

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0123**

Medicínsky významné amfizoické améby a nové stratégie ich eliminácie

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Martin Mrva, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Katedra zoológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Katedra farmakognózie a botaniky, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

-

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

-

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Zahraničné karentované publikácie (ADC):

Bittner Fialová S., Kello M., Čoma M., Slobodníková L., Drobná E., Holková I., Garajová M., Mrva M., Zachar V., Lukáč M. Derivatization of Rosmarinic Acid Enhances its in vitro Antitumor, Antimicrobial and Antiprotozoal Properties. *Molecules* 24:1078 (2019)
doi:10.3390/molecules24061078

<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/6/1078>

Bittner Fialová S., Kurin E., Trajčiková E., Jánošová L., Šušaničková I., Tekeľová D., Nagy M., Mučaji P. Mentha rhizomes as an alternative source of natural antioxidants. *Molecules* 25: 200 (2020). doi:10.3390/molecules25010200

<https://doi.org/10.3390/molecules25010200>

Borovičková T., Mrva M., Garajová M. Thecamoeba quadrilineata (Amoebozoa, Lobosa) as a new member of amphizoic amoebae — first isolation from endozoic conditions. *Parasitology Research* 118:1019-1023 (2019). doi.org/10.1007/s00436-019-06207-y

<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06207-y>

Dušeková A., Garajová M., Lukáč M., Mrva M. Derivatisation of metronidazole enhances cytotoxic effect against Acanthamoeba genotype T4 isolates and leads to cytomorphological changes in trophozoites. *Acta Tropica* 216: 105830 (2021).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105830>

Garajová M., Mrva M., Vaškovicová N., Martinka M., Melicherová J., Valigurová A. Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for Acanthamoeba cyst wall architecture. *Scientific Reports* 9:4466 (2019).

doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>

Lukáč M., Pisárčik M., Garajová M., Mrva M., Dušeková A., Vrták A., Horáková R., Horváth B., Devínsky F. Synthesis, surface activity and biological activities of phosphonium and metronidazole salts. *Journal of Surfactants and Detergents* 23: 1025-1032 (2020).

doi:10.1002/jsde.12439

<https://doi.org/10.1002/jsde.12439>

Mrva M., Garajová M. The efficiency of cultivation media in recovering naked lobose amoebae from freshwater environments. *Zoological Studies* 57: 9 (2018).

doi:10.6620/ZS.2018.57-09.

<http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/57/57-09.pdf>

Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., Mučaji, P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules* 21:1717 (2016). doi:10.3390/molecules21121717

Smirnov A., Nasonova E., Geisen S., Bonkowski M., Kudryavtsev A., Berney C., Glotova A., Bondarenko N., Dyková I., Mrva M., Fahrni J., Pawlowski J. Phylogeny and Systematics of Leptomyxid Amoebae (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida). *Protist* 168: 220–252 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.10.006>

Timko L., Pisárčik M., Mrva M., Garajová M., Juhásová A., Mojžiš J., Mojžišová G., Bukovský M., Devínsky F., Lukáč M. Synthesis, physicochemical properties and biological activities of novel alkylphosphocholines with foscarnet moiety. *Bioorganic Chemistry* 104: 104224 (2020). doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104224

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104224>

Trajčiková E., Kurin E., Slobodníková L., Straka M., Lichvariková A., Dokupilová S., Čičová I., Nagy M., Mučaji P., Bittner Fialová S. Antimicrobial and antioxidant properties of four *Lycopus* taxa and an interaction study of their major compounds. *Molecules* 25: 1422 (2020). doi:10.3390/molecules25061422

<https://doi.org/10.3390/molecules25061422>

Vysokoškolské učebnice vydané v SR (ACB):

Ondriska, F., Boldiš, V., Garajová, M., Mrva, M. *Klinická parazitológia*. PRIF UK Bratislava. 2016. ISBN 978-80-223-4217-9

Uplatnenie výsledkov projektu

Komplexný interdisciplinárny výskum v rámci projektu priniesol významné výsledky s uplatnením a presahom vo viacerých oblastiach výskumu a praxe. Detailným preštudovaním cytomorfológie a ultraštruktúry rôznych kmeňov patogénnych a potenciálne patogénnych amfizoických meňaviek a ich molekulárnou identifikáciou boli zistené významné informácie dôležité najmä pre presnú identifikáciu izolátov využiteľnú v klinickej praxi. V prípade klinických izolátov bola po ich identifikácii nastavená adekvátne terapia vedúca k zlepšeniu stavu ochorenia u všetkých infikovaných pacientov. Boli tiež získané originálne dáta o rozšírení a diverzite potenciálne patogénnych environmentálnych kmeňov amfizoických améb z vybraných biotopov a vnútorných orgánov vybraných bezstavovcov, dôležité z epidemiologického hľadiska.

Špecifická a štandardizovaná terapia závažných protozoárných ochorení spôsobovaných amfizoickými amébami – primárnej amébovej meningoencefalitídy, granulomatóznej amébovej encefalitídy, diseminovaných a kutánných infekcií, amébových keratitíd nebola doposiaľ vyvinutá. V rámci riešenia projektu získané údaje z testovania cytotoxického účinku potenciálne amebicídnych zlúčenín, rastlinných extraktov, fytochemikálií a ich derivátov na klinických izolátoch amfizoických meňaviek rodu *Acanthamoeba* smerujú k praktickému využitiu a aplikácii vo vývoji nových terapeutík proti akantamébovým infekciám (granulomatózna amébová encefalitída, diseminované a kutánne infekcie, akantamébová keratitída). V niektorých prípadoch bola zistená aj vysoká antineoplastická a antimikrobiálna aktivita, čo otvára možnosti vývoja nových terapeutík v ďalších oblastiach medicínskej praxe.

Definovanie mechanizmu cytotoxického účinku identifikovaním cytomorfologických zmien po aplikácii zlúčenín je výrazným prínosom k objasneniu mechanizmov ich účinku a prispieva k nasmerovaniu vývoja nových liečiv. Zistené rozdiely v citlivosti použitých izolátov na aplikované zlúčeniny upozorňujú na dôležitosť nastavenia adekvátnej terapie v klinickej praxi, ktorú bude potrebné špecifikovať podľa jednotlivých prípadov. V tomto zmysle je významná aj zrealizovaná molekulárna identifikácia genotypov izolovaných kmeňov.

Originálne nové zistenia o architektúre steny cýst akantaméb prispievajú k vývoju stratégií proti akantamébovým infekciám so zameraním na inhibíciu syntézy celulózy. Získané údaje majú praktické využitie v humánnej medicíne, najmä v nasmerovaní vývoja nových liečiv za účelom terapie ochorení spôsobovaných amfizoickými meňavkami ako aj v preventívnych opatreniach na zabránenie vzniku a šírenia ochorení spôsobovaných týmito patogénmi. Uplatňuje sa tak prepojenie vedecko-výskumnej experimentálnej činnosti a praktického využitia získaných poznatkov najmä v oblastiach epidemiológie, diagnostiky amébových infekcií v klinickej praxi, terapeutických postupov infekcií amfizoickými meňavkami a preventívnych opatreniach na zabránenie vzniku ochorení. Niektoré zo získaných výsledkov sú aplikované aj v pedagogickom procese o čom svedčí publikovanie vysokoškolskej učebnice klinickej parazitológie.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Stanovené ciele projektu boli splnené. Boli získané originálne a komplexné výsledky v oblasti výskumu potenciálnych amebicídnych zlúčenín s perspektívou využitia ako liečiv akantamébových infekcií, vrátane výsledkov metaanalýz súčasných poznatkov o terapeutikách a biologicky aktívnych rastlinných zložkách. Boli pripravené a vyselektované extrakty z vybraných orgánov viacerých druhov rastlín (*Cotinus coggygia*, *Mentha piperita*, *Mentha longifolia*, *Mentha villosa*, *Origanum vulgare*, *Artemisia glabella*, *Lycopus exaltatus*, *Lycopus europaeus*, *Tanacetum* spp., *Lycium* sp., *Calendula* sp.), vrátane identifikácie a kvantifikácie bioaktívnych zlúčenín v extraktoch a definovania ich antineoplastického a antimikrobiálneho účinku. Pripravené boli 2 deriváty kyseliny rozmarínovej, ktorá je významnou zložkou týchto extraktov. Bol definovaný cytotoxický efekt a dynamika amebicídneho účinku sérií vybraných potenciálne amebicídnych zlúčenín (zwitteriónových a kationových tenzidov, rastlinných extraktov, derivátov fytochemikálií) na klinických izolátoch rodu *Acanthamoeba*. Všetky z celkovo otestovaných 43 zlúčenín (29 alkylfosfocholínov, 3 stilbazóliové soli, 2 fytochemikálie a ich 6 derivátov – fosfóniových solí, metronidazol a ďalšie 3 fosfóniové soli) a 7 rastlinných extraktov prejavili inhibičný účinok na množenie patogénnych izolátov akantaméb. Vysoká amebicídna, ale aj antibakteriálna, antimykotická a antineoplastická aktivita niektorých zlúčenín nasvedčuje ich terapeutickému potenciálu a budúcemu možnému využitiu v klinickej praxi. Zaznamenané cytomorfologické zmeny buniek akantaméb po aplikácii zlúčenín sú prínosom k objasneniu mechanizmu účinku testovaných zlúčenín. Zistené rozdiely v citlivosti izolátov akantaméb na amebicídne zlúčeniny upozornili na potrebu zvýšenej pozornosti pri nastavení adekvátnej terapie v klinickej praxi.

Boli zistené nové významné údaje o cytomorfológii akantaméb, najmä o architektúre a formovaní vysoko rezistentnej steny cýst, platné pre celý rod *Acanthamoeba*, vrátane prvých údajov o aktivite mikrotubulárnych sietí u nezrelých cýst a aktivite filamentózneho aktínu v neskorých fázach encystácie. Encystácia akantaméb bola v takomto rozsahu preskúmaná po prvýkrát. Bola formulovaná hypotéza, že klastre intramembránových partikul na cytoplazmatickej membráne predstavujú komplexy, formujúce celulózové mikrofibrily. Boli získané nové údaje o morfológii a ultraštruktúre nedostatočne definovaných genotypov patogénnych a potenciálne patogénnych amfizoických meňaviek z environmentálneho aj klinického materiálu, vrátane molekulárnej identifikácie 9 nových klinických izolátov z územia Slovenska. Identifikácia, nové opisy a riešenie taxonomických otázok sú prínosom pre vedecký výskum ako aj klinickú prax. Získané údaje o diverzite a rozšírení potenciálne patogénnych kmeňov (*Thecamoeba quadrilineata*, *Vermamoeba vermiformis*, *Acanthamoeba* spp., *Sappinia* sp. a ďalších) sú významné z epidemiologického hľadiska. Nové údaje o vhodných kultivačných médiách sú využiteľné v praxi na izoláciu kmeňov z rôznych biotopov. V priebehu riešenia projektu bolo realizovaných 13 diplomových prác (6 úspešne ukončených obhajobou) a 6 dizertačných doktorandských prác (2 úspešne ukončené obhajobou), podľa plánu bolo vytvorené postdoktorandské miesto pre jednu z doktorandiek po úspešnom ukončení štúdia.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The set goals of the project were met. Original and comprehensive results have been obtained in the research field on potential amoebicidal compounds with a perspective on

their use as drugs for infections caused by *acanthamoebae*, including the results of meta-analyses of current knowledge about therapeutics and biologically active plant components. Extracts from selected organs of several plant species (*Cotinus coggygria*, *Mentha piperita*, *Mentha longifolia*, *Mentha villosa*, *Origanum vulgare*, *Artemisia glabella*, *Lycopus exaltatus*, *Lycopus europaeus*, *Tanacetum* spp., *Lycium* sp., *Calendula* sp.) were prepared and selected, including the identification and quantification of bioactive compounds in the extracts, and definition of their antineoplastic and antimicrobial effect. Two derivatives of rosmarinic acid, which is an important component of these extracts, were prepared. The cytotoxic effect and dynamics of the amoebicidal effect of series of selected potentially amoebicidal compounds (zwitterionic and cationic surfactants, plant extracts, phytochemical derivatives) on clinical isolates of the genus *Acanthamoeba* were defined. All of the total 43 compounds tested (29 alkylphosphocholines, 3 stilbazolium salts, 2 phytochemicals and their 6 derivatives - phosphonium salts, metronidazole and other 3 phosphonium salts) and 7 plant extracts showed an inhibitory effect on the multiplication of pathogenic *Acanthamoeba* isolates. The high amoebicidal as well as antibacterial, antimycotic and antineoplastic activity of some compounds indicates their therapeutic potential and future possible use in clinical practice. Recorded cytomorphological changes of cells of *acanthamoebae* after application of the compounds are helpful in elucidating the mechanism of action of the tested compounds. The observed differences in the susceptibility of *Acanthamoeba* isolates to amoebicidal compounds highlighted the need for caution in setting up adequate therapy in clinical practice.

Significant new data valid for the whole genus *Acanthamoeba* have been detected on the cytomorphology of *acanthamoebae*, in particular on the architecture and formation of the highly resistant cyst wall, including the first data on microtubular network activity in immature cysts and filamentous actin activity in late encystment stages. The encystment of *acanthamoebae* was examined to this extent for the first time. The hypothesis that clusters of intramembranous particles on the cytoplasmic membrane represent complexes forming cellulose microfibrils has been formulated.

New data were obtained on the morphology and ultrastructure of insufficiently defined genotypes of pathogenic and potentially pathogenic amphizoic amoebae from environmental and clinical material, including molecular identification of 9 new clinical isolates from Slovakia. Identification, new descriptions and solutions of taxonomic issues are beneficial for scientific research as well as clinical practice. The data obtained on the diversity and distribution of potentially pathogenic strains (*Thecamoeba quadrilineata*, *Vermamoeba vermiformis*, *Acanthamoeba* spp., *Sappinia* sp. and other species), are important from an epidemiological point of view. New obtained data on suitable culture media can be used in practical isolation of strains from various habitats. During the project, 13 diploma theses (6 successfully completed) and 6 doctoral dissertations (2 successfully completed) were realized. According to the project plan a postdoctoral position was created for one of the doctoral students after successful completion of her studies.