

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory (B3912)

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů (BMOBIBO, 1515R011)



Marek Valach

Současná chemoterapie onemocnění způsobených parazitickými  
prvky

Current chemotherapy of protozoan parasitic diseases

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2021.

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování doc. RNDr. Ivanu Hrdému, Ph.D. za jeho cenné rady, podnětná doporučení a metodickou a odbornou pomoc. Rovněž si vysoce cením ochoty a trpělivosti, které projevil při vedení mé bakalářské práce. Chtěl bych také poděkovat své rodině za neutuchající podporu při psaní této práce.

*Marek Valach*

## **Abstrakt**

Práce se věnuje problematice chemoterapie chorob způsobených jednobuněčnými parazity. Tyto choroby postihující velkou část lidstva s nejzávažnějšími následky zejména v rozvojových zemích v tropickém a subtropickém pásmu se netěší takové pozornosti jako nemoci způsobené viry a bakteriemi. Zátěž, kterou kvůli chorobám způsobenými jednobuněčnými prvky nese obyvatelstvo těchto zemí, zdůrazňuje potřebu účinných léčebných metod založených na chemoterapii, protože vakcinace proti původcům těchto chorob zatím není dostupná. Podstatou chemoterapeutického zásahu je eliminace nebo potlačení parazita v pacientovi, využívající slabý článek jeho životního cyklu nebo rozdíl fyziologie hostitele a parazita. Cílem práce je nabídnout přehled aktuálně schválených chemoterapeutik čtyř nejčastěji se vyskytujících chorob způsobených parazitickými prvky. Choroby jsou v práci přehledně popsány z hlediska příznaků a životního cyklu parazita. Hlavní důraz je kladen na popis mechanismu účinku jednotlivých látek a případně na mechanismus poskytující parazitům rezistenci na tyto látky.

Klíčová slova: toxoplazmóza, améboza, malárie, spavá nemoc, Chagasova choroba, chemoterapie, mechanismus účinku, artemisinin, fexinidazol

## **Abstract**

This work is devoted to the process of chemotherapy of diseases caused by parasitic protozoa. Even though being often shadowed by bacterial or viral infections, protozoan caused diseases affect hundreds of millions of people every year, especially in tropical and subtropical regions of the developing world. This great burden placed on inhabitants of these countries highlights the need for functional chemotherapeutics against these diseases, because vaccination is not yet an option. The goal of successful chemotherapy is either elimination or suppression of the parasite in the patient by exploiting its weaknesses in its life cycle or differences in physiology between the parasite and the host. The aim of this work is to provide an overview of chemotherapeutics currently approved for the treatment four most prevalent parasite diseases. The diseases are clearly described in the terms of symptoms, their socioeconomical impact and lifecycle of the parasite. An emphasis is placed on the description of mode of action of each chemotherapeutical agent and on mechanism allowing the parasite to resist the drug.

Key words: toxoplasmosis, amebiasis, malaria, sleeping sickness, Chagas disease, chemotherapy, mode of action, artemisinin, fexinidazole

# Obsah

1	Úvod.....	2
2	Choroby.....	3
2.1	Toxoplazmóza .....	3
2.1.1	Socioekonomický kontext.....	4
2.1.2	Historie léčby .....	5
2.1.3	Aktuální léčba .....	5
2.2	Améboza .....	7
2.2.1	Socioekonomický kontext.....	8
2.2.2	Historie léčby .....	8
2.2.3	Aktuální léčba .....	8
2.3	Malárie .....	10
2.3.1	Socioekonomický kontext.....	12
2.3.2	Historie léčby .....	12
2.3.3	Aktuální léčba .....	12
2.4	Trypanozomiázy.....	21
2.4.1	Socioekonomický kontext.....	23
2.4.2	Historie léčby .....	24
2.4.3	Aktuální léčba .....	24
3	Diskuse a závěr.....	28
4	Literatura.....	31

# 1 Úvod

Parazitární choroby ohrožují miliardy lidí a více než milion lidí jim podlehne ročně (Lozano *et al.* 2012). Byť tento milion obětí vypadá jako nízké číslo vedle sedmi milionů lidí, kteří v roce 2020 zemřeli hladem, problémem parazitárních chorob je vázání dalších lidských a finančních zdrojů na léčbu, přičemž tyto zdroje chybí v jiných potřebných oblastech rozvoje společnosti. Ačkoli se jedná o významnou skupinu chorob, pozornost jim věnovaná měřeno dedikovanými výzkumnými kapacitami a objemem finančních prostředků neodpovídá jejich závažnosti. Důvodem pro tento stav věcí je skutečnost, že ve většině případů se jedná o choroby postihující rozvojové země, jejichž rozpočty si nemohou dovolit výdaje na studium léčiv, která by zajistila dostatečnou ziskovost výzkumu prováděnému farmaceutickými společnostmi.

Před Leeuwenhoekovým objevem mikroskopu mohli lékaři pouze uhadovat příčinu chorob, kterou mnohdy přičítali po Galénově příkladu "humorální nerovnováze" a pouštění žilou bylo po patnáct století univerzálním řešením neduhů, pokud vina nebyla přičítána vnějším příčinám, jakými byl třeba zkažený, "špatný vzduch" - "mal aire" považovaný za původce moru i malárie. Teprve zviditelněním bakterií a mikroskopických parazitů byly splněny předpoklady pro skutečně deterministický racionální postup léčby.

Jak napovídá název, práce je soustředěna na chemoterapii parazitárních chorob – nezabývá se do detailů životními cykly parazitů, podmínkami prostředí nutnými pro jejich vývoj. Stejně tak se nezabývá detaily léčby – průběhem, dávkováním, vedlejšími účinky. Cílem práce je tedy z rozsáhlé původní vědecké literatury představit soudobou chemoterapii na léčení nebo potlačování vybraných parazitárních chorob na vybraných účinných látkách a principech jejich působení. Výběr jednotlivých chorob se řídil prevalencí. Z důvodu omezeného možného rozsahu bakalářské práce nemohla být další onemocnění zahrnuta.

Skutečnost, že předmětem této práce jsou choroby způsobené jednobuněčnými parazity, je významná, protože oproti bakteriím mají parazité složitější životní cyklus, který může být jak zdrojem neporazitelnosti, tak slabým článkem, na jehož přerušení lze zaměřit léčbu (nebo preventivní opatření). A jak již bylo řečeno výše, při pohledu na mapy rozšíření parazitárních chorob je zřejmé, že jejich největší rozšíření koreluje s tropickými oblastmi, tedy oblastmi "globálního jihu", které jsou současně chudými rozvojovými zeměmi. Důsledkem této situace je požadavek, aby látky pro chemoterapii byly generické a co nejlevnější, bez složitého způsobu podávání.

K organizaci předkládané práce. Kapitoly věnované vybraným parazitárním chorobám mají obdobné členění (parazit a jeho životní cyklus, geografický a sociální kontext choroby, objev choroby, historie a perspektivy a podstata léčby). Kapitola Diskuse a závěr shrnuje a porovnává, co mají choroby a terapie společného, čím se liší, a zamýšlí se nad budoucím vývojem v této oblasti.

## 2 Choroby

### 2.1 Toxoplazmóza

Toxoplazmóza je celosvětově rozšířená zoonóza způsobené prvokem *Toxoplasma gondii*. Přesto, že počet obyvatel pozitivních na specifické protilátky se liší v závislosti na geografické oblasti, jde o jednu z nejběžnějších nákaz. Poprvé byla popsána jako lidský patogen v roce 1939 v USA. Na poznání původce se významně podílel i český badatel Josef Janků (Janků 1923).

*T. gondii* patří mezi vícehostitelské kokcidie ze skupiny Apicomplexa, která také obsahuje apikoplast. Parazituje v buňkách člověka a většiny teplokrevných zvířat. Konečným hostitelem, ve kterém může toxoplazma dokončit svůj reprodukční cyklus, jsou kočkovité šelmy. *T. gondii* existuje ve třech formách: sporozoit (oocysta, infekční stádium), tachyzoit (patogenní stádium) a bradyzoit (infekční stádium). Oocysty vznikají pohlavním rozmnožováním v těle kočkovitých šelem a jsou vylučovány trusem. Ve vlhkém prostředí za přístupu vzduchu dozrávají za 1-5 dní na infekční oocystu. Mezihostitel se nakazí kontaminovanou potravou. V jeho těle se oocysty promění na tachyzoity, ti se lyticky množí a část z nich diferencuje do stádia bradyzoitů, kteří pak encystují v buňkách hostitele, preferenčně ve svalové tkáni nebo mozku. Bradyzoiti mohou přetrvávat v mezihostiteli v zapouzdřeném stavu celý život, průběžně ovšem dochází k uvolňování bradyzoitů z buněk jejich prasknutím. Uvolnění bradyzoitů se mohou zpětně přeměnit na tachyzoity a způsobit tak relaps akutní toxoplazmózy. Další hostitel se nakazí požitím tkáně obsahující bradyzoity nebo potravou kontaminovanou oocystami. Diferenciace tachyzoitů do bradyzoitů, tedy přesun z akutní do chronické fáze toxoplazmózy se zdá být spouštěna stresovými faktory a řízena centrálním regulátorem bradyzoite formation deficient protein 1 (*BFDI*), který svojí translací spouští kaskádu dalších transaktivátorů a transkripčních faktorů (Waldman *et al.* 2020).

Toxoplazmóza je primárně alimentární infekce, která se přenáší kontaminovaným jídlem a vodou. V případě kongenitální toxoplazmózy dochází k přenosu tachyzoitů z krve matky na plod, pokud dojde k primoinfekci matky v průběhu těhotenství. Zřídka může dojít k přenosu při orgánové transplantaci od nakaženého dárce. Existují tři hlavní genetické linie *T. gondii*, typy I, II a III, specifické pro geografické oblasti. Typ genetické linie má vliv na klinické symptomy onemocnění. Například v Evropě se vyskytuje převážně genotyp II a 80-90 % zdravých jedinců má bezpříznakový nebo mírný průběh nákazy. Naproti tomu v Jižní a Střední Americe, kde se vyskytují jiné genetické linie, byl vážný průběh nemoci zaznamenán u většího počtu jedinců (Dardé 2008). První příznaky akutní toxoplazmózy se objevují přibližně 5 až 23 dní po nákaze. Akutní toxoplazmóza se projevuje horečkou, bolestí hlavy, očí a svalů, zduřenými uzlinami, může dojít k zvětšení jater a sleziny a také se může objevit vyrážka. V některých případech může dojít i k infekci a zánětu plic (pneumonie), srdce (myokarditida), jater (hepatitida) nebo očí (retinohoroiditida). U oční formy je též přítomno rozmazané dvojité vidění. Následky přenosu *T. gondii* na plod závisí na gestačním věku ve kterém se matka nakazila. S vyšším gestačním věkem se riziko nákazy plodu zvyšuje, ale snižuje se závažnost postižení. Plody nakažené v rané fázi



těhotenství většinou umírají v děloze nebo se rodí s vážnými neurologickými a očními vadami. Pokud dojde k nákaze v druhém a třetím trimestru jsou projevy nemoci u narozených dětí většinou mírné. Relapsy onemocnění nepředstavují pro imunokompetentní jedince problém a jejich imunita je rychle zvládne potlačit, ovšem u imunokompromitovaných (např. AIDS) jedinců mohou být relapsy až fatální.

Během chronické fáze infikuje parazit zejména centrální nervovou soustavu. Tento fakt společně s evoluční strategií parazita vyvolávají otázku, jestli tato preference je pouze snahou ukrýt se do imunoprivilegovaných orgánů, nebo jde o snahu zvýšit svoje šance na rozšíření či posun k definitivnímu hostiteli ovlivněním chování aktuálního hostitele.

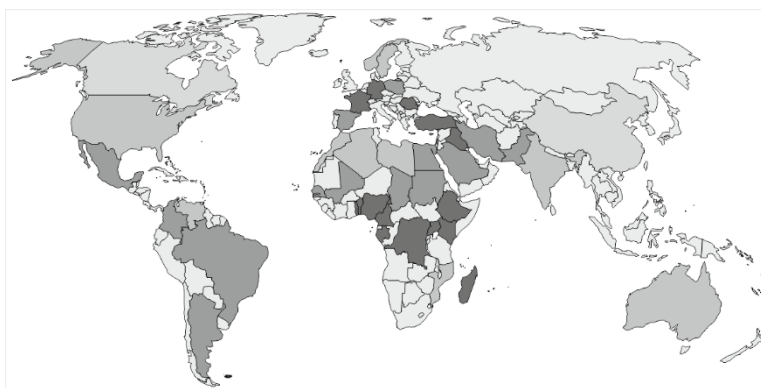
Ohledně možných změn chování u infikovaných lidí není v rámci vědecké komunity jasno. Byly pozorovány např. korelace mezi séropozitivitou na toxoplazmu a pravděpodobností účasti v dopravní nehodě, určitými charakterovými vlastnostmi u mužů, nebo prevalencí některých duševních chorob (schizofrenie, bipolární porucha, závislost, obsedantně-kompulzivní porucha) (Flegr *et al.* 1994, Flegr *et al.* 2002, Sutterland *et al.* 2015). Jiní autoři zase nenašli žádné vztahy nebo se domnívají, že nákaza nemusí být kauzální příčinou dané odchylky (Sugden *et al.* 2016, Johnson *et al.* 2020).

U krysa je vliv lépe popsán a zdá se, že infekce opravdu moduluje chování hostitele (Gonzalez *et al.* 2007). Krysy trpící chronickou toxoplazmózou se chovaly odvážněji, měly větší explorativní tendence a sníženou averzi k predátorům, jestli je snížení averze specifické na kočky není jisté (Gonzales *et al.* 2007, Vyas *et al.* 2007, Boillat *et al.* 2020). Parazit pravděpodobně dosahuje těchto efektů modulací transkriptomu hostitele, jeho imunitní odpovědi a úrovně dopaminu (Prandovszky *et al.* 2011, Tanaka *et al.* 2013, Pittman *et al.* 2014, Boillat *et al.* 2020).

### 2.1.1 Socioekonomický kontext

#### Prevalence

séropozitivních jedinců je geograficky odlišná (Obr. 1). Například v USA je přibližně 11 % obyvatel ve věku 6-49 let pozitivní na *T. gondii* (Jones *et al.* 2007), zatímco v Brazílii je to až 78 % (Pappas *et al.* 2009). Faktory ovlivňující počet infikovaných zahrnují klimatické podmínky (teplé a vlhké klima umožňuje přežívání a vyzrávání oocyst), stravovací návyky nebo chov domácích mazlíčků.



Obr. 1: Četnost rozšíření toxoplazmózy ve světě (schematicky dle Houdek 2017; tmavší šedá = vyšší výskyt)

Kongenitální toxoplazmóza se vyskytuje po celém světě. Vysoký výskyt je hlášen z Evropy, Střední Ameriky, Brazílie a centrální Afriky. Rozšíření je závislé na pravděpodobnosti

primonákazy žen v reprodukčním věku. Například v roce 2018 bylo v Evropské unii hlášeno 208 potvrzených případů kongenitální toxoplazmózy, z nichž 72,6 % pocházelo z Francie (EFSA *et* ECDC 2021).

### 2.1.2 Historie léčby

Počátek výzkumu účinných léků proti toxoplazmóze se datuje do 40. let 20. století, kdy byly zavedeny sulfonamidy (Sabin *et* Warren 1942). V 50. letech 20. století byl objeven efekt kombinované léčby pyrimethaminem a sulfonamidem (Eyles *et* Coleman 1953). Léčba touto kombinací je využívána dodnes. Současně byl na trh uveden spiramycin, následován v 70. letech clindamycinem. Později se objevují makrolidová antibiotika azithromycin a clarithromycin a v 90. letech atovaquon.

### 2.1.3 Aktuální léčba

Léčba akutní toxoplazmózy se zaměřuje na pacienty s těžkým průběhem a pacienty s dlouhotrvajícími symptomy. Imunokompetentní pacienti s mírnými příznaky léčbu nepotřebují (Dunay *et al.* 2018). Typicky je podávána kombinace pyrimethaminu, sulfadiazinu a leukovorinu (kyselina folinová) nebo kombinace pyrimethaminu, klindamycinu a leukovorinu. Pyrimethamin se též podává v kombinaci s atovaquonem nebo azitromycinem. U pacientů s alergií na sulfonamidy se podává atovaquon jako monoterapie. V případě nedostupnosti pyrimethaminu lze použít kombinaci trimethoprim-sulfamethoxazol. Tato léčba se využívá hlavně pro oční formy toxoplazmózy. V současnosti není schválen žádný lék na chronickou fázi nemoci cílící na bradyzoity *T. gondii*.

Všechny podávané léky mohou mít závažné nežádoucí účinky a je nezbytný monitoring laboratorních parametrů jako je krevní obraz. Mezi běžné nežádoucí účinky pyrimethaminu patří vyrážka, nevolnost, změny v krevním obraze. Sulfadiazin a podobné látky může způsobit horečku, vyrážku, leukopenii, hepatitidu, nevolnost, zvracení a průjem. Nejčastějším nežádoucím účinkem při podávání klindamycinu je průjem spojený s přemnožením *Clostridium difficile* ve střevech a alergické reakce. Atovaquon může nejčastěji způsobit bolest hlavy, nespavost, vyrážku, průjem, nevolnost a zvracení, bolest břicha, kašel, horečku. Rezistence sice existuje, ale její rozšíření je téměř zanedbatelné.

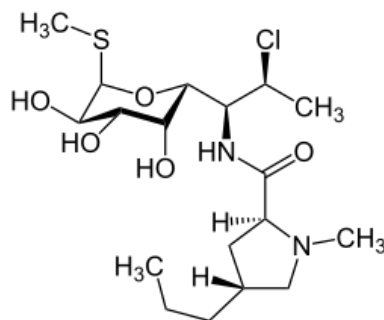
#### 2.1.3.1 Antifoláty

Terapeutický účinek některých sulfonamidů na toxoplazmózu je znám od roku 1942 (Sabin *et* Warren 1942). Mechanismus účinku na *T. gondii* je podobný tomu jako u *Plasmodium falciparum*, antifolátová chemoterapeutika kompetitivně inhibují jim příslušné enzymy a blokují tak dráhu *de novo* biosyntézy folátu přítomnou pouze v parazitu (Findlay *et al.* 1946, Hitchings *et al.* 1948, Kovacs *et al.* 1989). Mezi nejčastěji používaná antifolátová chemoterapeutika patří sulfadiazin a sulfamethoxazol (inhibitory dihydropteroát syntázy, DHPS), trimethoprim a pyrimethamin (inhibitory dihydrofolát reduktázy-tymidylát syntázy, DHFR-TS). Společně s antifolátovými chemoterapeutiky se často podává kyselina folinová za účelem zmírnění zejména hematologických vedlejších účinků.

Oproti nejdříve předpokládané podobnosti mezi mechanismem rezistence u *P. falciparum* na sulfonamidy bylo zjištěno, že nejen záměny v DHPS mohou mediovat sulfadiazin-rezistentní fenotyp (Wang *et al.* 1997, Doliwa *et al.* 2013). Dnes se předpokládá, že rezistence *T. gondii* na sulfadiazin může být zprostředkována jak záměnami v primární struktuře DHPS (Aspinall *et al.* 2002), tak změnami v expresi některých proteinů (Doliwa *et al.* 2013). Jeden z mechanismů rezistence na inhibitory DHFR-TS, dalšího z enzymů biosyntézy folátu je u *T. gondii* podobný tomu pozorovanému u *P. falciparum*, tj. změny v primární struktuře aktivního místa DHFR-TS (Donald *et al.* 1993). Dále také existuje variabilita v IC<sub>50</sub> mezi jednotlivými kmeny parazita, která ovšem není vysvětlena sekvencí *dhfr-ts* a na vysvětlení se zatím čeká (Meneceur *et al.* 2008).

### 2.1.3.2 Klindamycin

Klindamycin je antibiotikum ze skupiny lincosamidů (Obr. 2), které vykazuje i antiparazitické účinky na parazity ze skupiny Apicomplexa (McMaster *et al.* 1973).



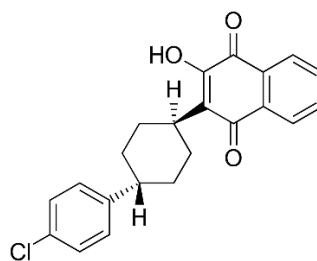
Obr. 2: Klindamycin – chemická struktura (podle Wikipedie)

V rámci této skupiny cílí klindamycin zřejmě na translační aparát apikoplastu, přesněji na velkou ribozomální podjednotku (Douthwaite 1992, Camps *et al.* 2002). Svou vazbou interferuje jak s A, tak P místem ribozomu (Schlünzen *et al.* 2001). Zastavení translace navozuje podobný jev jako má doxycyklin na *Plasmodium* spp., jev tzv. opožděné smrti (delayed death), kdy parazit umírá až v následném lytickém cyklu. Parazit ztrácí v průběhu prvního lytického cyklu apikoplast, ale přesto zůstává viabilní a množí se (Amberg-Johnson *et al.* Yeh 2018). Absencí apikoplastu dochází k narušení důležitých biosyntetických drah, které jsou zde lokalizovány a které jsou pro parazita esenciální. U *Toxoplasma gondii* jde o syntézu mastných kyselin II (FASII) a dráhu biosyntézy prenylových prekurzorů, která je ovšem zásadní zřejmě jen ve stádiu tachyzoitů (Mazumdar *et al.* 2006, Nair *et al.* 2011). Přežívání a množení parazita i přes ztrátu apikoplastu by mohla vysvětlovat jeho schopnost importovat hostitelské metabolity a kompenzovat tím vlastní neschopnost jejich syntézy (Li *et al.* 2013, Amberg-Johnson *et al.* Yeh 2018). Toto tvrzení je podpořeno pozorováním, kdy aplikace klindamycinu společně s inhibitorem biosyntézy prenylových prekurzorů (atrovastinem) omezila růst parazita (Amberg-Johnson *et al.* Yeh 2018).

### 2.1.3.3 Atovaquon

V in vitro a in vivo experimentech prokázal Araujo *et al.* (Araujo *et al.* 1991), že atovaquon (hydroxynaftochinon; Obr. 3) inhibuje replikaci tachyzoitů a působí též na bradyzoity různých kmenů *T. gondii*. U chronicky nemocných myši snížilo podávání atovaquonu počet bradyzoitů v mozku. V současnosti se atovaquon používá jak v léčbě malárie, tak v léčbě toxoplazmózy, kde se podává pacientům, kteří netolerují standardní léčbu pyrimethamin-sulfadiazinem.

Komplex III je 3. proteinový komplex v rámci respiračního elektronového transportního řetězce lokalizovaného ve vnitřní mitochondriální membráně a obsahující cytochrom b, cytochrom c, Rieskeho železo-sírný protein a další podjednotky. Funkcí komplexu III je předávat elektrony z ubichinolu na cytochrom c a pomocí jejich rozdílného redoxního potenciálu pumpovat protony do mezimembránového prostoru mitochondrií.



Obr. 3: Atovaquon – chemická struktura (podle Wikipedie)

Atovaquon kompetitivně inhibuje přenos elektronů elektronovým transportním řetězcem právě vazbou na komplex III, přesněji vazbou do ubichinol-oxidačního místa (Fry *et al.* 1992, McFadden *et al.* 2000, Kessl *et al.* 2003). Vazba je zprostředkována vhodným tvarem vazebného místa a interakcí s aminokyselinami cytochromu b a Rieskeho proteinu, zejména interakce hydroxy skupiny atovaquonu a histidinu 181 na Rieskeho proteinu se zdá být klíčová (McFadden *et al.* 2000, Kessl *et al.* 2003). Důvodem, proč atovaquon neúčinkuje tak silně na savčí komplex III, je jeho sekvenční odlišnost. A právě introdukce L275F mutace do kvasinkového cytochromu b zmenšila jeho citlivost na tu podobnou u hovězího dobytka (Kessl *et al.* 2003). Právě změny v sekvenci cytochromu b mohou vést k omezení vazby atovaquonu a tedy rezistenci nebo alespoň nižší citlivosti (McFadden *et al.* 2000, Kessl *et al.* 2006).

## 2.2 Améboza

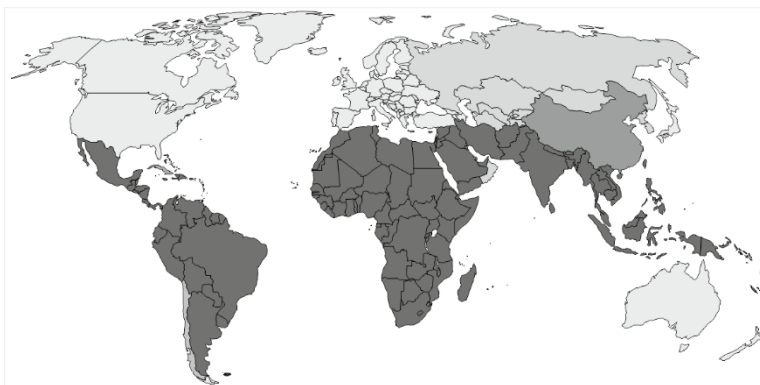
Améboza je onemocnění způsobené infekcí měňavkou úplavičnou (*Entamoeba histolytica*), která je parazitickým prvokem z říše Amoebozoa. Popsáno je nejméně sedm druhů střevních měňavek (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. hartmani*, *E. coli* a *E. polecki*) z nichž *E. histolytica* je nejvýznamnějším patogenem. *E. dispar* se pokládá za nepatogení. V poslední době se objevují zprávy o infekcích způsobených *E. moshkovskii*, patogenita *E. bangladeshi* je předmětem zkoumání. *E. histolytica* se vyskytuje celosvětově, nejčastěji v chudých rozvojových zemích s nízkým hygienickým standardem. Oblasti s vysokým výskytem měňavkových infekcí jsou soustředěny do tropického a subtropického pásma (Indie, Afrika, Mexiko a části centrální a Jižní Ameriky).

Jediným hostitelem *E. histolytica* je člověk. K nákaze dochází při požití cystami kontaminovaných potravin nebo vody. V tenkém střevě dojde k excystaci a uvolnění čtyř améb, které se rozdělí na osm améb. Tyto pokračují do tlustého střeva. Stádium trofozoita se vyskytuje ve dvou formách – minuta a magna. Forma minuta žije v lumen tlustého střeva, kde se živí bakteriemi, může encystovat do infekčních cyst vylučovaných stolicí, nebo se za určitých okolností může změnit v invazivní formu magna. Ta napadá buňky střevního epitelu, tvoří hluboké ulcerace charakteristického tvaru široké lahve s úzkým hrdlem. V lézi se živí tkáňovou drtí a erytrocyty. Odtud se může krevním řečištěm šířit do dalších orgánů jako jsou játra, plíce, mozek nebo slezina, kde vznikají druhotné léze.

*E. histolytica* způsobuje střevní amebózu (dysenterii) a za určitých okolností se může objevit závažná extraintestinální forma onemocnění. Inkubační doba je jeden až tři týdny. Většina amebóz je bezpříznaková, ve stolici hostitele jsou přítomny cysty. Nedyzenterická kolitida se projevuje mírnými příznaky jako je řídká stolice a přítomností trofozoitů formy minuta. Amébová kolitida či dysenterie se projevuje horečkou, bolestí břicha, ztrátou hmotnosti, těžkými průjmy, ve stolici je krev a hlen, přítomny jsou trofozoity formy magna. Poškození střevní stěny může způsobit nekrózu až perforaci střeva, hemoragii či amébovým napodobující nádor střeva. Neléčená kolitida může vést k úmrtí. Akutní infekce může přejít do chronické fáze charakteristické epizodami dysenterii s krví a hlenem ve stolici střídané zácpou. Nejčastější formou extraintestinální amébové infekce je jaterní absces. První příznaky se projevují během 8 až 20 týdnů od nákazy. Pacienti trpí bolestí v pravém podžebří, mají horečku. Další symptomy zahrnují kašel, ztrátu hmotnosti, nevolnost. Ruptura jaterního abscesu může vést k peritonitidě.

### 2.2.1 Socioekonomický kontext

Amebóza je celosvětově hlavním důvodem vážných průjemových onemocnění zejména u dětí žijících v nevyhovujících socioekonomických podmínkách (Obr. 4). Každoročně se nakazí miliony lidí a odhadem 55 000 lidí na nakaženou země. V rozvojových zemích je průměrně zodpovědný za 9 % úmrtí dětí do 5 let. (Shirley *et al.* 2018).



Obr. 4: Četnost rozšíření amebózy ve světě (schematicky dle Beyls 2011; tmavší šedá = vyšší výskyt)

### 2.2.2 Historie léčby

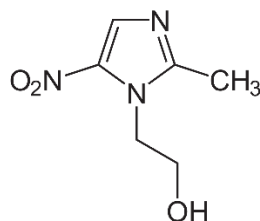
Jako první účinný lék na léčbu dysenterie byl v roce 1912 popsán emetin (Rogers 1912).

### 2.2.3 Aktuální léčba

Všechny amébové infekce včetně asymptomatických by měly být léčeny. Lékem první volby pro eliminaci invazních trofozoitů je metronidazol (Obr. 5) a jeho alternativy jako tinidazol. Metronidazol má více vedlejších účinků než tinidazol, ale je účinnější (Gonzales *et al.* 2009). Nežádoucí účinky metronidazolu zahrnují nevolnost, bolest hlavy, anorexii, kovovou chuť nebo periferní neuropatii. Terapie symptomatických pacientů zahrnuje vedle metronidazolu též látky působící na cysty jako je paromomycin případně diloxanid. Paromomycin může způsobit průjem, a proto se nepodává současně s metronidazolem. Při léčbě diloxanidem se může objevit nevolnost, průjem, ztráta chuti k jídlu nebo bolest žaludku.

### 2.2.3.1 Metronidazol

Metronidazol patří do skupiny 5-nitroimidazolů, který byl původně vyvinut pro léčbu trichomonázových infekcí. Později se zjistilo, že též účinkuje na další parazitické prvky jako je *E. histolytica* nebo *Giardia lamblia*.



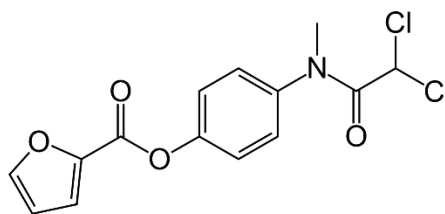
Obr. 5: Metronidazol – chemická struktura (podle Wikipedie)

Metronidazol je dnes využíván k léčbě široké palety parazitárních nebo bakteriálních onemocnění. Jeho efekt na infekci *E. histolytica* je znám již od roku 1966 (Powell *et al.* 1966). Mechanismus účinku této látky zahrnuje stejně jako u jiných nitroimidazolových chemoterapeutik nejprve redukci jeho nitroskupiny pomocí buněčných enzymů, u *E. histolytica* se jedná o thioredoxin reduktázu (EhTrx) (Leitsch *et al.* 2007). Redukovaný metronidazol je reaktivní a tvoří addukty s DNA (Ludlum *et al.* 1988), thioley a určitými buněčnými proteiny (např. superoxid dismutáza, purin nukleosid fosforyláza, thioredoxin, thioredoxin reduktáza) (Leitsch *et al.* 2007). Snížení množství volných thiolů (hlavně cysteinu, ale i thioredoxinu) v parazitovi zřejmě vede k vyšší citlivosti na oxidační stres (Fahey *et al.* 1984, Leitsch *et al.* 2007).

Rezistence *E. histolytica* na metronidazol nebyla v rámci klinické praxe objevena, během výzkumu se ovšem několika výzkumným skupinám podařilo ji indukovat v laboratorních podmínkách (Samarawickrema 1997, Wassman *et al.* 1999). U vzniklých rezistentních kmenů byla pozorována vyšší míra exprese genů spojených se zpracováním nukleotidů, redukcí thiolů a s odpovědí na oxidační stres (Wassmann *et al.* 1999, Leitsch *et al.* 2007).

### 2.2.3.2 Diloxanid

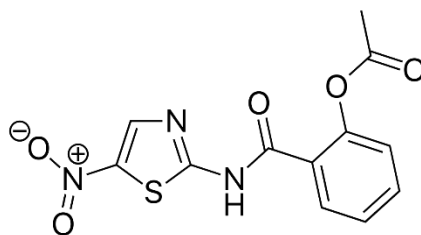
Diloxanid je derivát dichloracetamidu (Obr. 6). Aktivně působí na cysty *E. histolytica* a je používán jak k léčbě asymptomatických přenašečů, tak v kombinaci s metronidazolem u pacientů s aktivní formou nemoci. Diloxanid není účinný na extraintestinální formu amébozy, protože neúčinkuje mimo střevo. Jeho mechanismus účinku v rámci střeva není znám.



Obr. 6: Diloxanid – chemická struktura (podle Wikipedie)

### 2.2.3.3 Nitazoxanid

Nitazoxid (Obr. 7) je používán jako alternativa při léčbě amébozy. Po podání je nitazoxanid rychle metabolizován na tizoxanid a tizoxanid glukoronid (Adagu *et al.* 2002). Předpokládá se, že jeho mechanismus účinku v *E. histolytica* také pochází z redukce jeho nitroskupiny, ale mechanismů účinku může být více.



Obr. 7: Nitazoxanid – chemická struktura (podle Wikipedie)

## 2.3 Malárie

Malárie je jedno z nejdůležitějších parazitárních onemocnění na světě. Roční incidence výskytu malárie v posledních 20 letech oscilovala mezi dvěma až třemi sty miliony případů, v roce 2019 se pohybovala v rozpětí od 211 do 252 milionů případů a 409 tisíc obětí (WHO malaria report 2020). Jedná se o krví přenosnou nemoc, která se přenáší pomocí vektorů, samic komára rodu *Anopheles*, a je způsobena parazitickým prvokem *Plasmodium* ze skupiny Apicomplexa. Dnes je známo pět jeho druhů, které způsobují malárii u lidí: *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* a *P. vivax*. Původce malárie, prvok rodu *Plasmodium*, byl poprvé popsán v roce 1880 Charlesem Luisem Alfonsem Laveranem.

Příznaky onemocnění jsou v raných fázích nespecifické, podobné běžnému virovému onemocnění a s progresí nemoci se postupně zhoršují. Nedostane-li se nakaženému adekvátní léčby, končí nemoc zpravidla smrtí. Na začátku je pozorována únava, bolest hlavy, nevolnost, bolest svalů či kloubů, s postupem onemocnění přichází zimnice, horečka, pocení, zvracení a silná nevolnost spojená s nechutenstvím. Není-li podána léčba, tak choroba přechází z „nekomplikované“ do závažné fáze s těžkými symptomy a následně ke smrti nakaženého. Mezi symptomy závažné fáze patří koma, metabolická acidóza, anémie, hypoglykemie, selhání ledvin či otok plic (WHO guidelines for the treatment of malaria 2015).

Životní cyklus parazita je dvouhostitelský s tím, že definitivním hostitelem jsou zmíněné samice komára *Anopheles*. Cyklus probíhá tak, že sexuální stádia parazita (tzv. makro a mikrogamonti) jsou nasáta z meziphostitele, např. člověka. Ve střevě komára se transformují v mikro a makrogamety a splývají za vzniku zygoty (ookinety). Ta proniká stěnou střeva a usazuje se na jeho vnějším povrchu. Následně se ookinet mění na oocystu, která prodělává mnoho dělení za vzniku sporozoitů, infekčních stádií, která se usazují v slinných žlázách komára a čekají na vstříknutí do hostitele během sání.

Sporozoiti vpravení do hostitele zůstávají v krevním řečišti a pomocí něj se dostávají do jater, kde infikují hepatocyty, ve kterých probíhá masivní množení. Přibližně 10 – 12 dní po infekci hepatocytů dochází k jejich rozpadu a uvolnění merozoitů do krve. Ti infikují erythrocyty, kde podstupují asexuální reprodukční cyklus, který končí vznikem nových merozoitů a pohlavních gametozoitů. Merozoiti uvolnění z infikovaných erythrocytů napadají další erythrocyty. U druhů *P. ovale* a *P. vivax* dochází k opětovné reinfekci hepatocytů tzv. hypnozoity. Tento jev ztěžuje léčbu

nemoci, protože krevní stádia jsou průběžně doplňována. Pro léčbu malárie způsobené těmito druhy rodu *Plasmodium* se kromě standardních antimalarik používají také látky účinkující na hypnozoitní stádia.

Podobnost fyziologie parazita k té hostitele zmenšuje množství cílů, na které je možno chemoterapeutiky zacílit tak, aby byl efekt specifický pouze na parazita. Oproti lidským buňkám disponuje parazit dalšími vlastnostmi, které se staly častými cíli antimalarik.

Jednou z nejdůležitějších metabolických drah parazita z hlediska mechanismu účinku chemoterapeutik je určitě dráha detoxifikace hemu, zejména v krevních stádiích parazita. Hemoglobin se působením různých proteáz rozkládá uvnitř k tomuto účelu specializovaného membránového kompartmentu s acidickým prostředím, potravní vakuoly. Rozklad hemoglobinu je primární a pravděpodobně jedinou funkcí těchto organel (Goldberg *et al.* 1990). Během degradace hemoglobinu je uvolňována jeho prostetická skupina, hem, který je pro parazita toxický. Jeho detoxifikace funguje na bázi „skládání“, kdy je uvolněný hem oxidován na hematin, který je následně dimerizován do molekul beta hematinu v "head-to-tail" konformaci. Oba porfyrinové kruhy jsou drženy dohromady vazbami atomů železa jednoho kruhu na atom kyslíku z propionového vedlejšího řetězce druhého kruhu (Orjih *et al.* 1981, Slater *et al.* 1991, Pagola *et al.* 2000, Egan *et al.* 2002). Vzniklé dimery beta hematinu se následně uspořádávají do finálních krystalů hemozoinu, malarického barviva. Nukleace růstu krystalů hemozoinu je lokalizována na vnitřní stranu membrány potravní vakuoly, v jakém prostředí ale krystaly rostou je zatím nejasné (Kapishnikov *et al.* 2012a, Kapishnikov *et al.* 2012b).

Část vědecké obce předpokládá, že růst krystalů probíhá v lipidickém prostředí, například tak, že do krystalů hemozoinu obalených lipidovými nanosférami se rozpouští beta-hematin z vodného prostředí potravní vakuoly a následně se váže na již vzniklý krystal (Pisciotta *et al.* 2007, Vekilov *et al.* 2015). Jiná část předpokládá, že růst je facilitován proteiny. Klíčovým aktérem v tomto procesu je proteinový komplex HFC (hemozoin formation complex), který se podílí jak na degradaci endocytovaného hemoglobinu, tak na následném vzniku krystalů hemozoinu. Tento komplex se skládá z cysteinové proteázy falcipain 2, aspartátových proteáz plasmepsin II, IV a histo-aspartátové proteázy (HAP), a proteinu HDP (heme detoxification protein) (Chugh *et al.* 2013). Protein HDP se podílí na vzniku hemozoinu z proteázami uvolněných hemových jednotek (Jani *et al.* 2008). Kromě HFC se na formaci hemozoinu podílejí ještě proteiny bohaté na histidin (histidine rich proteins, HRP II a III) (Sullivan *et al.* 1996) a protein lipocalin (Matz *et al.* 2020).

Druhou významnou a odlišující vlastností je, že parazit je vybaven apikoplastem, organelou vzniklou sekundární endosymbiózou s červenou řasou (Gardner *et al.* 1991, Janouskovec *et al.* 2010). Během evolučního vývoje došlo k výrazné redukci jeho genomu a funkcí. V apikoplastu se přesto soustřeďuje několik významných metabolických drah, mezi kterými vyniká nemevalonátová dráha syntézy prenylových prekurzorů, která je jedinou esenciální dráhou v krevním stádiu parazita, kdy je onemocnění nejzávažnější a na které cílí téměř všechna antimalarika (Jomaa *et al.* 1999, Yeh *et al.* DeRisi 2011). Právě prokaryotický původ apikoplastu je důležitý, protože umožňuje zacílit na některé jeho procesy s jistotou, že se nenacházejí v eukaryotickém hostiteli, např. translace proteinů jiným typem ribozomů.



### 2.3.1 Socioekonomický kontext

Eradikace malárie je jedním z hlavních cílů lidstva mnoho desítek let. Aktuálně je malárie rozšířena na všech kontinentech s výjimkou Evropy, Antarktidy a Austrálie, rozdělení dopadu mezi kontinenty je ovšem velmi nerovnoměrné (Obr. 8).



Obr. 8: Četnost rozšíření malárie ve světě (schematicky dle Centres for Disease Control and Prevention (2020); tmavší šedá = vyšší výskyt)

Pouze 6 % všech nálezů připadá všem postiženým

kontinentům kromě Afriky. Zbýlých 94 % (215 milionů) identifikovaných případů pochází právě z Afrického kontinentu, zejména z Nigérie, Demokratické republiky Kongo, Ugandy, Mozambiku a Nigeru (WHO World Malaria Report 2020). První globální plán na eradikaci malárie byl vyhlášen WHO již v roce 1955 a soustředil se na likvidaci nakažených komárů plošným postřikem insekticidem DDT. Tímto způsobem se podařilo vymýtit endemická ložiska malárie v Evropě a Austrálii a významně snížit její výskyt v Indii. Současné strategie boje s malárií zahrnují jak výzkum, tak materiální pomoc zasaženým zemím, preventivní léčbu těhotných žen a efektivní identifikaci a léčbu nakažených v časných fázích nemoci. Kombinace účinných léků se používají v boji s rezistentními kmeny.

### 2.3.2 Historie léčby

První doklady o léčbě malárie pocházejí z Číny, kde se odvar z listů pelyňku *Artemisia annua* používají déle než tisíc let. Chinin se používá pro léčbu malárie od 17. století, nejprve jako výluh z kůry chinovníku (*Cinchona*), později v podobě čistého chininu. Chinin byl poprvé syntetizován v laboratoři v roce 1944. Mezi další prvotní léky použité při léčbě malárie patří Atebrin (Mepacrin, quinacrin) podávaný vojákům v 2. světové válce. V roce 1946 byl zaveden chlorochin, následován po válce ve Vietnamu meflochinem.

### 2.3.3 Aktuální léčba

V současnosti Světová zdravotnická organizace doporučuje, aby byla malárie léčena pomocí kombinované terapie artemisininovým derivátem a další partnerskou látkou (ACT, artemisinin combination therapy), se standardní délkou 3 dnů. Dnes je využíváno 5 různých ACT: artemether–lumefantrin, artesunát + amodiaquin, artenunát + meflochin, dihydroartemisinin + piperacuin, artesunát + sulfadoxin – pyrimethamin. Jejich dostupnost se různí mezi regiony. U malárie nezpůsobené *P. falciparum* může být ACT nahrazena chlorochinem za předpokladu, že původcem je *P. ovale*, *P. malariae* nebo *P. knowlesi*, případně *P. vivax* s tím, že v oblasti není na

nej rozšířená rezistence. Léčba závažné malárie zahrnuje alespoň 24hodinovou léčbu nitrožilním/nitrosvalovým artemisininovým derivátem (typicky artesunát), v případě jeho nedostupnosti je doporučeno využít chinin pomocí parenterálního podání. Po uplynutí doby a splnění podmínky, že pacient je opět schopen přijímat léky ústně, léčba pokračuje jako u nekomplikované formy nemoci (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015).

V oblastech s nižším rizikem nákazy nebo při léčbě malárie způsobené *P. ovale* nebo *P. vivax* je doporučeno podávat také primachin, který specificky účinkuje na pohlavní a hypnozoitní stádia (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015).

Díky rychlému nástupu účinku artemisininu a jeho derivátů dochází k rychlé redukci nálože parazita (10000násobně za 48 h). Partnerský lék naopak účinkuje déle a zajišťuje kompletní eliminaci parazita. Spojení dvou odlišných chemoterapeutik také zmenšuje pravděpodobnost nedokonalé eliminace parazita a možného vzniku rezistence (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition, 2015). V případě selhání terapie platí doporučení zkusit jiné ACT, na jehož komponenty není v daném regionu rezistence. Před nasazením léčby je důležité odhalit důvody selhání léčby, např. zdali se jedná o nedodržení dávkování léků pacientem („patient compliance“), rezistenci parazita na dané ACT, špatné dávkování nebo jednoduše další infekci (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition, 2015).

Kromě vlastní chemoterapie onemocnění se předepisují některá antimalarika v rámci profylaxe při cestách do regionů s rizikem nákazy nebo při prevenci nákazy v oblastech pouze se sezónním výskytem malárie. Mezi nejčastější patří: chlorochin, sulfadoxin-pyrimethamin, amodaiquin + sulfadoxin-pyrimethamin, meflochine, primachin (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition, 2015).

Níže popsané látky účinkují na všechny druhy rodu *Plasmodium*, pouze u *P. vivax* byla pozorována rezistence na chlorochin, všechny ostatní pozorované rezistence byly nalezeny pouze v *P. falciparum*.

### **2.3.3.1 Aminochinoliny**

Aminocholinová chemoterapeutika jsou si chemicky podobná, a proto jsou sdružena do jedné kapitoly. Možné mechanismy rezistence parazita na ně jsou probrány společně na konci kapitoly.

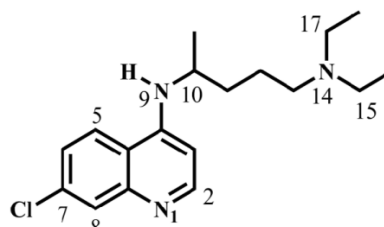
#### **2.3.3.1.1 Chlorochin**

Chlorochin (původně resorchin) je syntetický lék (Obr. 9) a byl objeven společně se sontochinem v roce 1934 Hansem Andersagem v laboratoři firmy Bayer při hledání náhražky chininu. Současný název léku pochází od amerických vědců, kteří upravili molekulu sontochinu a pojmenovali ji chlorochin. Později se zjistilo, že chlorochin a resochin jsou identické látky. K medicínským účelům se chlorochin začal používat až po druhé světové válce, kdy se stal hlavním lékem proti malárii.

Dnes se chlorochin využívá pro léčbu nekomplikované malárie způsobené všemi druhy kromě *P. falciparum* a může být použit k léčbě během těhotenství. Je indikován také jako profylaxe při cestách do míst, kde je hlavním původcem malárie *P. vivax*, opět i pro těhotné ženy. Chlorochin

je obecně dobře tolerovaný, kontraindikován je pouze pro lidi alergické na aminochinoliny. I přes dobrou toleranci byly zaznamenány vedlejší účinky, nejčastěji šlo o svědění, dále pak bolest hlavy, hepatitidu nebo zvýšené množství jaterních enzymů, poruchy zažívacího traktu a kožní léze. Dlouhodobé užívání je spojeno s myopatií a poruchami očí (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition, 2015).

Chlorochin se řadí do skupiny 4-aminochinolinů, z hlediska acidobazicity se jedná o slabou diprotickou bázi. Díky této vlastnosti a jinak relativně nepolárním uspořádání molekuly může v neutrální formě (bez náboje) procházet biologickými membránami. V cytoplazmě se vyskytuje v neutrální formě, naopak v potravních vakuolách parazita je kvůli nižšímu pH protonován a tedy „uvězněn“, protože v nabitě formě nemůže projít přes membránu potravní vakuoly (Homewood *et al.* 1972).



Obr. 9: Chlorochin – chemická struktura (podle Wikipedie)

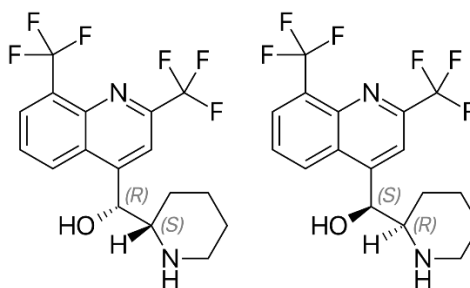
Po průniku do potravní vakuoly tvoří tyto z větší části ploché molekuly s hematinem komplexy (Cohen *et al.* 1964) pomocí nekovalentních  $\pi$ - $\pi$  interakcí (Moreau *et al.* 1985). Vzniklé komplexy hemu s aminoquinoliny se váží na krystal hemozoinu a inhibují tak jeho další růst (Sullivan *et al.* 1996). Dochází k nahromadění nedetoxifikovaného hemu v potravní vakuole parazita, což vede k oxidativnímu stresu a smrti parazita (Orjih *et al.* 1981). Chlorochin se váže na krystaly hemozoinu dvěma způsoby: vazba na konce jednotlivých řad hematinových dimerů v rámci vrstvy, což umožňuje další inkorporaci hematinových dimerů a na „hladké“ plochy nad vrstvami, čímž inhibují nukleaci dalších vrstev krystalu (Olafson *et al.* 2015).

Chlorochin také zřejmě ovlivňuje endocytózu hemoglobinu parazitem, konkrétně dopravu váčků endocytovaného hemoglobinu do potravní vakuoly (Hoppe *et al.* 2004; Roberts *et al.* 2008). Hemoglobin – chlorochinové komplexy brání také enzymatickému komplexu HFC (hemozoin formation complex) degradovat hemoglobin a syntetizovat hemozoin (Chugh *et al.* 2013).

#### 2.3.3.1.2 Meflochin

Meflochin je chininový analog (Obr. 10) a byl vyvinut ve Walter Reed Army Institute of Research v USA krátce po Vietnamské válce pro léčbu malárie způsobené kmeny *P. falciparum* rezistentními na dostupnou léčbu. Jeho výroba však byla drahá a další vývoj nepokračoval. WHO iniciovala vývoj levnější výroby ve spolupráci s firmou Hoffmann-la-Roche a sponzorovala klinické studie v Latinské Americe, Zambii a Thajsku. Výsledky klinických studií ukázaly účinek léku proti rezistentní *P. falciparum*. Lék byl poprvé schválen k užití ve Švýcarsku v roce 1984 pod názvem Lariam. V USA byl lék schválen v roce 1989.

Meflochin je dnes využíván k profylaxi, případně k léčbě nekomplikované malárie společně s artesunátem v rámci ACT. Užívání meflochinu přináší i nechtěné účinky, gastrointestinální potíže, nejčastěji jde o průjemy, nevolnost a bolest břicha. Léčba malárie meflochinem jako součásti ACT je ovšem dobře tolerována (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015). Užívání meflochinu jako



Obr. 10: Meflochin – chemická struktura (podle Wikipedie)

profylaxe je také spojeno s neurologickými vedlejšími účinky, jde o závratě, nespavost, úzkost, deprese, živé či zvláštní sny a problémy s viděním (Overbosch *et al.* 2001).

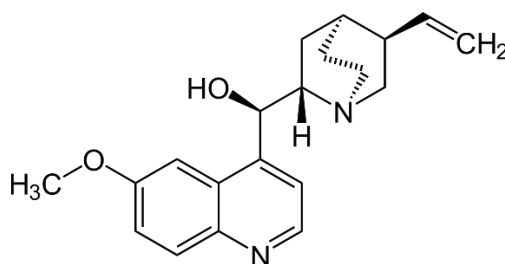
Mechanismus účinku meflochinu je širší než třeba chlorochinu. Podobně jako chlorochin potlačuje schopnost parazita endocytovat hostitelský hemoglobin a částečně také inhibuje detoxifikaci hemu (Famin *et al.* 2002, Roberts *et al.* 2008, Olafson *et al.* 2017). Detoxifikace hemu je také negativně ovlivněna vazbou komplexů chemoterapeutika a hemu na rostoucí krystaly hemozoinu, ovšem oproti chlorochinu se tyto komplexy váží pouze na konce rostoucích řad, což je nejméně efektivní způsob potlačení růstu krystalu (Olafson *et al.* 2017).

Výzkum z nedávné doby odhalil další místa působení meflochinu, konkrétně 60S velkou ribozomální podjednotku (Wong *et al.* 2017). V rámci velké ribozomální podjednotky se meflochin váže do oblasti nazvané GTPase associated centre a zastavuje translaci. Na jeho vazbě se podílí zejména aromatické jádro meflochinu a jeho trifluorované methylové vedlejší řetězce na C2 a C8 (Wong *et al.* 2017). Kromě inhibice translace byla pozorována také inhibice činnosti enzymu purin nukleosid fosforylázy (PfPNP), tj. enzymu štěpícímu N-glykosidickou vazbu v nukleosidech za souběžné fosforylace vzniklého cukru (Dziekan *et al.* 2019). Inhibice je zprostředkována vazbou do jeho aktivního místa pomocí interakcí s vedlejšími řetězci okolních aminokyselin a fosfátu, který se zde nachází. Do aktivního místa PfPNP se vázal pouze + enantiomer a inhibice je dosaženo až při vyšších koncentracích, což značí, že toto zřejmě není hlavní mechanismus účinku meflochinu (Dziekan *et al.* 2019).

### 2.3.3.1.3 Chinin

Objev chininu patří mezi zásadní medicínské objevy 17. století. Extrakt z kůry dřeviny chinovníku (*Cinchona*) původem z Jižní Ameriky se používal původními obyvateli k léčbě horečky, k léčbě malárie se používal od 16. století. Do Evropy (Španělska) byl dovezen již v roce 1636. Chinin (Obr. 11) byl poprvé izolován v roce 1820 a byl první chemickou látkou úspěšně použitou pro léčbu infekční choroby.

Chinin je doporučen pro léčbu závažné formy malárie za předpokladu, že nitrožilní nebo parenterální formy artemisininů nejsou dostupné, léčbu nekomplikované malárie v prvním trimestru těhotenství nebo když není dostupné ACT. Léčba chininem je spojena s častými vedlejšími účinky, které jsou označovány jako chinismus. Mírná forma chinismu se



Obr. 11: Chinin – chemická struktura (podle Wikipedie)

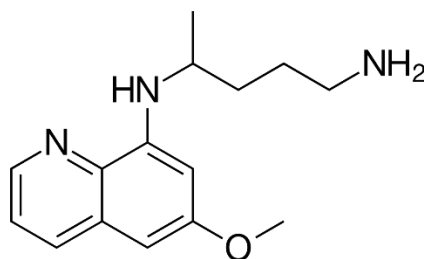
vyznačuje bolestmi hlavy, zvoněním v uších a možnou poruchou slyšení, nevolností, závratěmi, a ojediněle i rozmazaným viděním. Těžší forma chinismu se projevuje závratěmi, zvracením, bolestí břicha, průjmy, významnou poruchou sluchu, nebo dokonce oslepnutím. Kromě chinismu může při léčbě chininem docházet i k dalším vedlejším účinkům, např. nízké glykémii spojené s vysokou koncentrací inzulínu, tento vedlejší efekt je častější u malých dětí, těhotných žen nebo seniorů (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015).

Mechanismus účinku chininu je stále částečně zahalen tajemstvím, i když se jedná o jedno z nejdéle používaných antimalarik na světě. Dnes je známo, že chinin účinkuje na dráhu detoxifikace hemu (Olafson *et al.* 2017), endocytózu hemoglobinu (Roberts *et al.* 2008), replikaci DNA a dráhu zpracování nukleosidů (O'Brien *et al.* 1966) Inhibice detoxifikace hemu má obdobný mechanismus jako u chlorochinu, chinin se váže na konce rostoucích řad nebo na dokončené plochy a brání jejich dorůstání, respektive nukleaci (Olafson *et al.* 2017). Replikace DNA je inhibována přímou vazbou na ni, tato vazba je zprostředkována  $\pi$ - $\pi$  interakcemi mezi párem bazí v malém žlábků a chinolinovým kruhem (Punihale *et al.* 2018).

#### 2.3.3.1.4 Primachin

Tento 8-aminochinolin (Obr. 12) byl vyvinut v roce 1946, zejména za účelem ochránit americké vojáky při nasazení v tropických oblastech s výskytem malárie (Elderfield *et al.* 1946). Dnes se využívá k dosažení kompletní eliminace parazita při nákaze *P. ovale* nebo *P. vivax*, k eliminaci pohlavních stádií parazita (zejména v oblastech s nižší incidencí) či jako profylaxe (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015).

Primachin je relativně dobře tolerovaný lék u jedinců, kteří nevykazují deficienci enzymu glukózo-6-fosfát dehydrogenáza (G6PD), u jedinců s jeho deficiencí může docházet k hemolýze. Enzym oxiduje glukózo-6 fosfatáza redukce NADP<sup>+</sup> na NADPH + H<sup>+</sup> (Dern *et al.* 1954, Carson *et al.* 1956). Vzniklé redukční ekvivalenty slouží mimo jiné k udržování glutathionu v redukované formě a bránění tak



Obr. 12: Primachin – chemická struktura (podle Wikipedie)

oxidativnímu stresu (Carson *et al.* 1956). WHO doporučuje předepisovat primachin pacientům, kteří nemají tuto vadu, případně pacientům, kde výhoda vyléčení převáží potenciální riziko spojené s primachinem indikovanou hemolýzou (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015).

Mechanismus účinku primachinu byl dlouho neznámý, ovšem recentní studie z roku 2019 zjistila, že pravděpodobně obsahuje dvě důležité fáze. Podle autorů je primachin nejprve bioaktivován hydroxylací enzymem cytochrom P450 2D6 (CYP2D6). Tato hydroxylovaná forma primachinu je nestabilní a podléhá samovolné oxidaci do quinoneminové formy, během této reakce dochází také k tvorbě peroxidu vodíku. Quinoneminová forma je pak redukována zpět na hydroxylovou formu pomocí cytochrom P450 oxidoreduktázy, partnera CYP2D6. Donorem elektronů je NADPH. Vzniklý cyklus vede k tvorbě peroxidu vodíku, který je pro parazita letální (Camarda *et al.* 2019). Specificita účinku pouze na sporozoitní a gametozoitní stádia pravděpodobně vzniká lokalizací těchto stádií do buněk exprimujících CYP2D6 (Smalley *et al.* 1981, Treluyer *et al.* 1991, Joice *et al.* 2014, Alonso *et al.* 2015, Camarda *et al.* 2019). Rezistence na primachin není známa.

### **2.3.3.2 Rezistence parazita na aminochinoliny**

Aminochinolinová antimalarika mají velmi podobnou chemickou strukturu, není proto divu, že určité změny v parazitovi ovlivňují efektivitu vícero chemoterapeutik z této skupiny. Rezistence parazita na aminochinoliny je zprostředkovávána dvěma proteiny: *P. falciparum* chloroquine rezistance protein (PfCRT) a *P. falciparum* multidrug rezistance protein 1 (PfMDR1) (Foote *et al.* 1990, Fidock *et al.* 2000).

PfCRT je transmembránový transportní protein, který svojí funkcí přispívá k udržení homeostázy v potravní vakuole parazita tím, že z ní exportuje peptidy o délce mezi 4 až 11 aminokyselinami, které vznikly štěpením hostitelských proteinů (Fidock *et al.* 2000, Shafik *et al.* 2020). Export je poháněn protonovým gradientem a symportem s dalším, dosud neidentifikovaným substrátem. Mutace v PfCRT nesoucí rezistenci na chlorochin sice zvyšují jeho transport z potravní vakuoly, ale zmenšují jak míru, tak spektrum hostitelských peptidů, které může PfCRT z potravní vakuoly exportovat (Shafik *et al.* 2020). Mutace v PfCRT jsou primární determinantou senzitivity parazita na 4-aminochinolinová antimalarika, naopak na ostatní aminochinoliny nemají velký vliv (Fidock *et al.* 2000).

PfMDR1 je homolog lidského P-glykoproteinu 1 (P-gp 1), enzymologicky se jedná o ABC transportér, sídlící v membráně potravní vakuoly parazita (Foote *et al.* 1989, Cowman *et al.* 1991, Volkman *et al.* 1995). Enzym transportuje xenobiotika do potravní vakuoly (Rohrbach *et al.* 2006). Mutace a amplifikace genu *pfmdr1* jsou zřejmě determinantou senzitivity parazita na 8-aminochinoliny a aminoalkoholy (Wilson *et al.* 1989, Volkman *et al.* 1995).

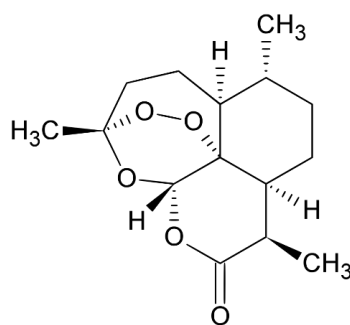
Oba transportéry se tedy nacházejí zejména na membráně potravní vakuoly ovšem s tím rozdílem, že transportují látky v opačném směru, PfCRT z a PfMDR1 do potravní vakuoly (Cowman *et al.* 1991, Fidock *et al.* 2000, Rohrbach *et al.* 2006, Shafik *et al.* 2020). Právě odlišnost směru transportu a odlišnost v cílech jednotlivých aminocholinů by mohly vysvětlit, proč je vliv

jednotlivých mutací na senzitivitu parazita na jednotlivá chinolinová antimalarika rozdílný. 4-aminochinoliny a chinin působí hlavně v potravní vakuole jako inhibitory detoxifikace hemu, takže je vhodné, aby se zde koncentrovaly, čemuž brání mutantní PfCRT, naopak mutantní PfMDR1 tomu částečně napomáhá jejich zvýšeným transportem do potravní vakuoly (Sullivan *et al.* 1996, Reed *et al.* 2000, Veiga *et al.* 2016). Ostatní chinolinová antimalarika (např. meflochin) sice také působí v potravní vakuole na detoxifikaci hemu, ale jejich hlavní cíl se zřejmě nachází mimo ni. Parazitě vystaveni těmto antimalarikům jsou pod selekčním tlakem na zmenšení jejich koncentrace v cytoplazmě, např. vyšším transportem do potravní vakuoly.

### 2.3.3.3 Artemisininy

Artemisinin (Obr. 13), v Číně pojmenovaný „Qinghaosu“, a jeho deriváty jsou dnes používány jako nejčastější léčebné látky první linie při léčbě malárie, protože tvoří jednu z komponent artemisininové kombinované terapie (artemisinin-based combination therapy, ACT) (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015). Látka se vyskytuje jako sekundární metabolit v rostlině *Artemisia annua*, podle které byla pojmenována. Znalost léčebných vlastností této látky ovšem pochází již ze staré Číny, kde se výluh z listů *A. annua* pil při horečnatých stavech (Klayman 1985). Antimalarické účinky artemisininů byly objeveny na začátku 80. let minulého století v rámci tajného vojenského projektu 523 v Čínské lidové republice, který měl za cíl objevit účinné léky na malárii, která silně postihovala čínské a severovietnamské vojáky během Vietnamské války. V rámci projektu byly testovány účinky různých látek z tradiční čínské medicíny při léčbě malárie (Klayman 1985). Za objev artemisininu obdržela v roce 2015 Tu Youyou, vedoucí projektu 523, Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (Su *et Miller* 2015).

Z chemického pohledu jsou artemisininy seskviterpenový lakton, jeho molekula obsahuje 1, 2, 4-trioxánový kruh, který je zodpovědný za jeho antimalarické účinky, v literatuře je často referováno o této skupině jako o endoperoxidech, protože mají uvnitř molekuly reaktivní endoperoxidovou skupinu (Obr. 13). Přímou artemisinin se dnes již nepoužívá, protože byl nahrazen pokročilejšími deriváty, které mají lepší vlastnosti, zejména v oblasti



Obr. 13: Artemisinin – chemická struktura (podle Wikipedie)

rozpuštěnosti. Těmito deriváty jsou: dihydroartemisinin, artesunát, artemether (Suputtamongkol, *et al.* 2002, WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015).

Oproti jiným antimalarickým přípravkům se artemisininy vyznačují svým rychlým nástupem účinku, ale také eliminací, svojí extrémně nízkou toxicitou a dobrou tolerancí (Klayman 1985, WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015). I tak se při léčbě artemisininem mohou vyskytnout vedlejší účinky, mezi nejzávažnější patří alergická reakce na něj a opožděná hemolýza, méně závažné pak jsou kašel, vyrážka, zmatenost, podráždění zažívacího traktu (WHO

guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015). I když jsou artemisininy známé téměř 50 let, tak jejich zřejmě hlavní mechanismus účinku byl pospán relativně nedávno, jeden z důvodů takto dlouhého čekání může být i fakt, že artemisininy působí na mnoho cílů uvnitř parazita.

Artemisininy vstupují do parazita běžnou difúzí přes biologické membrány (Gu *et al.* 1984, Pooley *et al.* 2010). Jejich vstup by mohl být v určitém smyslu poháněn tím, že v potravní vakuole parazita artemisininy ireverzibilně reagují s hemem nebo železnatými ionty, během reakce dochází k rozpadu vnitřní endoperoxidové funkce a vzniku radikálů (Gu *et al.* 1984, Posner *et al.* 1994, Cazelles *et al.* 2001, Klonis *et al.* 2011). Aktivovaný artemisinin alkyluje hem a další molekuly, zejména proteiny (Loup *et al.* 2007, Wang *et al.* 2015). Alkylovaný hem zůstává redoxně aktivní a není detoxifikován do inertního hemozoinu, samotný artemisinin se ale na rostoucí krystal neváže (Loup *et al.* 2007, Meunier *et al.* 2010, Olafson *et al.* 2017). Narušení detoxifikace hemu vede, podobně jako účinkem aminochinolinů, k oxidačnímu stresu a smrti parazita (Meunier *et al.* 2010). Alkylace proteinů parazita probíhá podobně jako alkylace hemu a zřejmě se jedná o naprosto náhodný proces (Jourdan *et al.* 2019), který navozuje fyziologickou odpověď na vyšší množství špatně složených proteinů (tzv. UPR, unfolded protein response), kdy parazit omezí translaci (Mok *et al.* 2014). Kromě proteinů jsou ovlivněny i proteasomy, což ještě dále umocňuje účinek na proteom parazita a v součtu znamená vyšší koncentraci polyubiquitinovaných proteinů, které jsou pro parazita zřejmě toxické (Mok *et al.* 2014, Bridgford *et al.* 2018).

Za specifický cíl artemisininů se považuje 3-fosfatidylinositol kináza (PfPI3K), enzym se nachází v membránách různých kompartmentů parazita a podílí se na správné funkci dopravy váčků a endocytóze hemoglobinu (Vaid *et al.* 2010). Studie z roku 2015 za pomoci počítačového modelování struktury PfPI3K navrhuje, že artemisininy se váží do aktivního místa tohoto enzymu a inhibují tak jeho funkci (Mbengue *et al.* 2015). Další studie ovšem nenašly podobnou specifitu (Wang *et al.* 2015, Hassett *et al.* 2017, Jourdan *et al.* 2019).

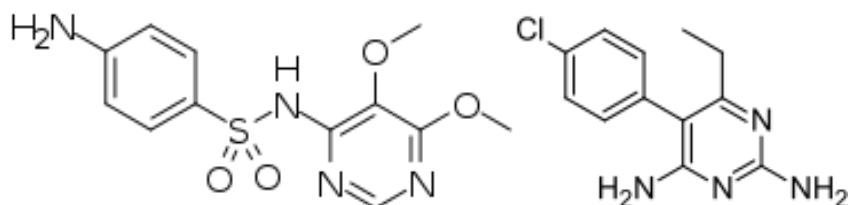
Rezistence parazita vůči artemisininům je dnes velmi důležité téma, protože artemisininy jsou hlavním lékem pro léčbu malárie, bohužel ani přes velké úsilí není mechanismus rezistence plně popsán. Polehčující okolností ovšem může být, že oproti rezistencím např. na antifoláty nebo aminochinoliny se jedná spíše jen o zvýšenou odolnost, kterou je možné překonat prodloužením doby užívání ACT (Wang *et al.* 2019). Dnes nejpravděpodobnější model rezistence předpokládá, že je způsobena silnou aktivací tzv. unfolded protein response, odpovědi na nesložené nebo špatně složené proteiny. V rámci této odpovědi dochází k omezení translace a upregulaci proteasomové degradační dráhy (Mok *et al.* 2014). Součástí degradační dráhy je i protein PfKelch13, který funguje jako adaptorový protein E3 ubiquitin ligázy a jehož mutace jsou spojeny s vyšší odolností parazita na artemisininy (Cheeseman *et al.* 2012, Ariey *et al.* 2014, Mbengue *et al.* 2015). Mutace v PfKelch13 zmenšovaly množství ubiquitinovaných proteinů (Dogovski *et al.* 2015), parazité s mutantními PfKelch13 endocytují menší množství hemoglobinu, což znamená méně volného hemu nutného k aktivaci artemisininů (Cazelles *et al.* 2001, Birnbaum *et al.* 2020). Parazité s mutantním PfKelch13 se vyvíjejí v erytrocytech pomaleji a zůstávají déle v raných stádiích,



které jsou vůči působení ACT odolnější (Mok *et al.* 2014, WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition 2015).

#### 2.3.3.4 Antifoláty

Antimalarika cílicí na metabolickou dráhu folátu parazita jsou známá již od první poloviny 20. století, kdy Hitchings *et al.* objevili, že 2,4-diaminopyrimidiny se chovají jako antagonisté pteroylglutamové kyseliny (dihydrofolát) (Hitchings *et al.* 1948). Pár let předtím byl také objeven efekt sulfonamidů, analogů para aminobenzoové kyseliny, na *P. falciparum* (Findlay *et al.* 1946) a později byl také zjištěn jejich synergický efekt při léčbě malárie. Velký boom využívání antifolátů (zejména kombinace sulfadoxinu a pyrimethaminu pod obchodním označením Fansidar®) (Obr. 14) nastal po rozšíření rezistence na chlorochin. K jejich útlumu došlo po nástupu artemisininů. Dnes se antifolátová antimalarika používají zejména ve spojení s artemisininy ve formě ACT, případně jako profylaxe při těhotenství a u malých dětí. Použití antifolátů není doporučeno u alergiků na jednu z partnerských látek, malým dětem do 2 měsíců věku a HIV pozitivním jedincům (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition, 2015).



Obr. 14: Sulfadoxin a pyrimethamin – chemická struktura (podle Wikipedie)

Mechanismus účinku obou látek vychází ze schopnosti parazita oproti lidskému hostiteli syntetizovat kyselinu listovou *de novo* (Ferone 1973). Obě látky jsou analogy substrátů enzymů v této dráze a inhibují svoje cílové proteiny kompetitivně (Horton-Smith *et Boyland* 1946, Hitchings *et al.* 1948). Výsledkem inhibice je nedostatek tetrahydrofolátu, který je esenciální pro přenos alkylů na jiné molukuly, například syntézu TMP z UMP nebo syntézu methioninu. Senzitivita parazita na inhibitory biosyntézy folátů je dána rozdílnou regulací translace genu *dhfr*, kdy lidská dihydrofolát reduktáza (DHFR) inhibuje svoji translaci vazbou své mRNA v případě, že nejsou přítomny její substráty či inhibitory (Ercikan-Abali *et al.* 1997). Kontrola translace u parazita probíhá podobně, ovšem s tím rozdílem, že místo na DHFR vázající vlastní mRNA je vzdálené od katalytického místa, takže obsazenost katalytického místa vazbu neovlivňuje (Zhang 2002). U partnerské látky, sulfadoxinu, je selektivita na parazita zaručená, protože lidé postrádají dihydropteroát syntázu (DHPS).

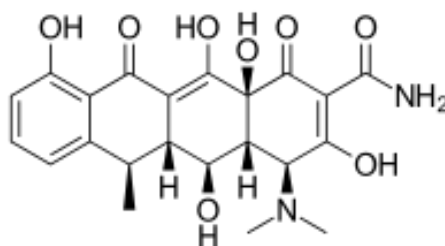
Rezistence na obě partnerské látky je zprostředkována aminokyselinovými změnami v primární struktuře DHFR nebo DHPS, které zmenšují afinitu jejich inhibitorů k nim, ale i amplifikací genu *gchl* kódujícího GTP cyklohydrolázu 1, i když u ní se dnes ukazuje, že je spíše kompenzační mutací k těm v primární struktuře DHFR (Peterson *et al.* 1988, Cowman *et al.* 1988, Cowman *et al.* 1994, Brooks *et al.* 1994, Kidgell *et al.* 2006, Sugaram *et al.* 2020). GTP cyklohydroláza 1 je první enzym biosyntetické dráhy folátu, její amplifikace vede k zvýšení množství substrátů pro

downstream enzymy této biosyntetické dráhy, což kompenzuje mutace v DHFR (Kidgell *et al.* 2006; Nair *et al.* 2008).

### 2.3.3.5 Doxycyklin

Doxycyklin je širokospektrální antibiotikum ze skupiny tetracyklinů (Obr. 15). Při léčbě malárie je využíván jako profylaxe na cestách do zemí s rizikem přenosu a může být použit společně s artemisininy nebo chininem k léčbě malárie. Dle Světové zdravotnické organizace je kvůli svým vedlejším účinkům doxycyklin při léčbě malárie kontraindikován u alergiků na tetracyklinová antibiotika, těhotných žen a dětí do 8 let věku. Mezi významné vedlejší účinky patří odbarvování zubů, hypoplazie skloviny a další interakce s vyvíjejícími se kostmi (WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition, 2015).

Mechanismus účinku se liší dle koncentrace, při nižší koncentraci (~ 1  $\mu\text{M}$ ) působí doxycyklin jako inhibitor translace apikoplastových genů. Tato inhibice nevede k rychlé eliminaci parazita, ale k tzv. „delayed death“ neboli oddálené smrti, kdy parazit projde ještě jedním celým vývojovým cyklem a jeho smrt přichází až v druhém cyklu (Dahl *et al.* 2006, Dahl *et Rosenthal* 2007).



Obr. 15: Doxycyklin – chemická struktura (podle Wikipedie)

Při vyšších koncentracích (~ 10  $\mu\text{M}$ ) dochází k chelataci kovů, hlavně železa, z apikoplastu, následkem tohoto procesu je porucha biogeneze apikoplastu a porucha syntézy prenylových prekurzorů, tento účinek se projevuje rychle (Okada *et al.* 2020). Jak přesně k chelataci dochází a které molekuly jsou ovlivněny zatím není známo.

Při nižších koncentracích působí doxycyklin jen jako inhibitor translace genů apikoplastu (Dahl *et al.* 2006). Inhibice translace vede k tomu, že biogeneze apikoplastu a import jaderných proteinů do apikoplastu jsou nefunkční, efekt se ovšem projevuje až v další generaci parazita (Dahl *et al.* 2006, Dahl *et Rosenthal* 2007). Další generace parazita nemají apikoplast a neprobíhá tak u nich *de novo* syntéza prenylových prekurzorů, jejich nedostatek znamená defekty vedoucí k smrti parazita v podobě špatné lokalizace proteinů v rámci buňky, maturace potravní vakuoly nebo příjmu hostitelského hemoglobinu (Kennedy *et al.* 2019). Rezistence parazita na doxycyklin není známa.

## 2.4 Trypanozomiázy

*Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodesiense* jsou zástupci endoparazitických bičíkatých prvoků z řádu Trypanosomatida. Jejich výskyt je vázán na subsaharskou Afriku, kde jsou původci africké spavé nemoci. V průběhu svého životního cyklu potřebují dva hostitele. Přenašečem a zároveň definitivním hostitelem, ve kterém probíhá pohlavní rozmnožování, je moucha tse-tse (*Glossina*). Hlavním hostitelem *T. b. gambiense* je člověk, ale napadána mohou být i domácí zvířata. Hlavním hostitelem *T. b. rhodesiense* je

dobytek a divoká zvířata. Do savčího těla se trypanozoma dostává sáním nakaženou mouchou tse-tse. Prvoci vstupují do lymfatického systému a odtud do krevního řečiště, kterým jsou v podobě krevních trypomastigotů roznášeni po těle do dalších tělních tekutin jako je lymfa nebo mozkomíšni mok. V tělních tekutinách probíhá binární nepohlavní dělení. Moucha tse-tse se infikuje při sání na nakaženém hostiteli jehož krev obsahuje trypomastigoty. Ve středním střevě mouchy se krevní trypomastigoti transformují na procyklické trypomastigoty a pokračují v binárním dělení. Po opuštění středního střeva se mění na epimastigoty, kteří pokračují v binárním dělení a migrují do slinných žláz. Zde probíhá pohlavní rozmnožování. Celý cyklus v mouše trvá asi tři týdny.

*T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense* jsou původci africké spavé nemoci, která je bez léčby smrtelná. Existují dvě varianty africké spavé nemoci, které se liší jak dobou trvání, tak způsobem přenosu na člověka. *T. b. gambiense* způsobuje chronickou formu nemoci, která se postupně po dobu několika let zhoršuje. Hlavním rezervoárem *T. b. gambiense* je člověk a k přenosu nemoci dochází z člověka na člověka přes mouchu tse-tse. Hlavní areál výskytu *T. b. gambiense* je západní a centrální Afrika. *T. b. rhodesiense* se vyskytuje hlavně ve východní Africe a jejími hlavními hostiteli jsou primárně divoká a domácí zvířata. Způsobuje akutní formu nemoci s dobou trvání od několika týdnů do několika měsíců. Identifikace skutečného původce spavé nemoci bylo možné až po Pasteurově objevu choroboplodných zárodků na konci 19. století. Role mouchy tse-tse v životním cyklu trypanozomy byla plně vysvětlena až Friedrichem Kleinem v roce 1909 (Kleine 1909).

Klinické příznaky spavé nemoci způsobené *T. b. gambiense* se objevují v období týdnů až měsíců po nakažení. Inkubační doba spavé nemoci způsobené *T. b. rhodesiense* bývá obvykle do tří týdnů. Nemoc má dvě fáze. V první fázi se trypanozomy nacházejí v krevním řečišti. Ve druhé fázi se dostávají přes hematoencefalickou bariéru do centrálního nervového systému. Krátce po bodnutí mouchou tse-tse se může v místě vpichu objevit bolestivá kožní léze, následuje zduření mizních uzlin, bolesti hlavy a kloubů, opakující se ataky horečky, malátnost a anémie. Ve druhé fázi, kdy se parazit dostane do mozkomíšního moku, je napaden nervový systém. Pacient má bolesti hlavy, třes, motorické potíže, nemůže se soustředit, dochází ke změnám osobnosti a poruchám spánku. Stav pacienta se postupně zhoršuje až ke komatu a smrti.

Další onemocnění způsobené parazitickými prvky rodu *Trypanosoma* je Chagasova choroba. Vyskytuje se ve Střední a Jižní Americe (Obr. 16) a jejím původcem je *Trypanosoma cruzi*. Při přenosu parazita hrají významnou roli ploštice z podčeledi Triatominae („kissing bug“).

Spolehlivou identifikaci choroby a parazita provedl Chagas před 1. světovou válkou, poznal i roli hmyzu. Skutečnost, že choroba není přenášena sáním, ale kontaminací rány hmyzími výměšky byla objevena až o desetiletí později. *T. cruzi* se také přenáší z matky na plod, transfúzí krve nebo transplantací a požitím

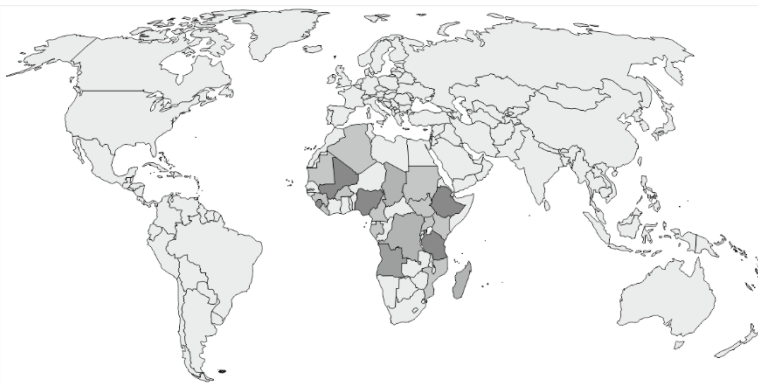


Obr. 16: Četnost rozšíření Chagasovy nemoci ve světě (schematicky dle WHO 2018 v Wikipedia 2021; tmavší šedá = vyšší výskyt)

nakažených potravin a vody. Infekce *T. cruzi* má akutní a chronickou fázi. První projevy se objevují jeden až dva týdny po nakažení. Akutní fáze je na počátku charakteristická přítomností infekce a otoku víček, otoku v místě vpichu a zvětšení mízních uzlin. Může se objevit horečka, bolesti břicha, zvětšení srdce, otoky nohou. Chronická fáze se objevuje 8 až 10 týdnů od nákazy a trvá mnoho let až celý život. Projevy zahrnují chronické změny na srdci a v trávicím systému. Při léčbě se používá benznidazol a nifurtimox.

### 2.4.1 Socioekonomický kontext

Výskyt africké spavé nemoci je soustředěný do 36 subsaharských zemích (Obr. 17), kde ohrožuje přibližně 70 milionů obyvatel, zejména v chudých agrárních oblastech (Kennedy 2019).



Obr. 17: Četnost rozšíření spavé nemoci ve světě (schematicky dle WHO 2004 v Wikipedia 2021; tmavší šedá = vyšší výskyt)

V roce 2012 byl WHO vyhlášen program na postupnou eliminaci a kontrolu choroby do roku 2020 a nulový přenos *T. b. gambiense* do roku 2030. V době vyhlášení programu zabírala plocha ohrožených území s vysokým až středním rizikem nákazy 709 000 km<sup>2</sup>. V posledním desetiletí se daří tuto plochu snižovat o přibližně 40 000 km<sup>2</sup> za rok s cílem 90 % redukce plochy ohrožených území do 2020. Počet případů spavé nemoci klesl od roku 2000 do roku 2018 o 96 % (*T. b. gambiense*) a 97 % (*T. b. rhodesiense*) (Franco *et al.* 2020) a program je na dobré cestě ke splnění svých cílů.

## 2.4.2 Historie léčby

V období 1896-1906 zemřelo při epidemii spavé nemoci v Africe 300-500 000 lidí. Tato epidemie iniciovala výzkum léků proti spavé nemoci. Od roku 1906 byla v tomto výzkumu zapojena farmaceutická firma Bayer, která testovala účinnost různých barviv a v roce 1917 se jí podařil přelomový objev v podobě germaninu. Látka byla později přejmenovaná na suramin a používá se dodnes při léčbě raných fází spavé nemoci způsobené *T. b. rhodesiense* (Steverding 2010). Souběžně probíhalo testování různých sloučenin arzenu a v roce 1949 byl na seznam léků proti spavé nemoci zapsán melarsoprol. Přes jeho významné nežádoucí se účinky se i tento lék stále používá při léčbě druhé fáze spavé nemoci způsobené *T. b. rhodesiense*. V 30. letech 20. století se objevily diamidiny, z nichž pentamidin se stále používá na léčbu první fáze nemoci způsobené *T. b. gambiense*. Mezi další léky zavedené ve 20. století patří derivát nitrofuranu nifurtimox (Obr. 20) a DFMO ( $\alpha$ -difluoromethylornithin) (Obr. 18), který byl v roce 1990 schválen jako lék proti spavé nemoci způsobené *T. b. gambiense* (Steverding 2010). Při léčbě Chagasovy choroby se používá benznidazol a nifurtimox. Z nejnovějších léků je nutno uvést fexinidazol (Obr. 19) schválený Evropskou medicínskou agenturou v roce 2018 pro léčbu spavé nemoci způsobenou *T. b. gambiense*.

## 2.4.3 Aktuální léčba

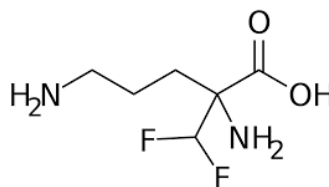
Postup doporučený Světovou zdravotnickou organizací při léčbě spavé nemoci způsobené *T. b. gambiense* se změnil s uvedením fexinidazolu na trh. Fexinidazol se podává orálně po dobu deseti dní a je první volbou u pacientů starších šesti let, kteří nevykazují závažné postižení centrálního nervového systému (CNS; první fáze nemoci). Výhodou je možnost ambulantní léčby. V případě selhání léčby fexinidazolem je nasazen buď pentamidin (první fáze nemoci) nebo kombinovaná terapie nifurtimox-eflornitinem (NECT; druhá fáze nemoci). Pacienti s podezřením na závažný průběh nemoci s postižením CNS jsou léčeni primárně NECT. Fexinidazol je volbou u pacientů s nízkou hladinou bílých krvinek. Kombinace NECT je vysoce účinná ve druhé fázi nemoci (účinnost je 95-98 % a mortalita méně než 1 %) a je též doporučená pro děti mladší šesti let. Léčba NECT vyžaduje hospitalizaci. Nifurtimox se podává orálně po dobu deseti dní, zatímco eflornitin se podává nitrožilně, infúzemi ve 12hodinových intervalech, po dobu sedmi dní. Léky druhé volby pro pacienty se závažným průběhem jsou monoterapie eflornitinem, pentamidin (intramuskulární injekce), fexinidazol a případně melarsoprol (intravenózní injekce). Kvůli svým závažným nežádoucím účinkům a 6 % mortalitě bývá melarsoprol nasazován až v případě selhání všech léčebných postupů (WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis 2019). Oproti nabídce léků na spavou nemoc způsobenou *T. b. gambiense* jsou možnosti léčby spavé nemoci způsobené *T. b. rhodesiense* velmi omezené. V první fázi se používá suramin (intravenózní injekce), případně pentamidin. Ve druhé fázi je jedinou možností melarsoprol (WHO 2013).

Při léčbě Chagasovy choroby se používají orálně podávané léky benznidazol a nifurtimox. Tyto léky jsou téměř 100 % účinné, pokud je léčba zahájena krátce po infekci. Léky jsou též

nasazovány při reaktivaci nemoci nebo na počátku chronické fáze. Podávají se nakaženým ženám v plodném věku jako prevence kongenitálního přenosu nemoci.

#### 2.4.3.1 Eflornitin ( $\alpha$ -difluoromethylornithin)

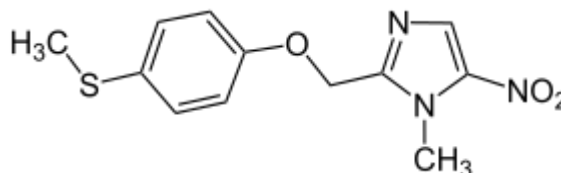
Eflornitin (Obr. 18) působí jako ireverzibilní inhibitor ornitin dekarboxylázy, která je prvním enzymem v dráze biosyntézy polyaminů (Metcalf *et al.* 1978). Eflornitin účinkuje sice na ornitin dekarboxylázu (ODC) jak u *T. b. rhodesiense*, tak u *T. b. gambiense*, ale úspěšnost terapie není stejná u nález oběma poddruhy *T. brucei* (Iten *et al.* 1997). Důvod rozdílné úspěšnosti léčby je rozdílný turnover ODC u obou poddruhů, u *T. b. gambiense* je ODC obnovována průměrně za 18 h, u *T. b. rhodesiense* pouze za 4-5 h (Phillips *et al.* 1987, Iten *et al.* 1997). Inhibice ornitin dekarboxylázy vede ke snížení koncentrace dihydrotrypanothionu (unikátního analogu glutathionu) (Fairlamb *et al.* 1987), polyaminů (putrescinu, spermidinu, sperminu) a S-adenosylmethioninu (Bacchi *et al.* 1983). Eflornitin se do buněk dostává aminokyselinovou permeázou TbAAT6, jejíž delece zároveň znamená rezistenci parazita na eflornitin. (Vincent *et al.* 2010).



Obr. 18: Eflornitin – chemická struktura (podle Wikipedie)

#### 2.4.3.2 Fexinidazol

Fexinidazol (Obr. 19) je aktuálně nejmodernější chemoterapeutikum určené k léčbě spavé nemoci. Kromě vysoké účinnosti je také řádově méně toxický než ostatní chemoterapeutika používaná k léčbě Chagasovy choroby nebo spavé nemoci způsobené oběma poddruhy *T.*



Obr. 19: Fexinidazol – chemická struktura (podle Wikipedie)

*brucei*. Další výhodou je, že je možné ho podávat orálně oproti třeba nitrožilní administraci eflornitinu. Nežádoucí účinky léčby fexinidazolem zahrnují zvracení, sníženou chuť k jídlu, nespavost, bolest hlavy, třes a závratě.

Kompletní mechanismus účinku fexinidazolu není znám. Předpokládá se, že po podání chemoterapeutika je sulfidová skupina fexinidazolu rapidně oxidována na sulfoxidovou nebo sulfonovou skupinu (Torreele *et al.* 2010). Trypanocidní účinek fexinidazolu a jeho metabolitů zřejmě pochází z jeho redukce nitroreduktázou podobným způsobem jako u jiných nitroimidazolů (Wilkinson *et al.* 2008, Sokolova *et al.* 2010, Bahia *et al.* 2014). Tento předpoklad podporuje i zjištění, že, stejně jako u nifurtimoxu je hlavní determinantou senzitivity parazita na fexinidazol přítomnost jeho specifické nitroreduktázy (Wilkinson *et al.* 2008, Sokolova *et al.* 2010, Wyllie *et al.* 2015).

### 2.4.3.3 Arsenové preparáty

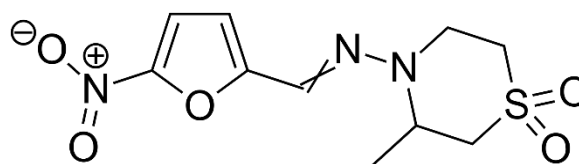
Arsenová chemoterapeutika jsou používána pro léčbu spavé nemoci téměř 200 let a působí na *T. brucei* spp. i *T. cruzi*, pro léčbu Chagasovy choroby se ovšem kvůli své toxicitě nevyužívají. Dnes využívaná arsenová chemoterapeutika sice nejsou již tak toxická jako ta původní, ale i tak mají závažné nežádoucí účinky a úmrtnost v důsledku léčby je až 6 %. Mezi dnes nejčastěji používané preparáty patří melarsopol pro *T. b. gambiense* po selhání první linie léčby (WHO Interim guidelines for the treatment of HAT 2019). Léčba melarsopolem může způsobit encefalopatický syndrom (horečka, křeče, neurologické potíže, koma), který u 10-70 % postižených pacientů končí smrtí.

I přes tak dlouhou dobu uplatnění v klinické praxi není mechanismus účinku arsenových chemoterapeutik přesně popsán. Dnes je známo, že do buněk vstupují pomocí membránových transportérů TbAT1 (*T. brucei* adenosine transporter 1, dříve popisovaný jako P2,) a TbAQP2 (*T. brucei* aquaporin 2, dříve popisovaný jako HAPT1) (Carter *et Fairlamb* 1993, Mäser 1999, de Koning 2001, Baker *et al.* 2012). TbAT1 je *T. brucei* specifický adenosinový přenašeč, a TbAQP2 je *T. brucei* specifický aquaporinový přenašeč, který díky specifické sekvenci ve vnitřní straně kanálu dokáže přenášet i arsenová chemoterapeutika (Baker *et al.* 2012). Efekt ztráty či poškození každého z přenašečů je z hlediska odolnosti na arsenová chemoterapeutika aditivní, ovšem ne stejný, protože většinu veškerých přenesených arsenových chemoterapeutik zprostředkovává TbAT1 a zbytek pak TbAQP2 (Graf *et al.* 2013). Oba tyto přenašeče jsou také zodpovědné za vstup pentamidinů, odlišné třídy chemoterapeutik, do parazita, poměr jejich působení je ovšem opačný (Mäser 1999, Baker *et al.* 2012, Graf *et al.* 2013).

Mechanismus účinku není dostatečně probádán, dnes se předpokládá, že po vstupu do parazita tvoří arsenová chemoterapeutika addukty s trypanothionem, druhově specifickým analogem glutathionu. Tyto addukty se nazývají Mel T a blokují trypanothion reduktázu (Fairlamb *et al.* 1989). Vedle inhibice redukce antioxidantních thiolů blokují také arsenová chemoterapeutika mitózu interferencí s některými z buněčných kináz (Thomas *et al.* 2018).

### 2.4.3.4 Nifurtimox

Nifurtimox je další z antiparazitik obsahující nitro skupinu (Obr. 20). Dnes je využíván na léčbu Chagasovy choroby a spavé nemoci (*T. b. gambiense*) v rámci kombinované terapie s eflornitinem. Mezi nejběžnější nežádoucí účinky patří bolest břicha a hlavy, nevolnost a zvracení. Léčba je dobře tolerována dětmi.



Obr. 20: Nifurtimox – chemická struktura (podle Wikipedie)

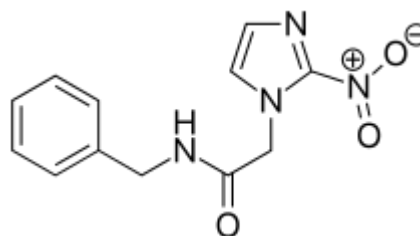
Nifurtimox je po vstupu do buněk aktivován parazitovou nitroreduktázou a postupně přeměněn na efektorovou reaktivní molekulu (Wilkinson *et al.* 2008, Hall *et al.* 2011). Aktivace probíhá přenosem dvou elektronů pomocí *T. cruzi* nitroreduktázy (TcNTR) za oxidace NADPH, který molekulu destabilizuje, což vede ke sledu reakcí za vzniku zpravidla reaktivních nenasyčených

otevřených nitrilů, které jsou cytotoxické, ale i méně reaktivních aminů (Hall *et al.* 2011). Nifurtimox nebo jeho metabolity také v parazitu ovlivňují membránový potenciál mitochondrií a import proteinu do mitochondrií (Thomas *et al.* 2018).

TcNTR je specifická mitochondriální nitroreduktáza nevykazující citlivost na přítomnost kyslíku a v genomu parazita je kódována ve dvou kopiích (Wilkinson *et al.* 2008). Právě její schopnost selektivně redukovat nifurtimox je důvodem vyšší citlivosti parazita na něj, a naopak ztráta jednoho z jejích dvou genů znamená násobný nárůst v odolnosti, ztráta obou genů vede k ještě vyšší odolnosti. Absence TcNTR ovšem znamená poruchy dělení parazita, TcNTR je zřejmě pro parazita esenciální a bez souběžných kompenzačních změn by se parazité bez ní neprosadili (Hall *et al.* 2011). Toxicita nifurtimoxu je pro lidské buňky nižší právě díky absenci TcNTR, dochází zde ovšem k produkci kyslíkových radikálů jiným metabolismem nifurtimoxu (Docampo *et al.* 2004, Hall *et al.* 2011).

#### 2.4.3.5 Benznidazol

Benznidazol náleží do skupiny 2-nitroimidazolů (Obr. 21). Mechanismus účinku se značně podobá tomu u nifurtimoxu, což ovšem není překvapující, protože obě chemoterapeutika jsou si dost podobná. Benznidazol je v parazitu aktivován specifickou nitroreduktázou (TcNTR) za vzniku nestabilního, reaktivního glyoxalu, který následně tvoří



Obr. 21: Benznidazol – chemická struktura (podle Wikipedie)

kovalentní addukty s dalšími molekulami (Hall *et al.* Wilkinson 2011). Nejčastěji jde o thiole (glutathion, trypanothion), protože jejich koncentrace se za působení benznidazolu významně snižuje a byly pozorovány kovalentní addukty právě s nimi (Maya *et al.* 1997, Hall *et al.* Wilkinson 2011, Trochine *et al.* 2014). Snižování koncentrace antioxidantních thiolů pravděpodobně činí parazita senzitivnější na oxidační stres.

Rezistence na benznidazol je ovlivněna přítomností unikátní nitroreduktázy (Wilkinson *et al.* 2008), jejíž absence snižovala citlivost parazita na benznidazol (Campos *et al.* 2014). Dále také byly objeveny MDR proteiny (multidrug resistance protein), které transportovaly benznidazol z parazita (Campos *et al.* 2013).

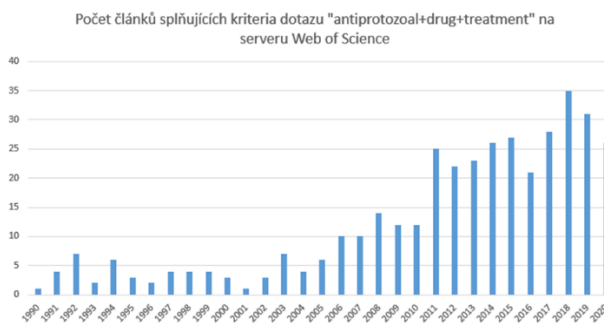


### 3 Diskuse a závěr

Člověka napadá kolem sedmdesáti druhů jednobuněčných parazitů. Mnoho z nich je relativně vzácných, přítomnost jiných je téměř bezpříznaková, ale napadení hrstkou z nich patří mezi nejzávažnější a nejrozšířenější onemocnění lidí. Onemocnění byla tedy pro tuto práci vybrána dle množství fatalit a incidence, výběr popsanych látek se řídil zejména seznamem hlavních léčiv doporučených Světovou zdravotnickou organizací na jedné straně a předepsaným rozsahem práce na straně druhé.

Globalizovaná společnost, klimatická změna, populační exploze v zemích tropického a subtropického podnebného pásu a migrační vlny jsou důvody rozplývání hranic mezi „běžnými“ a „tropickými“ či „exotickými“ chorobami. I to je důvod pro rostoucí zájem o tuto problematiku jak mezi badateli, tak u farmaceutických firem. Tuto skutečnost lze ilustrovat na příkladu bibliometrické analýzy odborných článků věnovaných vývoji léků na vybrané parazitární choroby, která ukazuje stoupající trend zájmu o tuto problematiku (Obr. 22).

Ačkoli významná část chorob diskutovaných v této práci může být eliminována pouhým nárůstem hygienických a životních standardů, který přinese ekonomický vzestup rozvojových zemí, přesto lze chemoterapii považovat za nejúčinnější metodu léčeni nemocí způsobených parazitickými prvky. Léčba může cílit na původce choroby, ale také se může soustřeďovat na odstraňování nežádoucích projevů choroby na zdraví a životní komfort pacienta.



Obr. 22: Graf znázorňující nárůst počtu publikací věnovaných chemoterapii parazitárních chorob způsobených prvky

První pokusy o léčeni těchto chorob jsou obvykle zakotveny v lidovém léčitelství založeném na kombinaci látek přírodního původu, především rostlinného, které nesou mnoha generacemi akumulovanou životní zkušenost boje s nemocí (např. výluh z kůry chinovníku, chinin pro léčbu malárie). „Koktejl“ molekul v tradičních léčebných přípravcích je v současné době obvyklým výchozím bodem, ze kterého vycházejí farmaceutické společnosti, když hledají nová účinná farmaka. S rostoucí dostupností různých analytických metod lze provést molekulární „inventuru“ přítomných substancí a následně provádět screening jejich účinnosti. Tímto způsobem lze identifikovat účinnou látku a jejímu detailnímu výzkumu dále věnovat soustředěnou pozornost. Identifikovaná účinná látka může následně posloužit jako „inspirace“ i pro hledání podobných či příbuzných molekul založených na chemické modifikaci molekuly výchozí. Tento proces v současnosti probíhá převážně v laboratořích – „in vitro“ – ve zkumavkách, ale současně lze pozorovat nástup i moderních metod „in silico“ – na křemíku mikročipů počítačů založených na simulacích sloučenin předpokládajících pouze platnost chemických a fyzikálních zákonů.

Simulacemi vytipované „kandidátské“ molekuly jsou pak syntetizovány a podrobeny dalšímu testování.

Jiným způsobem snížení nákladů na vývoj nových léků *de novo* a urychlení jejich uvedení do praxe je přístup zvaný „drug repurposing“ – opětovné použití léků. Vychází z předpokladu, že účinná látka musí splňovat dva předpoklady: být bezpečná pro člověka a potlačovat parazita. Pokud se aplikují ověřené látky používané pro léčbu jiných chorob, lze se v jejich zkoušení v principu omezit jen na studium účinnosti při potírání parazita. V některých případech se ukazuje, že některé takové látky (např. metronidazol) vykazují schopnost působit na tři i více parazitů současně (Andrews *et al.* 2014). Možnost takových „průniků“ naznačuje i souhrnná tabulka 1.

Samotný vývoj nového léku je stále nákladnější činnost, kterou si mohou dovolit pouze finančně silné společnosti. Objem počátečních investic vysvětluje následný zájem farmaceutických společností si udržet právní ochranu objevené látky co nejdéle i snahu potlačit po vypršení ochrany nástup generických léků obsahujících stejnou látku. Od dlouhé řady nadějných látek vede cesta k novému léku (jedné účinné látce) přes drastickou redukci „kandidátů“ v podmínkách laboratorního výzkumu, testů v preklinických fázích výzkumu až po etapu klinických studií. Náklady, které si takový výzkum vynutí, jsou důsledkem vysokých standardů výroby a striktních požadavků na účinnost a bezpečnost nového preparátu. Od nových léků se očekává, že budou účinnější, budou mít méně nežádoucích účinků než stávající léčiva a jejich podání bude pro pacienta přijatelnější. Dobrým příkladem je nově zavedený lék na léčbu spavé nemoci způsobenou *T. b. gambiense* fexinidazol. I přes zvyšující se zájem farmaceutických společností a vědecké komunity o vývoj nových léků na parazitární choroby se stále v praxi používají látky objevené v minulém století, které mají závažné nežádoucí účinky, protože nová, moderní léčiva stále chybí (např. melarsopol, který má mortalitu až 6 %, je jediný lék pro pacienty s těžkým průběhem spavé nemoci způsobenou *T. b. rhodesiense*).

V práci bylo na mnoha konkrétních příkladech ukázáno, že spolupráce parazitologa podrobně studujícího životní cyklus parazita, fyziologa hledajícího odlišnosti lidské fyziologie a fyziologie parazitického prvoka pro volbu selektivního účinku vybrané látky a v neposlední řadě chemika garantujícího přípravu či modifikaci vybrané látky v požadované čistotě je klíčovým předpokladem nalezení nového léku. Chemoterapie tedy představuje díky mezioborové opoře a zakotvení v poznacích chemie, biologie, fyziologie a lékařství nejúčinnější léčbu chorob působených parazitickými prvky.

Tab. 1: Souhrnná tabulka vybraných chorob způsobených jednobuněčnými prvky

Název choroby	Oblast výskytu	Parazit	Způsob přenosu	Závažnost choroby	Léčba
<b>Toxoplazmóza</b>	Celosvětově	<i>Toxoplasma gondii</i>	Kočkovité šelmy, domácí zvířata, kontaminovaná voda a potraviny	Vysoce rozšířená, až 50% světové populace nakaženo, obvykle asymptomatický průběh, hrozí poškození plodu u těhotných žen	antifoláty, klindamycin, atovaquon
<b>Améboza (měňavková úplavice, dyzentérie)</b>	Celosvětově	<i>Entamoeba histolytica</i>	Kontaminovaná voda a potraviny	Cca 500 miliónů lidí, 55 tis. úmrtí ročně	metrodiazol, diloxanid, nitazoxanid
<b>Malárie</b>	Převážně Afrika, tropické oblasti světa	<i>Plasmodium</i> spp.	Komáři rodu <i>Anopheles</i>	Stav 2019: Nakaženo 229 miliónů lidí, 409 tisíc úmrtí	aminocholiny, artemisininy, antifoláty, doxycyklin
<b>Spavá nemoc</b>	subsaharská Afrika	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> , <i>T. b. rhodesiense</i>	Moucha tse-tse ( <i>Glossina</i> )	70 mil. ohrožených, 11 tis. nemocných, 3 tis. mrtvých ročně	fexinidiazol, eflornitin, nifurtimox, benznidazol, melarsopol
<b>Chagasova nemoc</b>	Jižní Amerika (+migrace do rozvinutých zemí)	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Dravá ploštice z podčeledi Triatominae	6 mil. nemocných ročně, 8 tis. ročně zemře	nifurtimox, benznidazol

## 4 Literatura

Adagu, I. S., Nolder, D., Warhurst, D., C., Rossignol, J.-F., (2002). In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), 103–111.

Alonso S., Su M., Jones J. W., Ganguly S., Kane M. A., Jones R. J., Ghiaur G. (2015). Human bone marrow niche chemoprotection mediated by cytochrome P450 enzymes. *Oncotarget*, 6: 14905-14912.

Amberg-Johnson, K., Yeh, E. (2018). Host cell metabolism contributes to delayed-death kinetics of apicoplast inhibitors in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), e01646-18.

Andrews, K. T., Fisher, G., Skinner-Adams, T. S. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 4(2), 95-111.

Araujo, F. G., Huskinson, J., Remington, J. S. (1991). Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(2), 293–299.

Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M., Bout, D. M., Ménard, S., Rogers, W. O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J.-C., Fairhurst, R. M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O., Ménard, D. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505(7481), 50–55.

Aspinall, T. V., Joynson, D. H. M., Guy, E., Hyde, J. E., Sims, P. F. G. (2002). The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(11), 1637–1643.

Bacchi, C. J., Garofalo, J., Mockenhaupt, D., McCann, P. P., Diekema, K. A., Pegg, A. E., Nathan, H. C., Mullanez, E. A., Chunosoff, L., Sjoerdsma, A., Hutner, S. H. (1983). In vivo effects of  $\alpha$ -DL-difluoromethylornithine on the metabolism and morphology of *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 7(3), 209–225.

Bahia, M. T., Nascimento, A. F. S., Mazzeti, A. L., Marques, L. F., Gonçalves, K. R., Mota, L. W. R., Diniz, L. de F., Caldas, I. S., Talvani, A., Shackelford, M., Koltun, M., Saunders, J., White, K. J., Scandale, I., Charman, S. A., Chatelain, E. (2014). Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4362–4370.

Baker, N., Glover, L., Munday, J. C., Andrés, D. A., Barrett, M. P., de Koning, H. P., Horn, D. (2012). Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences Jul 2012*, 109 (27) 10996-11001.

Beys, N. (2011). Diagnostic sérologique de l'amibiase à *Entamoeba histolytica* : validation d'un nouveautest ELISA au CHU de Grenoble. *Sciences pharmaceutiques*.

Birnbaum, J., Scharf, S., Schmidt, S., Jonscher, E., Hoeijmakers, W. A. M., Flemming, S., Toenhake, C. G., Schmitt, M., Sabitzki, R., Bergmann, B., Frohke, U., Mesén-Ramírez, P., Blancke Soares, A., Herrmann, H., Bártfai, R., Spielmann, T. (2020). A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science*, 367(6473), 51–59.

Boillat, M., Hammoudi, P.-M., Dogga, S., K., Pagès, S., Goubran, M., (2020). Neuroinflammation-associated aspecific manipulation of mouse predator fear by *Toxoplasma gondii*. *Cell Reports*, 30, 320–334.

Bridgford, J. L., Xie, S. C., Cobbold, S. A., Pasaje, C. F. A., Herrmann, S., Yang, T., Gillett, D. L., Dick, L. R., Ralph, S. A., Dogovski, C., Spillman, N. J., Tilley, L. (2018). Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nature Communications*, 9(1), 3801.

Brooks, D. R., Wang, P., Read, M., Watkins, W. M., Sims, P. F. G., Hyde, J. E. (1994). Sequence variation of the hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European Journal of Biochemistry*, 224(2), 397–405.

Camarda, G., Jirawatcharadech, P., Priestley, R. S., Saif, A., March, S., Wong, M. H. L., Leung, S., Miller, A. B., Baker, D. A., Alano, P., Paine, M. J. I., Bhatia, S. N., O'Neill, P. M. O., Ward, S. A., Biagini, G. A.

- (2019). Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. *Nature Communications*, 10(1), 3226.
- Campos, M.C.O., Castro-Pinto, D.B., Ribeiro, G.A., Berredo-Pinho, M., Ferreira Gomes, L. H., da Silva Bellieny, M., S., Gulart, C., Echevarria, A., Leon, L. L. (2013). P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitology Research*, 112, 2341–2351.
- Campos, M. C. O., Leon, L. L., Taylor, M. C., Kelly, J. M. (2014). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(1), 17–19.
- Camps, M., Arrizabalaga, G., Boothroyd, J. (2002). An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, 43(5), 1309–1318.
- Carson, P. E., Flanagan, C. L., Ickes, C. E., Alving, A. S. (1956). Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes. *Science*, 124(3220), 484–485.
- Carter, N. S., Fairlamb, A. H. (1993). Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature*, 361(6408), 173–176.
- Cazelles, J., Robert, A., Meunier, B. (2001). Alkylation of heme by artemisinin, an antimalarial drug. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series IIC - Chemistry*, 4(2), 85–89.
- Centres for Disease Control and Prevention (2020). Where malaria occurs.
- Cohen, S. N., Phifer, K. O., Yielding, K. L. (1964). Complex formation between chloroquine and ferrihæmic acid in vitro and its effect on the antimalarial action of chloroquine. *Nature*, 202(4934), 805–806.
- Cowman, A. F., Galatis, D., Thompson, J. K. (1994). Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(3), 1143–1147.
- Cowman, A. F., Karcz, S., Galatis, D., Culvenor, J., G. (1991). A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *The Journal of Cell Biology*, 113(5), 1033–1042.
- Cowman, A. F., Morry, M. J., Biggs, B. A., Cross, G. A., Foote, S. J. (1988). Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolatereductase-thymidylatesynthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 9109–9113.
- Dahl, E. L., Rosenthal, P. J. (2007). Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3485–3490.
- Dahl, E. L., Shock, J. L., Shenai, B. R., Gut, J., DeRisi, J. L., Rosenthal, P. J. (2006). Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3124–3131.
- Dardé, M. L. (2008). *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite*, 3, 366–371.
- de Koning, H. P. (2001). Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Molecular Pharmacology*, 59(3), 586–592.
- Dern, R. J., Weinstein, I. M., Leroy, G. V., Talmage, D. W., Alving, A. S. (1954). The hemolytic effect of primaquine. I. The localization of the drug-induced hemolytic defect in primaquine-sensitive individuals. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 43(2), 303–309.
- Docampo, R., Mason, R., Mottley, C., Muniz, R. (2004). Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 256(21), 10930–10933.
- Dogovski, C., Xie, S. C., Burgio, G., Bridgford, J., Mok, S., McCaw, J. M., Chotivanich, K., Kenny, S., Gnadig, N., Straimer, J., Bozdech, Z., Fidock, D. A., Simpson, J. A., Dondorp, A. M., Foote, S., Klonis, N., Tilley, L. (2015). Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance. *PLOS Biology*, 13(4), e1002132.
- Doliwa, C., Xia, D., Escotte-Binet, S., Newsham, E. L., Sanya J., S., Aubert, D., Randle, N., Wastling, J. M., Villena, I. (2013). Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel electrophoresis (DIGE). *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, 35–44.

- Donald, R. G., Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11703–11707.
- Douthwaite, S. (1992). Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 20(18), 4717–4720.
- Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., Montoya, J. G. (2018). Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clinical Microbiology Review*, 31(4), e00057-17.
- Dziedan, J. M., Yu, H., Chen, D., Dai, L., Wirjanata, G., Larsson, A., Prabhu, N., Sobota, R. M., Bozdech, Z., Nordlund, P. (2019). Identifying purine nucleosidephosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay. *Science Translational Medicine*, 11(473), eaau3174.
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2):6406.
- Egan, T. J., Combrinck, J. M., Egan, J., Hearne, G. R., Marques, H. M., Ntenti, S., Sewell, B.T., Smith, P.J, Taylor, D., van Schalkwyk, D.A., Walden, J. C. (2002). Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Journal*, 365(2), 343–347.
- Elderfield, R. C., Gensler, W. J., Head, J. D., Hageman, H. A., Kremer, C. B., Wright, J. B., Birstein, O. (1946). Alkylaminoalkyl Derivatives of 8-Aminoquinoline. *Journal of the American Chemical Society*, 68(8), 1524–1529.
- Ercikan-Abali, E. A., Banerjee, D., Waltham, M. C., Skacel, N., Scotto, K. W., Bertino, J. R. (1997). Dihydrofolate reductase protein inhibits its own translation by binding to dihydrofolate reductase mRNA sequences within the coding region. *Biochemistry*, 36(40), 12317–12322.
- Eyles, D. E., Coleman, N. (1953). Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiotics and Chemotherapy*, 3, 483–490.
- Fahey, R., Newton, G., Arrick, B., Overdank-Bogart, T., Aley, S. (1984). *Entamoeba histolytica*: a eukaryote without glutathione metabolism. *Science*, 224(4644), 70–72.
- Fairlamb, A. H., Henderson, G. B., Bacchi, C. J., Cerami, A. (1987). In vivo effects of difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24(2), 185–191.
- Fairlamb, A. H., Henderson, G. B., Cerami, A. (1989). Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2607–2611.
- Famin, O., Ginsburg, H. (2002). Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*, 63(3), 393–398.
- Ferone, R. (1973). The enzymic synthesis of dihydropteroate and dihydrofolate by *Plasmodium berghei*. *The Journal of Protozoology*, 20(3), 459–459.
- Flegr, J., Havlíček, J., Kodým, P., Malý, M., Smahel, Z. (2002). Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 2, 11.
- Flegr, J., Hrdý, I. (1994). Influence of chronic toxoplasmosis on some human personality factors. *Folia Parasitologica*. 41(2), 122-126.
- Fidock, D. A., Nomura, T., Talley, A. K., Cooper, R. A., Dzekunov, S. M., Ferdig, M. T., Ursos, L. M., Sidhu, A. B., Naudé, B., Deitsch, K. W., Su, X. Z., Wootton, J. C., Roepe, P. D., Wellems, T. E. (2000). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6(4), 861–871.
- Findlay, G. M., Maegraith, B. G., Markson, J. L., Holden, J. R. (1946). Investigations in the chemotherapy of malaria in West Africa. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 40(3-4), 358–367.
- Foote, S. J., Kyle, D. E., Martin, R. K., Oduola, A. M. J., Forsyth, K., Kemp, D. J., Cowman, A. F. (1990). Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 345(6272), 255–258.

- Foote, S. J., Thompson, J. K., Cowman, A. F., Kemp, D. J. (1989). Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell*, 57(6), 921–930.
- Franco, J. R., Cecchi, G., Priotto, G., Paone, M., Diarra, A., Grout, L., Simarro, P. P., Zhao, W., Argaw, D. (2020). Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis at continental and country level: Update to 2018. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(5), e0008261.
- Fry, M., Pudney, M. (1992). Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochemical Pharmacology*, 43(7), 1545–1553.
- Gardner, M., Williamson, D., Wilson, R. (1991). A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44(1), 115–123.
- Goldberg, D. E., Slater, A. F., Cerami, A., Henderson, G. B. (1990). Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(8), 2931–2935.
- Gonzales ML, Dans LF, Martinez EG. (2009). Antiamoebic drugs for treating amoebic colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* (2):CD006085.
- Gonzalez, L. E., Rojnik, B., Urrea, F., Urdaneta, H., Petrosino, P., Colasante, C., Pino, S., Hernandez, L. (2007). *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats. *Behavioural Brain Research*, 177(1), 70–79.
- Graf, F. E., Ludin, P., Wenzler, T., Kaiser, M., Brun, R., Pyana, P. P., Büscher, P., de Koning, H. P., Horn, D., Mäser, P. (2013). Aquaporin 2 mutations in *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates correlate with decreased susceptibility to pentamidine and melarsoprol. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2475.
- Gu, H. M., Warhurst, D. C., Peters, W. (1984). Uptake of [3H] dihydroartemisinin by erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(2), 265–270.
- Hall, B. S., Bot, C., Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13088–13095.
- Hall, B. S., Wilkinson, S. R. (2011). Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 115–123.
- Hassett, M. R., Sternberg, A. R., Riegel, B. E., Thomas, C. J., Roepe, P. D. (2017). Heterologous expression, purification, and functional analysis of *Plasmodium falciparum* phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Biochemistry*, 56(33), 4335–4345.
- Hitchings, G. H., Elion, G. B., VanderWerff, H., and Falco, E. A. (1948). Pyrimidine derivatives as antagonists of pteroylglutamic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 174, 765-766.
- Homewood, C. A., Warhurst, D. C., Peters, W., Baggaley, V. C. (1972). Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature*, 235(5332), 50–52.
- Hoppe, H. C., van Schalkwyk, D. A., Wiehart, U. I. M., Meredith, S. A., Egan, J., Weber, B. W. (2004). Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2370–2378.
- Horton-Smith, C., Boyland, E. (1946). Sulphonamides in the treatment of caecal coccidiosis of chickens. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 1(2), 139–152.
- Houdek, P. (2017). Puppet master: Possible influence of the parasite *Toxoplasma gondii* on managers and employees. *Academy of Management Perspectives*, 31(1), 63–81.
- Cheeseman, I. H., Miller, B. A., Nair, S., Nkhoma, S., Tan, A., Tan, J. C., Al Saai, S., Phyo, A. P., Loo, C. L., Lwin, K. M., McGready, R., Ashley, E., Imwong, M., Stepniewska, K., Yi, P., Dondorp, A. M., Mayxay, M., Newton, P. N., White, N. J., Nosten, F., Ferdig, M. T., Anderson, T. J. C. (2012). A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science*, 336(6077), 79–82.
- Chugh, M., Sundararaman, V., Kumar, S., Reddy, V. S., Siddiqui, W. A., Stuart, K. D., Malhotra, P. (2013). Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), 5392–5397.

- Iten, M., Mett, H., Evans, A., Enyaru, J. C., Brun, R., Kaminsky, R. (1997). Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei rhodesiense* to D,L-alpha-difluoromethylornithine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(9), 1922–1925.
- Jani, D., Nagarkatti, R., Beatty, W., Angel, R., Slebodnick, C., Andersen, J., Kumar, S., Rathore, D. (2008). HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PloS Pathogens*, 4(4), e1000053.
- Janků, J. (1923). Pathogenesa a patologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu žluté skvrny v oku normálně velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitů v sítnici. *Časopis Lékařů Českých*, 62, 1021–1027, 1054–1059, 1081–1085, 1111–1115, 1138–1143.
- Janouskovec, J., Horak, A., Obornik, M., Lukes, J., Keeling, P. J. (2010). A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 10949–10954.
- Johnson, H. J., Koshy, A. A. (2020). Latent toxoplasmosis effects on rodents and humans: How much is real and how much is media hype? *mBio*, 11(2). e02164.
- Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K. B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K. C., Duraisingh, M. T., Taylor, T. E., Milner, D. A., Marti, M. (2014). *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science Translational Medicine*, 6(244), 244re5
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemayer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, J., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., Beck, E. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 285(5433), 1573–1576.
- Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K., Wilson, M. (2007). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3)suppl, 405-410.
- Jourdan, J., Walz, A., Matile, H., Schmidt, A., Wu, J., Wang, X., Dong, Y., Vennerstrom, J. L., Schmidt, R. S., Wittlin, S., Mäser, P. (2019). Stochastic protein alkylation by antimalarial peroxides. *ACS Infectious Diseases*. 5(12), 2067-2075.
- Kapishnikov, S., Berthing, T., Hviid, L., Dierolf, M., Menzel, A., Pfeiffer, F., Als-Nielsen, J., Leiserowitz, L. (2012b). Aligned hemozoin crystals in curved clusters in malarial red blood cells revealed by nanoprobe X-ray Fe fluorescence and diffraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11184–11187.
- Kapishnikov, S., Weiner, A., Shimoni, E., Guttmann, P., Schneider, G., Dahan-Pasternak, N., Dzikowski, R., Leiserowitz, L., Elbaum, M. (2012a). Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11188–11193.
- Kennedy, P.G.E. (2019). Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Journal of Neurology*, 266, 2334-2337.
- Kennedy, K., Crisafulli, E. M., Ralph, S. A. (2019). Delayed Death by Plastid Inhibition in Apicomplexan Parasites. *Trends in Parasitology*, 35(10), 747-759.
- Kessler, J. J., Ha, K. H., Merritt, A. K., Meshnick, S. R., Trumppower, B. L. (2006). Molecular basis of *Toxoplasma gondii* atovaquone resistance modeled in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146(2), 255–258.
- Kessler, J. J., Lange, B. B., Merbitz-Zahradnik, T., Zwicker, K., Hill, P., Meunier, B., Pálsdóttir, H., Hunte, C., Meshnick, S., Trumppower, B. L. (2003). Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc1 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31312–31318.
- Kidgell, C., Volkman, S. K., Daily, J., Borevitz, J. O., Plouffe, D., Zhou, Y., Johnson, J. R., Le Roch, K., Sarr, O., Ndir, O., Mboup, S., Batalov, S., Wirth, D. F., Winzeler, E. A. (2006). A systematic map of genetic variation in *Plasmodium falciparum*. *PloS Pathogens*, 2(6), e57.
- Klayman, D. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228(4703), 1049–1055.



- Kleine, F. K. (1909). Positiv Infektionversuche mit *Trypanosoma brucei* durch *Glossina palpalis*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 35, 469–470.
- Klonis, N., Crespo-Ortiz, M. P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P. J., Tilley, L. (2011). Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(28), 11405–11410.
- Kovacs, J. A., Allegra, C. J., Beaver, J., Boarman, D., Lewis, M., Parrillo, J. E., Chabner, B., Masur, H. (1989). Characterization of de novo folate synthesis in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*: potential for screening therapeutic agents. Journal of Infectious Diseases, 160(2), 312–320.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Wilson, I. B. H., Altmann, F., Duchêne, M. (2007). Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: A central role for thioredoxin reductase. PLoS Biology, 5(8), e211.
- Li, Z.-H., Ramakrishnan, S., Striepen, B., Moreno, S. N. J. (2013). *Toxoplasma gondii* relies on both host and parasite isoprenoids and can be rendered sensitive to atorvastatin. PLoS Pathogens, 9(10), e1003665.
- Loup, C., Lelievre, J., Benoit-Vical, F., Meunier, B. (2007). Trioxaquines and heme-artemisinin adducts inhibit the in vitro formation of hemozoin better than chloroquine. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(10), 3768–3770.
- Lozano, R., *et al.*, (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 380(9859):2095-128.
- Ludlum, D. B., Colinas, R. J., Kirk, M. C., Mehta, J. R. (1988). Reaction of reduced metronidazole with guanosine to form an unstable adduct. Carcinogenesis, 9(4), 593–596.
- Mäser, P. (1999). A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. Science, 285(5425), 242–244.
- Matz, J. M., Drepper, B., Blum, T. B., van Genderen, E., Burrell, A., Martin, P., Stach, T., Collinson, L., Abrahams, J. P., Matuschewski, K., Blackman, M. J. (2020). A lipocalin mediates unidirectional heme biomineralization in malaria parasites. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(28), 16546-16556.
- Maya, J. D., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J. M., Tellez, R., Gaule, C., Morello, A. (1997). Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology, 86(1), 101-106.
- Mazumdar, J., H. Wilson, E., Masek, K., A. Hunter, C., Striepen, B. (2006). Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(35), 13192–13197.
- Mbengue, A., Bhattacharjee, S., Pandharkar, T., Liu, H., Estiu, G., Stahelin, R. V., Riyk, S. S., Njimoh, D. L., Ryan, Y., Chotivanich, K., Nguon, C., Ghorbal, M., Lopez-Rubio, J.-J., Pfrender, M., Emrich, S., Mohandas, N., Dondorp, A. M., Wiest, O., Haldar, K. (2015). A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. Nature, 520(7549), 683–687.
- McFadden, D. C., Tomavo, S., Berry, E. A., Boothroyd, J. C. (2000). Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Qo domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. Molecular and Biochemical Parasitology, 108(1), 1–12.
- McMaster, P. R. B., Powers, K. G., Finerty, J. F., Lunde, M. N. (1973). The effect of two chlorinated licomycin analogues against acute toxoplasmosis in mice. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 22(1), 14-17.
- Meneceur, P., Bouldouyre, M. A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., Garin, J. F., Derouin, F. (2008). In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(4), 1269-77.
- Meunier B, Robert A. (2010). Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. Accounts of Chemical Research, 43(11), 1444-51.
- Metcalf, B. W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. J., Casara, P., Vevvert, J. P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs. Journal of the American Chemical Society, 100(8), 2551–2553.

- Mok, S., Ashley, E. A., Ferreira, P. E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., Chotivanich, K., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Dhorda, M., Nguon, C., Lim, P., Amaratunga, C., Suon, S., Hien, T. T., Htut, Y., Faiz, M. A., Onyamboko, M. A., Mayxay, M., Newton, P. N., Tripura, R., Woodrow, C. J., Miotto, O., Kwiatkowski, D. P., Nosten, F., Day, N. P. J., Preiser, P. R., White, N. J., Dondorp, A. M., Fairhurst, R. M., Bozdech, Z. (2014). Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*, 347(6220), 431–435.
- Moreau, S., Perly, B., Chachaty, C., Deleuze, C. (1985). A nuclear magnetic resonance study of the interactions of antimalarial drugs with porphyrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 840(1), 107–116.
- Nair, S. C., Brooks, C. F., Goodman, C. D., Strurm, A., McFadden, G. I., Sundriyal, S., Anglin, J.-L., Song, Y., Moreno, S. N. J., Striepen, B. (2011). Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1547–1559.
- Nair, S., Miller, B., Barends, M., Jaidee, A., Patel, J., Mayxay, M., Newton, P., Nosten, F., Ferdig, M. T., Anderson, T. J. (2008). Adaptive copy number evolution in malaria parasites. *PLoS Genet.*, 10, e1000243.
- O'Brien, R. L., Olenick, J. G., Hahn, F. E. (1966). Reactions of quinine, chloroquine, and quinacrine with DNA and their effects on the DNA and RNA polymerase reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(6), 1511–1517.
- Okada, M., Guo, P., Nalder, S.-A., Sigala, P. A. (2020). Doxycycline has distinct apicoplast-specific mechanism of antimalarial activity. *Elife*, 9, e60246.
- Olafson, K. N., Ketchum, M. A., Rimer, J. D., Vekilov, P. G. (2015). Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(16), 4946–4951.
- Olafson, K. N., Nguyen, T. Q., Rimer, J. D., Vekilov, P. G. (2017). Antimalarials inhibit hematin crystallization by unique drug–surface site interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), 7531–7536.
- Orjih, A.U., Banyal, H.S. Chevli, R. and Fitch, C.D. (1981). Hemin lyses malaria parasites. *Science* 214, 667- 669.
- Overbosch, D., Schilthuis, H., Bienzle, U., Behrens, R. H., Kain, K. C., Clarke, P. D., Toovey, S., Knobloch, J., Nothdurft, H. D., Shaw, D., Roskell, N. S., Chulay, J.D., Malarone International Study Team (2001). Atovaquone-proguanil versus mefloquine for malaria prophylaxis in nonimmune travelers: results from a randomized, double-blind study. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 1015–1021.
- Pagola, S., Stephens, P. W., Bohle, D. S., Kosar, A. D., Madsen, S. K. (2000). The structure of malaria pigment  $\beta$ -haematin. *Nature*, 404(6775), 307–310.
- Pappas, G., Roussos, N., Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal of Parasitology*, 39(12), 1385-1394.
- Peterson, D. S., Walliker, D., Wellems, T. E. (1988). Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 9114–9118.
- Phillips, M. A., Coffino, P., Wang, C. C. (1987). Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from *Trypanosoma brucei*. Implications for enzyme turnover and selective difluoromethylornithine inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 262(18), 8721-8727.
- Pisciotta, J. M., Coppens, I., Tripathi, A. K., Scholl, P. F., Shuman, J., Bajad, S., Shualev, V., Sullivan, Jr. D. J. (2007). The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *Biochemical Journal*, 402(1), 197–204.
- Pittman, K. J., Aliota, M. T., Knoll, L. J. (2014). Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. *BMC Genomics*, 15(1), 806.

- Pooley, S., Fatih, F. A., Krishna, S., Gerisch, M., Haynes, R. K., Wong, H.-N., Staines, H. M. (2010). Artemisone uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 550–556.
- Posner, G. H., Oh, C. H., Wang, D., Gerena, L., Milhous, W. K., Meshnick, S. R., Asawamahasadka, W. (1994). Mechanism-based design, synthesis, and in vitro antimalarial testing of new 4-methylated trioxanes structurally related to artemisinin: the importance of a carbon-centered radical for antimalarial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(9), 1256–1258.
- Powell SJ, MacLeod I, Wilmot AJ, Elsdon-Dew R. (1966). Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. *Lancet*, 2(7477), 1329–1231.
- Prandovszky, E., Gaskell, E., Martin, H., Dubey, J. P., Webster, J. P., McConkey, G. A. (2011). The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PLoS ONE*, 6(9), e23866.
- Punihaole, D., Workman, R. J., Upadhyay, S., Van Bruggen, C., Schmitz, A. J., Reineke, T. M., Frontiera, R. R. (2018). New insights into quinine–DNA binding using raman spectroscopy and molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(43), 9840–9851.
- Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K., Cowman, A. F. (2000). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 403(6772), 906–909.
- Roberts, L., Egan, T. J., Joiner, K. A., Hoppe, H. C. (2008). Differential effects of quinoline antimalarials on endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1840–1842.
- Rogers, L. (1912). The rapid cure of amoebic dysentery and hepatitis by hypodermic injection of soluble salts of emetine. *British Medical Journal*, 1, 1424.
- Rohrbach, P., Sanchez, C. P., Hayton, K., Friedrich, O., Patel, J., Sidhu, A. B. S., Ferdig, M. T., Fidock, D. A., Lanzer, M. (2006). Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. *The EMBO Journal*, 25(13), 3000–3011.
- Sabin, A. B., Warren, J. (1942). Therapeutic effectiveness of certain sulfonamides on infection by an intracellular protozoon (*Toxoplasma*). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 51, 19–23.
- Samarawickrema, N. (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(6), 833–840.
- Shafik, S. H., Cobbold, S. A., Barkat, K., Richards, S. N., Lancaster, N. S., Llinás, M., Hogg, S. J., Summers, R. L., McConville, M. J., Martin, R. E. (2020). The natural function of the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Nature Communications*, 11(1), 3922.
- Shirley, Debbie-Ann T (2018). A Review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. *Open forum infectious diseases* vol. 5,7.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413, 6858.
- Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A., Henderson, G. B. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(2), 325–329.
- Smalley, M. E., Abdalla, S., Brown, J. (1981). The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(1), 103–105.
- Sokolova, A. Y., Wyllie, S., Patterson, S., Oza, S. L., Read, K. D., Fairlamb, A. H. (2010). Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 2893–2900.
- Steverding, D. (2010). The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasit Vector*, 3, 15.
- Su, X.-Z., Miller, L. H. (2015). The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science China Life Sciences*, 58(11), 1175–1179.

- Sugaram, R., Suwannasin, K., Kunasol, C., Mathema, V. B., Day, N. P. J., Sudathip, P., Imwong, M. (2020). Molecular characterization of *Plasmodium falciparum* antifolate resistance markers in Thailand between 2008 and 2016. *Malaria Journal*, 19(1).
- Sugden, K., Moffitt, T. E., Pinto, L., Poulton, R., Williams, B. S., Caspi, A. (2016). Is *Toxoplasma gondii* infection related to brain and behavior impairments in humans? Evidence from a population-representative birth cohort. *PLOS ONE*, 11(2), e0148435.
- Sullivan, D. J., Gluzman, I. Y., Goldberg, D. E. (1996). Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science*, 271(5246), 219–222.
- Suputtamongkol, Y., Newton, P. N., Angus, B., Teja-Isavadharm, P., Keeratithakul, D., Rasameesoraj, M., Pukrittayakamee, S., White, N. J. (2002). A comparison of oral artesunate and artemether antimalarial bioactivities in acute falciparum malaria. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52(6), 655–661.
- Sutterland, A. L., Fond, G., Kuin, A., Koeter, M. W. J., Lutter, R., van Gool, T., Yolken, R., Szoke, A., Lebozer, M., de Haan, L. (2015). Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 132(3), 161–179.
- Tanaka, S., Nishimura, M., Ihara, F., Yamagishi, J., Suzuki, Y., Nishikawa, Y. (2013). Transcriptome analysis of mouse brain infected with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 81(10), 3609–3619.
- Thomas, J. A., Baker, N., Hutchinson, S., Dominicus, C., Trenaman, A., Glover, L., Alsford, S., Horn, D. (2018). Insights into antitrypanosomal drug mode-of-action from cytology-based profiling. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(11), e0006980.
- Torrele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M. A., Pécou, B. (2010). Fexinidazole – A new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e923.
- Treluyer, J.-M., Jacoz-Aigrain, E., Alvarez, F., Cresteil, T. (1991). Expression of CYP2D6 in developing human liver. *European Journal of Biochemistry*, 202(2), 583–588.
- Trochine, A., Creek, D. J., Faral-Tello, P., Barrett, M. P., Robello, C. (2014) Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(5): e2844.
- Vaid, A., Ranjan, R., Smythe, W. A., Hoppe, H. C., Sharma, P. (2010). PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood*, 115(12), 2500–2507.
- Veiga, M. I., Dhingra, S. K., Henrich, P. P., Straimer, J., Gnädig, N., Uhlemann, A.-C., Martin, R. E., Lehane, A. M., Fidock, D. A. (2016). Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nature Communications*, 7, 11553.
- Vekilov, P. G., Rimer, J. D., Olafson, K. M., Ketchum, M. A. (2015). Lipid or aqueous medium for hemozoin crystallization? *CrystEngComm*, 17(41), 7790–7800.
- Vincent, I. M., Creek, D., Watson, D. G., Kamleh, M. A., Woods, D. J., Wong, P. E., Burchmore, R. J., Barrett, M. P. (2010). A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes. *PLoS Pathogens*, 6(11), e1001204.
- Volkman, S. K., Cowman, A. F., Wirth, D. F. (1995). Functional complementation of the *ste6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* with the *pfindr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8921–8925.
- Vyas, A., Kim, S.-K., Giacomini, N., Boothroyd, J. C., Sapolsky, R. M. (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6442–6447.
- Waldman, B. S., Schwarz, D., Wadsworth, M. H., Saeij, J. P., Shalek, A. K., Lourido, S. (2020). Identification of a Master Regulator of Differentiation in *Toxoplasma*.
- Wang, J., Xu, C., Liao, F. L., Jiang, T., Krishna, S., Tu, Y. (2019). A Temporizing solution to “Artemisinin Resistance.” *New England Journal of Medicine*, 380(22), 2087–2089.

- Wang, J., Zhang, C.-J., Chia, W. N., Loh, C. C. Y., Li, Z., Lee, Y. M., He, Z., Yuan, L.-X., Lim, T. K., Liu, M., Liew, C. X., Lee, Y. Q., Zhang, J., Lu, N., Lim, C. T., Hua, Z.-C., Liu, B., S, H.-M., Tan, L. S. W., Lin, Q. (2015). Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, 6, 10111.
- Wang, P., Read, M., Sims, P. F. G., Hyde, J. E. (1997). Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroatesynthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Molecular Microbiology*, 23(5), 979–986.
- Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26051–26056.
- WHO (2004). Mortality and health data statistics. Ve Wikipedia (2021).
- WHO (2013). Control and surveillance of human African trypanosomiasis. WHO technical report series, 984.
- WHO (2015). WHO guidelines for the treatment of malaria 3rd edition.
- WHO (2018). Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Ve Wikipedia (2021).
- WHO (2019). WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis.
- WHO (2020). WHO world malaria report 2020.
- Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 105(13), 5022-5027.
- Wilson, C., Serrano, A., Wasley, A., Bogenschutz, M., Shankar, A., Wirth, D. (1989). Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*, 244(4909), 1184–1186.
- Wong, W., Bai, X.-C., Sleebs, B. E., Triglia, T., Brown, A., Thompson, J. K., Jackson, K. E., Hanssen, E., Marapana, D. S., Fernandez, I. S., Ralph, S. A., Cowman, A. F., Scheres, S. H. W., Baum, J. (2017). Mefloquine targets the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome to inhibit protein synthesis. *Nature Microbiology*, 2, 17031.
- Wyllie, S., Foth, B. J., Kelner, A., Sokolova, A. Y., Berriman, M., Fairlamb, A. H. (2015). Nitroheterocyclic drug resistance mechanisms in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 625–634.
- Yeh, E., DeRisi, J. L. (2011). Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*, 9(8), e1001138.
- Zhang, K. (2002). Divergent regulation of dihydrofolate reductase between malaria parasite and human host. *Science*, 296(5567), 545–547.