

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (B1501)

Studijní obor: Biologie (1501R001)



Michal Havelka

**Rezistence *Trichomonas vaginalis* a dalších anaerobních
patogenů k metronidazolu**

**Resistance of *Trichomonas vaginalis* and other anaerobic
pathogens to metronidazole**

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha 2020

Poděkování:

Rád bych poděkoval především svému školiteli za jeho trpělivost a rady, kterými mi zpracování této bakalářské práce velmi ulehčil. Dále bych rád poděkoval katedře parazitologie za to, že mi toto téma schválila. Nakonec bych rád poděkoval všem, kdo mě při psaní této bakalářské práce podporovali.

Prohlášení:

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

V Praze dne: 14.8.2020

.....

Michal Havelka

Abstrakt

V této bakalářské práci jsou popsány mechanismy účinku metronidazolu a rezistence k tomuto chemoterapeutiku u tří anaerobních eukaryotických patogenů (*T. vaginalis*, *G. intestinalis* a *E. histolytica*). Nemoci způsobované těmito třemi patogeny patří na seznam opomíjených nemocí, přestože nám mohou způsobovat vážné komplikace. Metronidazol působí pouze v buňkách organismů s anaerobním metabolismem. Do buňky metronidazol vniká pasivní difúzí a poté musí být aktivován redukcí nitroskupiny. Mechanismus aktivace metronidazolu se mezi jednotlivými patogeny liší. Nejdůležitější jsou pro aktivaci metronidazolu enzymy energetického metabolismu v hydrogenosomech, dále cytosolická thioredoxin reduktáza a nitroreduktázy. Metronidazol působí poškození buněk třemi hlavními způsoby – poškození DNA a proteinů nitroradikály, tvorba kovalentních vazeb s proteiny a kovalentních vazeb s thiolu. Patogeni se mohou proti léčivu bránit omezením jeho aktivace zvýšením vnitrobuněčné koncentrace kyslíku nebo ztrátou energetického metabolismu v hydrogenozomech. Většinou jsou tyto způsoby obrany spjaty se změnou ve fyziologii patogena a také se snížením jeho životaschopnosti. Z alternativ k metronidazolu v léčbě trichomoniázy jsou nejlepšími kandidáty benzimidazolové deriváty a furazolidon. U všech možných alternativ je ale nutné ještě provést klinické testy.

Klíčová slova: metronidazol, rezistence, *Trichomonas*, *Giardia*, *Entamoeba*, alternativy, lék, hydrogenozom,

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to describe mechanisms of resistance to metronidazole in three anaerobic eukaryotic pathogens (*T. vaginalis*, *G. intestinalis*, *E. histolytica*). Diseases caused by these pathogens belong to the list of important but currently neglected diseases. Metronidazole acts only on microbes with an anaerobic metabolism. The drug enters the cell by passive diffusion and needs to be activated by reduction of the nitro group. Mechanisms of activation are different for every pathogen. Enzymes bound with energetic metabolism in hydrogenosomes, cytosolic thioredoxin reductase and nitroreductases play a major role in the activation. The drug damages cells in three ways – DNA damage, formation of covalent bonds with proteins, and covalent bonds with thiols. Pathogens have specific mechanisms to defend themselves against the drug. They can either down-regulate enzymes that activate metronidazole, reduce it to non-reactive aminoimidazole or they can increase the intracellular concentration of oxygen which leads to deactivation of the drug by futile cycling. These mechanisms are bound with physiological changes and subsequently with lowered viability of these pathogens. Furazolidone and benzimidazole derivatives are the best candidates to become an alternative to metronidazole for the treatment of trichomoniasis. Clinical trials are necessary for every probable alternative.

Key words: metronidazole, resistance, Trichomonas, Giardia, Entamoeba, alternatives, cure, hydrogenosome

Obsah

1. Úvod	1
2. Charakteristika vybraných patogenů a onemocnění	2
2.1. Trichomoniáza a <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
2.1.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
2.1.2. Přenos, příznaky, rizika	3
2.2. Giardióza a <i>Giardia intestinalis</i>	3
2.2.1. <i>Giardia intestinalis</i>	3
2.2.2. Přenos, příznaky, rizika	4
2.3. Améboza a <i>Entamoeba histolytica</i>	5
2.3.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	5
2.3.2. Přenos, příznaky, rizika	6
3. Metronidazol.....	7
3.1. Struktura metronidazolu	7
3.2. Použití metronidazolu.....	7
3.3. Mechanismus aktivace metronidazolu.....	8
3.4. Cytotoxické účinky metronidazolu.....	12
3.4.1. Poškození DNA	12
3.4.2. Vytváření kovalentních vazeb s proteiny	13
3.4.3. Vytváření kovalentních vazeb s thioly	14
4. Rezistence k metronidazolu.....	16
4.1. <i>Trichomonas vaginalis</i> a rezistence k metronidazolu	16
4.1.1. Mechanismy anaerobní rezistence <i>T. vaginalis</i>	17
4.1.2. Mechanismy klinické (aerobní) rezistence <i>T. vaginalis</i>	18

4.2. <i>Entamoeba histolytica</i> a rezistence k metronidazolu	19
4.2.1. Mechanismy rezistence <i>Entamoeba histolytica</i>	19
4.3. <i>Giardia intestinalis</i> a rezistence k metronidazolu	20
4.3.1. Mechanismy rezistence <i>G. intestinalis</i>	20
5. Alternativy k léčbě metronidazolem	22
5.1. Proč hledat alternativy k metronidazolu?	22
5.2. Možné alternativy v léčbě trichomoniázy	22
6. Závěr.....	24
7. Použitá literatura.....	25

1. Úvod

Boj s patogenními organismy, ať už prokaryotními, eukaryotními nebo virovými, je často během na velmi dlouhou trať. Stejně jako my máme své mechanismy obrany, ony mají ty své. Jedním z jejich významných mechanismů je rezistence k léčivům. Ke každému léčivu a u každého patogenního organismu se mechanismy rezistence značně liší a jejich objasnění a pochopení je v boji s nimi velmi důležitým krokem. Tento krok může vést k vývoji nových účinnějších léčiv, která se mohou zasloužit buďto o částečnou nebo v extrémních případech úplnou eradikaci daného patogenního organismu. Tudíž je třeba se této problematice řádně věnovat, mechanismy rezistence objasnit a získané poznatky dále využít.

Cílem této bakalářské práce je vytvořit ucelenou literární rešerši zaměřenou na shrnutí mechanismů rezistence vybraných anaerobních eukaryotních patogenních organismů k více než půl století užívanému, stále relativně spolehlivému a mnohdy jedinému antibiotiku užívanému v boji s těmito patogeny – metronidazolu. Nejprve se zaměřím na charakterizaci onemocnění, která tyto patogeny způsobují, poté na samotný metronidazol – jeho historii, mechanismy aktivace, cytotoxické účinky a mechanismus rezistence daných patogenů. Nakonec bych rád shrnul znalosti o léčivech, která slouží, nebo by mohla v budoucnu sloužit v léčbě daných infekcí jako vhodná alternativa.

Poznatky získané psaním této bakalářské práce bych v budoucnu rád v menším či větším rozsahu využil během svého dalšího studia.

2. Charakteristika vybraných patogenů a onemocnění

Tato práce bude zaměřena na mechanismy rezistence třech patogenních organismů: *Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis* a *Entamoeba histolytica*. V následujících kapitolách si tyto tři patogeny společně s onemocněními, která způsobují, více přiblížíme.

2.1. Trichomoniáza a *Trichomonas vaginalis*

Trichomoniáza je infekce lidské urogenitální soustavy způsobená patogenem *T. vaginalis*. Uvádí se, že jde o nejčastější lidské nevírové sexuálně přenosné onemocnění na světě. Podle odhadu Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2008 přibude každoročně až 276,4 milionů nových případů infekce *T. vaginalis*, z čehož patrně většina pochází z rozvojových zemí (WHO, 2012). Přestože jde o významně rozšířené onemocnění, není mu věnována taková pozornost, jakou by si zasloužilo. To je dáno tím, že nezpůsobuje přímo smrt, a tím, že mnoho lidí není obeznámeno s jeho vážnými následky (Menezes *et al.*, 2016).

2.1.1. *Trichomonas vaginalis*

Životní cyklus tohoto patogena je velmi jednoduchý. Převažuje pohyblivá forma trofozoita, která je jediným infekčním stádiem. Trofozoit se vyznačuje čtyřmi volnými bičíky, pátý bičík pak lemuje undulující membránu (Kulda *et al.*, 1986). Nejcharakterističtější organelou *T. vaginalis* je hydrogenozom, což je redukovaná mitochondrie. Pro hydrogenozom je charakteristický anaerobní metabolismus pyruvátu a malátu za vzniku molekulárního vodíku. Od toho je ostatně i odvozen jeho název. Dále obsahuje hydrogenozom enzymy odpovědné za vznik železosírných (FeS) skupin (Schneider *et al.*, 2011). Tvar těla může být různý. V čisté axenické kultuře je nejčastěji hruškovitý nebo oválný. Jakmile ale dojde v těle hostitele k přichycení na vaginální epitel, bere na sebe trofozoit améboidní podobu, čímž zvětšuje povrch, kterým může s buňkami epitelu interagovat. *T. vaginalis* využívá k adhezi širokou škálu molekul hostitelského povrchu – od cukrů přes proteiny až po některé lipofosfoglykany (Vilela and Benchimol, 2011). V životním cyklu *T. vaginalis* chybí stádium cysty a mimo tělo hostitele tento parazit přežívá jen velmi krátkou dobu (Honigberg and Brugerolle, 1990). Za určitých podmínek (například nedostatek živin) ale vytváří *T. vaginalis* formy cystám podobné, tzv. pseudocysty. Pseudocysty vznikají reverzibilní invaginací bičíků, aniž by docházelo k vytváření nějaké silné stěny, a pomáhají *T. vaginalis* přežít po určitou dobu ve stresovém prostředí (Beri *et al.*, 2020).

2.1.2. Přenos, příznaky, rizika

T. vaginalis je patogenem pouze lidským a přenáší se převážně sexuálním kontaktem. Přestože je to málo pravděpodobné, některé studie naznačují, že by mohlo docházet k přenosu infekce i vodou (Crucitti *et al.*, 2011) a přes jiné kontaminované objekty (Whittington, 1957).

Patogen napadá nejčastěji močovou trubici, pochvu a vulvu. Až 80% infekcí je asymptomatických (Allsworth *et al.*, 2009) a u těch symptomatických se mohou příznaky výrazně lišit. Mezi příznaky u žen patří zelenožlutý a silně zapáchající výtok z pochvy, svědění, podráždění, pálení během močení a zarudnutí poševní sliznice. Infekce může způsobovat vaginitidu, uretritidu a často vede, kvůli zvýšení pH vedoucímu ke snížené koncentraci bakterie *Lactobacillus acidophilus*, k namnožení anaerobních bakterií způsobujících bakteriální vaginózu (Rein, 1990). Podle některých studií má trichomoniáza vliv na průběh těhotenství a může vést k předčasnému porodu nebo až potratu (Silver *et al.*, 2014). Neléčená infekce u mužů zvyšuje riziko rakoviny prostaty (Sutcliffe *et al.*, 2012; Twu *et al.*, 2014). U žen je tato infekce spojována se zvýšeným rizikem rakoviny děložního čípku (Kharsany *et al.*, 1993). Neléčená trichomoniáza může v extrémních případech vést u mužů až k neplodnosti (Gimenes *et al.*, 2014) a některé studie naznačují, že infekce *T. vaginalis* zvyšuje pravděpodobnost jak nakažení virem HIV, tak jeho následného přenosu (Quinlivan *et al.*, 2012).

2.2. Giardióza a *Giardia intestinalis*

Giardióza je střevní infekce způsobená mikroaerofilním patogenem *G. intestinalis*. Uvádí se, že je infekce *G. intestinalis* nejčastější příčinou průjmových onemocnění. Odhaduje se, že se každoročně nakazí až 280 milionů lidí, z čehož k většině infekcí patrně dochází v rozvojových zemích (Lane and Lloyd, 2002). V některých zemích se uvádí až 50% prevalence v dětských kolektivech (Almirall *et al.*, 2013).

2.2.1. *Giardia intestinalis*

G. intestinalis je parazitem s velmi charakteristickou morfologií. V životním cyklu jsou známy dvě formy. První forma je pohyblivá a bičíkatá – trofozoit. Druhá forma je nepohyblivá s pevnou stěnou – cysta. Tělo trofozoita má tvar kapky a pohybuje se pomocí čtyř párů bičíků. Uvnitř buňky můžeme pozorovat dvě jádra a pár mediálních tělísek, což dává *G. intestinalis* na barvených preparátech její charakteristický vzhled. Další významnou částí trofozoita je ventrální přísavný disk, který patogen využívá k adhezi k buňkám

střevního epitelu (Gillin *et al.*, 1996). Nejcharakterističtější organelou *G. intestinalis* je mitozom, což je ještě více redukována mitochondrie, než jak tomu je u hydrogenozomu. V mitozomu už vůbec neprobíhá energetický metabolismus a jediným známým metabolickým procesem je biosyntéza železosírných (FeS) skupin (Tovar *et al.*, 2003; Martinová *et al.*, 2015).

Člověk se nakazí pozřením infekčních stádií – cyst. Ty jsou oválné s pevnou stěnou. Uvnitř každé z nich můžeme pozorovat čtyři jádra. To je zapříčiněno tím, že po encystaci dochází k jednomu mitotickému dělení jader, které ovšem není následováno cytokinezí (Jiráková *et al.*, 2012). Cysty prochází žaludkem, v dvanáctníku se jejich pevné stěny rozpustí působením proteáz a každá z nich dá vzniknout dvěma dvoujaderným trofozoitům. Trofozoiti se ve střevě vyskytují buďto volně, nebo přichyceni k epitelialním buňkám tenkého střeva. Své počty zvětšují asexuálně binárním podélným dělením (Gillin *et al.*, 1996). Dělení buňky probíhá ve třech fázích, které se od sebe liší jak délkou, tak i tím, jestli je buňka přichycena, nebo volně pohyblivá. Buňka začíná dělení přichycena k epitelu tenkého střeva, proběhne mitóza, vzniknou nové přísavné disky a dojde k semi-konzervativnímu rozdělení bičíků mezi budoucí dceřinné buňky. Aby se buňka mohla rozdělit na dvě dceřinné buňky, musí na několik málo minut přejít do fáze plovoucí. Vzniklé dceřinné buňky jsou ovšem stále spojeny tenkým cytoplazmatickým mostem. K úplnému oddělení a maturaci dochází až v poslední fázi (dlouhé až 50 minut), ve které se musí tyto dvojice buněk znovu přichytit k epitelu tenkého střeva (Nohynková *et al.*, 2006; Tůmová *et al.*, 2007). K encystaci dochází v tlustém střevě a cysty odchází ven se stolicí. Ve vlhkém prostředí dokáží přežít mimo tělo i několik měsíců (Bean, 2005).

2.2.2. Přenos, příznaky, rizika

K přenosu dochází pozřením kontaminovaného jídla, pití nebo fekálně-orální cestou. *G. intestinalis* se dělí do osmi genotypů s širokou škálou hostitelů, jako jsou některé druhy primátů, hospodářská zvířata, psi, kočky a několik dalších druhů volně žijících savců. Člověka mohou infikovat giardie genotypu I. a II. (Feng and Xiao, 2011; Ryan and Cacciò, 2013; Heyworth, 2016).

Uvádí se, že 5–15 % infekcí člověka je asymptomatických (Hill, 2001). U ostatních jsou nejčastějšími symptomy akutní giardiózy bolesti břicha, horečka, nadýmání a průjemy. U 80 % případů dochází k pohubnutí až o 5 kg, což je zapříčiněno malabsorpcí střeva. Tato zhoršená absorpce střeva je způsobena tím, že se trofozoiti namnoží do takových počtů, že

pokrývají celý povrch epitelu tenkého střeva (Hanevik *et al.*, 2007). V chronických případech u dětí může mít nemoc vliv na jejich vývin (Nygård *et al.*, 2006). Někdy má giardióza následky přetrvávající i několik měsíců až let po vyléčení, například syndrom dráždivého tračníku nebo chronickou únavu (Hanevik *et al.*, 2014).

2.3. Améboza a *Entamoeba histolytica*

Améboza je infekce střev způsobená parazitem *E. histolytica*. Uvádí se, že se každoročně tímto parazitem nakazí až 50 milionů lidí, a z toho že následkům této infekce každoročně podlehnou 50 000–100 000 nakažených (Walsh, 1986; WHO, 1997; Lozano *et al.*, 2012).

2.3.1. *Entamoeba histolytica*

U tohoto patogena převládají dvě formy; pohyblivý trofozoit a nepohyblivá cysta. Trofozoit se vyznačuje charakteristickými eruptivními pseudopodii. Ta využívá převážně k pohybu a k procesu fagocytózy (Tanyuksel and Petri Jr, 2003). Specifickým procesem je u améb trogocytóza. To je proces, během kterého při styku s různými buňkami (od epiteliálních buněk až po buňky imunitního systému) améba pohlcuje jejich fragmenty, což vede přes zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých kationtů k buněčné smrti napadené buňky. Trogocytóza je významná jak při pronikání z lumen střeva do krevního řečiště, tak při tvorbě abscesů během extraintestinální fáze (Ralston *et al.*, 2014).

Cytoplazma *E. histolytica* je rozdělena na ektoplazmu a endoplazmu. Velmi dlouho se mělo za to, že u tohoto patogena došlo k vymizení většiny organel. Není tomu tak. V endoplazmě můžeme nalézt velké množství měchýřků. Některé z nich představují redukováný Golgiho komplex, jiné hladké endoplazmatické retikulum (Dacks *et al.*, 2003; Bredeston *et al.*, 2005). Dále tam lze nalézt ribozomy, polyribozomy a mitozomy (Tovar *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2000).

Cysty jsou infekčním stádiem. Jsou čtyřjaderné, nepohyblivé s pevnou chitinovou stěnou. Infekce začíná jejich pozřením. Pevná chitinová stěna ochrání cysty před nízkým pH trávicích šťáv (Das *et al.*, 2006). Cysty projdou skrz žaludek a tenké střevo až na rozhraní s tlustým střevem, kde dochází k excystaci. Každá cysta dá vzniknout osmi jednojaderným trofozoitům formy minuta (neinvazivní forma). Trofozoiti ve formě minuta se ve střevě živí bakteriemi a tráveninou, adherují epiteliální buňky střeva a nijak zvlášť (v porovnání s invazivní formou) hostiteli neškodí. Množí se asexuálně binárním dělením a svůj životní cyklus uvnitř hostitele zakončují encystací. Cysty poté odchází z těla společně se stolicí.

Někteří trofozoiti ale přechází z formy minuta na invazivní formu magna, unikají z lumen střeva, napadají střevní sliznici a působí amébovou dysenterii (Tanyuksel and Petri Jr, 2003). K této transformaci dochází penetrací mukózy (atrofie mukózy způsobená například nutričním deficitem), která za normálních podmínek funguje jako bariéra chránící střevní epitel a která snižuje pohyblivost trofozoitů vazbou lektinu, který *E. histolytica* využívá k adhezenci (Chadee *et al.*, 1987). Forma magna je jakási slepá ulička v životním cyklu, která už dále není schopná vytvářet cysty. Ve střevní submukóze vytváří jedinci této formy lahvicovité léze. Améby se dále (po prasknutí lahvicovité léze) dostávají do krevního řečiště a napadají především játra, ale i další orgány včetně mozku (Adams and MacLeod, 1977; Villiers and Durra, 1998).

2.3.2. Přenos, příznaky, rizika

K přenosu dochází většinou pozřením cystami kontaminovaného jídla nebo vypitím cystami kontaminované vody. Možná je také infekce orálně-análním sexuálním kontaktem (Phillips *et al.*, 1981). Kromě lidí může *E. histolytica* infikovat některé druhy primátů, kočky a psy (Wittnich, 1976; Shimada *et al.*, 1992; Regan *et al.*, 2014; Vlčková *et al.*, 2018).

Uvádí se, že až u 90 % infekcí *E. histolytica* nejsou symptomy buďto žádné nebo jsou jen velmi mírné (Gatti *et al.*, 2002), avšak i asymptomatictí lidé se musí léčit. Jsou buďto přenašeči cyst nebo se u nich po určité době mohou příznaky nakonec také projevit. Amébozu dělíme na neinvazivní, invazivní a na extraintestinální. Základními příznaky amébové dysenterie jsou bolesti břicha, průjmy s příměsí krve a hlenu, často horečka a ve 20 % případů dochází k výrazným ztrátám na váze (Reed, 2000). U extraintestinální amébozy dochází nejčastěji ke vzniku jaterních abscesů. Méně časté jsou pak abscesy mozkové a rozšíření do pohrudnice a osrdečníku (Adams and MacLeod, 1977; Villiers and Durra, 1998).

3. Metronidazol

3.1. Struktura metronidazolu

Metronidazol je sloučeninou patřící do skupiny 5-nitroimidazolů. 5-nitroimidazoly jsou skupinou sloučenin tvořených aromatickým imidazolovým kruhem s navázanou nitroskupinou (NO_2^-) na pátém atomu kruhu. Nitroskupina je nejdůležitějším substituentem pro cytotoxickou aktivitu nitroimidazolů. 5-nitroimidazoly se od sebe liší substituenty na prvním nebo druhém atomu kruhu. V případě metronidazolu je na prvním atomu kruhu navázán 2-hydroxyethyl, na druhém atomu methyl. Například tinidazol (blízký příbuzný metronidazolu) má na prvním atomu kruhu navázán 2-ethylsulfonylethyl (Ang *et al.*, 2017). Struktura metronidazolu je zobrazena na Obrázku 1.

3.2. Použití metronidazolu

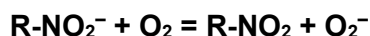
Metronidazol byl vynalezen původně jako lék proti infekcím způsobených patogenem *T. vaginalis*. Vznikl jako syntetický derivát azomycinu (2-nitroimidazol), sloučeniny produkované několika zástupci skupin Actinobacteria a Proteobacteria (Cosar and Julou, 1959). Od té doby se jeho využití, co se týče počtu patogenů, proti kterým působí, velmi rozšířilo. Brzy na to došlo k dalšímu významnému objevu – účinku metronidazolu proti střevnímu patogenu *G. intestinalis* (Schneider, 1961). Následně se přišlo na to, že je účinný i proti dalšímu střevnímu patogenu – *E. histolytica* (Powell *et al.*, 1966). Zde však využití metronidazolu zdaleka nekončí. Do konce 20. století se na seznam patogenů, proti kterým metronidazol působí, přidaly ještě *Dientamoeba fragilis* (Preiss *et al.*, 1991), *Blastocystis hominis* (Zierdt *et al.*, 1983) a několik zástupců anaerobních a mikroaerofilních bakterií – *Fusobacterium fusiforme*, *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori* a *Clostridium spp.* (Füzi & Csukás, 1969; Nastro & Finegold, 1972; Hirschl *et al.*, 1988).

Metronidazol je účinný především v buňkách organismů s anaerobním metabolismem. To je dáno jeho mechanismem aktivace, který bude popsán v další kapitole. Metronidazol se musí stát alternativním akceptorem elektronů, aby došlo k redukci nitroskupiny. Přenašeč s vyšším redoxním potenciálem má vždy větší tendenci přijmout elektron než ten s nižším redoxním potenciálem. U anaerobních organismů figurují přenašeče o velmi nízkém redoxním potenciálu, nižším, než má nitroskupina metronidazolu. Nitroskupina metronidazolu má ovšem o dost nižší redoxní potenciál, než mají přenašeče v buňkách organismů s aerobním metabolismem (Smith and Edwards, 1995). V buňkách aerobů tedy k redukci metronidazolu téměř nedochází (Edwards *et al.*, 1973). K tomu se navíc v

přítomnosti kyslíku metronidazol zpětně oxiduje, čímž se stává znovu neaktivním (Obr. 1,2). Tento proces se nazývá jalový cyklus (Reakce 1) (Mason and Holtzman, 1975).

Reakce 1: Jalový cyklus. Nitroradikálový aniont se ve vysoké koncentraci kyslíku zpětně oxiduje za vzniku metronidazolu a superoxidového aniontu.

Převzato a upraveno z Edwards, (1993).



3.3. Mechanismus aktivace metronidazolu

Stejně jako ostatní nitroimidazoly, vstupuje metronidazol do buňky v podobě neaktivního prekurzoru, který je aktivován až redukcí nitroskupiny uvnitř buněk patogenů. Do dnešního dne nebyly objeveny žádné specifické transportéry, které by usnadňovaly jeho vstup do buněk. Předpokládá se tedy, že do buňky proniká pasivní difuzí (Müller and Gorrell, 1983). Pro pasivní difuzi je třeba určitý koncentrační gradient, který je udržován redukcí nitroskupiny metronidazolu uvnitř buňky (Ings *et al.*, 1974).

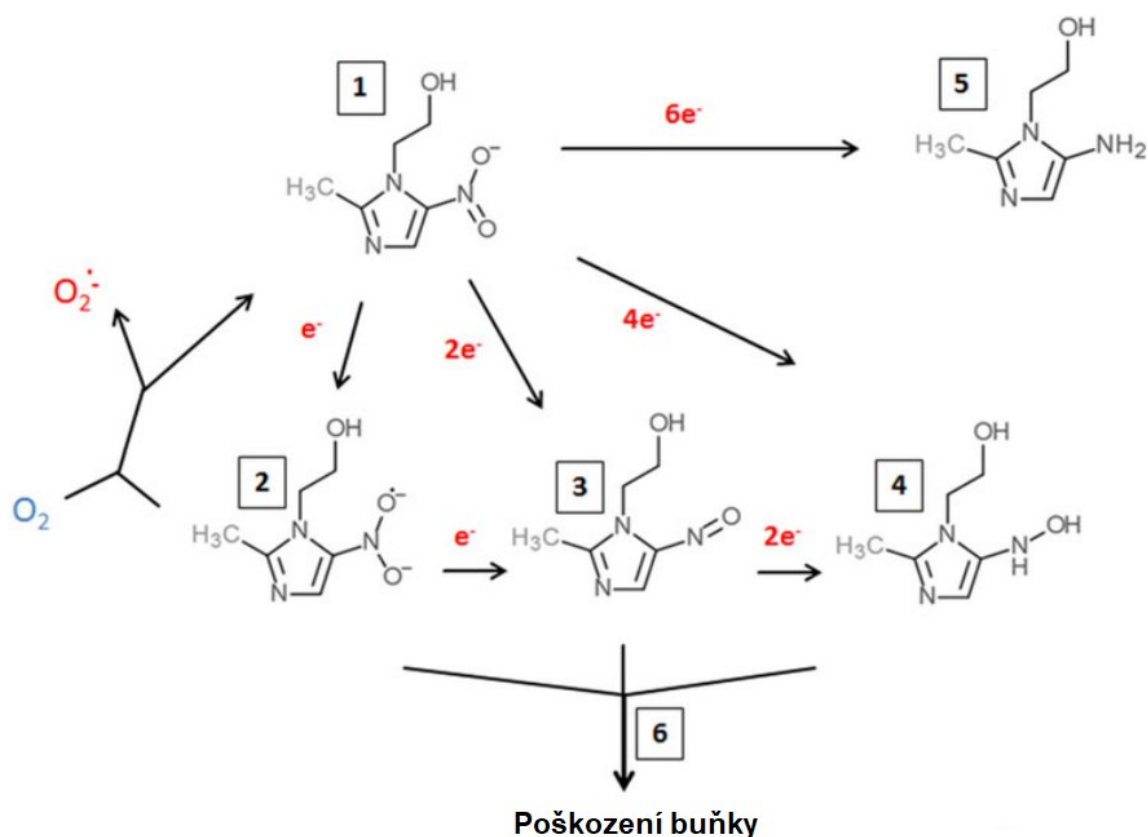
Není zcela jasné, který z intermediátů (Obr.1) je hlavní cytotoxickou formou. U klasických nitroaromatických sloučenin je třeba dodat celkem šest elektronů, aby došlo podle Reakce 2 k redukcí nitroskupiny až na aminoskupinu (Ings *et al.*, 1974). V případě nitroimidazolů většinou ale k redukcí až na aminoskupinu nedochází. Podle jednoho názoru se tato reakce v případě nitroimidazolů zastavuje po prvním kroku. Podle tohoto názoru vzniká po prvním kroku redukce nestabilní nitroradikálový aniont, který se následně rychle rozpadá na nitritový aniont a imidazolový radikál. Rozpadem by bylo zabráněno dalšímu kroku redukce. Nitritový aniont by měl být v tomto případě hlavním cytotoxickým agens (Edwards *et al.*, 1980). Podle jiného názoru by hlavními cytotoxickými formami mohly být buďto nitrosové nebo hydroxylaminové intermediáty, které vznikají následnými kroky redukce (Ings *et al.*, 1974; Leitsch *et al.*, 2007, 2009).

Reakce 2: Klasický mechanismus redukce nitroskupiny nitroaromatické sloučeniny na aminoskupinu včetně všech vznikajících intermediátů.

Zleva doprava můžeme vidět nitrosloučeninu, nitroradikálový aniont, nitrosový, poté hydroxylaminový intermediát a nakonec amin.

Převzato a upraveno z Edwards, (1993).





Obr. 1: Aktivace metronidazolu a jeho cytotoxicita v buňkách mikroaerofilů a anaerobů. Metronidazol vstupuje do buňky jako neaktivní prekurzor (1). O podobě další formy rozhoduje počet elektronů přenesených na nitroskupinu. Prvním možným vzniklým intermediátem po přidání jednoho elektronu je nitroradikálový aniont (2). Po přidání celkově dvou elektronů nám vzniká nitrosoimidazol (3). Přidáním celkově čtyř elektronů vzniká poslední možný reaktivní intermediát – hydroxylaminimidazol (4). K reakci může dojít buďto postupně (1→2→3→4) nebo může být jednokroková (1→4). Na levé straně můžeme vidět situaci, kdy se metronidazol ocitne v buňce s vysokou koncentrací kyslíku. V tom případě je nitroradikálový aniont velmi rychle zpětně oxidován na původní nereaktivní prekurzor. Některé enzymy u *G. intestinalis* (enzym nitroreduktáza 2) jsou schopny detoxifikovat metronidazol v jednom kroku přidáním šesti elektronů na nitroskupinu za vzniku nereaktivní formy aminoimidazolu (5). Reaktivní formy (2, 3, 4) vedou k cytotoxickému poškození buňky (6).

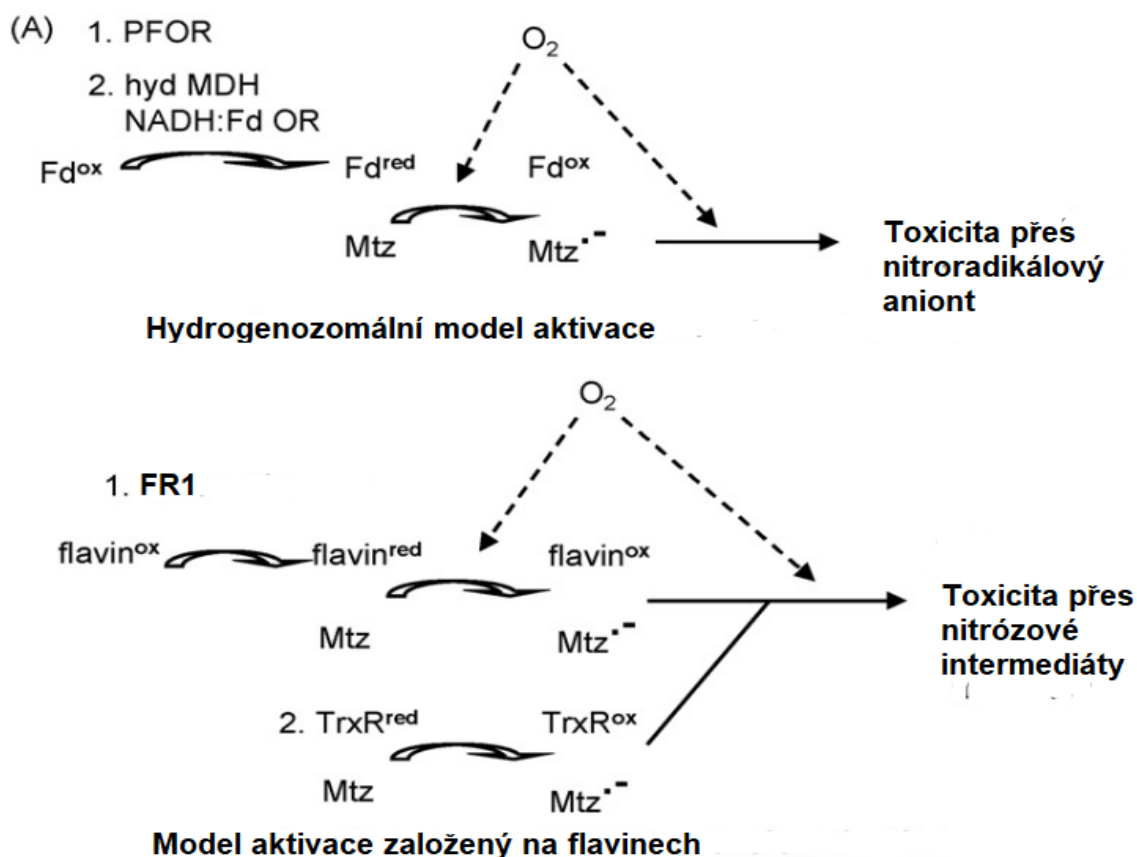
Převzato a upraveno z Leitsch, (2019).

První enzymatickou dráhou spojovanou s redukcí metronidazolu byla dráha metabolizující pyruvát enzymem pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázou (PFOR) (Yarlett *et al.*, 1986; Vanacova *et al.*, 2003). Tato metabolická dráha existuje skoro u všech anaerobů citlivých k metronidazolu (Narikawa, 1986). Za normálních podmínek je tento enzym u běžných organismů s anaerobním metabolismem využíván jako katalyzátor přeměny pyruvátu na acetyl-CoA a oxid uhličitý. Elektrony z reakce poté předává na ferredoxin, který je dále přenáší na enzym hydrogenázu. Hydrogenáza využívá tyto elektrony k syntéze molekulárního vodíku. Avšak pokud je v buňce přítomen metronidazol, stává se právě ten alternativním akceptorem elektronů, jelikož ferredoxin má o něco nižší redoxní potenciál (-430 mV), než jaký má nitroskupina metronidazolu (-415 mV) (Edwards *et al.*, 1973; Müller, 1986).

Podle nedávných studií ale hrají pravděpodobně významnou roli v redukcí metronidazolu flavinové enzymy (Obr. 2). Zmíňme si zde důležitý enzym thioredoxin reduktázu (TrxR). Thioredoxin reduktáza u některých anaerobů redukuje malý protein thioredoxin (Trx), který dále aktivuje skupinu thioredoxin-dependentních peroxidáz (TrxP), známým jinak jako peroxiredoxiny (Leitsch *et al.*, 2007, 2009, 2011). Peroxiredoxiny můžeme nalézt v různých buněčných kompartmentech a jejich hlavní funkcí je ochrana buňky proti poškození během oxidativního stresu. Tuto funkci plní převážně redukcí peroxidu vodíku a alkylových hydroperoxidů (Chae *et al.*, 1994). V přítomnosti metronidazolu však vykazuje thioredoxin reduktáza nitroreduktázovou aktivitu a místo thioredoxinu redukuje nitroskupinu metronidazolu (Coombs *et al.*, 2004). Zde je také důležité zmínit ještě jiný flavinový enzym – flavinovou reduktázu 1 (FR1), jinak známou jako NADPH oxidáza. Flavinová reduktáza 1 je enzymem, jehož aktivita vede v buňkách *T. vaginalis* k redukcí kyslíku za vzniku peroxidu vodíku. U rezistentních kmenů je exprese tohoto enzymu snížena nebo úplně vypnuta (Leitsch *et al.*, 2012a). To vede k domněnce, že jeho aktivita bude nějakým způsobem důležitá pro aktivaci nebo cytotoxicitu metronidazolu a že snížení aktivity tohoto enzymu bude důležitým krokem při vytváření rezistence (Leitsch *et al.*, 2014). Pro *G. intestinalis* je třeba zmínit nitroreduktázu 1 (GINR1) a nitroreduktázu 2 (GINR2) jako další aktivátory metronidazolu (Nillius *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2013). Nitroreduktázová aktivita byla dokázána i u samotného enzymu hydrogenázy. Ta má tudíž také schopnost aktivovat metronidazol (Church *et al.*, 1990).

Způsobů aktivace je tedy hned několik a není lehkým úkolem určit, který z nich by měl být tím hlavním. Větší množství aktivátorů v buňkách patogenů ve většině případů

velmi snižuje pravděpodobnost vzniku nějaké silné rezistence. Je navíc možné, že mezi různými patogeny převládají různé způsoby aktivace. Tento názor podpořily také experimenty se sníženou expresí nebo přímo deaktivací PFOR v buňkách *T. vaginalis* a *G. intestinalis*. U *T. vaginalis* mělo snížení exprese PFOR na citlivost k metronidazolu jen velmi malý vliv (Leitsch *et al.*, 2009). U *G. intestinalis* po snížení exprese PFOR ale došlo k rapidnímu snížení citlivosti k metronidazolu (Dan *et al.*, 2000).



Obr. 2: Modely aktivace metronidazolu v buňkách *T. vaginalis*.

Nahoře je vidět původní model aktivace přes PFOR a hydrogenázu. PFOR nebo NADH ferredoxin oxidoreduktáza (NADH:Fd OR) redukuje ferredoxin (Fd), který dále redukuje metronidazol (Mtz) za vzniku nitroradikálového aniontu, který by měl být hlavním cytotoxickým agens. NADH:Fd OR je produkována pomocí malát dehydrogenázy (hyd MDH). Kyslík v tomto modelu buďto oxiduje redukovaný ferredoxin nebo nitroradikál. Dole je vidět model aktivace založený na FR1 a TrxR. V tomto modelu je metronidazol redukován flavinovými enzymy (TrxR) a volnými flaviny generovanými pomocí FR1. Kyslík zde buďto oxiduje redukované flaviny nebo nitroradikály dříve, než se nitroradikály stihnou redukovat na vysoce toxické nitrozové intermediáty.

Převzato a upraveno z Leitsch *et al.*, (2010).

3.4. Cytotoxické účinky metronidazolu

Jak už bylo naznačeno v minulé kapitole, metronidazol už svou samotnou aktivací narušuje elektronový tok v buňce a v některých případech ho může i přímo inhibovat. Tím, že se stává alternativním akceptorem elektronů ferredoxinu a thioredoxinu, narušuje metabolismus pyruvátu a brání aktivaci peroxiredoxinů uvnitř buněk patogenů. To však není jeho hlavní účinek. Všechny důležité účinky si v této kapitole přiblížíme.

3.4.1. Poškození DNA

Jak bylo pozorováno už v roce 1974, reaktivní intermediáty se váží na DNA a proteiny (Ings *et al.*, 1974). Metronidazol způsobuje zlomy dvoušroubovice a destabilizaci helikální struktury DNA. Poškození by měl pravděpodobně způsobovat nitroradikálový aniont oxidací DNA (Edwards *et al.*, 1990; Löfmark *et al.*, 2010). Hodnota minimální letální koncentrace metronidazolu (MLC) pozitivně koreluje s koncentrací párů adeninu (A) a thyminu (T) (Edwards *et al.*, 1974). Nejpravděpodobnějším cílem intermediátů se zdá být thymin, jelikož při poškození dochází k uvolňování směsi thyminů a thymidin fosfátů (Edwards *et al.*, 1980). Metronidazol vytváří ještě vazby s guaninem (G). Tyto vazby ale nemají na poškození DNA žádný vliv, jelikož jsou samy o sobě velmi nestabilní a rychle se rozpadají (Ludlum *et al.*, 1988).

Přestože dochází k jejímu poškození, DNA se nezdá být hlavním cílem cytotoxických účinků metronidazolových intermediátů, což naznačuje i několik nedávných studií (Hofštetřová *et al.*, 2010; Leitsch *et al.*, 2009). Pokud by byla DNA specifickým cílem, zastavil by se u *G. intestinalis* po poškození DNA buněčný cyklus, dokud by nedošlo k potřebným opravám. Dalším argumentem je to, že pokud by šlo pouze o poškození DNA, neměla by být ovlivněna schopnost adherence k epiteliálním buňkám. Avšak *G. intestinalis* tuto schopnost téměř ihned ztrácí, a to i v koncentracích, které pro ně nejsou letální (Hofštetřová *et al.*, 2010; Uzlikova and Nohynkova, 2014). Dále dochází u *T. vaginalis* ke zlomům dvoušroubovice příliš pomalu v porovnání s rychlostí, kterou zástupci *T. vaginalis* vystavení vysoké koncentraci metronidazolu umírají. Navíc se zdá, že poškození DNA je nepřímo úměrné koncentraci redukováného metronidazolu, což je přesný opak toho, co by se dalo očekávat. S vyšší koncentrací totiž cytotoxicita logicky roste. Dále není jisté, jak by mohly nitroradikálové anionty reagovat s DNA v jádře, aniž by před tím reagovaly s jadernými obaly (Leitsch *et al.*, 2009).

3.4.2. Vytváření kovalentních vazeb s proteiny

Metronidazol vytváří v buňkách *T. vaginalis* kovalentní vazby se sedmi cytosolickými proteiny – thioredoxin reduktázou (TrxR), thioredoxin peroxidázou (TXNPx), thiolovou peroxidázou (TPX), ribonukleotid reduktázou (RNR), cytosolickou malát dehydrogenázou (MDH), enolázou a glukóza-6-fosfát izomerázou (GPI), což vede u většiny z těchto proteinů (kromě enolázy a glukóza-6-fosfát izomerázy) k inhibici nebo omezení jejich aktivity. Dané proteiny by mohly být cílem především proto, že se všechny vyskytují v přítomnosti thioredoxin reduktázy, která v buňkách *T. vaginalis* pravděpodobně figuruje jako hlavní zdroj reaktivních intermediátů metronidazolu. Thioredoxin reduktáza by měla být tedy jak aktivátorem, tak i cílem cytotoxických účinků metronidazolu (Leitsch *et al.*, 2009).

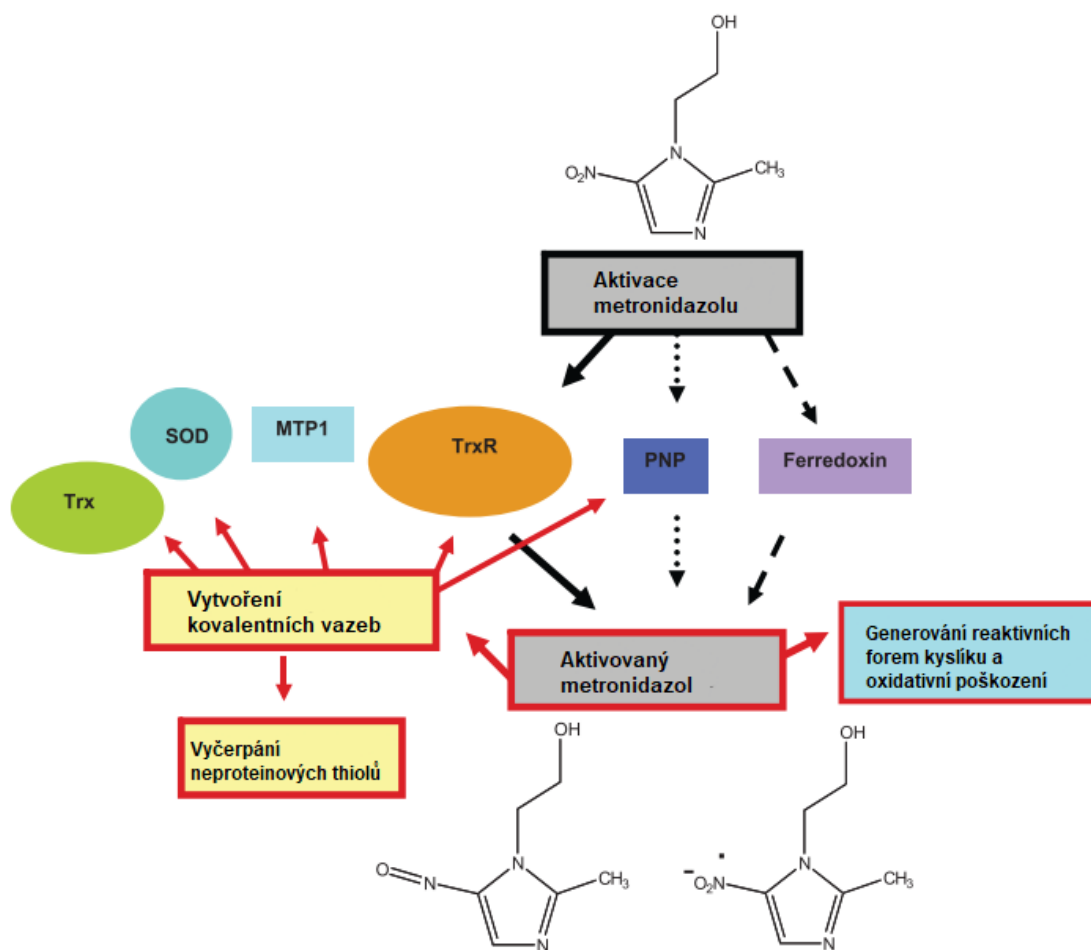
U *E. histolytica* vytváří reaktivní intermediáty metronidazolu kovalentní vazby s pěti cytosolickými proteiny (Obr. 3) – metronidazol target proteinem 1 (Mtp1), superoxid dismutázou (SOD), purin nukleosid fosforylázou (PNP), thioredoxin reduktázou (TrxR) a thioredoxinem (Trx). Mtp1 byl donedávna pouze hypotetickým proteinem. Obsahuje ve své struktuře šest cysteinů. Jeho aktivace a následná aktivita by možná mohly být závislé na thioredoxinu. Superoxid dismutáza je enzym vyskytující se v přítomnosti thioredoxin reduktázy a má za úkol odstraňovat superoxidové aniontové radikály vznikající aktivitou tohoto enzymu (Leitsch *et al.*, 2007).

U *G. intestinalis* jsou účinky metronidazolových intermediátů oproti zmíněným dvěma patogenům trochu odlišné. U *T. vaginalis* a *E. histolytica* se vytváří kovalentní vazby převážně s proteiny spjatými s thioredoxinovým systémem nebo s proteiny vyskytujícími se v blízkosti tohoto systému. U *G. intestinalis* se vytváří kovalentní vazby se strukturními proteiny giardiny, *Giardia* trofozoit antigenem 2 (GTA-2), acetaldehyd dehydrogenázou (ACDH), pyruvát fosfát dikinázou (PPDK), aminotransferázou aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAT) a elongačním faktorem 1- γ (Leitsch *et al.*, 2012b). Ani jeden ze zmíněných proteinů do thioredoxinového systému nepatří, ani s ním není nijak spjat. Je pravděpodobné, že jsou dané proteiny cílem proto, že se v buňce *G. intestinalis* vyskytují v blízkosti enzymu PFOR, který zde nejspíše bude figurovat jako hlavní zdroj reaktivních intermediátů metronidazolu (Leitsch *et al.*, 2011). S nejvyšší pravděpodobností je v buňkách *G. intestinalis* hlavním cílem metronidazolu translační elongační faktor 1- γ , esenciální faktor v syntéze proteinů. Vytvořením kovalentní vazby s metronidazolem je veškerá aktivita tohoto faktoru inhibována (Leitsch *et al.*, 2012b).

3.4.3. Vytváření kovalentních vazeb s thiolu

V buňkách *T. vaginalis* a *E. histolytica* dochází dále k vytváření vazeb s neproteinovými thiolu (Obr. 3), hlavně cysteinem, což může vést k destabilizaci oxidoredukční rovnováhy buňky. Cystein je mezi anaerobními organismy velmi důležitou aminokyselinou. Je nejen složkou proteinů, ale také důležitým reduktantem. Hraje významnou roli v obraně proti oxidativnímu stresu a detoxifikaci peroxidu vodíku (Fahey *et al.*, 1984). Vytvořením kovalentní vazby s metronidazolem se jakákoliv antioxidační aktivita thiolů inhibuje a jakmile se koncentrace thiolů v cytosolu příliš sníží, vyvolává to v buňce oxidativní stres (Leitsch *et al.*, 2007, 2009). Avšak to, že metronidazol vytváří vazby s cysteinem, může mít pro buňku také protektivní charakter. To bylo prokázáno *in vitro* pokusem se zvýšenou koncentrací cysteinů v médiu. Po delší inkubaci v médiu se zvýšenou koncentrací cysteinu přežívalo vystavení metronidazolu větší procento patogenů v porovnání s jedinci inkubovanými v médiu s normální koncentrací cysteinu. Ve vyšší koncentraci cysteinu v médiu nevzniká tolik kovalentních vazeb metronidazolu s proteiny a neproteinovými thiolu buňky, takže nemůže docházet k navození tak rapidního oxidativního stresu (Leitsch *et al.*, 2007; Leitsch, 2017).

Tak jako se buňky *G. intestinalis* od *T. vaginalis* a *E. histolytica* odlišovaly proteiny, které vytvářely vazbu s metronidazolem, tak se také odlišují vlivem metronidazolu na snížení hladiny neproteinových thiolů. V testech, ve kterých se porovnával vliv metronidazolu a dalších nitroimidazolů na hladinu neproteinových thiolů, neměl metronidazol na jejich množství v buňkách *G. intestinalis* takový vliv, jako tomu bylo v buňkách *T. vaginalis* nebo *E. histolytica*. Tam vliv metronidazolu jednoznačně převažoval nad vlivem ostatních nitroimidazolů včetně 2-nitroimidazolu (Leitsch *et al.*, 2007, 2009). V buňkách *G. intestinalis* nejúčinněji snižuje hladinu neproteinových thiolů 2-nitroimidazol, o něco méně některé jiné 5-nitronimidazoly (například ronidazol) a nejhůře pak metronidazol (Leitsch *et al.*, 2012b). Rozdílné účinky metronidazolu v buňkách *G. intestinalis* v porovnání s *T. vaginalis* a *E. histolytica* by se mohly dát za vinu hlavně odlišným faktorům ovlivňujícím metabolismus metronidazolu. Tato odlišnost je pravděpodobně způsobena tím, že se *G. intestinalis* převážnou většinu života vyskytuje v tenkém střevě, a tak je adaptována k toleranci vyšších koncentrací kyslíku než například *T. vaginalis* a *E. histolytica* (Mastronicola *et al.*, 2011; Leitsch *et al.*, 2012b).



Obr. 3: Model aktivace a účinku metronidazolu v buňkách *E. histolytica*.

Po vstupu metronidazolu do buňky je aktivován TrxR (černá obyčejná šipka), možná fosforylázou PNP (tečkovaná šipka) nebo ferredoxinem (přerušovaná šipka). Aktivovaný může být ve dvou formách, buďto nitroradikálový aniont (dole vpravo) nebo nitrosoimidazol (dole vlevo). Nitroradikálový aniont může vytvářet reaktivní formy kyslíku (ROS) a tím způsobovat oxidativní poškození. Nitrosoimidazol pak vytváří kovalentní vazby s neproteinovými thiolů, čímž vede k snížení hladiny neproteinových thiolů. Dále vytváří vazbu s pěti proteiny: thioredoxin reduktázou, metronidazol target proteinem 1, purin nukleosid fosfatázou, superoxid dismutázou a thioredoxinem, což vede k inhibici nebo změně aktivity daných proteinů (červené šipky).

Převzato a upraveno z Leitsch *et al.*, (2007).

4. Rezistence k metronidazolu

Přestože je metronidazol využíván už 60 let, je výskyt rezistence k němu mezi anaerobními patogeny relativně malý. U většiny patogenů nedochází k vytváření rezistence k metronidazolu v takové míře, jako tomu bývá u jiných antibiotik (Holmes *et al.*, 2016). S určitými formami rezistence k metronidazolu se ovšem mezi klinickými izoláty patogenů můžeme běžně setkat.

Zde je důležité zmínit, že rezistence k metronidazolu není jediným důvodem selhání léčby. Během selhání léčby hrají podstatnou roli i opakovaná reinfekce patogenem (například u *T. vaginalis* způsobená tím, že se neléčí partner (Kissinger *et al.*, 2006)) nebo vliv jiných mikroorganismů obsazujících stejnou niku jako patogen. Tyto mikroorganismy pak mohou podstatně snižovat účinnost metronidazolu (Nagy and Földes, 1991). Také velmi záleží na dávkování a na způsobu podání. Nejúčinnější je 2 g dávka denně perorálně podávaná několik dní (Mattila *et al.*, 1983).

Kromě *Helicobacter pylori*, zástupce mikroaerofilních bakterií, jsme zatím u žádného patogena nenarazili na úplnou rezistenci k metronidazolu. Je více než pravděpodobné, že je navození takto silné rezistence u *H. pylori* způsobeno pro tohoto patogena specifickými mechanismy aktivace metronidazolu, kterými se liší od patogenů ostatních. K aktivaci metronidazolu v buňkách *H. pylori* dochází prostřednictvím nitroreduktáz RdxA a FdxA. Nesmyslnou mutací v genech kódujících tyto nitroreduktázy pak pravděpodobně dochází k vytvoření rezistence (Jenks *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2000).

Stejně jako se mezi patogeny lišily mechanismy aktivace a cytotoxického účinku metronidazolu, liší se i mechanismy rezistence a názory na ně se také často rozcházejí. V následující části tyto mechanismy pro jednotlivé patogeny rozebereme.

4.1. *Trichomonas vaginalis* a rezistence k metronidazolu

O rezistenci k metronidazolu se u *T. vaginalis* vědělo (Robinson, 1962) už pár let po jeho zavedení do klinické praxe. U *T. vaginalis* rozdělujeme rezistenci k metronidazolu na dva typy podle podmínek, za kterých vznikají. Prvním typem je rezistence aerobní, nebo jinak také označovaná jako rezistence klinická (Meingassner and Thurner, 1979). Druhým typem je rezistence anaerobní (Kulda, 1999). Té je docíleno pouze v laboratorních podmínkách, a proto se někdy označuje jako rezistence laboratorně indukovaná.

4.1.1. Mechanismy anaerobní rezistence *T. vaginalis*

Tento typ rezistence je navozen eliminací cest, které běžně vedou v buňkách *T. vaginalis* k aktivaci metronidazolu. Navození anaerobní rezistence se dá docílit pouze *in vitro* a je doprovázeno snížením exprese hydrogenozomálních enzymů, které jsou zodpovědné za aktivaci metronidazolu. Tato změna ve fyziologii způsobuje snížení celkové viability. Anaerobní rezistence se projevuje za anaerobních podmínek a dochází ke snížení citlivosti k metronidazolu až tisícinásobně (Kulda *et al.*, 1993).

Navození anaerobní rezistence u *T. vaginalis* souvisí s postupným snížením aktivity až úplnou ireverzibilní inhibicí PFOR, důležitého aktivátoru metronidazolu v hydrogenosomech. Jedinci, u kterých je snížena exprese jen PFOR, vykazují ale pouze slabou změnu citlivosti a ve vyšších koncentracích léku umírají (Čerkasovová *et al.*, 1988). K navození anaerobní rezistence je v buňkách *T. vaginalis* nutná inhibice aktivity nebo snížení exprese dalších hydrogenozomálních enzymů, především NAD⁺ dependentního jablečného enzymu, který za normálních podmínek katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát, a hydrogenázy, která syntetizuje molekulární vodík (Rasoloson *et al.*, 2002). Takto rezistentní *T. vaginalis* neprodukuje vodík a mají výrazně sníženou produkci acetátu, která je rovněž svázaná s metabolismem pyruvátu. Zastavení hydrogenozomálního energetického metabolismu je kompenzováno zvýšením glykolýzy v cytoplasmě. Dochází ke zvýšení exprese cytosolického enzymu laktát dehydrogenázy a následkem toho je zvýšení produkce laktátu (Kulda *et al.*, 1993).

Ze studií z roku 2009 a 2010 vychází, že by pro vytvoření anaerobní rezistence měla být klíčová ztráta aktivity flavinových enzymů (TrxR a FR1), jelikož byla jejich aktivita velmi snížena nebo úplně inhibována u anaerobně rezistentních kmenů *T. vaginalis*. Inhibice aktivity thioredoxin reduktázy je způsobena nepřítomností důležitého kofaktoru – FAD (flavinadenindinukleotidu) (Leitsch *et al.*, 2009, 2010). Pokud se navíc inhibuje pouze aktivita enzymů PFOR a hydrogenázy, ale neinhibuje se aktivita flavinových enzymů, dochází dál k běžné redukci metronidazolu na reaktivní intermediáty (Leitsch *et al.*, 2010). Za sníženou aktivitou PFOR a dalších hydrogenozomálních enzymů by mohla stát nízká koncentrace flavinů (Leitsch *et al.*, 2009, 2010, 2012a). Tento argument by jen potvrzoval předchozí myšlenku o klíčové roli flavinových enzymů ve vytvoření anaerobní rezistence, aniž by vyvracel dřívější doklady o snížení aktivity PFOR a dalších hydrogenozomálních enzymů. Pokud by však výhradní roli hrály pouze flaviny, nebylo by jasné, na jakém

principu by byl založen selektivní účinek metronidazolu na anaerobní organismy, protože flaviny jsou běžné i u hostitelských buněk.

4.1.2. Mechanismy klinické (aerobní) rezistence *T. vaginalis*

Navození aerobní rezistence je možné pouze v prostředí se zvýšenou koncentrací kyslíku. V anaerobním prostředí vykazují aerobně rezistentní kmeny jen mírnou změnu citlivosti k metronidazolu. Ve zvýšených koncentracích kyslíku dochází ke snížení citlivosti až o několik řádů (Müller and Gorrell, 1983). Navození tohoto typu rezistence je pravděpodobně způsobeno částečnou inhibicí aktivity mechanismů odpovědných za snižování intracelulární koncentrace kyslíku a udržování anaerobního prostředí. Částečná inhibice aktivity těchto faktorů a následné zvýšení vnitrobuněčné koncentrace kyslíku by mělo mít za následek inaktivaci metronidazolu přes jalový cyklus (Reakce 1) (Yarlett *et al.*, 1986).

Hlavním faktorem důležitým pro vytvoření aerobní rezistence by měly být flavinové enzymy (jejich běžnou funkci v buňkách *T. vaginalis* dobře znázorňuje Obrázek 2). Aktivita flavinové reduktázy 1 je snížena nebo úplně inhibována v buňkách vykazujících jak anaerobní, tak aerobní rezistenci. Tento enzym je v buňkách *T. vaginalis* důležitým faktorem ve vychytávání kyslíku a jeho následné redukci na peroxid vodíku během recyklace NADP⁺ na NADPH (Leitsch *et al.*, 2014). Je velmi pravděpodobné, že inhibice aktivity flavinových enzymů nebo snížení jejich exprese, což dále vede k nižší hladině redukováných flavinů, budou důležité podmínky pro vytváření jak aerobní, tak anaerobní rezistence. To podporuje i pozorování, že stádium časně anaerobně rezistentních kmenů vykazuje velmi podobný fenotyp jako aerobně rezistentní kmeny *T. vaginalis* (Tachezy *et al.*, 1993). Dalším zjištěním, potvrzujícím tento názor, je to, že když se u rezistentních kmenů reaktivuje exprese flavinové reduktázy 1, přestávají být tyto kmeny rezistentními (Leitsch *et al.*, 2014).

I přes svou důležitou roli nebude flavinová reduktáza 1 jediným faktorem ovlivňujícím vytvoření aerobní rezistence u *T. vaginalis*. Z genomové studie rezistentních kmenů z roku 2017 (Bradic *et al.*, 2017) vychází, že by takových faktorů mělo být hned několik. U rezistentních kmenů dochází ke snížení exprese jak flavinové reduktázy 1, tak i dalších enzymů, jako například nitroreduktáz. Dalším důležitým rozdílem oproti nerezistentním kmenům je zvýšená exprese Nim 2 proteinů a velmi snížená exprese Nim 1 proteinů, vzdálených příbuzných Nim proteinů v buňkách *B. fragilis* (Pal *et al.*, 2009; Schaumann *et al.*, 2005). Přenesení Nim 1 genu do buněk *E. coli* vede k až dvacetinásobnému snížení citlivosti k metronidazolu, jelikož je redukován na neškodný aminoimidazol (Obr.1) (Pal

et al., 2009). V buňkách rezistentních *T. vaginalis* je však jeho exprese snížena, což vede k otázce, jak přesně a jestli vůbec by mohly produkty Nim genů v buňkách *T. vaginalis* ovlivňovat citlivost k metronidazolu. Další důležitou změnou oproti nerezistentním kmenům byla zvýšená exprese 14 genů pro membránové transportéry. Transportéry by tak mohly hrát důležitou roli v detoxifikaci přenášením metronidazolu přes membránu ven z buňky (Bradic *et al.*, 2017). Dalším důležitým faktorem ve vytváření rezistence by mohla být sekundární alkohol dehydrogenáza (S-ADH). Tento enzym v buňce za běžných anaerobních podmínek oxiduje sekundární alkoholy a redukuje ketony (Sutak *et al.*, 2012). U některých aerobně rezistentních kmenů je jeho exprese snížena, ale souvislost mezi aktivitou S-ADH a rezistencí k metronidazolu není jasná (Leitsch *et al.*, 2012a, 2013).

Je zjevné, že vytvoření rezistence je u *T. vaginalis* velmi složitý proces zahrnující mnoho faktorů, z nichž některé ještě buďto vůbec neznáme, nebo o nich a jejich funkci víme jen velmi málo. Této problematice bude nutné se v budoucnu věnovat a jednotlivé vztahy mezi těmito faktory objasnit, pokud chceme úplně pochopit mechanismus vytváření rezistence u patogena *T. vaginalis*.

4.2. *Entamoeba histolytica* a rezistence k metronidazolu

S klinickou rezistencí k metronidazolu jsme se u *E. histolytica* doposud nesetkali, avšak v laboratorním prostředí se podařilo rezistenci několikrát vyvolat (Samarawickrema *et al.*, 1997; Wassmann *et al.*, 1999; Penuliar *et al.*, 2015).

4.2.1. Mechanismy rezistence *Entamoeba histolytica*

Během pokusů, ve kterých se v buňkách *E. histolytica* podařilo vyvolat laboratorně indukovanou rezistenci k metronidazolu, se snížila citlivost maximálně desetinásobně (Penuliar *et al.*, 2015). V buňkách rezistentních kmenů dochází ke zvýšení exprese superoxid dismutázy a peroxiredoxinů a ke snížení exprese ferredoxinu 1 a thioredoxin reduktázy (Wassmann *et al.*, 1999). V genomové studii z roku 2015 bylo pozorováno, že rezistentní kmeny mění expresi až 88 genů, ale že například exprese enzymu PFOR a jeho následná aktivita u nich zůstává neměnná (Penuliar *et al.*, 2015). Zmíněným snížením exprese ferredoxinu a thioredoxin reduktázy se mechanismus vytvoření rezistence podobá mechanismu pozorovanému u anaerobně rezistentních kmenů *T. vaginalis*. Odlišuje se od ní ale tím, že u *E. histolytica* nedochází ke snížení aktivity enzymu PFOR (Penuliar *et al.*, 2015). To se dává za vinu hlavně tomu, že se v buňkách *E. histolytica* nevyskytuje pyruvát dehydrogenáza nebo pyruvát dekarboxyláza, enzymy, které by mohly figurovat jako

alternativy při inhibici PFOR (Clark *et al.*, 2007; Wassmann *et al.*, 1999). U rezistentních kmenů se nezhoršuje schopnost redukovat metronidazolový prekurzor. Dochází u nich však ke snížení virulence a zhoršení růstu buněk (Penuliar *et al.*, 2015). To je další podobnost s (anaerobně) rezistentními kmeny *T. vaginalis*, kde změna ve fyziologii buňky, vedoucí k rezistenci, vede k snížení celkové životaschopnosti buňky (Kulda *et al.*, 1993).

4.3. *Giardia intestinalis* a rezistence k metronidazolu

U *G. intestinalis* se běžně s klinickou rezistencí setkáváme (až stonásobné snížení citlivosti k metronidazolu v anaerobním prostředí). Ve starších studiích se mluví o účinnosti léčby mezi 60–100 % (Gardner and Hill, 2001). Samotná účinnost samozřejmě také závisí na léčebném režimu, jelikož u jedné 2 g dávky metronidazolu se udávala účinnost mezi 36–60 %, zatímco u režimu, kde se podává 700 mg denně po dobu 10 dní, se účinnost pohybovala mezi 80–100 % (Gardner and Hill, 2001). Dlouho se mělo za to, že přibližně u 20 % případů dochází k selhání léčby, avšak novější studie naznačují, že toto číslo rychle roste. Například v Londýně došlo mezi lety 2008 a 2013 k nárůstu počtu případů selhání léčby o více než 25 % (Nabarro *et al.*, 2015).

4.3.1. Mechanismy rezistence *G. intestinalis*

Z toho, co bylo zatím vyzkoušeno, by se dalo usuzovat, že důležitou roli při vytvoření rezistence bude hrát inhibice aktivity enzymu PFOR. Té se dá docílit *in vitro* pomocí „hammerhead“ ribozymů nebo dlouhou expozicí zvyšujícím se, ale ne přímo letálním koncentracím metronidazolu (Dan *et al.*, 2000; Leitsch *et al.*, 2011). Pokud však navodíme rezistenci pomocí mutagenese způsobené ultrafialovým zářením, aktivita PFOR zůstává neměnná (Leitsch *et al.*, 2011). PFOR tedy nemůže být jediným faktorem pro vytvoření rezistence u *G. intestinalis*. Je nutné najít faktory jiné.

Další možností, pokud přihlédneme k mechanismům vzniku rezistence *T. vaginalis*, by byl enzym thioredoxin reduktáza. Tento enzym je přítomný i v buňkách *G. intestinalis* a bylo dokázáno, že zvýšení jeho exprese vede k desetinásobnému zvýšení citlivosti k metronidazolu (Leitsch *et al.*, 2016). To znamená, že samotná přítomnost thioredoxin reduktázy má určitý vliv na aktivaci metronidazolu v buňkách *G. intestinalis*. To nám ale ještě neodpovídá na otázku, zda je to faktor důležitý pro vytváření rezistence. Pouze vypovídá o tom, že hraje roli v aktivaci. U rezistentních kmenů *G. intestinalis* se tento enzym exprimuje v úplně stejném množství jako u běžných kmenů (Leitsch *et al.*, 2009). Je zde ještě možnost, že by nebyla snížena exprese tohoto enzymu, ale byla by inhibována aktivita,

stejně jako tomu bylo u anaerobně rezistentních kmenů *T. vaginalis*. Tam je inhibice aktivity thioredoxin reduktázy způsobena snížením koncentrace flavinadeninindinukleotidu (FAD), kofaktoru, bez kterého nemůže thioredoxin reduktáza plnit svou funkci (Leitsch *et al.*, 2009, 2010; Ansell *et al.*, 2015).

Dalšími enzymy důležitými pro redukcí nitroskupiny metronidazolu v buňkách *G. intestinalis* jsou nitroreduktázy, zejména nitroreduktáza 1 (GINR1) a nitroreduktáza 2 (GINR2) (Nillius *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2013). Zvýšení exprese nitroreduktázy 1 vede až k trojnásobnému zvýšení citlivosti k metronidazolu a její exprese je většinou u rezistentních kmenů snížena (Ansell *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2018). Je překvapivé, že zvýšení exprese nitroreduktázy 2 vede naopak k snížení citlivosti buněk k metronidazolu (Ansell *et al.*, 2017). Je možné, že nitroreduktáza 2 dodává metronidazolu všech šest elektronů potřebných k redukcí nitroskupiny na aminoskupinu za vzniku aminoimidazolu (Obr.1, Reakce 2), což metronidazol sice redukuje, ale zároveň ho inaktivuje (Ansell *et al.*, 2017). U nejvíce rezistentních kmenů je snížena exprese nitroreduktázy 1, zvýšena exprese nitroreduktázy 2 a zároveň je indukováno odstraňování metronidazolu přes membránu ven z buňky pomocí tzv. MATE-like přenašečů. MATE-like přenašeče pravděpodobně slouží jako antiporter, přenáší metronidazol z cytosolu do extracelulárního prostoru, zatímco dovnitř přenáší sodné kationty, kterých je v extracelulárním prostoru výrazný přebytek. Z této studie dále vychází, že rezistentní kmeny mají sníženou životaschopnost, což je způsobeno přeorientováním metabolismu (podobně jako v buňkách *T. vaginalis* a *E. histolytica*) (Ansell *et al.*, 2017).

Podobně jako tomu bylo v případě *T. vaginalis*, i zde je třeba se faktorům ovlivňujícím vytváření rezistence k metronidazolu dále věnovat. Není vyloučeno, že existuje nějaký další, dosud neznámý faktor. Například gen pro enzym flavinovou reduktázu 1 (důležitý faktor při navození rezistence v buňkách *T. vaginalis*) se sice v genomu *G. intestinalis* nevyskytuje, jsou tam ale některé jiné oxidoreduktázy, které by mohly zastávat stejnou nebo podobnou funkci. Dalším příkladem může být enzym nazvaný diaforáza, který by mohl teoreticky sloužit k inaktivaci metronidazolu (Sánchez *et al.*, 2001; Ansell *et al.*, 2017).

5. Alternativy k léčbě metronidazolem

Jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách, rezistence k metronidazolu není v případě léčby infekcí *E. histolytica* žádný problém. Klinická rezistence takřka nevzniká a navození laboratorně indukované rezistence je velmi obtížné. Co se týče infekcí parazitem *G. intestinalis*, s klinickou rezistencí se běžně setkáváme, ale alternativou jsou například furazolidon, albendazol nebo paromomycin (Carter *et al.*, 2018; Webster, 1960). U *T. vaginalis* žádnou zavedenou alternativu k nitroimidazolům nemáme. Tato kapitola bude tedy zaměřena převážně na alternativy k standardní léčbě infekcí parazitem *T. vaginalis*.

5.1. Proč hledat alternativy k metronidazolu?

Z praxe víme, že časem většina léčiv ztrácí svou schopnost patogeny zabíjet nebo alespoň dochází k výrazné redukci jejich účinnosti. To je způsobeno právě například schopností parazita navodit nějakým mechanismem rezistenci. Dalším důvodem, proč je nutné nalézt alternativu, je fakt, že se u některých lidí můžeme setkat s hypersenzitivitou k metronidazolu. Ta se dá v některých případech obejít desenzitizací k metronidazolu pod dohledem odborníka. V tom případě se ale zvyšuje pravděpodobnost vytvoření rezistence (Cudmore *et al.*, 2004; Workowski and Berman, 2010). Třetím výrazným důvodem jsou samotné vedlejší účinky metronidazolu. Nejčastěji se u pacientů setkáváme s nevolností, zvracením, bolestí hlavy, nespavostí, závratěmi a vyrážkou. U některých pacientů má ale léčba metronidazolem daleko vážnější důsledky. Můžeme se u nich setkat s eosinofilií, leukopenií, palpitací srdce a také periferní neuropatií. Pravděpodobnost a vážnost těchto vedlejších účinků roste společně se zvyšující se dávkou metronidazolu. To souvisí s tím, že při selhání léčby je jedinou zavedenou možností zvýšení dávky metronidazolu (Lossick, 1990; Howe and Kissinger, 2017).

5.2. Možné alternativy v léčbě trichomoniázy

Tinidazol je metronidazolu příbuzný lék, další ze skupiny 5-nitroimidazolů. Má velmi podobné mechanismy aktivace a cytotoxické účinky jako metronidazol. Od metronidazolu se ovšem liší nejen strukturou (na prvním atomu kruhu je zde navázán 2-ethylsulfonylethyl oproti 2-hydroxyethylu u metronidazolu), ale také poločasem rozpadu (tinidazol má delší poločas rozpadu než metronidazol), minimální letální koncentrací (tinidazol má nižší MLC než metronidazol) a tím, že má slabší vedlejší účinky (Miller *et al.*, 1969; Kirkcaldy *et al.*, 2012; Raja *et al.*, 2016; Bouchemal *et al.*, 2017). Problémem je zde vytváření rezistence

stejnými mechanismy jako u metronidazolu, což souvisí s tím, jak podobně tinidazol a metronidazol fungují (Schwebke and Barrientes, 2006). Dalším problémem je přímo vytváření křížové rezistence mezi metronidazolem a tinidazolem (Upcroft *et al.*, 1990). Je třeba nalézt alternativu, která nepatří do rodiny nitroimidazolů.

Albendazol a mebendazol jsou dva azolové deriváty, patřící do skupiny benzimidazolů, které se běžně využívají v léčbě infekcí *G. intestinalis*, ale ukázaly se být účinné i proti *T. vaginalis in vitro* (Sears and O'Hare, 1988; Navarrete-Vázquez *et al.*, 2003). S-substituovaný 4,6-dibromo a 4,6-dichloro-2-mercapto-benzimidazol se ukázaly být dokonce mnohem účinnější proti *T. vaginalis in vitro* než samotný metronidazol (Andrzejewska *et al.*, 2004). Několik dalších benzimidazolových derivátů vykazuje podobnou aktivitu *in vitro* (Soria-Arteche *et al.*, 2013; Valdez-Padilla *et al.*, 2009). Benzimidazolové deriváty se tedy zdají být výbornými adepty.

Disulfiram a nithiamid by se daly využít při léčbě osob, které vykazují alergii nebo hypersenzitivitu k metronidazolu (Bouma *et al.*, 1998; Goodhew and Secor, 2013). Dalším možným léčivem by mohl být analog metronidazolu s navázaným chlorem namísto hydroxy skupiny – chlorovaný metronidazol. Testy na myších vykazují dobré výsledky, je ale nutné provést klinické testy na lidech (Chacon *et al.*, 2018). N-hexadecil-1,4-butandiamin vykazuje *in vitro* dvakrát nižší minimální letální koncentraci (MLC 2,5 µg/mL) než metronidazol (Giordani *et al.*, 2011).

Furazolidon by se zdál být z již zavedených léků nejlepším adeptem pro léčbu trichomoniázy. Spektrum jeho vedlejších příznaků není příliš široké a už teď se využívá například k léčbě infekcí *G. intestinalis*. Zpráv o tom, že byl furazolidon účinný v léčbě rezistentních kmenů *T. vaginalis*, je ale zatím velmi málo (Zierdt *et al.*, 1983; Goldman *et al.*, 2009).

Adeptů na vytvoření účinné alternativy k metronidazolu tedy máme hned několik. Buďto může jít o staré zavedené léky doposud využívané na jiné infekce, nové deriváty starých léčiv nebo také nová léčiva získaná z přírodních zdrojů (Moo-Puc *et al.*, 2008). Největším problémem je nedostatečné financování výzkumu nových léčiv (trichomoniáza je stále velmi přehlížené onemocnění), a tudíž nemožnost postoupit k často velmi nákladným klinickým testům (de Brum Vieira *et al.*, 2015).

6. Závěr

V této bakalářské práci jsem se pokusil shrnout hlavní mechanismy rezistence třech anaerobních eukaryotických patogenních organismů – *T. vaginalis*, *G. intestinalis* a *E. histolytica*. Nejprve jsem krátce charakterizoval onemocnění, která způsobují, poté popsal mechanismy aktivace metronidazolu a jeho následné cytotoxické účinky. Nakonec jsem se zabýval léčivou, která slouží nebo by teoreticky mohla v budoucnu sloužit v léčbě infekcí *T. vaginalis* jako alternativa k metronidazolu.

Je zřejmé, že jednotlivé mechanismy vytváření rezistence jsou pro každý jednotlivý patogenní organismus odlišné, stejně jako jsou odlišné mechanismy aktivace a cytotoxické účinky metronidazolu v jejich buňkách. Vytváření rezistence je u každého patogena složitý proces zahrnující na buněčné a biochemické úrovni velkou spoustu faktorů. Některé jsou již známé, některé neznámé. Důležitou roli ve vytváření rezistence pravděpodobně hraje změna v expresi nebo aktivitě některých enzymů. Patogeni nejčastěji snižují aktivitu faktorů odpovědných za aktivaci metronidazolu. Docílí toho buďto snížením exprese těchto faktorů samotných nebo snížením exprese jejich kofaktorů. V reakci na to zvyšují aktivitu faktorů jiných. Dalším důležitým mechanismem rezistence je snižování aktivity faktorů odpovědných za udržování anaerobního prostředí v buňce, čímž se zvyšuje vnitrobuněčná koncentrace kyslíku a dochází k deaktivaci metronidazolu pomocí jalového cyklu. Nelze ale přehlížet ani roli faktorů hostitelského organismu. Všem faktorům se bude nutno v budoucnu důkladně věnovat, podrobně jejich roli ve vytváření rezistence pochopit a popsat.

Co se týče alternativ k metronidazolu v léčbě *T. vaginalis*, je zde teoreticky několik vhodných kandidátů. Nejvhodnějšími kandidáty se zdají být benzimidazolové deriváty, chlorovaný metronidazol a furazolidon. Problémem je zde to, že ještě nebyly provedeny klinické testy. To je zapříčiněno převážně nedostatečným financováním výzkumu (trichomoniáza je stále velmi přehlížené onemocnění), jelikož klinické testy jsou velmi nákladné. Tato problematika si do budoucna žádá další a detailnější studie.

7. Použitá literatura

- Adams, E.B., and MacLeod, I.N. (1977). II. Amebic liver abscess and its complications. *Medicine (Baltimore)*. 56.
- Allsworth, J.E., Ratner, J.A., and Peipert, J.F. (2009). Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sex. Transm. Dis.* 36, 738–744.
- Almirall, P., Núñez, F.A., Bello, J., González, O.M., Fernández, R., and Escobedo, A.A. (2013). Abdominal pain and asthenia as common clinical features in hospitalized children for giardiasis. *Acta Trop.* 127, 212–215.
- Andrzejewska, M., Yopez-Mulia, L., Tapia, A., Cedillo-Rivera, R., Laudy, A.E., Starościak, B.J., and Kazimierczuk, Z. (2004). Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 323–329.
- Ang, C.W., Jarrad, A.M., Cooper, M.A., and Blaskovich, M.A.T. (2017). Nitroimidazoles: Molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases. *J. Med. Chem.* 60, 7636–7657.
- Ansell, B.R.E., McConville, M.J., Ma'ayeh, S.Y., Dagley, M.J., Gasser, R.B., Svärd, S.G., and Jex, A.R. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol. Adv.* 33, 888–901.
- Ansell, B.R.E., Baker, L., Emery, S.J., McConville, M.J., Svärd, S.G., Gasser, R.B., and Jex, A.R. (2017). Transcriptomics indicates active and passive metronidazole resistance mechanisms in three seminal *Giardia* lines. *Front. Microbiol.* 8, 398.
- Bean, C.L. (2005). Protozoa in water. *Water Encycl.* 313–314.
- Beri, D., Yadav, P., Devi, H.R.N., Narayana, C., Gadara, D., and Tatu, U. (2020). Demonstration and characterization of cyst-like structures in the life cycle of *Trichomonas vaginalis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 430.
- Bouchemal, K., Bories, C., and Loiseau, P.M. (2017). Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 811–825.

- Bouma, M.J., Snowdon, D., Fairlamb, A.H., and Ackers, J.P. (1998). Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J. Antimicrob. Chemother.* *42*, 817–820.
- Bradic, M., Warring, S.D., Tooley, G.E., Scheid, P., Secor, W.E., Land, K.M., Huang, P.-J., Chen, T.-W., Lee, C.-C., Tang, P., *et al.* (2017). Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genome of *Trichomonas vaginalis*. *Genome Biol. Evol.* *9*, 1658–1672.
- Bredeston, L.M., Caffaro, C.E., Samuelson, J., and Hirschberg, C.B. (2005). Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* *280*, 32168–32176.
- de Brum Vieira, P., Giordani, R.B., Macedo, A.J., and Tasca, T. (2015). Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. *Parasitol. Res.* *114*, 1249–1261.
- Carter, E.R., Nabarro, L.E., Hedley, L., and Chiodini, P.L. (2018). Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions. *Clin. Microbiol. Infect.* *24*, 37–42.
- Čerkasovová, A., Novák, J., Čerkasov, J., Kulda, J., and Tachezy, J. (1988). Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta. Univ. Carolinae. Biol* *30*, 505–512.
- Chacon, M.O., Fonseca, T.H.S., Oliveira, S.B. V, Alacoque, M.A., Franco, L.L., Tagliati, C.A., Cassali, G.D., Campos-Mota, G.P., Alves, R.J., Capettini, L.S.A., *et al.* (2018). Chlorinated metronidazole as a promising alternative for treating trichomoniasis. *Parasitol. Res.* *117*, 1333–1340.
- Chadee, K., Petri Jr, W.A., Innes, D.J., and Ravdin, J.I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* *80*, 1245–1254.
- Chae, H.Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* *269*, 27670–27678.

- Church, D.L., Rabin, H.R., and Laishley, E.J. (1990). Reduction of 2-, 4- and 5-nitroimidazole drugs by hydrogenase 1 in *Clostridium pasteurianum*. *J. Antimicrob. Chemother.* *25*, 15–23.
- Clark, C.G., Alsmark, U.C.M., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., *et al.* (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. (Academic Press), pp. 51–190.
- Coombs, G.H., Westrop, G.D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R.P., Embley, T.M., Mottram, J.C., and Müller, S. (2004). The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J. Biol. Chem.* *279*, 5249–5256.
- Cosar, C., and Julou, L. (1959). The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. *96*, 238–241.
- Crucitti, T., Jaspers, V., Mulenga, C., Khondowe, S., Vandepitte, J., and Buvé, A. (2011). Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia. *PLoS One* *6*, e16310–e16310.
- Cudmore, S.L., Delgaty, K.L., Hayward-McClelland, S.F., Petrin, D.P., and Garber, G.E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* *17*, 783–793.
- Dacks, J.B., Davis, L.A.M., Sjögren, A.M., Andersson, J.O., Roger, A.J., and Doolittle, W.F. (2003). Evidence for Golgi bodies in proposed “Golgi-lacking” lineages. *Proceedings. Biol. Sci.* *270 Suppl*, S168–S171.
- Dan, M., Wang, A.L., and Wang, C.C. (2000). Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Mol. Microbiol.* *36*, 447–456.
- Das, S., Van Dellen, K., Bulik, D., Magnelli, P., Cui, J., Head, J., Robbins, P.W., and Samuelson, J. (2006). The cyst wall of *Entamoeba invadens* contains chitosan (deacetylated chitin). *Mol. Biochem. Parasitol.* *148*, 86–92.

- Edwards, D.I. (1993). Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.* *31*, 9–20.
- Edwards, D.I., Dye, M., and Carne, H. (1973). The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclic drugs. *Microbiology* *76*, 135–145.
- Edwards, D.I., Mathison, G.E., and Platt, D.J. (1974). Metronidazole — an antimicrobial drug which inhibits photosynthesis. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* *71*, 424–427.
- Edwards, D.I., Knox, R.J., Rowley, D.A., Skolimowski, I.M., Knight, R.C. (1980). The biochemistry of nitroimidazole drug action. *Biochem. Nitroimidazole Drug Action.* 673–676.
- Edwards, D.I., Tocher, J.H., Dale, L.D., Widdick, D., and Virk, N. (1990). Effects on DNA of bio-reducible nitroimidazole and benzotriazine drugs BT – Selective activation of drugs by redox processes. G.E. Adams, A. Breccia, E.M. Fielden, and P. Wardman, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 275–283.
- Fahey, R.C., Newton, G.L., Arrick, B., Overdank-Bogart, T., and Aley, S.B. (1984). *Entamoeba histolytica*: a eukaryote without glutathione metabolism. *Science* (80-.). *224*, 70+.
- Feng, Y., and Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* *24*, 110–140.
- Füzi, M., and Csukás, Z. (1969). [A yet unknown antibacterial effect of metronidazole]. *Orv. Hetil.* *110* *28*, 1605–1606.
- Gardner, T.B., and Hill, D.R. (2001). Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 114–128.
- Gatti, S., Swierczynski, G., Robinson, F., Anselmi, M., Corrales, J., Moreira, J., Montalvo, G., Bruno, A., Maserati, R., Bisoffi, Z., Scaglia, M. (2002). Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *67*, 123–127.
- Ghosh, S., Field, J., Rogers, R., Hickman, M., and Samuelson, J. (2000). The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane. *Infect. Immun.* *68*, 4319–4322.

- Gillin, F.D., Reiner, D.S., and McCaffery, J.M. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 679–705.
- Gimenes, F., Souza, R.P., Bento, J.C., Teixeira, J.J. V, Maria-Engler, S.S., Bonini, M.G., and Consolaro, M.E.L. (2014). Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat. Rev. Urol.* *11*, 672–687.
- Giordani, R.B., Araújo, D.P., Duarte, M., Zuanazzi, J.A., Tasca, T., and De Almeida, M. V (2011). Anti-protozoal activity of diamine derivatives. *Biomed. Pharmacother.* *65*, 60–62.
- Goldman, L.M., Upcroft, J.A., Workowski, K., and Rapkin, A. (2009). Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Sex. Health* *6*, 345–347.
- Goodhew, E.B., and Secor, W.E. (2013). Drug library screening against metronidazole-sensitive and metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* isolates. *Sex. Transm. Infect.* *89*, 479 LP – 484.
- Hanevik, K., Hausken, T., Morken, M.H., Strand, E.A., Mørch, K., Coll, P., Helgeland, L., and Langeland, N. (2007). Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *J. Infect.* *55*, 524–530.
- Hanevik, K., Wensaas, K.-A., Rortveit, G., Eide, G.E., Mørch, K., and Langeland, N. (2014). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 6 years after *Giardia* infection: A controlled prospective cohort study. *Clin. Infect. Dis.* *59*, 1394–1400.
- Heyworth, M.F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite* *23*.
- Hill, D.R. (2001). *Giardia lamblia*. *Princ. Pract. Clin. Parasitol.* 219–241.
- Hirschl, A.M., Hentschel, E., Schütze, K., Nemeč, H., Pötzi, R., Gangl, A., Weiss, W., Pletschette, M., Stanek, G., and Rotter, M.L. (1988). The efficacy of antimicrobial treatment in *Campylobacter pylori*-associated gastritis and duodenal ulcer. *Scand. J. Gastroenterol.* *23*, 76–81.
- Hofšetrová, K., Uzlíková, M., Tůmová, P., Troell, K., Svärd, S.G., and Nohýnková, E. (2010). *Giardia intestinalis*: Aphidicolin influence on the trophozoite cell cycle. *Exp. Parasitol.* *124*, 159–166.

- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., and Piddock, L.J. V (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* 387, 176–187.
- Honigberg, B.M., and Brugerolle, G. (1990). Structure BT - Trichomonads parasitic in humans. B.M. Honigberg, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 5–35.
- Howe, K., and Kissinger, P.J. (2017). Single-dose compared with multidose metronidazole for the treatment of trichomoniasis in women: A meta-analysis. *Sex. Transm. Dis.* 44.
- Ings, R.M.J., McFadzean, J.A., and Ormerod, W.E. (1974). The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. *Biochem. Pharmacol.* 23, 1421–1429.
- Jenks, P.J., Ferrero, R.L., and Labigne, A. (1999). The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 753–758.
- Jiráková, K., Kulda, J., and Nohýnková, E. (2012). How nuclei of *Giardia* pass through cell differentiation: Semi-open mitosis followed by nuclear interconnection. *Protist* 163, 465–479.
- Kharsany, A.B., Hoosen, A.A., Moodley, J., Bagaratee, J., and Gouws, E. (1993). The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin. Med.* 69, 357–360.
- Kirkcaldy, R., Augostini, P., Asbel, L., Bernstein, K., Kerani, R., Mettenbrink, C., Pathela, P., Schwebke, J., Secor, W.E., Workowski, K., *et al.* (2012). *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US Cities, STD surveillance network, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis. J.* 18, 939.
- Kissinger, P., Schmidt, N., Mohammed, H., Leichliter, J.S., Gift, T.L., Meadors, B., Sanders, C., and Farley, T.A. (2006). Patient-delivered partner treatment for *Trichomonas vaginalis* infection: A randomized controlled trial. *Sex. Transm. Dis.* 33.
- Kulda, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* 29, 199–212.

- Kulda, J., Nohýnková, E., and J., L. (1986). Basic structure and function of the *Trichomonad* cell. *Acta Univ. Carol.-Biol.* 30, 181–198.
- Kulda, J., Tachezy, J., and Čerkasovová, A. (1993). *In vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 262–269.
- Kwon, D.H., Kato, M., El-Zaatari, F.A.K., Osato, M.S., and Graham, D.Y. (2000). Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 188, 197–202.
- Lane, S., and Lloyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 123–147.
- Leitsch, D. (2017). Drug susceptibility testing in microaerophilic parasites: Cysteine strongly affects the effectivities of metronidazole and auranofin, a novel and promising antimicrobial. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 7, 321–327.
- Leitsch, D. (2019). A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology* 146, 1167–1178.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Wilson, I., Altmann, F., and Duchêne, M. (2007). Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: A central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biol.* 5, e211.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Binder, M., Stadlmann, J., Altmann, F., and Duchêne, M. (2009). *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Mol. Microbiol.* 72, 518–536.
- Leitsch, D., Kolarich, D., and Duchêne, M. (2010). The flavin inhibitor diphenyleneiodonium renders *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole, inhibits thioredoxin reductase and flavin reductase, and shuts off hydrogenosomal enzymatic pathways. *Mol. Biochem. Parasitol.* 171, 17–24.
- Leitsch, D., Burgess, A.G., Dunn, L.A., Krauer, K.G., Tan, K., Duchêne, M., Upcroft, P., Eckmann, L., and Upcroft, J.A. (2011). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1756–1765.

- Leitsch, D., Drinić, M., Kolarich, D., and Duchêne, M. (2012a). Down-regulation of flavin reductase and alcohol dehydrogenase-1 (ADH1) in metronidazole-resistant isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *183*, 177–183.
- Leitsch, D., Schlosser, S., Burgess, A., and Duchêne, M. (2012b). Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* *2*, 166–170.
- Leitsch, D., Williams, C.F., Lloyd, D., and Duchêne, M. (2013). Unexpected properties of NADP-dependent secondary alcohol dehydrogenase (ADH-1) in *Trichomonas vaginalis* and other microaerophilic parasites. *Exp. Parasitol.* *134*, 374–380.
- Leitsch, D., Janssen, B.D., Kolarich, D., Johnson, P.J., and Duchêne, M. (2014). *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Mol. Microbiol.* *91*, 198–208.
- Leitsch, D., Müller, J., and Müller, N. (2016). Evaluation of *Giardia lamblia* thioredoxin reductase as drug activating enzyme and as drug target. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* *6*, 148–153.
- Löfmark, S., Edlund, C., and Nord, C.E. (2010). Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin. Infect. Dis.* *50*, S16–S23.
- Lossick, J.G. (1990). Epidemiology of urogenital trichomoniasis BT – Trichomonads parasitic in humans. B.M. Honigberg, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 311–323.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., *et al.* (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* *380*, 2095–2128.
- Ludlum, D.B., Colinas, R.J., Kirk, M.C., and Mehta, J.R. (1988). Reaction of reduced metronidazole with guanosine to form an unstable adduct. *Carcinogenesis* *9*, 593–596.
- Martincová, E., Voleman, L., Pyrih, J., Žárský, V., Vondráčková, P., Kolísko, M., Tachezy, J., and Doležal, P. (2015). Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitochondria using *in vivo* enzymatic tagging. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 2864–2874.

- Mason, R.P., and Holtzman, J.L. (1975). The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1267–1274.
- Mastronicola, D., Giuffrè, A., Testa, F., Mura, A., Forte, E., Bordi, E., Pucillo, L.P., Fiori, P.L., and Sarti, P. (2011). *Giardia intestinalis* escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: A molecular hypothesis. *IUBMB Life* 63, 21–25.
- Mattila, J., Männistö, P.T., Mäntylä, R., Nykänen, S., and Lamminsivu, U. (1983). Comparative pharmacokinetics of metronidazole and tinidazole as influenced by administration route. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 721–725.
- Meingassner, J.G., and Thurner, J. (1979). Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 254–257.
- Menezes, C.B., Frasson, A.P., and Tasca, T. (2016). Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microb. Cell* 3, 404–419.
- Miller, M.W., Howes, H.L., and English, A.R. (1969). Tinidazole, a potent new antiprotozoal agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9, 257–260.
- Moo-Puc, R., Robledo, D., and Freile-Pelegrin, Y. (2008). Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonal activity. *J. Ethnopharmacol.* 120, 92–97.
- Müller, M. (1986). Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem. Pharmacol.* 35, 37–41.
- Müller, M., and Gorrell, T.E. (1983). Metabolism and metronidazole uptake in *Trichomonas vaginalis* isolates with different metronidazole susceptibilities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24, 667–673.
- Müller, J., Schildknecht, P., and Müller, N. (2013). Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GINR2). *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1781–1789.
- Müller, J., Hemphill, A., and Müller, N. (2018). Physiological aspects of nitro drug resistance in *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8, 271–277.

- Nabarro, L.E.B., Lever, R.A., Armstrong, M., and Chiodini, P.L. (2015). Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008-2013; 2013. *Clin. Microbiol. Infect.* *21*, 791–796.
- Nagy, E., and Földes, J. (1991). Inactivation of metronidazole by *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* *27*, 63–70.
- Narikawa, S. (1986). Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *J. Antimicrob. Chemother.* *18*, 565–574.
- Nastro, L.J., and Finegold, S.M. (1972). Bactericidal activity of five antimicrobial agents against *Bacteroides fragilis*. *J. Infect. Dis.* *126*, 104–107.
- Navarrete-Vázquez, G., Yépez, L., Hernández-Campos, A., Tapia, A., Hernández-Luis, F., Cedillo, R., González, J., Martínez-Fernández, A., Martínez-Grueiro, M., and Castillo, R. (2003). Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorg. Med. Chem.* *11*, 4615–4622.
- Nillius, D., Müller, J., and Müller, N. (2011). Nitroreductase (GlnR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 1029–1035.
- Nohynková, E., Tumová, P., and Kulda, J. (2006). Cell division of *Giardia intestinalis*: flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryot. Cell* *5*, 753–761.
- Nygård, K., Schimmer, B., Søbstad, Ø., Walde, A., Tveit, I., Langeland, N., Hausken, T., and Aavitsland, P. (2006). A large community outbreak of waterborne giardiasis – delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health* *6*, 141.
- Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S.K., and Samuelson, J. (2009). *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 458–464.
- Penuliar, G.M., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2015). Phenotypic and transcriptional profiling in *Entamoeba histolytica* reveal costs to fitness and adaptive responses associated with metronidazole resistance. *Front. Microbiol.* *6*, 354.

- Phillips, S.C., Mildvan, D., William, D.C., Gelb, A.M., and White, M.C. (1981). Sexual transmission of enteric protozoa and helminths in a Venereal-Disease-Clinic population. *N. Engl. J. Med.* *305*, 603–606.
- Powell, S.J., Macleod, I., Wilmot, A.J., and Elsdon-Dew, R. (1966). Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. *Lancet* *288*, 1329–1331.
- Preiss, U., Ockert, G., Broemme, S., and Otto, A. (1991). On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infections in childhood. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* *35*, 27–34.
- Quinlivan, E.B., Patel, S.N., Grodensky, C.A., Golin, C.E., Tien, H.-C., and Hobbs, M.M. (2012). Modeling the impact of *Trichomonas vaginalis* infection on HIV transmission in HIV-infected individuals in medical care. *Sex. Transm. Dis.* *39*, 671–677.
- Raja, I.M., Basavareddy, A., Mukherjee, D., and Meher, B.R. (2016). Randomized, double-blind, comparative study of oral metronidazole and tinidazole in treatment of bacterial vaginosis. *Indian J. Pharmacol.* *48*, 654–658.
- Ralston, K.S., Solga, M.D., Mackey-Lawrence, N.M., Somlata, Bhattacharya, A., and Petri, W.A. (2014). Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature* *508*, 526–530.
- Rasoloson, D., Vanacova, S., Tomkova, E., Razga, J., Hrdy, I., Tachezy, J., and Kulda, J. (2002). Mechanisms of *in vitro* development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* *148*, 2467–2477.
- Reed, S.L. (2000). Clinical manifestations and diagnosis. In *Amebiasis*, (World Scientific), pp. 113–126.
- Regan, C.S., Yon, L., Hossain, M., and Elsheikha, H.M. (2014). Prevalence of *Entamoeba* species in captive primates in zoological gardens in the UK. *PeerJ* *2*, e492–e492.
- Rein, M.F. (1990). Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women BT - Trichomonads parasitic in humans. B.M. Honigberg, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 225–234.
- Robinson, S.C. (1962). Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Can. Med. Assoc. J.* *86*, 665.

- Ryan, U., and Cacciò, S.M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* *43*, 943–956.
- Samarawickrema, N.A., Brown, D.M., Upcroft, J.A., Thammapalerd, N., and Upcroft, P. (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* *40*, 833–840.
- Sánchez, L.B., Elmendorf, H., Nash, T.E., and Müller, M. (2001). NAD(P)H:menadiione oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia*: a simpler homologue of the vertebrate enzyme. *Microbiology* *147*, 561–570.
- Schaumann, R., Petzold, S., Fille, M., and Rodloff, A.C. (2005). Inducible metronidazole resistance in nim–positive and nim–negative *Bacteroides fragilis* group strains after several passages metronidazole containing Columbia agar plates. *Infection* *33*, 368–372.
- Schneider, J. (1961). [Treatment of giardiasis (lambliasis) by metronidazole]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* *54*, 84–95.
- Schneider, R.E., Brown, M.T., Shiflett, A.M., Dyall, S.D., Hayes, R.D., Xie, Y., Loo, J.A., and Johnson, P.J. (2011). The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int. J. Parasitol.* *41*, 1421–1434.
- Schwebke, J.R., and Barrientes, F.J. (2006). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 4209–4210.
- Sears, S.D., and O’Hare, J. (1988). *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to 50 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* *32*, 144–146.
- Shimada, A., Muraki, Y., Awakura, T., Umemura, T., Sanekata, T., Kuroki, T., and Ishihara, M. (1992). Necrotic colitis associated with *Entamoeba histolytica* infection in a cat. *J. Comp. Pathol.* *106*, 195–199.
- Silver, B.J., Guy, R.J., Kaldor, J.M., Jamil, M.S., and Rumbold, A.R. (2014). *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: A systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Dis.* *41*, 369–376.

- Smith, M.A., and Edwards, D.I. (1995). Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* *35*, 751–764.
- Soria-Arteche, O., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Trejo-Soto, P.J., Hernández-Luis, F., Gres-Molina, J., Maldonado, L.A., and Castillo, R. (2013). Synthesis and antiprotozoal activity of nitazoxanide–N-methylbenzimidazole hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *23*, 6838–6841.
- Sutak, R., Hrdy, I., Dolezal, P., Cabala, R., Sedinová, M., Lewin, J., Harant, K., Müller, M., and Tachezy, J. (2012). Secondary alcohol dehydrogenase catalyzes the reduction of exogenous acetone to 2-propanol in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS J.* *279*, 2768–2780.
- Sutcliffe, S., Neace, C., Magnuson, N.S., Reeves, R., and Alderete, J.F. (2012). Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis – a proposed molecular mechanism. *PLoS Pathog.* *8*, e1002801–e1002801.
- Tachezy, J., Kulda, J., and Tomková, E. (1993). Aerobic resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole induced *in vitro*. *Parasitology* *106*, 31–37.
- Tanyuksel, M., and Petri Jr, W.A. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* *16*, 713–729.
- Tovar, J., Fischer, A., and Clark, C.G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* *32*, 1013–1021.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., and Lucocq, J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* *426*, 172–176.
- Tůmová, P., Kulda, J., and Nohýnková, E. (2007). Cell division of *Giardia intestinalis*: Assembly and disassembly of the adhesive disc, and the cytokinesis. *Cell Motil.* *64*, 288–298.

- Twu, O., Dessí, D., Vu, A., Mercer, F., Stevens, G.C., de Miguel, N., Rappelli, P., Cocco, A.R., Clubb, R.T., Fiori, P.L., Johnson, P.J. (2014). *Trichomonas vaginalis* homolog of macrophage migration inhibitory factor induces prostate cell growth, invasiveness, and inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 8179–8184.
- Upcroft, J.A., Upcroft, P., and Boreham, P.F.L. (1990). Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Int. J. Parasitol.* *20*, 489–496.
- Uzlikova, M., and Nohynkova, E. (2014). The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines. *Mol. Biochem. Parasitol.* *198*, 75–81.
- Valdez-Padilla, D., Rodríguez-Morales, S., Hernández-Campos, A., Hernández-Luis, F., Yépez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A., and Castillo, R. (2009). Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* *17*, 1724–1730.
- Vanacova, S., Liston, D.R., Tachezy, J., and Johnson, P.J. (2003). Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* *33*, 235–255.
- Vilela, R., and Benchimol, M. (2011). Interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with keratin: An important role in parasite infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *106*, 701–704.
- Villiers, J.P., and Durra, G. (1998). Case report: Amoebic abscess of the brain. *Clin. Radiol.* *53*, 307–309.
- Vlčková, K., Kreisinger, J., Pafčo, B., Čížková, D., Tagg, N., Hehl, A.B., and Modrý, D. (2018). Diversity of *Entamoeba spp.* in African great apes and humans: an insight from Illumina MiSeq high-throughput sequencing. *Int. J. Parasitol.* *48*, 519–530.
- Walsh, J.A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* *8*, 228–238.
- Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J. Biol. Chem.* *274*, 26051–26056.

- Webster, B.H. (1960). Furazolidone in the treatment of giardiasis. *Am. J. Dig. Dis.* 5, 618–622.
- Whittington, M.J. (1957). Epidemiology of infections with *Trichomonas vaginalis* in the light of improved diagnostic methods. *Br. J. Vener. Dis.* 33, 80–91.
- WHO (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008 (World Health Organization).
- WHO, P. (1997). UNESCO. 1997. Report: a consultation with experts on amoebiasis: Mexico City. *Epidemiol. Bull* 18, 13–14.
- Wittnich, C. (1976). Entamoeba histolytica infection in a German shepherd dog. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* 17, 259–263.
- Workowski, K.A., and Berman, S.M. (2010). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010.
- Yarlett, N., Yarlett, N.C., and Lloyd, D. (1986). Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19, 111–116.
- Zierdt, C.H., Swan, J.C., and Hosseini, J. (1983). *In vitro* response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. *J. Protozool.* 30, 332–334.