



## Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

**APVV-19-0056**

**Parazitologicky významné amfizoické meňavky 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

Publikácie v zahraničných karentovaných časopisoch:

Bittner Fialová S., Rendeková K., Mučaji P., Nagy M., Slobodníková L. Antibacterial activity of medicinal plants and their constituents in the context of skin and wound infections, considering European legislation and folk medicine—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 10746 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms221910746>

Corsaro D., Mrva M., Colson P., Walochnik J. Validation and redescription of *Acanthamoeba terricola* Pussard, 1964 (Amoebozoa: Acanthamoebidae). *European Journal of Protistology*, 94: 126091 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2024.126091>

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>

Kováč J., Slobodníková L., Trajčiková E., Rendeková K., Mučaji P., Sychrová A., Bittner Fialová S. Therapeutic potential of flavonoids and tannins in management of oral infectious diseases — a review. *Molecules*, 28: 158 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28010158>

Lukáč M., Slobodníková L., Mrva M., Dušeková A., Garajová M., Kello M., Šebová D., Pisárčik M., Kojnok M., Vrták A., Kurin E., Bittner Fialová S. Caffeic acid phosphonium derivatives: Potential selective antitumor, antimicrobial and antiprotozoal agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 25: 1200 (2024). <https://doi.org/10.3390/ijms25021200>

Mrva M., Borovičková T., Garajová M. First isolation of *Leptomyxa* (Amoebozoa, Leptomyxida) from endozoic conditions: an interaction between two common soil organisms. *European Zoological Journal*, 89: 1174-1179 (2022).  
<https://doi.org/10.1080/24750263.2022.2121435>

Sychrová A., Škovranová G., Čulenová M., Bittner Fialová S. Prenylated flavonoids in topical infections and wound healing. *Molecules*, 27: 4491 (2022).  
<https://doi.org/10.3390/molecules27144491>

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

Vedecké monografie:

Ondriska F., Boldiš V., Kaiglová A., Mrva M., Mrvová Garajová M., Steinhübel J. Atlas parazitov človeka. Typi Universitatis Tyrnaviensis, spoločné pracovisko Trnavskej univerzity v Trnave a Vedy, vydavateľstva Slovenskej akadémie vied, Trnava, 140 pp (2022). ISBN 978-80-568-0438-4

Publikácie v recenzovaných časopisoch:

Bittner Fialová, S. Rastlinné drogy odporúčané Európskou liekovou agentúrou pri ochoreniach kože. *Praktické lekárnictvo*. 12: 36-41 (2022).

Bittner Fialová S, Kurin E, Mučaji P, Nagy M. The combination of different parts of Oregano and water mint revealed antioxidant synergy. *Journal of Plant Physiology & Pathology [elektronický dokument]*, 11: 1 (2023), [online] ISSN:2329-955X

Bittner Fialová S, Kurin E, Trajčiková E, Drobná E, Dokupilová S, Slobodníková L. The rhizomes of *Origanum vulgare* exhibit antioxidant and antimicrobial activity comparable to the leaves. *Planta Medica [elektronický dokument]*. 89: 1363-1363 (2023), ISSN: 1439-0221

Kurin E, Bittner Fialová S. *Gymnema sylvestre*: potenciálna rastlina v liečbe obezity a diabetes mellitus. *Praktické lekárnictvo*, 13: 65-67 (2023).

Mrva M, Garajová M. Fluorescenčný rozjasňovač Rylux – alternatíva ku Calcofluor White pre fluorescenčnú vizualizáciu cyst akantaméb. *NewsLab*, 14: 71-72 (2023).

Mrva M, Garajová M, Dušeková A., Bittner Fialová S., Lukáč M. Derivatizácia zlúčenín do formy fosfóniových solí – nová perspektívna stratégia eliminácie patogénnych akantaméb. *NewsLab*, 14: 85-86 (2023).

## Uplatnenie výsledkov projektu

V rámci projektu bol zrealizovaný komplexný interdisciplinárny výskum, ktorý priniesol dôležité výsledky s uplatnením a presahom do viacerých oblastí výskumu ako aj praxe. Detailným preštudovaním cytomorfológie rôznych kmeňov patogénnych a potenciálne patogénnych amfizoických meňaviek a molekulárnymi analýzami boli zistené významné informácie dôležité najmä pre presnú identifikáciu izolátov využiteľnú v klinickej praxi. Farbenie cyst akantaméb fluorescenčným rozjasňovačom Rylux v klinických vzorkách je novou možnosťou pre rýchlu diagnostiku akantamébových infekcií. V prípade klinických izolátov bola po ich identifikácii bezodkladne nastavená adekvátna terapia vedúca k výraznému zlepšeniu stavu ochorenia u všetkých infikovaných pacientov. Z epidemiologického hľadiska sú dôležité získané originálne údaje o rozšírení a diverzite potenciálne patogénnych environmentálnych kmeňov amfizoických améb z vybraných biotopov a vnútorných orgánov vybraných bezstavovcov.

Doposiaľ absentuje špecifická a štandardizovaná terapia závažných protozoárnych ochorení spôsobovaných amfizoickými amébami – primárnej amébovej meningoencefalitídy, granulomatóznej amébovej encefalitídy, diseminovaných a kutánných infekcií, ako aj amébových keratitíd. Najčastejším pôvodcom väčšiny infekcií človeka sú akantaméby. V rámci riešenia projektu bolo získané množstvo údajov z testovania cytotoxického účinku potenciálne amebicídnych zlúčenín, rastlinných extraktov, fytochemikálií a ich derivátov na klinických izolátoch amfizoických meňaviek rodu *Acanthamoeba*, čo smeruje k praktickému využitiu a aplikácii pre vývoj nových terapeutík proti akantamébovým infekciám (granulomatózna amébová encefalitída, diseminované a kutánne infekcie, akantamébová keratitída). V prípade niektorých zlúčenín a extraktov bol zistený aj vysoký antineoplastický, antifungálny ako aj antibakteriálny účinok, z čoho vyplýva potenciál vývoja nových terapeutík v ďalších oblastiach medicínskej praxe.

Zadefinovanie mechanizmu cytotoxického účinku identifikovaním cytomorfológických zmien

po aplikácií zlúčenín predstavuje výrazný prínos k objasneniu mechanizmov ich účinku a prispieva k nasmerovaniu vývoja nových liečiv. Rozdiely v citlivosti izolátov améb na aplikované zlúčeniny zdôrazňujú dôležitosť nastavenia adekvátnej terapie v klinickej praxi, ktorú je potrebné špecifikovať podľa jednotlivých prípadov. Originálne nové zistenia na základe cytomorfológie a fylogenetických analýz kmeňov akantaméb prispievajú k presnejšej identifikácii genotypov a subgenotypov.

Získané dáta majú praktické využitie v humánnej medicíne, najmä v smerovaní vývoja nových liečiv ochorení spôsobovaných amfizoickými meňavkami, ale aj v preventívnych opatreniach na zabránenie vzniku a šírenia ochorení spôsobovaných týmito patogénmi. Uplatňuje sa tak prepojenie vedecko-výskumnej experimentálnej oblasti a praktického využitia získaných poznatkov najmä v oblastiach epidemiológie, diagnostiky amébových infekcií v klinickej praxi, terapeutických postupov pri infekciách amfizoickými meňavkami a v preventívnych opatreniach na zabránenie vzniku ochorení. Niektoré zo získaných výsledkov je okrem klinickej praxe možné aplikovať v pedagogickom procese o čom svedčí publikovanie vedeckej monografie Atlas parazitov človeka.

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

Stanovené ciele projektu boli splnené. Boli získané komplexné originálne výsledky v oblasti výskumu potenciálne amebicídnych zlúčenín s perspektívou využitia ako terapeutik akantamébových infekcií, vrátane výsledkov metaanalýz súčasných poznatkov o liečivách a biologicky aktívnych rastlinných zložkách. Boli pripravené a vyselektované extrakty z vybraných podzemných a nadzemných častí viacerých druhov rastlín (*Agrimonia eupatoria*, *Camellia sinensis*, *Cotinus coggygria*, *Dipsacus fullonum*, *Juglans regia*, *Lycopus* sp., *Mentha aquatica*, *Mentha piperita*, *Mespilus germanica*, *Origanum vulgare*, *Perilla frutescens*, *Sorbus domestica*, *Tagetes*, *Tanacetum* sp.), vrátane identifikácie a kvantifikácie bioaktívnych zlúčenín v extraktoch ako aj definovania ich antineoplastického, antifungálneho a antimikrobiálneho účinku, aj s použitím biokolorimetrického stanovenia antibakteriálnej aktivity. Pripravené boli 4 deriváty významnej fytozúčeniny kyseliny kávovej. Bol definovaný cytotoxický efekt a dynamika amebicídneho účinku sérií vybraných potenciálne amebicídnych zlúčenín (zwitteriónových a kationových tenzidov, rastlinných extraktov a derivátov fytochemikálií) na klinických izolátoch rodu *Acanthamoeba*. Z celkovo otestovaných 52 zlúčenín (14 alkylfosfocholínov, 24 anilidov, 3 bis(bibenzyly), 3 saponíny, metronidazol, kyselina kávová a jej 4 fosfóniové deriváty, 2 fosfóniové soli) a 7 rastlinných extraktov všetky prejavili inhibičný účinok na množenie buniek patogénnych akantaméb. Vysoká amebicídna, ale aj antibakteriálna, antimykotická a antineoplastická aktivita niektorých z otestovaných zlúčenín, najmä fosfóniových solí, poukazuje na ich terapeutický potenciál a budúce možné využitie v klinickej praxi. Zaznamenané cytomorfologické a ultraštruktúrne zmeny buniek akantaméb po aplikácii zlúčenín a v prípade fosfóniových solí aj dokázaná indukcia apoptózy, sú prínosom k objasneniu mechanizmu účinku testovaných zlúčenín. Zistené rozdiely v citlivosti izolátov akantaméb genotypu T4 na amebicídne zlúčeniny sú prejavom fenotypovej plasticity a zdôrazňujú potrebu zvýšenia pozornosti pre nastavenie adekvátnej terapie v klinickej praxi.

Komplexné výsledky molekulárnych analýz kompletnej 18S rDNA a génu COX1 vrátane fylogenetickej analýzy kmeňov akantaméb a cytomorfologických analýz cyst priniesli nové zistenia k identifikácii a fenotypovej plasticite genotypu T4, ktorý je najčastejšie asociovaný s akantamébovými infekciami. Bola zrealizovaná redeskripcia druhu *Acanthamoeba terricola*, do ktorého bol na základe našich výsledkov zahrnutý aj Neffov kmeň (uvádzaný pôvodne ako *A. castellanii*), využívaný desaťročia ako referenčný kmeň v desiatkach zahraničných publikácií o problematike akantaméb ako pôvodcov infekcií.

Boli získané nové dáta o cytomorfológii nedostatočne definovaných patogénnych a potenciálne patogénnych amfizoických meňaviek z environmentálneho aj klinického materiálu. Bolo izolovaných a identifikovaných 9 nových klinických izolátov z prípadov akantamébových keratitíd z územia Slovenska. Spomínané dáta sú prínosom pre vedecký výskum ako aj klinickú prax. Nové údaje o diverzite a rozšírení potenciálne patogénnych kmeňov (*Vermamoeba* sp., *Acanthamoeba* spp., *Sappinia* sp.) sú významné z epidemiologického hľadiska. V priebehu riešenia projektu bolo realizovaných 24 diplomových prác (21 úspešne ukončených obhajobou) a 6 dizertačných doktorandských prác (3 úspešne ukončené obhajobou).

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

The set objectives of the project were met. Comprehensive and original results were obtained in the research field of potentially amoebicidal compounds with the perspective of use as therapeutics for *Acanthamoeba* infections, including the results of meta-analyses of current knowledge about drugs and biologically active plant components. Plant extracts were prepared from selected underground and aboveground parts of several plant species (*Agrimonia eupatoria*, *Camellia sinensis*, *Cotinus coggygria*, *Dipsacus fullonum*, *Juglans regia*, *Lycopus* sp., *Mentha aquatica*, *Mentha piperita*, *Mespilus germanica*, *Origanum vulgare*, *Perilla frutescens*, *Sorbus domestica*, *Tagetes*, *Tanacetum* sp.), including the identification and quantification of bioactive compounds in extracts as well as defining their antineoplastic, antifungal and antimicrobial effects, also using biocalorimetric determination of antibacterial activity. Four derivatives of the important phytochemical caffeic acid were prepared. The cytotoxic effect and the dynamics of the amoebicidal effect of a series of selected potentially amoebicidal compounds (zwitterionic and cationic surfactants, plant extracts and derivatives of phytochemicals) on clinical isolates of the genus *Acanthamoeba* were defined. Out of a total of 52 tested compounds (14 alkylphosphocholines, 24 anilides, 3 bis(benzyls), 3 saponins, metronidazole, caffeic acid and its 4 phosphonium derivatives, 2 phosphonium salts) and 7 plant extracts, all showed an inhibitory effect on the proliferation of pathogenic *Acanthamoeba* cells. The high amoebicidal, but also antibacterial, antifungal and antineoplastic activities of some of the tested compounds, especially phosphonium salts, indicate their therapeutic potential and possible future application in the clinical practice. Recorded cytomorphological and ultrastructural changes of *Acanthamoeba* cells after the application of compounds and, in the case of phosphonium salts, also the proven induction of apoptosis, contribute to the clarification of the mechanism of action of the tested compounds. The detected differences in the sensitivity of isolates of *Acanthamoeba* genotype T4 to amoebicidal compounds are a manifestation of phenotypic plasticity and they emphasize the need for increased attention to setting adequate therapy in clinical practice. Complex results of molecular analyses of the complete 18S rDNA and COX1 gene, including phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* strains and cytomorphological analyses of cysts, brought new findings on the identification and phenotypic plasticity of the T4 genotype, which is the most often associated genotype with *Acanthamoeba* infections. A re-description of the species *Acanthamoeba terricola* was carried out, in which, based on our results, the Neff strain (previously referred to *A. castellanii*) was included. This strain was used for decades as a reference strain in dozens of international publications on the issue of *acanthamoebae* as causative agents of infections. New data on the cytomorphology of insufficiently defined pathogenic and potentially pathogenic amphizoic amoebae were obtained from environmental and clinical material. Nine new clinical isolates from the cases of *Acanthamoeba* keratitis from Slovakia were isolated and identified. The mentioned data are beneficial for scientific research as well as clinical practice. New data on the diversity and distribution of potentially pathogenic strains (*Vermamoeba* sp., *Acanthamoeba* spp., *Sappinia* sp.) are significant from an epidemiological point of view. During the implementation of the project, 24 diploma theses (21 successfully completed) and 6 doctoral dissertations (3 successfully completed) were realised.