się na jego skuteczność *in vivo*. Badania prowadzone przez Gookin i wsp. dowiodły brak przydatności tego leku w hamowaniu wzrostu trzech różnych izolatów *T. foetus* w hodowli komórkowej. Co ciekawe, obserwacje innych autorów wskazują na przejściowe ustąpienie objawów klinicznych u zarażonych kotów, niezależnie od eliminacji zarażenia. Prawdopodobnymi przyczynami tego zjawiska były zmiany w mikroflorze bakteryjnej zwierząt po podaniu środka leczniczego, eliminacja potencjalnych współzakażeń, np. *Giardia*, lub efekt immunomodulacyjny. Potwierdzeniem tych obserwacji były wnioski wyciągnięte z przeprowadzonego eksperymentu, gdzie tylko u jednego kota spośród 13 zwierząt poddanych doświadczeniu podawanie metronidazolu zmniejszyło występowanie biegunki (7). Co ciekawe, przyjmowanie leku skutkowało czasowym ustąpieniem objawów klinicznych u części kotów zarażonych *T. foetus*, ale po odstawieniu chemioterapeutyku objawy choroby się nasilały.

Paramomycyna to jeden z pierwszych leków, który był stosowany w leczeniu rzęsistkowicy kotów. Chemioterapeutyk ten należy do grupy środków aminoglikozydowych, których często używa się w terapii inwazji wywołanych przez pasożyty, w tym m.in. *Trichomonas vaginalis* ze względu na swoją udokumentowaną skuteczność (1). Badania przeprowadzone przez Foster i wsp. wskazywały na wysoki odsetek wyników ujemnych w kierunku *T. foetus* po zastosowaniu kuracji tym środkiem, co czyniło go obiecującym w leczeniu tej trudnej choroby. Podawanie paramomycyny spowodowało ustąpienie biegunki u 13 z 15 kotów chorych na rzęsistkowicę. Jednakże, podobnie jak w przypadku metronidazolu, u kotów leczonych tym środkiem znacznie dłuższy czas podawania leku był potrzebny dla ostatecznego ustąpienia biegunki (7). Z kolei Gookin i wsp. oceniała skuteczność działania paramomycyny u 25 kotów testowanych w kierunku *T. foetus* w okresie od trzech dni do sześciu miesięcy od rozpoczęcia leczenia. Wyniki badań wykazały, że u 40% kotów, u których zakończono leczenie, nadal występowała biegunka. Spośród tych przypadków u dziewięciu kotów stwierdzono obecność rzęsistków w badaniu rozmazu kału. Dodatkowo w grupie 12 kotów, u których stwierdzono normalne stolce, aż 22% (n = 9) także wykazywało wynik pozytywny na obecność rzęsistków. Wyniki badań wrażliwości przeprowadzonych przez 24 godz. wskazały brak skuteczności

paramomycyny w eliminacji rzęsistków w testach *in vitro* przy stężeniach powyżej 80 mg/ml. Ponadto eksperyment ujawnił działania niepożądane u czterech kotów w postaci ostrej niewydolności nerek, która wystąpiła na skutek przyjmowania paramomycyny, zaś u trzech z nich nastąpiła również utrata słuchu i zaćma. Chemioterapeutyk ten tylko w nieznacznym stopniu wchłania się z przewodu pokarmowego i prawie całkowicie wydalany jest z kałem. W związku z tym objawy uboczne przypisano kombinacji dwóch czynników, tj. zbyt dużej dawce paramomycyny podawanej kotom oraz zwiększonemu wchłanianiu leku przez uszkodzony nabłonek błony śluzowej jelita cienkiego (20). W związku z tym konieczne są dalsze badania farmakokinetyczne w celu dokładniejszej oceny skuteczności paramomycyny po podaniu doustnym.

Tinidazol jest lekiem z grypy 5-nitroimidazoli drugiej generacji stosowanym u ludzi w leczeniu przeciw pasożytniczym w przypadku oporności na metronidazol. Początkowo chemioterapeutyk ten wykazywał skuteczność w zapobieganiu namnażania się rzęsistków w warunkach *in vitro*, gdzie efekt hamujący wzrost *T. foetus* został osiągnięty przy MLC ≥ 10 $\mu\text{g/ml}$. Ponadto badania farmakokinetyczne leku wykazały długi okres półtrwania, co sugerowałoby możliwość podawania go tylko raz dziennie chorym zwierzętom. Jednakże lek ten wykazuje małą skuteczność w testach prowadzonych *in vivo* (12, 20). Badania dowiodły, że tylko u dwóch na cztery chore na rzęsistkowicę koty po podaniu tinidazolu uzyskano wyniki ujemne podczas 33-tygodniowego okresu po zakończeniu leczenia. Ponadto często odnotowywano nawroty choroby u zwierząt, które otrzymywały ten chemioterapeutyk. W eksperymentalnie wywołanym zarażeniu *T. foetus* obecność pasożyta została stwierdzona w ciągu sześciu do ośmiu tygodni po zaprzestaniu leczenia (1). Możliwym wyjaśnieniem niewystarczającej skuteczności leku może być fakt, że po podaniu doustnym jest on całkowicie wchłaniany i w związku z tym nie osiąga wystarczającego stężenia w jelicie grubym (10). W badaniu prowadzonym przez Gookin i wsp. nad przydatnością różnych leków w leczeniu rzęsistkowicy wykazano również niedostateczną skuteczność tinidazolu (21). Należy podkreślić, że w czasie kuracji tym lekiem w żadnym z opisywanych przypadków nie odnotowano działań niepożądanych (11).

Fenbendazol należący do grupy benzimidazoli oraz furazolidon będący pochodną nitrofuranu to powszechnie stosowane leki przeciw pasożytnicze skuteczne szczególnie w leczeniu mieszanych inwazji pasożytów. W dostępnej literaturze nie istnieje prace opisujące skuteczność fenbendazolu w terapii kociej rzęsistkowicy. Jednakże należy wspomnieć, iż kombinacja kilku chemioterapeutyków, tj. enroflokscyny, metronidazolu oraz fenbendazolu (50 mg/kg doustnie co 24 godz. przez 5 dni), zastosowana przez Stockdale i wsp., wpłynęła na ustąpienie biegunki u czterech kotów poddanych temu eksperymentalnemu leczeniu (22). Kather i wsp. testowali skuteczność furazolidonu u kotów. Wyniki z przeprowadzonych

badania potwierdziły uzyskane wcześniej rezultaty z zastosowaniem wcześniej opisywanych leków i, mimo czasowego ustąpienia objawów choroby po rozpoczęciu kuracji, dalsze przyjmowanie tego środka nie przyniosło poprawy stanu zdrowia u chorych zwierząt. Należy wspomnieć, że w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem hodowli *T. foetus* zaobserwowano wysoką skuteczność działania furazolidonu porównywalną do metronidazolu i ronidazolu (19). W związku z tym dalsze badania są niezbędne, aby szerzej poznać właściwości tego leku.

Najnowsze postępy w odkrywaniu leków i nowych celów terapeutycznych

Leczenie farmakologiczne przeciwko chorobom wywołanym przez pierwotniaki prowadzone jest głównie w oparciu o leki opracowane wiele lat temu. Mimo że odegrały one znaczącą rolę w leczeniu rzęsistkowicy, należy podkreślić, że wykazują zróżnicowaną toksyczność, co zostało już uprzednio przedstawione w niniejszej pracy. Dodatkowo, oporność *T. foetus* na te środki jest coraz większa. Dlatego istotne jest identyfikowanie nowych substancji aktywnych lub potencjalnych celów dla nich przy użyciu najnowszych technologii. Unowocześnianie leków już stosowanych, a także wskazywanie nowych kierunków poszukiwań celów dla leków stanowią interesującą alternatywę, którą należy rozwijać.

Możliwość przewidywania interakcji leków z białkami docelowymi jest kluczowa dla badań i rozwoju sposobów leczenia wielu chorób (23). Niemniej, metody eksperymentalne służące do odkrywania nowych leków są kosztowne i czasochłonne. Dlatego też obecnie coraz częściej stosuje się analizy *in silico* transkryptomu i proteomu, które dostarczają danych na temat ekspresji genów i białek oraz warunków, w jakich zachodzą. Z kolei te informacje pomagają przypisać funkcje nieznanym genom, odszyfrowywać mechanizmy patogenności mikroorganizmów, a także odkrywać nowe cele terapeutyczne (24). Przykładem pionierskich badań mających na celu poszukiwanie potencjalnych nowych celów dla leków przeciwko rzęsistkowicy u kotów były analizy transkryptomu. W ramach tych badań autorzy przeprowadzili sekwencjonowanie całkowitego RNA wyizolowanego z *T. foetus* od kotów i bydła. Następnie, korzystając z przygotowanej w ten sposób biblioteki transkryptomicznej, przy użyciu licznych programów bioinformatycznych zidentyfikowano 1511 pełnowymiarowych genów ortologicznych wspólnych dla rzęsistków od obu gospodarzy. W celu identyfikacji transkryptów specyficznych dla gospodarza wyselekcjonowano 123 transkrypty *T. foetus* od kota, zaś po zastosowaniu dalszych analiz dowiedziono, że połowa z nich wykazywała pozytywne wyniki w odniesieniu do jednej lub więcej domen zdolnych do tworzenia ligandów, czyli potencjalnych leków. Należy podkreślić, że analiza, polegająca na wirtualnym wyszukaniu nowych celów dla leków, dostarczyła danych, które stanowią cenną podstawę do dalszych badań eksperymentalnych. Podjęcie takich działań umożliwi

syntezę chemiczną molekuł do opracowania skutecznego leku skierowanego przeciwko rzęsistkowicy u kotów (25).

Proteazy są enzymami występującymi w każdym żywym organizmie i odgrywają kluczową rolę w katabolizmie białek. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują proteazy cysteinowe, które są wydzielane w trakcie całego cyklu życiowego wielu pierwotniaków. Obecność tych enzymów jest niezbędna do katalizowania procesów komórkowych, zachodzących podczas odżywiania, rozmnażania czy inwazji do komórek gospodarza. Ponadto proteazy cysteinowe uważane są za istotny element wirulencji *T. foetus*, zaangażowany w rozkład i inaktywację przeciwciał ochronnych gospodarza, co umożliwia pasożytom pozostanie wewnątrz niego. Dzięki badaniom *in vitro* nad mechanizmami patogenności *T. foetus* w nabłonku jelitowym dowiedziono, że enzymy te odgrywają główną rolę w promowaniu adhezyjno-zależnej cytotoxyczności rzęsistków wobec nabłonka jelitowego gospodarza (26). Dlatego też autorzy sprawdzali doświadczalnie skuteczność działania inhibitorów proteaz cysteinowych w hamowaniu ich aktywności. Uzyskane wyniki badań wskazują jednoznacznie na to, że apoptoza enterocytów uległa wyhamowaniu i w konsekwencji zmniejszyła się ilość uszkodzeń nabłonka jelitowego gospodarza. Co ciekawe, zastosowanie inhibitorów proteaz cysteinowych w stężeniach wymaganych do zneutralizowania aktywności odpowiadających im enzymów było bójcze również dla samych rzęsistków. W związku z tym wstępne wyniki analiz zwróciły uwagę badaczy na te enzymy i ich inhibitory jako kandydatów na potencjalne cele terapeutyczne. Takie podejście umożliwi opracowanie w przyszłości nowych strategii terapeutycznych łagodzących kliniczne objawy rzęsistkowicy, w szczególności u kotów z zakażeniem opornym na chemioterapeutyki (27).

Istotnym rozwinięciem wcześniejszych badań były analizy przy użyciu najnowszych metod biologii molekularnej i genetyki, gdzie po raz pierwszy zidentyfikowano i scharakteryzowano proteazy w transkryptomie *T. foetus* od kota. Adnotacja za pomocą narzędzia Blast pozwoliła na identyfikacje łącznie 346 proteaz cysteinowych i 2 inhibitorów proteaz unikalnych dla *T. foetus* od kota. Należy podkreślić, że spośród wszystkich zidentyfikowanych proteaz największą wykrytą grupę stanowiły aktywne miejsca proteaz cysteinowych, stanowiące aż 50% spośród wszystkich uzyskanych trafień. Dzięki tym wynikom możliwe jest prowadzenie dalszych badań z zastosowaniem wykrytych cząsteczek białkowych w celu opracowania skutecznej terapii przeciw zakażeniom rzęsistkami u kotów (25).

Przy użyciu kilku technik, m.in. analizy proteomicznej, pośredniej immunofluorescencji (IF) oraz cytometrii przepływowej, autorzy scharakteryzowali proteazę cysteinową (CP30), a następnie oceniali wpływ ukierunkowanego hamowania CP30 na adhezyjno-zależną cytotoxyczność wywołaną przez pierwotniaka. Wyniki badań wskazują, że ukierunkowane hamowanie CP30 spowodowało

zmniejszoną adhezję *T. foetus* do monowarstwy nabłonka jelitowego *in vitro* oraz zmniejszyło cytotoksyczność. Należy podkreślić, że ważnym aspektem podczas poszukiwania nowego celu terapeutycznego jest również uwzględnienie potencjału toksyczności dla komórek gospodarza. Autorzy dowiedli, że CP30 nie został zidentyfikowany w komórkach nabłonka jelitowego świń użytych w tych testach *in vitro*, co sugeruje, że enzym ten może być kandydatem na nowy lek służący do selektywnego hamowania cytotoksyczności (28).

Jednym ze sposobów projektowania nowych leków jest zastosowanie w praktyce działań polegających na zakłócaniu mechanizmów i procesów, zachodzących w cyklu życiowym mikroorganizmu i uważanych za kluczowe do jego przetrwania (29). W przypadku *T. foetus* hydrogenosomy pełnią funkcje energetyczne, które są niezbędne do przeżycia pasożyta, uczestniczą w metabolizmie pirogronianu powstałego podczas glikolizy, a także są miejscem powstawania molekularnego wodoru. Dlatego też struktury te określane są jako odpowiedniki mitochondriów. Jednakże ich szlaki metaboliczne są odmienne i w związku z tym potencjalne substancje lecznicze, które wpływają destrukcyjnie na hydrogenosomy, nie wpływają na mitochondria gospodarza. Mikroskopia elektronowa wykazała, że organellum to stanowi główne miejsce początkowego działania wielu leków, w tym metronidazolu i tinidazolu, gdzie chemioterapeutyki są aktywowane do formy cytotoksycznej. Badania prowadzone nad rzęsistkami poddanymi działaniu tego leku dowiodły, że zmianom ulegały błony hydrogenosomów, a także tworzyły się przedziały wewnątrz nich, powodując rozpad całych organelli. Podobnie na skutek działania innych środków leczniczych, np. 1,4-diamino-2-butanonem (DAB), hydrogenosomy również ulegają stopniowemu rozkładowi wraz z tworzeniem się wewnątrz nich dużych pęcherzyków. W związku z tym leki, które mogą zakłócać funkcje pełnione przez te organelle, mogą stanowić nowe alternatywy dla leczenia chorób wywoływanych przez rzęsistkę (30).

Piśmiennictwo

1. Yao C., Köster L.S.: *Trichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. *Vet. Res.* 2015, **46**, 1–16.
2. Suzuki J., Kobayashi S., Osuka H., Kawahata D., Oishi T., Sekiguchi K., Hamada A., Iwata S.: Characterization of a human isolate of *Trichomonas foetus* (cattle/swine genotype) infected by a zoonotic opportunistic infection. *J Vet Med Sci.* 2016, **78**, 633–640.
3. Dąbrowska J., Keller I., Karamon J., Kochanowski M., Gottstein B., Cencek T., Frey C., Muller N.: Whole genome sequencing of a feline strain of *Trichomonas foetus* reveals massive genetic differences to bovine and porcine isolates. *Int. J. Parasitol.* 2020, **50**, 227–233.
4. Gookin J.L., Hanrahan K., Levy M.G.: The conundrum of feline trichomonosis: The more we learn the 'trickier' it gets. *J. Feline Med. Surg.* 2017, **19**, 261–274.
5. Dahlgren S.S., Gjerde B., Pettersen H.Y.: First record of natural *Trichomonas foetus* infection of the feline uterus. *J. Small Anim. Pract.* 2007, **48**, 654–657.
6. Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Sroka J., Zdybel J., Cencek T.: *Trichomonas foetus* as a causative agent of trichomonosis in different animal hosts. *J. Vet. Res.* 2019, **63**, 533.
7. Foster D.M., Gookin J.L., Poore M.F., Stebbins M.E., Levy M.G.: Outcome of cats with diarrhea and *Trichomonas foetus* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004, **225**, 888–892.
8. Rosypal A.C., Ripley A., Walden H.D.S., Blagburn B.L., Grant D.C., Lindsay D.S.: Survival of a feline isolate of *Trichomonas foetus*

- in water, cat urine, cat food and cat litter. *Vet. Parasitol.* 2012, **185**, 279–281.
9. Dąbrowska J., Karamon J., Kochanowski M., Sroka J., Skrzypek K., Zdybel J., Różycki, M., Jabłoński A., Cencek T.: *Trichomonas foetus*: A study of prevalence in animal hosts in Poland. *Pathogens* 2020, **9**, 203. Doi: 10.3390/pathogens9030203.
10. Grellet A., Makhoulouf S.E., Desquilbet L., Hovhannessian F., Boogaerts C. Dore V., Anthony M., Espana B., Prouillac C., Kirilov P.: Efficacy of guar gum-based ronidazole capsules as a treatment for *Trichomonas foetus* infection in cats. *J. Feline Med. Surg.* 2017, **19**, 177–184.
11. Gookin J.L., Copple C.N., Papich M.G., Poore M.F., Stauffer S.H., Birkenheuer A.J., Twedt D.C., Levy M.G.: Efficacy of Ronidazole for treatment of feline *Trichomonas foetus* infection. *J. Vet. Intern. Med.* 2006, **20**, 536–543.
12. Gookin J.L., Stauffer S.H., Coccaro M.R., Poore M.F., Levy M.G., Papich M.G.: Efficacy of tinidazole for treatment of cats experimentally infected with *Trichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.* 2007, **68**, 1085–1088.
13. Burgener I., Frey C., Kook P., Gottstein B.: *Trichomonas foetus*: A new intestinal parasite in Swiss cats. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2009, **151**, 383–389.
14. Bell E.T., Gowan R.A., Lingard A.E., McCoy R.J., Šlapeta J., Malik R.: Naturally occurring *Trichomonas foetus* infections in Australian cats: 38 Cases. *J. Feline Med. Surg.* 2010, **12**, 889–898.
15. Rosado T.W., Specht A., Marks S.L.: Neurotoxicosis in 4 cats receiving ronidazole. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, **21**, 328.
16. LeVine D.N., Papich M.G., Gookin J.L., Davidson G.S., Davis J.L., Hayes R.B.: Ronidazole pharmacokinetics after intravenous and oral immediate-release capsule administration in healthy cats. *J. Feline Med. Surg.* 2011, **13**, 244–250.
17. Xenoulis P.G., Lopinski D.J., Read S.A., Suchodolski J.S., Steiner J.M.: Intestinal *Trichomonas foetus* infection in cats: A retrospective study of 104 cases. *J. Feline Med. Surg.* 2013, **15**, 1098–1103.
18. Zygner W.: Diagnostyka i zwalczanie rzęsistkowicy u kotów. *Życie Wet* 2013, **88**, 132–135.
19. Kather E.J., Marks S.L., Kass P.H.: Determination of the *in vitro* susceptibility of feline *Trichomonas foetus* to 5 antimicrobial agents. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, **21**, 966–970.
20. Gookin J.L., Riviere J.E., Gilger B.C., Papich M.G.: Acute renal failure in four cats treated with paromomycin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1999, **215**, 1821–1823.
21. Gookin J.L., Stauffer S.H., Dybas D., Cannon D.H.: Documentation of *in vivo* and *in vitro* aerobic resistance of feline *Trichomonas foetus* isolates to ronidazole. *J. Vet. Intern. Med.* 2010, **24**, 1003–1007.
22. Stockdale H.D., Givens M.D., Dykstra C.C., Blagburn B.L.: *Trichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. *Vet. Parasitol.* 2009, **160**, 13–17.
23. Chen X., Yan C.C., Zhang X., Zhang X., Dai F., Yin J., Zhang Y.: Drug-target interaction prediction: databases, web servers and computational models. *Brief. Bioinform.* 2016, **17**, 696–712.
24. Stroud L.J., Šlapeta J., Padula M.P., Druery D., Tsiotsioras G., Coorsen J.R., Stack C.M.: Comparative proteomic analysis of two pathogenic *Trichomonas foetus* genotypes: There is more to the proteome than meets the eye. *Int. J. Parasitol.* 2017, **47**, 203–213.
25. Morin-Adeline V., Lomas R., O'Meally D., Stack C., Conesa A., Šlapeta J.: Comparative transcriptomics reveals striking similarities between the bovine and feline isolates of *Trichomonas foetus*: Consequences for *in silico* drug-target identification. *BMC Genomics* 2014, **15**, 1–18.
26. Tolbert M.K., Stauffer S.H., Brand M.D., Gookin J.L.: Cysteine protease activity of feline *Trichomonas foetus* promotes adhesion-dependent cytotoxicity to intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 2014, **82**, 2851–2859.
27. Tolbert M.K., Gookin J.L.: Mechanisms of *Trichomonas foetus* pathogenicity in cats with insights from venereal trichomonosis. *J. Vet. Intern. Med.* 2016, **30**, 516–526.
28. Gould E.N., Giannone R., Kania S.A., Tolbert M.K.: Cysteine protease 30 (CP30) contributes to adhesion and cytopathogenicity in feline *Trichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.* 2017, **244**, 114–122.
29. Benchimol M., Gadelha A.P., de Souza W.: Unusual cell structures and organelles in *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* are potential drug targets. *Microorganisms* 2022, **10**, 2176.
30. Benchimol M.: The hydrogenosoma as a drug target. *Curr. Pharm. Des.* 2008, **14**(9), 872–81. Doi: 10.2174/138161208784041114.

Dr Joanna Dąbrowska,
e-mail: joanna.dabrowska@piwet.pulawy.pl