

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Marie Glavanakovová

Železo jako faktor virulence parazitických protist

Iron as a factor of virulence of parasitic protists

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Róbert Šut'ák, Ph. D.

Praha 2013

Prohlášení

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

V Praze dne 12. května 2013

Marie Glavanakovová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli RNDr. Róbertu Šuťákovi, Ph. D. za jeho ochotu, trpělivost a cenné rady při sestavování této práce. Bez jeho pomoci by nemohla vzniknout v předpokládané podobě.

Abstrakt

Železo je pro většinu organismů jedním z esenciálních prvků jejich metabolismu. Především díky možnosti účastnit se oxido-redukčních reakcí je tento prvek schopen zajišťovat řadu důležitých procesů v buňkách. Na druhé straně je ale známa vysoká toxicita volných atomů železa. Železo je tedy paradoxně jak esenciálním, tak potenciálně toxickým prvkem pro většinu organismů.

Pro parazitické organismy je dostatečný příjem železa zásadní vzhledem k jejich vysokým nárokům na množení se ve svém hostiteli. Mnoho studií tedy zkoumá vztah dostupnosti železa na vývoj parazita jako jeden ze zásadních faktorů virulence. V experimentech se využívají chelátory, což jsou chemické látky schopné specificky s vysokou afinitou vázat ionty železa a využívají se především v léčbě nadbytku železa v organismu. Tato práce shrnuje poznatky o účincích nadbytku či nedostatku železa na vývoj parazitických organismů a v této souvislosti také o chelatačních látkách, jejich vlivu na virulenci a využití v terapii infekcí vybraných parazitických protist rodu *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* a *Tritrichomonas*.

Klíčová slova: železo, chelátování, virulence, parazitická protista, desferrioxamine

Abstract

Iron is an essential nutrient for metabolism in almost all living organisms. Its importance for many crucial cellular processes originates primarily from the flexibility of available redox potentials. However, the high toxicity of free iron ions is well known. For most organisms, iron is simultaneously and paradoxically essential and toxic.

Iron acquisition is crucial for parasitic organisms because it is needed for multiplication in hosts. Many studies have examined the relationship between iron availability and parasite development as a primary factor of virulence. These experiments commonly use chelators, chemical compounds that bind specifically and with high affinity iron ions, and are especially used for iron overload treatment. This thesis summarizes the influence of iron overload or deprivation in the host on the development of parasitic organisms and the impact of chelating agents on the virulence of selected parasitic protists, including the *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* and *Tritrichomonas* genuses.

Key words: iron, chelation, virulence, parasitic protists, desferrioxamine

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod | 1 |
| 2. Železo | 2 |
| 2.1. Vlastnosti železa a jeho role v biologických systémech..... | 2 |
| 2.2. Toxicita železa..... | 3 |
| 2.3. Proteiny spojené se železem..... | 3 |
| 2.3.1. Hemoproteiny | 4 |
| 2.3.2. Železosírné klastry..... | 4 |
| 2.3.3. Ostatní proteiny obsahující železo..... | 4 |
| 2.4. Metabolismus železa u člověka a na buněčné úrovni..... | 5 |
| 3. Chelatační látky | 6 |
| 3.1. Vlastnosti chelatačních látek a jejich využití v terapii | 6 |
| 3.2. Nejvyužívanější chelatační látka desferrioxamine | 6 |
| 4. Vybraní zástupci parazitických protist | 7 |
| 4.1. <i>Plasmodium</i> | 7 |
| 4.1.1. Životní cyklus plasmodií a malárie | 7 |
| 4.1.2. Metabolismus železa plasmodií..... | 7 |
| 4.1.3. Využití chelatačních látek v terapii infekce plasmodiem | 9 |
| 4.2. <i>Leishmania</i> | 13 |
| 4.2.1. Životní cyklus leishmanií a leishmaniózy | 13 |
| 4.2.2. Metabolismus železa leishmanií..... | 13 |
| 4.2.3. Využití chelatačních látek v terapii leishmanióz..... | 14 |
| 4.3. <i>Trypanosoma</i> | 17 |
| 4.3.1. Životní cyklus trypanosom a způsobená onemocnění | 17 |
| 4.3.2. Metabolismus železa trypanosom..... | 17 |
| 4.3.3. Využití chelatačních látek v terapii trypanosomální infekce..... | 18 |
| 4.4. <i>Trichomonas, Tritrichomonas</i> | 20 |
| 4.4.1. Životní cyklus a způsobená onemocnění..... | 20 |
| 4.4.2. Metabolismus železa <i>Trichomonas</i> a <i>Tritrichomonas</i> | 20 |
| 4.4.3. Železo jako faktor virulence u trichomonád..... | 21 |
| 5. Závěr..... | 23 |
| 6. Literatura | 24 |

1. Úvod

Železo je po hliníku druhým nejčastěji se vyskytujícím kovem v zemské kůře. Toto významné rozšíření nabízí jedno z vysvětlení, proč se stal pro většinu organismů esenciálním prvkem jejich metabolismu, bez kterého by nebyly schopny správného růstu a vývoje. Především díky možnosti účastnit se oxido-redukčních reakcí je tento prvek schopen zajišťovat řadu důležitých procesů týkajících se například transportu kyslíku v organismu, přenosu elektronů v elektrontransportním řetězci mitochondrií, či syntézy DNA a RNA (Fontecave, Pierre 1993). Na druhé straně je ale známa toxicita volných atomů železa, které katalyzují vznik vysoce reaktivních látek, což může mít na buňku velice škodlivý vliv. (Crichton 2001). Železo je tedy paradoxně jak esenciálním, tak potenciálně toxickým prvkem pro většinu organismů.

Dostupnost železa v hostiteli je zásadní pro možnost růstu a vývoje parazitických organismů vzhledem k jejich náročnosti na množení se a přežití v nepříznivých podmínkách svého hostitele. Pro savce bylo tedy důležité vytvořit si účinné mechanismy, jak zabránit přístupu volného železa pro patogenní mikroorganismy. Stejně tak ale musely reagovat i parazité, tedy nalézt efektivní způsob příjmu železa v buňkách či séru hostitele. Tento vztah se ukázal být velice významným pro virulenci (Sutak *et al.* 2008). Logicky tak zvýšená hladina železa v organismu hostitele často podporuje růst parazita, kdežto deprivace naopak snižuje virulenci a schopnost jeho rozmnožování (Weinberg 1999). Tento fakt dává impuls směrem k vývoji nových léčiv na bázi chelátorů, což jsou chemické látky, které jsou schopné specificky s vysokou afinitou vázat ionty železa. Tato práce si dává za cíl shrnout poznatky o vztahu virulence vybraných parazitických protist rodu *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* a *Tritrichomonas* vzhledem k dostupnosti železa v hostiteli, využití chelatačních látek jako prostředku k terapii infekcí a jejich schopnosti inhibovat výše zmíněná protista.

2. Železo

2.1. Vlastnosti železa a jeho role v biologických systémech

Železo je 26. prvkem periodické soustavy a řadí se mezi kovy. Může nést různá oxidační čísla, přičemž nejčastěji nabývá forem železnatých (Fe^{2+}) a železitých (Fe^{3+}) iontů. Jejich chemické vlastnosti a význam pro biologické systémy se různí.

Fe^{3+} ionty jsou v aerobním prostředí hlavní dostupnou formou železa, problémem však zůstává, že za fyziologických podmínek pH se vyznačují velmi nízkou rozpustností ve vodě ($[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-18}$ M; pH = 7) (Crichton 2001). Aby je tedy mohly organismy využívat, je potřeba jejich inkorporace do struktur, které zajistí jejich možnost absorpce živým systémem. U prokaryot jsou to nízkomolekulární chelatační látky, u savců pak proteinové struktury jako například transferrin (Fontecave, Pierre 1993).

Naproti tomu jsou železnaté (Fe^{2+}) ionty majoritní, aktivní formou železa v buňce, a to především proto, že jsou rozpustné ve vodných roztocích, a jsou tedy schopny se účastnit mnoha metabolických dějů. Význam redukované formy pro organismy lze doložit na následujících příkladech. Ve většině proteinů a enzymů je inkorporováno železo právě ve své redukované formě Fe^{2+} (Fontecave, Pierre 1993). Železnaté ionty jsou také pravděpodobně formou, kterou buňka přijímá z vesikulů, kde se v kyselém prostředí vyvazuje Fe^{3+} z transportního komplexu a je redukováno na Fe^{2+} membránovou reduktázou (Núñez *et al.* 1990). Podílí se také na samoregulaci hladiny železa v buňce tím, že interaguje s geny pro syntézu skladovacích (při nadbytku železa) nebo transportních (při nedostatku) proteinů (Theil 1990). V neposlední řadě je to právě Fe^{2+} , které je schopné vázat a aktivovat kyslík - zejména hemoglobinové přenašeče v krvi (Andreini *et al.* 2008).

Vlastnosti železa, které jsou unikátní pro jeho zařazení do biologických systémů, pramení především z extrémní variability $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ redoxních potenciálů a jeho schopnosti účastnit se přenosu elektronů (Crichton 2001).

Železo hraje také zásadní roli v interakci patogen - hostitel. Dostupnost železa v hostiteli u různých infekčních onemocnění má velký dopad na jejich virulenci. Savci si proto vyvinuli

mechanismus, díky němuž je možné redukovat množství nenavázaného železa v extracelulárním prostoru, které je potenciálně dosažitelné pro patogenní mikroorganismy. Železo se vyskytuje především intracelulárně, mimo buňku je jeho limitované množství pevně navázáno na proteiny jako je například transferrin (Sutak *et al.* 2008).

2.2. Toxicita železa

Železo, ač je pro organismy nepostradatelným prvkem, se objevuje i v reakcích, kde dochází ke generaci tzv. ROS, neboli reaktivních kyslíkových radikálů (např. superoxidový anion O_2^- , hydroxylový anion $\cdot OH$). Uspořádání elektronů ve většině atomů a molekul je v párech. Volné radikály jsou takové molekuly, kterým právě jeden z elektronů v páru chybí. Obecně jsou tedy velice reaktivní a mohou mimo jiné fungovat jako nosiči elektronů v chemických reakcích. Samotné železo se podílí na tvorbě kyslíkových radikálů prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$) (Fenton 1894). Produkci takovýchto molekul může docházet k poškození buňky na různé úrovni. Proteiny, konkrétně postranní řetězce jejich aminokyselin, jsou náchylné na oxidaci volnými radikály, nejčastěji se tak děje na cysteinových či methioninových zbytcích. Stabilita fosfolipidové buněčné membrány je také ohrožena generovanými ROS a to především její nenasycené mastné kyseliny. Velké škody mohou hlavně hydroxylové radikály napáchat i na DNA, kde se váží na báze, a produkovat tak různé modifikace genetické informace. Snížení hladiny volného železa (a jiných kovů s vysokým redoxním potenciálem, např. mědi) a tím předcházení vzniku oxidativního stresu, se tak stalo určující pro léčbu mnoha nemocí. Jde zejména o neurodegenerativní, nádorová či kardiovaskulární onemocnění (Jomova *et al.* 2012). Proto byly organismy donuceny vyvinout si mechanismy, s jejichž pomocí lze zabránit výskytu volného železa, a tím se vyhnout jeho toxicitě.

2.3. Proteiny spojené se železem

Proteiny, které mají ve své struktuře zahrnutý kov, tzv. metaloproteiny, se dají dělit podle různých kritérií, jako například podle své funkce (strukturní, katalytické, transportní, aj.). Crichton (2001) navrhuje dělení proteinů obsahujících železo na tři skupiny - hemoproteiny, proteiny se železosírnými (Fe-S) klastry a proteiny mimo tyto dvě skupiny, které také obsahují železo, především jsou to skladovací a transportní struktury.

2.3.1. Hemoproteiny

Železo je v těchto proteinech vázáno přes čtyři atomy dusíku na molekuly porfyrinu. Ty jsou tvořeny čtyřmi pyrrolovými kruhy, které se na sebe váží pomocí metylenových můstků. Celé to dohromady tvoří prostetickou skupinu hem. (Crichton 2001). Ta je konstatní ve strukturách různých druhů hemů, jejich rozdílnost tkví v periferních substituentech.

Mezi hemoproteiny patří např. hemoglobiny, které jsou díky své schopnosti vázat, přenášet, skladovat a vyvazovat O₂ nepostradatelnými proteiny pro zajištění transportu kyslíku v organismu (Bertini *et al.* 2007).

2.3.2. Železosírné klastry

Železosírné (Fe-S) klastry jsou důležitou strukturou, kterou najdeme téměř ve všech živých organismech. Díky jejich variabilitě redoxního potenciálu je můžeme nalézt především v elektron transportních systémech, ale zastávají i jiné funkce jako například strukturní, enzymatickou anebo se podílí na regulaci genové exprese (Bertini *et al.* 2007). K jejich biogenezi dochází v matrix mitochondrií sestavením z endogenních Fe-S klastrů a apoproteinů importovaných z cytosolu (Mühlenhoff *et al.* 2000).

2.3.3. Ostatní proteiny obsahující železo

Mnoho dalších proteinů také obsahuje ve svých strukturách železo. Vyjma různých enzymů jsou pro metabolismus železa důležité proteiny, které tento kov skladují či transportují.

- **Ferritin** - Ferritin je především cytosolický protein skladující železo, který je tvořen 24 podjednotkami (12 podjednotek u bakteriálního ferritinu) a můžeme ho nalézt u rostlin, zvířat a mikroorganismů. Jednotlivé podjednotky jsou nejčastěji alfa-helixy sestávající z lehkého a těžkého řetězce, které se samy uspořádávají do struktury podobné kleci. V dutině takto vzniklé klece je možné uchovávat až 4 500 železitých iontů. (Liu *et al.* 2005). Ferritin vykazuje forroxidázovou aktivitu, která konvertuje Fe²⁺ na oxidovanou Fe³⁺ formu, ve které je následně uskladněno (Bertini *et al.* 2007).

- **Transferrin** - Transferrin je transportní protein přítomný v buňkách savců. Jeho polypeptidový řetězec vytváří dvě nezávislé strukturní domény vyskytující se na jeho N- a C- koncích. (Williams *et al.* 1980). K orgánům se železo dostává pomocí krevního oběhu navázané právě na

transferrin a jednotlivé buňky musí vykazovat syntézu transferrinových receptorů-1 (TfR1), na které se transportní proteiny navazují. Poté dochází k indukci receptorem řízené endocytózy a následné internalizaci transportovaného železa (Hentze *et al.* 2004).

2.4. Metabolismus železa u člověka a na buněčné úrovni

Průměrné množství železa u zdravého jedince se pohybuje mezi 55 a 45 mg železa na kilogram tělesné váhy. 60-70 % železa se vyskytuje navázané v hemoglobinu; 10 % v myoglobinu, cytochromech a jiných enzymech, které obsahují tento kov jako kofaktor; zbylých 20-30 % tvoří především železo uskladněné v proteinech jako je ferritin; na extracelulární transportní protein transferin připadá méně než jedno procento (0,1-0,2 %) (Fontecave, Pierre 1993). Železo přijímáme pouze v potravě a to zhruba 1-2 mg denně. Stejně množství je pak i denně vylučováno (odchází společně se žlučí, močí, odloupenou kůží, či u žen menstruací). Železo je absorbováno epiteliálními buňkami dvanáctníku a je transportováno do krve, kde cirkuluje v komplexu s transferrinem. Většina železa je poté inkorporována do hemoglobinu prekurzorů nebo již maturovaných červených krvinek. Železo je v těle skladováno hlavně v parenchymatických buňkách jater nebo v makrofázích, které se vyskytují v endotheliu a podílí se na recyklaci železa z degradovaných hemoglobinů (Andrews 1999).

Na buněčné úrovni je železo v extracelulárním prostoru striktně navázané na transferrin nebo lactoferrin. Buňky ho poté přijímají přes specifický receptor řízenou endocytózou a uvolňují železo v kyselém prostředí jejich endozomů. Železo může být dále uskladněno v proteinech ferritinu, většina se ho ale spotřebuje v mitochondriích na syntézu hemu či železosírných proteinů (Hentze *et al.* 2004).

3. Chelatační látky

3.1. Vlastnosti chelatačních látek a jejich využití v terapii

Chelatační činidla jsou chemické látky, které mají schopnost vázat s vysokou afinitou určitý kov, respektive železo. Jejich použití je zásadní především v léčbě nadbytku železa v organismu, kdy je snaha se vyvarovat u těchto pacientů přebytku volného železa, které se může podílet na tvorbě oxidativního stresu a poškodit tak důležité orgány, jako jsou játra či srdce. (Brittenham 1992). Jak bude ukázáno později, mohou tyto látky hrát důležitou roli také v terapii parazitálních nákaz. Vzhledem k vysokému požadavku železa u rychle se množících jednobuněčných protist, jsou tyto látky často účinnými inhibitory dané infekce. Aby ale byly účinné, měly by splňovat některé vlastnosti, jako selektivní a vysoká afinita k železitým iontům parazitických buněk, schopnost rychle se dostat do intracelulárních kompartmentů parazita, či v neposlední řadě schopnost po navázání železa rychle opustit buňku, aby se eliminovalo vystavení hostitelské buňky případné toxicitě komplexu chelátor - železo (Lytton *et al.* 1993).

3.2. Nejvyužívanější chelatační látka desferrioxamine

Desferrioxamine (DFO) je jedna z mála chelatačních látek využívaná klinicky. Je to bakteriální siderofor, který je produkován bakteriemi *Streptomyces pilosus*, a jehož účinky u pacientů s nadbytkem železa byly studovány již před desítkami let (Smith *et al.* 1962). DFO je relativně účinným a bezpečným lékem. Jeho nedostatek však tkví v jeho nízké absorpci organismem, pokud je podáván orálně. Je to látka hydrofilní povahy a špatně tedy prostupuje buněčnými membránami. Pro výsledný terapeutický efekt je tak nezbytná delší doba vystavení pacienta DFO a jeho intravenózní podávání (Brittenham 1992), což ale může vést k neblahým vedlejším účinkům a komplikacím v léčbě (Freedman *et al.* 1999). Díky všem těmto parametrům společně ještě s jeho vysokou cenou se stává DFO relativně nepraktickým či dokonce naprosto nedostupným léčivem v mnoha oblastech světa.

4. Vybraní zástupci parazitických protist

4.1. *Plasmodium*

4.1.1. Životní cyklus plasmodií a malárie

Plasmodium je jednobuněčný organismus, který obligátně parazituje uvnitř buněk svého hostitele a způsobuje tak závažné onemocnění - malárii. Zdravotnický nejvýznamnějšími druhy jsou *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* a *Plasmodium malariae*. Mají vcelku komplikovaný životní cyklus, který zahrnuje obratlovce jako hostitele pro jeho asexuální fázi cyklu, na druhé straně samičky komára rodu *Anopheles*, v jejichž střevech dochází k pohlavnímu rozmnožování. Po nasátí infikované krve komárem dochází k přesunu sporozoitů do slin komára. Při dalším příjmu potravy se tak parazit dostává do krevního oběhu hostitele a napadá jaterní buňky. Tato fáze malárie se nazývá asymptomatická. V játrech dochází k proliferaci a stádium merozoitů se následně dostává do krevního oběhu, kde jeden parazit většinou infikuje jednu červenou krvinku. V krvinkách prodělává různé změny vývoje. Nejprve tzv. prstýnkové stádium, které není metabolicky příliš aktivní oproti následnému stádiu trofozoita, který masivně zpracovává cytoplasmu krvinek. V posledním stádiu schizonta se parazit několikrát dělí a produkovaní merozoiti pak opouštějí krvinky a pokračují v kolonizaci krevního řečiště. Klinicky se poslední fáze vývoje projevuje jako tzv. malarický záchvat způsobený praskáním krvinek (Francis 1997).

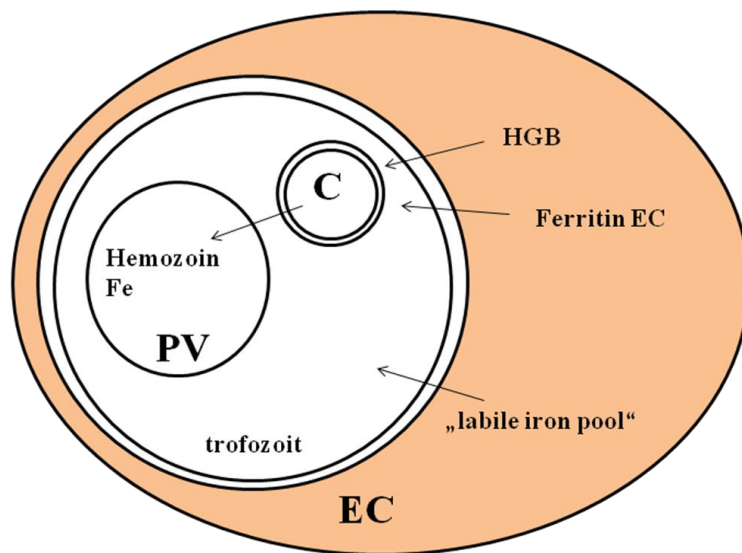
Malárii je ročně postiženo okolo 100 miliónů lidí a přes jeden milión jich na následky této infekce zemře. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je v ohrožení téměř 40% populace. Nejčastěji se jedná o tropické a subtropické oblasti, přičemž nejvíce je zasažena oblast Subsaharské Afriky (WHO 1993).

4.1.2. Metabolismus železa plasmodií

Obecně není o metabolismu železa u plasmodia mnoho známo, především o mechanismech, kterými ho plasmodium získává ze svého okolí. Metabolicky neaktivnější je ve fázi trofozoita nebo v ranné fázi schizonta, kdy také dochází k nejvýraznější mobilizaci dostupného železa (Cabantchik *et al.* 1999). Hemoglobin je v potravní vakuole parazita degradován pomocí proteáz

a kyselého prostředí vakuoly na aminokyseliny, které jsou dále využity, a hemové skupiny, které, jak by se dalo logicky předpokládat, budou zdrojem železa pro plasmodium. Téměř veškerý hem, který je z hemoglobinu uvolněn, však následně polymerizuje do krystalické struktury zvané malarický pigment nebo hemozoin (Egan *et al.* 2002). Neví se, jestli je plasmodium schopné hem opravdu využít. Některé studie potvrdily přítomnost enzymů podobných hem oxygenázám, které jsou nezbytné pro zpracování hemu (Okada 2009). Recentní studie ale tyto výsledky vyvrátily s tím, že plasmodium není schopné nijak enzymaticky hem degradovat (Sigala *et al.* 2012), a proto tedy zřejmě využívají jiné, alternativní cesty, jak železo během krevní fáze získávat.

Potenciálně možné zdroje železa pro plasmodium sumarizoval ve své studii Scholl *et al.* (2005), viz Obr. 1. Je to již zmíněný hem, který v infikovaných erythrocytech výrazně klesá (až o 70 %), kdežto hladina železa zůstává konstantní. Dalším zdrojem může být tzv. „labile iron pool“, což je v podstatě přechodně se vyskytující zásoba železa uvnitř buněk, která je dobře chelatovatelná, a v infikovaných buňkách je detekovatelná především v parazitovi samém. Z proteinových struktur může být zdrojem pro plasmodium železo z ferritinu, které zbylo v erythrocytech po syntéze hemu. Do trávicí vakuoly parazita by se zřejmě mohl dostávat společně s hemoglobinem a tam být poté degradován proteázami (Scholl *et al.* 2005).



Obr. 1. Získávání železa u plasmodií. Plasmodium ve stádiu trofozoita se vyskytuje uvnitř erythrocytů (EC). Hemoglobin (HGB) a ferritin červených krvinek (ferritin EC) jsou pravděpodobně fagocytovány pomocí cytosomu (C) a následně transportovány do potravní vakuoly (PV), kde je hemoglobin štěpen proteázami a uvolněný hem poté krystalizuje do struktury zvané hemozoin (hemozoin Fe). Další možností je, že získává železo z „labile iron pool“ červených krvinek (podle Scholl *et al.* 2005).

4.1.3. Využití chelatačních látek v terapii infekce plasmodiem

Naše znalosti o tom, jakým způsobem plasmodium získává železo z média svého hostitele, jsou vcelku kusé, a zatím nebyl objeven žádný zjevný mechanismus, který by jim dovoľoval absorbovat železo například z tělních tekutin jejich hostitele. Víme ale, že je plasmodium velmi náchylné na nedostatek tohoto kovu indukovaný různými farmaceutiky (Cabantchik *et al.* 1999). Množství studií se tomuto tématu věnuje a hledá způsob, jak zdokonalit dostupné léky proti tomuto stále aktuálnímu problému.

Chelatační látky jsou slibným řešením pro zastavení růstu a vývoje parazita v infikovaných buňkách. Nejčastěji testovaným chelátorem k experimentální léčbě lidské malárie je desferrioxamine (DFO), což je látka hydrofilní povahy, špatně prostupuje buněčnými membránami a jeho účinek je tedy pomalý. Tento fakt je i přes dobré výsledky jak *in vitro* (Raventos-Suarez 1982; Whitehead *et al.* 1990), tak *in vivo* (Pollack *et al.* 1987) limitující pro terapeutické využití jako orálně podávaný lék. Pravděpodobný mechanismus účinku této látky a jiných příbuzných hydroxamátů je jejich schopnost odnímat železo z důležitých zdrojů, jako jsou skladovací proteiny, nebo atakují železo navázané v klíčových enzymech pro růst parazita jako je ribonukleotid reduktáza nezbytná pro syntézu DNA. DFO je i přes pomalé působení vzhledem ke své špatné prostupnosti, účinné v inhibici parazita především ve stádiu trofozoit/schizont a zabraňuje tak masivnímu množení parazita nejenom tím, že váže železo, ale také způsobuje fragmentaci jaderné membrány a postupnou vakuolizaci nukleoplazmy (Atkinson *et al.* 1991). Koncentrace, které jsou schopné inhibovat plasmodium v kultuře (15 μM), jsou až 60krát nižší než koncentrace, které mohou být tolerovány *in vivo* (Raventos-Suarez *et al.* 1982). Příznivé výsledky chelátoru DFO byly pozorovány již před více než dvaceti lety, kdy byly testovány jeho inhibiční účinky na *Plasmodium falciparum in vivo*. Hershko a Peto (1988) zdůrazňují fakt, že působení na růst parazita nemá vliv na hladinu železa v hostiteli, a tudíž DFO zřejmě působí přímo v infikovaných erytrocytech (Hershko, Peto 1988). Pomocí fluorescenčních sond (calceinu) bylo zjištěno, že účinky chelatačních látek vázajících železo jsou především v tom, že jsou schopny se dostat do parazitického kompartmentu infikované buňky a vázat železo přímo v cytosolu plasmodia. Fluorescence výrazně narůstala (calcein emituje záření, pokud na něj není železo navázano) poté, co byl k buňkám přidán chelátor. (Loyevsky *et al.* 1999a).

Vzhledem k tomu, že DFO špatně prostupuje membránou, byl pozorován také účinek lipofilních chelátorů, které patří mezi katecholy. Dobré výsledky má chelátor F160, který působí velice rychlým inhibičním efektem jak na prstýnkové stádium, kdy se velmi rychle kumuluje uvnitř infikovaných erytrocytů, tak i na stádium trofozoita (50 – 70 %). Jeho *in vitro* aktivita i u kmenů resistantních vůči chlorochinu a další slibné vlastnosti (jako právě rychlá akumulace, nízká toxicita vůči buňkám hostitele) jsou opět dobrou vyhlídkou do budoucna pro jeho použití minimálně jako pomocné látky k jiným léčivům (Hammadi *et al.* 2003). Ovšem nepotvrdila se přímá korelace mezi aktivitou chelatačních látek tohoto typu a jejich schopností prostupovat membránami (Pradines *et al.* 2002). Další studie zkoumaly antiplasmodiální aktivitu syntetických sideroforů, které také patří mezi katecholy, a potvrdily jejich vyšší účinnost než běžně využívaný DFO (Rotheneder *et al.* 2002). Tyto chemické látky tedy mají vysoký potenciál stát se do budoucna využívanými léčivy v boji proti malárii.

Pro zlepšení účinků využívaných chelatačních látek v terapiích se často studují jejich možné kombinace. Například samostatně podávaný orální chelátor deferiprone u asymptomatických pacientů infikovaných *Plasmodium falciparum* neprokázal redukci množství parazitů uvnitř červených krvinek (Thuma *et al.* 1998). Zato jeho použití jako aditivum společně s jinými antimalariky mělo signifikantně lepší výsledky v léčbě experimentální skupiny, kde došlo mj. k rychlejšímu úbytku parazitémie v organismu než v kontrolní skupině, která požívala antimalarika bez přídatku deferiprone (Mohanty *et al.* 2002). Dobrou zprávou je, že nebyly pozorovány žádné vedlejší efekty aditiva u pacientů.

Účinky chelatačních látek mohou být reverzibilní, kdy je *Plasmodium* schopné po odstranění chelátoru znovu rozvinout nemoc, nebo irreverzibilní, kdy jeho vývoj v infikovaném organismu již není možný. Například studie chelátoru RSFileu_{m2}, který velice dobře proniká do buněk, ukazuje, že po kontinuálním vystavení této látce, je prstýnkové stádium *Plasmodium falciparum* částečně schopné se vzpamatovat. Ovšem po následném použití DFO dochází k irreverzibilnímu efektu a plasmodium již nevykazuje syntézu DNA (Lytton *et al.* 1994). Toto je také opět příklad, kdy využití kombinace různých látek může zlepšit celkovou terapii pacienta.

Další možností chelátování je využití “pro-drug”, tzn. látek, u nichž je nutné upravit jejich strukturu, například odštěpením určité sekvence hydrolýzou, aby měly požadovaný účinek. Jednou z takovýchto látek je chelátor dexrazoxane, která u myších hepatocytů napadených

P. yoelii inhibovala vývoj sporozoitů na schizonty ze 45 až 69 % díky přítomnosti hydrolyzačních enzymů v hepatocytech (Loyevsky *et al.* 1999b). Tento koncept by mohl být využitelný pro vývoj nových antimalarik.

Recentní studie zabývající se látkami primárně určenými pro léčbu nadbytku železa u člověka nasvědčují tomu, že některé z těchto látek, např. FBS0701, by mohly fungovat i u terapie malárie. Testy prováděné na myších modelech infikovaných *Plasmodium falciparum* ukazují, že tato látka působí při menších koncentracích než běžně využívané chelátory deferiprone či DFO. IC₅₀, neboli koncentrace dané látky nutná pro usmrcení 50% parazita, je 6 μM, což je výrazně méně než u ostatních, výše zmíněných látek (15 a 30 μM) (Ferrer *et al.* 2012). Vzhledem k jeho dobrým výsledkům co se týče vstupu do erytrocytů, chelátování železa v nich a jeho využitelnost v monoterapiích, či jako profylaxe, existují nadějně vyhlídky na využití těchto látek i proti parazitálním infekcím. Studie dalších látek, které se osvědčily v jiném odvětví medicíny a to v boji proti nádorovým buňkám, ukázaly dobré výsledky i v inhibici růstu *Plasmodium falciparum in vitro*. Tyto lipofilní chelátory (aroylhydrazon, thiosemicarnazon) měly signifikantně lepší účinky i u kmenů plasmodií resistantních vůči chlorochinu (Walcourt *et al.* 2004), která se v minulosti široce využívala v boji proti malárii. Tyto výsledky také nabízí propojení více oblastí experimentálních studií léčiv zaměřených na vychytávání železa v organismu a jejich využití k léčbě více onemocnění.

V endemických oblastech výskytu malárie existuje riziko tzv. superinfekce, kdy je jeden již infikovaný člověk v podstatě reinfikován po poštípání jiným komárem, který přenáší i třeba úplně odlišný druh plasmodia. U dětí starších 6ti let se v těchto oblastech často vyskytují jedinci, kteří jsou nositeli jak krevní, tak zároveň i jaterní fáze parazitémie. Zajímavostí ale je, že krevní fáze infekce oslabuje následný rozvoj sporozoitů plasmodia, kteří nejsou schopny se vyvíjet v jaterních hepatocytech a nedostávají se do erytrocytů. Toto bylo potvrzeno i na myších modelech (Portugal *et al.* 2011a). Za povšimnutí stojí způsob, jakým si plasmodium ochraňuje svou niku uvnitř červených krvinek před vznikem superinfekce, a tím také v podstatě ulehčuje svému hostiteli, jehož imunitní systém bojuje pouze proti jednomu parazitovi. Transport železa a jeho homeostáze je u savců kontrolován hormonem hepcidin (Nemeth, Ganz, 2009), který se váže na transportní protein železa ferroportin a zabraňuje tak v jeho exportu z buněk (z enterocytů a z makrofágů), to znamená, že zvýšená hladina hepcidinu vede k nižší absorpci železa, snížená hladina hepcidinu naopak ke kumulaci železa v organismu. Vyšší hladiny

hepcidinu byly naměřeny u jedinců s infikovanými červenými krvinkami, takže plasmodium pravděpodobně stimuluje tvorbu hepcidinu v játrech. Bylo také prokázáno, že právě při krevní fázi malárie dochází k redistribuci železa mezi orgány hostitele. Více železa bylo nalezeno ve slezině, méně pak v játrech. Hepcidin tedy inhibuje jaterní fázi parazitémie tím, že limituje přístup železa proliferujícím sporozoitům (Portugal *et al.* 2011b).

Z dostupných studií a experimentů sledujících dopad chelatačních látek na vývoj a růst plasmodia je zřejmé, že železo může být považováno za důležitý faktor v boji proti tomuto jednobuněčnému parazitovi, respektive proti stále vysoce rozšířenému onemocnění malárie. Do budoucna je otázkou, zda se podaří nalézt opravdu účinná látka, či kombinace látek, které by zastavily infekci plasmodiem, příliš by nezatěžovaly organismus pacientů a nebyly by ani příliš nákladné vzhledem k rozšíření malárie především v chudých oblastech tropů a subtropů.

4.2. *Leishmania*

4.2.1. Životní cyklus leishmanií a leishmaniózy

Leishmania je parazitický protist patřící do řádu dvouhostitelských Trypanosomatid. Z hlediska své patogenity je původcem významného onemocnění - leishmaniózy. Jedná se o zoonózy, výjimečně o antropozózy, a vyznačují se širokým spektrem klinických příznaků u jeho nositelů, kterými jsou v zásadě savci. Leishmaniózy jsou rozšířené především v tropických a subtropických oblastech. Rozeznáváme kožní (způsobené *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*), kožně-slizniční (*L. braziliensis*) či útrobní neboli viscerální leishmaniózy (*L. donovani*), která bývá často letální.

Leishmanie cirkulují během svého životního cyklu mezi obratlovci a přenašeči, kterými jsou flebotomové z rodu *Phlebotomus* či *Lutzomyia*. Uvnitř přenašeče se vyskytuje ve formě promastigota. Parazit se dostává do hostitele během sání flebotoma z jeho ústního ústrojí a je fagocytován do makrofágů. Zde se vyskytuje ve vakuole, která fúzuje s lysozomy za vzniku fagolysozomu, a mění se na amastigota, bezbičíkatou formu. V této vakuole dochází k masivnímu množení a následné lyzi buňky. Uvolnění amastigoti infikují další buňky (Volf, Horák *et al.* 2007).

4.2.2. Metabolismus železa leishmanií

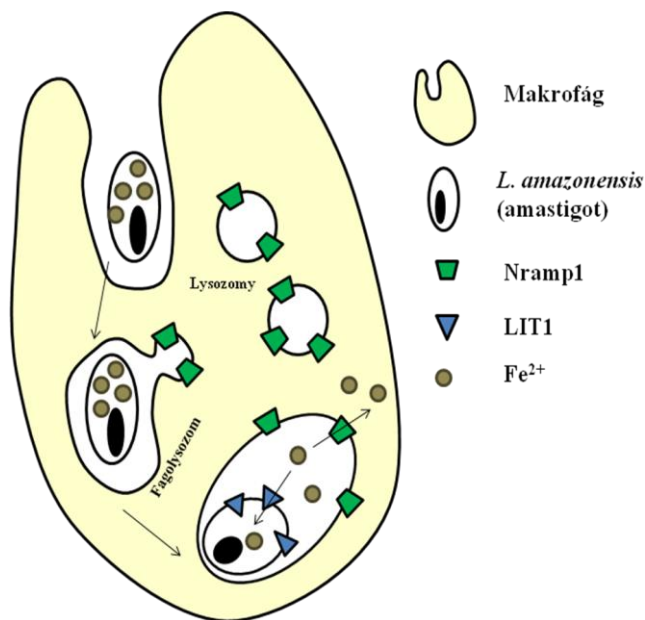
Ve fázi promastigota se leishmanie vyskytují volně a jsou tedy závislé na dostupnosti železa z extracelulárních zdrojů. Podle studií Wilsona *et al.* je *Leishmania chagasi* pro zajištění růstu schopna v prostředí svého přenašeče získávat železo navázané jak na hemin, tak i na extracelulární transportní proteiny transferrin a lactoferrin (Wilson *et al.* 1994). Leishmanie se přizpůsobily rozličným prostředím tím, že využívají enzymy reduktázy, které v jejich okolí redukují oxidované formy železa Fe^{3+} na Fe^{2+} , které se tedy stává snadno dostupným zdrojem pro promastigoty (Wilson *et al.* 2002).

U amastigotů je situace jiná. Vyskytují se uvnitř makrofágů hostitele, kde potřebují efektivní mechanismus, jak přijímat ionty železa, které se dostanou k parazitoformní vakuole, aby byly vůbec schopni se vyvíjet v tomto nepříznivém prostředí. Jedním z prostředků, jak získávají železo, je pomocí membránového proteinu LIT1, který byl identifikován a charakterizován u *Leishmania amazonensis* (Huynh *et al.* 2006). Tento transportér železnatých iontů je esenciální

pro intracelulární vývoj amastigotů v makrofázích a mimo jiné byla prokázána jeho důležitost také pro virulenci leishmanií. Zdrojem železa se pro amastigoty stávají molekuly nehemového, ale i hemového železa (hemin či hemoglobin). Právě například hemin se váže na povrchové ligandy leishmanií s vysokou afinitou (Carvalho *et al.* 2009).

4.2.3. Využití chelatačních látek v terapii leishmaniózy

Za zmínku stojí přirozený mechanismus deprivace železa v makrofázích, tedy v prostředí, kde se leishmanie výrazně pomnožují, a musí si tak zajistit dostatek potřebných železa, k čemuž využívají již zmíněné LIT1 membránové přenašeče. Tomuto se buňky imunitního systému brání mimo jiné tak, že mají na povrchu fagolysozomálních vakuol transportéry (NRAMP proteiny), které zajišťují pumpování dvojmocných iontů železa ven, a tím ho znepřístupňují parazitům, které předtím fagocytovaly (Forbes, Gros 2001), viz Obr. 2. Dochází tak k přirozenému obrannému procesu pomocí transportérů s vysokou afinitou k danému iontu, leishmanie se není schopná vyvíjet a je náchylnější na oxidativní stres uvnitř makrofága. Tento mechanismus tedy dává prostor pro různé modulační transportérů pomocí farmakologických prostředků na zefektivnění léčby leishmaniózy.



Obr. 2. Transport železa pomocí Nrampl a LIT1 přenašečů v makrofázích infikovaných leishmaniemi. Nrampl je exprimován v lysozomech a následně rekrutován do membrán maturujících fagolysosomů. Nrampl pumpuje Fe²⁺ ionty ven z fagolysosomů. LIT1 je exprimován na plasmatické membráně intracelulárních amastigotů a transportuje preferenčně Fe²⁺ ionty dovnitř buňky (podle Marquis, Gros 2007).

Nedávné studie sledovaly také spojitost mezi nedostatkem železa a leishmaniózou, jelikož oboje patří mezi častá onemocnění v populaci. Myši (kmen BALB/c) byly experimentálně infikovány *Leishmania chagasi* a poté u nich byla vyvolána deficeence železa pomocí chelatační látky DFO. DFO nezpůsobilo žádné výrazné změny na váze myši či jejich hmotnosti jater a sleziny. Výsledky u těchto myši byly nejpříhodnější ve 4. a 6. týdnu, což je období, kdy se nejvíce rozvíjí jaterní, resp. slizniční forma parazitémie, a u sledovaných myši bylo množství parazitů v tkáni výrazně potlačeno (Malafaia *et al.* 2011). Vyvolání nedostatku železa u hostitele tedy může mít výrazný vliv na rozvoj leishmanióz a celkově by tedy mohla tato metoda být využívána do budoucna. Nicméně je nutné nalézt hranici, kdy je deficeence natolik vysoká, aby zabránila vývoji leishmanií, ale zároveň natolik nízká, aby negativně neovlivňovala imunitní systém pacienta.

Naopak ještě novější studie se zabývají druhou možností, a to nadbytkem železa v organismu hostitele a jeho dopadem na vývoj leishmanií. I přesto, že je známo, že nadbytek železa spíše zvyšuje citlivost hostitele na mnoho patogenů a jeho nedostatek naopak limituje růst parazitujícího organismu (Weinberg 1999), bylo zde dosaženo paradoxně naprosto opačných výsledků, než ve studii Malafaia. *Leishmania infantum* se zdárně vyvíjela i v myších, které měly nízký příjem železa ve stravě. V porovnání s kontrolní skupinou nebyly rozdíly v množství parazita v játrech a slezině (Vale-Costa *et al.* 2013). Studie Vale-Costy dále sleduje také vývoj *Leishmania infantum* v myších, které měly před vyvoláním infekce zvýšenou hladinu železa, a to 3 až 8 krát. Množství leishmanie v infikovaných myších bylo signifikantně nižší po dobu experimentu než u kontrolní skupiny. Tento experiment také ukazuje, že železo se následně kumuluje uvnitř makrofágů. Externě podávané železo tak podporuje oxidativní ochranný mechanismus hostitele a brání tak pomnožení amastigotů, kteří vykazují ještě vyšší citlivost na zvýšenou hladinu železa (inhibice růstu nastává mezi 0,56 až 18 mM železa). U promastigotů dochází ke změnám charakteristickým pro stresové situace (ztráta běžné motility, oválná forma buněk) při koncentracích železa vyšších než 9 mM (Vale-Costa *et al.* 2013). Je tedy patrné, že je zapotřebí tuto problematiku prozkoumat podrobněji, jelikož různé druhy leishmanií mohou na podobnou léčbu reagovat naprosto opačným způsobem.

Význam železa pro přežití promastigotů *Leishmania major* dokazují i studie Soteriadoua, které testují více chelatačních látek, přičemž pozitivní výsledek na deprivaci růstu leishmanií měly všechny tři studované chelátory. DFO se ale ukázalo oproti zástupcům

hydroxypyridinových chelátorů (L1, CP94) méně účinné. Nicméně, inhibice růstu byla signifikantní a po odstranění chelátoru L1 a přidání média s vyšším obsahem železa došlo opětovně k růstu kultury, což dokazuje, že vývoj promastigotů je závislý na dostupnosti železa v jejich okolí (Soteriadou *et al.* 1995).

Pro dosažení lepších výsledků při terapii leishmanióz pomocí chelatačních činidel se v dnešní době pracuje na syntéze nových kombinací již známých látek. Například konjugace chelatačních činidel chlorochinu a deferipronu dala vzniknout obdobným látkám, které jsou ale čtyřikrát účinnější proti *Leishmania infantum* než deferiprone samotný (Gehrke *et al.* 2013). Tato aktivita byla ale zaznamenána pouze u promastigotů, u amastigotů se kýžený efekt chelátoru nedostavil ani při jeho vysokých koncentracích, což může být způsobeno rozdílností metabolismu obou forem anebo také limitovaným příjmem dané látky makrofágy.

Zmíněné studie poukazují na zajímavý vztah leishmanií a železa, a tudíž by tato cesta experimentálního testování různých chelatačních látek mohla být efektivní v boji proti tomuto paratitovi, který je stále trvající hrozbou v populaci. Celkově, i přes závažnost tohoto onemocnění a jeho rozšíření, je leishmanióza přehlíženým tématem, kterému by se mělo věnovat více pozornosti. Dle posledních pokusů sumarizovat data, je každoročně zaznamenáno až 58 000 případů viscerální a 220 000 kožní leishmaniózy (Alvar *et al.* 2012). Přesto, že tato čísla nejsou přesná, vzhledem k velkému objemu dat a také špatné evidenci pacientů v některých zemích, rozhodně leishmaniózy stojí v popředí významných parazitických infekcí.

4.3. *Trypanosoma*

4.3.1. Životní cyklus trypanosom a způsobená onemocnění

Trypanosoma patří stejně jako leishmanie do dvouhostitelských Trypanosomatid. Během svého životního cyklu jsou schopny různé druhy trypanosom parazitovat téměř na všech třídách obratlovců a přenášeny jsou nejčastěji hmyzími přenašeči, pijavkami nebo také kontaminativně. V přenašeči dochází k důležité části vývoje, kdy se trypanosomy pomnožují a diferencují na infekční stádia schopná nakazit nového hostitele (např. metacykličtí trypomastigoti). V obratlovcích se pomnožují jako trypomastigoti (*T. brucei*), epimastigoti či amastigoti (*T. cruzi*) (Volf, Horák *et al.* 2007).

Mezi zdravotnický významné druhy patří zejména *Trypanosoma cruzi* rozšířená v tropickém a subtropickém pásu Jižní a Střední Ameriky, přenášena plošticemi podčeledi Triatominae. Jsou původcem závažné trypanosomózy (Chagasova choroba), která se projevuje nejprve mírnější akutní fází následovanou fází chronickou, kdy dochází k zánětu srdečního svalu či zbytnění jícnu a tlustého střeva. Zatím nebyl nalezen účinný lék. Dalšími významnými zástupci jsou poddruhy *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* a *T. brucei rhodesiense*, které nalezneme převážně na africkém kontinentu a hostitele infikují pomocí svého vektora - glosin, neboli mouchy "tse-tse". Dvě poslední výše zmíněné způsobují chronickou, resp. akutní spavou nemoc, které oboje bez léčení končí smrtí (Volf, Horák *et al.* 2007). Toto onemocnění je především podmíněné schopností trypanosom měnit své povrchové antigeny (vrstva variabilního povrchového glykoproteinu) a imunita nakaženého jedince je poté vyčerpána v důsledku neustálé aktivace (Pays *et al.* 2001).

4.3.2. Metabolismus železa trypanosom

Pro krevní formy trypanosom, jako jsou africké trypanosomy, je hlavním zdrojem transferin přítomný v krvi a jiných tělních tekutinách. *T. brucei* exprimuje unikátní receptory, které jsou kódované v genomu v místech pro variabilní povrchové glykoproteiny. Tyto receptory se vyskytují pouze ve fázi životního cyklu, kdy jsou trypanosomy přítomny ve svém hostiteli (savci). Po navázání na receptory je transferrin endocytován a v endozómech je následně železo uvolněno pro potřebu parazita díky kyselému prostředí. U ostatních forem trypanosom, jako jsou procyklická stádia, je toho o metabolismu železa známo velmi málo

(Taylor, Kelly 2010). Recentní studie ale ukazují, že procyklické formy přijímají železité ionty ve dvou krocích a to tak, že je nejprve redukují na využitelné železnaté a následně je transportují do buněk. Toto může je zřejmě efektivní mechanismus, jak si zajistit železo v prostředích jako je střevo hmyzího přenašeče nebo jeho slinné žlázy, kde se transferrin nevyskytuje. (Mach *et al.* 2013).

4.3.3. Využití chelatačních látek v terapii trypanosomální infekce

První zprávy o možné souvislosti mezi koncentrací železa a rozvojem trypanosomální infekce se objevují již v 80. letech v pracích Lalondea a Holbeina (1984) a Looa a Lalondeho (1984). Autoři pozorovali, že po snížení hladiny dostupného železa v experimentálně infikovaných myších pomocí DFO, nebo pomocí kontrolované diety, dochází k redukcí parazitémie a zůstává více přeživších myší. Obě práce tedy v závěru potvrzují myšlenku, že *in vivo* efekt snížené hladiny železa koreluje se snížením růstu a patogenity parazita (Lalonde, Holbein, 1984; Loo, Lalonde, 1984).

DFO, nejčastěji využívaná chelatační látka, má podle mnoha studií trypanostatický efekt. U myší infikovaných *T. cruzi*, kterým byl po dobu 35 dnů (se začátkem 14 dnů před infikováním) podáván 5 mg DFO denně, byla zaznamenána nižší hladina parazitémie a také nižší mortalita (Arantes *et al.* 2011). Stejně pozitivní výsledky po deprivaci železa u *T. cruzi* zaznamenaly i jiné studie dlouhodobé léčby pomocí DFO (Arantes *et al.* 2007). Výhody této chelatační látky, které vyplývají ze studie Arantesové, jsou především v tom, že DFO působí zřejmě nezávisle na metabolismu železa hostitele a stejně tak nemá žádné signifikantní hematologické vedlejší účinky. DFO zaznamenal také slibné výsledky v terapii afrických trypanosom. Krevní forma *T. brucei* je až 10krát náchylnější na deprivaci železa pomocí DFO než běžné savčí buňky. Hlavním cílem DFO jsou zřejmě některé z nepostradatelných enzymů vázících železo, jako například ribonukleotid reduktáza nutná pro syntézu DNA. Usuzovat se tak dá vzhledem k tomu, že u *T. brucei* vystaveným DFO je syntéza DNA na pouhých 18 % oproti kontrolnímu vzorku (Breidbach *et al.* 2002). Výsledky studií Breidbacha či Arantesové tedy nasvědčují tomu, že anti-trypanosomální efekt DFO je založen na specifickém zásahu do metabolismu železa tohoto parazita.

Působení DFO na trypanosomy není zřejmě pouze v tom, že znepřístupňuje parazitovi zdroje železa, ale také DFO vyvolává v průběhu infekce odpověď organismu hostitele ve zvýšení

oxidativního stresu, což má napomoci zneškodnit parazita. DFO ale také samo o sobě funguje v infikovaném organismu jako antioxidant, a to zejména v játrech, a zabraňuje přílišnému poškození tkáně oxidativním stresem způsobeným Chagasovou nemocí (Francisco *et al.* 2010). Z toho je patrné, že DFO má během terapie infekce trypanosomami více (i protichůdných) rolí a je tedy důležité nalézt optimální podmínky pro jeho využití.

K léčbě Chagasovy nemoci způsobené *T. cruzi* se využívá již mnoho let látka benznidazol, která je komerčně dostupná hlavně v Brazílii (Coura, de Castro 2002). Ta sice nepůsobí jako chelátor, ale její kombinace s již testovaným DFO se zdá být velice úspěšná, jak potvrdily studie Francisca. U infikovaných myší poklesla parazitémie a mortalita během období, kdy jim byl podáván DFO nebo benznidazol samostatně. Léčba kombinací obou látek po dobu 35 dnů ale snížila mortalitu na 0 % (Francisco *et al.* 2008).

DFO není zdaleka jediným chelatačním činidlem schopným inhibovat trypanosomy. Požadavky na tyto látky jsou zejména: 1) minimální toxicita vůči organismu hostitele, 2) schopnost tvořit stabilní komplexy s některými z esenciálních kovů - železo, měď či zinek a také 3) nezbytná míra hydrofobicity dané látky. Ve studii Rodriguese (1995) vykazovala většina z 30ti testovaných chelatačních látek různých chemických vlastností inhibiční účinek *T. cruzi* a některé se dokonce blížily 70 %, což je výrazně více oproti 46% u benznidazolu (Rodrigues *et al.* 1995), který se běžně využívá v léčbě trypanosomóz a který ale funguje na jiném principu než chelátory. Mnoho výzkumných týmů obrátilo pozornost právě k chelatačním látkám a jejich možnému terapeutickému využití v boji proti trypanosomám. Podle studie Merschjohannové a Steverdinga (2006), ve které testovali účinky 13ti látek vůči *T. brucei* a stanovovali jejich hodnotu IC₅₀, pouze dva z vybraných chelátorů nevykazovaly anti-trypanosomální aktivitu. I přesto, že látky testované v tomto případě nejsou příliš vhodné pro klinické použití, alespoň zdůrazňují fakt, že chelátory lipofilní povahy mají velký potenciál ve vývoji nových léků proti těmto parazitům (Merschjohann, Steverding 2006). Stále totiž narážíme na fakt, že k chemoterapii afrických trypanosom se využívají léky vyvinuté před několika desetiletími a některé z nich ještě vykazují vedlejší účinky (Fairlamb 2003), přičemž dalším problémem je také narůstající rezistence trypanosom vůči používaným látkám (Matovu *et al.* 2001).

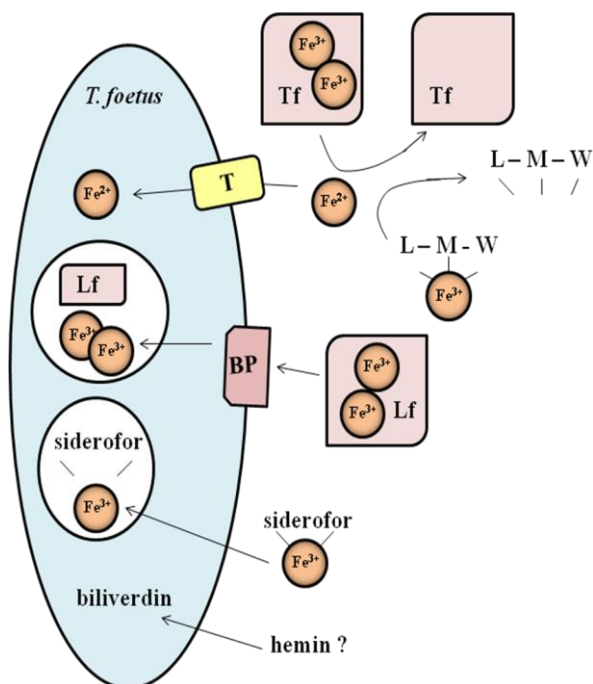
4.4. Trichomonas, Tritrichomonas

4.4.1. Životní cyklus a způsobená onemocnění

Zástupci řádu Trichomonadida jsou dobře známou skupinou flagelátních protozoí, kteří se adaptovali na anaerobní či mikroaerobní prostředí. Nalezneme je většinou jako komenzály v trávicím traktu různých obratlovců i bezobratlých, některé druhy jsou volně žijící a některé jsou pro své hostitele patogenní (Kulda 1999a). Významné parazitující druhy rodu *Trichomonas* (*T. vaginalis*) a *Tritrichomonas* (*T. foetus*) jsou původci urogenitální trichomonózy u lidí, resp. u skotu. Tato onemocnění patří mezi nejrozšířenější sexuálně přenosné choroby, které často probíhají zprvu asymptomaticky. U člověka se nevytváří imunita proti *T. vaginalis*, takže je možná i reinfekce a některé kmeny si dokonce vytvořily resistenci vůči používaným lékům (metronidazol). U žen se projevuje zánětem vagíny, pochvy či charakteristickým výtokem. Muži bývají většinou asymptomatickými nosiči a výjimečně u nich může propuknout zánět varlat nebo prostaty. U skotu jsou opět nosiči infekce *T. foetus* býci, u kterých má onemocnění většinou mírný průběh, zato u krav může infekce skončit až úplnou sterilitou. Aby se předcházelo výrazným ekonomickým ztrátám v chovech, řeší se situace především v Evropě umělou inseminací (Volf, Horák *et al.* 2007).

4.4.2. Metabolismus železa *Trichomonas* a *Tritrichomonas*

Obecně je známo relativně málo o tom, jak trichomonády přijímají železo a o to méně pak o jeho transportu uvnitř buňky. Trichomonády jsou schopné přijímat železo z mnoha zdrojů ve svém okolí (viz Obr. 3). *Tritrichomonas foetus* je například schopná získávat železo navázané na malé chemické látky, tzv. siderofory, které jsou produkovány mikroorganismy a mají vysokou afinitu pro daný kov. Železo poté vstřebává zřejmě nespecificky za pomoci pinocytózy a uvolňuje pro svou potřebu v kyselém prostředí intracelulárních váčků (Sutak *et al.* 2004b). Dalším potenciálním zdrojem je pro *T. foetus* hemin. Jelikož je zde ale železo vázáno pevně, je potřeba specifických enzymů (hem oxygenázy) na jeho vyvázání. Stopy biliverdinu, který je produktem aktivity tohoto enzymu, byly nalezeny v buňkách *T. foetus* kultivované s heminem (Sutak *et al.* 2004b). Jedny z hlavních efektivních zdrojů ale zůstávají pro trichomonády pravděpodobně proteiny transferrin a lactoferrin, přičemž lactoferrin se zřejmě dostává do buňky pomocí receptorem řízené endocytózy (Tachezy *et al.* 1996).



Obr. 3. Navrhované mechanismy příjmu železa u *Trichomonas foetus*. Železo z transferinu (Tf) a nízkomolekulárních komplexů (L – M – W) je redukováno, uvolněno a transportováno do buňky zatím neznámým transportním systémem (T). Železo z lactoferrinu (Lf) se dostává do buňky pomocí endocytózy, kterou zprostředkovává specifický vazebný protein (BP). Železo navázané na siderofory je nespecificky pinocytováno a v kyselém prostředí intracelulárních vesikulů poté vyvázáno. Dalším potenciálním zdrojem by mohl být hemin, který je hem oxygenázou degradován na biliverdin (podle Sutak *et al.* 2008).

Zajímavostí v metabolismu železa u trichomonád je jejich schopnost přizpůsobit se jeho deprivaci tím, že mohou využívat alternativního metabolismu. Běžně totiž dochází v hydrogenozómech (typické orgány pro amitochondriální organismy) k přeměně malátu či pyruvátu na H_2 , CO_2 a acetát za využití železosírných proteinů (např. pyruvát:ferrodoxin oxidoreduktáza). Po kultivaci *Trichomonas foetus* v podmínkách chudých na železo *in vitro* došlo ke snížení typických produktů této dráhy i jeho proteinů, toto si ale trichomonády jsou schopné kompenzovat aktivací cytosolické dráhy přeměny pyruvátu na etanol (Vaňáčková *et al.* 2001).

4.4.3. Železo jako faktor virulence u trichomonád

Jak již bylo řečeno, železo je esenciálním prvkem pro vývoj většiny organismů, *T. foetus* má v porovnání s ostatními amitochondriálními protisty velmi vysoké nároky na množství železa (50 - 100 μM) (Tachezy *et al.* 1996). Při jeho nedostatku můžeme u *T. vaginalis* pozorovat až

80 % snížení syntézy proteinů, až třikrát se sníží denzita buněk v médiu a mimo jiné dochází i prodloužení generační doby trichomonád až 2,5krát oproti normálním podmínkám (Lehker, Alderete 1992). U *T. vaginalis* spočívá vliv železa na virulenci v tom, že se mění schopnost parazita adherovat na povrch epiteliálních buněk svého hostitele. Po kultivaci trichomonády v médiu s dostatkem až přebytkem železa vzrostly hodnoty cytoadherence. Naopak médium s nedostatkem železa působilo opačným efektem a *T. vaginalis* ztrácí na virulenci a patogenitě (Ryu *et al.* 2001). Dalším nesporným důkazem, že železo je pro trichomonády nezbytným faktorem virulence, je studie Kuldy *et al.* (1999). U kmene *T. foetus* KV-1 se běžně mortalita po rozvoji infekce pohybuje okolo 5 %, avšak po zvýšení množství dostupného železa vzrostla u infikovaných myší mortalita až na 80 %, což je obvyklá hodnota pro vysoce virulentní kmen LUB-1MIP. Tyto výsledky naznačují, že příjem železa je důležitý pro rozvoj infekce a schopnost parazita se v hostiteli pomnožovat (Kulda *et al.* 1999b).

Běžně se pro léčbu infekce trichomonádami využívají látky jako je metronidazol. Mnoho kmenů si však již stačilo vytvořit rezistenci vůči těmto léčivům, a tak je pochopitelně snaha nalézt účinnější prostředky. Jedním z nich by mohla být látka omeprazole, která inhibuje pyruvát dekarboxylázu, klíčový enzym pro produkci etanolu v rámci cytosolického metabolismu. Toto by mohla být jedna z využitelných vlastností pro léčbu infekcí, jelikož trichomonády s nedostatkem železa mají nefunkční metabolismus hydrogenozómů a závisí tedy na etanolové fermentaci v cytosolu (Sutak *et al.* 2004a). Spojení deprivace železa (a tedy potlačení metabolismu v hydrogenozómech) a terapie látkou omeprazole (zablokování pyruvát dekarboxylázy) může být efektivním způsobem, jak bojovat proti tomuto parazitovi.

Přestože je toho již dost známo o vlivu hladiny železa na virulenci trichomonád, stále neexistuje mnoho studií zabývajících se vlivem chelatačních látek na růst a vývoj parazita a jejich využití v terapii této infekce.

5. Závěr

Tato práce shrnuje poznatky o tom, jaký vliv má železo na růst vybraných druhů parazitických protist a jaký dopad má nadbytek či nedostatek železa na jejich virulenci. Železo je nepostradatelným prvkem pro téměř všechny organismy a je nezbytné pro zachování mnoha funkcí, například replikace DNA. Jak je známo, parazitické organismy se vyznačují schopností rychlé reprodukce, proto je pro ně dostatečný zdroj železa zcela zásadní. Vzhledem k tomu, že parazitické organismy jsou všude kolem nás, stal se boj s nimi „během na dlouhou trať“. Často se stane, že používané léky přestanou fungovat, jelikož si rychle se vyvíjející parazité stihnou vytvořit resistenci. Je tedy důležité neustále nalézat nové prostředky proti nepřetržitě hrozícím onemocněním, která především v tropických a subtropických oblastech, způsobují závažné ztráty na životech.

Studie vlivu železa na vývoj zástupců parazitických protist rodu *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* a *Tritrichomonas* ukazují důležitou roli tohoto kovu pro jejich růst a vývoj. Studovanými látkami, které způsobují v organismu deprivaci železa, jsou chelatační činidla, která specificky s vysokou afinitou váží daný kov. Tyto látky potvrdily svůj vysoký potenciál stát se novým prostředkem léčby anebo fungovat v kombinaci s již známými léky. Stále ale hledáme ideální látku, či kombinace látek, které by měly požadované antiparazitální účinky a nezatěžovaly by příliš organismus pacienta. Například hlavní chelátor desferrioxamine, který je klinicky využíván k léčbě nadbytku železa, má stále mnoho nedostatků i přes velmi dobré výsledky v léčbě malárie. V praxi se ale chelátory k léčbě parazitálních infekcí příliš nevyužívají. Do budoucna by bylo tedy vhodné testovat látky úspěšné *in vitro* také *in vivo* a jejich kombinace s již využívanými léčivy. Vzhledem k rozšíření těchto onemocnění v zemích tropického a subtropického pásu by měly takové látky splňovat i kritérium snadné finanční dostupnosti.

Železo se tedy z dostupných studií jeví jako důležitým faktorem virulence u vybraných parazitických protist a jeho metabolismus společně s využitím chelatačních látek v terapiích rozhodně stojí za další podrobnější zkoumání.

6. Literatura

Alvar, J. et al., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), p.e35671.

Andreini, C. et al., 2008. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 13(8), pp.1205–18.

Andrews, Nancy C., 1999. Disorders of iron metabolism. *New England Journal of Medicine*, 341(26), pp.1986-1995.

Arantes, J.M. et al., 2007. Trypanosoma cruzi: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. *Experimental parasitology*, 117(1), pp.43–50.

Arantes, J.M. et al., 2011. Trypanosoma cruzi: desferrioxamine decreases mortality and parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect. *Experimental Parasitology*, 128(4), pp.401–408.

Atkinson, C.T. et al., 1991. Stage-specific ultrastructural effects of desferrioxamine on Plasmodium falciparum in vitro. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 45(5), pp.593-601.

Bertini, I. et al., 2007. *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*. Sausalito, Calif.: University Science Books.

Breidbach, T. et al., 2002. Growth inhibition of bloodstream forms of Trypanosoma brucei by the iron chelator deferoxamine. *International journal for parasitology*, 32(4), pp.473–9.

Brittenham, G.M., 1992. Development of iron-chelating agents for clinical use. *Blood*, 80(3), pp.569-574.

Cabantchik, Z I, Moody-Haupt, S. & Gordeuk, V R, 1999. Iron chelators as anti-infectives; malaria as a paradigm. *FEMS immunology and medical microbiology*, 26(3-4), pp.289–98.

Carvalho, S. et al., 2009. Heme as a source of iron to Leishmania infantum amastigotes. *Acta tropica*, 109(2), pp.131–5.

Coura, J.R., Castro, S.L., 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), pp.3-24.

Crichton, R., 2001. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*, 2nd ed. Chichester: Wiley J. R. Boelaert et al., eds., John Wiley & Sons.

Egan, T.J. et al. 2002. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Journal*, 365(2), pp.343-347.

Fairlamb A. H., 2003. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in Parasitology*, 19(11), pp.488-494.

Fenton H. J. H., 1894. LXXIII. – Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society*, 65(11), pp.899-910.

Ferrer, P. et al., 2012. Antimalarial Iron Chelator, FBS0701, Shows Asexual and Gametocyte *Plasmodium falciparum* Activity and Single Oral Dose Cure in a Murine Malaria Model. *PLoS ONE*, 7(5), p.e37171.

Fontecave, M. & Pierre, J.L., 1993. Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie*, 75(9), pp.767–73.

Forbes J. R., Gros, P., 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-patogen interaction. *Trends in Microbiology*, 9(8), pp.397-403.

Francis, S. E. et al. 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, 51, pp.97-123.

Francisco, A.F. et al., 2008. Trypanosoma cruzi: effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. *Experimental parasitology*, 120(4), pp.314–9.

Francisco, A.F. et al., 2010. Increase of reactive oxygen species by desferrioxamine during experimental Chagas' disease. *Redox report: communications in free radical research*, 15(4), pp.185–90.

Freedman, M. H. et al., 1990. Pulmonary syndrome in patients with thalassemia major receiving intravenous deferoxamine infusions. *American Journal of Diseases of Children*, 144(5), pp.565-569.

Gehrke, S.S. et al., 2013. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(3), pp.805–13.

Hammadi, A. et al., 2003. Cellular uptake of a catechol iron chelator and chloroquine into *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*, 65(8), pp.1351–1360.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. & Andrews, N.C., 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117(3), pp.285–97.

- Hershko, C. & Peto, T.E., 1988.** Deferoxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. *The Journal of experimental medicine*, 168(1), pp.375–87.
- Huynh, C. et al., 2006.** Leishmania amazonensis ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes: current and future prospects. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), pp.2363-2375.
- Jomova, K., Baros, S. & Valko, M., 2012.** Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Metal Chemistry*, 37(2), pp.127–134.
- Kulda, J et al., 1999b.** Iron enhancement of experimental infection of mice by Tritrichomonas foetus. *Parasitology Research*, 85(8-9), pp.692–699.
- Kulda, J. et al. 1999a.** Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance: current and future prospects. *International Journal for Parasitology*, 29(2), pp.199-212.
- Lalonde, R. G., Holbein, B. E. 1984.** Role of iron in Trypanosoma cruzi infection of mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 73(2), pp.470-476.
- Lehker, M.W. & Alderete, J F, 1992.** Iron regulates growth of Trichomonas vaginalis and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Molecular microbiology*, 6(1), pp.123–32.
- Liu, X. & Theil, E.C., 2005.** Ferritins: Dynamic Management of Biological Iron and Oxygen Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 38(3), pp.167–175.
- Loo, V.G. & Lalonde, R.G., 1984.** Role of iron in intracellular growth of Role of Trypanosoma cruzi. *Infection and Immunity*, 45(3), pp.726-730.
- Loyevsky, M, John, C., et al., 1999a.** Chelation of iron within the erythrocytic Plasmodium falciparum parasite by iron chelators. *Molecular and biochemical parasitology*, 101(1-2), pp.43–59.
- Loyevsky, M, Sacci, J.B., et al., 1999b.** Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii: effect of the iron chelation prodrug dexrazoxane on in vitro cultures. *Experimental parasitology*, 91(2), pp.105–14.
- Lytton, S. D. et al. 1993.** Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials: I. Membrane permeation properties and cytotoxic activity. *Blood*, 81(1), pp.214-221.
- Lytton, S.D. et al., 1994.** Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials: II. Evidence for differential effects on parasite iron-dependent nucleic acid synthesis. *Blood*, 84(3), pp.910–5.
- Mach, J. et al. 2013.** Efficient iron uptake via reductive mechanism in procyclic Trypanosoma brucei. *Journal of Parasitology*, 99(2), pp.363-364.

- Malafaia, G. et al., 2011.** Leishmania chagasi: effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. *Experimental parasitology*, 127(3), pp.719–23.
- Marquis, J-F., Gros, P. 2007.** Intracellular Leishmania: your iron or mine?. *Trends in Microbiology*, 15(3), pp.93-97.
- Matovu, E. et al. 2001.** Drug resistance in Trypanosoma brucei spp., the causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle. *Microbes and Infection*, 3(9), pp.763-770.
- Merschjohann, K., Steverding, D. 2006.** In vitro growth inhibition of bloodstream forms of Trypanosoma brucei and Trypanosoma congolense by iron chelators. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 5(3)
- Mohanty, D. et al. 2002.** Deferiprone (L1) as an adjuvant therapy for Plasmodium falciparum malaria. *Indian Journal of Medical Research*, 115, pp.17-21.
- Mühlenhoff, U., Lill, R. 2000.** Biogenesis of iron–sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1459(2-3), pp.370-382.
- Nemeth, E., Ganz, T. 2009.** The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematologica*, 122(2-3), pp.78-86.
- Núñez, M. T. et al. 1990.** Mobilisation of iron from endocytic vesicles. The effect of acidification and reduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, pp.6688-6692.
- Okada, K. 2009.** The novel heme oxygenase-like protein from Plasmodium falciparum converts heme to bilirubin IX α in the apicoplast. *FEBS Letters*, 583(2), pp.3313-319.
- Pays, E. et al. 2001.** The VSG expression sites of Trypanosoma brucei: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 114, pp.1-16.
- Pollack, S. et al. 1987.** Desferrioxamine suppresses Plasmodium falciparum in Aotus monkeys. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 184(2), pp.162-4.
- Portugal, S. et al. 2011a.** Host-mediated regulation of superinfection in malaria. *Nature Medicine*, 17(6), pp.732-737.
- Portugal, S., Drakesmith, H. & Mota, M.M., 2011b.** Superinfection in malaria: Plasmodium shows its iron will. *EMBO reports*, 12(12), pp.1233–42.
- Pradines, B., 2002.** Iron chelators as antimalarial agents: in vitro activity of dicatolate against Plasmodium falciparum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(2), pp.177–187.
- Raventos-Suarez, C. et al. 1982.** Plasmodium falciparum: Inhibition of in vitro growth by desferrioxamine. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 31(5), pp.919-922.

- Rodrigues, R.R. et al., 1995.** Chelating agent inhibition of Trypanosoma cruzi epimastigotes in vitro. *Journal of inorganic biochemistry*, 60(4), pp.277–88.
- Rotheneder, A. et al. 2002.** Effects of synthetic siderophores on proliferation of Plasmodium falciparum in infected human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), pp.2010-3.
- Ryu, J. S., et al. 2001.** Effect of iron on the virulence of Trichomonas vaginalis. *Journal of Parasitology*, 87(2), pp.457-460.
- Scholl, P. F., et al. 2005.** Bioavailable iron and heme metabolism in Plasmodium falciparum. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 295, pp.293-324.
- Sigala, P.A. et al., 2012.** Direct Tests of Enzymatic Heme Degradation by the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(45), pp.37793–37807.
- Smith, R. S. et al. 1962.** Iron Excretion in Thalassaemia Major After Administration of Chelating Agents. *BMJ*, 2(5319), pp.1577-1580.
- Soteriadou, K. et al. 1995.** Effect of iron chelation on the in-vitro growth of leishmania promastigotes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(1), pp.23-29.
- Sutak, R. et al. 2004a.** Pyruvate Decarboxylase, the Target for Omeprazole in Metronidazole-Resistant and Iron-Restricted Tritrichomonas foetus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), pp.2185-2189.
- Sutak, R. et al., 2004b.** Siderophore and haem iron use by Tritrichomonas foetus. *Microbiology*, 150(12), pp.3979–3987.
- Sutak, R. et al., 2008.** Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends in Microbiology*, 16(6), pp.261–8.
- Tachezy, J et al., 1996.** Tritrichomonas foetus: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Experimental Parasitology*, 83(2), pp.216–28.
- Taylor, M C & Kelly, J M, 2010.** Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology*, 137(6), pp.899–917.
- Theil E. C. 1990.** Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(9), pp.4771-4.
- Thuma, P E et al., 1998.** Assessment of the effect of the oral iron chelator deferiprone on asymptomatic Plasmodium falciparum parasitemia in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(3), pp.358–64.
- Vale-Costa, S. et al., 2013.** Iron Overload Favors the Elimination of Leishmania infantum from Mouse Tissues through Interaction with Reactive Oxygen and Nitrogen Species Y. M. Traub-Csekö, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2), p.e2061.

Vaňáčová, S. et al., 2001. Iron-induced changes in pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and involvement of iron in expression of hydrogenosomal proteins. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 1), pp.53–62.

Volf, P., Horák, P. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha, Triton.

Walcourt, A. et al., 2004. Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(3), pp.401–407.

Weinberg E. D. 1999. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(3), pp. 231-8.

Whitehead, S., Peto, T. E. 1990. Stage-dependent effect of Deferoxamine on growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Blood*, 76(6), pp.1250-1255.

WHO 1993. Global Malaria Control. *Bulletin of the World Health Organization*, 71(3-4), pp.281-284.

Williams, J. & Moreton, K., 1980. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum. *The Biochemical journal*, 185(2), pp.483–8

Wilson, M E, Vorhies, R.W., Andersen, K. a, et al., 1994. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infection and immunity*, 62(8), pp.3262–9.

Wilson, Mary E. et al., 2002. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. *Experimental parasitology*, 100(3), pp.196–207.