

## Derivatizácia zlúčenín do formy fosfóniových solí – nová perspektívna stratégia eliminácie patogénnych akantaméb

Martin Mrva<sup>1</sup>, Mária Garajová<sup>1</sup>, Aneta Dušeková<sup>1</sup>, Silvia Bittner Fialová<sup>2</sup>, Miloš Lukáč<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie, Bratislava

<sup>2</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra farmakognózie a botaniky, Bratislava

<sup>3</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra chemickej teórie liečiv, Bratislava

Pre závažné infekcie človeka spôsobované amfizoickými meňavkami rodu *Acanthamoeba* – granulomatóznou amébovou encefalitídou (GAE) a akantamébovou keratitídou (AK) doposiaľ nebola vyvinutá spoľahlivá a štandardizovaná terapia, čo je spôsobené najmä variabilnou citlivosťou patogénov a vysokorezistentnými cystami. Experimenty dokazujú, že deriváty známych zlúčenín a fytochemikálií vo forme amfifilných fosfóniových solí sa vyznačujú účinnejšou penetráciou cez cytoplazmatickú membránu akantaméb a akumuláciou v membránových systémoch, ktoré poškodzujú. Dosahujú tak niekoľkonásobne vyšší amebicídny účinok a predstavujú novú potenciálnu stratégiu eliminácie patogénnych kmeňov týchto amfizoických meňaviek.

**Kľúčové slová:** *Acanthamoeba*, klinické izoláty, amebicídny efekt, fosfóniové soli

### Derivatization of compounds into the form of phosphonium salts – a new perspective strategy for the elimination of pathogenic acanthamoebae

For severe human infections caused by amphizoic amoebae of the genus *Acanthamoeba* – granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and *Acanthamoeba* keratitis (AK), a reliable and standardized therapy has not yet been developed. It is mainly due to the variable sensitivity of pathogens and highly resistant cysts. Experiments prove that derivatives of known compounds and phytochemicals in the form of amphiphilic phosphonium salts are characterized by more effective penetration of the cytoplasmic membrane of acanthamoebae and by accumulation in the membrane systems that they damage. They thus achieve a several times higher amoebicidal effect and represent a new potential strategy for eliminating pathogenic strains of these amphizoic amoebae.

**Keywords:** *Acanthamoeba*; clinical isolates; amoebicidal effect, phosphonium salts

**NewsLab, 2023; roč. 14 (S): 85 – 86**

### Úvod

Patogénne kmene voľne žijúcich akantaméb spôsobujú závažné infekcie človeka aj zvierat: granulomatóznou amébovou encefalitídou (GAE), systémové a kožné infekcie a progresívne, zrak ohrozujúce ochorenie rohovky – akantamébovou keratitídou (AK)<sup>(1)</sup>. Terapeutické možnosti sú obmedzené, pretože dosiaľ nie je k dispozícii žiadna spoľahlivá a štandardizovaná terapia. Kombinácie známych chemoterapeutík, antimykotík a antibiotík majú množstvo vedľajších účinkov, liečba je nejednotná, dlhodobá a vzhľadom na variabilnú citlivosť akantaméb na terapeutiká a rezistentné cysty je často neúčinná<sup>(2)</sup>. Problematická liečba vedie k vývoju nových potenciálnych terapeutík.

### Fosfóniové soli – perspektívna stratégia eliminácie patogénnych akantaméb

V poslednom období sa do centra záujmu dostáva výskum fosfóniových solí. Sú to katiónové tenzidy, pričom ich molekula pozostáva z lipofilnej a hydrofilnej časti<sup>(3)</sup>. Sú schopné penetrovať cez cytoplazmatickú membránu a akumulovať sa v membránových organelách, najmä mitochondriách pato-

génov, kde poškodzujú komplexy dýchacieho reťazca, membránový potenciál a syntézu ATP<sup>(4)</sup>. Dokázaný už bol ich antibakteriálny<sup>(5)</sup> a antifungálny<sup>(6)</sup> účinok. Napriek vysokému potenciálu biologickej aktivity doposiaľ bolo publikovaných iba niekoľko prác o ich antiprotozoálnej aktivite. Ich cytotoxický účinok bol úspešne skúmaný proti kmeňom *Trypanosoma brucei*<sup>(7)</sup>.

Prvé práce o citlivosti akantaméb na fosfóniové soli boli publikované pomerne nedávno. Bolo zistené, že derivatizácia známych zlúčenín a fytochemikálií do formy fosfóniových solí má výrazný efekt na zosilnenie amebicídneho účinku. Dôležitou obsahovou látkou mnohých rastlinných extraktov (najmä v čeľadi Lamiaceae) je fenolová zlúčenina kyselina rozmarínová, známa antioxidáciami, protizápalovými a antimikrobiálnymi účinkami. Amebicídny účinok jej dvoch fosfóniových derivátov s lepšou schopnosťou prieniku cez cytoplazmatickú membránu bol preskúmaný na dvoch klinických izolátoch rodu *Acanthamoeba* z prípadov AK. Hodnoty EC<sub>50</sub> (koncentrácia, pri ktorej je eliminovaných 50 % trofozoitov) dosahovali 1,14 – 5,6 mM po 24 h, čo je troj- až osemnásobne vyšší účinok, než dosahovala samotná kyselina rozmarín-

nová<sup>(9)</sup>. Ďalšou významnou fenolovou zlúčeninou je kyselina kávová, vyznačujúca sa antimikrobiálnymi účinkami, ale iba nízkou amebicídnu aktivitou. Jej derivatizácia na semi-syntetickú fosfóniovú soľ výrazne prispela k zvýšeniu aktivity, pričom pri dvoch klinických izolátoch akantaméb zistená minimálna trofocídna koncentrácia (MTC) so 100 % trofocídnym účinkom, dosahovala 125 – 250  $\mu\text{M}$  po 48 h. Pri samotnej kyseline kávovej MTC dosahovali hodnoty > 500  $\mu\text{M}$ <sup>(9)</sup>.

Metronidazol je liečivom so známymi antimikrobiálnymi účinkami, ktorý sa využíva pri terapii trichomonózy, giardiózy a amebózy, spôsobovanej *Entamoeba histolytica*. Jeho schopnosť eliminácie patogénnych kmeňov akantaméb je však nízka. Novosyntetizovaný fosfóniový amfifilný derivát metronidazolu prejavil vysokú amebicídnu aktivitu proti klinickým izolátom akantaméb s hodnotami  $\text{EC}_{50}$  72 – 144  $\mu\text{M}$  po 24 h<sup>(3)</sup>, ktorá pokračovala v podobných hodnotách aj po 48 h<sup>(10)</sup>. Po aplikácii zlúčeniny boli pozorované viaceré cytologické zmeny zahŕňajúce uvoľnenie buniek z podkladu, zaguľatenie buniek, resorpciu akantopódií, narušenie integ-

rity cytoplazmatickej membrány spojené s únikom cytoplazmy, ale aj „blebbing“ cytoplazmatickej membrány, čo je znak, často asociovaný s apoptózou eukaryotických buniek<sup>(10)</sup>.

### Záver

Zo spomínaných výsledkov vyplýva, že derivatizácia známych zlúčenín do formy semisyntetických amfifilných fosfóniových solí so zvýšenou schopnosťou prieniku cez cytoplazmatickú membránu patogéna predstavuje novú perspektívu v nových stratégiách eliminácie patogénnych kmeňov akantaméb.

### PodĎakovanie

Práca vznikla s podporou grantu VEGA 1/0284/20. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-15-0123 a APVV-19-0056.

### LITERATÚRA

1. Garajová M, Mrva M. Meňavky rodu *Acanthamoeba* – pôvodcovia infekcií človeka. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2011; 60: 121–130.
2. Cope JR, Ali IK, Visvesvara GS. Pathogenic and opportunistic free-living ameba infections. In: Ryan ET, Hill DR, Solomon T, et al. (Eds) *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 10th Ed. Elsevier Inc 2020: 814–820.
3. Lukáč M, Pisárčik M, Garajová M, et al. Synthesis, surface activity, and biological activities of phosphonium and metronidazole salts. *J Surfactants Deterg* 2020; 23: 1025–1032.
4. Zielonka J, Joseph J, Sikora A, et al. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. *Chem Rev* 2017; 117: 10043–10120.
5. Kanazawa A, Ikeda T, Endo T. Synthesis and antimicrobial activity of dimethyl- and trimethyl-substituted phosphonium salts with alkyl chains of various lengths. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 945–952.
6. Tan W, Li Q, Wei L, et al. Synthesis, characterization, and antifungal property of starch derivatives modified with quaternary phosphonium salts. *Mater Sci Eng C* 2017; 76: 1048–1056.
7. Taladriz A, Healy A, Flores Pérez EJ, et al. Synthesis and structure-activity analysis of new phosphonium salts with potent activity against African trypanosomes. *J Med Chem* 2012; 55: 2606–2622.
8. Bittner Fialová S, Kello M, Čoma M, et al. Derivatization of rosmarinic acid enhances its in vitro antitumor, antimicrobial and antiprotozoal properties. *Molecules* 2019; 24(6): 1078.
9. Dušeková A, Mrva M, Garajová M, et al. Cytotoxický efekt nového derivátu kyseliny kávovej na patogénne kmene akantaméb. In: *Študentská vedecká konferencia Prif UK 2020. Zborník recenzovaných príspevkov*. Bratislava. Univerzita Komenského v Bratislave. 2020: 120–124.
10. Dušeková A, Garajová M, Lukáč M, et al. Derivatization of metronidazole enhances cytotoxic effect against *Acanthamoeba* genotype T4 isolates and leads to cytomorphological changes in trophozoites. *Acta Trop* 2021; 216: 105830.

**doc. RNDr. Martin Mrva, PhD.**

Univerzita Komenského v Bratislave,  
Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
e-mail: martin.mrva@uniba.sk