

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Aneta Čadková

Současné možnosti léčby parazitických kinetoplastid
Current treatment options for parasitic kinetoplastids

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Mach, Ph.D.

Praha, 2021

Abstrakt

Chagasova choroba, spavá nemoc a leishmanióza jsou nemoci vyskytující se především v rozvojových oblastech Afriky, Ameriky a Asie. Jsou způsobené parazitickými kinetoplastidy z rodů *Trypanosoma* a *Leishmania*. Zástupci těchto dvou rodů prochází při svém vývoji morfologickými změnami, při kterých dochází ke změnám jejich vlastností. Vyznačují se složitými mechanismy, jimiž dokáží obcházet imunitu hostitele. Zároveň díky těmto mechanismům a selekčním tlakům jsou schopni následně vytvářet rezistence na léky. Nemoci, které prvoci způsobují, se řadí mezi tzv. „zanedbávané tropické nemoci“. Výzkum a vývoj léčiv proti těmto nemocem je značně podfinancován. Současně používaná léčiva jsou drahá a mají řadu vedlejších účinků. Kvůli nedostatečné kontrole dochází k jejich nadbytečnému užívání a vytváření rezistence. Práce nejprve obecně představuje lidské parazity z třídy Kinetoplastida. Dále popisuje léčbu nemocí, které charakterizované druhy způsobují a zaměřuje se na shrnutí současných používaných léčiv, jejich mechanismus, rezistenci a potenciální nová léčiva.

Klíčová slova: kinetoplastida, *Trypanosoma*, *Leishmania*, léčba, nemoc, mechanismus působení, rezistence, nitroreduktáza

Abstract

Chagas disease, sleeping sickness and leishmaniasis are diseases occurring mainly in developing areas of Africa, America and Asia. They are caused by parasitic kinetoplastids from the genus *Trypanosoma* and *Leishmania*. These protozoans undergo morphologic transformations during their development leading to changes of their properties. They are characterized by complex mechanisms that allow them to evade the host's immunity. At the same time, because of these mechanisms and selection pressures, they are able to subsequently develop resistance to used drugs. The diseases caused by protozoa are classified as "neglected tropical diseases". The research and development of drugs against them is heavily underfunded. Currently used drugs are expensive, have a number of side effects, and due to lack of usage regulation develop resistance. The work first generally presents human parasites of the class Kinetoplastida. It further describes the treatment of diseases caused by the characterized species and focuses on a summary of currently used drugs, their mechanism, resistance and potential new drugs in clinical phases.

Key words: kinetoplastids, *Trypanosoma*, *Leishmania*, treatment, disease, mechanism of action, resistance, nitroreductase

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Machovi Ph.D. za jeho trpělivost, vstřícný přístup a v neposlední řadě odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat všem svým blízkým za celkovou podporu při práci.

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, 6.5.2021

Aneta Čadková

Seznam zkratek

ABC	ATP vázající transportér (<i>ATP binding cassette</i>)
ADP	adenosindifosfát
AmB	amfotericin B
AQP2	aquaglyceroporin 2
BZ	benznidazol
CATT	destičkový aglutinační test na trypanosomiázu (<i>card-agglutination trypanosomiasis test</i>)
CD	Chagasova choroba (<i>Chagas disease</i>)
CL	kožní leishmanióza
CP	cysteinová proteáza
CPSF3	podjednotka faktoru štěpení a polyadenylační specifity 3 (<i>cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3</i>)
CZ	cruzipain
DCL	difúzní kožní leishmanióza
DFMO	eflornitin (<i>difluoromethylornithine</i>)
DL	diseminovaná leishmanióza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNDi	iniciativa léčiv proti zanedbávaným nemocem (<i>drugs for neglected diseases initiative</i>)
EBI	inhibitory ergosterolové dráhy
ED	ergosterolová dráha
ELISA	enzymový imunosorbentní test (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>food and drug administration</i>)
Fe-SOD	superoxiddismutáza
HAT	spavá nemoc neboli lidská africká trypanosomiáza (<i>human african trypanosomiasis</i>)
HIV	virus lidského imunodeficitu (<i>human immunodeficiency virus</i>)
IFA	test imunofluorescenčních protilátek (<i>immunofluorescence assay</i>)
IFN- γ	interferon gamma
iNOS	enzym syntézy oxidu dusnatého
kDNA	kinetoplastová DNA
LCL	lokální kožní leishmanióza

LdMT	<i>L. donovani</i> miltefosin transportér
MCL	mukokutánní leishmanióza
MDR1	multirezistentní protein 1 (<i>multidrug resistance protein 1</i>)
MFST	membránové transportní proteiny
mRNA	mediátorová RNA (<i>messenger RNA</i>)
NECT	nifurtimox-eflornitin kombinovaná terapie (<i>nifurtimox-eflornithine combination therapy</i>)
NFX	nifurtimox
NTDs	zanedbávané tropické nemoci (<i>neglected tropical diseases</i>)
NTR	nitroreduktáza
ODC	ornitin dekarboxyláza (<i>ornithine decarboxylase</i>)
P2	purinový transportér 2
PCR	polymerázová řetězová reakce
PG	prostaglandin
PKDL	post-kala-azarová dermální leishmanióza
POSA	posaconazole
RCL	recidivující kožní leishmanióza
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SbIII	trivaletní antimon
SbV	pentavaletní antimon
TbAT1	<i>T. brucei</i> adenosinový transportér 1
TbAAT6	<i>T. brucei</i> transportér AAT6
TcOYE	<i>T. cruzi old yellow enzym</i>
TR	trypanothion reduktáza
VL	viscerální leishmanióza
VSG	variantní povrchový glykoprotein

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Charakteristika vybraných druhů řádu Trypanosomatida	3
3.1	<i>Trypanosoma</i>	4
3.1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	4
3.1.2	<i>Trypanosoma brucei</i>	6
3.2	<i>Leishmania</i>	8
4	Léčba	13
4.1	Chagasova choroba	13
4.1.1	Současné použití léčiv	13
4.1.2	Nová a experimentální léčiva	15
4.2	Spavá Nemoc	18
4.2.1	Současné použití léčiv	18
4.2.2	Nová a experimentální léčiva	22
4.3	Leishmanióza	24
4.3.1	Současné použití léčiv	24
4.3.2	Nová a experimentální léčiva	28
4.4	Vývoj léků a umělá inteligence	29
5	Závěr	30
6	Literatura	31

1 Úvod

Třída Kinetoplastida spadá, společně s řády Euglenida a Diplonemida, do kmene Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1993). Třidu dělíme na dva řády – Bodonida a Trypanosomatida. Jelikož se u řádu Bodonida nejedná o lidské parazity, bude se dále tato práce věnovat pouze řádu Trypanosomatida.

Trypanosomatida je řád bičíkatých prvoků, kteří se vyznačují specializovanou strukturou kinetoplastem. Jedná se o mitochondriální oblast, ve které se vyskytuje tzv. kinetoplastová DNA (kDNA) složená z maxi a mini kroužků (Cavalcanti and de Souza, 2018). Jak již vyplývá z názvu, třída Kinetoplastida je pojmenovaná na základě této jedinečné struktury.

Mezi parazitická kinetoplastida spadají různé druhy rodů *Leishmania* a *Trypanosoma*. Léčba nemocí, které tyto parazity způsobují, je často zastaralá a nedostatečně financovaná. A to i přesto, že ročně onemocní miliony jedinců.

Na výzkum léčiv proti nemocem z rozvojových zemí není kladen takový důraz, jako je tomu v případě nemocí z ekonomicky vyspělých států. Přesto došlo v posledních letech ke vzniku velmi nadějných léčiv a na dalších se intenzivně pracuje.

Tato bakalářská práce nejprve obecně charakterizuje vybrané představitele z rodů *Leishmania* a *Trypanosoma*, kteří parazitují na lidech. Představuje jejich vývojové cykly, vektory a nemoce, které přenáší (Chagasova choroba, spavá nemoc a leishmanióza). Druhá část shrnuje současné použití léčiv těchto nemocí, vzniklé rezistence a nová experimentální léčiva.

2 Cíl práce

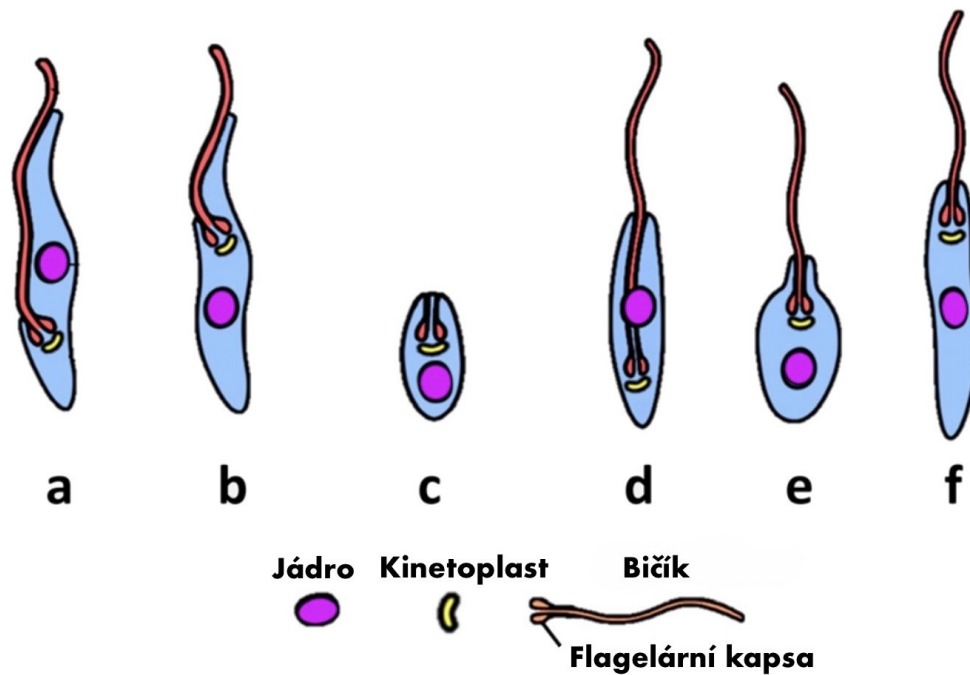
Cílem této práce je shrnout současné možnosti léčby nemocí způsobenými parazitickými kinetoplastidy a obecně charakterizovat druhy, které tyto nemoci způsobují. Práce je zejména zaměřená na mechanismus působení léčiv, rezistence a potenciální nová léčiva.

3 Charakteristika vybraných druhů řádu Trypanosomatida

Řád Trypanosomatida jsou prvoci, kteří oproti dvou-bičíkatému řádu Bodonia, disponují jedním parazitickým bičíkem (tzv. flagellum) (Langousis a Hill, 2014). Bičík je důležitý nejen pro pohyb parazita, ale také klíčový pro jeho patologii a morfologii.

Poziční uspořádání bičíku, jádra a kinetoplastu hraje důležitou roli v životním cyklu a také určuje o jakou morfologickou formu se jedná, např. amastigota, promastigota, atd. (viz Obr.1) (Bastin *et al.*, 2000; Langousis a Hill, 2014).

Důležité je si uvědomit, že ne všechny druhy tvoří všechny morfotypy. Systematika je založena na preferencích hostitele a fázích životního cyklu. Diferenciace buněčných typů jsou spojeny s životními cykly, které úzce souvisí s momentální interakcí parazita s hostitelem nebo vektorem a podílí se tedy i na úspěšném přenosu parazita (Gull, 2001; Kaufer *et al.*, 2017). Dva rody tohoto řádu mají globální dopad na lidské zdraví – *Trypanosoma* a *Leishmania*.



Obr. 1: Morfologická stadia trypanosom (převzato a upraveno z (Kaufer *et al.*, 2017))

a. Trypomastigot; b. Epimastigot; c. Amastigot; d. Opisthomastigot; e. Choanomastigot; f. Promastigot

3.1 *Trypanosoma*

Trypanosoma je rod lékařsky významných parazitických prvoků, kteří infikují řadu různých obratlovců, včetně zvířat a lidí. Společně s rodem *Leishmania* je řadíme mezi hemoflageláty (Schuster a Sullivan, 2002).

První, kdo pozoroval trypanosomy pod mikroskopem byl roku 1841 Gabriel Valentin, když zkoumal krev pstruha. O 2 roky později, roku 1843, je pozoroval a popsal David Gruby při zkoumání žabí krve (Gruby, 1843). Pojmenování *Trypanosoma* kombinuje dvě řecká slova – trypanon (šnek) a soma (tělo). Roku 1972 C.A. Hoare rozřadil savčí trypanosomy podle jejich cesty přenosu na dvě sekce - Stercoraria a Salivaria (Hoare, 1972).

3.1.1 *Trypanosoma cruzi*

Do skupiny Stercoraria patří parazité, kteří se vyvíjejí v konci zadního střeva a jsou následně přenášení současně se stolicí vektora. Do hostitele proniknou rankou v kůži nebo přes sliznici. Zástupcem je *Trypanosoma cruzi*, prvok, vyskytující se především v oblastech latinské Ameriky.

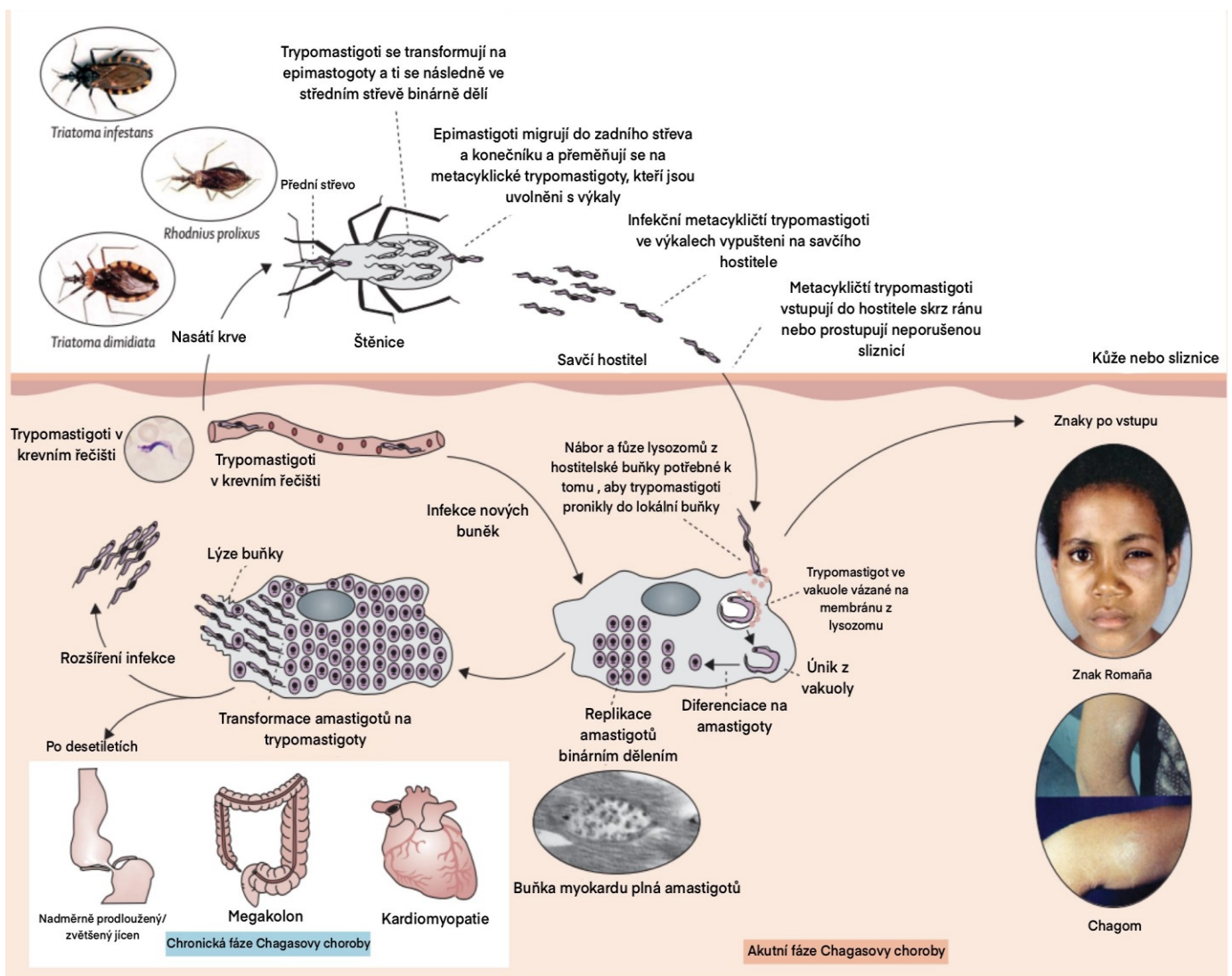
Roku 1909 objevil tohoto parazita brazilský fyzik Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, který ho pojmenoval po Oswaldu Goncalves Cruzi (Vianna Martins *et al.*, 2012). K jeho přenosu dochází orální, transfúzní, vertikální (z matky na dítě) nebo vektorovou cestou. Zcela výjimečně může být přenos zapříčiněn kontaminovaným jídlem nebo pitím (Faria *et al.*, 2021; Herrera *et al.*, 2011).

Typickým vektorem *T. cruzi* jsou ploštice zákeřnice z podčeledi Triatominae. Nemoc, kterou tento parazit způsobuje nazýváme Chagasova choroba (CD). Byla tak pojmenována na počest Carlose Justiniano Ribeiro Chagase, který výzkumu ohledně *T. cruzi* věnoval značnou část svého života (Vianna Martins *et al.*, 2012).

CD je na světě nakaženo kolem osmi milionů lidí a ročně této nemoci podlehne až 10 000 lidí (WHO, 2021). To, že mohlo dojít k nákaze touto chorobou jedinec nemusí vůbec zaznamenat. Je tzv. asymptomatický v akutní fázi. Postupem času, však může dojít k rozvinutí chronické fáze choroby, která se projeví až o desítky let později. Jsou také známy případy, kdy může dojít k reaktivaci akutní fáze nemoci (Laranja *et al.*, 1956; Rassi, 2010). U jedinců s virem HIV bylo zjištěno, že při koinfekci HIV a *T. cruzi* dochází právě u těchto imunosuprimovaných pacientů k reaktivaci CD. (Almeida *et al.*, 2011).

Životní cyklus parazita

Infikovaná ploštice v průběhu sání krve ze savce defekuje (Obr.2). Infekční metacykličtí trypomastigoti se z výkalů dostávají přes mechanicky narušenou kůži (poškrábáním) nebo skrze neporušené sliznice, včetně spojivky, do hostitele. Trypomastigoti napadají buňky a začnou se diferencovat na intracelulární amastigoty. Amastigoti se pomocí binárního dělení začnou množit v parazitoformních vakuolách. Z vakuoly následně unikají do cytoplazmy a mění se na trypomastigoty. Ti opouští buňku a vnikají do krevního řečiště, ze kterého mohou být nasáti vektorem. Uvnitř vektora ve středním střevě dochází k přeměně na epimastigoty, kteří se následně pomnoží a putují do zadního střeva. V zadním střevě dochází k opětovné přeměně na infekční metacyklické trypomastigoty.



Obr. 2: Životní cyklus parazita *Trypanosoma cruzi* a klinický obraz Chagasovy choroby (převzato a upraveno z (Rassi, 2010))

Klinický obraz Chagasovy choroby

CD rozdělujeme na akutní a chronickou fázi. Akutní fáze se projevuje horečnatými stavy, u kterých se nakaženému tvoří léze v místě průniku parazitů do těla. Po vstupu parazita mohou vzniknout typické znaky CD, tzv. chagom nebo znak Romaña – otok oka (Obr.2)(Laranja *et al.*, 1956). Symptomy akutní fáze se objevují 1-2 týdny po kontaktu s nakaženou plošticí. Pokud se jedná o nákazu skrz transfúzi, příznaky se mohou objevit až několik měsíců po transfúzi. U 5–10 % může nastat v akutní fázi smrt, u většiny infikovaných jedinců (90 %), ale projevy samovolně vymizí. U 20–30 % dojde postupem času k posunu do chronické fáze, kdy se pacienti vyznačují pozitivitou na protilátky proti *T. cruzi* v séru. (Rassi *et al.*, 2000). Chronická fáze se projevuje tím, že dochází k zvětšení orgánů, např. zvětšení jícnu nebo srdce (tzv. kardiomegalie).

Diagnostické metody

Diagnóza se liší dle toho, zda se jedinec nachází v akutní nebo v chronické fázi nemoci. V akutní fázi je pravděpodobné, že se parazit nachází v krevním řečišti v podobě trypanostigota. Provádí se tedy krevní testy (mikroskopické vyšetření nebo provedení PCR (polymerázová řetězová reakce)). V chronické fázi se stanovuje výsledek pomocí kombinace více sérologických testů na protilátky proti *T. cruzi*. Používá se např. ELISA – enzymový imunisorbentní test a test imunofluorescenčních protilátek (IFA) (Muñoz *et al.*, 2019).

3.1.2 *Trypanosoma brucei*

Druh *T. brucei* je zástupcem skupiny Salivaria. Patří sem parazité, kteří se vyvíjejí v přední části trávicího traktu hmyzu a následně jsou přenášeni do hostitele spolu se slinami vektora.

T. brucei však není jediným druhovým zástupcem této skupiny. Je jím například i *T. vivax* (rezervoár divoký dobytek) nebo *T. suis* (rezervoár prase), které na člověku ne parazitují. Jelikož je tato práce zaměřená na lidské parazity, bude se dále zabývat pouze lidskými patogenními poddruhy *T. brucei*. Ty rozdělujeme na dvě formy – západoafrická forma (*T. b. gambiense*) a východoafrická forma (*T. b. rhodesiense*). Stejně jako u *T. cruzi* se jedná o prvoky, kteří také významně mění svoji morfologii, s rozdílem, že k významným přeměnám dochází pouze ve vektoru.

Vektor přenášející africké trypanosomy je moucha tse-tse (Diptera, *Glossina*), známá také jako bodavka. Saje převážně na velkých kopytnících, někdy i na člověku. Nemoc kterou

tito dva parazité způsobují se jmenuje lidská africká trypanosomiáza (HAT) neboli spavá nemoc (Simarro *et al.*, 2014).

HAT podle WHO hlásí k roku 2019 okolo tisíce případů (WHO, 2020a). Nemoc je endemická v 36 zemích subsaharské Afriky, kde dochází k šíření této nemoci. *T. b. gambiense* způsobuje chronickou formu nemoci a jejím hlavním rezervoárem je člověk. Jedná se tak o antroponózu. *T. b. rhodesiense* způsobuje akutní formu nemoci a jako hlavní rezervoár má zvířata. K přenosu na člověka dochází spíše náhodně a jedná se tak o zoonózu.

Životní cyklus afrických trypanosom

Pro africké trypanosomy je charakteristický složitý životní cyklus. Infikovaný vektor (moucha tse-tse) nasaje krev ze savce a skrz ránu se společně se slinami dostávají metacykličtí trypomastigoti do těla. V místě sání vzniká lokální zánět, kde se trypanosomy množí. Následně migrují do lymfatického systému a krevního řečiště. Trypomastigoti v pozdějším stádiu putují krví i do jiných tělních tekutin. Časem se dostávají do mozkomíšního moku. Po celou dobu se v hostiteli množí. V těle hostitele se většinou vyskytují hlavně dvě morfologické formy – široká forma a štíhlá forma. Parazit se nejprve diferencuje na štíhlou formu, která proliferuje a poté na širokou, která je po nasátí, na rozdíl od štíhlé formy, schopna přežít ve střevech vektora.

K morfologickým změnám dochází uvnitř vektora. V mouše se krevní trypomastigoti transformují na procyklické trypomastigoty a ty se dále v zadním střevě vektora binárně dělí. Poté co opustí střevo se diferencují na epimastigoty, kteří se množí ve slinných žlázách. Epimastigoti se následně opětovně mění na metacyklické trypomastigoty a mohou být znovu inokulováni.

Klinický obraz

Při akutní formě ke smrti dochází v rámci 6 měsíců, pokud neprobíhá nebo nezabírá žádná léčba. U chronické formy, kde je nástup pomalejší, přichází smrt průměrně do 3 let. (Checchi *et al.*, 2008). Symptomy HAT rozdělujeme na dvě fáze – ranou (I. fázi) a pozdní (II. fázi). Příznaky nemoci se u fází liší závažností a svojí frekvencí.

I. fáze

I.fáze je hemo-lymfatická (parazit se nachází v krvi a lymfě). Při této fázi dochází k mírným občasným příznakům, jako je bolest hlavy, bolest kloubů, horečka, tachykardie, oteklé lymfatické uzliny nebo také kožní léze zvané šankry.

II. fáze

II. fáze je meningo-encefalitická. Paraziti překročí hematoencefalickou bariéru a způsobují celkové systémové zhoršení. To se projevuje závažnými neurologickými problémy např. porušením motoriky a vadou řeči. Tento zásadní progres nemoci vede až k smrti. (Checchi *et al.*, 2008).

Velmi důležitým krokem, který by měl následovat po prvních příznacích je včasná diagnóza, která ukáže, v jaké fázi se člověk nachází a podle toho je možné zvolit správnou léčbu.

Diagnostické metody

Diagnóza u podezření na nákazu parazitem by měla být učiněna co nejdříve, aby se zabránilo postupu do druhé neurologické fáze. V Africe je bohužel použití diagnostiky finančně náročné, proto mnohokrát nedochází k časně diagnóze a předchází jí smrt. Jelikož se většinou jedná o polní podmínky, využívají se prvotně terénní diagnostiky. Do nich se zahrnujeme tzv. aktivní screening, který detekuje protilátky a parazity. Mezi aktivní screening se řadí metoda CATT (kartový aglutinační test na trypanosomiázu), při které se výsledky získávají z kapilární krve. Tento test je rychlý a finančně velmi dostupný, proto se využívá jako první diagnostická metoda. U pacientů s pozitivním CATT dochází poté k vyšetření lymfatických uzlin. (Lejon *et al.*, 2010; Truc *et al.*, 2002).

Pro přesné rozlišení o jakou fázi se jedná, se však vyžaduje provedení lumbální punkce. Ze získaného mozkomíšního moku se detekuje množství trypanosom, tím se rozliší fáze nemoci a podle výsledku se nasazují léky (Lejon *et al.*, 2010).

3.2 *Leishmania*

Leishmania je rod obligátně intracelulárních parazitických prvoků. Vzhledem k jejich přenosu krvesajícím hmyzem patří zástupci rodu *Leishmania*, stejně tak jako rod *Trypanosoma*, mezi hemoflageláty (Schuster a Sullivan, 2002). Pod tento rod spadá 31 druhů *Leishmania* schopných nakazit savce, z toho 20 druhů je patogenních pro člověka (Akhoundi *et al.*, 2016). Všechny druhy mají digenetický životní cyklus. Fázi ve vektoru tvoří pohyblivý promastigoti a fázi v savci tvoří amastigoti (Baron, 1996). Druhy patogenní pro člověka se vyskytují na všech kontinentech, s výjimkou Austrálie a Antarktidy. Odhaduje se, že ročně je tímto parazitem nově nakaženo až 2 miliony lidí (WHO, 2020b). Endemická situace je ve více jak 90 zemích, v ohrožení je 350 miliónů lidí a ročně zemře na tuto chorobu až 30 tisíc lidí (WHO, 2020b).

Nemoc, kterou parazit způsobuje se nazývá leishmanióza a má tři hlavní klinické formy – kožní (CL), viscerální (VL) známá také jako kala-azar (tj. v hindštině černá nemoc) a mukokutánní (MCL). To, jaká forma vznikne, závisí na více faktorech např. druhu parazita, imunitě jedince, ve které zemi se jedinec nakazil atd. (Tab.1).

Největší problém způsobuje leishmanióza v rozvojových zemích. 75 % případů CL z celosvětového výskytu je v 10 zemích – Afghánistánu, Alžírsku, Brazílii, Etiopii, Íránu, Kolumbii, Kostarice, Peru, Severním Súdánu a Sýrii. 90 % případů VL z celosvětového výskytu je v 6 zemích - Bangladéši, Brazílii, Etiopii, Indii, Súdánu a Jižním Súdánu (Alvar *et al.*, 2012). Jedná se o formu, která je nejvážnější a neléčená končí smrtí. 90 % případů z celosvětového výskytu MCL je v Bolívii, Brazílii, Etiopii a Peru (WHO, 2020b).

Druhy <i>Leishmania</i>	Forma nemoci v člověku	Geografické rozmístění
<i>L. aethiopica</i>	Lokální kožní leishmanióza	Etiopie, Keňa
	Difúzní kožní leishmanióza	
<i>L. major</i>	Lokální kožní leishmanióza	Severní Afrika, Súdán, Severní India, Pákistán, Subsaharská Afrika
<i>L. mexicana</i>	Lokální kožní leishmanióza	Centrální Amerika
<i>L. amazonensis</i>	Lokální kožní leishmanióza	Jižní Amerika, sever Amazonu
<i>L. braziliensis</i>	Lokální kožní leishmanióza	Jižní Amerika
	Mukokutánní leishmanióza	Centrální Amerika a Mexiko
<i>L. peruviana</i>	Lokální kožní leishmanióza	Západní Andy, Argentinské vrchovina
<i>L. infantum</i>	Viscerální leishmanióza, lokální kožní leishmanióza	Středomořská pánev; středo-východní a centrální Asie k Pákistánu; Čína; Centrální a Jižní Amerika, jižní Evropa, severo-západní Afrika
<i>L. donovani</i>	Viscerální leishmanióza	Etiopie, Súdán, Keňa, Indie, Čína, Bangladéš, Burma

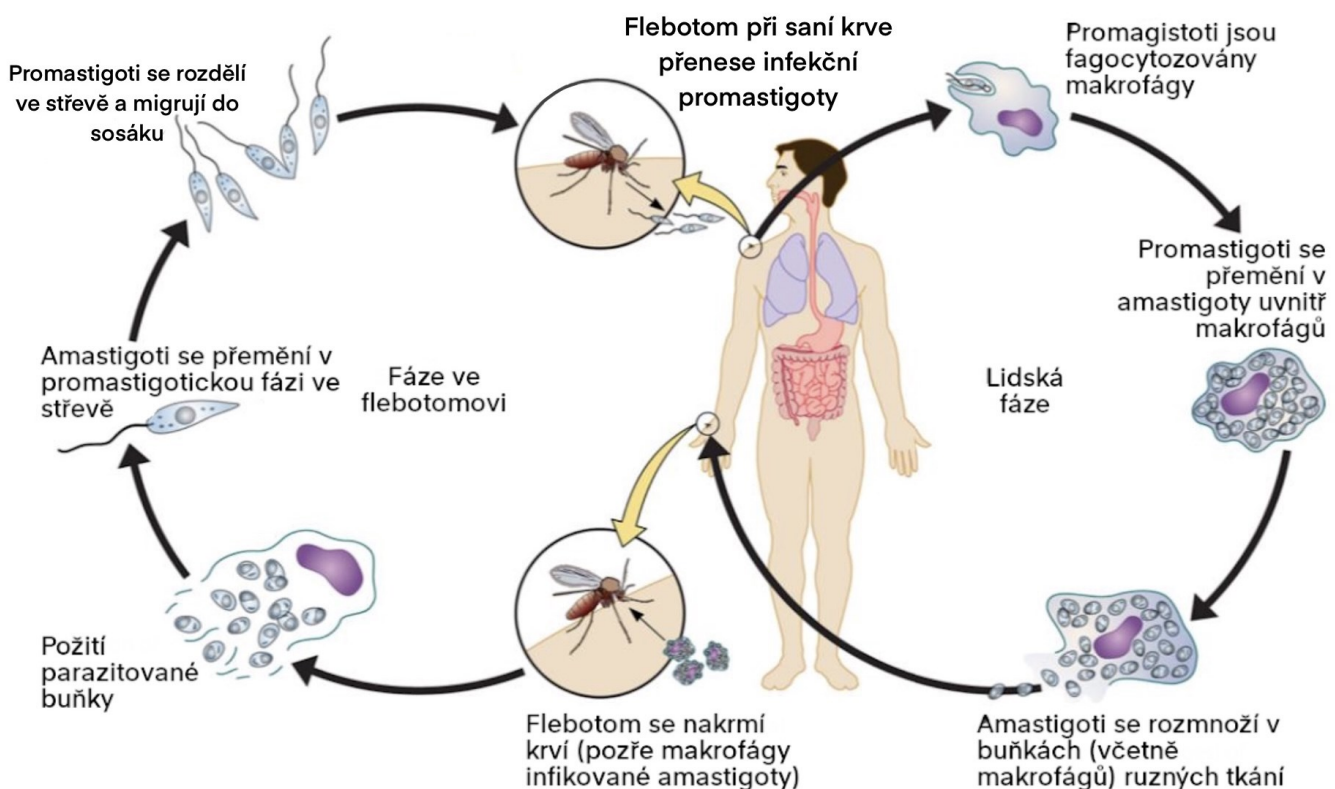
Tab. 1: Klinicky významné druhy rodu *Leishmania* (převzato a upraveno z (Alemayehu a Alemayehu, 2017))

Vektorem je samice z rodu *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) ve Starém světě nebo rodu *Lutzomyia* (Diptera, Psychodidae) v Novém světě. Výjimečně jsou známy případy, kdy k přenosu došlo jehlou nebo krevní transfúzí (Killick-Kendrick, 1999). Podčeleď Psychodidae se

dělí na 6 rodů, ale jen 2 z nich jsou prokazatelně vektory lidské leishmaniózy - *Phlebotomus* a *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, 1999). Uvažovalo se i o zařazení třetího rodu *Sergentomyia*, ale výsledky zkoumání dosud neprokázaly významný přenos lidské leishmaniózy (Maia and Depaquit, 2016). Dosud bylo popsáno okolo 900 druhů flebotomů, ale pouze u 30 z nich byla prokázána vektorová kapacita, tzn. schopnost vývoje parazita uvnitř vektora a jeho přenosu. Flebotomové jsou nejaktivnější za soumraku a v noci. Přes den se vyskytují v domech, sklepeních, jeskyních nebo v puklinách skal. (Lane and Crosskey, 1993).

Životní cyklus rodu *Leishmania*

Flebotom při sání krve ze savce přeneše spolu se slinami infekční promastigoty (Obr.3). Ti jsou fagocytováni makrofágy a uvnitř se transformují na amastigoty. Amastigoti se uvnitř množí jednoduchým dělením a pokračují infikováním dalších buněk. Amastigoty poté nasaje flebotom a v jeho střevě se přemění na promastigoty. Promastigoti se ve střevě dělí, následně putují do slinných žláz, kde při sání krve dochází k přenosu parazita a cyklus se opakuje.



Obr. 3: Životní cyklus rodu *Leishmania* (převzato a upraveno z (Esch a Petersen, 2013))

Klinický obraz nemoci

Jaká forma nemoci vznikne, závisí na více faktorech (např. imunitě jedince a druhu parazita). Bez ohledu na formu onemocnění se však stává, že část jedinců zůstane asymptomatická tzn. neprojevují se příznaky, ale sérologické testy nebo PCR vykazují pozitivitu (Srivastava *et al.*, 2013). Příznaky nemoci se liší projevem, inkubační dobou a důsledky.

Kožní leishmanióza

Jedná se o nejčastější formu nemoci, při níž dochází k napadení kůže a vede k jejímu poškození. Inkubační doba se pohybuje mezi 2-8 týdny. Kožní leishmaniózu dále dělíme na čtyři hlavní formy – lokalizovanou (LCL), difúzní (DCL), diseminovanou (DL) a recidivující (RCL).

LCL se považuje za nejmírnější a nejčastější formu. Dojde ke vzniku papule, z níž vznikne léze, která se často samovolně vyhojí za vzniku jizvy (Goto a Lindoso, 2010).

DCL je důsledkem anergie (nedostatečná nebo nulová imunitní odpověď), kdy jsou přítomny nodulární léze, bohaté na parazity, které však nikdy neulcerují (netvoří vředy). Jedná se o celoživotní nákazu. (Goto a Lindoso, 2010).

Při onemocněním DL vznikají desítky pleomorfních (nerovnoměrných) kožních lézí, které jsou nesouvisle rozšířeny po těle (Machado *et al.*, 2019).

RCL je charakteristická vznikem léze v blízkosti již uzdravené jizvy. RCL je zejména spojovaná s druhem *L. tropica* (Goto a Lindoso, 2010; Oliveira-Neto *et al.*, 1998).

Viscerální leishmanióza

Viscerální leishmanióza představuje nejzávažnější formu nemoci, která se projevuje např. úbytkem hmotnosti, opakující se horečkou, zvětšení sleziny (splenomegalie) a jater (hepatomegalie) (Sundar a Rai, 2002). Po vyléčení nemoci se u určitého procenta lidí vyvine post-kala-azarová dermální leishmanióza (PKDL), která prodlužuje dobu léčení a léze je zdrojem parazita pro přenašeče (Sundar a Rai, 2002).

Mukokutánní leishmanióza

Známa také pod názvem espundia (tj. španělsky vřed), se projevuje roky po kožní formě nemoci a jedná se o jednu z jejích forem. Nejprve se projevují mírné příznaky, jako zánět nosní dutiny. Avšak postupem času se objevují slizniční léze a dochází k porušení orálně-nosních dutin, což vede až k úplné destrukci chrupavky (Cárdenas *et al.*, 2020; Lacerda *et al.*, 2021).

Diagnostické metody

Diagnostika je u druhů *Leishmania* velmi důležitá nejen z hlediska geografického, ale i z hlediska klinického. Morfologicky jsou různé druhy nerozlišitelné, lze je však rozlišit různými diagnostickými metodami. Mezi klasické metody patří přímá detekce parazita, kdy se zkoumá roztěr barvený Giemsou, za účelem vizualizace amastigota. Zkoumání může probíhat optickým mikroskopem nebo pomocí PCR. Pozitivní výsledky se posílají na restriční analýzu RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů), pro rozlišení druhů (De Andrade *et al.*, 2006). Metoda roztěru a optického mikroskopu je levná a rychlá. Nepřímé metody jsou založeny na analýze specifických imunitních odpovědí při sérologických testech (Marfurt *et al.*, 2003). Druhy parazita se odlišují také analýzou izoenzymy (McNicoll *et al.*, 2006), která je však pomalá a nákladná.

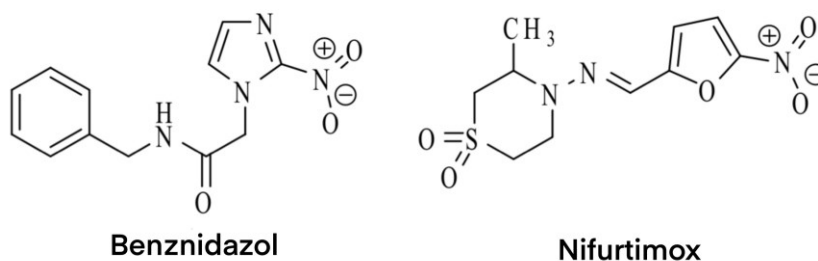
4 Léčba

Chagasova choroba, HAT a leishmanióza patří do skupiny "zanedbávaných tropických nemocí" – NTDs. Jsou to nemoci, které nejsou dostatečně finančně podporované. Výzkum nových léčiv je často pomalý a neefektivní. V posledních letech došlo k většímu povědomí o HAT a jejich úspěšných klinických testech. Tyto výzkumy se odrazily na zlepšení situace, oproti ostatním onemocněním způsobenými parazitickými kinetoplastidy.

Hledání cíle v parazitovi pro vývoj léčiv se řídí určitými pravidly. Cíl (i) nesmí být přítomný v lidském hostiteli; (ii) musí být esenciální pro přežití parazita; (iii) musí být drogovatelný (úspěšně reaguje na inhibitory) (Ilari *et al.*, 2018). To vše splňuje cíl, na který se v dnešní době zaměřuje spousta výzkumů – trypanothion reductáza (TR). Jedná se o unikátní antioxidační sloučeninu typickou pro kinetoplastida, který využívá trypanothion, jako obranu proti oxidačnímu stresu. Mezi další cíle řadíme superoxiddismutázu (Fe-SOD), cysteinové proteázy a další (Romero a López, 2017).

4.1 Chagasova choroba

Přesto, že byla nemoc objevena před více jak stoletím, používají se v klasické léčbě více jak 40 let pouze dva trypanocidní léky – benznidazol (BZ) a nifurtimox (NFX) (Obr. 4). Problémem těchto léčiv je řada vedlejších účinků a skutečnost, že se jejich účinnost snižuje s věkem pacienta a dobou nákazy.



Obr. 4: Chemická struktura benznidazolu a nifurtimoxu (převzato a upraveno z (Menezes *et al.*, 2014))

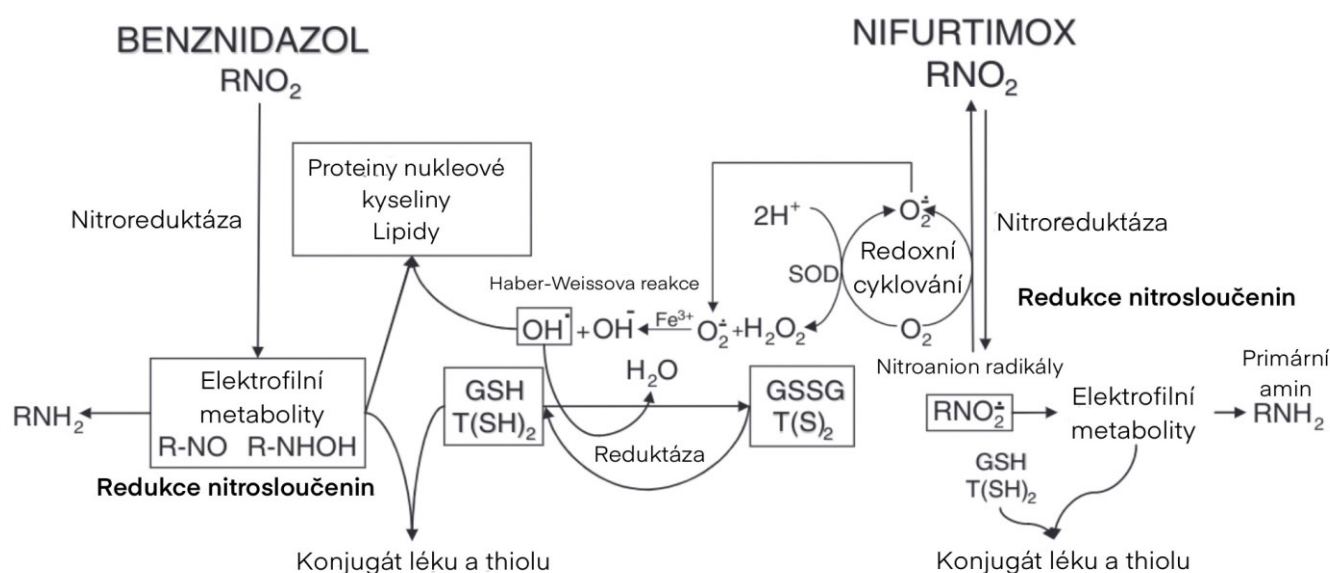
4.1.1 Současné použití léčiv

BZ i NFX se užívají orálně. BZ se považuje za lék první linie, kvůli svým mírnějším vedlejším účinkům oproti NFX. V roce 2017 byl BZ společností FDA schválen pro léčbu dětí ve věku 2-12 let a byl tak prvním schváleným lékem na Chagasovu chorobu ve Spojených státech amerických (FDA, 2017). NFX začal být používán roku 1965 v rozvojových zemích, ale až roku 2020 byl lék schválen k lékařskému užití ve Spojených státech (FDA, 2021).

Působení léčiv v organismu

Oba léky jsou nitroheterocyklické sloučeniny, které reagují s nitroreduktázami (NTR) *T. cruzi* (Obr. 6), za vzniku elektrofilních metabolitů a volných radikálů. Ty se váží na proteiny, lipidy, DNA a RNA, což vede k poškození těchto makromolekul (Hall *et al.*, 2011). Právě porucha aktivity NTR způsobuje rezistenci vůči nitroheterocyklickým léčivům (Wilkinson *et al.*, 2008). Volné radikály z NFX, mohou reagovat s kyslíkem a za účasti superoxiddismutázy (Fe-SOD) vzniká H_2O_2 (Obr. 6). Ve studii Romanha *et al.* (2002) bylo potvrzeno, že léčba BZ zvyšuje expresi interferonu gama (IFN- γ), který je tvořen v důsledku zánětu a tím také přispívá ke smrti parazita.

Při studiu intracelulární trypanosomální kyseliny arachidonové a jejího metabolismu u parazitů bylo zjištěno, že prostaglandinová syntáza v *T. cruzi* souvisí s enzymem TcOYE (*T. cruzi* old yellow enzym) (Kubata *et al.*, 2002). TcOYE katalyzuje syntézu prostaglandinu a redukuje jedním nebo dvěma elektrony trypanocidní léčiva, kterými jsou např. nitroheterocyklické sloučeniny (Kubata *et al.*, 2002). Tato redukce vede k chinonovým meziproductům odvozených od trypanocidních léčiv jako zdroj volných semichinonových radikálů poškozujících organelu parazitického prvoka (Kubata *et al.*, 2002). Tato reakce dobře shrnuje působení jak BZ, tak NFX. TcOYE je významným enzymem díky své nitroreduktázové aktivitě a aktivuje tak léčiva proti Chagasově chorobě (Díaz-Viraqué *et al.*, 2018).



Obr. 6: Reakce působení nifurtimoxu a benznidazolu s nitroreduktázami a spojenými enzymy. (převzato a upraveno (Maya *et al.*, 2007))
SOD – superoxiddismutáza; GSSG – glutathion sulfid; GSH – glutathion; T(SH)₂ – trypanothion; T(S)₂ – trypanothion disulfid

Vedlejší účinky

Benznidazol

Vedlejší účinky BZ se řadí mezi mírnější, přesto dochází až u 20 % procent dospělých k přerušení léčby z důvodu nesnášenlivosti a toxickým účinkům léku (Molina *et al.*, 2015). Přerušení léčby je také s jedním z důvodů rostoucí rezistence kmenů. Vedlejší účinky BZ je např. dermatitida, zažívací potíže, polyneuritida (zánětlivé onemocnění nervů), kloubní potíže, nechutenství a bolesti hlavy (Oliver *et al.*, 2017).

Nifurtimox

Mezi vedlejší účinky NFX patří porucha příjmu potravy, ztráta hmotnosti, psychické změny, ospalost, zažívací problémy, alergické kožní reakce a neurologická toxicita (polyneuropatie, křeče) (Crespillo-Andújar *et al.*, 2018).

Rezistence

Na myších modelech byly pozorovány kmeny *in vivo* s účinností léčiva BZ nebo NFX od 0 do 100 %. Kmeny u nichž bylo procento vyléčení méně než 50 %, byly označeny jako kmeny přirozeně rezistentní (Filardi a Brener, 1987). Kritickým krokem funkce BZ a NFX je aktivace léčiva skrze NTR. Pokud je parazit vystaven selekčnímu tlaku, dochází k mutacím a ztrátě funkčnosti NTR. Tím se u *T. cruzi* vytváří rezistence vůči léčivům (Mejia *et al.*, 2012). Další podíl na vzniku rezistence má enzym TcYOE. Dle výzkumu García-Huertas *et al.* (2017), bylo prokázáno, že u parazitů, kteří nadměrně exprimovali enzym TcOYE, byla zaznamenána větší citlivost vůči BZ, přičemž downregulace enzymu způsobila rezistenci parazita. Bylo také potvrzeno, že rezistence stoupá se snížením aktivity NTR. Naopak její nadměrnou expresí vzniká přecitlivělost (Wilkinson *et al.*, 2008).

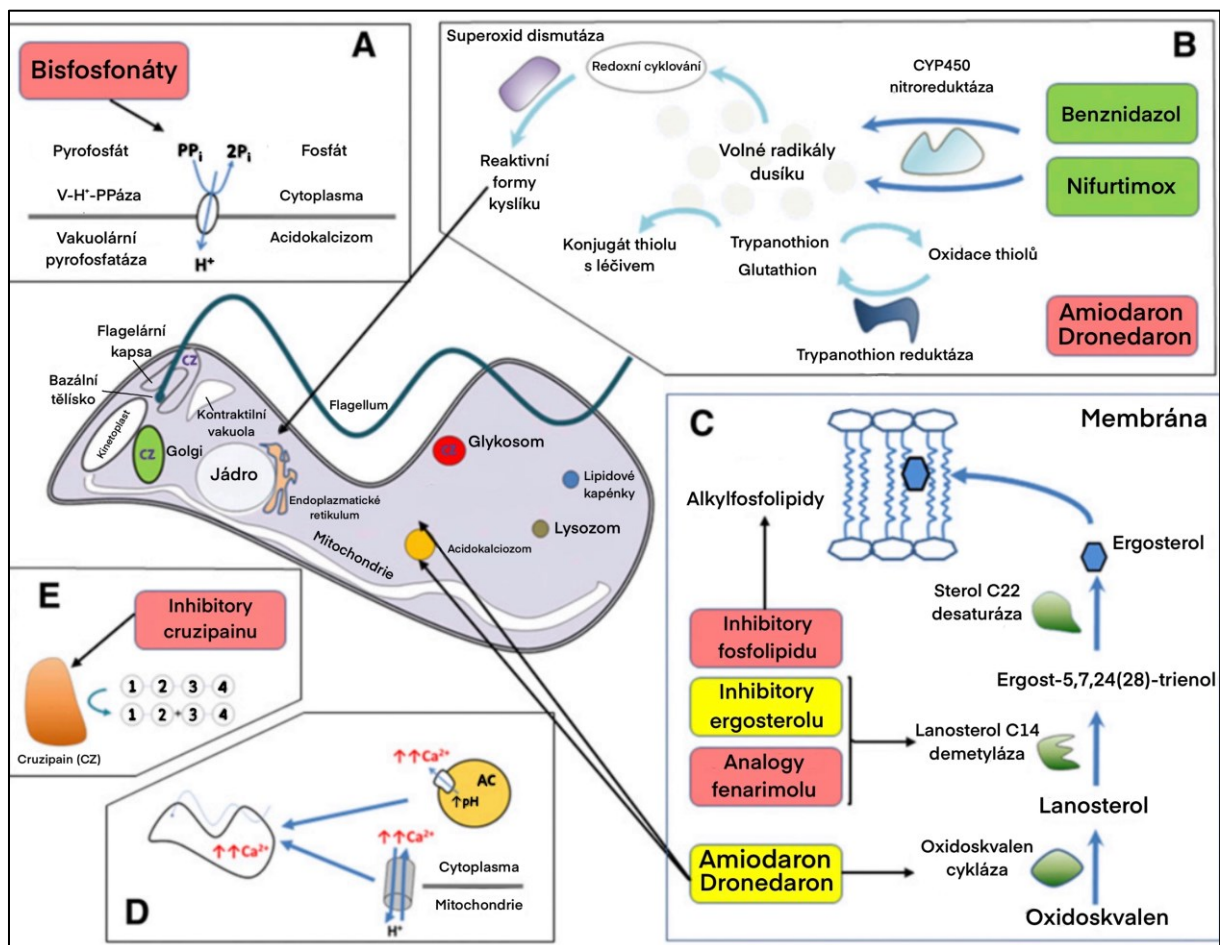
4.1.2 Nová a experimentální léčiva

Vývoj nových léčiv se zaměřuje na dráhy a enzymy životně důležité pro parazita. Mezi takovou dráhu u *T. cruzi* patří dráha ergosterolová (ED) (Obr. 5). Inhibitory této dráhy (EBI) jsou považovány za nejpokročilejší kandidáty potenciálních nových léků a jsou již v klinických studiích. EBI cílí na lanosterol C14 demetylázu (Urbina, 2009). Takovým lékem je např. posaconazole (POSA). Jedná se o triazolové antifungální širokospektrální léčivo (Kwon a Mylonakis, 2007), které bylo schváleno v roce 2006 pro lékařské užití ve Spojených státech amerických (FDA, 2006). Poslední klinická studie z roku 2015 však ukázala, že monoterapie

BZ je stále lepší oproti POSA. Kombinovaná léčba BZ+POSA prokazovala o něco lepší výsledky než monoterapie POSA (Morillo *et al.*, 2017).

Dalšími léky užívanými v klinické studii, blokující ED, jsou amiodaron a dronedaron. Amiodaron je antiarytmikum, které se podává symptomatickým pacientům se srdeční formou CD (Benaim *et al.*, 2006). Lék vykazuje toxicitu vůči štítné žláze, a proto se s amiodaronem podává dronedaron, který toxicitu eliminuje. (Benaim *et al.*, 2012). Kromě inhibice ED, amiodaron a dronedaron uvolňují Ca^{2+} z mitochondrií a acidokalciozomů, čímž se zvyšuje hladina vápníku v cytoplasmě a narušuje tak homeostázu parazita (Benaim *et al.*, 2020).

U všech ostatních cílů se prozatím nepodařilo dostat přes experimentální fázi. Dalším z cílů vývoje jsou bifosfonáty, které inhibují farnesylpyrofosfát syntázu (Obr.5)(Montalvetti *et al.*, 2001) nebo inhibitory cruzipainu (CZ) (Obr. 5). CZ je cysteinová proteáza, která je exprimovaná ve všech vývojových formách *T. cruzi*. Pomáhá parazitovi s imunitními úniky, množením a diferenciací (Campetella *et al.*, 1990). Nadějným lékem se zdál K777 (Choy *et al.*, 2013), vinyl-sulfonový ireverzibilní inhibitor CZ. Od jeho vývoje však bylo opuštěno vzhledem k nesnášenlivosti u psů a primátů (DNDi, 2009).



Obr. 5: Schéma léčiv s trypanocidní aktivitou (převzato a upraveno z (Sales Junior *et al.*, 2017)). Zeleně – používané léky, červeně – experimentální, žlutě – v klinické studii

Vakcína

Vakcína proti *T. cruzi* v současné době neexistuje. Publikovaný článek Cerny z roku 2020 představil pozitivní výsledky při užití terapeutické vakcíny, která kombinuje CZ a přírodní inhibitor CZ chagasin. Po použití vakcíny se zvýšila sekrece IFN- γ a došlo ke snížení výskytu parazita v krvi jak v akutní, tak v chronické fázi (Cerny *et al.*, 2020).

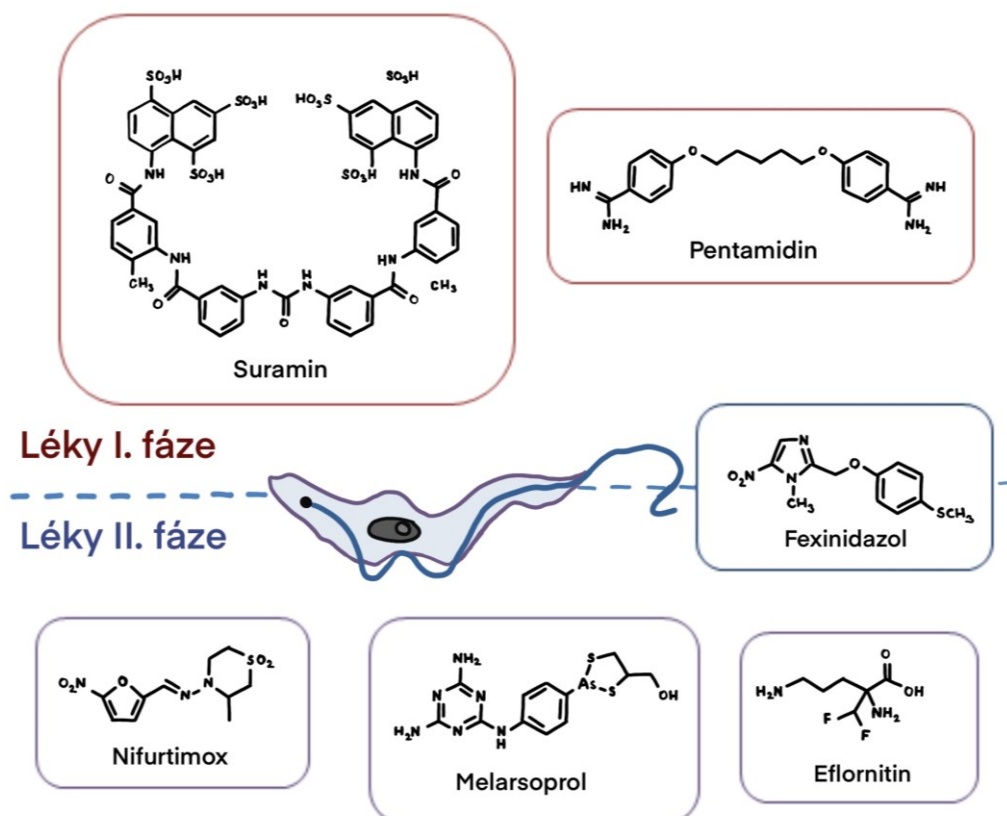
4.2 Spavá Nemoc

Nemoc je specifická svými fázemi a je tedy nutno ji i specificky léčit. Léky, které se podávají v první fázi, nemohou být aplikovány ve fázi druhé, jelikož nedojde k prostupu přes hemoencefalickou bariéru. Léky proti první fázi se ve fázi druhé používají spíše jako doplněk léčby (např. pro čištění krve).

Stejně jako Chagasova choroba je i HAT řazena mezi NTDs. V posledních letech se vývoj léčiv proti HAT setkává s úspěchem a větší pozorností farmaceutických a výzkumných firem.

4.2.1 Současné použití léčiv

V současné léčbě lidí se užívají hlavně tyto 4 léčiva – pentamidin a suramin v první fázi nemoci, eflornitin a melarsoprol ve fázi druhé (Obr. 7). Jako páté hlavní léčivo se občasně řadí také NFX, ale jeho užití spadá pod přísná kritéria a používá se zásadně v kombinaci s ostatními léčivy. Proto ho neřadíme do skupiny 4 předešlých léčiv, která se užívají jak samostatně, tak i v kombinaci. Suramin, eflornitin a melarsoprol se podávají intravenózně, pentamidin intramuskulárně a NFX se podává orálně, díky jeho snadnému vstřebávání (WHO, 1995).



Obr. 7: Chemická struktura léčiv na spavou nemoc – suramin, pentamidin, nifurtimox, fexinidazol, melarsoprol a eflornitin (převzato a upraveno z (Capela *et al.*, 2019))

Působení léčiv na organismus

I.fáze

Při první fázi nemoci se používá pentamidin a suramin.

Pentamidin patří mezi aromatické diaminy a byl poprvé syntetizován ve 40. letech 20. století (Berger, 1995). Mechanismus působení léku není zcela známý. Zřejmě vstupuje do parazita transportérem P2 (purinový transportér 2) a uvnitř se akumuluje (Obr. 8). Inhibuje syntézu nukleových kyselin, oxidativní fosforylaci v mitochondriích a poškozuje kDNA (Basselin *et al.*, 1996; Munday *et al.*, 2014).

Suramin (původně germanin) byl vyvinut v první polovině 20. století (Dressel, 1961). Jedná se o polyaniontovou sloučeninu, která se řadí mezi naftalenová barviva. Lék vstupuje do parazita pomocí glykoproteinu ISG75 (Alsford *et al.*, 2013) (Obr. 8). Endozomálním systémem putuje do lysozomu, odkud se pomocí membránových transportních proteinů (MFST) dostává do cytoplazmy (Obr. 8). Svými zápornými náboji se váže na glykolytické enzymy parazita, čímž je inhibuje. Tyto enzymy nesou na svém povrchu kladně nabitě náboje (díky argininu a lysinu) a tvoří tak vazebné místo pro suramin (Willson *et al.*, 1993).

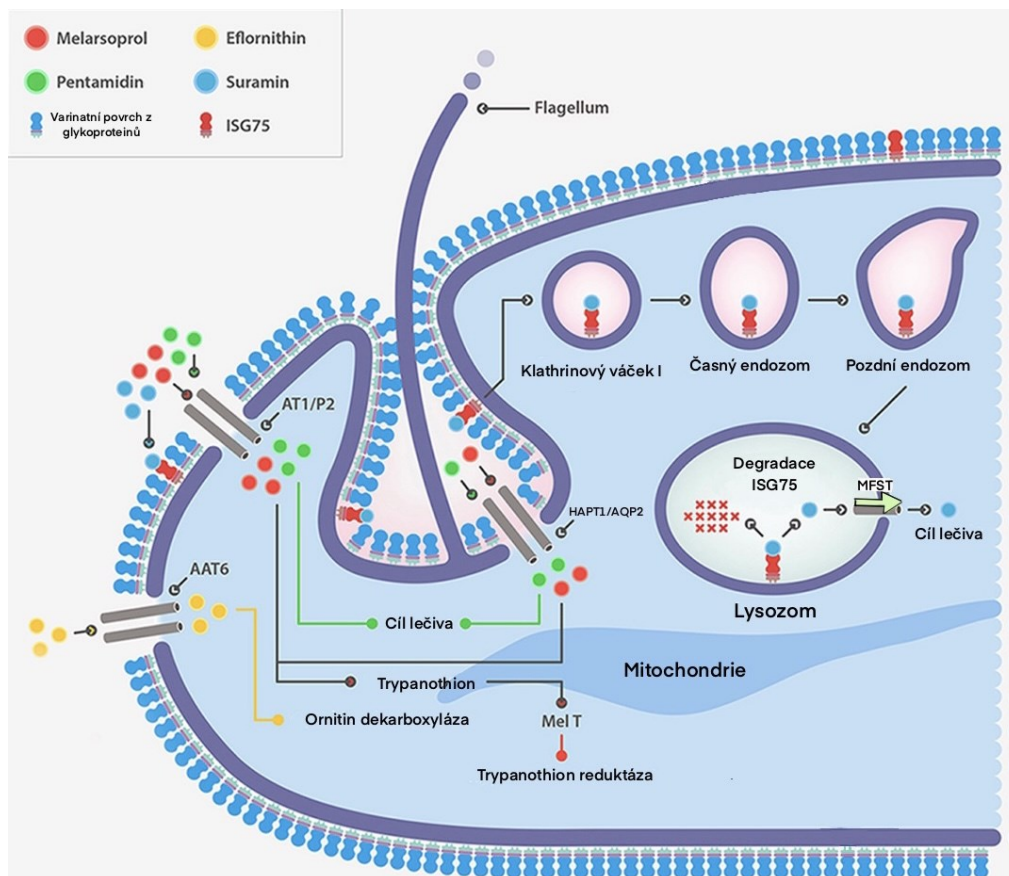
II.fáze

Při druhé fázi nemoci se užívá melarsoprol, eflornitin a kombinace léků s nifurtimoxem.

Melarsoprol je trivalentní organický arsenik a podává se intravenózně injekcí. Stejně jako u pentamidinu, vstupuje do parazita P2 transportérem. Tvoří melarsen oxid, který trypanosomy absorbují a naváže se na trypanothion, kde vytvoří reakční adukt Mel T (Obr. 8), který inhibuje reduktázu trypanosomy (Fairlamb *et al.*, 1989).

Eflornithin (DFMO) je analogem ornitinu a do parazita vstupuje transportérem TbAAT6 (transportér *T. brucei* AAT6) (Obr. 8). Působí jako inhibitor sebevražedného enzymu ODC (ornitin dekarboxyláza), na který se nevratně váže a zabraňuje tak syntéze polyaminů (Bacchi *et al.*, 1983). Mechanismus byl potvrzen vytvořením mutantů bez ODC, kteří již nebyli déle citlivými na DFMO (Li *et al.*, 1998). Důvodem proč lék nepůsobí na lidský ODC je v rozdílu stability enzymu u člověka a parazita. ODC člověka je méně stabilní, díky kratšímu poločasu rozpadu enzymu. Stabilita ODC se liší i napříč druhy rodu *Trypanosoma*. Proto DFMO působí pouze na *T. b. gambiense*, kde je doba rozpadu ODC menší než u *T. b. rhodesiense* (Iten *et al.*, 1997).

Nifurtimox inhibuje NTR za vzniku volných radikálů (viz. kapitola Chagasova choroba).



Obr. 8: Schematické znázornění struktury, transportérů a proteinů *T. brucei* zapojených do absorpce nebo mechanismu účinku trypanocidů (převzato a upraveno z (Garcia-Salcedo *et al.*, 2016))

Vedlejší účinky

Pentamidin

Mezi nejčastější vedlejší účinky pentamidinu patří respirační problémy, hypotenze a poškození ledvin. Mezi méně časté patří bolest hlavy, hypoglykemie (pokles cukru v krvi), anémie a hyperémie (překrvení) (Diro *et al.*, 2015).

Suramin

Suramin je špatně snesitelný ve velkých dávkách, proto je nutné podávat léčivo v malých dávkách. Pacienti cítí často únavu, nevolnost, objevit se může také anémie, problémy s ledvinami nebo neuropatie (WHO, 1995).

Melarsoprol

Melarsoprol je sice velmi účinným léčivem, ale kvůli arsenické skupině také velice toxický. Může způsobit zvýšený tlak, poškození ledvin, závratě nebo vyvolat zvracení. U 5-10 % pacientů se objeví encefalopatie po léčbě doprovázená třesem, bolestmi hlavy a těžkou mluvou. Až 50 % procent pacientů, po projevení encefalopatie umírá v průběhu léčby (WHO, 1995).

Eflornithin

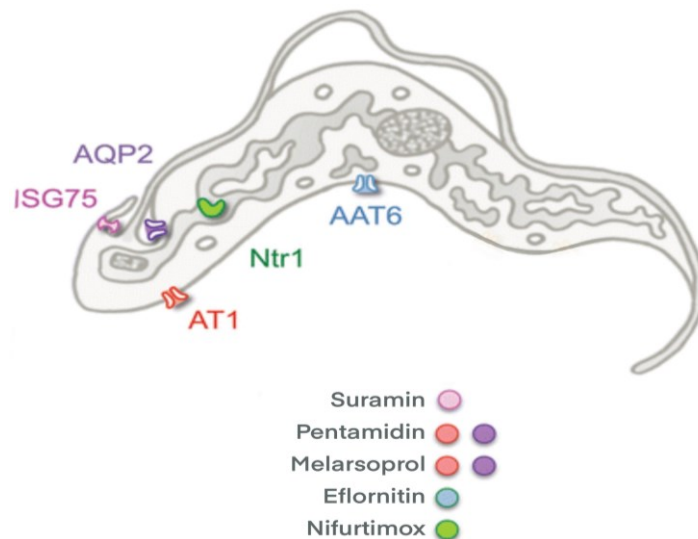
DMFO má často jako vedlejší účinek anémii (chudokrevnost), leukopenii (snížený počet bílých krvinek), trombocytopenii (snížený počet trombocytů) nebo průjem. Mezi méně časté účinky patří zvracení, alopecie (ztráta vlasů) nebo akné (Aronson, 2016). Přestože je melarsoprol více toxický než DMFO, v mnoha léčebných centrech je preferovaný pro léčbu, kvůli dlouhodobé a nákladné terapii DMFO.

Rezistence

Trypanosomy nesou na svém povrchu řadu transportérů a povrchových proteinů, kterými získávají živiny z hostitele. Tyto transportéry jsou jak cílem léčiv, tak potenciálním důvodem rezistencí (Obr. 9). Příkladem takových transportérů jsou např. P2 transportér a aquaglyceroporin 2 (AQP2) (Baker *et al.*, 2012), které se spojují s funkcí pentamidinu a melarsoprolu. Vyřazením transportéru AQP2 dochází ke ztrátě aktivity vysoce afinitního transportéru pentamidinu a vytvoření zkřížené rezistence pentamidinu a melarsoprolu (Obr. 9) (Munday *et al.*, 2014). Transportér P2 je kódován genem TbAT1 (Obr. 8). Umlčením tohoto genu dojde k vytvoření rezistence (Matovu *et al.*, 2003).

U DFMO se předpokládá, že k rezistenci dochází při ztrátě genu TbAAT6 (Obr. 9), který funguje jako transmembránový protein (Vincent *et al.*, 2010).

I přes to, že je suramin starý přes 100 let, nevznikly u lidských trypanosom významné rezistence. Není to ale tak, že by rezistence neexistovala. Studie z roku 2012 umlčela protein ISG75 a výsledkem bylo snížení citlivosti parazita na suramin. Předpokládá se, že mutace proteinu IG75 by mohla být důvodem vzniku rezistence (Alsford *et al.*, 2012) (Obr. 9).



Obr. 9: Schématické znázornění transportérů (AQP2, TbAT1, TbAAT6), enzymu (NTR) a proteinu (ISG75) krevní formy *T. brucei*, které se podílí na vzniku rezistence vůči léčivům na HAT (převzato a upraveno z (Graf a Mäser, 2017))

Kombinace léků

Kombinace léčiv je v klinickém použití preferovaná, neboť umožňuje snížení množství jednotlivých dávek léčiv a také množství vedlejších účinků. Menší dávkování také zmenšuje pravděpodobnost vzniku rezistence, která vzniká zvýšenou dávkou jednotlivých léčiv (Priotto *et al.*, 2006). Různé kombinace tedy vykazují lepší výsledky než monoterapie (Priotto *et al.*, 2006), nicméně kombinace s melarsoprolem vykazovaly větší míru závažných vedlejších účinků (Bisser *et al.*, 2007; Priotto *et al.*, 2006).

Jako nejslibnější léčebnou kombinací první linie v druhé fázi se ukázal NECT – nifurtimox-eflornitin kombinovaná terapie (Yun *et al.*, 2010). Kombinace léčiv nifurtimoxu a eflornitinu byla už v předešlých letech součástí jiných studií. Například studie z roku 2006, testovala tuto kombinaci společně s dalšími dvěma kombinacemi – melarsoprol-nifurtimox a melarsoprol-eflornitin (Priotto *et al.*, 2006). Nejúspěšnější výsledky vykazoval nifurtimox-eflornitin.

I přesto, že se jedná o velmi nadějný lék, stále má daleko od úplného nahrazení melarsoprolu. Jedním z problémů je fakt, že NECT je více účinná na *T. b. gambiense* než na *T. b. rhodesiense*.

4.2.2 Nová a experimentální léčiva

Není pochyb o tom, že je potřebné najít nové léky proti HAT. Ať už z důvodu vedlejších účinků používaných léků, vznikajících rezistencí nebo náročné, drahé dodávce léčiv. Mezi nejvýznamnější nová léčiva řadíme fexinidazol a acoziborol (známý také jako SCYX-7158).

Fexinidazol byl v roce 2018 schválen Výborem evropské agentury pro léčivé přípravky pro humánní užití a stal se tak prvním orálním léčivem používaným pro obě dvě fáze HAT (Lindner *et al.*, 2020). Stejně jako NFX má fexinidazol nitroskupinu a jejich mechanismus působení je podobný. Dochází k redukci elektronu ze skupiny NO₂ pomocí NTR1 (specifická nitroreduktáza 1) (Wilkinson *et al.*, 2008) a je oxidován na sulfon a sulfoxid (Brun *et al.*, 2011).

Acoziborol úspěšně v roce 2015 dokončil I. fázi klinické studie u člověka (DNDi, 2015). V současné době pokračují další fáze klinického testování. Jedná se o derivát benzoxaborolu. Oxaboroly vykazují antiprotozoální, antivirovou a antibakteriální aktivitu a mají několik známých cílů. Mezi trypanocidní cíle patří gen CPSF3. CPSF3 má endonukleázovou aktivitu a hraje klíčovou roli při tvorbě 3' konce pre-mRNA. Acoziborol zaujme aktivní místo CPSF3 a inhibuje tak jeho aktivitu. Důvodem, proč má lék specifickou trypanocidní aktivitu je přítomnost tyrosinu v lidském CPSF3. Postranní řetězec tyrosinu je velmi objemný a dochází tak k stericému střetu s acoziborolem (Wall *et al.*, 2018).

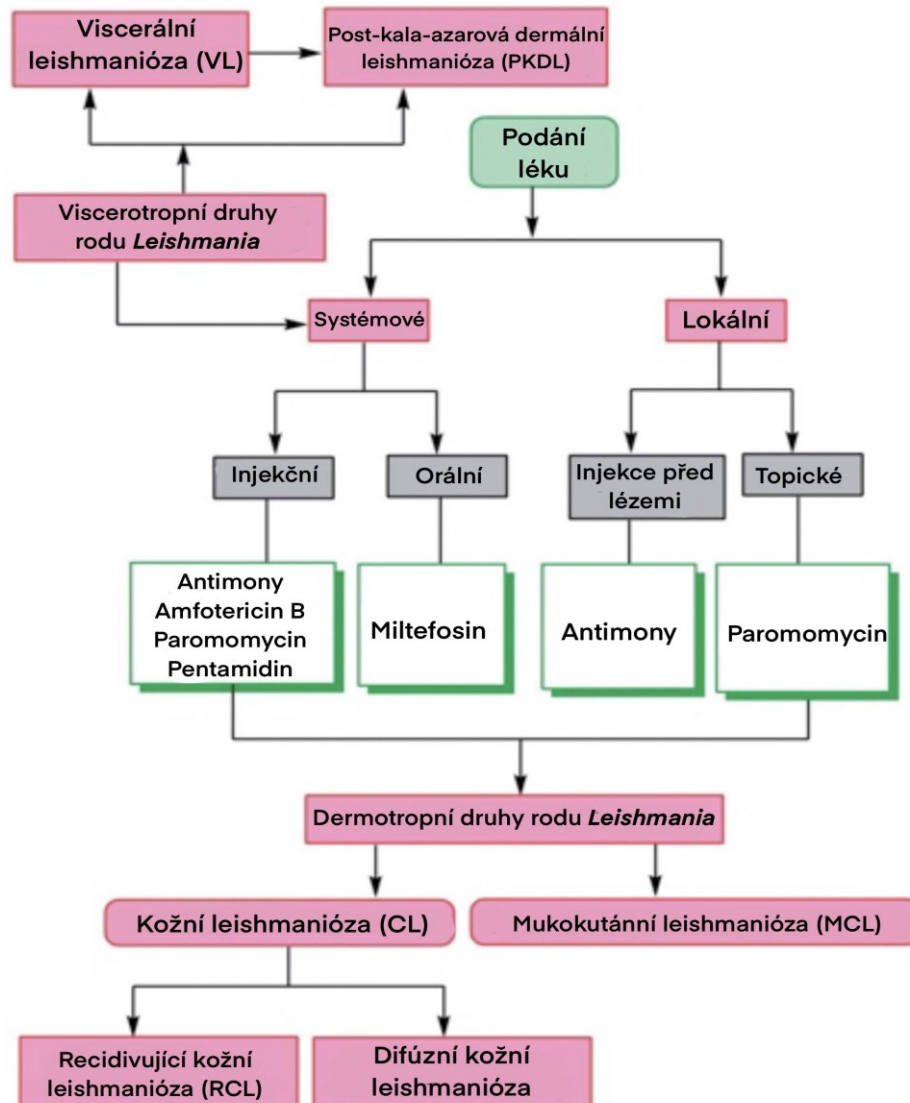
Nadějným kandidátem na orální léčbu HAT byl také lék DB289, ale kvůli jeho vysoké toxicitě vůči ledvinám bylo testování zastaveno (Harrill *et al.*, 2012).

Vakcína

Vyvinutí vakcíny je žádané hned z několika důvodů. Jelikož se často jedná o zoonózu, která je velmi těžce vymýtitelná, očkování by mohlo pomoci nejenom k ochraně zdraví, ale i ke zlepšení ekonomiky a celkovému zlepšení kvality života obyvatel v endemických ohniscích. Dosavadní pokusy se však ukázali jako neúčinné a nepřekročili pomyslnou experimentální hranici. Proč je vyvinutí vakcíny spíše málo pravděpodobné? Trypanosomy jsou specifické variantním povrchem z glykoproteinů – VSG, který se obměňuje. Genom obsahuje okolo 1000 genů, kdy dochází k náhodnému zapínání a vypínání při každé generaci. Parazité tak dokáží velmi dobře unikat imunitnímu systému, který nestačí vytvářet tak rychle nové protilátky (Kennedy, 2004).

4.3 Leishmanióza

Léčba je stejně jako u Chagasovy choroby náročná a vývoj nových léků je nedostatečně finančně podporován. Výběr léčiva se liší typem infekce (Obr. 10), druhem parazita a v jaké oblasti se pacient nachází. Cíle léčiv jsou u rodu *Leishmania* podobné jako u *T. cruzi* - trypanothion reduktáza, superoxid-dismutáza, cysteinové proteázy CPA, CPB, CPC a indukovatelná syntáza oxidu dusného (iNOS) (Romero a López, 2017).



Obr. 10: Schéma výběru léčiv na základě druhu parazita a formě nemoci (převzato a upraveno z (Sangshetti *et al.*, 2015))

4.3.1 Současné použití léčiv

Mezi léky první linie řadíme látky obsahující pentavalentní antimony (SbV). Patří sem sloučeniny stiboglukonát sodný (Pentostam) (Obr. 11) a meglumin antimonát (Glucantim) (Moore *et al.*, 2001). Používají se na léčbu všech forem nemocí. Bohužel v některých zemích

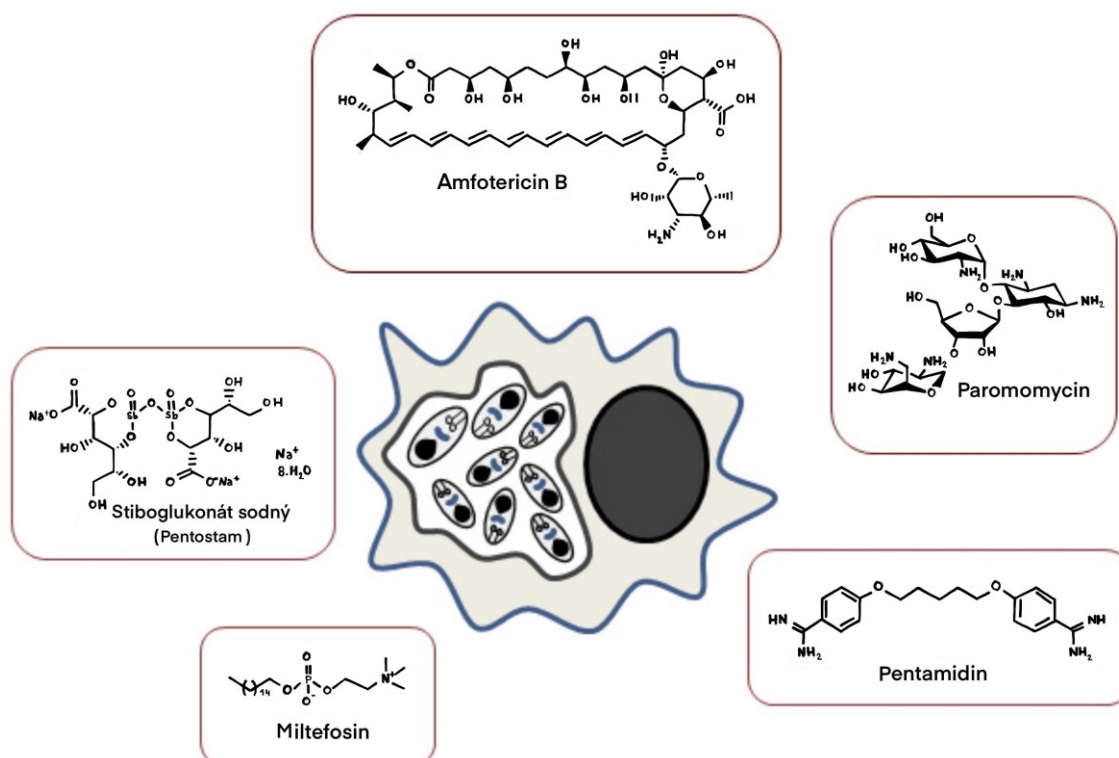
dochází k vytváření rezistence a místo těchto dvou léčiv se preferuje použití amfotericinu B (AmB) (Thakur *et al.*, 1993).

AmB (deoxycholát sodný) (Obr. 11) je antifungální lék, který se řadí do léků druhé linie společně s pentamidinem a paromomycinem. Má však nefrotoxické účinky a proto byly navrženy jeho tři méně toxické klinické formy, které nahrazují deoxycholát lipidy (Tiphine *et al.*, 1999). Liposomální AmB je oproti běžnému AmB výrazně méně toxický. Bohužel výroba a uskladnění jsou více finančně náročné.

Pentamidin, který se používá také u léčby HAT (viz. oddíl 4.2.1) se u leishmaniózy užívá k léčbě CL a VL u HIV pozitivních pacientů, aby se zabránilo relapsu nemoci (Diro *et al.*, 2015).

Paromomycin, aminoglykosidový aminocyklitol (Obr. 11), je širokospektrálním antibiotikem, kterým je možné orálně léčit obě formy CL i VL (Sundar a Chakravarty, 2008). U všech antileishmaniálních léčiv vykazují lepší výsledky jejich kombinace. Výjimkou není ani paromomycin, který v kombinaci s SbV vykazuje větší úspěšnost, než jako monoterapie (Musa *et al.*, 2012).

Miltefosin, alkylfosfolipid (Obr. 11) je orální léčivo podávané na léčbu VL, PKDL a CL. Byl původně vyvinut jako protirakovinné léčivo, ale jeho vedlejší účinky omezovaly proti rakovinnou léčbu (Dummer *et al.*, 1993).



Obr. 11: Chemická struktura léčiv na leishmaniózu – amfotericin B, paromomycin, Pentostam, miltefosin a pentamidin (převzato a upraveno z (Capela *et al.*, 2019))

Působení léčiv na organismus

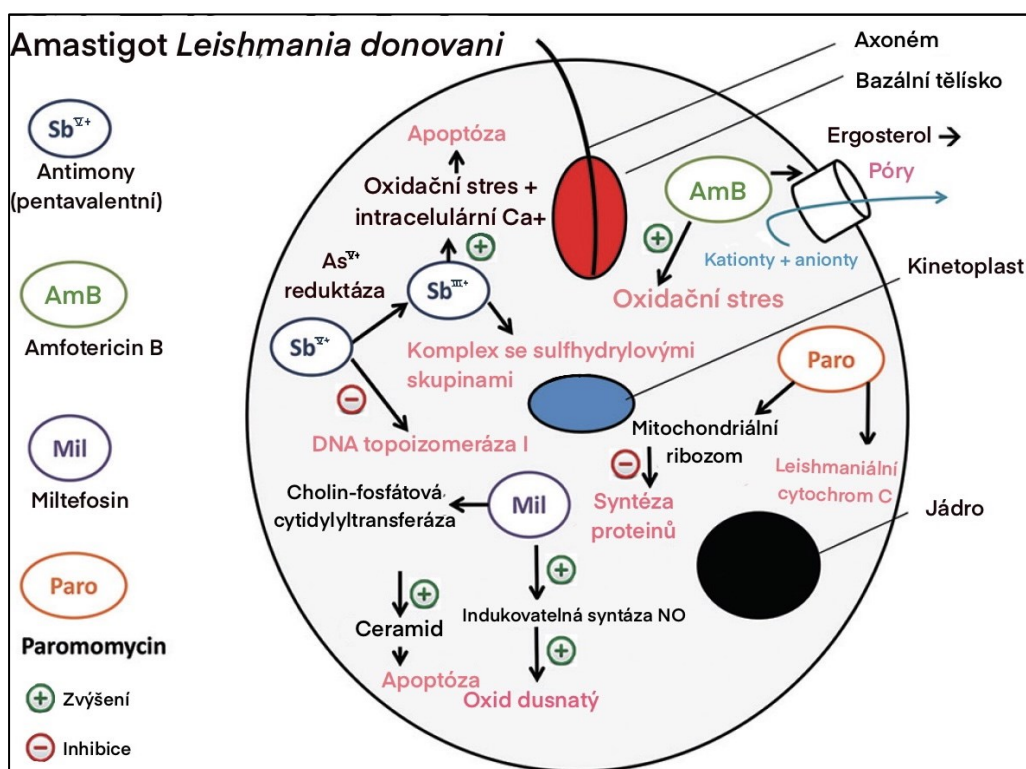
Mechanismus SbV není stále zcela objasněn, ale předpokládá se, že dochází k aktivování SbV v amastigotu, kde je transformován pomocí reduktázy (Obr. 12) na svojí toxickejší trojmocnou formu (SbIII). Ta způsobuje degradaci DNA parazita, interaguje s thiolovými skupinami (glutathion), inhibuje fosforylaci ADP a beta-oxidaci mastných kyselin (Serenio *et al.*, 2001). Stiboglukonát sodný vykazuje také schopnost inhibovat DNA topoizomerázu I (John Walker a Nancy G. Saravia, 2004).

AmB se váže na steroly buněčné stěny parazita (Obr. 12). Stěnu poruší, dochází k úniku kationtů a aniontů, což vede ke smrti buňky (Kumar Saha *et al.*, 1986).

Pentamidin má podobný mechanismus účinku u zástupců rodu *Leishmania* jako u *Trypanosoma brucei*. Dochází k poškození mitochondrií, inhibici syntézy nukleových kyselin a syntézy polyaminů (Basselin *et al.*, 1996).

Paromomycin inhibuje syntézu proteinů navázáním se na ribozomální 30S podjednotku, čímž dochází k akumulaci iniciačního komplexu, chybnému čtení a předčasnému ukončení translace mRNA (Sundar a Chakravarty, 2008).

Miltefosin působí jako inhibitor syntézy fosfatidylcholinu, ovlivňuje vápníkové kanály v plazmatické membráně parazita a ovlivňuje jejich funkčnost přenosu Ca^{2+} (Pinto-Martinez *et al.*, 2017).



Obr. 12 Schéma mechanismu účinku léků na leishmaniózu u amastigota *L. donovani* (převzato a upraveno z (Datta *et al.*, 2021))

Vedlejší účinky

Pentavalentní antimony

Antimony jsou poměrně vysoce toxické a s vedlejšími účinky se pacienti setkávají velmi často. Projevují se křečemi, vyrážkou, nevolností, bolestí hlavy a ve výjimečných případech hepatotoxicitou, nefrotoxicitou a kardiotoxicitou (Moore *et al.*, 2001).

Amfotericin B

Vedlejší účinky se nejvíce dostávají na začátku léčby a vyskytují se v podobě nevolnosti, třesu, ztuhlosti, zvracení, hypotenze (pokles tlaku), úbytku váhy, křečí a horečky (Thakur *et al.*, 1993). Při užití liposomální formy není výskyt vedlejších účinků tak častý.

Pentamidin

Stejně jako u léčby HAT patří mezi nejčastější vedlejší účinky respirační problémy, hypotenze a poškození ledvin. Méně časté jsou bolesti hlavy, hypoglykemie (pokles cukru v krvi) atd. viz oddíl 4.2.1 (Diro *et al.*, 2015).

Paromomycin

Paromomycin se řadí mezi méně toxické léky. Vedlejší účinky se objevují výjimečně. Nejčastěji ve formě vyrážky, méně často dochází k ototoxicitě (poškození struktur vnitřního ucha) a renální toxicitě (poškození ledvin) (Sundar a Chakravarty, 2008).

Miltefosin

Mezi nejčastější vedlejší účinky miltefosinu patří nechutenství, bolesti břicha, nevolnost a zvracení. Ve výjimečných případech dochází u pacientů k selhání ledvin (Verweij *et al.*, 1992).

Rezistence

Během posledního desetiletí vznikla větší rezistence oproti pentavalentním antimonům. Ta vznikla nadbytečným a nezodpovědným používáním léčiv (Perry *et al.*, 2015). Látky obsahující sulfhydryl jsou zásadní jak pro funkci léku, tak bohužel i pro vznik rezistence. Kmeny rezistentní vůči antimonu vykazují zvýšenou hladinu intracelulárních thiolů, které udržují nitrobuněčné redukční prostředí parazita. Ten se díky tomu může lépe bránit proti oxidačnímu stresu. (Haldar *et al.*, 2011).

Rezistence u pentamidinu je způsobená zvýšenou expresí PRP1 (ABC transportér), který vypumpovává lék z parazita ven skrz flagellární kapsu. (Coelho *et al.*, 2007).

AmB, miltefosin a paromomycin nevykazují výrazné rezistence, díky tomu, že nedochází k nadbytečnému používání léčiv. Zkoumají se laboratorně indukované rezistence, které by mohli být budoucím problémem. Výsledky ukazují, že i v případě AmB mohou být

ABC transportéry zapojeny do rezistence. Např. zvýšená exprese proteinu MDR1 (multirezistentní protein 1 rodiny ABC) byla přítomna u rezistentních kmenů a docházelo tak k rychlejšímu vyplavování AmB (Purkait *et al.*, 2012).

U miltefosinu se rezistence může vytvořit inaktivací genů odpovědných za příjem léčiva. Příkladem je inaktivace LdMT (*L. donovani* miltefosin transportér) a jeho podjednotky LdRos3 - ATPázy P typu (Pérez-Victoria *et al.*, 2006) nebo neznámým mechanismem, díky kterému rezistentní kmen snižuje ROS (reaktivní formy kyslíku) a tím se dokáže vyhnout apoptóze.

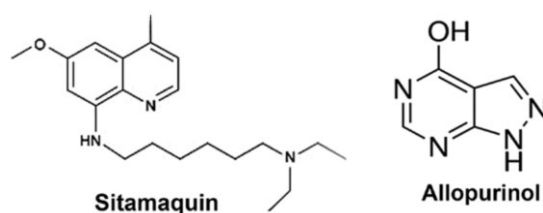
Paromomycin má velmi dobré předpoklady stát se lékem první linie VL. Jeho vedlejší účinky nejsou vysoké a rezistence se díky jeho nízkým dávkám a krátkému podávání vyskytuje zatím velmi málo (Sundar a Chakravarty, 2008). Předpokládá se, že rezistence by mohla být spojena s navázáním léčiva k povrchu buňky parazita. Výzkum Jhingran *et al.* (2009) zjistil, že inhibice endocytózních drah parazita vedla ke snížení příjmu paromomycinu.

4.3.2 Nová a experimentální léčiva

V klinických studiích se momentálně nachází dvě orálně podávaná léčiva – sitamaquin a allopurinol.

Sitamaquin, 8-aminochinolin (Obr. 13), je v klinické studii jako orální lék na VL. Mechanismus léku není zatím zcela objasněn. Předpokládá se, že inhibuje mitochondriální elektrontransportní řetězec a spouští oxidační stres, který vede k apoptóze (Carvalho *et al.*, 2011).

Allopurinol (Obr. 13) se podává především v kombinaci s pentavaletními antimony k léčbě CL a VL, jelikož jako monoterapie není efektivní (Sundar a Chakravarty, 2015). Lék se ve své fosforylované formě začleňuje do nukleových kyselin, kde narušuje translaci (Chawla a Madhubala, 2010). Inhibuje leishmaniální enzym hypoxanthin-guanin fosforibosyl transferázu, který je velice zásadní pro parazita, jelikož se podílí na metabolismu purinu a *Leishmania* není schopna syntetizovat puriny (Shih *et al.*, 1998).



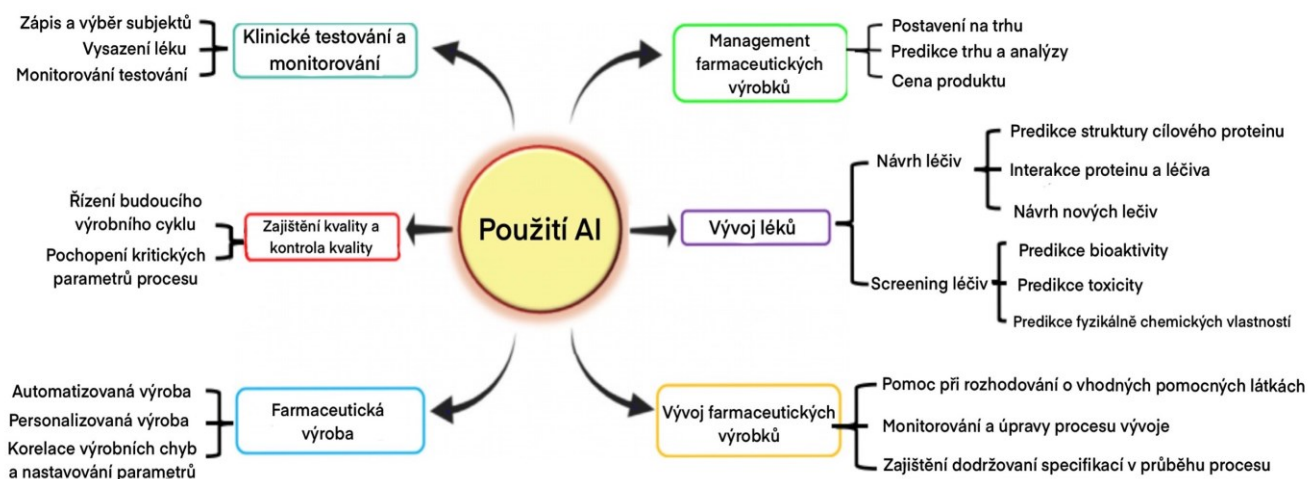
Obr. 13: Chemická struktura sitamaquinu a allopurinolu (převzato a upraveno z (Kumar *et al.*, 2018))

4.4 Vývoj léků a umělá inteligence

Významnou pomocí ve farmaceutickém odvětví by mohla být v budoucnu umělá inteligence (AI). AI může být využita, jak ve vývoji léčiv, tak v následné distribuci (Obr. 14). Předpokladem je, že použití AI výrazně urychlí testování hypotéz, umožní provádět rychleji experimenty, monitorovat procesy, predikovat rezistence atd.

Některé výzkumy již využívají tzv. robotické vědce. Tým Univerzity Cambridge používá vědeckého robota jménem EVE, který v roce 2018 zjistil, že běžně používaná složka zubní pasty triclosan, inhibuje enzym dihydrofolát reduktázu u parazitů způsobující malárii a ovlivňuje tak jejich růst. Enzym je cílem antimalarika pyrimethaminu, na který jsou již vytvořené rezistence. Triclosan byl však oproti pyrimethaminu účinný i na rezistentní kmeny (UCAM, 2018). To, že robot je schopný prozkoumat tisíce sloučenin mnohem efektivněji a levněji značí, že využití AI ve vědě je cesta správným směrem.

V roce 2019 představila biotechnická společnost Atomwise společně s neziskovou výzkumnou organizací DNDi výzkum, kdy se pomocí AI objevují nové sloučeniny, které by mohly představovat novou generaci léčiv proti Chagasově chorobě (DNDi, 2019). Vědci nejprve vybrali tři ověřené, ale komplexní terapeutické proteinové cíle, které inhibují *T. cruzi*. AI následně provedla screening miliónů sloučenin a vybrala kandidáty, kteří by mohli mít potenciální inhibiční funkci. Vybrané sloučeniny jsou podrobené dalšímu testování.



Obr. 14: Použití AI v různých farmaceutických oblastech (převzato a upraveno z (Paul *et al.*, 2021))

Výzkumy zaznamenávají úspěchy, stále jsou však v začátcích a bude ještě dlouhou dobu trvat, než se stanou běžnými praktikami u nemocí ve vyspělých státech, natož NTDs, kde je enormně podfinancován výzkum léčiv i dnes.

5 Závěr

Nemoci způsobené parazitickými kinetoplastidy jsou z hlediska výzkumu a vývoje velmi zanedbávané. Jelikož se často vyskytují v zemích třetího světa, nejsou dostatečně atraktivní pro společnosti, které by projekty financovaly. Nadějně působí výzkumné projekty HAT, které v posledních letech ukázaly pozitivní výsledky (např. u fexinidazolu a acoziborolu) a mohly by zvýšit zájem ohledně vývoje léčiv pro ostatní NTDs. Problémem je také nedostatečná kontrola používání léčiv. Dochází k nadbytečnému používání a tím vznikají rezistence, které budou postupem času stále jen vzrůstat. Kombinací léčiv se sice tato skutečnost oddaluje, nicméně z dlouhodobého hlediska není možné řešit rezistenci pouze kombinacemi. Je nutné vyvinout nová léčiva s komplexním účinkem, která budou v parazitovi cílit na více míst zároveň. Léky, které se v současnosti používají, mají velké množství vážných vedlejších účinků, přičemž např. u melarsoprolu, který se užívá v II. fázi HAT, je po projevu encefalopatie až 50 % úmrtnost. Bohužel ani rezistence, ani mechanismus současných léčiv, není ve většině případů stále zcela objasněn. Objasnění těchto mechanismů by mohlo posunout výzkum a vývoj léčiv výrazně dopředu.

Důležitou metodou při výzkumu léků je vytvoření genomových knihoven. Typ knihovny se vytváří podle potřeby zkoumání, například knihovna nadměrné exprese vybraného proteinu parazita. Tím můžeme zjistit působení léčiv na parazita a jaký protein je zodpovědný za vytvoření rezistence. Knihovny se tedy obecně využívají ke zkoumání působení léčiv v parazitovi, screeningu, mapování genomu a následné identifikaci cíle. Další významnou metodou je sekvenování připravených rezistentních kmenů.

Díky těmto metodám, může dojít k porozumění mechanismu terapií určitého léčiva, což může pomoci při vývoji vylepšených terapií a také při predikci rezistencí.

V oblastech farmaceutického odvětví je do budoucna důležité zapojení AI, která by mohla umožnit urychlení objevování léků, zmenšit chybovost kontrol, automaticky monitorovat klinické testy, propojovat data, řešit otázky atd. Prozatím není bohužel využití AI ve vývoji léčiv běžné a výzkumy jsou stále v začátcích. Není však pochyb o tom, že aplikace AI by mohlo posunout vývoj léků o krok dál.

6 Literatura

(* značené sekundární citace)

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., and Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *10*, e0004349.

Alemayehu, B., and Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A review on parasite, vector and reservoir host. *Health Sci. J.* *11*,1-6.

*Almeida, E.A. de, Ramos Júnior, A.N., Correia, D., and Shikanai-Yasuda, M.A. (2011). Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980–2010). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *44*, 762–770.

Alsford, S., Eckert, S., Baker, N., Glover, L., Sanchez-Flores, A., Leung, K.F., Turner, D.J., Field, M.C., Berriman, M., and Horn, D. (2012). High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature* *482*, 232–236.

Alsford, S., Field, M.C., and Horn, D. (2013). Receptor-mediated endocytosis for drug delivery in African trypanosomes: fulfilling Paul Ehrlich's vision of chemotherapy. *Trends Parasitol.* *29*, 207–212.

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den, and the WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* *7*, e35671.

De Andrade, H.M., Reis, A.B., dos Santos, S.L., Volpini, Â.C., Marques, M.J., and Romanha, A.J. (2006). Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet. Parasitol.* *140*, 231–238.

Aronson, J.K. (2016). Eflornithine. In *Meyler's side effects of drugs*, Elsevier Science, *16*, 32–34.

Ashwin, H., Sadlova, J., Vojtkova, B., Becvar, T., Lypaczewski, P., Schwartz, E., Greensted, E., Van Bocxlaer, K., Pasin, M., Lipinski, K.S., et al. (2021). Characterization of a new *Leishmania major* strain for use in a controlled human infection model. *Nat. Commun.* *12*, 215.

Bacchi, C.J., Garofalo, J., Mockenhaupt, D., McCann, P.P., Diekema, K.A., Pegg, A.E., Nathan, H.C., Mullaney, E.A., Chunosoff, L., Sjoerdsma, A., et al. (1983). *In vivo* effects of α -dl-Difluoromethylornithine on the metabolism and morphology of *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *7*, 209–225.

Baker, N., Glover, L., Munday, J.C., Aguinaga Andrés, D., Barrett, M.P., de Koning, H.P., and Horn, D. (2012). Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 10996–11001.

Basselin, M., Lawrence, F., and Robert-Gero, M. (1996). Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.* *315*, 631–634.

Bastin, P., Pullen, T.J., Moreira-Leite, F.F., and Gull, K. (2000). Inside and outside of the

trypanosome flagellum. *Microbes Infect.* 2, 1865–1874.

*Baron, S. (1996). *Medical microbiology*. University of Texas medical branch at Galveston. 4, 82.

Benaim, G., Sanders, J.M., Garcia-Marchán, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A.R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J.M., Leon-Rossell, A., *et al.* (2006). Amiodarone Has Intrinsic Anti *Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* 49, 892–899.

Benaim, G., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-Gonzalez, S., Plaza-Rojas, L., Silva, M.L., Parra-Gimenez, N., Garcia-Marchan, Y., Paniz-Mondolfi, A., and Uzcanga, G. (2012). *In Vitro* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3720–3725.

Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A.E., Sordillo, E.M., and Martinez-Sotillo, N. (2020). Disruption of intracellular calcium homeostasis as a therapeutic target against *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 46.

Berger, B. (1995). Characterisation of pentamidine-resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69, 289–298.

Bisser, S., N’Siesi, F., Lejon, V., Preux, P., Van Nieuwenhove, S., Miaka Mia Bilenge, C., and Büscher, P. (2007). Equivalence trial of melarsoprol and nifurtimox monotherapy and combination therapy for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *J. Infect. Dis.* 195, 322–329.

Brun, R., Don, R., Jacobs, R.T., Wang, M.Z., and Barrett, M.P. (2011). Development of novel drugs for human african trypanosomiasis. *Future Microbiol.* 6, 677–691.

Campetella, O., Martínez, J., and Cazzulo, J.J. (1990). A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 50, 45–149.

Capela, Moreira, R., and Lopes (2019). An overview of drug resistance in protozoal diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5748.

Cárdenas, G.A.P., Travezaño, J.E.R., and Chávez, M.S.C. (2020). Man with severe mucocutaneous leishmaniasis. *Vis. J. Emerg. Med.* 20, 100784.

Carvalho, L., Luque-Ortega, J.R., López-Martín, C., Castanys, S., Rivas, L., and Gamarro, F. (2011). The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4204–4210.

Cavalcanti, D.P., and de Souza, W. (2018). The kinetoplast of Trypanosomatids: from early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. *Scanning* 2018, 1–10.

*Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol rev.* 57, 42.

Cerny, N., Bivona, A.E., Sanchez Alberti, A., Trinitario, S.N., Morales, C., Cardoso Landaburu, A., Cazorla, S.I., and Malchiodi, E.L. (2020). Cruzipain and its physiological inhibitor,

chagasin, as a DNA-based therapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *Front. Immunol.* *11*, 565142.

Chawla, B., and Madhubala, R. (2010). Drug targets in *Leishmania*. *J. Parasit. Dis.* *34*, 1–13.

Checchi, F., Filipe, J.A., Haydon, D.T., Chandramohan, D., and Chappuis, F. (2008). Estimates of the duration of the early and late stage of *gambiense* sleeping sickness. *BMC Infect. Dis.* *8*, 16.

Choy, J.W., Bryant, C., Calvet, C.M., Doyle, P.S., Gunatilleke, S.S., Leung, S.S.F., Ang, K.K.H., Chen, S., Gut, J., Osés-Prieto, J.A., *et al.* (2013). Chemical–biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target. *Beilstein J. Org. Chem.* *9*, 15–25.

Coelho, A.C., Messier, N., Ouellette, M., and Cotrim, P.C. (2007). Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* Amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 3030–3032.

Crespillo-Andújar, C., Chamorro-Tojeiro, S., Norman, F., Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., and Pérez-Molina, J.A. (2018). Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clin. Microbiol. Infect.* *24*, 1344.e1-1344.e4.

Datta, A., Podder, I., Das, A., Sil, A., and Das, N.K. (2021). Therapeutic modalities in post kala-azar dermal leishmaniasis: a systematic review of the effectiveness and safety of the treatment options. *Indian J. Dermatol.* *66*, 34–43.

Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M.L., Trochine, A., González-Herrera, F., Castillo, C., Liempi, A., Kemmerling, U., Maya, J.D., and Robello, C. (2018). Old yellow enzyme from *Trypanosoma cruzi* exhibits *in vivo* prostaglandin F2 α synthase activity and has a key role in parasite infection and drug susceptibility. *Front. Immunol.* *9*, 456.

Diro, E., Ritmeijer, K., Boelaert, M., Alves, F., Mohammed, R., Abongomera, C., Ravinetto, R., De Crop, M., Fikre, H., Adera, C., *et al.* (2015). Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *9*, e0004087.

DNDi (2009). K777 (Chagas) | DNDi. Získáno 21.4.2021 z [dndi.org](https://dndi.org/research-development/portfolio/k777/) <<https://dndi.org/research-development/portfolio/k777/>>

DNDi (2015). R&D status November 2015: DNDi Sleeping Sickness programme | DNDi. Získáno 21.4.2021 z [dndi.org](https://dndi.org/news/2015/hat-rndstatus-19112015/) <<https://dndi.org/news/2015/hat-rndstatus-19112015/>>

DNDi (2019). DNDi and Atomwise collaborate to advance drug development using AI for neglected diseases | DNDi. Získáno 21.4.2021 z [dndi.org](https://dndi.org/press-releases/2019/dndi-and-atomwise-collaborate-to-advance-drug-development-using-ai-for-neglected-diseases/) <<https://dndi.org/press-releases/2019/dndi-and-atomwise-collaborate-to-advance-drug-development-using-ai-for-neglected-diseases/>>

Dressel, J. (Ralph E.O. (1961). The discovery of germanin by Oskar Dressel and Richard Kothe. *J. Chem. Educ.* *38*, 620.

Dummer, R., Krasovec, M., Röger, J., Sindermann, H., and Burg, G. (1993). Topical

administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1993, 29, 963–970.

Esch, K.J., and Petersen, C.A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 58–85.

Fairlamb, A.H., Henderson, G.B., and Cerami, A. (1989). Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2607–2611.

Faria, A.R., Nunes, J.B., Leite, A.L.L., Ramos, A.B. da S.B., Siqueira, R.V., Nogueira, E.S.C., Marques, M.J., and Colombo, F.A. (2021). Risk of *Trypanosoma cruzi* transmission in southern Minas Gerais, Brazil – Data from 2014 to 2020. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 23, 100530.

FDA (2006). Drug Approval Package: Noxafil (Posaconazole) NDA #022003. Získáno 21.4.2021 z [accessdata.fda.gov<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/022003s000_NoxafilTOC.cfm>](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/022003s000_NoxafilTOC.cfm)

FDA (2017). FDA approves first U.S. treatment for Chagas disease (FDA). Získáno 21.4.2021 z [fda.gov.org<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-us-treatment-chagas-disease>](https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-us-treatment-chagas-disease)

FDA (2021). New Drug Therapy Approvals 2020. FDA. Získáno 21.4.2021 z [fda.gov<https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/new-drug-therapy-approvals-2020>](https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/new-drug-therapy-approvals-2020)

Filardi, L.S., and Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 755–759.

García-Huertas, P., Mejía-Jaramillo, A.M., Machado, C.R., Guimarães, A.C., and Triana-Chávez, O. (2017). Prostaglandin F2 α synthase in *Trypanosoma cruzi* plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. *R. Soc. Open Sci.* 4, 170773.

Garcia-Salcedo, J.A., Unciti-Broceta, J.D., Valverde-Pozo, J., and Soriano, M. (2016). New approaches to overcome transport related drug resistance in trypanosomatid parasites. *Front. Pharmacol.* 7, 351.

*Goto, H., and Lindoso, J.A.L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8, 419–433.

Graf, F.E., and Mäser, P. (2017). Drug resistance in *Trypanosoma brucei*. In antimicrobial drug resistance: Mechanisms of drug resistance, D.L. Mayers, J.D. Sobel, M. Ouellette, K.S. Kaye, and D. Marchaim, Springer International Publishing, 1, 667–676.

Gruby, D. (1843). Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'haematozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* 17, 1134-1136.

Gull, K. (2001). The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int. J. Parasitol.* 31, 443–452.

Haldar, A.K., Sen, P., and Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of Leishmaniasis:

current status and future directions. *Mol. Biol. Int.* 2011, 1–23.

Hall, B.S., Bot, C., and Wilkinson, S.R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J. Biol. Chem.* 286, 13088–13095.

Harrill, A.H., DeSmet, K.D., Wolf, K.K., Bridges, A.S., Eaddy, J.S., Kurtz, C.L., Hall, J.Ed., Paine, M.F., Tidwell, R.R., and Watkins, P.B. (2012). A mouse diversity panel approach reveals the potential for clinical kidney injury due to DB289 not predicted by classical rodent models. *Toxicol. Sci.* 130, 416–426.

Herrera, H.M., Rocha, F.L., Lisboa, C.V., Rademaker, V., Mourão, G.M., and Jansen, A.M. (2011). Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 380–387.

Hoare, C.A. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific. 18, 750.

Ilari, A., Genovese, I., Fiorillo, F., Battista, T., De Ionna, I., Fiorillo, A., and Colotti, G. (2018). Toward a drug against all kinetoplastids: From leishbox to specific and potent trypanothione reductase inhibitors. *Mol. Pharm.* 15, 3069–3078.

Iten, M., Mett, H., Evans, A., Enyaru, J.C.K., Brun, R., and Kaminsky, R. (1997). Alterations in ornithine decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei rhodesiense* to D,L-Difluoromethylornithine. 41, 4.

Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M.P., and Madhubala, R. (2009). Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 164, 111–117.

John Walker and Nancy G. Saravia (2004). Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *J. Parasitol.* 90, 1155–1162.

Rassi, A.R., A., and Little, W.C. (2000). Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* 23, 883–889.

Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., and Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit. Vectors* 10, 287.

Kennedy, P.G.E. (2004). Human african trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J. Clin. Invest.* 113, 496–504.

Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.

Kubata, B.K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C.J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., Lazarus, M., Maruyama, T., Martin, S.K., Duszenko, M., *et al.* (2002). A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 196, 1241–1252.

Kumar, A., Pandey, S.C., and Samant, M. (2018). Slow pace of antileishmanial drug development. *Parasitol. Open* 4, e4.

Kumar Saha, A., Mukherjee, T., and Bhaduri, A. (1986). Mechanism of action of amphotericin

B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19, 195–200.

Kwon, D.S., and Mylonakis, E. (2007). Posaconazole: a new broad-spectrum antifungal agent. *Expert Opin. Pharmacother.* 8, 1167–1178.

Lacerda, A.F.A., Oliveria, D.S., Salomão, J.V.F., Oliveira, L.G.R., Monte-Alegre, A., Santos, J.Y.G. dos, Souza, C.C. de, Magalhães-Junior, J.T., and Araújo-Santos, e T. (2021). Clinical, epidemiological and transmission cycle aspects of leishmaniasis urbanization in Barreiras, Bahia, Brazil. *Spat. Spatio-Temporal Epidemiol.* 36, 100395.

Lane, R.P., and Crosskey, R.W. (1993). Sandflies (Phlebotominae) Medical Insects and Arachnids. Springer, Dordrecht. 1, 78–119.

*Langousis, G., and Hill, K.L. (2014). Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 505–518.

Laranja, F.S., Dias, E., Nobrega, G., and Miranda, A. (1956). Chagas' Disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 14, 1035–1060.

Lejon, V., Ngoyi, D.M., Boelaert, M., and Büscher, P. (2010). A CATT negative result after treatment for human african trypanosomiasis is no indication for cure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e590.

Li, F., Hua, S. -b., Wang, C.C., and Gottesdiener, K.M. (1998). *Trypanosoma brucei brucei*: Characterization of an ODC null bloodstream form mutant and the action of alpha-difluoromethylornithine. *Exp. Parasitol.* 88, 255–257.

Lindner, A.K., Lejon, V., Chappuis, F., Seixas, J., Kazumba, L., Barrett, M.P., Mwamba, E., Erphas, O., Akl, E.A., Villanueva, G., *et al.* (2020). New WHO guidelines for treatment of *gambiense* human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. *Lancet Infect. Dis.* 20, e38–e46.

Machado, G.U., Prates, F.V., and Machado, P.R.L. (2019). Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. *An. Bras. Dermatol.* 94, 9–16.

Maia, C., and Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite* 23, 55.

Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C.L., Beck, H.-P., and Felger, I. (2003). Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3147–3153.

Matovu, E., Stewart, M.L., Geiser, F., Brun, R., Mäser, P., Wallace, L.J.M., Burchmore, R.J., Enyaru, J.C.K., Barrett, M.P., Kaminsky, R., *et al.* (2003). Mechanisms of arsenical and diamidine uptake and resistance in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* 2, 1003–1008.

McNicoll, F., Drummelsmith, J., Müller, M., Madore, É., Boilard, N., Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (2006). A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 6, 3567–3581.

Mejia, A.M., Hall, B.S., Taylor, M.C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S.R., Triana-Chávez,

O., and Kelly, J.M. (2012). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J. Infect. Dis.* 206, 220–228.

Menezes, J., Vaz, L., de Abreu Vieira, P., da Silva Fonseca, K., Carneiro, C., and Taylor, J. (2014). Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of diaryldiazepines. *Molecules* 20, 43–51.

Molina, I., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Treviño, B., Serre, N., Sao Avilés, A., and Almirante, B. (2015). Toxic profile of benznidazole in patients with chronic Chagas disease: risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6125–6131.

Montalvetti, A., Bailey, B.N., Martin, M.B., Severin, G.W., Oldfield, E., and Docampo, R. (2001). Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 276, 33930–33937.

Moore, E., O’Flaherty, D., Heuvelmans, H., Seaman, J., Veeken, H., de Wit, S., and Davidson, R.N. (2001). Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull. World Health Organ.* 79, 388–393.

Morillo, C.A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., Mallagray, M., Apt, W., Beloscar, J., Gascon, J., *et al.* (2017). Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. Cruzi* carriers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 939–947.

Munday, J.C., Eze, A.A., Baker, N., Glover, L., Clucas, C., Aguinaga Andres, D., Natto, M.J., Teka, I.A., McDonald, J., Lee, R.S., *et al.* (2014). *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 651–663.

Muñoz, G., Vergara, C., Martínez, G., Apt, W., and Zulantay, I. (2019). Quantification of immunoglobulin G against *Trypanosoma cruzi* in individuals with chronic Chagas disease treated with nifurtimox and evaluated in prolonged follow-up. *Korean J. Parasitol.* 57, 39–41.

Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., *et al.* (2012). Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1674.

Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M., Souza, C.S., Fernandes, O., and Pizmes, C. (1998). Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *International journal of dermatology*, 37, 846–849.

Oliver, L., Elizondo, E., Acarregui, A., Esquisabel, A., Viñas, M., Pedraz, J.L., Veciana, J., Vinuesa, T., Ventosa, N., and Herráez, R. (2017). Benznidazole Nanoformulates: A chance to improve therapeutics for Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 1469–1476.

WHO (1995). WHO model prescribing information : drugs used in parasitic diseases (World Health Organization). 2, 83-85.

Paul, D., Sanap, G., Shenoy, S., Kalyane, D., Kalia, K., and Tekade, R.K. (2021). Artificial intelligence in drug discovery and development. *Drug Discov. Today* 26, 80–93.

- Pérez-Victoria, F.J., Sánchez-Cañete, M.P., Castanys, S., and Gamarro, F. (2006). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* Parasites. *J. Biol. Chem.* *281*, 23766–23775.
- Perry, M.R., Prajapati, V.K., Menten, J., Raab, A., Feldmann, J., Chakraborti, D., Sundar, S., Fairlamb, A.H., Boelaert, M., and Picado, A. (2015). Arsenic exposure and outcomes of antimonial treatment in visceral leishmaniasis patients in Bihar, India: a retrospective cohort Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *9*, e0003518.
- Pinto-Martinez, A.K., Rodriguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernandez-Rodriguez, V., and Benaim, G. (2017). Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺ channel. *Antimicrob. Agents Chemother.* *62*, e01614-17.
- Priotto, G., Fogg, C., Balasegaram, M., Erphas, O., Louga, A., Checchi, F., Ghabri, S., and Piola, P. (2006). Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda. *PLoS Clin. Trials* *1*, e39.
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A.H., Das, S., Kumar, S., Pandey, K., Ravidas, V., Kumar, M., De, T., *et al.* (2012). Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 1031–1041.
- Rassi, A.J. (2010). Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010; *375*, 1388-1402.
- Romanha, A.J., Alves, R.O., Murta, S.M.F., Silva, J.S., Ropert, C., and Gazzinelli, R.T. (2002). Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon- γ in mediating parasitologic cure. *J. Infect. Dis.* *186*, 823–828.
- Romero, A.H., and López, S.E. (2017). In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalaziny-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. *J. Mol. Graph. Model.* *76*, 313–329.
- Sales Junior, P.A., Molina, I., Fonseca Murta, S.M., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., and Carneiro, C.M. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *97*, 1289–1303.
- Sangshetti, J.N., Kalam Khan, F.A., Kulkarni, A.A., Arote, R., and Patil, R.H. (2015). Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. *RSC Adv.* *5*, 32376–32415.
- *Schuster, F.L., and Sullivan, J.J. (2002). Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. *Clin. Microbiol. Rev.* *15*, 374–389.
- Sereno, D., Holzmüller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaiissi, A., and Lemesre, J.-L. (2001). Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 2064–2069.
- Shih, S., Hwang, H.-Y., Carter, D., Stenberg, P., and Ullman, B. (1998). Localization and targeting of the *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase to the glycosome. *J. Biol. Chem.* *273*, 1534–1541.

- Simarro, P., Franco, J., Diarra, A., and Jannin, J. (2014). Epidemiology of human african trypanosomiasis. *Clin. Epidemiol.* 257.
- Srivastava, P., Gidwani, K., Picado, A., Van der Auwera, G., Tiwary, P., Ostyn, B., Dujardin, J.-C., Boelaert, M., and Sundar, S. (2013). Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India. *Trop. Med. Int. Health* 18, 548–554.
- Sundar, S., and Chakravarty, J. (2008). Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17, 787–794.
- Sundar, S., and Chakravarty, J. (2015). An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 237–252.
- Sundar, S., and Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 9, 951–958.
- Thakur, C.P., Sinha, G.P., Pandey, A.K., Barat, D., and Sinha, P.K. (1993). Amphotericin B in resistant kala-azar in Bihar. *The National medical journal of India.* 6, 57–60.
- Tiphine, M., Letscher-Bru, V., and Herbrecht, R. (1999). Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability: Lipid formulations of amphotericin B. *Transpl. Infect. Dis.* 1, 273–283.
- Truc, P., Lejon, V., Magnus, E., Jamonneau, V., Nangouma, A., Verloo, D., and Penchenier, L. (2002). Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei gambiense*, and LATEX/*T. b. gambiense* methods for serodiagnosis and surveillance of human african trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bull. World Health Organ.* 80, 882-6
- UCAM (2018). AI “scientist” finds that toothpaste ingredient may help fight drug-resistant malaria. Ziskáno 30.4.2021 z cam.ac.uk< <https://www.cam.ac.uk/research/news/ai-scientist-finds-that-toothpaste-ingredient-may-help-fight-drug-resistant-malaria>>
- Urbina, J.A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 311–318.
- Verweij, J., Planting, A., van der Burg, M., and Stoter, G. (1992). A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118, 606–608.
- *Vianna Martins, A., Patrícia Gomes, A., de Mendonça, E.G., Rangel Fietto, J.L., Alberto Santana, L., de Almeida Oliveira, M.G., Geller, M., Freitas Santos, R. de, Roger Vitorino, R., and Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio* 16, 45–58.
- Vincent, I.M., Creek, D., Watson, D.G., Kamleh, M.A., Woods, D.J., Wong, P.E., Burchmore, R.J.S., and Barrett, M.P. (2010). A molecular mechanism for eflornithine resistance in african trypanosomes. *PLoS Pathog.* 6, e1001204.
- Wall, R.J., Rico, E., Lukac, I., Zuccotto, F., Elg, S., Gilbert, I.H., Freund, Y., Alley, M.R.K., Field, M.C., Wyllie, S., *et al.* (2018). Clinical and veterinary trypanocidal benzoxaboroles target CPSF3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 9616–9621.

WHO (2020a). Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). Získáno 29.4.2021 z who.int <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))>

WHO (2020b). Leishmaniasis. Získáno 29.4.2021 z who.int <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>

WHO (2021). WHO | What is Chagas disease? (World Health Organization). Získáno 29.4.2021 z who.int <<http://www.who.int/chagas/disease/en/>>

Wilkinson, S.R., Taylor, M.C., Horn, D., Kelly, J.M., and Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 5022–5027.

Willson, M., Callens, M., Kuntz, D.A., Perié, J., and Opperdoes, F.R. (1993). Synthesis and activity of inhibitors highly specific for the glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *59*, 201–210.

Yun, O., Priotto, G., Tong, J., Flevaud, L., and Chappuis, F. (2010). NECT is next: implementing the new drug combination therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *4*, e720.