

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Klára Wernerová

Homeostáza železa u malárie
Iron homeostasis in malaria

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli, RNDr. Róbertu Šuťákovi, Ph.D. a RNDr. Janu Machovi, Ph.D. za odborné rady, vstřícnost a čas, který mi při zpracovávání této práce věnovali.

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, 2. 6. 2020

Podpis

Abstrakt

Ačkoliv je malárie značně zkoumaným infekčním onemocněním, stále s ní nedokážeme dostatečně účinně bojovat, o čemž vypovídá poměrně vysoký počet nakažených. Existuje sice množství antimalarik, nicméně na řadu z nich vzniká rezistence, proto je třeba vyvíjet nová, účinnější léčiva. Jednou z možností je zacílit na parazitův metabolismus železa, esenciálního prvku všech organismů. Železo se účastní syntézy DNA, dýchání a výroby energie. Funguje jako kofaktor ribonukleotid reduktázy, metaloproteinů s FeS klastry nebo hemem. Během infekce musí paraziti s hostitelem bojovat o potřebné látky, a tedy také o železo. Mechanismus příjmu nebo vylučování železa u původce malárie není zatím zcela jasný, jsou známy pouze 2 transportéry železa a již nyní je zřejmé, že jich musí být více. Parazit rodu *Plasmodium* tráví velké množství hemoglobinu, který je následně degradován na volný hem a denaturovaný globin. Volný hem je však pro buňku toxický. *Plasmodium* se toxicitě volného hemu brání tvorbou chemicky inertního hemozoinu. Tento unikátní mechanismus ochrany před toxicitou volného hemu je pro *Plasmodium* i ostatní krevní parazity velice výhodný, protože ho však nesdílí se svým hostitelem, stává se rovněž výhodným cílem pro léčiva. Další možností chemoterapie je použití chelátorů železa. Chelátory vykazují dvojitý způsob účinku, buďto železo vychytávají a znemožňují tak jeho využití organizmem, nebo s ním tvoří toxické komplexy. Jejich účinnost při léčbě malárie je však poněkud rozporuplná. Klinicky nejvyužívanější deferoxamin má totiž celou řadu nevýhod, které znesnadňují léčbu malárie, proto jsou vyvíjeny nové sloučeniny eliminující tyto nevýhodné vlastnosti. Chelátory železa proto stále představují zajímavou potencionální strategii při léčbě malárie.

Klíčová slova: *Plasmodium*, malárie, metabolismus železa, chemoterapeutika, chelátory

Abstract

Although malaria is a well-studied infectious disease, we are still unable to fight it effectively, as evidenced by a large number of infected people. Many drugs are available against malaria. However, because of incessantly emerging resistances, new, more effective antimalarials need to be developed. One possibility is to target the parasite's iron metabolism, the essential element of all organisms. Iron participates in DNA synthesis, respiration, energy production. It acts as a cofactor of ribonucleotide reductase, and metalloproteins with FeS clusters or heme. During the infection, the parasite must compete with the host for nutrients, including iron. The mechanism of iron uptake or excretion in malaria parasite is not completely clear. Only two iron transporters are known, but it is already evident, that there must be more of them. The *Plasmodium* parasite digests a large amount of hemoglobin, which is degraded into free heme and denatured globin. Free heme is toxic to the cell though. *Plasmodium* defends itself from the toxicity of free heme by forming chemically inert hemozoin. This unique mechanism of protection against the free heme toxicity is very useful for *Plasmodium* and other blood parasites, but it also becomes an advantageous target for drugs because the mechanism is present only in the parasite, not in the host. Another option for chemotherapy is to use the iron chelators. Chelators have a dual nature. They can either withhold iron and make it unavailable for the organism, or they can form a toxic complex with iron. The efficacy of chelators during the treatment of malaria is a bit contradictory. The most used chelator, in clinical practice, deferoxamine, has many disadvantages that make the treatment of malaria difficult. This is the reason for developing new compounds, which could eliminate these disadvantages. Therefore, iron chelators are still an interesting potential strategy concerning the treatment of malaria.

Key words: *Plasmodium*, malaria, iron metabolism, chemotherapeutics, chelators

Seznam zkratk

ARDS	acute respiratory distress syndrome (syndrom akutní dechové tísně)
BAT	ethan-1,2-bis(N-1-amino-3-ethylbutyl-3-thiol)
CCC1	Ca ²⁺ -sensitive cross complementer 1
DFO	deferoxamin
DMT-1	divalent metal transporter 1 (transportér dvojmocného kovu 1)
ER	endoplazmatické retikulum
FAC	ferric ammonium citrate (citrát železito-amonný)
Hb	hemoglobin
HDP	heme detoxification protein (protein detoxifikace hemu)
HNFB	2-hydroxy-1-naftylaldehyd-m-fluorobenzoyl hydrazon
Hz	hemozoin
LIP	labile iron pool (labilní zásoby železa)
MA-DFO	methylanthranilic-DFO
met-Hb	methemoglobin
SF1-ileu	syntetický ferrichrom obsahující izoleucin
SIH	salicylaldehyd-isonikotinoyl hydrazon
TAT	N',N',N'-tris(2-methyl-2-mercaptopropyl)1,4,7-triazacyklononan
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin
VIT	vacuolar iron transporter (vakuolární transportér železa)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
WT	wild type (geneticky nemodifikovaný jedinec)
ZIP	Zrt-, Irt-like protein
ZIPCO	ZIP domain-containing protein (protein obsahující doménu ZIP)

Obsah

Úvod	8
1. Paraziti lidské malárie a jejich biologie.....	8
1.1 Životní cyklus.....	8
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i>	10
1.3 <i>Plasmodium vivax</i>	10
1.4 <i>Plasmodium ovale</i>	11
1.5 <i>Plasmodium malariae</i>	11
1.6 <i>Plasmodium knowlesi</i>	12
1.7 <i>Plasmodium berghei</i>	12
2. Symptomy.....	13
2.1 Těžká malárie.....	13
2.1.1 Anémie	13
2.1.2 Mozková malárie	13
2.1.3 Respirační a jiné potíže	14
3. Metabolismus železa u parazita <i>Plasmodium</i>	14
3.1 Homeostáza železa	14
3.2 Zdroje železa	15
3.3 Transportéry železa	16
3.3.1 ZIPCO (ZIP domain-containing protein)	16
3.3.2 VIT (vacuolar iron transporter)	17
3.4 Hemozoin.....	18
4. Chemoterapeutické strategie proti malárii.....	20
4.1 Chinolinová antimalarika.....	20
4.2 Artemisinin	22
4.3 Chelátory.....	24
4.3.1 Deferoxamin a jeho deriváty	25
4.3.2 Obrácené siderofory.....	26
4.3.3 Acylhydrazony.....	26
4.3.4 Aminothioly.....	26
4.3.5 Hydroxypyridin-4-ony	27
4.4 Vztah železa, malárie a anémie	27
Závěr	29
Literatura.....	31

Úvod

Malárie je jedním z nejzávažnějších infekčních onemocnění světa. Zmínky o lidech, nakažených nemocí s příznaky shodnými s malárií se vyskytují už ve starověkých egyptských a čínských spisech. Záhy se nemoc rozšířila do Evropy a následně díky evropským cestovatelům, kolonizátorům či otrokářům i do zbytku světa. Původcem malárie je prvok rodu *Plasmodium*, konkrétně druhy: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* a *P. knowlesi*. Přenašečem je samička komára rodu *Anopheles* (Garcia, 2010). Podle zpráv Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2019 se nakazí přes 200 milionů lidí ročně. Nejvíce ohroženou skupinou jsou kojenci, děti do pěti let, těhotné ženy, HIV pozitivní pacienti a migranti z nemalarických oblastí. Mezi nejvíce zasažené oblasti patří subsaharská Afrika, jihovýchodní Asie, východní Středomoří, Jižní a Střední Amerika, západní Pacifik (WHO, 2019).

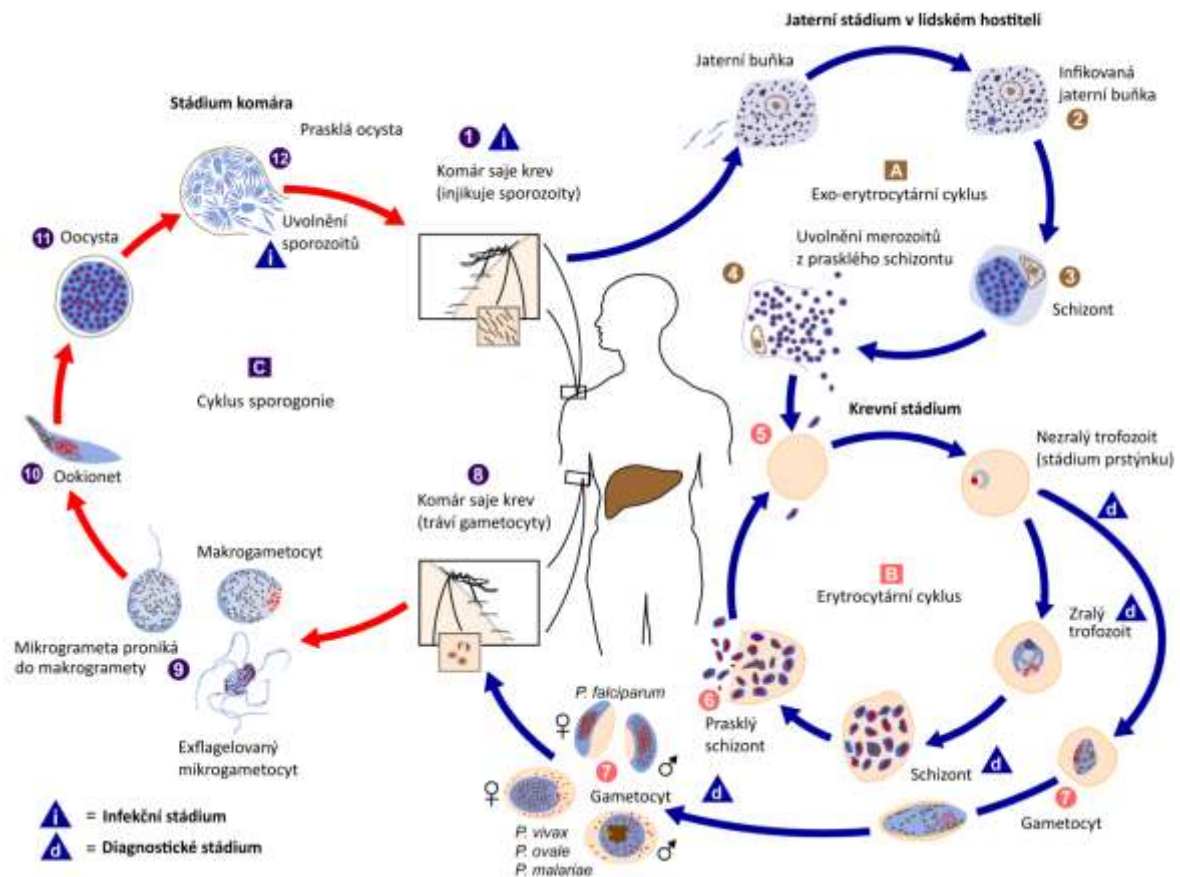
Vyhlídky na eliminaci a možnou eradikaci malárie motivují k vyvíjení nových antimalarik, účinnějších vakcín a k hlubšímu pochopení biologie parazita a samotné nemoci. Jednou z možných cest je zacílit na metabolismus železa parazita. K tomu je třeba pochopit, jak a z jakých zdrojů parazit železo získává, jak ho transportuje, jak ho vylučuje a jak parazita ovlivňuje stav železa hostitele. To vše je cílem této práce.

1. Paraziti lidské malárie a jejich biologie

Malárii způsobuje pět druhů rodu *Plasmodium*, které se liší schopností vytvářet hypnozoity v hepatocytech, napadáním červených krvinek na základě jejich zralosti, v chování a modifikaci tvaru napadených krvinek i samotného prvoka, v délce trvání jaterního a erytrocytárního cyklu, v množství jaterních merogonií, v patogenitě, a v neposlední řadě i v oblasti rozšíření. Paraziti rodu *Plasmodium* jsou obligátně parazitickou skupinou kmene *Apikomplexa* a mají orgány pro tento kmen charakteristické. Jsou to apikální komplex, mikronemy, densní granule a roptrie, které napomáhají parazitovi proniknout do buňky hostitele, dále pak apikoplast, který se mimo jiné podílí na tvorbě hemu nebo FeS center (Marr et al., 2003).

1.1 Životní cyklus

Plasmodium má poměrně komplikovaný životní cyklus, viz obrázek 1, během něhož střídá 2 hostitele, a to obratlovčího meziphostitele a definitivního hostitele, kterým je u původců lidské malárie samička komára rodu *Anopheles*.



Obrázek 1: Životní cyklus parazitického rodu *Plasmodium*. Upraveno podle CDC, 2019.

Cyklus je započat injikací sporozoitů do krevních cév hostitelské dermis během sání komára. Sporozoiti musí co nejrychleji opustit místo vniku, aby nebyli zničeni imunitním systémem hostitele a odvedeni spolu s lymfou. K tomu jim slouží charakteristický klouzavý pohyb, tzv. gliding. Z hostitelské dermis putují do buněk jaterního parenchymu, kde probíhá exo-erytrocytární merogonie. Po penetraci sporozoitů do buňky každý sporozoit diferencuje do merozoita a začne se dělit. Po několikanásobném dělení dojde k uvolnění merozoitů ze zralého schizonta do krevního řečiště, kde napadají červené krvinky a zahajují tak erytrocytární cyklus. Právě stádia erytrocytárního cyklu způsobují onemocnění. Někteří merozoiti se namísto rychlého dělení diferencují do stádia inaktivních hypnozoitů, kteří se mohou po určité době aktivovat a způsobit relapsy infekce. Stádium invadovaného merozoita v červené krvince se nazývá trofozoit. Trofozoit roste několikanásobným jaderným dělením, přičemž nezralé stádium prstýnku maturuje ve zralého schizonta, který praská a uvolňuje merozoity, kteří napadají novou červenou krvinku a cyklus se opakuje. Někteří trofozoiti se místo dělení diferencují do předpohlavních stádií – samčích mikrogametocyt a samičích makrogametocyt. Obě stádia jsou infekční pro definitivního hostitele. *Anopheles* se nakazí ve chvíli, kdy nasaje krev s gametocyty obou typů, které se ve střevě komára mění na gamety.

Kopulací makrogamety s mikrogametou se vytvoří pohyblivá zygota (ookineta), která vstupuje do klidové fáze (oocysty) pod vrstvou pojivové tkáně oddělující střevo od tělní dutiny komára. V oocystách potom vzniká velké množství sporozoitů, které se z nich následně uvolní a putují do slinných žláz komára, kde čekají, až bude komár opět sát (CDC, 2019).

1.2 *Plasmodium falciparum*

P. falciparum způsobuje těžkou malárii a nejčastěji ze všech lidských parazitů rodu *Plasmodium* smrt infikovaných osob (Coban et al., 2018). Ohniskem výskytu malárie, jejímž původcem je *P. falciparum*, je zejména Afrika, ale také Asie, Amerika, popřípadě východní Středomoří. Podle posledních odhadů WHO v roce 2018 bylo v Africe u 99,7 % nakažených původcem onemocnění právě *P. falciparum*, v jihovýchodní Asii to bylo 50 %, ve východním středomoří 71 % a v západním Pacifiku 65 % (WHO, 2019). *P. falciparum* vyvolává maligní terciánu, při níž dochází ke každodenním záchvatům a třídenní tropickou malárii, při které propukne záchvat jednou za 48 hodin. Inkubační doba je 8 až 11 dní, přičemž samotnému malarickému záchvatu předchází 3 až 4 dny nejasných chřipkových příznaků. *P. falciparum* má vysokou parazitémii, je schopné napadnout červené krvinky jakéhokoli stáří. Proto je také nejčastějším původcem malarické anémie. Napadené erythrocyty se nezvětší, ale narostou na jejich povrchu lepivé výrůstky. Nevytváří hypnozoity, vytváří jen jednu generaci jaterních merozoitů, tudíž nedochází k relapsům. Merogonie probíhá v krvetvorných orgánech (kostní dřeni, slezině, játrech). V periferní krvi se vyskytují jen stádia prstýnku nebo srpkovitých gametocytů (Garcia, 2010). Hlavní příčinou patogenity je schopnost cytoadherence infikované červené krvinky na receptor endoteliálního proteinu C (Cowman et al., 2016), což je regulátor srážlivosti krve, který svou činností brání vzniku trombóz a komplikací s jejich vznikem spojených (Esmon, 1992). Touto vazbou blokuje aktivaci samotného proteinu C, což vede k ucpávání cév v důsledku vzniku místních sraženin a také vlivem uvolňování parazitů a jejich metabolitů (Cowman et al., 2016).

1.3 *Plasmodium vivax*

P. vivax je široce rozšířený lidský patogen, který se vyskytuje v celém subtropickém a tropickém pásmu a může zasahovat i do mírných pásem (Garcia, 2010). Podle odhadů WHO z roku 2018 bylo 75 % případů malárie v Americe způsobeno právě tímto druhem (WHO, 2019). Je původcem třídenní malárie („benigní terciány“) a může se vyvinout až v těžkou malárii. Záchvaty se opakují každých 48 hodin, nicméně se tato frekvence postupně prodlužuje, k záchvatům dochází nepravidelně a jsou méně závažné. Neléčený primární útok

může trvat 3 týdny až několik měsíců. Inkubační doba se pohybuje okolo 8 až 17 dnů. Napadá pouze retikulocyty s Duffy antigenem, proto má poměrně nízkou parazitémii (Garcia, 2010). Duffy antigen neboli Duffy antigenní receptor pro chemokiny je receptor exprimovaný zejména na povrchu erytrocytů a endoteliálních buněk lemujících postkapilární žilky v ledvinách, slezině a neuronálních buňkách. Vazbou s Duffy vazebným proteinem zprostředkovává invazi merozoitů *P. vivax* i *P. knowlesi* do červených krvinek (Ntumngia et al., 2016). Infikované červené krvinky se zvětšují a modifikují. Na svém povrchu mají drobné prohlubeniny (Schüffnerovo tečkování). *P. vivax* vytváří hypnozoity, jejichž reaktivací dochází k relapsům. V periferní krvi se vyskytují všechna stádia. Ačkoliv byly hlášeny i případy, kdy infekce skončila smrtí, těžké komplikace bývají vzhledem k nízké parazitémii tohoto druhu spíše vzácné (Garcia, 2010).

1.4 *Plasmodium ovale*

P. ovale se vyskytuje v tropických oblastech, zejména tam, kde se nevyskytuje *P. vivax*, tedy v západní Africe, Asii a Jižní Americe. Většina vlastností *P. ovale* je shodná s vlastnostmi *P. vivax*, proto i příznaky nemoci jsou stejné. *P. ovale* však na rozdíl od *P. vivax* napadá erytrocyty bez Duffy antigenu (Garcia, 2010).

1.5 *Plasmodium malariae*

P. malariae je původcem čtyřdenní malárie (tzv. kvartány). Záchvaty propukají každých 72 hodin. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 18 až 40 dnů. Prodromální příznaky se mohou podobat příznakům malárie způsobené *P. vivax*. Díky tomu, že napadá jen staré erytrocyty, v průběhu erytrocytárního cyklu produkuje nižší počet merozoitů a má delší, 72 hodin trvající vývojový cyklus, je parazitémie poměrně nízká. Netvoří hypnozoity, i přesto může dojít k recidivě i po několika letech, protože má schopnost dlouhodobě přežívat v krevním oběhu. Napadené erytrocyty se nezvětšují, spíše může dojít ke zmenšení velikosti. V periferní krvi lze nalézt všechna vývojová stádia parazita. Tento druh malárie je u zdravých lidí vlivem nízké parazitémie relativně benigní, nicméně má poněkud závažnější příznaky během horečnatého stavu a delší fázi „cold stage“, která záchvatu předchází. Infekce způsobená parazitem *P. malariae* zapříčiňuje poškození ledvin projevující se zvýšením proteinů v moči. Při chronické infekci jsou problémy s ledvinami výsledkem usazování cirkulujících komplexů protilátka-antigen v glomerulu při nadbytku antigenu (Collins and Jeffery, 2007; Garcia, 2010).

1.6 *Plasmodium knowlesi*

Mezi původce lidské malárie bylo *P. knowlesi* zařazeno poměrně nedávno. Přirozeně se tento patogen vyskytuje u makaků dlouhoocasých a makaků vepřích. K přenosu na člověka docházelo vzácně, nicméně v roce 2004 bylo hlášeno poměrně velké množství nakažených v Malajsii, následně také v Thajsku, Singapuru, Myanmaru, Číně a na Filipínách. Je původcem každodenních horečnatých záchvatů (Singh and Daneshvar, 2013). Inkubační doba je 9 až 12 dní. V akutní fázi se projevuje nespecifickými příznaky, jimiž jsou bolest hlavy, horečka spojená se zimnicí, pocení, nevolnost, průjmy a další. Pokud je infekce včas odhalena, jedná se o snadno léčitelný typ malárie, v opačném případě však může způsobovat těžkou malárii a mít i smrtelné následky, proto je zásadní správné určení druhu. *P. knowlesi* může být zaměněno s druhem *P. falciparum*, jenž má podobná počáteční krevní stádia, a *P. malariae*, který se podobá gametocyty a zralými krevními stádii. *P. knowlesi* netvoří hypnozoity. Napadá všechna stádia červených krvinek. Parazitované červené krvinky nemění tvar ani velikost, na povrchu mají občasné slabé Schüffnerovo tečkování. V periferní krvi se nachází všechna parazitická stádia (Garcia, 2010; Singh and Daneshvar, 2013).

1.7 *Plasmodium berghei*

Ačkoli *P. berghei* patří mezi parazity malárie, neinfikuje člověka, ale hlodavce. Chování tohoto druhu je analogické k chování parazitů lidské malárie. Současně je možné provést celý jeho životní cyklus v laboratoři. Z těchto důvodů je ideálním modelovým organismem. Také četné experimenty, na něž v mé práci odkazuji, byly provedeny právě na tomto druhu. Vyskytuje se v oblasti střední Afriky a jeho přenašečem je stejně jako u lidských patogenů komár rodu *Anopheles*. Ač je parazit *P. berghei* schopen infikovat erytrocyty jakéhokoli stáří, k napadení si vybírá především retikulocyty. Netvoří stádium hypnozoita. Organizace genomu, metabolické dráhy, životní cyklus i morfologie jednotlivých vývojových stádií jsou napříč všemi druhy savčích parazitů rodu *Plasmodium* podobné. *P. berghei* se však od původců lidské malárie významně liší např. svým nesynchronizovaným vývojem a uvolňováním patogenů do krve. Nedochozí k sekvestraci stádií prstýnku, trofozoitů a gametocytů. Velmi často způsobuje tzv. mozkovou malárii, která vede u laboratorních jedinců obvykle k smrti, u přirozených hostitelů pak k dlouhodobé chronické infekci (Janse, 2016).

2. Symptomy

Příznaky malárie jsou vyvolány metabolickými produkty merozoitů, uvolněných do krve při synchronizovaném rozpadu erytrocytů, případně následujícími imunologickými pochody spuštěnými v reakci na přítomnost parazitů. Mezi akutní příznaky patří opakující se horečnaté záchvaty, bolest hlavy, svalů, kloubů, nechutenství, zvracení, fotofobie, žloutenka i anémie. Malarické záchvaty se periodicky opakují s frekvencí závislou na tom, který druh rodu *Plasmodium* je původcem onemocnění (Coban et al., 2018; Cowman et al., 2016; Garcia, 2010). Pokud není počáteční fáze infekce projevující se těmito nespecifickými chřipkovými příznaky léčena a kontrolována, může se nemoc vyvinout v tzv. těžkou malárii, která může končit smrtí nakaženého (CDC, 2019).

2.1 Těžká malárie

Těžká malárie je v oblastech s vysokou úrovní přenosu u dospělých osob vzácná, a to díky přirozeně získané imunitě. Proto ji pozorujeme zejména u malých dětí v Asii, kde není úroveň přenosu tak vysoká. K těžké malárii dochází obvykle vlivem systémové poruchy, často spojené s ledvinovou a jaterní dysfunkcí (Cowman et al., 2016). Projevuje se těžkou anémií, mozkovou malárií, respiračními potížemi souvisejícími s metabolickou acidózou, případně kombinací zmíněných projevů (WHO, 2019). Mezi další příznaky těžké malárie patří hypoglykémie, kolaps oběhu, šok, hemoglobinurie, spontánní krvácení nebo naopak rozšiřující se intravaskulární koagulace a další (Kuhn & McCarthy, 2006).

2.1.1 Anémie

Anémie (česky chudokrevnost) vzniká bezprostředně životním cyklem parazita rodu *Plasmodium*, v důsledku rozpadu napadených červených krvinek, dále vlivem zvýšeného odstraňování parazitovaných i nenapadených krvinek, vytvářením anti-fosfatidylserinových protilátek, které se váží i na neinfikované červené krvinky a usnadňují tak jejich likvidaci a konečně také snížením erythropoézy (Coban et al., 2018). Anémie vyvolaná malárií nevede ke ztrátě železa (Prentice et al., 2007).

2.1.2 Mozková malárie

Příčinou mozkové malárie, zahrnující křeče, vysoké horečky až kóma, je poškození endotelu mozkových cév vlivem sekvestrace maturovaných parazitů. Jejím výsledkem je narušení hematoencefalické bariéry, která vede k otokům mozku až smrti nakaženého jedince (Coban et al., 2018; Cowman et al., 2016).

2.1.3 Respirační a jiné potíže

Respirační potíže byly pozorovány u dětí s těžkou anémií, nikoli však v podobě akutní dechové tísně (ARDS), který pozorujeme u nakažených dospělých. Respirační potíže mohou být důsledkem nadměrného hromadění tekutin v plicích, těžké anémie, doprovodné pneumonie. Jsou zástupným ukazatelem acidózy a jsou často spojené s plicními otoky. Mohly by souviset také se sekvestrací napadených červených krvinek v plicní cirkulaci, i když to nebylo nikdy přímo prokázáno (Cowman et al., 2016; Taylor et al., 2012b).

Při metabolické acidóze se hromadí kyselé látky v krvi vylučované právě dysfunkčními ledvinami. K poškození ledvin dochází vlivem uvolnění parazitů z infikovaných červených krvinek. U těžké malárie se jedná zejména o laktátovou acidózu. (Sriboonvorakul et al., 2018).

3. Metabolismus železa u parazita *Plasmodium*

Železo je čtvrtý nejhojněji se vyskytující prvek zemské kůry. Jedná se o přechodný kov, který má oxidační i redukční vlastnosti. Tvoří stabilní Fe^{2+} nebo Fe^{3+} ionty. Ačkoliv se železo v lidském organismu vyskytuje pouze ve stopovém množství, jeho přítomnost je nezbytná, a to nejen pro člověka, ale prakticky pro všechny organismy. Železo se účastní klíčových buněčných procesů, jako jsou syntéza DNA, výroba energie a dýchání. Funguje jako kofaktor ribonukleotid reduktázy a metaloproteinů s FeS klastry nebo hemu. Je tedy také součástí elektronového transportního řetězce, kde mění své oxidační stavy a účastní se tak přenosu elektronů (Crichton, 2016).

3.1 Homeostáza železa

Zmíněné prospěšné redoxní vlastnosti železa se však mohou stát pro buňku toxické. Při oxidaci přebytečných Fe^{2+} kationtů na kationty Fe^{3+} vznikají prostřednictvím Fentonovy reakce volné hydroxylové radikály, které poškozují nukleové kyseliny, lipidy a proteiny. Aby se předešlo těmto poškozením, je třeba udržet homeostázu železa. Zajistit, aby se nehromadily přebytečné Fe^{2+} kationty, ale současně aby docházelo k dostatečnému zásobování železem (Galaris et al., 2019). U parazitů malárie mají tuto regulaci na starosti zejména integrální membránové proteiny fungující jako přenašeče. Mezi tyto proteiny patří např. ZIPCO (Sahu et al., 2014) a VIT (Labarbuta et al., 2017). Toxickému působení Fe^{2+} se parazit také brání vytvořením hemozoinu (Hz) (Yamada and Sherman, 1979).

Během infekce musí patogen s hostitelem o železo bojovat. Patogeny umí účinně železo vychytávat. Hostitel má zase mechanismy, kterými parazitovi znemožňuje železo získávat.

V případě lidského hostitele se na tomto mechanismu významně podílí peptidický hormon hepcidin, který vzniká v játrech. Reguluje dostupnost železa, jeho metabolismus a redistribuci. Proces omezení dostupnosti železa pro patogen je součástí tzv. nutriční imunity. Zvýšení koncentrace železa v krvi vede k produkci hepcidinu, který se následně váže na ferroportin a degraduje ho. Ferroportin je transmembránový protein exportující železo z buňky a je lokalizován na povrchu enterocytů, hepatocytů a makrofágů. Působení hepcidinu proto brání recyklaci a exportu železa (Aschemeyer et al., 2018; Hood and Skaar, 2012). V lidském organismu je naprostá většina železa vázána v hemu červených krvinek a makrofázích. V retikuloendoteliálních makrofázích se recyklují staré červené krvinky a železo se zde nabaluje na transferin a je následně dopraveno do kostní dřeně. Většina potřebného železa je získána právě touto recyklací (Galaris et al., 2019). Malárie vyvolává destrukci infikovaných i nenakažených červených krvinek, která makrofágům znesnadňuje recyklaci, a železo tak nemůže být vráceno do kostní dřeně (Prentice et al., 2007). V lidských buňkách infikovaných parazitem *Plasmodium* klesají hladiny ferroportinu, exportéru železa, a naopak významně rostou hladiny DMT-1 (divalent metal transporter 1), proteinu, který zprostředkovává transport železa a jiných dvojmocných kovů do buňky, což vypovídá o tom, že *Plasmodium* ke svému vývoji opravdu železo potřebuje (Albuquerque et al., 2009; Yanatori and Kishi, 2019).

3.2 Zdroje železa

Nabízí se řada možností, jaký zdroj železa by mohl parazit *Plasmodium* využívat. Jednou z možných variant je příjem železa z hostitelského hemu, který je uvolňován při degradaci hemoglobinu (Hb). Tento zdroj však není pro *Plasmodium* nezbytný, jelikož si umí vyrobit vlastní hem *de novo* (Surolia and Padmanaban, 1992). Spíše využívá železo pocházející z cytosolu červených krvinek vázané na proteiny jako je např. feritin nebo železo vázané v LIP (labile iron pool) (Gabay and Ginsburg, 1993; Hershko and Peto, 1988). Zda je také schopen přijímat extracelulární železo z transferinu je rozporuplné. Nicméně *Plasmodium* nejspíše využívá kombinaci výše zmíněných variant, než že by byl závislý pouze na jedné z nich (Clark et al., 2013; Fry, 1989; Haldar et al., 1986; Peto and Thompson, 1987; Pollack and Fleming, 1984; Pollack, 1988; Rodriguez and Jungery, 1986; Sanchez-Lopez and Haldar, 1992; Scott et al., 1990; Surolia and Misquith, 1996).

3.3 Transportéry železa

Transportéry železa jsou nedílnou součástí jeho metabolismu, ačkoliv jejich identifikace je často velmi obtížná. Železo je sice nepostradatelný prvek, ale má také toxické vlastnosti, proto je nutné, aby bylo dobře regulováno. Nejúčinnějším způsobem regulace je právě efektivně transportovat potřebné železo do buňky, případně nadbytečné železo z buňky ven.

3.3.1 ZIPCO (ZIP domain-containing protein)

ZIPCO je protein, jehož součástí je N-terminální signální peptid a 7 transmembránových domén. Součástí proteinu je ZIP-doména (Zrt-, Irt-like protein). Patří tak do rodiny ZIP proteinů, které fungují jako transportéry kovových iontů. ZIPCO je pravděpodobně lokalizován v plazmatické membráně jaterního stádia a jeho produkce vrcholí v pozdních jaterních stádiích. U modelového organismu *P. berghei*, který parazituje u hlodavců, je kódován genem, PBANKA_050650. Tento gen obsahuje 13 z 15 konzervovaných aminokyselin, charakteristických pro rodinu ZIP proteinů, lokalizovaných kompletně nebo částečně ve čtyřech transmembránových oblastech (Eng et al., 1998; Sahu et al., 2014). ZIPCO vykazuje větší expresi u pre-erytrocytárních stádií, než u erytrocytárních. Inaktivací genu *ZIPCO* je omezen vývoj parazita uvnitř hepatocytu, nicméně není nijak ovlivněno jeho rozmnožování v myši krvi. To bylo experimentálně prokázáno pomocí rekombinantního klonu Δ *ZIPCO* vytvořeného delecí vnitřního fragmentu ZIPCO, dlouhého 540 bp, kódujícího ZIP charakteristickou sekvenci a jeho následného nahrazení kazetou hDHFR. Míra množení *Plasmodium* Δ *ZIPCO* během exponenciálního růstu parazitů v krvi myši byla podobná jako tomu bylo u parazitů s nedeletovaným fragmentem (WT). Naopak zásadní roli hraje v jaterním vývojovém stádiu. Nedostatek funkčního ZIPCO proteinu narušuje růst a životaschopnost jaterního stádia, snižuje počet merozoitů a je spojen s omezenou karyokinezí. Δ *ZIPCO* paraziti jsou značně menší, do krve uvolňují merozoitů méně a se zpožděním oproti WT (Sahu et al., 2014).

Vzhledem k tomu, že protein ZIPCO v buňkách udržuje homeostázu železa je vývoj jaterních forem Δ *ZIPCO* ovlivňován železem. Při přidání citrátu železito-amonného (FAC) velikost jaterních forem WT nijak významně nevzroste, naopak výrazně vzroste u jaterních forem Δ *ZIPCO*. Tento jev naznačuje, že Δ *ZIPCO* paraziti nepoužívají k získání železa pouze protein ZIPCO, ale také nějaký další nízkoafinitní transportér železa. Jaterní formy Δ *ZIPCO* jsou také citlivější na působení deferoxaminu (DFO), vysoce afinitního chelátoru Fe^{3+} kationtů, než jaterní formy WT. Při přidání DFO se velikost jaterních forem WT i ZIPCO

znatelně zmenší, nicméně tento efekt může být přidáním železa z FAC zvrácen. Železo je tedy pravděpodobně pro růst ZIPCO jaterních forem limitujícím faktorem (Sahu et al., 2014).

Podobný efekt byl pozorován při přísunu zinku, kdy se zvýšila velikost Δ ZIPCO jaterních stádií, ale velikost jaterních stádií WT nebyla nijak ovlivněna. Obdobně jako železo je zinek důležitý zejména pro vývoj erytrocytárních parazitických stádií. Omezení zinku prostřednictvím chelátoru TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin) vede k smrti krevního stádia parazita, což lze zvrátit přidáním zinku (Sahu et al., 2014).

Výše zmíněné experimenty související s přísunem a spotřebou železa naznačují, že právě ZIPCO protein je u jaterních forem prvoka *Plasmodium* důležitý pro využití tohoto kovu a mohl by sloužit jako membránový transportér.

3.3.2 VIT (vacuolar iron transporter)

Vzhledem k možné toxicitě železa potřebují organismy detoxifikační mechanismy. Tyto mechanismy zprostředkovávají proteiny rodiny VIT - vakuolární transportéry železa, objeveny u rostliny *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2006), v kvasinkových buňkách značeny jako CCC1 (Ca²⁺-sensitive cross complement 1), u parazita *P. falciparum* jako PfVIT (Slavic et al., 2016).

Na základě předpokladu, že v potravní vakuole dochází k trávení Hb, následné detoxifikaci hemu, a tudíž k hromadění železa, bylo navrženo, že by protein PfVIT mohl být lokalizován v membráně potravní vakuoly. Nicméně potravní vakuola byla nalezena pouze v krevním asexuálním vývojovém stádiu parazita *Plasmodium*. Naopak protein PfVIT je exprimován v průběhu celého životního cyklu, proto se v membráně potravní vakuoly nejspíš nenachází. S největší pravděpodobností bude lokalizovaný v membráně endoplazmatického retikula (ER) stejně jako protein PbVIT u modelového organismu *P. berghei*. (Slavic et al., 2016). Tomuto tvrzení také nahrává skutečnost, že dva rostlinné transportéry VIT1 s funkční homologií ke kvasinkovému transportéru CCC1 se nachází v membráně ER, kde udržují homeostázu přechodných kovů (Yamada et al., 2013). Proteiny rodiny VIT jsou složeny z polypeptidů o 250 až 400 aminokyselinách, uspořádaných do 5 transmembránových α -helixů s dlouhým hydrofilním N-koncem. PfVIT má na svém N-konci 4 fosfoakceptorová místa a hydrofilní smyčku, která spojuje transmembránové helixy 2 a 3 na aminokyselinových zbytcích S21, S122, S140 a T150 (Labarbuta et al., 2017; Treeck et al., 2012; Solyakov et al., 2011). Fosforylace, případně defosforylace, těchto zbytků by pak mohla sloužit k regulaci transportu zprostředkovaného proteinem PfVIT (Labarbuta et al., 2017). U jiných transportních proteinů tomu tak je. Například biogenní monoaminové přenašeče v savčím

mozku regulují pomocí fosforylace, či defosforylace proteinu směr a aktivitu transportu (Ramamoorthy et al., 2011).

Jelikož rostlinný protein VIT a kvasinkový CCC1 protein fungují jako transportéry Fe^{2+} iontů, ale i jiných kationtů přechodných kovů první řady, předpokládalo se, že také protein PfVIT bude mít tuto schopnost. Zmíněný předpoklad byl testován na mutantních kmelech kvasinky *S. cerevisiae* ΔCCC1 . Mutantní kmen ΔCCC1 postrádal gen kódující protein CCC1 a byl proto velice citlivý na případnou toxicitu železa. Bylo prokázáno, že funkci deletovaného CCC1 lze nahradit nejen expresí homologního rostlinného proteinu VIT, ale také expresí proteinu PfVIT, čímž byla potvrzena schopnost proteinu PfVIT parazita *P. falciparum* transportovat Fe^{2+} ionty (Slavic et al., 2016).

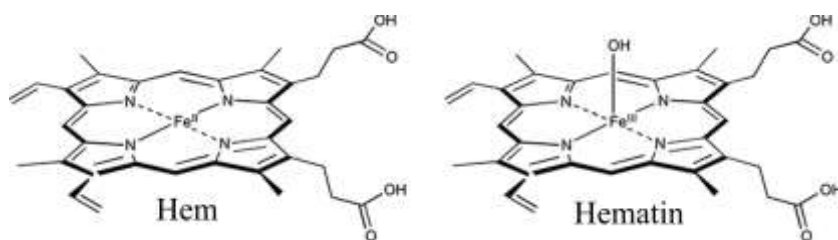
Protože protein CCC1 přenáší kromě Fe^{2+} iontů i jiné kationty, byla také testována schopnost proteinu PfVIT nahradit funkci nepřítomného vakuolárního transportéru na import Zn^{2+} iontů v mutantním kvasinkovém kmeni Δzrc1 , ta se však nepotvrdila (Slavic et al., 2016).

Dále byly také prováděny experimenty na bakteriálních buňkách *E. coli*, kde byla u buněk exprimujících protein PfVIT prokázána větší odolnost vůči cytotoxickým účinkům Fe^{2+} , ne však jiných iontů přechodných kovů první řady (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} nebo Ni^{2+}). PfVIT tedy funguje jako transportér výhradně Fe^{2+} iontů, přičemž o původu této selektivity se zatím jen spekuluje. Ačkoli poloměry všech testovaných iontů přechodných kovů první řady jsou podobné, ne všechny z nich byly prostřednictvím proteinu PfVIT transportovány, proto selektivita patrně nebude dána velikostí, ale spíš koordinačním číslem a geometrií substrátu kovových iontů. PfVIT je transportér $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^+$, který k přenosu přes membránu využívá protonem řízený antiport katalyzovaný elektrochemickým gradientem (Labarbuta et al., 2017).

3.4 Hemozin

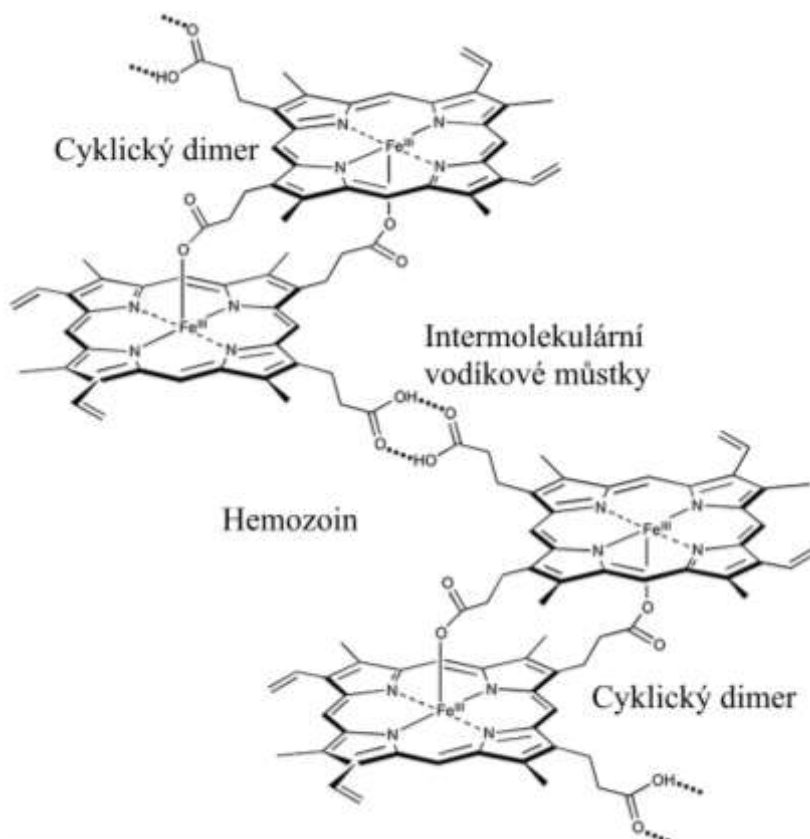
Parazit malárie tráví krev, a tudíž i poměrně velké množství v ní obsaženého Hb. Hb je hlavním zdrojem živin zejména pro stádia vyvíjející se uvnitř červených krvinek. Tato stádia jsou schopna degradovat 60 – 80 % hostitelského Hb (Krugliak et al., 2002). Degradace Hb se uskutečňuje v potravní vakuole za účasti řady proteáz. Hb je oxidován na met-Hb a pomocí aspartátových proteáz je hydrolyzován na volný hem a denaturovaný globin. Globin je pak dále hydrolyzován pomocí cysteinových proteáz a exopeptidáz na krátké peptidy a aminokyseliny (Goldberg et al., 1991; Rosenthal et al., 1988; Yamada and Sherman, 1979). Při trávení dochází k uvolňování volného hemu, který je pro buňku toxický. Vede totiž

k produkci volných kyslíkových radikálů, peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů a DNA (Aft and Muellers, 1983, 1984). *Plasmodium* nemá funkční hemoxygenázu, a proto nedokáže degradovat hem (Sigala et al., 2012). Z toho důvodu si vyvinul parazit *Plasmodium*, ale i řada dalších patogenů žijících se krví jako např. *Schistosoma mansoni* nebo *Rhodnius prolixus*, detoxifikační mechanismus, kterým se brání toxicitě volného hemu přeměnou na netoxický Hz (Oliveira et al., 2005). Tento mechanismus je zahájen samovolnou oxidací Fe^{2+} na Fe^{3+} kationty uvnitř porfyrinového kruhu. Vzniká potencionálně toxický hematin, který je následně přeměněn na krystalický, chemicky inertní Hz (Vanderesse et al., 2016). Struktura hemu a hematinu je zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2: Chemická struktura hemu a hematinu. Upraveno podle Vanderesse et al., 2016

Hz je malarický pigment tmavě hnědé až černé barvy. Tvoří ho cyklický dimer protoporphyrinu s Fe^{3+} ionty uvnitř porfyrinového kruhu, kde propionová skupina každé molekuly koordinuje střed s Fe^{3+} svého partnera (Slater et al., 1991), viz obrázek 3.



Obrázek 3: Chemická struktura Hz. Upraveno podle Vanderesse et al., 2016

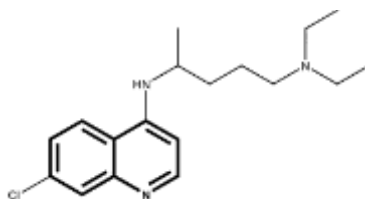
Jakými konkrétními mechanismy dochází k formování β -hematinu není zatím zcela objasněno. Zdá se, že tvorba Hz je proces řízený lipidy a/nebo proteiny bohatými na histidin či enzymy (Bendrat et al., 1995; Slater et al., 1991; Sullivan et al., 1996). Někteří vědci tvrdí, že k formaci dochází autokatalyticky, kdy každý vzniklý Hz podporuje tvorbu dalších Hz (Dorn et al., 1995). Jiní se přiklání k teorii, že formování Hz zprostředkovávají neutrální lipidy, mono- di- a tri- acylglyceroly (Jackson et al., 2004). Součástí směsi těchto neutrálních lipidů bylo značné množství monostearoylglycerolu a monopalmitoylglycerolu, a menší množství dipalmitoylglycerolu, dioleoylglycerolu a dilineoylglycerolu (Pisciotta et al., 2007). Ukázalo se, že směs neutrálních lipidů v podmínkách podobných trávicí vakuole účinně iniciuje tvorbu krystalů β -hematinu (Hoang et al., 2010), a je dokonce schopna řídit velikost těchto krystalů (Ambele *et al.*, 2013). Na detoxifikaci hemu a formaci Hz se významně podílí protein HDP (heme detoxification protein) (Jani et al., 2008). Nicméně do tohoto procesu je zapojen celý komplex proteinů. Součástí zmíněného komplexu je falcipain 2/2', proteázy plasmepsin II a plasmepsin IV a histo-asparagová proteáza ve spojení s proteinem HDP (Chugh et al., 2013).

4. Chemoterapeutické strategie proti malárii

Ačkoliv existuje spousta antimalarik s různým mechanismem účinku, na řadu z nich vzniká rezistence, proto je třeba vyvíjet nová, účinnější léčiva. Jednou z možností je zacílit na metabolismus prvku nezbytného pro parazita, v tomto případě na metabolismus železa.

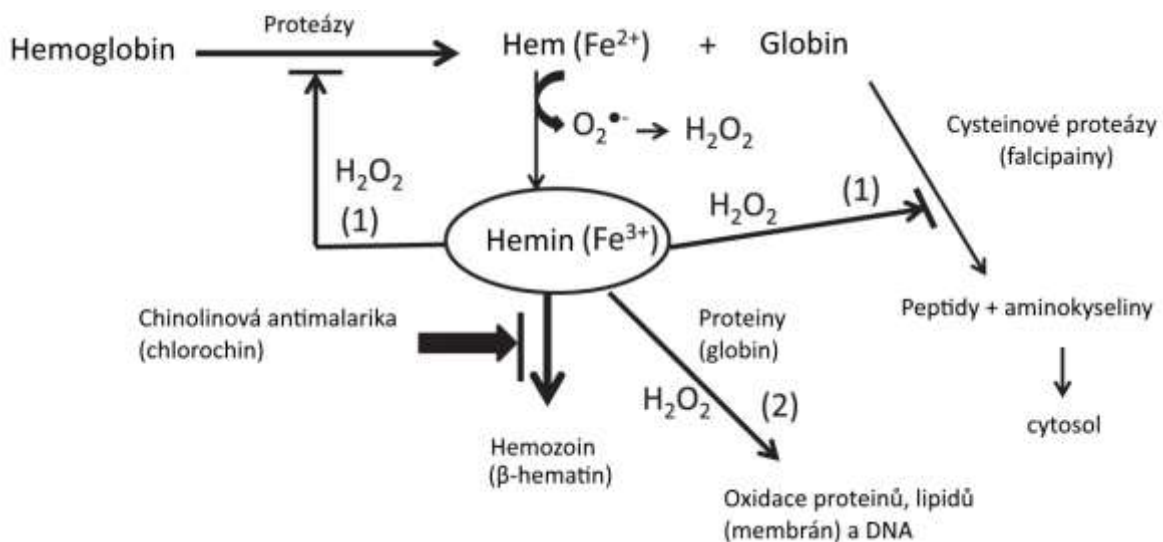
4.1 Chinolinová antimalarika

Chinolinová antimalarika obsahující heterocyklickou dusíkatou sloučeninu chinolin, viz obrázek 4, se uplatňují při detoxifikaci hemu.



Obrázek 4: Chemická struktura chlorochinu s typickým chinolinovým jádrem. Převzato z Rai *et al.*, 2018.

Zasahují do procesu tvorby Hz vložím komplexu tvořeného hemem s navázaným chinolinem do rostoucího polymeru Hz. Chinoliny se hromadí v potravní vakuole. Zde pak dochází ke kumulaci volného hemu, což působí na buňku toxicky (Kuhn et al., 2007). Konečný biochemický mechanismus účinku však je třeba ještě dále testovat.



Obrázek 5: Mechanismus účinku chinolinových léčiv inhibujících tvorbu Hz v potravní vakuole parazita Plasmodium. Tato inhibice zvyšuje množství volného heminu, který napomáhá vzniku peroxidázových reakcí, při nichž dochází k oxidaci hemu (Fe^{2+}), čímž vzniká H_2O_2 . Peroxidázové reakce inhibují cysteinové proteázy potřebné pro degradaci proteinů účastnících se růstu parazitů (1) a zároveň mohou oxidovat proteiny (enzymy), lipidy a DNA, což vede k poškození parazitů (2). Převzato z Herraiz et al., 2019.

Jak je z obrázku 5 patrné, oxidací hemu vzniká hemin, přičemž dochází k uvolňování H_2O_2 . V důsledku působení aktivních chinolinů roste množství volného heminu. Volný hemin, který zůstává ve vakuole, kromě interakce s proteiny (např. globinem) také katalyzuje peroxidázové reakce. Vzniká tak oxidační stres, který vede k poškození lipidových membrán, proteinů a DNA. Oxidační účinky heminu jsou zesilovány prostřednictvím podávaných chinolinových léčiv. Mezi nejaktivnější chinoliny s největšími pro-oxidačními účinky patří chlorochin, chinakrin, amodiachin, chinin, chinidin a meflochin. Ačkoliv dochází vlivem chinolinových antimalarik v přítomnosti H_2O_2 k zvýšené peroxidaci, bylo prokázáno, že samy chinoliny žádný pro-oxidační účinek nemají (Herraiz et al., 2019), což odporuje dosavadním tvrzením, že chlorochin, zástupce tohoto typu antimalarik, působí prostřednictvím produkce reaktivních kyslíkových radikálů (Monti et al., 2002). Chlorochin navodí stav oxidačního stresu zvýšením hladiny volného heminu. Na zesílení peroxidázových reakcí katalyzovaných heminem mají vliv některé proteiny, jako globin nebo hovězí sérový albumin (Herraiz et al., 2019).

Volný hemin je také příčinou inhibice cysteinových proteáz: papainu, ficinu a katepsinu B, které se podílí na tvorbě Hz. K inhibici dochází v prostředí s H_2O_2 , což potvrzuje vliv peroxidázových reakcí (Herraiz et al., 2019). Cysteinové proteázy hrají roli

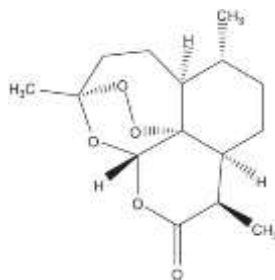
v procesech nezbytných pro přežití a vývoj parazitů (Rosenthal, 2004). Obsahují důležitou thiolovou skupinu, která může být díky přítomnému H_2O_2 a nepřítomným redukčním činidlům oxidována na inaktivní kyselinu sulfenovou. Tato reakce je v přítomnosti glutathionu případně přidáním cysteinu reverzibilní (Denu and Tanner, 1998; Lin et al., 1975). Glutathion je tedy schopen zvrátit inhibici proteolýzy cysteinových proteáz způsobenou peroxidázovými reakcemi. Na druhu *P. berghei* byl prokázán vliv množství glutathionu na účinky chlorochinu. Glutathion by proto mohl být součástí antioxidantních systémů parazita, které by inhibovaly peroxidázové reakce způsobené heminem (Herraiz et al., 2019; Platel et al., 1999). Hledaným ideálem jsou tudíž léčiva, která by zvyšovala akumulaci heminu a současně snižovala účinky antioxidantních systémů parazita. Je zajímavé, že působení globinu ovlivňovalo aktivitu antioxidantů a inhibitorů peroxidázových reakcí. Jejich oxidace se v přítomnosti globinu snižovala (Herraiz et al., 2019).

Herraiz et al., 2019 objasnili biochemické mechanismy účinku chinolinových antimalarik, nicméně získaná data by měla být ještě dále zkoumána a potvrzena testováním *in-vivo*, kde hraje roli řada dalších faktorů a podmínky zde jsou proto poněkud komplikovanější. Byly také testovány účinky látek analogických k chinolinovým antimalarikům, jako jsou např. β -karbonyly nebo nitroindazoly. β -karbonyly a 8-hydroxychinolin nevykazovaly antimalarickou aktivitu jako např. chlorochin či chinakrin, naopak dva testované nitroindazoly (DIM 5 a DIM 32) ano (Herraiz et al., 2019).

Ač jsou chinolinová antimalarika používána v léčbě malárie poměrně úspěšně již řadu let, přesto se odborníci potýkají se snadno vznikající rezistencí parazitů na tato léčiva. Parazité mají obranné mechanismy, kterými se brání proti kumulaci volného hemu, případně heminu, různé antioxidantní systémy a podobně, které mohou napomáhat vzniku rezistencí.

4.2 Artemisinin

Artemisinin je přírodní extrakt izolovaný z čínské byliny *Artemisia annua*. Jedná se o lék na chemické bázi seskviterpenového laktonu. Artemisinin a jeho deriváty nesou jádro 1,2,4-trioxanu s neobvyklým endoperoxidovým můstkem, viz obrázek 6.



Obrázek 6: Chemická struktura artemisininu. Převzato ze Isacchi et al., 2011.

Jeho antimalarická aktivita je pravděpodobně dána produkcí volných radikálů, které vznikají jako následek štěpení endoperoxidového můstku, což také dokládá fakt, že při absenci endoperoxidového můstku k léčivé aktivitě artemisininu nedochází (Klayman, 1985; Krungkrai and Yuthavong, 1987). Obecně lze říci, že přechodné kovy s nízkou valencí jsou schopny štěpit peroxidy, čímž dochází k produkci kyslíkových radikálů, které mohou následně vést k produkci uhlíkových radikálů s vysokým antimalarickým účinkem (Posner and Oh, 1992). Štěpení endoperoxidového můstku je katalyzováno hemovými Fe^{2+} ionty, které jsou produkovány při degradaci Hb, a zahrnuje přeskupování elektronů z Fe^{2+} na $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, které vede k produkci škodlivých volných radikálů (Posner et al., 1995; Wu et al., 1998).

Aktivita artemisininu značně závisí na degradaci Hb, což potvrzují experimenty, při nichž byl sledován účinek tohoto léčiva na parazitech s inhibovanými cysteinovými i aspartátovými proteázami, které jsou nedílnou součástí procesu degradace Hb. Aktivita artemisininu byla použitím inhibitorů proteáz omezena, a to zejména při použití inhibitorů cysteinových proteáz. Inhibitory také bránily zvýšení oxidativního stresu, který je vlivem působení artemisininu vyvolán. Zmíněný pokus proto potvrzuje předpoklad závislosti artemisininu na absorpci a následné hydrolyze Hb. Artemisinin je schopen vázat volný hem, který se uvolní po degradaci Hb falcipainem 2 (Klonis et al., 2011). Jakmile se artemisinin na hem naváže, není už možné, aby byl hem převeden na Hz (Chugh et al., 2013). Artemisinin inhibuje tvorbu Hz, případně zapříčiňuje jeho degradaci (Pandey et al., 1999). Paradoxně bylo současně prokázáno, že artemisinin snižuje schopnost parazitů přijímat Hb (Klonis et al., 2011). Nestrávený Hb se pak hromadí v parazitovi (Hoppe et al., 2004). Existují ještě jiné studie, které poukazují na souvislost aktivity artemisininu spojenou s přímou inhibicí ATPázy vápníku (PfATP6) (Eckstein-Ludwig et al., 2003).

Artemisinin a související endoperoxidová antimalarika jsou výjimečná rychlostí léčby infekce a zároveň účinku i proti parazitům, kteří už získali na jiná antimalarika, jako jsou například chinoliny, rezistenci. Naopak nevýhodou těchto léčiv je jejich velmi krátký poločas rozpadu v *in-vivo* prostředí, který je přibližně 1 – 3 hodiny (Dondorp et al., 2009; Eastman and Fidock, 2009; Hien and White, 1993). Proto je vhodné podpořit léčbu těchto antimalarik ještě kombinací s léky s dlouhodobějším účinkem, jako jsou lumefantrin, amodiachin, piperachin, meflochin, sulfadoxin-pyrimethamin nebo pyronaridin (Nosten and White, 2007). Artemisininy jsou účinné proti asexuálním krevním stádiím, ale také proti transmisním pohlavním stádiím parazita (Kumar and Zheng, 1990). Mezi významné deriváty artemisininu patří např. dihydroartemisinin, artemether, arteether nebo artesunát (Hien and White, 1993).

Z výše zmíněných informací je patrné, že železo je pro aktivitu artemisininu opravdu esenciální, což také potvrzuje fakt, že použití chelátoru železa DFO působí vůči endoperoxidovým antimalarikům antagonisticky (Stocks et al., 2007). Nabízela by se proto hypotéza, že dodáním většího množství železa by mohla být posílena aktivita těchto antimalarik. Nicméně to, zda přináší dodávání železa infikovaným pacientům příznivé zdravotní výsledky, je poněkud sporné, viz kapitola 4.4.

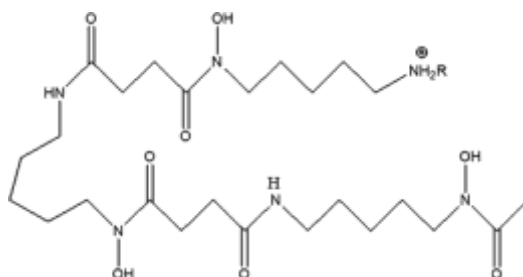
4.3 Chelátory

Bylo navrženo, že další možnou strategií v boji s malárií by mohly představovat látky schopné vychytávat železo (Raventos-Suarez et al., 1982). Schopnost vychytávat železo mají chelátory železa, které selektivně vážou Fe^{3+} . Těto skupině dominuje klinicky nejvyužívanější DFO (Raventos-Suarez et al., 1982), ale její součástí je i řada dalších (Edward et al., 1997; Fritsch et al., 1987; Heppner et al., 1988; Loyevsky et al., 1993, 1997; Tsafack et al., 1996; Yang et al., 1992). Antimalarická aktivita těchto chelátorů může být potlačena dodáním ekvimolární koncentrace železa. Chelátory jsou nejen schopné železo vychytávat, ale také s ním tvořit toxické komplexy (Jairam et al., 1991; Scheibel and Adler, 1982). Tento mechanismus účinku je charakteristický pro chelátory, které selektivně vážou Fe^{2+} , např. 2',2'-bipyridyl (Jairam et al., 1991). Antimalarickou aktivitu sloučenin této skupiny logicky nelze zvrátit přidáním železa (Loyevsky et al., 1997).

Důležitou vlastností chelátorů železa je jejich dostatečně vysoká afinita a selektivita k Fe^{3+} . Chelátory selektivní pro Fe^{2+} mají totiž afinitu i k jiným biologicky významným dvojmocným kovům, jako Zn^{2+} nebo Cu^{2+} (Baum and Ng, 2004). Naopak chelátory selektivní pro Fe^{3+} mají afinitu spíše k trojmocným iontům jako je Ga^{3+} nebo Al^{3+} aj., které nejsou pro buňku tak nezbytné (Caraco' et al., 1998). Jelikož MA-DFO (methylantranilic-DFO), derivát DFO, váže mnohem výrazněji Fe^{3+} než Fe^{2+} a má současně vyšší chelatační účinky na *P. falciparum* než na savčí buňku, lze usuzovat, že železo, které je součástí LIP parazita se vyskytuje zejména v Fe^{3+} formě (Glickstein et al., 1996). Ideální jsou proto siderofory, jejichž ligandem je hydroxamát, případně katechol, jelikož mají afinitu k Fe^{3+} velmi vysokou (Hider et al., 1981, 1983; Bergeron et al., 1991; Yinnon et al., 1989). Na rozdíl od savčích buněk, které po odstranění chelátoru kompletně obnovují růst, *Plasmodium* snáší nedostatek železa způsobený chelátorem hůře a je schopné své životní funkce obnovit jen minimálně (Lytton et al., 1994). Účinek chelátoru je dále ovlivněn jejich schopností proniknout skrz membránu infikovaných červených krvinek, přičemž nejlépe prostupují hydrofobní sloučeniny. Stádium

pozdního trofozoitu je nejpropustnější, a proto nejvíce citlivé na působení chelátorů (Loyevsky et al., 1993; Raventos-Suarez et al., 1982; Shanzer et al., 1991).

4.3.1 Deferoxamin a jeho deriváty



Obrázek 7: Chemická struktura DFO, R = H. Převzato z Rai et al., 2018.

DFO, jehož strukturu znázorňuje obrázek 7, je odvozený od kyseliny trihydroxamové. V přírodě je tento siderofor produkovaný bakterií *Streptomyces pilosus*. Je klinicky nejvyužívanějším chelátorem železa, a to zejména při léčbě železem přetíženého organismu, k čemuž může docházet po opakovaných transfuzích. DFO se proto využívá při léčbě talasémie a srpkovité anémie (Sorrentino et al., 2020), ale také při léčbě neurodegradativních chorob, při nichž se hromadí železo v mozku (Fine et al., 2020). V neposlední řadě je DFO účinný při léčbě malárie (Gordeuk et al., 1992).

DFO má však řadu nevýhod. Špatně proniká do červených krvinek, působí pouze na stádia pozdního trofozoitu, při jeho perorálním podávání je prakticky neúčinný a je poměrně rychle odbouráván z krve, proto je vhodné infuzní podávání (Summers et al., 1979). Z těchto důvodů byla vytvořena řada derivátů, které mají potřebné vlastnosti pro zlepšení účinnosti tohoto sideroforu. Účinek DFO může být také zesílen kombinací s jinými chelátory, případně antimalariky (Chevion et al., 1995; Glickstein et al., 1996; Hershko et al., 1991; Jairam et al., 1991; Loyevsky et al., 1997; Lytton et al., 1994; Shanzer et al., 1991; Thuma et al., 1998b, 1998a; Tsafack et al., 1996).

Bylo zjištěno, že infikované erythrocyty lépe propouští komplex Zn-DFO, než samotný DFO. Jelikož má DFO mnohem vyšší afinitu k Fe^{3+} než k Zn^{2+} , po vstupu do buňky vyměňuje Zn-DFO svůj navázaný Zn^{2+} za Fe^{3+} ionty, které jsou nezbytné pro životní funkce parazita. Zn-DFO také účinkuje při nižších koncentracích než DFO. (Chevion et al., 1995).

Také pro derivát MA-DFO je membrána erythrocytu propustnější než pro DFO. MA-DFO je nejvíce hydrofobní a zároveň do buňky nejlépe prostupující sloučeninou ze skupiny N-terminálních derivátů. Selektivně suprimuje růst a proliferaci parazitické buňky. Zřejmě proto, že v cytosolu savčích buněk převládá železo v Fe^{2+} formě. MA-DFO však váže s vyšší afinitou Fe^{3+} ionty (Glickstein et al., 1996). DFO je velmi rychle vyplavován z krve, proto

jsou vyvíjeny deriváty, které by prodloužily dobu působení léčiva v krevním oběhu. Jedním z nich je například 8-ramenný polyethylenglykol-DFO (Yu et al., 2020).

4.3.2 Obrácené siderofory

Obrácené siderofory (též syntetické ferrichromy) se vyznačují svou velmi dobrou prostupností skrz membránu červených krvinek. Snazší pronikání do erytrocytů bylo umožněno nahrazením hydrofilní obálky molekuly ferrichromu za obálku hydrofobní. Přírodní siderofory produkované mikroby vážou Fe^{3+} ionty z média a prostřednictvím receptorů je transportují do buňky, čímž stimulují růst mikroba. Ačkoliv i obrácené siderofory vážou Fe^{3+} ionty, na rozdíl od těch přírodních pronikají do buňky difúzí, vychytávají intracelulární železo a růst mikroba inhibují. Syntetický ferrichrom obsahující izoleucin (SF1-ileu), *in-vitro* zkoumaný zástupce této skupiny, nepůsobí na savčí buňky, zato působí na všechna vývojová stádia parazita *P. falciparum*, primárně však na stádium prstýnku. Chemoterapeutické účinky DFO, který inhibuje pouze stádium pozdního trofozoitu, jsou tudíž kombinací s SF1-ileu výrazně zlepšeny. (Lytton et al., 1994; Shanzer et al., 1991).

4.3.3 Acylhydrazony

Součástí této skupiny jsou sloučeniny např. SIH (salicylaldehyd-isonikotinoyl hydrazon) a HNFB (2-hydroxy-1-naftylaldehyd-m-fluorobenzoyl hydrazon), u nichž byla potvrzena jejich schopnost inhibovat růst všech stádií parazita *P. falciparum*. Vážou Fe^{3+} a velmi dobře prostupují membránou červených krvinek. Obzvláště účinné jsou pak v kombinaci s DFO. Ačkoliv SIH vychytáváním železa omezuje růst parazita, při jeho nízkých koncentracích (<20 $\mu\text{mol/l}$) roste parazit paradoxně lépe při kontinuálním dávkování ve srovnání s parazity po ukončení dávkování. Parazit pravděpodobně dokáže recyklovat a znovu využít extracelulární železo, které tam SIH při nižších koncentracích dopravuje (Tsafack et al., 1996). Bylo ukázáno, že pokud se SIH nevyskytuje volně, ale ve formě komplexu, může poskytovat železo savčím buňkám (Laskey et al., 1986). Proto je výhodné podávat SIH v kombinaci s DFO, které díky své špatné prostupnosti membránou působí spíše extracelulárně a má vyšší afinitu pro Fe^{3+} než SIH, takže železo transportované pomocí SIH z buňky DFO vyváže a zabrání tak parazitovi, aby ho znovu recykloval (Tsafack et al., 1996).

4.3.4 Aminothioly

Do této skupiny chelátorů patří BAT (ethan-1,2-bis(N-1-amino-3-ethylbutyl-3-thiol) a TAT (N',N',N'-tris(2-methyl-2-mercaptopropyl)1,4,7-triazacyklononan), což jsou sloučeniny, které dokáží inhibovat růst parazita *P. falciparum* 5krát až 10krát efektivněji, než

DFO. BAT i TAT brání vzniku škodlivých hydroxylových radikálů. Jsou cytotoxické vůči parazitům malárie, nikoliv vůči savcím buňkám. Působí na stádium trofozoita a schizonta. TAT je účinnější než BAT, je totiž lipofilnější a má vyšší počet koordinačních míst pro železo (Loyevsky et al., 1997).

4.3.5 Hydroxypyridin-4-ony

Chelátory této skupiny jsou, na rozdíl od DFO, účinné i při perorálním podávání. Vážou s vysokou specifitou Fe^{3+} v LIP napadených červených krvinek. Dokáží inhibovat růst parazita *Plasmodium in-vitro* i *in-vivo*. Membrána erytrocytu je propustnější pro hydrofobnější molekuly, schopnost vychytávání železa z buňky je proto dána mírou lipofily chelátorů. Výhodou hydroxypyridinonů je, že lze modifikovat jejich lipofilitu změnou délky R_2 substituentu navázaném na dusíku heterocyklu (Hershko et al., 1991).

Nejnámějším hydroxypyridinonem je zřejmě deferipron, který je užíván pacienty, jejichž organismus je přetížen nadměrnými hladinami železa, nejčastěji po opakovaných transfúzích při léčbě talasémie (Kontoghiorghes et al., 1987). Byly také testovány antimalarické účinky deferipronu. Ačkoliv při pozorování *in-vitro* docházelo k inhibici růstu parazita *P. falciparum*, *in-vivo* nikoliv. Deferiprone má poměrně nízkou lipofilitu a je velice rychle odbouráván z krve. Aby inhiboval parazita *in-vivo*, musel by být soustavně podáván ve vyšších dávkách, s čímž je zase spojené riziko abnormálního snížení počtu neutrofilních granulocytů v krvi, případně jiných vedlejších účinků. Deferipron proto není pro léčbu malárie příliš vhodný (Thuma et al., 1998b).

4.4 Vztah železa, malárie a anémie

Jak bylo již řečeno, malárie způsobuje mimo jiné také anémii. Anémie je onemocnění krve tvorby, při kterém dochází ke snížení koncentrace Hb v krvi. Existuje několik druhů a specifických příčin tohoto onemocnění.

Nejnámějším druhem anémie spojené s malárií je srpkovitá anémie. Vyskytuje se výrazně častěji v oblastech zasažených malárií nejspíše proto, že jedinci trpící srpkovitou anémií jsou vůči projevům těžké malárie odolní, čímž těmto jedincům poskytuje evoluční výhodu (Aidoo et al., 2002). Jak je z názvu patrné, srpkovitá anémie se vyznačuje změnou tvaru červených krvinek, a to z jejich přirozeného tvaru promáčknutého piškotu na tvar protaženého srpku. Tyto deformované červené krvinky infikované parazitem jsou kvůli zvýšené opsonizaci pomocí IgG a C3c přednostně určeny k předčasnému zničení fagocytózou (Ayi et al., 2004). Srpkovitá anémie je způsobena mutací genu pro β -globin (Ingram, 1957), která je autozomálně recesivně dědičná a vede k řadě symptomů. Mimo příznaky

charakteristické pro všechny typy anémií, jako jsou únava, bledost a dušnost, je dalším příznakem také tzv. oběhová příhoda, která vede k ucpávání cév a poté až k odumření některých orgánů, nejčastěji jsou postiženy slezina, srdce, ledviny a plíce (Williams and Thein, 2018).

Podobně talasémie je dědičné onemocnění krve, jehož výskyt koreluje s oblastmi výskytu malárie z podobných důvodů, jako tomu bylo u srpkovité anémie. Mutantní červené krvinky podstatně hůř přenášejí kyslík, proto mají postižení jedinci vyšší počet červených krvinek, než zdraví lidé. Ačkoliv bude postižený napaden stejným množstvím parazitů jako zdravý jedinec, přesto bude mít více nenapadených červených krvinek, tudíž bude vůči malárii odolnější (Fowkes et al., 2008). Příčinou onemocnění je porucha syntézy některého z polypeptidových řetězců Hb, nejčastěji α (v případě α -talasémie) nebo vzácněji β (v případě β -talasémie). To brání správné tvorbě Hb, a tím pádem i potřebné distribuci kyslíku po těle, což vede nejen k fyzickým, ale i psychickým patologiím (Rikos et al., 2020; Taylor et al., 2012a).

Ačkoliv je známá celá řada dalších typů anémií, existuje ještě jeden typ, který nesmí být opomenut, a to tzv. sideropenická anémie, jejíž příčinou je nedostatek železa. Je to nejrozšířenější druh anémie, který postihuje převážně děti předškolního věku a těhotné ženy. Projevuje se podobně jako ostatní typy anémií únavou, bledostí, bolestí hlavy, nízkou soustředěností, ale také příznaky souvisejícími právě s nedostatkem železa, jako je koilonychie (lžičkovitá deformace nehtů), vypadávání vlasů, zrychlené bušení srdce, syndrom neklidných nohou a další. U dětí může nedostatek železa způsobovat zpoždění mentálního a motorického rozvoje, u těhotných pak roste riziko předčasných porodů. Pacientům s touto anamnézou je proto dodáváno železo (Camaschella, 2015). Jelikož se ale výskyt anémie způsobené nedostatkem železa překrývá s oblastmi výskytu malárie, zůstává otázkou, zda tuto léčbu založenou na dodávání železa anemickým pacientům použít i v oblastech postižených malárií. Existují totiž studie, které ukazují, že je pro *P. falciparum* snazší infikovat červené krvinky s dostatečným množstvím železa, než ty s jeho nižším obsahem (Barffour et al., 2017; Camaschella, 2015; Goheen et al., 2016; Gwamaka et al., 2012; Moya-Alvarez et al., 2017; Nyakeriga et al., 2004). Několik vědeckých skupin se proto začalo touto problematikou zabývat, nicméně došly k poněkud rozporuplným výsledkům.

Z výsledků některých výzkumů vyplývá, že doplňování železa anemickým dětem v oblasti s výskytem malárie nemá žádný vliv na zhoršení infekce. Pozitivní účinky doplňování železa na anemické pacienty převažují nad případným negativním vlivem na zhoršení malárie. Nicméně žádný negativní vliv v těchto studiích nebyl zaznamenán (Bates et al., 1987; Berger et al., 2000; Desai et al., 2004; Ekvall et al., 2000; Gara et al., 2010; Van

Den Hombergh et al., 1996; Mebrahtu et al., 2004; Menendez et al., 1997; Verhoef et al., 2002).

Jiné experimenty ukázaly opačné výsledky. Denní doplňování železa vedlo ke zhoršení zdravotního stavu až k úmrtí u nakažených jedinců (Nwanyanwu et al., 1996; Oppenheimer et al., 1986; Sazawal et al., 2006; Smith et al., 1989).

Podobně experimenty na druhé rizikové skupině, tedy těhotných ženách, vykazovaly nejasné výsledky po léčbě anémie, založené na doplňování železa (Fowkes et al., 2018; Kabyemela et al., 2008; Menendez et al., 1994).

Zda železo v malarických oblastech anemickým jedincům doplňovat, či nikoliv, je stále nejasné. Rozporuplné výsledky různých studií jsou dány komplikovaným testováním. Pokusy mohou být ovlivněny celou řadou faktorů, jako je věk a pohlaví jedince, roční období, dostatečný počet probandů, velikost dávky a frekvence s jakou je železo dodáváno, přítomnost hemoglobinopatie a momentální stav železa, na stávajícím průběhu malárie u nakaženého aj., proto lze jen obtížně zobecnit jednotlivé závěry.

Doplňování železa jedincům s jeho nedostatkem průkazně zlepšilo jejich hematologický stav, proto je doplňování železa anemickým jedincům vhodným postupem. Nicméně vzhledem k tomu, že se výskyt malárie a anémie způsobené nedostatkem železa překrývá, a vzhledem k možnému následnému zhoršení infekce je doporučeno dodávat železo současně s antimalariky (Fontaine, 2007).

Závěr

Předmětem této práce bylo shrnout, jakou roli hraje železo v boji s malárií. Popsat, z jakých zdrojů a jak parazit železo přijímá, transportuje a vylučuje a jaký vliv na něj mají hladiny železa hostitele. Jelikož je železo nezbytné pro vývoj a přežití parazita *Plasmodium*, nabízí se využít právě zásah do metabolismu železa jako způsob léčby malárie. Proto jsou zde také zmíněny látky, které na železo a jeho metabolismus cílí.

Parazit pravděpodobně není závislý pouze na jednom zdroji železa, ale využívá železo z více různých zdrojů, jako je železo vázané v LIP, feritinu, transferinu nebo hemu hostitele.

Není dosud zcela jasné, jakým mechanismem *Plasmodium* železo přijímá a jakým ho vylučuje. Zdá se však, že právě protein ZIPCO souvisí s přísunem železa skrz plazmatickou membránu, i když se očividně nejedná o jediný způsob transportu. Transportér PfVIT naopak zprostředkovává detoxifikaci železa. Jak bylo ukázáno, tak oba tyto transportéry se významně podílí na udržování homeostázy železa u těchto parazitů a stávají se tak zajímavým cílem pro antimalarická léčiva.

Parazit *Plasmodium* tráví Hb. Během trávení Hb dochází k uvolňování volného hemu, který je pro buňku toxický. Toxickému vlivu volného hemu se parazit brání přeměnou hemu na chemicky inertní Hz. Železo uvnitř Hz však parazit nevyužívá. Tvorba Hz, která je pro parazita esenciální, představuje možný cíl. A právě na ten míří chinolinová a artemisininová antimalarika.

Další zmiňovanou strategií je chelatační terapie, která se stále zdokonaluje. Jsou vyvíjeny nové chelátory s lepší schopností proniknout do buňky, s delší dobou působení, s nižšími negativními vedlejšími účinky na hostitele, s účinností i při perorálním podávání.

Zda je vhodné léčit anemické jedince v malarických oblastech podáváním železa je dosud nejasné. Výsledky studií mluví protichůdně. Při této léčbě v oblastech trvalého výskytu malárie je proto na místě spolu s dodáváním železa preventivní podávání antimalarik.

Malárie je po staletí známým, a proto široce probádaným onemocněním. Nicméně i přes značné pokroky ve výzkumu existuje stále mnoho otazníků, na něž je třeba odpovědět. Současně kvůli neustále se objevujícím rezistentním kmenům, je nutné stále pátrat po nových účinnějších léčivech.

Literatura

- Aft, R.L., and Muellers, G.C. (1983). Hemin-mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.* *258*, 12069–12072.
- Aft, R.L., and Muellers, G.C. (1984). Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. *J. Biol. Chem.* *259*, 301–305.
- Aidoo, M., Terlouw, D.J., Kolczak, M.S., McElroy, P.D., Ter Kuile, F.O., Kariuki, S., Nahlen, B.L., Lal, A.A., and Udhayakumar, V. (2002). Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* *359*, 1311–1312.
- Albuquerque, S.S., Carret, C., Grosso, A.R., Tarun, A.S., Peng, X., Kappe, S.H.I., Prudêncio, M., and Mota, M.M. (2009). Host cell transcriptional profiling during malaria liver stage infection reveals a coordinated and sequential set of biological events. *BMC Genomics* *10*, 1–13.
- Ambele, M.A., Sewell, B.T., Cummings, F.R., Smith, P.J., and Egan, T.J. (2013). Synthetic hemozoin (β -hematin) crystals nucleate at the surface of neutral lipid droplets that control their sizes. *Cryst. Growth Des.* *13*, 4442–4452.
- * Aschemeyer, S., Qiao, B., Stefanova, D., Valore, E. V., Sek, A.C., Alex Ruwe, T., Vieth, K.R., Jung, G., Casu, C., Rivella, S., et al. (2018). Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood* *131*, 899–910.
- Ayi, K., Turrini, F., Piga, A., and Arese, P. (2004). Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: A common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* *104*, 3364–3371.
- Barffour, M.A., Schulze, K.J., Coles, C.L., Chileshe, J., Kalungwana, N., Arguello, M., Siamusantu, W., Moss, W.J., West, K.P., and Palmer, A.C. (2017). High iron stores in the low malaria season increase malaria risk in the high transmission season in a prospective cohort of rural Zambian children. *J. Nutr.* *147*, 1531–1536.
- Bates, C.J., Powers, H.J., Lamb, W.H., Gelman, W., and Webb, E. (1987). Effect of supplementary vitamins and iron on malaria indices in rural Gambian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *81*, 286–291.
- Baum, L., and Ng, A. (2004). Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer’s disease animal models. *J. Alzheimer’s Dis.* *6*, 367–377.
- Bendrat, K., Berger, B.J., and Cerami, A. (1995). Haem polymerization in malaria. *Nature* *378*, 138.
- Berger, J., Dyck, J.L., Galan, P., Aplogan, A., Schneider, D., Traissac, P., and Hercberg, S. (2000). Effect of daily iron supplementation on iron status, cell-mediated immunity, and incidence of infections in 6-36 month old Togolese children. *Eur. J. Clin. Nutr.* *54*, 29–35.
- * Camaschella, C. (2015). Iron-deficiency anemia. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1832–1843.

- CaracO', C., Aloj, L., and Eckelman, W.C. (1998). The gallium-deferoxamine complex: Stability with different deferoxamine concentrations and incubation conditions. *Appl. Radiat. Isot.* *49*, 1477–1479.
- CDC (2019). DPDx - Malaria. Dostupné na: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria>. Získáno 16/12/2019. [internet].
- Chevion, M., Chuang, L., and Golenser, J. (1995). Effects of zinc-desferrioxamine on *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 1902–1905.
- Chugh, M., Sundararaman, V., Kumar, S., Reddy, V.S., Siddiqui, W.A., Stuart, K.D., and Malhotra, P. (2013). Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5392–5397.
- Clark, M., Fisher, N. C., Kasthuri, R., & Cerami Hand, C. (2013). Parasite maturation and host serum iron influence the labile iron pool of erythrocyte stage *Plasmodium falciparum*. *Bone* *23*, 1–16.
- Coban, C., Lee, M.S.J., and Ishii, K.J. (2018). Tissue-specific immunopathology during malaria infection. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 266–278.
- * Collins, W.E., and Jeffery, G.M. (2007). *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* *20*, 579–592.
- * Cowman, A.F., Healer, J., Marapana, D., and Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and disease. *Cell* *167*, 610–624.
- * Crichton, R. (2016). Iron metabolism: From molecular mechanisms to clinical consequences: Fourth edition.
- Denu, J.M., and Tanner, K.G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: Evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* *37*, 5633–5642.
- Desai, M.R., Dhar, R., Rosen, D.H., Kariuki, S.K., Shi, Y.P., Kager, P.A., and ter Kuile, F.O. (2004). Daily iron supplementation is more efficacious than twice weekly iron supplementation for the treatment of childhood anemia in western Kenya. *J. Nutr.* *134*, 1167–1174.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Ph, D., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., et al. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Drug Ther. (NY)*. *361*, 455–467.
- Dorn, A., Stoffel, R., Matile, H., Bubendorf, A., and Ridley, R.G. (1995). Malarial haemozoin/ β -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* *374*, 269–271.
- Eastman, R.T., and Fidock, D.A. (2009). Artemisinin-based combination therapies: A vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 864–874.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D.A., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., and Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* *424*, 957–961.

- Edward, J.T., Chubb, F.L., and Sangster, J. (1997). Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Relationship of the lipophilicity of the apochelator to its ability to mobilize iron from reticulocytes in vitro: Reappraisal of reported partition coefficients. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 1362–1368.
- Ekvall, H., Premji, Z., and Björkman, A. (2000). Micronutrient and iron supplementation and effective anti-malarial treatment synergistically improve childhood anaemia. *Trop. Med. Int. Heal.* 5, 696–705.
- Eng, B.H., Guerinot, M.L., Eide, D., and Saier, M.H. (1998). Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* 166, 1–7.
- Esmon, C.T. (1992). Protein S and protein C. Biochemistry, physiology, and clinical manifestation of deficiencies. *Trends Cardiovasc. Med.* 2, 214–219.
- Fine, J.M., Kosyakovskiy, J., Baillargeon, A.M., Tokarev, J. V., Cooner, J.M., Svitak, A.L., Faltsek, K.A., Frey, W.H., and Hanson, L.R. (2020). Intranasal deferoxamine can improve memory in healthy C57 mice, suggesting a partially non-disease-specific pathway of functional neurologic improvement. *Brain Behav.* 10, 1–10.
- Fontaine, O. (2007). Conclusions and recommendations of the WHO Consultation on prevention and control of iron deficiency in infants and young children in malaria-endemic areas. *Food Nutr. Bull.* 28, S621–S627.
- Fowkes, F.J.I., Allen, S.J., Allen, A., Alpers, M.P., Weatherall, D.J., and Day, K.P. (2008). Increased microerythrocyte count in homozygous α^+ - thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia. *PLoS Med.* 5, 0494–0501.
- Fowkes, F.J.I., Moore, K.A., Opi, D.H., Simpson, J.A., Langham, F., Stanisic, D.I., Ura, A., King, C.L., Siba, P.M., Mueller, I., et al. (2018). Iron deficiency during pregnancy is associated with a reduced risk of adverse birth outcomes in a malaria-endemic area in a longitudinal cohort study. *BMC Med.* 16, 1–10.
- Fritsch, G., Sawatzki, G., Treumer, J., Jung, A., and Spira, D.T. (1987). *Plasmodium falciparum*: Inhibition *in-vitro* with lactoferrin, desferriferriethiocin, and desferricrocin. *Exp. Parasitol.* 63, 1–9.
- Fry, M. (1989). Diferric transferrin reductase in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 469–473.
- Gabay, T., and Ginsburg, H. (1993). Hemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate — A possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. *Exp. Parasitol.* 77, 261–272.
- * Galaris, D., Barbouti, A., and Pantopoulos, K. (2019). Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1866, 118535.
- Gara, S.N., Madaki, A.J.K., and Thacher, T.D. (2010). A comparison of iron and folate with folate alone in hematologic recovery of children treated for acute malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 843–847.

- * Garcia, L.S. (2010). Malaria. Clin. Lab. Med. 30, 93–129.
- Glickstein, H., Breuer, W., Loyevsky, M., Konijn, A.M., Libman, J., Shanzer, A., and Cabantchik, Z.I. (1996). Differential cytotoxicity of iron chelators on malaria-infected cells versus mammalian cells. Blood 87, 4871–4878.
- Goheen, M.M., Wegmüller, R., Bah, A., Darboe, B., Danso, E., Affara, M., Gardner, D., Patel, J.C., Prentice, A.M., and Cerami, C. (2016). Anemia offers stronger protection than sickle cell trait against the erythrocytic stage of falciparum malaria and this protection is reversed by iron supplementation. EBioMedicine 14, 123–130.
- Goldberg, D.E., Slater, A.F.G., Beavis, R., Chait, B., Cerami, A., and Henderson, G.B. (1991). Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: A catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. J. Exp. Med. 173, 961–969.
- Gordeuk, V., Thuma, P., Brittenham, G., McLaren, C., Parry, D., Backenstose, A., ... Poltera, A.A. (1992). Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. N. Engl. J. Med. 327, 1473–1477.
- Gwamaka, M., Kurtis, J.D., Sorensen, B.E., Holte, S., Morrison, R., Mutabingwa, T.K., Fried, M., and Duffy, P.E. (2012). Iron deficiency protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria and death in young children. Clin. Infect. Dis. 54, 1137–1144.
- Haldar, K., Henderson, C.L., and Cross, G.A.M. (1986). Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-sn-glycerol. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 8565–8569.
- Heppner, D.G., Hallaway, P.E., Kontoghiorghes, G.J., and Eaton, J.W. (1988). Antimalarial properties of orally active iron chelators. Blood 72, 358–361.
- Herraiz, T., Guillén, H., González-Peña, D., and Arán, V.J. (2019). Antimalarial quinoline drugs inhibit β -hematin and increase free hemin catalyzing peroxidative reactions and inhibition of cysteine proteases. Sci. Rep. 9, 1–16.
- Hershko, C., and Peto, T.E.A. (1988). Deferoxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. J. Exp. Med. 168, 375–387.
- Hershko, C., Theanacho, E.N., Spira, D.T., Peter, H.H., Dobbin, P., and Hider, R.C. (1991). The effect of N-alkyl modification on the antimalarial activity of 3-hydroxypyridin-4-one oral iron chelators. Blood 77, 637–643.
- Hider, R.C., Mohd-Nor, A.R., Silver, J., Morrison, I.E.G., and Rees, L.V.C. (1981). Model compounds for microbial iron-transport compounds. Part 1. Solution chemistry and Mössbauer study of iron(II) and iron(III) complexes from phenolic and catecholic systems. J. Chem. Soc. Dalton Trans.
- Hider, R.C., Howlin, B., Miller, J.R., Mohd-Nor, A.R., and Silver, J. (1983). Model compounds for microbial iron-transport compounds. Part IV. Further solution chemistry and Mössbauer studies on iron(II) and iron(III) catechol complexes. Inorganica Chim. Acta 80, 51–56.
- Hien, T.T., and White, N.J. (1993). Qinghaosu. Lancet 341, 603–608.

- Hoang, A.N., Sandlin, R.D., Omar, A., Egan, T.J., and Wright, D.W. (2010). The neutral lipid composition present in the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* concentrates heme and mediates β -hematin formation with an unusually low activation energy. *Biochemistry* *49*, 10107–10116.
- Van Den Hombergh, J., Dalderop, E., and Smit, Y. (1996). Does iron therapy benefit children with severe malaria-associated anaemia? A clinical trial with 12 weeks supplementation of oral iron in young children from the Turiani division, Tanzania. *J. Trop. Pediatr.* *42*, 220–227.
- * Hood, M.I., and Skaar, E.P. (2012). Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 525–537.
- Hoppe, H.C., Van Schalkwyk, D.A., Wiehart, U.I.M., Meredith, S.A., Egan, J., and Weber, B.W. (2004). Antimalarial quinolones and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 2370–2378.
- Ingram, V.M. (1957). Gene mutations in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* *180*, 326–328.
- Isacchi, B., Arrigucci, S., Marca, G. La, Bergonzi, M.C., Vannucchi, M.G., Novelli, A., and Bilia, A.R. (2011). Conventional and long-circulating liposomes of artemisinin: Preparation, characterization, and pharmacokinetic profile in mice. *J. Liposome Res.* *21*, 1–8.
- Jackson, K.E., Klonis, N., Ferguson, D.J.P., Adisa, A., Dogovski, C., and Tilley, L. (2004). Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* *54*, 109–122.
- Jairam, K.T., Havlik, I., and Monteagudo, F.S.E. (1991). Possible mechanism of action of desferrioxamine and 2,2'-bipyridyl on inhibiting the *in-vitro* growth of *Plasmodium falciparum* (FCR 3 strain). *Biochem. Pharmacol.* *42*, 1633–1634.
- Jani, D., Nagarkatti, R., Beatty, W., Angel, R., Slebodnick, C., Andersen, J., Kumar, S., and Rathore, D. (2008). HDP - A novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog.* *4*, 1–15.
- Janse, C. (2016). General introduction rodent malaria parasites. Dostupné na: <https://www.lumc.nl/org/parasitologie/research/malaria/berghei-model/general-introduction>. Získáno 20/04/2020. [internet].
- Kabyemela, E.R., Fried, M., Kurtis, J.D., Mutabingwa, T.K., and Duffy, P.E. (2008). Decreased susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women with iron deficiency. *J. Infect. Dis.* *198*, 163–166.
- Kim, S.A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kaplan, J., and Guerinot, M. Lou (2006). Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* (80-.). *314*, 1295–1298.
- Klayman, D.L. (1985). Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* (80-.). *228*, 1049–1055.

- Klonis, N., Crespo-Ortiz, M.P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P.J., and Tilley, L. (2011). Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11405–11410.
- Kontoghiorghes, G.J., Aldouri, M.A., Hoffbrand, A.V., Barr, J., Wonke, B., Kourouclaris, T., and Sheppard, L. (1987). Effective chelation of iron in β thalassaemia with the oral chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* *295*, 1509–1512.
- Krugliak, M., Zhang, J., and Ginsburg, H. (2002). Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* *119*, 249–256.
- Krungkrai, S.R., and Yuthavong, Y. (1987). The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *81*, 710–714.
- Kuhn, S.M., and McCarthy, A.E. (2006). Paediatric malaria: What do paediatricians need to know? *Paediatr. Child Health (Oxford)* *11*, 349–354.
- Kuhn, Y., Rohrbach, P., and Lanzer, M. (2007). Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin. *Cell. Microbiol.* *9*, 1004–1013.
- Kumar, N., and Zheng, H. (1990). Stage-specific gametocytocidal effect *in-vitro* of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* *76*, 214–218.
- Labarbuta, P., Duckett, K., Botting, C.H., Chahrour, O., Malone, J., Dalton, J.P., and Law, C.J. (2017). Recombinant vacuolar iron transporter family homologue PfVIT from human malaria-causing *Plasmodium falciparum* is a Fe²⁺/H⁺ exchanger. *Sci. Rep.* *7*, 1–10.
- Laskey, J.D., Ponka, P., and Schulman, H.M. (1986). Control of heme synthesis during friend cell differentiation: Role of iron and transferrin. *J. Cell. Physiol.* *129*, 185–192.
- Lin, W.S., Armstrong, D.A., and Gaucher, G.M. (1975). Formation and repair of papain sulfenic acid. *Can. J. Biochem.* *53*, 298–307.
- Loyevsky, M., Lytton, S.D., Mester, B., Libman, J., Shanzer, A., and Cabantchik, Z.I. (1993). The antimalarial action of desferal involves a direct access route to erythrocytic (*Plasmodium falciparum*) parasites. *J. Clin. Invest.* *91*, 218–224.
- Loyevsky, M., John, C., Zaloujnyi, I., and Gordeuk, V. (1997). Amino-thiol multidentate chelators as antimalarials. *Biochem. Pharmacol.* *54*, 451–458.
- Lytton, S., Mester, B., Libman, J., Shanzer, A., and Cabantchik, Z. (1994). Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials: II. Evidence for differential effects on parasite iron-dependent nucleic acid synthesis. *Blood* *84*, 910–915.
- * Marr, J.J., Komuniecki, R.W., and Nilsen, T.W. (2003). *Molecular medical parasitology* (Elsevier).
- Mebrahtu, T., Stoltzfus, R.J., Chwaya, H.M., Jape, J.K., Savioli, L., Montresor, A., Albonico, M., and Tielsch, J.M. (2004). Low-dose daily iron supplementation for 12 months does not increase the prevalence of malarial infection or density of parasites in young Zanzibari children. *J. Nutr.* *134*,

3037–3041.

- Menendez, C., Todd, J., Alonso, P.L., Francis, N., Lulat, S., Ceesay, S., M' Boge, B., and Greenwood, B.M. (1994). The effects of iron supplementation during pregnancy, given by traditional birth attendants, on the prevalence of anaemia and malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 590–593.
- Menendez, C., Kahigwa, E., Hirt, R., Vounatsou, P., Aponte, J.J., Font, F., Acosta, C.J., Schellenberg, D.M., Galindo, C.M., Kimario, J., et al. (1997). Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet* 350, 844–850.
- Monti, D., Basilico, N., Parapini, S., Pasini, E., Olliaro, P., and Taramelli, D. (2002). Does chloroquine really act through oxidative stress? *FEBS Lett.* 522, 3–5.
- Moya-Alvarez, V., Cottrell, G., Ouédraogo, S., Accrombessi, M., Massougbodgi, A., and Cot, M. (2017). High iron levels are associated with increased malaria risk in infants during the first year of life in Benin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 497–503.
- Nosten, F., and White, N.J. (2007). Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 181–192.
- * Ntumngia, F.B., Thomson-Luque, R., Pires, C. V, and Adams, J.H. (2016). The role of the human Duffy antigen receptor for chemokines in malaria susceptibility: current opinions and future treatment prospects. *Physiol. Behav.* 176, 139–148.
- Nwanyanwu, O.C., Ziba, C., Kazembe, P.N., Gamadzi, G., Gondwe, J., and Redd, S.C. (1996). The effect of oral iron therapy during treatment for *Plasmodium falciparum* malaria with sulphadoxine - pyrimethamine on Malawian children under 5 years of age. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90, 589–595.
- Nyakeriga, A.M., Troye-Blomberg, M., Chemtai, A.K., Marsh, K., and Williams, T.N. (2004). Malaria and nutritional status in children living on the coast of Kenya. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1604–1610.
- Oliveira, M.F., Kycia, S.W., Gomez, A., Kosar, A.J., Bohle, D.S., Hempelmann, E., Menezes, D., Vannier-Santos, M.A., Oliveira, P.L., and Ferreira, S.T. (2005). Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett.* 579, 6010–6016.
- Oppenheimer, S.J., David Gibson, F., Macfarlane, S.B., Moody, J.B., Harrison, C., Spencer, A., and Bunari, O. (1986). Iron supplementation increases prevalence and effects of malaria: Report on clinical studies in Papua New Guinea. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 603–612.
- Pandey, A. V., Tekwani, B.L., Singh, R.L., and Chauhan, V.S. (1999). Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. *J. Biol. Chem.* 274, 19383–19388.
- Peto, T.E.A., and Thompson, J. (1987). Effects of iron and desferrioxamine on the growth of *Plasmodium falciparum in-vitro*. *Br. J. Haematol.* 65, 257–257.
- Pisciotta, J.M., Coppens, I., Tripathi, A.K., Scholl, P.F., Shuman, J., Bajad, S., Shulaev, V., and

- Sullivan, D.J. (2007). The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *Biochem. J.* 402, 197–204.
- Platel, D.F.N., Mangou, F., and Tribouley-Duret, J. (1999). Role of glutathione in the detoxification of ferriprotoporphyrin IX in chloroquine resistant *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98, 215–223.
- Pollack, S., and Fleming, J. (1984). *Plasmodium falciparum* takes up iron from transferrin. *Br. J. Haematol.* 58, 289–293.
- Pollack, S., and Schnelle, V. (1988). Inability to detect transferrin receptors on *P. falciparum* parasitized red cells. *Br. J. Haematol.* 125–129.
- Posner, G.H., and Oh, C.H. (1992). A Regiospecifically oxygen-18 labeled 1,2,4-trioxane: A simple chemical model system to probe the mechanism(s) for the antimalarial activity of artemisinin (Qinghaosu). *J. Am. Chem. Soc.* 114, 8328–8329.
- Posner, G.H., Wang, D., Cumming, J.N., Oh, C.H., French, A.N., Bodley, A.L., and Shapiro, T.A. (1995). Further evidence supporting the importance of and the restrictions on a carbon-centered radical for high antimalarial activity of 1, 2, 4-trioxanes like artemisinin. *J. Med. Chem.* 38, 2273–2275.
- * Prentice, A.M., Ghattas, H., Doherty, C., and Cox, S.E. (2007). Iron metabolism and malaria. *Food Nutr. Bull.* 28, 524–539.
- * Rai, M., Ingle, A.P., and Medici, S. (2018). *Biomedical applications of metals* (Springer International Publishing).
- * Ramamoorthy, S., Shippenberg, T.S., and Jayanthi, L.D. (2011). Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation.
- Raventos-Suarez, C., Pollack, S., and Nagel, R.L. (1982). *Plasmodium falciparum*: Inhibition of *in-vitro* growth by desferrioxamine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 919–922.
- Raymond J. Bergeron, Jan Wiegand, James S. McManis, and P.T.P. (1991). Synthesis and biological evaluation of naphthyl-desferrioxamine iron chelators. *J. Med. Chem.* 39, 1575–1581.
- Rikos, N., Giannadaki, G.K., Spontidaki, A., Tzagkaraki, M., and Linardakis, M. (2020). Health status, anxiety, depression, and quality of life of patients with thalassemia. *J. Public Heal.*
- Rodriguez, M.H., and Jungery, M. (1986). A protein on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes functions as a transferrin receptor. *Nature* 324, 388–391.
- Rosenthal, P.J. (2004). Cysteine proteases of malaria parasites. *Int. J. Parasitol.* 34, 1489–1499.
- Rosenthal, P.J., McKerrow, J.H., Aikawa, M., Nagasawa, H., and Leech, J.H. (1988). A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest.* 82, 1560–1566.
- Sahu, T., Boisson, B., Lacroix, C., Bischoff, E., Richier, Q., Formaglio, P., Thiberge, S., Dobrescu, I., Ménard, R., and Baldacci, P. (2014). ZIPCO, a putative metal ion transporter, is crucial for

- Plasmodium* liver-stage development . EMBO Mol. Med. 6, 1387–1397.
- Sanchez-Lopez, R., and Haldar, K. (1992). A transferrin-independent iron uptake activity in *Plasmodium falciparum*-infected and uninfected erythrocytes. Mol. Biochem. Parasitol. 55, 9–20.
- Sazawal, S., Black, R.E., Ramsan, M., Chwaya, H.M., Stoltzfus, R.J., Dutta, A., Dhingra, U., Kabole, I., Deb, S., and Othman, M.K. (2006). Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: Community-based, randomised, placebo-controlled trial. Lancet 367, 133–143.
- Scheibel, L.W., and Adler, A. (1982). Antimalarial activity of selected aromatic chelators. III. 8-Hydroxyquinolines (oxines) substituted in positions 5 and 7, and oxines annelated in position 5,6 by an aromatic ring. Mol. Pharmacol.
- Scott, M.D., Ranz, A., Kuypers, F.A., Lubin, B.H., and Meshnick, S.R. (1990). Parasite uptake of desferroxamine: a prerequisite for antimalarial activity. Br. J. Haematol. 75, 598–602.
- Shanzer, A., Libman, J., Lytton, S.D., Glickstein, H., and Cabantchik, Z.I. (1991). Reversed siderophores act as antimalarial agents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 6585–6589.
- Sigala, P.A., Crowley, J.R., Hsieh, S., Henderson, J.P., and Goldberg, D.E. (2012). Direct tests of enzymatic heme degradation by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem. 287, 37793–37807.
- * Singh, B., and Daneshvar, C. (2013). Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. Clin. Microbiol. Rev. 26, 165–184.
- Slater, A.F.G., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A., and Henderson, G.B. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 325–329.
- Slavic, K., Krishna, S., Lahree, A., Bouyer, G., Hanson, K.K., Vera, I., Pittman, J.K., Staines, H.M., and Mota, M.M. (2016). A vacuolar iron-transporter homologue acts as a detoxifier in *Plasmodium*. Nat. Commun. 7, 1–10.
- Smith, A.W., Hendrickse, R.G., Harrison, C., Hayes, R.J., and Greenwood, B.M. (1989). The effects on malaria of treatment of iron-deficiency anaemia with oral iron in Gambian children. Ann. Trop. Paediatr. 9, 17–23.
- Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M.M., Semblat, J.P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A.R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., et al. (2011). Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nat. Commun. 2, 512–565.
- Sorrentino, F., Maffei, L., Caprari, P., Cassetta, R., Dell’anna, D., Materazzi, S., and Risoluti, R. (2020). Pregnancy in thalassemia and sickle cell disease: The experience of an Italian thalassemia center. Front. Mol. Biosci. 7, 1–6.
- Sriboonvorakul, N., Ghose, A., Hassan, M.M.U., Hossain, M.A., Faiz, M.A., Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Sukthana, Y., Leopold, S.J., Plewes, K., et al. (2018). Acidosis and acute kidney

- injury in severe malaria. *Malar. J.* 17, 1–8.
- Stocks, P.A., Bray, P.G., Barton, V.E., Al-Helal, M., Jones, M., Araujo, N.C., Gibbons, P., Ward, S.A., Hughes, R.H., Biagini, G.A., et al. (2007). Evidence for a common non-heme chelatable-iron-dependent activation mechanism for semisynthetic and synthetic endoperoxide antimalarial drugs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46, 6278–6283.
- Sullivan, D.J., Gluzman, I.Y., and Goldberg, D.E. (1996). *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* (80-.). 271, 219–222.
- Summers, M.R., Jacobs, A., Tudway, D., Perera, P., and Ricketts, C. (1979). Studies in desferrioxamine and ferrioxamine metabolism in normal and iron-loaded subjects. *Br. J. Haematol.* 42, 547–555.
- Surolia, N., and Misquith, S. (1996). Cell surface receptor directed targeting of toxin to human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* 396, 57–61.
- Surolia, N., and Padmanaban, G. (1992). De novo biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 744–750.
- Taylor, S.M., Parobek, C.M., and Fairhurst, R.M. (2012a). Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 457–468.
- Taylor, W.R.J., Hanson, J., Turner, G.D.H., White, N.J., and Dondorp, A.M. (2012b). Respiratory manifestations of malaria. *Chest* 142, 492–505.
- Thuma, P.E., Mabeza, G.F., Biemba, G., Bhat, G.J., McLaren, C.E., Moyo, V.M., Zulu, S., Khumalo, H., Mabeza, P., M’Hango, A., et al. (1998a). Effect of iron chelation therapy on mortality in Zambian children with cerebral malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 214–218.
- Thuma, P.E., Olivieri, N.F., Mabeza, G.F., Biemba, G., Parry, D., Zulu, S., Fassos, F.F., Mcclelland, R.A., Koren, G., Brittenham, G.M., et al. (1998b). Assessment of the effect of the oral iron chelator deferiprone on asymptomatic *Plasmodium falciparum* parasitemia in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 358–364.
- Treeck, M., Sanders, J.L., Elias, J.E., and Boothroyd, J.C. (2011). The Phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites’ boundaries. *Cell Host Microbe* 10, 410–419.
- Tsafack, A., Loyevsky, M., Ponka, P., and Cabantchik, Z.I. (1996). Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials. IV. Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoyl hydrazone derivatives. *J. Lab. Clin. Med.* 127, 574–582.
- Vanderesse, R., Colombeau, L., Frochot, C., and Acherar, S. (2016). Inactivation of malaria parasites in blood: PDT vs inhibition of hemozoin formation. In *Current Topics in Malaria*, pp. 205–233.
- Verhoef, H., West, C.E., Nzyuko, S.M., De Vogel, S., Van Der Valk, R., Wanga, M.A., Kuijsten, A., Veenemans, J., and Kok, F.J. (2002). Intermittent administration of iron and sulfadoxine-pyrimethamine to control anaemia in Kenyan children: A randomised controlled trial. *Lancet* 360, 908–914.

- WHO (2019). World Malaria Report 2019. Dostupné na: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>. Získáno 13/01/2020. [internet].
- * Williams, T.N., and Thein, S.L. (2018). Sick cell anemia and its phenotypes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *19*, 113–147.
- Wu, W.M., Wu, Y., Wu, Y.L., Yao, Z.J., Zhou, C.M., Li, Y., and Shan, F. (1998). Unified mechanistic framework for the Fe(II)-induced cleavage of Qinghaosu and derivatives/analogues. The first spin-trapping evidence for the previously postulated secondary C-4 radical. *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 3316–3325.
- Yamada, K.A., and Sherman, I.W. (1979). *Plasmodium lophurae*: Composition and properties of hemozoin, the malarial pigment. *Exp. Parasitol.* *48*, 61–74.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2013). Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *Plant Physiol.* *161*, 108–120.
- Yanatori, I., and Kishi, F. (2019). DMT1 and iron transport. *Free Radic. Biol. Med.* *133*, 55–63.
- Yang, Y.Z., Ranz, A., Pan, H.Z., Zhang, Z.N., Lin, X.B., and Meshnick, S.R. (1992). Daphnetin: A novel antimalarial agent with *in-vitro* and *in-vivo* activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *46*, 15–20.
- Yinnon, A.M., Theanacho, E.N., Grady, R.W., Spira, D.T., and Herschko, C. (1989). Antimalarial effect of HBED and other phenolic and catecholic iron chelators. *Blood* *74*, 2166–2171.
- Yu, B., Yang, Y., Liu, Q., Zhan, A., Yang, Y., and Liu, H. (2020). A novel star like eight-arm polyethylene glycol-deferoxamine conjugate for iron overload therapy. *Pharmaceutics* *12*, 1–13.

* sekundární citace