

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РОМАНЧИШИНА АНАСТАСІЯ ПАВЛІВНА

УДК 579.61:593.12]:615.28.035.4

ДИСЕРТАЦІЯ
БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АКАНТАМЕБ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ
СКРИНІНГУ ПРОТИСТОЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ

Галузь знань – 22 «Охорона здоров'я»

Спеціальність – 222 «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А.П. Романчишина

Науковий керівник: **Широбоков Володимир Павлович**, доктор медичних наук, професор, академік НАН та НАМН України, завідувач кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Романчишина А.П. «Біологічні властивості акантамеб та їх використання для скринінгу протистоцидних препаратів». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (галузь знань 22 – «Охорона здоров'я»). – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Україна, Київ, 2025.

Дисертаційна робота спрямована на дослідження ключових біологічних властивостей вільноживучих найпростіших роду *Acanthamoeba*, ізольованих із природних об'єктів України та обґрунтування можливості їх використання як експериментальної моделі для оцінки протистоцидної активності. Окрему увагу приділено проведенню скринінгових досліджень із визначення амебоцидних властивостей хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів.

Зростання наукового інтересу до *Acanthamoeba* spp. зумовлене їхньою високою екологічною пластичністю, що дозволяє їм виживати та розмножуватися у різноманітних природних і техногенних середовищах, включно з ґрунтом, водою, системами кондиціонування повітря, медичним обладнанням, тощо. Завдяки високій стійкості й здатності до виживання в екстремальних умовах, ці найпростіші становлять потенційну загрозу для здоров'я людини.

Представники роду *Acanthamoeba* здатні викликати важкі інвазивні захворювання, зокрема акантамебний кератит (АК), гранулематозний амебний енцефаліт (ГАЕ), первинний амебний менінгоенцефаліт (ПАМ), акантамебну пневмонію (АП) та інші. Дані патології характеризуються тяжким перебігом і високим рівнем летальності. Через неспецифічність клінічних симптомів, лабораторні методи дослідження мають вирішальне значення у постановці діагнозу. Зокрема, мікроскопічне дослідження дає змогу виявити цисти або трофозоїти у клінічному матеріалі, тоді як культуральні методи дозволяють виділити культуру збудника, проте мають обмежену чутливість і потребують тривалого часу. Значно вищу специфічність демонструють молекулярно-генетичні

підходи, зокрема ПЛР, що дозволяє виявляти ДНК акантамеб у мінімальних кількостях, а також ідентифікувати генотип.

Суттєво ускладнює лікування акантамебних інвазій здатність даних найпростіших утворювати цисти – резистентні життєві форми, стійкі до фізико-хімічних чинників і більшості існуючих антипротозойних препаратів. З метою елімінації цист зазвичай застосовують концентрації антипротозойних препаратів, що перевищують дози, необхідні для знищення акантамебних трофозоїтів. Однак, така терапія часто супроводжується високою токсичністю та ризиком розвитку серйозних побічних ефектів. Лікування переважно базується на емпіричних схемах, що включають комбінації антибіотиків, антифунгальних і антипротозойних препаратів. Водночас, на сьогодні відсутня уніфікована методика для визначення чутливості більшості патогенних найпростіших до хіміотерапевтичних препаратів в лабораторних умовах. Існуючі підходи до скринінгових досліджень протистоцидної активності є трудомісткими, тривалими за виконанням і нерідко супроводжуються суб'єктивністю оцінювання результатів. Зважаючи на вищезазначене, особливої актуальності набуває створення нових методик для визначення чутливості акантамеб до лікарських препаратів, а також пошук нових терапевтичних агентів з протистоцидною активністю.

Метою дисертаційної роботи є дослідження біологічних особливостей акантамеб, виділених з навколишнього середовища (грунту та бентонітових глин), розробка методів визначення їхньої чутливості до біологічно активних речовин та проведення скринінгу амебоцидної активності хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів в умовах експерименту.

Для досягнення поставленої мети визначено такі завдання: дослідити морфологічні та культуральні властивості акантамеб, ізольованих із різних об'єктів зовнішнього середовища; здійснити молекулярно-генетичну ідентифікацію акантамеб та бактеріальної культури, що використовується для їх культивування, шляхом секвенування генів рРНК та визначити їх філогенетичне положення; розробити методику визначення чутливості акантамеб до протистоцидних препаратів і провести скринінгове дослідження антиакантамебної активності

хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів; оцінити цитотоксичність найбільш активних сполук та встановити зв'язок між їхньою хімічною структурою та протистоксичною активністю.

У межах дисертаційної роботи проведено комплексне дослідження морфологічних, культуральних та молекулярно-генетичних характеристик п'яти штамів акантамеб із колекції кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця. За допомогою світлової, фазово-контрастної та електронної мікроскопії детально охарактеризовано основні морфологічні особливості різних стадій життєвого циклу акантамеб (трофозоїти та цисти). Уперше описано проміжну форму – прецисту, що вказує на послідовний, поетапний механізм формування цисти.

Для моноксенічного культивування акантамеб вперше використано бактерії *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*, що виділено із бентонітових глин Курцівського родовища. Таксономічне положення бактеріального ізоляту підтверджене шляхом секвенування гена 16S рРНК; отримана послідовність депонована в GenBank (MH517543.1). Використання цієї бактеріальної культури забезпечило стабільний ріст акантамеб в умовах *in vitro* та достовірну відтворюваність результатів у серії експериментів.

Потенційну патогенність досліджених акантамеб визначено з використанням термо та осмо-толерантних тестів, результати яких підтвердили безпечність даних штамів *Acanthamoeba* spp. для роботи в лабораторних умовах.

Проведено молекулярно-генетичну ідентифікацію досліджуваних найпростіших на основі аналізу фрагмента гена 18S рРНК. Порівняння нуклеотидних послідовностей із базами даних дозволили достовірно підтвердити приналежність усіх п'яти ізолятів до роду *Acanthamoeba*.

Філогенетичний аналіз продемонстрував, що послідовності гена 18S рРНК штамів *Krym*, *Cherkasy* та *Karpaty* мають 99% подібність до виду *Acanthamoeba castellanii* – одного з найбільш досліджених представників даного роду. Штам *Kyiv* виявив 100% спорідненість із *Acanthamoeba hatchetti*, а штам *Soil* – із *Acanthamoeba*

terricola, які є переважно сапрофітними формами акантамеб, що поширені у ґрунтовому середовищі.

Вперше описано здатність акантамеб формувати бляшки в товщі та на поверхні 0,7% поживного агару інокульованому бактеріями *Cellulosimicrobium* sp штам *bent-1*, що стало підґрунтям для створення нового кількісного методу оцінки життєздатності акантамеб та їх чутливості до хіміотерапевтичних препаратів.

Отримані дані підтверджують доцільність використання досліджених штамів акантамеб як надійної експериментальної моделі для оцінки протистоцидної дії хіміотерапевтичних агентів. Застосування удосконалених лабораторних підходів – зокрема лунко-дифузійного методу в поєднанні з феноменом бляшкоутворення та методу редукції акантамебних бляшок – забезпечує високу точність, чутливість і відтворюваність результатів. Завдяки технологічній простоті й низькій собівартості ці моделі є ефективним інструментом для первинного скринінгу сполук із протистоцидною активністю.

У результаті скринінгу 418 хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів з використанням модифікованого лунко-дифузійного методу виявлено суттєву гетерогенність амебоцидної активності даної групи сполук, що свідчить про залежність біологічної дії від структурних особливостей молекул. Лише близько 7% сполук продемонстрували високий рівень ефективності, тоді як майже половина не виявила жодного протистоцидного ефекту. Це дозволило відібрати 26 найактивніших сполук для подальшої оцінки їх мінімальної інгібуючої концентрації щодо різних життєвих форм акантамеб та цитотоксичності на культурі клітин. Окрім цього, із зазначеними сполуками проводився аналіз залежності їх протистоцидної активності від хімічної структури.

Дослідження токсичності на клітинній лінії HEp-2C виявило значну варіабельність цитотоксичної дії серед відібраних хімічних сполук, що дозволило класифікувати сполуки на високотоксичні, помірно токсичні та нецитотоксичні.

Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) високоактивних сполук коливалися в межах 31,25–83 мкг/мл, що демонструє співставний рівень активності з контрольною сполукою – клотримазолом. Найнижчі значення МІК спостерігались

для АМ-166, АМ-225 і АМ-262, при цьому АМ-225 була єдиною сполукою, яка поєднувала високу специфічну активність із низький рівень токсичної дії. Виражена цистоцидна активність є суттєвою характеристикою досліджуваних сполук, що набуває особливої значущості з огляду на високу резистентність цист акантамеб до дії фармакологічних засобів. АМ-225 забезпечувала найкраще співвідношення ефективності *in vitro* та безпечності, тоді як АМ-166, попри високу специфічну активність, потребує подальшої хімічної оптимізації через помірний рівень токсичності.

Додатково встановлено, що АМ-166 єдина серед досліджених сполук, що проявила комбіновану протистозидну, антибактеріальну (щодо грампозитивних бактерій) та протигрибкову активність. Сполуки АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336 виявили специфічну активність щодо акантамеб без супутнього антимікробного ефекту, що свідчить про їхню високу селективність і потенціал для розробки цільових протистозидних препаратів.

Таким чином, завдяки детальному дослідженню морфологічних, культуральних та молекулярно-генетичних властивостей п'яти штамів вільноживучих амеб роду *Acanthamoeba* обґрунтовано можливість їх застосування як надійної модельної системи для дослідження протистозидної активності хіміотерапевтичних засобів. Розроблені та апробовані лабораторні методики визначення чутливості акантамеб до хіміотерапевтичних препаратів дали змогу кількісно оцінити вплив досліджуваних сполук на життєздатність даних найпростіших. Отримані результати мають важливе практичне значення для створення ефективних і малотоксичних засобів лікування акантамебних інвазій. Виявлені хімічні сполуки з вираженою протистозидною активністю можуть бути використані як основа для розробки нових хіміотерапевтичних препаратів, спрямованих на елімінацію як трофозоїтних, так і цистових форм збудника.

Ключові слова: найпростіші, вільноживучі амеби, *Acanthamoeba* spp., мікроскопія, культивування, генотипування, секвенування, скринінгові дослідження, *in vitro*, хіміотерапевтичні сполуки, амебозидні препарати,

протистоцидна активність, медичні препарати, антимікробні препарати, антимікробна терапія, антимікробна резистентність.

ABSTRACT

Anastasiia Romanchyshyna. «Biological properties of acanthamoebae and their use for screening of protistocidal drugs». Qualifying scientific work in the manuscript form. Dissertation for Doctor of Philosophy degree in field of knowledge. – 22 «Health Care», in speciality 222 «Medicine». Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2025.

The dissertation work is devoted to the investigation of key biological characteristics of free-living protozoa of the genus *Acanthamoeba*, isolated from environments in Ukraine, and on the rationale for their use as an experimental model for assessing protistocidal activity. Particular attention is given to screening studies aimed at identifying amoebicidal properties of chemical compounds belonging to the 1-alkyl(aryl)oxy-3-amino-2-propanol group.

The increasing scientific interest in *Acanthamoeba* spp. is attributed to their high ecological plasticity, which enables them to survive and proliferate in a wide range of natural and anthropogenic environments, including soil, water, air-conditioning systems, medical devices etc. Due to this adaptability and their ability to persist under extreme conditions, these protozoa pose a potential threat to human health.

Members of the genus *Acanthamoeba* are capable of causing severe invasive diseases, including *Acanthamoeba* keratitis (AK), granulomatous amoebic encephalitis (GAE), primary amoebic meningoencephalitis (PAM), *Acanthamoeba* pneumonia (AP) and others. These pathologies are often associated with a severe clinical course and high mortality rates. Due to the non-specific nature of clinical symptoms, laboratory diagnostic methods play a decisive role in establishing an accurate diagnosis. Microscopic examination allows for the detection of cysts or trophozoites in clinical samples, while culture-based methods enable isolation of the causative agent. However, the latter are limited by low sensitivity and require prolonged incubation times. In contrast, molecular-genetic approaches – particularly polymerase chain reaction (PCR) – exhibit significantly higher specificity, enabling the detection of *Acanthamoeba* DNA in trace amounts and allowing for genotype identification.

A major challenge in the treatment of acanthamoeba invasions is the ability of these free-living protozoa to form cysts – resistant life stages that exhibit remarkable tolerance

to physicochemical stressors and to the majority of currently available anti-protozoal agents. To eliminate cysts, anti-protozoal drugs are typically administered at concentrations significantly higher than those required to eradicate trophozoites. However, such therapeutic regimens are frequently associated with high toxicity and an increased risk of severe adverse effects. Treatment strategies are largely empirical and often involve combinations of antibiotics, antifungals, and anti-protozoal compounds. At the same time, there is currently no standardized method for determining the drug susceptibility of most pathogenic protozoa under laboratory conditions. Existing approaches for screening protistocidal activity are often labor-intensive, time-consuming, and prone to subjective interpretation of results. Given these limitations, the development of novel, reliable methods for evaluating *acanthamoeba* drug susceptibility, as well as the identification of new therapeutic agents with protistocidal activity, has become a matter of particular scientific and clinical relevance.

The aim of dissertation work is to investigate the biological characteristics of *Acanthamoeba* strains isolated from environmental sources (soil and bentonite clays), to develop methods for assessing their susceptibility to biologically active substances, and to perform experimental screening of the amoebicidal activity of chemical compounds belonging to the 1-alkyl(aryl)oxy-3-amino-2-propanol group.

To achieve this objective, the study focused on investigating the morphological and cultural characteristics of *acanthamoeba* strains isolated from various environmental sources; performing molecular-genetic identification of both *acanthamoeba* and the bacterial culture used for their cultivation via rRNA gene sequencing and determining their phylogenetic positions; developing a methodology for assessing the susceptibility of *acanthamoeba* to protistocidal agents and conducting a screening of anti-*acanthamoeba* activity among chemical compounds belonging to the 1-alkyl(aryl)oxy-3-amino-2-propanol group; and evaluating the cytotoxicity of the most active compounds in order to establish a relationship between their chemical structure and protistocidal efficacy.

Within the framework of this dissertation, a comprehensive study was conducted on the morphological, cultural, and molecular-genetic features of five *acanthamoeba* strains from the collection of the Department of microbiology and parasitology with basics of

immunology at Bogomolets National Medical University. Using light, phase-contrast, and electron microscopy, detailed characterization of key morphological features of different life cycle stages (trophozoites and cysts) was performed. For the first time, an intermediate stage – precyst – was described, indicating a stepwise mechanism of cyst formation.

For monoxenic cultivation of *acanthamoeba*, bacteria of the species *Cellulosimicrobium* sp., strain *bent-1* – isolated for the first time from bentonite clays of the Kurtsivske deposit – were employed. The taxonomic affiliation of the bacterial isolate was confirmed by 16S rRNA gene sequencing, and the resulting nucleotide sequence has been deposited in GenBank (accession number MH517543.1). The use of this bacterial culture ensured stable growth of *acanthamoeba* under *in vitro* conditions and reliable reproducibility of results in a series of experiments.

The potential pathogenicity of the studied *acanthamoeba* strains was assessed using thermo- and osmotolerance assays, the results of which confirmed the biosafety of these *Acanthamoeba* spp. strains for use under laboratory conditions.

Molecular-genetic identification of the studied amoebae was performed based on the analysis of a fragment of the 18S rRNA gene. Comparative analysis of the obtained nucleotide sequences with available databases confirmed, with high reliability, the taxonomic classification of all five isolates within the genus *Acanthamoeba*.

Phylogenetic analysis revealed that the 18S rRNA gene sequences of the *Krym*, *Cherkasy*, and *Karpaty* strains exhibited 99% similarity to *Acanthamoeba castellanii*, one of the most well-characterized species within the genus. The *Kyiv* strain showed 100% genetic affinity with *Acanthamoeba hatchetti*, while the *Soil* strain was closely related to *Acanthamoeba terricola* – a predominantly saprophytic species commonly found in soil environments.

For the first time, the ability of *acanthamoeba* to form plaques within and on the surface of 0.7% nutrient agar inoculated with *Cellulosimicrobium* sp. strain *bent-1* was described. This finding laid the foundation for the development of a novel quantitative method to assess the viability and drug susceptibility of *acanthamoeba* under experimental conditions.

The obtained data support the feasibility of using the studied *acanthamoeba* strains as a reliable experimental model for evaluating the cysticidal activity of chemotherapeutic agents. The application of refined laboratory techniques – specifically, the well-diffusion method combined with plaque formation and plaque reduction assays – provided high levels of accuracy, sensitivity and reproducibility. Due to their procedural simplicity and low cost, these models represent an effective tool for primary screening of compounds with protistocidal activity.

Screening of 418 chemical compounds from the 1-alkyl(aryl)oxy-3-amino-2-propanol group using a modified well-diffusion method revealed considerable heterogeneity in amoebicidal activity, indicating that the biological effects of these substances are dependent on their molecular structure. Only approximately 7% of the compounds exhibited high efficacy, while nearly half demonstrated no protistocidal effect. Based on these results, 26 of the most active compounds were selected for further evaluation of their minimum inhibitory concentrations against various life stages of *acanthamoeba* and for cytotoxicity testing in cell culture. In addition, a structure–activity relationship analysis was performed for the selected compounds to examine the correlation between their chemical structures and protistocidal activity.

Cytotoxicity testing on the HEP-2C cell line revealed considerable variability in the toxic effects of the selected chemical compounds, allowing for their classification into highly toxic, moderately toxic, and non-cytotoxic categories.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the highly active compounds ranged from 31.25 to 83 µg/mL, indicating a level of activity comparable to that of the reference compound, clotrimazole. The lowest MIC values were observed for compounds AM-166, AM-225, and AM-262, with AM-225 being the only compound that combined high specificity with a low level of cytotoxicity. Pronounced cysticidal activity is a key feature of the tested compounds, particularly important in the context of the high resistance of *Acanthamoeba* cysts to pharmacological agents. Among them, AM-225 demonstrated the most favourable balance between in vitro efficacy and safety, whereas AM-166, despite its high specificity, requires further chemical optimization due to its moderate toxicity.

It was additionally established that AM-166 was the only compound among those tested to exhibit combined protistocidal, antibacterial (against Gram-positive bacteria), and antifungal activity. Compounds AM-225, AM-232, AM-262, and AM-336 demonstrated selective activity against *acanthamoeba* without exhibiting concomitant antimicrobial effects, indicating their specificity and potential as candidates for the development of targeted protistocidal agents.

Thus, based on a comprehensive analysis of the morphological, cultural, and molecular-genetic characteristics of five free-living strains of genus *Acanthamoeba*, the feasibility of their use as a reliable model system for evaluating the protistocidal activity of chemotherapeutic agents has been substantiated. The laboratory methods developed and validated for assessing *acanthamoeba* sensitivity to chemotherapeutic compounds enabled a quantitative evaluation of the effects of the tested substances on the viability of these protozoa. The results obtained hold significant practical value for the development of effective and low-toxicity therapeutic agents for the treatment of *acanthamoeba* invasions. Identified compounds with pronounced protistocidal activity may serve as a basis for the design of novel chemotherapeutic drugs aimed at eliminating both trophozoite and cystic forms of the pathogen.

Keywords: protozoa, free-living amoebae, *Acanthamoeba* spp., microscopy, cultivation, genotyping, sequencing, screening studies, in vitro, chemotherapeutic compounds, amoebicidal drugs, protistocidal activity, antimicrobial drugs, antimicrobial therapy, antimicrobial resistance.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Ширококов В.П., Понятовський В. А., Юришинець В. І., **Чоботар. А. П.**, Саламатін Р. В. (2017). Вільноіснуючі амеби, як представники еукаріото-прокаріотичного консорціуму бентонітових глин. Мікробіологічний Журнал, 79(3), 98–106. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.03.106>.
2. **Чоботар, А. П.** (2019). Акантамеби як резервуар патогенних бактерій та вірусів (огляд літератури). Інфекційні хвороби, 2 (96), 66-74. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2019.2.10328>.
3. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., **Chobotar, A.**, & Sałamatin, R. (2020). Applying of bacteria *Cellulosimicrobium* sp. for cultivation protozoa of genus *Acanthamoeba*. Annals of Parasitology, 66(1), 61-67. <https://doi.org/10.17420/ap6601.238>.
4. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., **Chobotar, A.**, & Sałamatin, R. (2020) Morphological, physiological and genetic characteristics of protozoa of genus *Acanthamoeba*, isolated from different deposit of bentonite in Ukraine. Annals of Parasitology, 66(1), 69-75. <https://doi.org/10.17420/ap6601.239>.
5. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., Poniatovska, V., **Romanchyshyna, A.**, & Sałamatin, R. (2024). Determination of the anti-protozoal activity of medicinal agents using the phenomenon of plaque formation by *Acanthamoeba* spp. Annals of parasitology, 70(1), 15-22. <https://doi.org/10.17420/ap7001.522>.

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Anastasiia Chobotar**. Bacteria *Cellulosimicrobium* sp. as a food substrate for free-living amoeba (2019). Abstract book of the 25th Congress of the Polish Parasitological Society, Warsaw, Poland (постерна доповідь).
2. Ширококов В. П., **Романчишина А. П.** Використання бентонітових глин для виділення вільноживучих найпростіших з об'єктів довкілля. Матеріали наукової конференції “Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології”, присвяченої 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології, вірусології та

імунології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України, 5 листопада 2019 року, м. Київ, Україна. 2019:155-156.

3. **Романчишина А.П.** Вільноживучі амеби, виділені з об'єктів навколишнього середовища в Україні. Третій національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 135-річчю ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова. НАМК України (за участю міжнародних спеціалістів), 20-21 травня 2021 року, м. Харків, Annals of Mechnikov Institute, N 2, 2021, с.57.

4. Широбоков В.П., Понятовський В.А., **Романчишина А.П.**, Короткий Ю.В. Визначення амебоцидної активності хімічних сполук з групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолу. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «МЕЧНИКОВСЬКІ ЧИТАННЯ – 2024» м. Харків, 1 листопада 2024 року, с.116-118.

5. Shyrobokov V.P., Poniatovskyi V.A., **Romanchyshyna A.P.**, Korotkyi Yu.V. New chemical compounds of 1-alkyl(aryl)oxy-3-amino-2-propanol group and their protistocidal activity. 35th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID Global 2025, 11 – 15 April 2025, Vienna, Austria) (постерна доповідь).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ВІЛЬНОЖИВУЧІ АМЕБИ ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА (огляд літератури)	29
1.1.Історія відкриття вільноживучих амеб	29
1.2.Поширеність вільноживучих амеб в навколишньому середовищі.....	30
1.3.Класифікація вільноживучих амеб.....	31
1.4.Морфологічні особливості акантамеб	31
1.5.Культуральні властивості акантамеб	35
1.6.Генетична ідентифікація та класифікація акантамеб	37
1.7.Акантамебні інвазії, їх діагностика та лікування	39
1.8.Методичні підходи до визначення амебоцидної активності природних та синтетичних речовин	42
1.9.Використання амінопропанолів як антимікробних, протигрибкових та антипротозойних агентів	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
2.1.Матеріали.....	49
2.1.1.Штами вільноживучих амеб (акантамеб).....	49
2.1.2. Штами бактерій та грибів.....	49
2.1.3. Поживні середовища.....	50
2.1.4. Досліджувані хімічні сполуки.....	51
2.2.Методи дослідження.....	53
2.2.1.Мікроскопічні метод	53
2.2.2 Культуральні методи.....	56
2.2.3.Вивчення ексцистування акантамеб	57

2.2.4.Визначення патогенного потенціалу акантамеб з використанням термо- та осмотолерантного тестів	57
2.2.5.Бляшкоутворення вільноживучих амєб	58
2.3.Визначення цитотоксичної дії досліджуваних сполук на лінії культур клітин HEp-2C	63
2.4.Статистична обробка отриманих результатів	64
РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АКАНТАМЕБ: МОРФОЛОГІЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ	66
3.1.Виділення акантамеб з бентонітових глин та ґрунтів України	66
3.2.Дослідження морфології та структури досліджуваних штамів акантамеб.	67
3.3.Дослідження процесу екзистування акантамеб.....	75
3.4.Культивування досліджуваних акантамеб	78
3.5.Характеристика бактеріальних ізолятів, що використовувались для культивування досліджуваних акантамеб	81
3.6.Феномен бляшкоутворення	85
3.7.Визначення патогенного потенціалу виділених акантамеб.....	87
3.8.Генотипування та філогенетичний аналіз досліджуваних акантамеб.....	89
РОЗДІЛ 4. АКАНТАМЕБИ ЯК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИСТОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ.....	93
4.1. Дифузійні методи визначення протистоцидної активності.....	94
4.2. Метод редукції бляшок в кількісному варіанті.....	97
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИСТОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ХІМІЧНИХ СПОЛУК ГРУПИ 1-АЛКІЛ(АРИЛ)ОКСИ-3-АМІНО-2-ПРОПАНОЛІВ	100
5.1.Скринінгове дослідження протистоцидної активності хімічних сполук..	100
5.2.Аналіз протистоцидної активності найефективніших сполук	102

5.3.Визначення цитотоксичності досліджуваних хімічних сполук	104
5.4.Мінімальна інгібуюча концентрація найактивніших хімічних сполук.....	109
5.5.Визначення цистоцидної активності п'яти найперспективніших хімічних сполук	112
5.6.Спектр антибактеріальної та протигрибкової активності обраних сполук	114
5.7.Зв'язок хімічної структури 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів з протистоцидною активністю	115
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ....	122
ВИСНОВКИ.....	132
ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	134
ДОДАТКИ.....	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

KMIV – конфокальна мікроскопія *in vivo*

LAMP – loop mediated isothermal amplification (петлева ізотермічна ампліфікація)

NNA – non-nutrient agar, непоживний агар

mNGS – metagenomic Next-Generation Sequencing (метагеномне секвенування нового покоління).

PAS – Page’s amoeba saline, амебний розчин Пейджа

PPYG – proteosopeptone-yeast-glucose, середовище, що містить протеозопептон, дріжджі та глюкозу

PYG – peptone-yeast-glucose, середовище, що містить пептон, дріжджі та глюкозу

АК – амебний кератит

АП – акантамебна пневмонія

БКФ – білий калькофлуор

БУО – бляшкоутворююча одиниця

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини

ВЖА – вільноживучі амеби

ГАЕ – гранулематозний амебний енцефаліт

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЗРБ – зона редукції бляшок

КУО – колонієутворююча одиниця

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

МТТ – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразолію бромід

НК – нуклеїнова кислота

ОЩ – оптична щільність

ПАМ – первинний амебний менінгіт/менінгоенцефаліт

ПГМБ – полігексаметиленбігуанід

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

рРНК – рибосомальна РНК

СНІД – синдром набутого імунодефіциту

СЕМ – скануюча електронна мікроскопія

ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія

ЦПЕ – цитопатичний ефект

ВСТУП

Актуальність теми. Вільноживучі амеби (ВЖА) – це група еукаріотичних мікроорганізмів, які мешкають у різних природних середовищах, зокрема у ґрунті, прісних та солоних водоймах, а також у штучних біотопах (водопровідній воді, системах кондиціонування тощо) [1–4]. Крім загальної мікробіології, вони є важливими об'єктами досліджень у медичній мікробіології, екології та паразитології. Основними представниками умовно-патогенних ВЖА є роди *Acanthamoeba*, *Naegleria Balamuthia* та *Sappinia*, які здатні спричиняти тяжкі системні захворювання у людини за певних умов, наприклад, при ослабленому імунітеті. Також відомі роди *Vermamoeba*, *Protacanthamoeba* та *Paravahlkampfia*, які менш вивчені, проте мають потенційну роль в патології людини [5].

У умовах воєнного стану в Україні проблема інфекційної безпеки стає особливо актуальною. Військовослужбовці часто змушені тривалий час контактувати з ґрунтом під час копання окопів, проживання у бліндажах та виконання польових завдань. Для дотримання гігієни вони нерідко використовують відкриті водойми – річки чи озера – без гарантії їхньої мікробіологічної безпеки. Сукупність цих чинників у поєднанні з ослабленням імунної системи, що спричинене довготривалим перебуванням у несприятливих санітарно-гігієнічних умовах, значно підвищує ризик зараження вільноживучими амебами.

Контактний шлях є провідним механізмом інфікування акантамебами, що обумовлює значний ризик їхнього проникнення в організм людини при взаємодії з контамінованими водними об'єктами, ґрунтом або інфікованими поверхнями. Найбільшу клінічну значущість мають представники роду *Acanthamoeba*, які здатні спричиняти ураження рогівки з розвитком амебного кератиту. Дане захворювання найчастіше реєструється серед користувачів контактних лінз, оскільки їх розвиток тісно пов'язаний із порушенням правил догляду за лінзами. До основних чинників ризику належать недостатня гігієна та потрапляння води в око під час носіння лінз, що створює умови для контамінації та подальшої колонізації акантамебами [6]. Окрім локальних інфекцій, *Acanthamoeba* spp. можуть бути етіологічним чинником тяжких генералізованих патологій, зокрема ГАЕ та ПАМ, які характеризуються

агресивним перебігом і високим рівнем летальності [7]. Особливо небезпечними дані мікроорганізми є для пацієнтів з імунodefіцитними станами (ВІЛ/СНІД, онкологічні та аутоімунні захворювання та ін.), оскільки вони здатні викликати неспецифічні ураження різних органів та систем [8].

Клінічні прояви акантамебних інвазій не є специфічними, в більшості випадків симптоми подібні до бактеріальних, вірусних або грибкових уражень, саме тому діагностика даних захворювань є ускладненою [6]. Для лабораторного підтвердження інвазій застосовують комплекс методів, серед яких мікроскопічні, культуральні та молекулярно-генетичні. Найбільш чутливим і швидким інструментом вважається полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), що дозволяє з високою точністю ідентифікувати етіологічну роль конкретного виду акантамеб у розвитку захворювання [9–11].

Лікування пацієнтів з підтвердженою акантамебною інвазією надзвичайно складне, оскільки жодних протоколів лікування даних захворювань та етіотропних препаратів не існує. Зазвичай медикаментозне лікування призначається відповідно до наукових публікацій, в яких описані ексклюзивні схеми лікування, препарати та дозування, що призводили до одужання пацієнтів [12]. Ускладнює лікування той факт, що цисти акантамеб є надзвичайно стійкими до впливу різних хіміотерапевтичних препаратів, а необхідні дозування, що здатні згубно діяти на стійкі форми найпростіших, є токсичними для організму людини [13, 14]. Зазвичай для лікування використовують наступні препарати: мілтефозин (етіотропний препарат для лікування лейшманіозу), антибіотики (поліміксин В, неоміцин, сульфадіозин), антисептики (діамідини, бігуаніди, хлорексидин, повідон-йод), антимікотики (амфотерицин В, вориконазол, клотримазол, міконазол) та стероїди. За наявності показань та відповідних умов, можуть також застосовуватись хірургічні методи лікування. Окремі літературні джерела повідомляють про ефективність альтернативних підходів до терапії акантамебних інфекцій, зокрема із використанням рослинних екстрактів, наночастинок срібла та інших металів, а також різних хіміотерапевтичних агентів, що демонструють здатність інгібувати ріст та життєдіяльність акантамеб [15–17].

Отже, вільноживучі амеби, зокрема представники роду *Acanthamoeba*, є серйозною загрозою для здоров'я людини, особливо в умовах ослабленого імунітету та незадовільної санітарної обстановки. Військові, які перебувають у польових умовах, зазнають підвищеного ризику інфікування, оскільки постійний контакт із забрудненим середовищем сприяє проникненню акантамеб в організм. Діагностика акантамебних інвазій є складною через неспецифічність клінічних проявів, а лікування ускладнюється відсутністю стандартних терапевтичних протоколів та стійкістю цист до більшості відомих хіміотерапевтичних засобів. Важливе наукове і практичне значення має використання акантамеб, які можна культивувати в лабораторних умовах, як моделі для відбору протистоксидних препаратів для лікування акантамебних та інших протозойних інвазій, поширених у певних регіонах світу (кишковий амебіаз, трохомоніаз, тощо). Саме тому наші дослідження були спрямовані на розробку ефективних методик визначення протистоксидної активності перспективних терапевтичних засобів, що має на меті покращити результати лікування пацієнтів з акантамебними та, можливо, іншими протозойними захворюваннями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дана наукова робота виконувалась як фрагмент ініціативно-пошукової науково-дослідної роботи кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Взаємодія акантамеб з кишковими вірусами людини та бактеріофагами в умовах експерименту», державний реєстраційний номер 0117U002260.

Мета дослідження: вивчення біологічних особливостей акантамеб виділених з навколишнього середовища (бентонітових глин та ґрунту), розробка методів для визначення амебоцидної активності нових хімічних сполук в умовах експерименту.

Завдання:

1. Дослідити морфологічні та культуральні властивості акантамеб, ізольованих з навколишнього середовища (бентонітові родовища та ґрунт) України.

2. Здійснити молекулярно-генетичну ідентифікацію акантамеб та бактеріальної культури, що використовується для їх культивування, шляхом секвенування генів рРНК та визначити їх філогенетичне положення.
3. Розробити методику визначення чутливості акантамеб до протистоцидних препаратів і провести скринінгове дослідження антиакантамебної активності хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів (в рамках договору про співпрацю з інститутом органічної хімії НАН України).
4. Оцінити цитотоксичність відібраних речовин з найбільшою амебоцидною активністю на культурі клітин НЕр-2С.
5. Встановити зв'язок між хімічною структурою сполуки та її протистоцидною активністю.

Предмет дослідження: біологічні властивості акантамеб, протистоцидна активність хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів.

Об'єкт дослідження: вільноживучі найпростіші роду *Acanthamoeba* виділені з ґрунту та бентонітових глин України.

Методи дослідження:

Для вивчення акантамеб, виділених з навколишнього середовища та дослідження протистоцидної активності хіміотерапевтичних сполук застосовували наступні методи:

- 1) Мікроскопічні: світлова, фазово-контрастна та електронна (трансмісійна та скануюча) мікроскопія – дослідження морфологічних особливостей акантамеб.
- 2) Протистологічні та бактеріологічні – моноксенічне культивування акантамеб на газоні бактерій та в товщі напіврідкого поживного агару, визначення амебоцидної активності хіміотерапевтичних сполук.
- 3) Молекулярно-генетичні (генотипування та секвенування ДНК досліджуваних культур бактерій і акантамеб, їх філогенетичний аналіз).
- 4) Вірусологічні (культивування культур клітин та визначення цитотоксичної дії досліджуваних сполук).
- 5) Статистичні (математична обробка отриманих результатів).

Наукова новизна отриманих результатів. У ході дослідження вперше в Україні виявлено вільноживучі амеби у бентонітових глинах та ґрунтах. Це є першим документально підтвердженим випадком виділення таких найпростіших із бентонітових відкладень на території України, що суттєво розширює уявлення про їх біорізноманіття та екологічну пластичність у специфічних біогеологічних умовах. Акантамеби, ізольовані з глин, продемонстрували низку унікальних морфологічних та культуральних характеристик, які забезпечують їхню здатність до тривалого виживання у глинистому середовищі. Це відкриває нові перспективи для вивчення механізмів екологічної адаптації найпростіших до екстремальних умов існування.

Вперше було ізольовано та використано бактерії роду *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1* для моноксенічного культивування акантамеб. Їх застосування, у якості бактеріального субстрату, є інноваційним підходом у протистологічних дослідженнях, що дозволяє відтворити умови природного середовища й підвищити ефективність культивування. Використання даних бактеріальних ізолятів створює основу для подальшого вдосконалення методик моноксенічного вирощування найпростіших. За допомогою секвенування ДНК та генотипування визначено родову приналежність акантамеб та бактерій, що використовувались нами для моноксенічного культивування досліджуваних найпростіших. Отримані нуклеотидні послідовності депоновано в міжнародну базу GenBank, що забезпечує їх відкритий доступ для наукової спільноти.

Для визначення чутливості акантамеб до протистоцидних препаратів було апробовано кілька методичних підходів, зокрема модифіковані варіанти дифузійних тестів і метод редукції бляшок. У результаті детальних досліджень розроблено оригінальну методику, яка поєднує лунко-дифузійний метод із феноменом бляшкоутворення. Саме така комбінація виявилася найбільш оптимальною, оскільки дозволяє отримати не лише якісну, але й кількісну оцінку амебоцидної дії хіміотерапевтичних речовин у простій, наочній і відтворюваній системі. Використання феномену бляшкоутворення, що відображає здатність акантамеб руйнувати бактеріальний шар в товщі і на поверхні 0,7% поживного

агару, стало ключовим індикатором життєздатності клітин даних найпростіших. Натомість, в зоні дифузії досліджуваних сполук з амебоцидними властивостями спостерігається інгібування утворення бляшок.

Вперше за допомогою цієї методики було досліджено протистоцидну активність хімічних речовин з групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, синтезованих в Інституті органічної хімії НАН України (договір про науково-практичну співпрацю від 01.07.2024 р.), на життєдіяльність вільноживучих амеб роду *Acanthamoeba* sp. У результаті проведеного скринінгу відібрано найбільш активні сполуки, що проявили виражену амебоцидну дію в поєднанні з низькою цитотоксичністю. Це свідчить про перспективність даних речовин як прототипів для створення нових хіміотерапевтичних препаратів, орієнтованих на лікування акантамебних інвазій.

Отримані результати мають значне прикладне значення у фармакології та медицині, а також вагомий науковий потенціал. Вони розширюють знання про біологічні властивості вільноживучих амеб, поглиблюють уявлення про їх взаємодію з різними хімічними агентами та відкривають нові перспективи для розробки біотехнологічних і терапевтичних стратегій.

Практичне значення отриманих результатів. На основі результатів дисертаційного дослідження розроблено методичні рекомендації, які вже впроваджені в навчальний процес кафедр мікробіології та паразитології медичних університетів України. Це дало змогу підвищити якість підготовки майбутніх лікарів, забезпечивши їх сучасними знаннями про біологічні властивості, екологію та патогенний потенціал вільноживучих амеб. Практичне застосування розроблених методик у навчанні дозволяє студентам відпрацьовувати навички роботи з найпростішими, засвоювати методи їх культивування та ідентифікації, що підвищує рівень лабораторної підготовки.

Застосування бактерій роду *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*, у якості живильного бактеріального субстрату для культивування акантамеб має суттєве прикладне значення. Використання цього підходу в лабораторній практиці дає змогу ефективно працювати з акантамебами, удосконалює підходи до їх

культивування та створює підґрунтя для впровадження методики у діагностику захворювань, спричинених акантамебами.

Методи молекулярно-генетичної ідентифікації, описані в роботі, можуть бути інтегровані у практику клінічних лабораторій для точної ідентифікації збудників інфекційних захворювань. Це особливо актуально для діагностики акантамебних інвазій, які часто мають неспецифічну клінічну картину та важко піддаються диференціації від бактеріальних, грибкових чи вірусних уражень.

Не менш важливим практичним результатом є розробка та впровадження вдосконаленої методики визначення протистоцидної активності хіміотерапевтичних препаратів щодо досліджуваних штамів *Acanthamoeba* spp. Запропонований підхід – комбінація лунко-дифузійного методу з феноменом бляшкоутворення – відзначається специфічністю, відтворюваністю та легкістю для рутинного скринінгу біологічно активних сполук із протистоцидною активністю.

Водночас, виявлення хімічних сполук із вираженою протистоцидною дією та низькою цитотоксичністю становить вагомий практичний інтерес. Отримані результати створюють підґрунтя для розробки нових лікарських засобів, орієнтованих на лікування акантамебних інвазій.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою самостійно виконано комплексний інформаційно-патентний пошук та опрацьовано сучасну наукову літературу за напрямом дослідження, що свідчить про ґрунтовну теоретичну підготовку та глибоке опанування наукової проблематики. У процесі виконання експериментальної частини роботи здобувач брала безпосередню участь у мікроскопічних дослідженнях, зокрема у вивченні морфологічних особливостей акантамеб із застосуванням світлової та електронної мікроскопії. До виконаних етапів належали приготування препаратів, мікротомія, проведення мікроскопічного аналізу та отримання електронно-мікроскопічних знімків, що підтверджує належне володіння мікроскопічними методиками та високий рівень експериментальних навичок.

Окрему частину роботи становило виділення ДНК із культур акантамеб та ізольованих бактерій, а також підготовка зразків до подальшого секвенування. Ці

етапи здійснювалися у тісній співпраці з кандидатом медичних наук, доцентом Понятовським В.А., за що дисертантка висловлює щирю вдячність. Секвенування отриманих нуклеотидних послідовностей було виконано на базі Варшавського медичного університету, і автор висловлює глибоку подяку професору, доктору габілітованому, завідувачу кафедри мікробіології та паразитології Університету Кардинала Стефана Вишинського у Варшаві (Польща) Саламатіну Р.В. за надану допомогу.

Дослідження протистоцидної активності та оцінка цитотоксичності хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолу проводилися дисертантом у співпраці з науковим керівником. Щирю вдячність автор висловлює кандидату фармацевтичних наук, завідувачу відділу трансферу технологій, інноваційної діяльності та інтелектуальної власності Інституту органічної хімії НАН України, Короткому Ю.В. за надані хімічні речовини для досліджень.

Усі етапи планування, постановки експериментів, інтерпретації результатів, а також написання дисертаційної роботи здійснювалися за безпосередньої участі наукового керівника – завідувача кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології, академіка НАН і НАМН України, д.м.н., професора Широбокова В.П., якому автор висловлює глибоку вдячність, а також щиро дякує всім колегам, які долучилися до реалізації цього дисертаційного дослідження.

Апробація результатів дисертаційного дослідження. Основні наукові положення та результати дослідження були представлені на конференціях: «Мікробіологія і вірусологія – сучасний стан і перспективи» присвячені 90-річчю від дня заснування Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України (25-26 вересня 2018, Київ); The 25th Congress of the Polish Parasitological Society, Warsaw, Poland (September 9th-12th, 2019); Науковій конференції “Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології” присвяченої 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України, (5 листопада 2019 року, м. Київ, Україна); Третьому національному форумі імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини,

присвячений 135-річчю ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України (за участю міжнародних спеціалістів), (20-21 травня 2021 року, м. Харків, Україна); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «МЕЧНИКОВСЬКІ ЧИТАННЯ – 2024» (1 листопада 2024 року, м. Харків, Україна); 35th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID Global 2025, 11 – 15 April 2025, Vienna, Austria).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових праць, з них 5 статей, 3 – в закордонних виданнях, 1 – в українському виданні, що входять до наукометричної бази Scopus та 5 тез (2 у виданнях країн Європейського союзу).

Структура і обсяг дисертації. Основний текст дисертації викладено на 178 сторінках друкованого тексту (основний текст 133 сторінки). Робота складається з анотації, вступу та 3 розділів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновків, та списку використаної літератури (175 посилань). Дисертація містить 27 малюнків та 5 таблиць, додатки.

РОЗДІЛ 1. ВІЛЬНОЖИВУЧІ АМЕБИ ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА (огляд літератури)

1.1. Історія відкриття вільноживучих амеб

Вільноживучі одноклітинні еукаріоти, що належать до царства *Protozoa*, становлять значний інтерес для науковців-протистологів. Вони були ізольовані з низки об'єктів навколишнього середовища. У взаємодії з бактеріями найпростіші можуть діяти як хижаки або симбіонти, а в організмах тварин і людини – як збудники інфекційних захворювань (інвазій).

Термін «амеби» охоплює найбільш різноманітну групу найпростіших, яка досліджується вже більше сотні років. Серед великого різноманіття вільноживучих амеб лише чотири роди здатні спричиняти захворювання серед людей та тварин: *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* та *Sappinia* [18].

Найпростіших роду *Acanthamoeba* вперше виявив Castellani в 1930 році як контамінантів культури дріжджеподібних грибів *Cryptococcus pararoseus* [19]. Первинно їх було названо *Hartmannella castellanii*, а вже за рік, після детальних морфологічних досліджень, встановлено, що трофозоїти акантамеб мають шипоподібні вирости – акани, а цисти характеризуються подвійною стінкою з нерівною поверхнею ектоцисти, яка відрізняється від гладкої та округлої стінки цист *Hartmannella* spp. [20]. Відповідно до цих відмінностей вид отримав сучасну назву – *Acanthamoeba castellanii*.

У 1899 році Schardinger відкрив амеби роду *Naegleria* і назвав їх *Amoeba gruberi*. Пізніше у 1912 році Alexeieff запропонував назву *Naegleria* [21]. Після відкриття ПАМ в Австралії у 1965 році Malcom Fowler надав збуднику остаточну назву *Naegleria fowleri*. Згодом у 1966 р. Butt, а потім у 1968 р. Carter описали захворювання, яке назвали «первинний амебний менінгоенцефаліт», а також диференціювали його від рідкісної інвазії мозку, спричиненої *Entamoeba histolytica* [22].

Наступні дослідження дали змогу ізольовати амебу, яка не реагувала на антисироватку, виготовлену проти окремих представників родів *Acanthamoeba* та

Naegleria, а також *E. histolytica*. Це дозволило диференціювати нещодавно ідентифікований мікроорганізм від відомих збудників амебного енцефаліту у людей. Згодом Govinda S. Visvesvara назвав цю амебу *Balamuthia mandrillaris* на честь свого покійного наставника William Balamuth та тварини, від якої було вперше виділено даних найпростіших – мандрила. Секвенування 18S рРНК і філогенетичний аналіз підтвердили, що це окремий рід і вид, тісно пов'язані з родом *Acanthamoeba* [23].

У подальших дослідженнях у таксонах амебоїдних організмів було виявлено нових представників родів – *Sappinia* та *Thecamoeba* (Amoebozoa, Discosea, Thecamoebida). Для цих форм характерна наявність парних ядер (здебільшого однієї пари), а їхні локомоторні стадії представлені моноподіальними, язичкоподібними або овальними амебами з вираженими бічними виростами (зморшками) уздовж клітини. *Sappinia diploidea* була вперше описана як *Amoeba diploidea* Гартманом і Неглером (1908), у подальших класифікаційних дослідженнях Alexeieff запропонував віднести вид до роду *Sappinia* (1912). У 2001 році *Sappinia* була ідентифікована як збудник захворювань нервової системи, що спричиняє амебний енцефаліт [24]. Отже, вільноживучим амебам притаманне велике різноманіття, як в таксономічному відношенні, так і в біологічних властивостях.

1.2. Поширеність вільноживучих амеб в навколишньому середовищі

Найпростіші роду *Acanthamoeba* мають убіквітарне поширення. Вони здатні виживати в різних середовищах, навіть при незначній кількості поживних речовин та кисню. Основним об'єктом, з якого були ізольовані дані найпростіші, є вода, а саме річки, озера, моря, лагуни, ставки та інші водойми, а також стічні води. Крім того, повідомляється про виділення вільноживучих амеб з водопровідної води, а також плавальних басейнів [1, 4, 25–33]. Їх поширеність у водних мережах, найімовірніше, пов'язана з формуванням біоплівки, у межах яких акантамеби співіснують з іншими мікроорганізмами. Такі мікробні спільноти слугують для найпростіших харчовим субстратом. З іншого боку, вільноживучі амеби певною мірою забезпечують бактеріям захист, виконуючи роль природного резервуара.

[34]. До основних місць перебування акантамеб також відносяться: пил, ґрунт та повітря, а саме вентиляційні канали та системи кондиціонування [35–38].

Експериментальні дослідження продемонстрували присутність акантамеб в медичних закладах: водопровідній мережі лікарень, стоматологічних установах, душових кабінах, що використовуються при наданні екстреної допомоги та апаратах для гемодіалізу [37, 39, 40]. Крім об'єктів зовнішнього середовища, культуру акантамеб можна виділити з клінічного матеріалу (ліквор, слиз, сльози, бронхоальвеолярна рідина) від хворих на кератит, енцефаліт та інші акантамебні захворювання [41–43].

1.3. Класифікація вільноживучих амеб

Таксономічне положення вільноживучих амеб було переглянуто декілька разів відповідно до критеріїв сучасної систематики. Спираючись на класифікацію, запропоновану Міжнародним товариством протистологів, ці мікроорганізми було поділено на так звані "супергрупи". *Acanthamoeba* та *Balamuthia* віднесено до супергрупи Amoebozoa (Discosea: Centramoebida), і вони утворюють родину *Acanthamoebidae*, яка включає *Protacanthamoeba* та три інші, нещодавно ідентифіковані, роди вільноживучих амеб: *Luapeleamoeba*, *Dracoamoeba* та *Vacuolamoeba* [44]. *Naegleria fowleri* відноситься до супергрупи Excavata: Heterolobosia: *Vahlkampfiidae*, а *Sappinia* до Amoebozoa: Flabellinea: *Thecamoebidae* [45].

1.4. Морфологічні особливості акантамеб

Назва *Acanthamoeba* походить від грец. "*acanth*" – "шипи", що означає наявність на поверхні цих амеб виростів (акантоподій) [19].

Загалом, життєвий цикл акантамеб складається з двох стадій: трофозоїт і циста. Стадія трофозоїту переважає, коли наявні сприятливі умови для росту, такі як: достатня кількість поживних речовин, нейтральний рН, відповідна температура (~30°C) та осмолярність (50-80 мОсм/л). Трофозоїти акантамеб в основному живляться бактеріями, мікроскопічними водоростями, дріжджами або дрібними органічними частинками шляхом фагоцитозу або піноцитозу та утворюють багато харчових вакуолів в цитоплазмі. Розмноження акантамеб відбувається у

вегетативній фазі їхнього розвитку та здійснюється шляхом мітотичного поділу за оптимальних умов існування [46].

Розмір трофозоїта варіює від 25 до 40 мкм в діаметрі, форма зазвичай довга, овальна або неправильна. Цитоплазматична мембрана складається з білків (33%), фосфоліпідів (25%), стеринів (13%) та ліпофосфогліканів (29%). Основними ланцюгами жирних кислот в акантамеб є олеїнові кислоти (40-50%) та інші поліненасичені жирні кислоти (20-30%). Глюкоза становить близько 60% усіх вуглеводів у складі плазматичних мембран і клітини в цілому [46]. Трофозоїт має кілька голчастих або остистих псевдоподій, відомих як акантоподії, що поширюються на всю поверхню клітини. Акантоподії надають трофозоїту характерний вигляд, беруть участь у живленні, пересуванні та відповідають за адгезію до поверхні. Акантамеби здатні рухатись за допомогою актинового цитоскелету, приблизна швидкість пересування трофозоїтів 0,8 мкм/сек. Спосіб руху аналогічний як на твердому субстраті, так і у воді. Актинові мікрофіламенти зосереджені безпосередньо під плазматичною мембраною та забезпечують структурну стійкість клітини й формування цитоплазматичних виступів [46].

Трофозоїт зазвичай має одне ядро, що становить приблизно одну шосту розміру тіла клітини. Ядерна оболонка розділена проміжком приблизно 350 Å та пронизана численними ядерними порами. Хроматин зосереджений уздовж внутрішньої поверхні оболонки ядра. Найвиразнішою структурою є ядерце – велике, щільне утворення, оточене унікальною прозорою оболонкою – *zona pellucida*. На ультраструктурному рівні трофозоїт акантамеби мало відрізняється від клітин ссавців. Він також містить різні клітинні органели, такі як мітохондрії, рибосоми, центросоми, апарат Гольджі та вакуолі. Вакуолі є помітними елементами трофозоїту. Вони існують в основному у двох окремих системах: одна – скорочувальна вакуоль, яка бере участь у клітинній осмотичній регуляції, а інша – травна, в якій розкладаються частинки, що надходять всередину клітини. Скоротливу вакуоль можна відрізнити від травної за відсутністю флокулентного вмісту при електронно-мікроскопічному дослідженні. Окрім скорочувальних і

травних, у цитоплазмі також можна спостерігати інші типи вакуоль, більшість з них містять глікоген [47].

Період зниження швидкості росту та перехід у спокійні цисти (інцистування) дозволяє акантамебам витримувати несприятливі умови та захищати себе від факторів зовнішнього середовища, таких як нестача поживних речовин, висихання та коливання температур [48]. Вони витримують низькі температури, ультрафіолетове випромінювання, зміни осмотичного тиску, зміни вологості та рН, а також відсутність органічних і неорганічних сполук [8]. Цисти акантамеб – це фаза спокою зі значним зниженням метаболічної активності, що дозволяє зберігати енергію і витримувати тривалі періоди без активного харчування та розмноження [49]. Стійкість цист дозволяє акантамебам поширюватися в довкіллі та/або слугувати резервуаром для інших патогенів [50].

Форма цист варіабельна, більшість із них – округлі, діаметром близько 13-20 мкм. Стінка цисти має двошарову будову: внутрішній шар – ендоциста (*endocyst*, внутрішня оболонка цисти) та зовнішній шар – ектоциста (*ectocyst*, зовнішня оболонка цисти), між якими розташований міжоболонковий простір. Ектоциста та ендоциста з'єднуються в ділянках остіолів – пор, що виконують функцію сенсорних структур для моніторингу умов навколишнього середовища. Кожна остіола закрита кришечкою (оперкулюмом), яка видаляється під час ексцистування, забезпечуючи вихід трофозоїта. Зовнішній шар стінки цисти утворений нерозчинними білками та полісахаридами, включно з целюлозою, і виконує захисну функцію. Ендоциста, розташована під ектоцистою, складається переважно з целюлози та забезпечує механічну цілісність цисти й захист трофозоїта, який перебуває всередині. Міжоболонковий простір заповнений білками, ліпідами, вуглеводами та невеликою кількістю целюлози, що додатково зміцнює стінку цисти. При цьому ендоциста зазвичай має більшу товщину, тоді як ектоциста тонша та зморшкувата. Основним полісахаридом стінки цисти акантамеб є целюлоза, проте наявність інших вуглеводів не виключається, зокрема описано наявність хітину, а також із β -1,3- та β -1,4-глюканів. Морфологічні особливості стінок цист є видовими та родовими діагностичними ознаками [51]. За сприятливих

умов трофозоїти вивільняються зі стінок цисти та починають активно ділитися, тим самим розпочинаючи вегетативний цикл розвитку.

Найчастіше морфологію акантамебних цист та трофозоїтів досліджують за допомогою мікроскопічних методів: світлова мікроскопія з різноманітними методиками фарбування, фазово-контрастна та дифракційно-інтерференційна мікроскопія. Одним з найкращих методів є електронна мікроскопія (трансмісійна та скануюча), використовуючи при цьому різні протоколи фіксації об'єкту та ультрамикротомію. При проведенні електронної мікроскопії можна візуалізувати цисти акантамеб, а також трофозоїти з ядром, мітохондріями та внутрішньоклітинними бактеріями [52].

Відповідно до класифікації Pussard & Pons (1977), рід *Acanthamoeba* поділяється на три групи (I-III), залежно від морфології цист та кількості відростків трофозоїтів (акантоподіїв). Це найбільш розповсюджений метод класифікації, за яким диференціюється більше, ніж 30 видів акантамеб [53].

Група I: У цю групу були віднесені п'ять видів: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, *A. tubiashi* та *A. byersii*. Середній діаметр цист цієї групи більше або дорівнює 18 мкм. Морфологічні особливості полягають у тому, що ектоцисти та ентоцисти широко відокремлені, зовнішня оболонка цисти злегка зморшкувата або гладка, а внутрішня – часто має зіркоподібну форму.

Група II: Ця група має відносно менші цисти із середнім діаметром менше 18 мкм. Зовнішня оболонка цисти може бути товстою або тонкою, складчастою або хвилястою, а внутрішня – має різноманітну форму (хвилясту, круглу, овальну, а також зірчасту, трикутну або чотирикутну). Ектоцисти та ентоцисти можуть бути розташовані близько один до одного або широко розділені. Це найбільш поширена група роду *Acanthamoeba* до неї відносяться 17 видів: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. mauritaniensis*, *A. triangularis*, *A. quina*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhysodes*, *A. paradiuionensis*, *A. hatchetti*, *A. diuionensis*, *A. pearcei*, *A. stevensoni*, *A. micheli*, *A. pyriformis*, *A. terricola* та *A. gigantean*. Більшість патогенних видів належать саме до цієї групи.

Група III: На даний момент група налічує вісім видів акантамеб: *A. culbertsoni*, *A. lenticulate*, *A. pustulosa*, *A. palestinensis*, *A. royreba*, *A. sohi*, *A. jacobsi*. Цисти цієї групи *Acanthamoeba* також невеликі: середній діаметр <18 мкм. Ектоциста в цій групі тонка і наближена до ендоцисти, тому зовнішню оболонку іноді важко візуалізувати. Внутрішня оболонка кругла, може мати згладжені кути [47].

1.5. Культуральні властивості акантамеб

В літературних джерелах описано декілька методів культивування акантамеб в лабораторних умовах: як аксенічно, так і моноксенічно (на бактеріальній культурі). Моноксенічну культуру зазвичай вирощують на голодному (непоживному) агарі (NNA) та агарових середовищах, що містять низьку концентрацію поживних речовин та 2% агару, розчиненого в амебному розчині Пейджа (PAS = середовище ATCC 1323). Суспензію культур бактерій *Escherichia coli* в поживному бульйоні пересівають на пластини NNA, а потім засівають акантамеби (клінічний матеріал або зразки навколишнього середовища) та інкубують при 37°C і 30°C, паралельно і щодня спостерігають за наявністю трофозоїтів. Після поглинання більшості бактерій відбувається процес інцистування [54]. За літературними даними, при моноксенічному культивуванні, у якості харчового субстрату для акантамеб, найчастіше використовують грамнегативні бактерії: безкапсульні штами *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*) та *Escherichia coli*. Як відомо, капсула у бактерій виконує антифагоцитарну функцію, тобто запобігає поглинанню клітинами імунної системи людини. Наявність мукоїдної капсули навколо бактерій також перешкоджає фагоцитозу і призводить до надмірного бактеріального росту в акантамебній популяції [55].

Акантамеби повільно адаптуються до культивування без бактерій. Аксенічне культивування можливе також на убитих різними способами прокаріотах. Описано методику культивування на пластинках «голодного» агару, покритих кишковою паличкою, що були опромінені ультрафіолетом протягом 20 хвилин [54]. Для культивування без бактерій вільноживучі амеби вирощують на збагаченому поживному середовищі з антибіотиками (пеніцилін-стрептоміцин і гентаміцин), що додаються для усунення бактеріальних контамінантів акантамеб. Основне

середовище, що використовується для аксенічного культивування *Acanthamoeba* spp., складається з протеозопептону або пептону, дріжджового екстракту та глюкози (PPYG або PYG, відповідно). При подальших дослідженнях було запропоновано низку модифікацій на основі PYG середовища, для досягнення необхідних цілей можна додавати вітаміни, амінокислоти, вуглеводи та ін. Акантамеби також можна культивувати аксенічно на моношарі тканинної культури. У кожному з цих випадків клітини тканинних культур забезпечують поживний субстрат для активно фагоцитуючих найпростіших [56, 57].

Для культивування трофозоїтів акантамеб використовують 2% середовище Bacto Casitone (Difco) із додаванням 10% бичачої сироватки за оптимальної температури росту 30°C. Вегетативні форми для експериментальних досліджень відбирають наприкінці фази експоненціального росту (72 години) після центрифугування [58]. У 2022 році Walters описав альтернативний спосіб культивування трофозоїтів аксенічно в середовищі AC6 з рН 6,6–6,95. Для отримання однорідної популяції вегетативних форм акантамеб їх культивують у свіжому середовищі AC6 протягом 24 годин. Після цього клітини відбирають, центрифугують при 500 g протягом 5 хвилин, промивають і ресуспендують у розчині Рінгера. Підрахунок клітин здійснюють за допомогою гемоцитометра [59].

Для визначення потенційної патогенності акантамеб проводять термо- та осмотолерантні тести. Термостійкість визначають на моноксенічних культурах та аксенічних культурах. Культури інкубують при 28°C, 37°C і 42°C. Для проведення осмотолерантного тесту до поживного середовища (NNA для моноксенічного і PYG для аксенічного культивування) додають різні концентрації D-маніту (0,5 М і 1,0 М).

Результати оцінюють за зоною росту акантамеб у моноксенічній культурі, починаючи з місця інокуляції, через 24–120 годин. В аксенічній культурі дані знімають щодня у період 72–168 годин інкубації, відбираючи 20 мкл гомогенізованої культури для підрахунку трофозоїтів у камері Нойбауера [60–62]. Акантамеби поділяють на три групи залежно від їхнього росту в тестах на толерантність. Штами, здатні розвиватися в гіперосмолярному середовищі та за

температури 40°C, класифікують як потенційно патогенні. Найпростіші, які здатні до росту лише в одному з тестів, відносять до групи з низьким патогенним потенціалом, а ті, що не продемонстрували здатності до росту за жодних з зазначених несприятливих умов, визначають як імовірно непатогенні [38].

1.6. Генетична ідентифікація та класифікація акантамеб

Завдяки впровадженню молекулярно-генетичних технологій стало можливим проведення філогенетичного аналізу представників роду *Acanthamoeba* шляхом дослідження нуклеотидних послідовностей гена 18S рРНК. Цей підхід відкрив нові можливості для систематики, ідентифікації та порівняльного вивчення різних ізолятів, що раніше було ускладнено через морфологічну подібність між видами.

Для ампліфікації цього гена найчастіше застосовують набір родоспецифічних праймерів, зокрема прямий праймер JDP1 та зворотний JDP2. Ця пара праймерів ампліфікує ASA.S1-ділянку гена 18S рРНК довжиною 423–551 н.п., яка кодує високо варіабельну область DF3 [28, 32, 63]. Використання цих праймерів вважається високоспецифічним для всіх генотипів *Acanthamoeba* spp. Для надійного генотипування ампліфікація здійснюється не лише в межах ASA.S1, але й у GTSA.B1-ділянці гена 18S рРНК. Остання ампліфікується праймерами CRN5 та 1137 і охоплює послідовність від 1 до 1475 нуклеотидних пар [64]. Така комбінація праймерів дозволяє отримати максимально достовірні результати щодо внутрішньовидової різноманітності акантамеб.

На сьогодні за результатами аналізу послідовності гена 18S рРНК рід *Acanthamoeba* поділяють на 23 генотипи (T1–T23). Доведено, що окремі генотипи (T1, T2, T4, T5, T10, T12 та T18) найчастіше асоційовані з розвитком ГАЕ, переважно у пацієнтів з імунodefіцитними станами. Інші генотипи (T2, T3, T4, T5, T6, T10, T11, T12 та T15) здатні спричиняти АК, який все частіше реєструється серед користувачів контактних лінз [65]. Таким чином, генотипування має не лише систематичне, але й клініко-діагностичне значення, оскільки дає змогу співвідносити певні варіанти *Acanthamoeba* spp. з ризиком розвитку специфічних форм інвазії. У таблиці 1 наведено основні генотипи та джерела виділення

найпростіших роду *Acanthamoeba*, що відображає як їх екологічну різноманітність, так і потенційний клінічний ризик.

Таблиця 1.1

Основні генотипи найпростіших роду *Acanthamoeba*

№ з/п	Генотип	Видова приналежність	Номер <i>Gene Bank</i>	Джерело (матеріал)	Посилання
1.	T1	<i>A. castellanii</i> CDC:0981:V006	U07400	Мозок пацієнта з ГАЕ	GAST et al., 1996 [66]
2.	T2	<i>A. palestinensis</i> <i>Reich</i>	U07411	Ґрунт	
3.	T3	<i>A. griffini</i>	U07412	Пляжний пісок	
4.	T4	<i>A. castellanii</i>	U07413	Культура дріжджів	
5.	T5	<i>A. lenticulata</i>	U94736	Басейн	Stothard et al., 1998 [67]
6.	T6	<i>A. palestinensis</i>	AF019063	Басейн	
7.	T7	<i>A. astronyxis</i>	AF019064	Лабораторна вода	
8.	T8	<i>A. tubiashi</i>	AF019065	Чиста вода	
9.	T9	<i>A. comandoni</i>	AF019066	Ґрунт	
10.	T10	<i>A. culbertsoni</i>	AF019067	Культура клітин людини	
11.	T11	<i>A. hatchetti</i>	AF019068	Солоня вода	
12.	T12	<i>A. healyi</i>	AF019070	Мозок пацієнта з ГАЕ	
13.	T13	<i>Acanthamoeba</i> <i>sp.</i> UWC9	AF132134	Хворі на амебний кератит	Horn et al., 1999 [68]
14.	T14	<i>Acanthamoeba</i> <i>sp.</i> PN15	AF333607	Хворі на амебний кератит	GAST et al., 2001 [69]
15.	T15	<i>A. jacobsi</i>	AY262361	Морська вода	Hewett et al., 2003 [70]
16.	T16	<i>Acanthamoeba</i> <i>sp.</i> cvX	GQ380408	Прісна вода	Corsaro et al., 2010 [71]
17.	T17	<i>Acanthamoeba</i> <i>sp.</i> TSP07/T17	JF325889	Ґрунт	Magliano et al., 2012 [72]

18.	T18	<i>Acanthamoeba</i> <i>sp.</i> CDC:V621	KC822470	Мозок пацієнта з ГАЕ	Qvarnstrom et al., 2013 [73]
19.	T19	<i>Acanthamoeba</i> <i>sp.</i> USP-AWW- A68	KJ413084	Вода з очисних споруд	Magnet et al., 2014 [74]
20.	T20	<i>Acanthamoeba</i> <i>sp.</i> OSU 04-020	DQ451160	Печінка тукана	Visvesvara et al., 2007 [75]
21.	T21	<i>A. pyriformis</i>	KX840327	Опале листя	Tice et al., 2016 [76]
22.	T22	<i>A. royreba</i>	CDEZ00000 000.1	–	За даними GenBank [77]
23.	T23	<i>A. bangkokensis</i> <i>sp. nov.</i>	MZ272148 MZ272149	Громадські джерела прісної води	Putaporntip et al., 2021 [78]

1.7. Акантамебні інвазії, їх діагностика та лікування

Інфекційні захворювання, спричинені вільноживучими амебами роду *Acanthamoeba*, становлять серйозну загрозу для здоров'я людини, особливо для осіб з ослабленим імунітетом. Вони є збудниками акантамебного кератиту, гранулематозного акантамебного енцефаліту та первинного амебного менінгоенцефаліту, а також можуть спричиняти ураження легень, шкіри, кісток та інших органів [8, 12, 79, 80]. АК – небезпечне для зору захворювання рогівки, частота якого зростає, особливо серед користувачів контактних лінз (до 85% випадків). Фактори ризику АК включають недостатню гігієну лінз, купання в них та використання забрудненої води для їх промивання [6], [81]. Шкірний акантамебіаз діагностується рідко, переважно у імунокомпрометованих пацієнтів, і може проявлятися некротичними ураженнями шкіри. Для діагностики зазвичай застосовують молекулярно-генетичні методи, зокрема метагеномне секвенування нового покоління (mNGS) [82]. Акантамебна пневмонія проявляється неспецифічними симптомами, такими як втрата ваги, утруднене дихання та інтерстиціальні зміни на рентгенограмах. Діагностику цього стану часто встановлюють посмертно – під час дослідження бронхоальвеолярної рідини або біопсії легеневої тканини [83]. ГАЕ – важке захворювання з летальними наслідками. Клінічні прояви включають зміни психічного стану, судоми, атаксію, ригідність

потиличних м'язів та інші неврологічні порушення, що часто призводять до смерті через підвищення внутрішньочерепного тиску. ГАЕ переважно розвивається у осіб із пригніченим імунітетом: пацієнти на кортикостероїдній терапії, з аутоімунними захворюваннями, ВІЛ/СНІДом або після трансплантації органів. У таких випадках дана інвазія прогресує від безсимптомного перебігу до дисемінованої форми з ураженням багатьох органів, що часто завершується летально [84].

Діагностика акантамебних інвазій залишається складним завданням через відсутність специфічних клінічних проявів, що часто імітують симптоматику бактеріальних, вірусних і грибкових інфекцій. Додатковим ускладнюючим чинником є низька обізнаність лікарів щодо цих рідкісних, але небезпечних захворювань.

Для підтвердження ролі акантамеб у етіології захворювання необхідна спеціалізована лабораторна діагностика. У разі АК матеріалом для дослідження є зішкріб із рогівки, а іноді – контактні лінзи або розчин для їх промивання [11]. При ураженнях мозку зазвичай досліджують зразки спинномозкової рідини (ліквору) та/або проводять біопсію тканин мозку [85].

Основними методами лабораторного дослідження є мікроскопічний, протистологічний (культивування збудника) і молекулярно-генетичний. Кожен із цих методів має свої переваги, недоліки та певні складнощі у виконанні. Мікроскопія дозволяє візуалізувати збудника в матеріалі, отриманому від хворого. Для світлової мікроскопії мазки забарвлюють за методом Романовського-Гімзи, а для зішкрібів із рогівки часто застосовують фарбування білим калькофлуором (БКФ) або за Грамом [86]. Метод конфокальної мікроскопії *in vivo* (КМІV) забезпечує неінвазивне виявлення гіперрефлексивних цист і трофозоїтів, однак його діагностична ефективність значною мірою залежить від кваліфікації спеціаліста та має обмежену доступність [87].

Класичним підходом до культивування акантамеб є використання непоживного агару, покритому шаром *Escherichia coli*. Бактеріальний шар слугує основним джерелом живлення для трофозоїтів і водночас забезпечує необхідні умови для їхнього розвитку. У процесі росту на такому середовищі акантамеби

залишають характерні сліди їхнього пересування по бактеріальному шару, що полегшує візуальну ідентифікацію їхньої присутності. Попри технічну простоту та економічність, цей метод має певні обмеження: його діагностична чутливість становить лише 33,3–66,7%, а для формування достатньо вираженого результату необхідний тривалий період інкубації, який може сягати 10 діб [88], [89].

Найбільш чутливим методом діагностики є ПЛР-тест на виявлення ДНК збудника, який вважається найбільш точним та достовірним [85]. Сучасні методи ПЛР, такі як LAMP, гніздова ПЛР та наноПЛР, забезпечують високу точність діагностики, а мультиплексна ПЛР дозволяє одночасно виявляти декілька збудників [88].

Лікування акантамебних інвазій є завжди викликом для лікаря, оскільки підібрати ефективний метод терапії досить складно. Уніфікованих схем лікування акантамебних інвазій закріплених певними протоколами, що затверджені Всесвітньою організацією охорони здоров'я або іншими міжнародними організаціями, на сьогодні не існує. Клінічні випробування для оцінки порівняльної ефективності схем лікування не проводилися через низьку щорічну захворюваність на ці хвороби та труднощі у встановленні діагнозу. Відповідно, експертні рекомендації ґрунтуються, насамперед, на ретроспективних оглядах окремих клінічних випадків із емпіричним застосуванням певних хіміотерапевтичних засобів, які дали позитивний ефект.

Ефективність лікування АК залежить від здатності препарату досягати цільової тканини, виходячи за межі захисного бар'єру ока. Схема лікування зазвичай включає діамідини (пропамідин-ізетіонат, гексамідин-діізетіонат), бігуаніди (полігексаметиленбігуанід, хлоргексидин), антибіотики (неоміцин), повідон-йод, мілтефозин та протигрибкові засоби (міконазол, клотримазол, вориконазол) [9]. Для лікування ГАЕ емпірично використовують комбінації препаратів, таких як ліпосомальний амфотерицин В, триметоприм-сульфаметоксазол, флуконазол, альбендазол, азитроміцин, рифампіцин та мілтефозин [90].

Акантамебні інвазії становлять серйозну загрозу для здоров'я людини через високу летальність та неспецифічність клінічних проявів. Їхнє виявлення є складним процесом, що потребує високої кваліфікації медичного персоналу та застосування спеціалізованих лабораторних методик, а лікування ускладнюється відсутністю уніфікованих терапевтичних протоколів.

1.8. Методичні підходи до визначення амебоцидної активності природних та синтетичних речовин

Протистоцидна активність лікарських засобів є предметом інтенсивних досліджень у всьому науковому світі. Це обумовлено зростанням поширеності протозойних інвазій, які становлять серйозну загрозу для здоров'я людини. Згідно з сучасними літературними даними, антипротозойною активністю володіють як традиційні хіміотерапевтичні препарати (наприклад, антибактеріальні, протигрибкові та антипаразитарні засоби), так і нові синтетичні сполуки, а також екстракти різноманітних рослин. Останні розглядаються як перспективна альтернатива класичним лікарським засобам [91–94].

Сучасні дослідження лікарських засобів передбачають комплексну оцінку протистоцидної активності за допомогою низки експериментальних підходів, включаючи методи *in vitro* та *in vivo*, а також їх комбінації. Серед лабораторних методів дослідження особливе значення мають *in vitro* тести на мікророзведення, зокрема бульйонний та агаровий методи, які дозволяють точно визначати ключові фармакологічні параметри – мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) та мінімальну протистоцидну концентрацію (МПК) досліджуваних сполук.

Важливість таких досліджень пояснюється особливостями життєвого циклу патогенних найпростіших, які перебувають у двох основних формах: активній (трофозоїти) та спокійній (цисти). Така диморфність зумовлює необхідність оцінки дії потенційних препаратів на обидві стадії розвитку протистів. Особливої уваги заслуговує цистоцидна активність, оскільки саме цисти демонструють підвищену стійкість як до впливу навколишнього середовища, так і до більшості антипротозойних засобів. Ця резистентність значно ускладнює лікування протозойних інвазій, що обумовлює нагальну потребу у створенні нових, більш

ефективних медикаментів. З огляду на клінічну значущість цистових форм, сучасні наукові розробки зосереджуються на методах, які дозволяють одночасно аналізувати вплив досліджуваних речовин на обидві морфологічні форми акантамеб. Такий інтегрований підхід сприяє отриманню більш повної оцінки потенціалу нових препаратів та підвищує ймовірність їх клінічного успіху.

У дослідженні Watcharapong Mitsuwan et al. було описано метод визначення амебоцидної активності проти *Acanthamoeba triangularis*, заснований на мікророзведенні у рідкому середовищі з використанням 96-лункових планшетів. До кожної лунки вносили по 100 мкл суспензії трофозоїтів або цист, попередньо культивованих у середовищі PYG, а також 100 мкл рослинного екстракту в діапазоні концентрацій 125–1000 мкг/мл. Інкубацію здійснювали протягом 24 годин за кімнатної температури. МІК визначали як найменшу концентрацію досліджуваної речовини, що забезпечувала не менше ніж 90% пригнічення росту акантамеб. Оцінку життєздатності клітин проводили за допомогою фарбування трипановим синім, порівнюючи результати із негативним контролем [95].

Подібний підхід було реалізовано у дослідженні Frough Ashtari et al., де для оцінки амебоцидної активності застосовували водний екстракт *Eucalyptus microtheca*. Інкубація трофозоїтів та цист акантамеб проводилась при 30 °C, а життєздатність визначалась за допомогою еозинового забарвлення: живі клітини залишалися не зафарбованими, тоді як мертві – поглинали барвник. Дослідження продемонструвало залежність протистотичної активності від концентрації та часу експозиції рослинного екстракту [91].

Окрім натуральних екстрактів, перспективність синтетичних сполук було продемонстровано у роботі Necati Ozpinar et al., де вивчали амебоцидну дію похідних бензотіазолу проти *Acanthamoeba castellanii* у формі трофозоїтів і цист. Найпростіші культивували в аксенічних умовах при 25 °C, після чого інкубували з досліджуваними речовинами у концентраціях 0,003125–0,1%, розчинених у ДМСО, у 24-лункових планшетах. Життєздатність клітин оцінювали методом фарбування трипановим синім протягом 48 годин, а у випадках повної загибелі здійснювали повторну інокуляцію для оцінки незворотності ефекту. Результати

вказують на виражену активність похідних бензотіазолу проти обох форм акантамеб, що свідчить про їхній потенціал як амебоцидних засобів [96].

Для оцінки цитотоксичного ефекту екстракту *Knema retusa* на трофозоїти *Acanthamoeba triangularis* застосовували метод подвійного фарбування акридиновим оранжевим та пропідіум йодидом з подальшою флуоресцентною мікроскопією. Суспензію трофозоїтів (1×10^5 клітин/мл) інкубували з досліджуваною сполукою та контролем (0,02% хлоргексидин) при 37°C протягом 24 годин. Візуалізацію проводили за допомогою конфокального мікроскопа, при цьому живі клітини ідентифікували за зеленою флуоресценцією (515-530 нм), а мертві – за червоною (>620 нм). Запропонований метод подвійного фарбування продемонстрував високу чутливість (до 90%) та специфічність (85-92%) у диференціації життєздатних клітин, дозволяючи виявляти як некротичні зміни, так і ранні стадії апоптозу. Отримані результати свідчать про ефективність цього підходу для оцінки протиамебної активності нових сполук, що має важливе значення для подальшого розвитку терапевтичних стратегій проти патогенних акантамеб. Застосування цього методу відкриває нові перспективи у дослідженні механізмів дії протипротозойних засобів та розробці нових ефективних препаратів [97].

Протистцидна активність лікарських засобів залишається актуальним напрямом сучасної біомедичної науки. Систематичні дослідження підтверджують ефективність як класичних хіміотерапевтичних препаратів, так і перспективних альтернатив – синтетичних молекул і рослинних екстрактів. Значний інтерес викликають нові методичні підходи, що дозволяють оцінювати дію антипаразитарних сполук на обидві життєві форми акантамеб – трофозоїти та цисти. Це має принципове значення, оскільки саме цистна форма проявляє високу стійкість до несприятливих умов та медикаментів, ускладнюючи ефективне лікування акантамебних інвазій. Методи *in vitro*, зокрема тести на мікророзведення, фарбування життєздатних клітин (трипановий синій, еозин) і подвійне фарбування, є високоточними інструментами для кількісної та якісної оцінки амебоцидної дії. Дослідження показали, що екстракти рослин (наприклад, *Eucalyptus microtheca*,

Knema retusa) та синтетичні похідні бензотіазолу здатні пригнічувати ріст або повністю знищувати акантамеби залежно від концентрації та часу дії. При цьому використання подвійного фарбування та флуоресцентної мікроскопії дозволяє не лише визначити життєздатність клітин, але й виявити ранні ознаки апоптозу, що відкриває нові можливості для аналізу механізмів дії препаратів. Таким чином, сучасні експериментальні підходи дозволяють виявляти активні сполуки та здійснювати глибший патофізіологічний аналіз їх впливу на найпростіших. Комплексна оцінка протистоксидної активності з урахуванням стадій життєвого циклу акантамеб є запорукою ефективної розробки нових терапевтичних засобів та подолання проблеми медикаментозної резистентності.

1.9. Використання амінопропанолів як антимікробних, протигрибкових та антипротозойних агентів

Амінопропанолі – це низькомолекулярні органічні сполуки, що містять гідроксильну та аміногрупу, завдяки чому вони характеризуються вираженими біофізичними властивостями. Їх хімічна структура забезпечує можливість структурної модифікації з включенням як ліпофільних, так і гідрофільних фрагментів, що робить амінопропанолі перспективними кандидатами для створення нових антимікробних і протигрибкових препаратів. Сучасні дослідження підтверджують, що похідні амінопропанолів проявляють активність проти широкого спектра грампозитивних і грамнегативних бактерій, а також грибів, зокрема дріжджових та дерматофітів [98, 99].

Одним із найбільш перспективних напрямів є синтез 1-амінопропанолів, які містять ароматичні залишки або довгі алкільні ланцюги. Такі сполуки демонструють виражену антибактеріальну та протигрибкову дію. У дослідженні Zhao et al. серія нових похідних амінопропанолів продемонструвала активність щодо *C. albicans*, *C. tropicalis*, *A. fumigatus* і *C. neoformans*, з мінімальними інгібуючими концентраціями (МІК) у межах 0,03–0,06 мкг/мл. Найбільшу активність виявили сполуки з конфігурацією S, що пояснюється їхньою здатністю ефективно інгібувати фермент ланостерол-14 α -деметилазу (CYP51), ключовий у біосинтезі ергостеролу в мембранах грибів [98].

Антибактеріальна активність амінопропанолів переважно зумовлена їх амфіфільною природою. Катіонні аміноспирти з довголанцюговими алкільними залишками продемонстрували високу ефективність проти *St. aureus*, *E. coli* та *Ps. aeruginosa*. Як показано у роботі Hafidi et al., ці молекули взаємодіють з фосфоліпідами мембрани бактерій, дестабілізують її структуру і порушують проникність, що призводить до загибелі клітин. Наприклад, сполуки з тетрадециловими й гексадециловими ланцюгами (CnEtOH, CnPrOH) мали МІК у межах 0,002–0,3 мМ проти різних штамів *Candida spp.*, включаючи клінічно резистентний *Candida auris* [99].

Крім прямої мікробіцидної дії, деякі похідні амінопропанолів мають виражену антибіоплівкову активність. Наприклад, сполука KVM 316 інгібувала утворення біоплівок *Ps. aeruginosa* на 96% у концентрації 6,25 мкг/мл, що є важливим у контексті боротьби з антибіотикорезистентними інфекціями, де біоплівки суттєво знижують ефективність стандартної терапії [100].

Аміноспирти, зокрема арил-аміноалкогольні похідні, демонструють перспективну антипротозойну активність проти широкого спектра найпростіших, включно з *Plasmodium spp.*, *Babesia spp.*, *Trypanosoma spp.* і *Leishmania spp.* Одним із добре досліджених представників цієї групи є альсінол – синтетичний арил-аміноспирт, який продемонстрував значну *in vitro* активність проти *Plasmodium falciparum*, пригнічуючи розвиток шизонтів та гаметоцитів. Крім того, ця сполука показала ефективність проти *Babesia divergens* і *Leishmania infantum*, а також помірну дію проти *Trypanosoma brucei*. У дослідженні Arias et al. було встановлено, що МІК альсінолу проти *P. falciparum* становила 0,1–0,5 мкг/мл, з вираженим цитостатичним ефектом. *In vivo* експерименти на мишачій моделі малярії показали зниження рівня паразитемії на понад 90% після п'яти діб лікування, що наближається до ефективності хлорохіну [101]. Дослідження Coimbra et al., присвячене синтезу ліпофільних аміноалкогольних похідних, встановило їхню активність проти *Leishmania amazonensis* та *Leishmania infantum*. Доведено, що ці молекули порушують функціонування лізосом, знижують активність протеаз та інгібують проліферацію протистів з IC₅₀ у межах 2–6 мкг/мл [102]. Окрему увагу

привертають похідні евгенолу, які містять аміноспиртовий фрагмент і демонструють високу активність проти *Plasmodium falciparum*. Зокрема, *in silico* моделювання показало здатність цих сполук взаємодіяти з дигідрофолатредуктазою паразита (PfDHFR), тоді як *in vitro* активність коливалася від 0,08 до 0,3 мкг/мл, що свідчить про потужну антималярійну дію [103].

Таким чином, амінопропаноли становлять перспективну групу низькомолекулярних сполук з широким спектром біологічної активності, що включає бактерицидну, фунгіцидну та протистозидну дію. Їх унікальна амфіфільна структура забезпечує можливість цілеспрямованого впливу як на прокаріотичні, так і на еукаріотичні клітини шляхом порушення цілісності клітинних мембран, інгібування ключових ферментативних систем та зниження біоплівкоутворення. Актуальність вивчення амінопропанолів обумовлена не лише їх високою ефективністю проти широкого спектра патогенів, включаючи антибіотикорезистентні штами бактерій і грибів, але й здатністю пригнічувати розвиток найпростіших – збудників серйозних паразитарних захворювань, таких як малярія, лейшманіоз, бабезіоз та трипаносомоз.

Важливим є той факт, що арил-аміноалкогольні похідні, зокрема альсінол та похідні евгенолу, продемонстрували високу ефективність як *in vitro*, так і *in vivo*, з потенціалом до подальшої доклінічної розробки. Таким чином, амінопропаноли можуть розглядатися як багатообіцяючі хіміотерапевтичні агенти нового покоління з можливістю застосування в боротьбі з різними інфекційними збудниками, особливо в умовах зростаючої резистентності до традиційних препаратів.

Отже, на підставі проаналізованих літературних даних можна сформулювати такі висновки:

1. Наявність значного масиву публікацій, присвячених вільноживучим амебам та інвазіям, які вони спричиняють, підтверджує актуальність подальших досліджень цих організмів. Особливий інтерес становлять представники родів *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* та *Sappinia*, що вирізняються високою екологічною пластичністю та медико-біологічною значущістю.

2. Вживання акантамеб значною мірою забезпечується здатністю до інцистування та підвищує стійкість до дії зовнішніх чинників і лікарських засобів. Морфологічні особливості трофозоїтів і цист, доповнені сучасними молекулярно-генетичними методами, є основою для коректної ідентифікації, класифікації та визначення потенційної патогенності найпростіших.

3. Інвазії, спричинені акантамебами, залишаються складною медичною проблемою через неспецифічність клінічних проявів, труднощі діагностики та обмеженість існуючих схем лікування.

4. Об'єктивна необхідність у пошуку нових протистоцидних препаратів зумовлена недостатньою активністю наявних засобів щодо різних стадій життєвого циклу акантамеб. Перспективними є широкий спектр хімічних речовин, включно з похідними амінопропанолів, для яких уже описано антипротозойну дію.

5. Проведений аналіз літератури засвідчує нагальну потребу у розробці нових протистоцидних засобів та стандартизованих підходів до їхнього тестування, що є ключовою умовою підвищення ефективності лікування акантамебних інвазій і формує наукове підґрунтя для подальшої експериментальної роботи в межах дисертаційного дослідження.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У розділі наведено характеристику матеріалів і опис експериментальних методів, використаних для розв'язання завдань дисертаційного дослідження. Методологічну базу сформовано таким чином, щоб забезпечити комплексне вивчення біологічних властивостей *Acanthamoeba* spp. та об'єктивну оцінку протистотичної активності хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів.

Для дослідження біологічних властивостей *Acanthamoeba* spp. застосовано комплекс мікроскопічних, культуральних та молекулярно-генетичних методів. Протистотичну активність сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів визначали із використанням власних розроблених експериментальних підходів, зокрема модифікованого лунко-дифузійного методу та модифікованого методу редукції кількості акантамебних бляшок. Усі експериментальні дослідження виконано на базі кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.

2.1. Матеріали

2.1.1. Штами вільноживучих амеб (акантамеб)

Для проведення скринінгових досліджень з оцінки протистотичної активності хімічних сполук, перспективних для використання у якості хіміотерапевтичних препаратів, було використано 5 штамів *Acanthamoeba* spp., що ізольовані з об'єктів довкілля (грунту та бентонітових глин) у ході багаторічних досліджень, виконаних на кафедрі мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Зокрема, ізоляцію 3 штамів акантамеб здійснено із проб бентонітових глин, які отримані з трьох різних родовищ – Дашуківського, Черкаська область (штам *Cherkasy*), Горбського, Закарпатська область (штам *Karpaty*) та Курцівського, Автономна Республіка Крим (штам *Krym*). Два штами *Acanthamoeba* spp. додатково виділено із зразків ґрунту, відібраних у місті Києві (*Kyiv* та *Soil*).

2.1.2. Штами бактерій та грибів

У ході виконання експериментальних досліджень використані еталонні (референтні) бактеріальні та грибові культури, а також бактеріальні ізоляти із зовнішнього середовища.

Для визначення оптимальних умов культивування штамів *Acanthamoeba* spp. у лабораторних умовах, а також для оцінки антибактеріальної та протигрибової активності найбільш ефективних сполук з протистотичною активністю групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів застосовували такі бактеріальні та грибові культури: *Escherichia coli* DSM 1103, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Acinetobacter baumannii* DSM 30007, *Staphylococcus aureus* DSM 346, *Streptococcus pyogenes* DSM 2071, *Enterococcus faecalis* DSM 346 та *Candida albicans* DSM 1386.

Для реалізації розробленого на кафедрі мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця моноксенічного способу культивування ізольованих акантамеб у лабораторних умовах використовували мікроорганізми *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*. Цей мікроорганізм було виділено з проб бентоніту, отриманих із Курцівського родовища. Ідентифікацію *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* здійснювали за морфологічними та культуральними ознаками, а також шляхом аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК.

2.1.3. Поживні середовища

Для підтримання життєдіяльності референтних бактеріальних ізолятів, штаму *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*, ізольованих штамів *Acanthamoeba* spp. в лабораторних умовах, а також з метою вивчення біологічних властивостей *Acanthamoeba* spp. та оцінки протистотичної активності сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів використовували низку комерційних стандартизованих сухих поживних середовищ, а також середовищ, приготовлених безпосередньо в лабораторії за відповідними прописами.

Для культивування бактерій і грибів застосовували: Nutrient agar – поживний агар для культивування мікроорганізмів (HiMedia®, Індія); Nutrient broth – поживний бульйон для культивування мікроорганізмів (HiMedia®, Індія);

поживний агар (ТОВ «Фармактив», Україна); поживний бульйон (ТОВ «Фармактив», Україна); агар Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна).

Для біохімічної ідентифікації *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* використовували кров'яний агар для визначення гемолізу (основа – поживний агар, ТОВ «Фармактив», Україна), середовище з крохмалем (основа – поживний агар, ТОВ «Фармактив», Україна), середовище Гісса з вуглеводами, середовище Сімонса (ТОВ «Фармактив», Україна), середовище для визначення індолютворення (ТОВ «Фармактив», Україна), поживний желатин (основа – поживний бульйон, ТОВ «Фармактив», Україна), молочний агар Ейкмана (основа – поживний агар, ТОВ «Фармактив», Україна), а також середовище для визначення редукції нітратів.

Для моноксенічного культивування акантамеб застосовували середовище такого складу (г/л): пептичний перевар тваринної тканини – 5,0; м'ясний екстракт – 1,5; дріжджовий екстракт – 1,5; хлорид натрію – 5,0; глюкоза – 10,0; агар – 15,0.

Для ініціації процесу ексцистування та отримання трофозоїтних форм акантамеб використовували рідке середовище PYG [104], яке містило пептон (7,5 г/л), дріжджовий екстракт (7,5 г/л) та глюкозу (15,0 г/л).

Поживні середовища готували відповідно до інструкцій виробників і загальноприйнятих лабораторних рецептів. Стерилізацію здійснювали в автоклаві відповідно до регламентованих режимів. Перед використанням усі середовища перевіряли на стерильність і відсутність мікробної контамінації.

2.1.4. Досліджувані хімічні сполуки

Для проведення скринінгу протистоцидної активності у дослідженні використано 418 хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, синтезованих кандидатом хімічних наук Ю. В. Коротким в Інституті органічної хімії НАН України за валідованими лабораторними методиками. Дослідження протистоцидної активності одержаних сполук здійснювали в межах науково-практичного співробітництва між Інститутом органічної хімії НАН України та кафедрою мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (договір від 01.07.2024 р.). Усі сполуки мали вигляд сухих порошків білого кольору, іноді з легким фіолетовим

або помаранчевим відтінком, що розчинялися в етанол-водній суміші (1:1). Для зручності роботи в лабораторії, всім досліджуваним сполуками було присвоєно код, наприклад АМ-1, АМ-2, АМ-3 і т. д.

Після приготування стокових розчинів отриманих хімічних сполук здійснювали їх деконтамінацію шляхом фільтрування через мембранні шприц-фільтри з розміром пор 0,22 мкм (Syringe Filter, Nylon66). Кожну сполуку застосовували у робочій концентрації 1 мг/мл. Повний перелік досліджуваних сполук наведено в Додатку Б.

У ролі препарату порівняння застосовували спиртовий розчин клотримазолу (виробництво ПАТ «НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод») – імідазольне похідне з широким спектром протигрибкової активності. Його фармакологічна дія зумовлена інгібуванням синтезу ергостеролу – ключового компонента клітинної мембрани мікроскопічних грибів, що спричиняє підвищенню її проникності та подальшої деструкції клітини [105]. Додатково клотримазол блокує активність пероксидаз, сприяючи накопиченню перекису водню до токсичних рівнів, що посилює ушкодження грибової клітини [106]. Експериментально доведено, що клотримазол активний і проти представників роду *Acanthamoeba* завдяки здатності інгібувати стерол-14 α -деметилазу (CYP51) – фермент, що залучений у біосинтез мембранних стеролів. Порушення цього процесу призводить до втрати мембранної цілісності, зниження функціональності та лізису акантамеб [107]. Також було показано, що клотримазол формує стабільні комплекси з CYP51 *Acanthamoeba castellanii*, що підтверджує специфічність його дії у відношенні даних мікроорганізмів [108, 109]. Окремими дослідниками показано, що препарат виявляє специфічну активність в умовах експерименту як щодо трофозоїтів, так і щодо цистових форм акантамеб, що має особливе значення, оскільки дані форми характеризуються підвищеною стійкістю до дії фізико-хімічних чинників і хіміотерапевтичних препаратів [110].

У клінічному контексті клотримазол може застосовуватися як допоміжний засіб у комбінованій терапії при АК після кератопластики, що дозволяє досягти зниження частоти рецидивів захворювання [111].

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Мікроскопічні методи

Світлова мікроскопія

З метою детальної морфологічної характеристики акантамеб та бактерій, використаних для їх культивування (*Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*), застосовували різні методи фарбування: метод Грама – для ідентифікації бактеріальної культури та дослідження її взаємодії з акантамебами; метод Романовського-Гімзи – для диференціації різних стадій життєвого циклу акантамеб і візуалізації цитоплазматичних включень; а також метод Дональдса [104] та забарвлення трихромним фарбником [112].

Мазки готували з бактеріальних і акантамебних культур, вирощених на 1% глюкозному поживному агарі (протягом 24 годин для *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*, та протягом 2-5 діб для акантамеб). Фіксацію здійснювали методом фламбування та/або у суміші Нікіфорова, після чого проводили забарвлення відповідним методом. Мікроскопію виконували з використанням імерсійного об'єктива при збільшенні $\times 1000$.

Фарбування за Грамом та Романовським-Гімзою проводили відповідно до загальноприйнятих методик [113]. Для дослідження процесу ексистування акантамеб застосовували метод Дональдса. Барвник, що використаний в даному методі, складався з трьох компонентів: розчину йоду (5%), калію йодиду (2,5%) та еозину (1%), розчинених в ацетатному буфері з pH 5,0. Експозицію барвника здійснювали протягом 5 хвилин, після чого мазки промивали водою та досліджували під імерсійною системою [104].

З метою візуалізації морфологічних деталей акантамеб (цитоплазми, ядра, каріосоми, вакуоль та цитоплазматичних включень), а також для диференціації трофозойтних і цистових форм застосовували фарбування трихромним барвником. Процедура проводили за наступним алгоритмом: зафіксований мазок двічі занурювали у 70 % етанол на 1 хвилину, після чого фарбували сумішню трихромного барвника протягом 8 хвилин. Далі препарат знебарвлювали розчином оцтової кислоти в етанолі та тричі промивали у 95 % етанолі по 1-2 секунди,

зневоднювали в карбол-ксилолі протягом 1 хвилини та просвітлювали у чистому ксилолі 2-3 хвилини. Після завершення фарбування препарати досліджували під мікроскопом з імерсійною системою при збільшенні $\times 1000$ [112]. Інтерпретацію препаратів, забарвлених трихромом, проводили з урахуванням характерного забарвлення основних морфологічних структур акантамеб: ядро, каріосома та стінки цист набували червоного або темно-рожевого відтінку, тоді як цитоплазма трофозоїтів забарвлювалася у синьо-зелений колір. Під час мікроскопії додатково оцінювали чіткість контурів клітин, наявність дегенеративних змін, а також відповідність морфологічних ознак трофозоїтним або цистовим формам.

Люмінісцентна мікроскопія

Для диференціації життєздатних форм акантамеб застосовували флуоресцентне забарвлення з використанням барвника акридинового оранжевого. Мазки обробляли 0,01 % розчином акридинового оранжевого, приготовленим у 0,2 М ацетатному буфері (рН 4,0), та інкубували протягом 5 хв. Після фарбування надлишок барвника видаляли промиванням дистильованою водою. Мікроскопію проводили з використанням флуоресцентного мікроскопа MICROmed Evolution LUM LS-8530 у спектральному діапазоні 420–650 нм.

Фазово-контрастна мікроскопія

Для фазово-контрастної мікроскопії нативних (незабарвлених) препаратів акантамеб використовували мікроскоп Carl Zeiss Axioplan. Дослідження проводили при збільшенні $\times 900$.

Підготовка препарату полягала в нанесенні 10 мкл суспензії акантамеб, вирощених на 1% глюкозному поживному агарі (протягом 2-5 діб) на чисте предметне скло, після чого краплю накривали покривним скельцем та проводили дослідження. При мікроскопії оцінювалися морфологічні особливості живих акантамеб, рухливість трофозоїтів та бактерій, які використовуються акантамебами в якості харчового субстрату, активність фагоцитозу, процеси клітинного поділу та інші процеси життєдіяльності даних найпростіших.

Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ)

Підготовка зразків та проведення електронно-мікроскопічного дослідження здійснювали на базі лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця.

Дослідженню підлягали ультратонкі зрізи різних життєвих форм акантамеб. Пробопідготовку проводили у відповідності до рекомендацій Michael J. Dykstra et al.[114]. Для префіксації найпростіших на чашку Петрі з щільним поживним середовищем, на якому спостерігався суцільний ріст досліджуваних акантамеб, наливали 20 мл 4% розчину глутаральдегіду та витримували його 12-15 год. при кімнатній температурі у витяжній шафі. Після цього з агару вирізали фрагменти розміром 3-5 мм і поміщали їх у стерильний сухий флакон.

Відмивання залишків глутаральдегіду із отриманих фрагментів здійснювали фізіологічним розчином, повторюючи процедуру тричі, щоразу залишаючи зразки у розчині на 10 хвилин. Після завершення фіксації проводили контрастування 2% розчином чотириокису осмію (OsO_4) з рН 7,0-7,2, витримуючи зразки протягом ночі у темному місці при кімнатній температурі. Далі препарати промивали фосфатним буфером 3-4 рази, залишаючи зразки в кожній порції буфера на 5 хвилин.

Дегідратацію здійснювали за такою послідовністю: занурення зразка у 50% етиловий спирт (тричі по 5 хвилин), потім – у 70% спирт на 10 хвилин. Далі зразки витримували протягом 6 годин у 2% спиртовому розчині уранілацетату для додаткового контрастування. Після цього проводили короткочасну обробку 96% етиловим спиртом (30 хвилин), а на завершення – триразове промивання у 100% (абсолютному) етиловому спирті та абсолютному ацетоні (по 5 хвилин кожне).

Після дегідратації зразки витримували 30 хвилин у пропіленоксиді з метою видалення залишків спиртів, які можуть перешкоджати полімеризації епоксидної смоли.

Паралельно готували робочу суміш епоксидних смол, що складалася з Epon 812, Araldite 502 та DDSA (додеценілсукцинової кислоти) у співвідношенні 1:1:2, з додаванням каталізатора DMP-30 (6 крапель на 10 мл суміші). Epon 812 та Araldite 502 є епоксидними смолами, що характеризуються високою стабільністю та

здатністю до глибокого проникнення в тканини. DDSA виконує функцію затверджувача, а DMP-30 слугує каталізатором, що пришвидшує полімеризацію.

З метою кращого просочування біоматеріалу, епоксидну суміш змішували з пропіленоксидом у співвідношенні 1:2, після чого занурювали туди зразки на 2-3 години. Потім робочу суміш розливали у капсули, занурювали в них підготовлені зразки та витримували в термостаті при 70 °C протягом 12 годин для повної полімеризації [114].

Одержані після полімеризації зразки в капсулах зачищали вручну під стереомікроскопом для усунення надлишків смоли та надання блокам правильної форми. Після цього формували трапецієподібну поверхню блоку з орієнтацією на ділянку, що містить зразок. Ультратонкі зрізи препаратів виготовляли за допомогою ультрамікротома «Reichert-Jung Ultracut 701» та аналізували із застосуванням електронного мікроскопа «JEM-100C-II». Перед мікроскопією зрізи додатково контрастували за допомогою 1-2% розчину фосфорновольфрамової кислоти з метою підвищення електронної щільності структур.

Скануюча електронна мікроскопія (СЕМ)

Пробопідготовку та скануючу електронну мікроскопію проводили в Центрі колективного користування електронними мікроскопами НАН України (ЦККЕМ) Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного. Для підготовки зразків використовували класичний метод фіксації, з використанням 2,5% розчину глутаральдегіду, призначений для дослідження тонких клітинних структур. Перед дослідженням у електронному мікроскопі зразки піддавали напиленню провідним шаром металу (платина-паладій у співвідношенні 80:20) за допомогою іонно-плазмового напилювача Jeol Fine Coat Ion Sputter JFC-1100. Після підготовки зразки досліджували за допомогою скануючого електронного мікроскопа JEOL JSM-6060LA.

2.2.2 Культуральні методи

Для культивування всіх п'яти ізолятів акантамеб у лабораторних умовах застосовували моноксенічний метод. Культивування здійснювали на 1% глюкозному поживному агарі. Культуру акантамеб вносили на щільне стерильне

поживне середовище з попередньо засіяними бактеріями роду *Cellulosimicrobium* sp. (штам *bent-1*). Подальше співкультивування здійснювали при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 5 днів. Видимий ріст акантамеб розпочинався з 2-3 доби від початку культивування та проявлявся появою зон лізису бактеріального газону, які поступово збільшувалися.

Чисту культуру бактерій *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* вирощували при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 18–24 годин на поживному агарі для культивування мікроорганізмів (HiMedia®, Індія) із додаванням 1 % глюкози. Ідентифікацію даної культури здійснювали на основі культуральних та біохімічних властивостей із підтвердженням за допомогою секвенування гена 16S рРНК. Культуральні характеристики на різних типах поживних середовищ, зокрема форму колоній і здатність до пігментоутворення, оцінювали візуально. Для біохімічної ідентифікації штаму досліджували його цукролітичні, гемолітичні, пептолітичні та протеолітичні властивості відповідно до стандартних методик [113].

2.2.3. Вивчення ексцистування акантамеб

Акантамеби, вирощені на бактеріальному газоні, знімали стерильним шпателем та вносили у 5 мл поживного середовища PYG. Отриману суспензію інкубували в термостаті при температурі $30 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 72 годин відповідно до рекомендацій Khunkitti et al. [104]. Відразу після приготування суспензії та на 24-й, 48-й і 72-й годинах інкубації відбирали по 1 мл середовища та центрифугували отримані аліквоти протягом 5 хв при 800 об/хв. Надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували в ацетатному буфері (рН 5,0). Із отриманої суспензії готували мазки та забарвлювали їх за методом Дональдса (опис наведено вище). Це забарвлення дозволяло диференціювати структурні елементи цисти та трофозоїта: зрілі цисти забарвлювались у жовтувато-коричневий колір, а «активовані» цисти – у червонувато-коричневий, залежно від ступеня ексцистування.

2.2.4. Визначення патогенного потенціалу акантамеб з використанням термо- та осмоотолерантного тестів

Дослідження термо- та осмоотолерантності ізольованих акантамеб проводили згідно рекомендацій Behniafar et al [60].

Для визначення термотолерантності 1% глюкозний поживний агар, засіяний бактеріями *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* та досліджуваними акантамебами, інкубували при температурах 25 °С, 37 °С та 40 °С протягом 7 діб. Після завершення інкубації візуально оцінювали наявність росту акантамеб на поживному середовищі (наявність зон лізису) та додатково підтверджували наявність активних трофозоїтів за допомогою фазово-контрастної мікроскопії.

Для визначення осмотолерантності готували чашки Петрі з 1% глюкозним поживним агаром з додаванням та 0,5 М та 1,0 М манітолу. Після засіву бактеріальною культурою *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* та досліджуваними акантамебами їх інкубували при 36 ± 1 °С протягом 7 діб. Отримані результати оцінювали аналогічно – шляхом візуального огляду та мікроскопічного аналізу. [60].

Акантамеби вважали потенційно патогенними, якщо вони зберігали здатність до росту у гіперосмолярному середовищі (з наявністю 1,0 М манітолу) та за температури вище 40°С. Якщо ріст спостерігається лише за однієї із умов (при 40°С або в середовищі з 1,0 М манітолу), такі ізоляти відносили до групи з низьким патогенним потенціалом для людини. Акантамеби, які не демонстрували росту за жодних несприятливих умов, класифікували як ймовірно непатогенні [38].

2.2.5. Бляшкоутворення вільноживучих амєб

Для визначення концентрації акантамеб у досліджуваному матеріалі, а також для використання їх як тест-об'єкта під час скринінгу протистоцидної активності потенційних хіміотерапевтичних препаратів застосовували феномен бляшкоутворення. Для представників цього роду мікроорганізмів зазначений феномен був уперше описаний на кафедрі мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця під керівництвом академіка НАН та НАМН України, професора В.П. Широбокова [115, 116].

Для отримання акантамебних бляшок здійснювали наступну процедуру: до 10 мл розтопленого і охолодженого до 45°С поживного 0,7% агару, що містив 1 % глюкози, додавали 500 мкл однодобової культури бактерій *Cellulosimicrobium* sp.

штам *bent-1*, вирощеної у поживному бульйоні з 1 % глюкози, а також 100 мкл суспензії акантамеб у концентрації 10^2 – 10^3 клітин (цист та/або трофозоїтів) на 1 мл. Після ретельного перемішування отриману суміш розливали у стерильні чашки Петрі. Після застигання агару чашки інкубували у термостаті при температурі 36 ± 1 °C. Тривалість інкубації становила близько 5 діб.

На другу-третю добу в товщі агару формувалися бляшки (негативні колонії), які на поверхні щільного середовища набували вигляду кратероподібних заглиблень. Кількість утворених бляшок була пропорційною числу життєздатних акантамеб у досліджуваній суспензії.

2.2.6. Молекулярно-генетичні методи дослідження акантамеб

Виділення бактеріальної та акантамебної ДНК

Для виділення нуклеїнових кислот із досліджуваних штамів акантамеб та бактеріальної культури *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1* застосовували метод сорбції на силікагелевій матриці відповідно до рекомендацій Boom et al. [117]. Для ізоляції використовували комерційні набори, розроблені на основі цього підходу. Метод ґрунтувався на лізисі бактеріальних і акантамебних клітин під дією хаотропних агентів, подальшій сорбції ДНК на силікагелевій матриці, багаторазовому промиванні комплексу «ДНК–силікагель» з метою видалення інгібіторів ПЛР та елююванні очищеної ДНК у стерильний буфер.

Для виділення нуклеїнових кислот із акантамеб та бактеріальної культури попередньо здійснювали підготовчий етап. Культури *Acanthamoeba* spp. інкубували протягом 5 діб на щільному поживному середовищі, що містило 1 % глюкози та було попередньо засіяне бактеріями *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*. Після завершення інкубації проводили змив цист і трофозоїтів із поверхні середовища з використанням 0,9 % розчину натрію хлориду. Отриману суспензію центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв для отримання максимальної біомаси акантамеб. Надосад обережно видаляли, після чого з осаду здійснювали виділення ДНК.

Для виділення ДНК із бактеріальної культури *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1* бактерії культивували у поживному бульйоні з додаванням 1 % глюкози

протягом 24 год. По завершенні інкубації суспензію центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв; надосад видаляли, а з отриманої біомаси здійснювали екстракцію ДНК.

Проведення полімеразної ланцюгової реакції

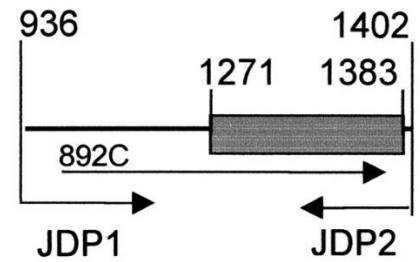
Загальний об'єм проби в усіх випадках складав 25 мкл. Суміш містила: 2 мкл ізолюваної ДНК, 1ОД Taq DNA Polymerase, 0,2 mM кожного дНТФ, 1-х ПЛР буфер з 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль кожного праймеру.

Для ампліфікації НК акантамеб були обрані праймери, що обмежують частину гену 18S рРНК довжиною в ≈ 1475 нуклеотидів, яка містить гіперваріабельні ділянки (праймери CRN 5 та 1137). Додатково також використовували праймери для ампліфікації регіону ASA.S1, а саме високоваріабельної ділянки DF3, 18S рРНК-гена *Acanthamoeba* (праймери JDP1 та JDP2), який є видоспецифічним та використовується для генотипування акантамеб (рис. 2.1, таблиця 2.1) [118]. Для ампліфікації НК *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1* використовували універсальні прокаріотичні праймери (27F та 1492R), що обмежували ділянку 16S РНК довжиною в ≈ 1465 нуклеотидів (таблиця 2.1) [119].

Для акантамеб програма ПЛР-ампліфікації складалась з тривалої денатурації протягом 10 хвилин при 94°C та 35 циклів: 94°C – 1 хв, 60°C – 1 хв, 72°C – 2 хв; фінальну елонгацію 72°C – 7 хвилин [70].

Програма ПЛР-ампліфікації для отримання копій бактеріального гена 16S рРНК передбачала початкову денатурацію при 95 °C протягом 5 хв, далі – 30 циклів ампліфікації, що включали денатурацію при 95 °C протягом 30 с, відпал праймерів при 55 °C протягом 40 с та елонгацію при 72°C протягом 50 с. Завершальним етапом була фінальна елонгація при 72 °C протягом 7 хв [119].

А. Регіон ASA.S1



Б. Варіабельні регіони GTSA.B1

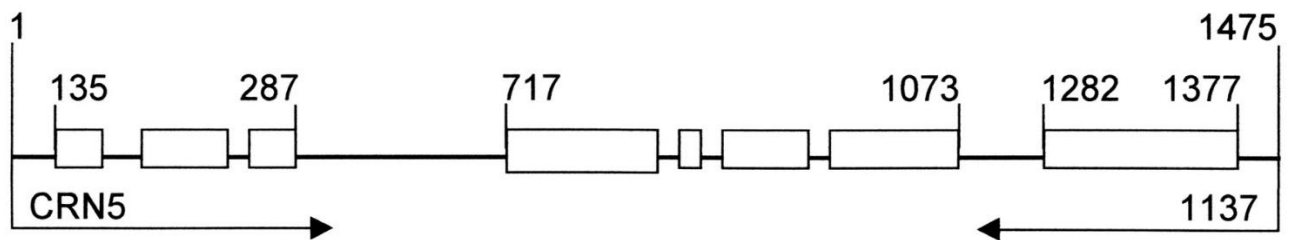


Рис. 2.1. Варіабельні регіони гену 18S рРНК, які використовуються для ідентифікації та генотипування *Acanthamoeba sp.* [120]

Таблиця 2.1

Специфічні праймери для генетичної ідентифікації акантамеб та бактеріальної культури

№	Праймери (5'→3')		Довжина фрагменту (н.п.)	Посилання
1.	Primer JDP1:	GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA	423–551	[28]
	Primer JDP2:	TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA		
2.	Primer CRN5:	CTGGTTGATCCTGCCAGTAG	~1475	[64]
	Primer 1137:	GTGCCCTTCCGTCAAT		
3.	Primer 27F:	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	~1465	[118]
	Primer 1492R:	GGTTACCTTGTTACGACTT		

Для аналізу ампліфікованих фрагментів ДНК застосовували метод горизонтального електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. Гель готували шляхом розчинення агарози у трис-борат-EDTA (TBE) буфері з подальшим додаванням бромистого етидію (концентрація 0,5 мкг/мл) як флуоресцентного інтеркалюючого

агента для візуалізації нуклеїнових кислот. В лунки агарозного гелю вносили по 6 мкл кожної з досліджуваних проб, в останню лунку додавали 6 мкл ДНК-маркеру з відомою молекулярною масою (GeneRuler™ 200 bp Plus DNA Ladder) з дискретним кроком 200 нуклеотидних пар. Електрофорез проводили при постійній напрузі 100 В протягом 20 хвилин у TBE буфері (pH 8,3). Після завершення розділення фрагментів гель аналізували у транслюмінаторі з довжиною хвилі 302 нм.

Виділення ДНК із агарозного гелю здійснювалося із використанням пакету реагентів «Gel-Out izolacja DNA z żeli agarozowych» (© Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Польща), у відповідності до інструкції виробника. Принцип методу для виділення ДНК з агарозного гелю ґрунтувався на використанні спеціальних мініколонок. Для реалізації поставленого завдання, фрагмент гелю, що містив ДНК, переносили до пробірки типу Еппендорф та інкубували з 400 мкл буфера GB (лізуючий буфер) при температурі 50 °С до повного розчинення агарози. Після цього до зразка додавали 250 мкл ізопропанолу, ретельно перемішували та наносили отриману суміш на мініколонку, вставлену в пробірку для збору. Центрифугування проводили при $11000 \times g$ протягом 30 секунд. Далі колонку двічі промивали 700 мкл буфера GW (промивний буфер) з подальшим центрифугуванням, після чого виконували додаткове центрифугування протягом 60 секунд для повного видалення залишків спирту. На завершальному етапі до центру мініколонок додавали 50 мкл елюційного буфера, витримували 2 хвилини при кімнатній температурі та центрифугували 60 секунд при $11\,000 \times g$. Отриману ДНК зберігали при температурі +4 °С або -20 °С залежно від подальших експериментальних потреб.

Генетична ідентифікація ізольованих акантамеб, бактеріальних ізолятів та проведення філогенетичного аналізу

Отримані ПЛР продукти генів 18S рРНК всіх п'яти акантамеб та 16S рРНК бактеріального ізоляту секвенували з використанням апарату ABI3730 Genetic Analyzer на базі Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Польща, м. Варшава).

Обробку отриманих сіквенсів проводили з використанням програмного забезпечення CLC Main Workbench 5. Первинну ідентифікацію мікроорганізмів проводили з використанням онлайн-інструменту BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Вирівнювання послідовностей 18S рДНК проводили з використанням програмного забезпечення MEGA 12 (ClustalW). В дослідженнях використано 29 послідовностей різних видів акантамеб (не включаючи досліджувані нами штами). Послідовності отримані із бази даних The National Center for Biotechnology Information. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Філогенетичні дерева будували методом Neighbor-joining (NJ) за допомогою програмного забезпечення MEGA 12 із використанням моделі двопараметричної корекції Кімури (Kimura two-parameter correction) для врахування множинних замін.

Отримані послідовності гену GTSA.B1 ізольованих акантамеб депоновані у базі GenBank.

2.3. Визначення цитотоксичної дії досліджуваних сполук на лінії культур клітин HEp-2C

Для дослідження цитотоксичної дії хімічних сполук використовували клітинну лінію HEp-2C, яку культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 5–10 % фетальної ембріональної сироватки, як ростового фактора, та антибіотиків (пеніцилін/стрептоміцин по 100 ОД/мл) у стандартних умовах інкубації ($36\pm 1^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2). Після формування моношару клітини переводили у суспензію за допомогою розчину версену, ресуспендували у свіжому середовищі та вносили у 96-лункові планшети в об'ємі 100 мкл на лунку при концентрації близько 1×10^5 клітин/мл. Інкубацію проводили протягом 18–24 годин до формування моношару у лунках планшету [121].

Через 24 години культуральне середовище із лунок видаляли та замінювали на 100 мкл свіжого RPMI-1640 без додавання антибіотиків і сироватки, а також додавали по 100 мкл досліджуваного препарату в концентрації від 500 до 0,49

мкг/мл (11 лунок). Окрема лунка слугувала контролем і містила лише середовище без препарату. Подальшу інкубацію проводили протягом 24 годин.

Після завершення терміну інкубації проводили візуальну оцінку морфологічних змін клітин, зокрема розвиток цитопатичного ефекту (ЦПЕ), порівнюючи лунки з різними концентраціями препаратів із контрольною лункою. Далі з усіх лунок видаляли культуральне середовище та замінювали його на 100 мкл свіжого RPMI 1640. В подальшому до кожної лунки додавали 10 мкл 12 мМ розчину МТТ, та продовжували інкубацію при 37°C упродовж 4 годин.

На наступному етапі дослідження з кожної лунки видаляли по 85 мкл середовища та додавали по 50 мкл ДМСО (диметилсульфоксиду) з метою розчинення формазанових кристалів. Вміст кожної лунки ретельно перемішували піпеткою після чого проводили додаткову інкубацію при 37°C протягом 10 хвилин. Безпосередньо перед проведенням фотометричного аналізу зразки повторно перемішували для отримання однорідного розчину [122].

Вимірювання оптичної щільності (ОЩ) проводили в спектрофотометрі (Numareader), при довжині хвилі 630 нм. Отримані показники ОЩ порівнювали з контрольними зразками (клітини без додавання препарату), після чого відсоток загиблих клітин розраховували за такою формулою:

$$\text{Відсоток цитотоксичності} = 100 - (\text{ОЩ зразка} / \text{ОЩ контролю}) \times 100$$

Інтерпретацію результатів здійснювали для кожної досліджуваної концентрації препарату відповідно до такої схеми: менш ніж 10 % нежиттєздатних клітин – сполука вважалася нецитотоксичною в даній концентрації; 10–25 % – низькоцитотоксичною; 25–40 % – помірно цитотоксичною; понад 40 % – високотоксичною.

Таким чином визначали концентрацію речовини, за якої досліджувана сполука не проявляла цитотоксичного ефекту [123]. Оцінювання проводилось у трьох повторях для кожної концентрації.

2.4. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку отриманих експериментальних даних здійснювали з використанням ліцензійного програмного забезпечення Microsoft Excel 2021, IBM

SPSS Statistics Base v.22 та EZR (R-statistics). Всі дослідження проводились у трьох незалежних повтореннях, що забезпечувало мінімізацію впливу випадкових факторів та дозволяло здійснювати надійний статистичний аналіз. Для кількісного представлення результатів скринінгу протистоцидної активності хімічних сполук розраховували середнє значення (M), стандартне відхилення (SD), та 95% довірчий інтервал (CI) для середнього значення, що дозволяло коректно описати центральну тенденцію та варіабельність даних.

Для виявлення статистично значущих відмінностей між групами за рівнем цитотоксичності застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). Попередньо проводили перевірку нормальності розподілу за допомогою тесту Шапіро–Вілка. Після виявлення загальних відмінностей між групами за допомогою ANOVA проводили пост-хок аналіз із застосуванням критерію Даннета для порівняння кожної експериментальної групи з контролем, з урахуванням поправки на множинні порівняння, що знижувало ризик виникнення помилки I роду (α -помилки) [124].

Загалом застосування сукупності статистичних методів дозволило надійно і валідно оцінити отримані результати, ідентифікувати статистично значущі відмінності між експериментальними групами, а також встановити кореляційні залежності між структурними особливостями досліджуваних хімічних сполук та їх біологічною активністю. Такий підхід забезпечив достовірну інтерпретацію даних *in vitro* оцінки токсичності та протистоцидної активності, що має важливе значення для наступних етапів доклінічного вивчення перспективних речовин.

РОЗДІЛ 3.

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АКАНТАМЕБ: МОРФОЛОГІЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ

3.1. Виділення акантамеб з бентонітових глин та ґрунтів України

Глини є однією з найпоширеніших осадових порід на Землі та відіграють важливу роль у геологічних, ґрунтових і біохімічних процесах. Попри те, що тривалий час їх вважали абіотичними структурами, сучасні дослідження переконливо доводять, що глинисті мінерали населені різноманітними мікроорганізмами, які здатні не лише виживати, а й проявляти метаболічну активність навіть в умовах обмеженої кількості поживних речовин, низької температури та відсутності світла [125, 126]. У складі глинистих відкладів виявлено бактерії родів *Pseudomonas* та *Micrococcus*, актиноміцети, гриби, а також окремі види протистів, які утворюють стабільні мікробні спільноти [126, 127].

Завдяки своїй колоїдній природі, високій сорбційній здатності та буферним властивостям глинисті мінерали створюють унікальні мікроекологічні ніші, що захищають мікроорганізми від ультрафіолетового випромінювання, висихання та дії токсичних речовин. Це робить глини не лише природним «резервуаром життя», але й перспективною моделлю для мікробіологічних, геохімічних та біотехнологічних досліджень [125, 128]. Одним із типів глинистих матеріалів є бентоніт – природна мінеральна суміш, що складається переважно з монтморилоніту, мінералу групи смектитових глин. Бентонітові глини (смектити, монтморилоніти) утворюються в результаті вивітрювання вулканічного попелу та інших вулканогенних порід. Бентоніт має пластинчасту будову та здатний інтенсивно набухати у водних розчинах, утворюючи стійкі гелі з високою адсорбційною здатністю. Такі гелі проявляють як біостимулюючі, так і біоінгібуючі властивості, що зумовлює їх широке застосування в біології та медицині, зокрема у виробництві пробіотиків. У зв'язку з цим, на кафедрі мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця під керівництвом академіка В.П. Широбокова було розроблено метод одержання бентонітового гелю для медичних потреб, що використовується у виробництві

пробіотиків та сорбентів [129]. Крім того, у ході мікробіологічного дослідження нативних бентонітових глин було показано, що вони заселені різноманітними еукаріотично-прокаріотичними консорціумами (бактерії, актиноміцети та вільноіснуючі амеби), життєдіяльність яких вдалося відновити [130]. Особливої уваги серед представників бентонітових глин заслуговували еукаріотичні спільноти.

Проведений на кафедрі комплекс мікробіологічних досліджень показав, що бентонітові глини є природним резервуаром життєздатних форм вільноживучих амеб, які в подальшому були ідентифіковані як представники роду *Acanthamoeba*. Важливо відзначити, що акантамеби виявлено у зразках усіх трьох досліджуваних родовищ, що свідчить про їх стабільну присутність у геологічних відкладеннях різного походження. У зразках бентонітів із Курцівського, Горбського та Дашуківського родовищ стабільно виявляли трофозоїти та цисти *Acanthamoeba* spp., що підтверджує широке поширення цих мікроорганізмів у природних мінеральних середовищах.

Особливу увагу привертає висока резистентність цист ізольованих акантамеб: вони залишалися життєздатними навіть після тривалого (понад 50 років з моменту забору зразків) зберігання бентоніту в лабораторних умовах при кімнатній температурі.

Паралельно з дослідженням бентонітів із використанням розробленого на кафедрі методу культивування акантамеб було проведено аналіз ґрунтових зразків, відібраних у різних екологічних зонах міста Києва. У досліджених зразках також виявлено представників роду *Acanthamoeba* spp. Усі виділені ізоляти акантамеб були внесені до колекції кафедри мікробіології, паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця, де підтримуються у культурі та використовуються для подальших морфологічних, молекулярно-генетичних та фармакологічних досліджень.

3.2. Дослідження морфології та структури досліджуваних штамів акантамеб

Відповідно до сучасних літературних даних, життєвий цикл акантамеб включає дві основні морфологічні стадії розвитку. Активна фаза представлена трофозоїтом – рухливою формою, яка забезпечує живлення, ріст та розмноження. Стадія спокою представлена цистою – високорезистентною структурою з двошаровою оболонкою, що дозволяє клітині тривалий час зберігати життєздатність і витримувати дію несприятливих умов довкілля [27]. У розділі наведено результати вивчення морфологічних особливостей ключових етапів життєвого циклу досліджуваних штамів акантамеб у лабораторних умовах.

Морфологічні особливості трофозоїтів ізолюваних акантамеб

У межах проведеного дослідження було проаналізовано морфологічні характеристики трофозоїтів акантамеб – вегетативної, метаболічно активної форми, що формується протягом перших 24 годин після проростання цист у сприятливих умовах, зокрема на поживних середовищах засіяних шаром бактерій.

Виявлено, що розміри вегетативних форм ізолюваних штамів акантамеб коливаються в межах 40 ± 5 мкм, проте можуть варіювати залежно від виду та умов культивування. Морфологічно трофозоїти акантамеб характеризуються високим ступенем поліморфності: здебільшого мають неправильну або асиметричну форму, що змінюється під впливом факторів навколишнього середовища, фази руху або взаємодії з субстратом. Цитоплазма трофозоїтів є зернистою, з вираженою вакуолізацією, а ядро розташоване центрально або ексцентрично (рис. 3.1).



Рис. 3.1 – Трофозоїти акантамеб штам *Крут*. Фазовий контраст

У ході мікроскопічних дослідження встановлено, що вегетативні форми *Acanthamoeba* spp. характеризуються вираженою рухливістю, та формуванням специфічних клітинних виростів шипоподібної форми – акантоподій. Ці структури забезпечують динамічну зміну морфології та просторового розташування в межах коротких інтервалів часу. Переважна їх локалізація спостерігалась у передній частині клітини, вони беруть участь в активному пересуванні акантамеб, прикріпленні до субстрату, орієнтації в середовищі та захопленні часток під час фагоцитозу. Також зафіксовано формування коротких акант у каудальній зоні трофозоїта, які, ймовірно, відіграють допоміжну роль у стабілізації положення клітини або сприяють її пересуванню. (рис. 3.2).

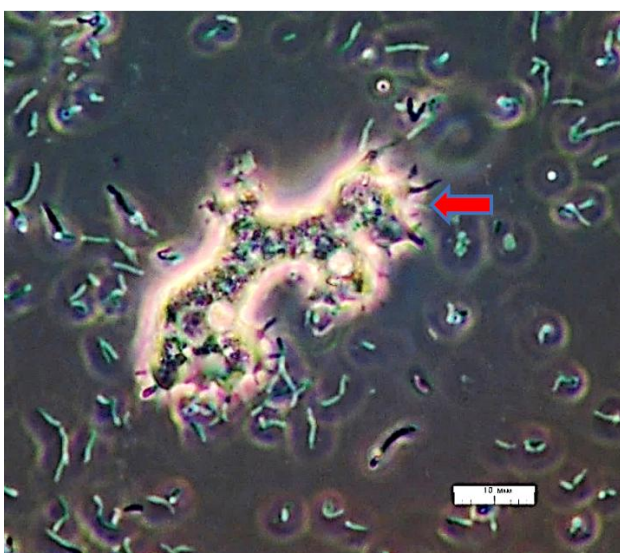


Рис. 3.2 – Акантоподії трофозоїта акантамеби штам *Krut*. Фазовий контраст

За результатами електронно-мікроскопічного аналізу трофозоїтів акантамеб штам *Krut* встановлено, що їх ультраструктурна організація загалом відповідає структурі типових еукаріотичних клітин, містить ядро, мітохондрії, травні вакуолі, цитоплазму з органелами та гнучку цитоплазматичну мембрану. Ядро акантамеб чітко окреслене, має округлу або злегка неправильну форму, з виразним ядерцем, що свідчить про активність транскрипційних процесів. У цитоплазмі виявлено велику кількість мітохондрій з добре розвиненими кристами, що є ознакою високої інтенсивності енергетичного метаболізму у трофічній фазі розвитку. Також спостерігається наявність численних травних вакуоль різного розміру, що містили

велику кількість фагоцитованих бактеріальних клітин і органічних субстратів (рис. 3.3).

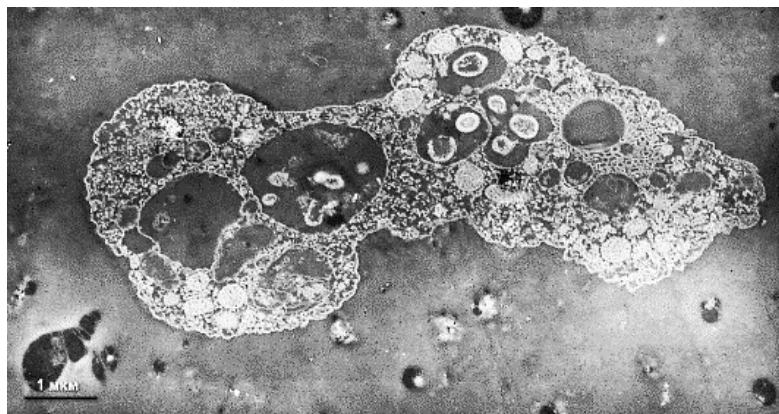


Рис. 3.3 – Електронно-мікроскопічне зображення трофозоїта штаму *Krum* (ультратонкий зріз)

Отже, отримані результати підтверджують, що морфологічна будова трофозоїтів акантамеб відповідає еукаріотичному типу організації та забезпечує реалізацію їхніх життєвоважливих функцій.

Дослідження морфології прецист акантамеб

У результаті експериментальних досліджень із застосуванням фазово-контрастної та електронної мікроскопії виявлено перехідну форму між трофозоїтом і цистою – прецисту. Результати дослідження свідчать, що виявлена перехідна форма формується на етапі інцистування як адаптивна реакція на несприятливі зовнішні умови, зокрема дефіцит поживних речовин у середовищі культивування. Попри те, що подібні проміжні етапи не завжди представлені в класичних схемах життєвого циклу *Acanthamoeba* spp., результати сучасних морфологічних та ультраструктурних досліджень [131], включно з отриманими у межах дисертаційної роботи, підтверджують їхнє існування та функціональну роль у процесі інцистування. Встановлено, що на цій стадії клітини зберігають тонку цитоплазматичну мембрану, притаманну трофозоїтам, але набувають округлої або овальної форми з діаметром від 6–7 до 40–50 мкм. В прецистах усіх досліджених штамів акантамеб чітко візуалізувалось ядро, а також спостерігалось поступове ущільнення цитоплазми (рис 3.4).

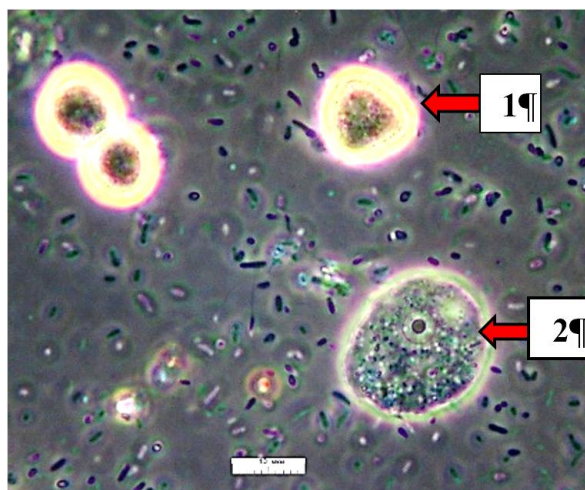


Рис. 3.4 – Прециста і цисти досліджуваних акантамеб штаму *Krym*. Фазовий контраст. 1 – циста, 2 – прециста

При вивченні нативних препаратів прецист акантамеб за допомогою фазово-контрастної мікроскопії виявлено характерні маятникоподібні рухи клітин, які, ймовірно, свідчать про активні процеси внутрішньоклітинної перебудови, зокрема перерозподіл цитоплазматичних структур та органел. Найбільш ймовірно, ці морфологічні зміни сприяють рівномірному формуванню зовнішньої оболонки та підготовці клітини до переходу у метаболічно неактивний (спокійний) стан, характерний для цист.

Електронно-мікроскопічне дослідження прецист акантамеб досліджуваних штамів дозволило ідентифікувати низку морфологічних характеристик, які свідчать про їх перехідний стан між трофозойтною формою та зрілою цистою. Встановлено, що внутрішньоклітинна структура прецист акантамеб зберігає чітко організовану цитоархітектоніку, властиву еукаріотичним клітинам. У цитоплазмі виявлено численні вакуолі, які містять фагоцитовані бактеріальні клітини, що вказує на збереження трофічної активності на ранніх етапах інцистування. Це свідчить про те, що навіть у стані переходу до метаболічно неактивної форми акантамеби залишаються здатними до фагоцитозу, забезпечуючи себе необхідними енергетичними та структурними компонентами для подальшої трансформації (Рис.3.5).

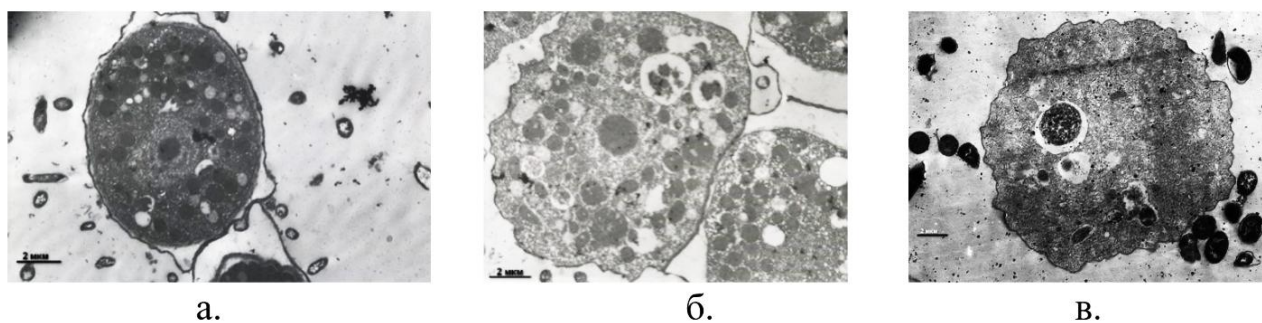


Рис. 3.5 – Ультраструктура прецист акантамеб штаму *Krum*. TEM (а-в)

Електронно-мікроскопічне дослідження прецист досліджуваних штамів акантамеб дозволило виявити чітко сформований гомогенний прозорий обідок навколо клітини, який поступово трансформується у поверхневий шар цисти – ектоцисту (Рис. 3.6). Зовнішньо цей шар межує з більш пухкою структурою, яка, ймовірно, бере участь у поступовому ущільненні та хімічній модифікації оболонки в процесі інцистування. Центральна частина клітини має компактну будову з рівномірним заповненням, що на електронограмах проявляється у вигляді електронно-щільної зони. Зазначені морфологічні зміни свідчать про активацію внутрішньоклітинних процесів структурної реорганізації, спрямованих на формування повноцінної зрілої цисти.

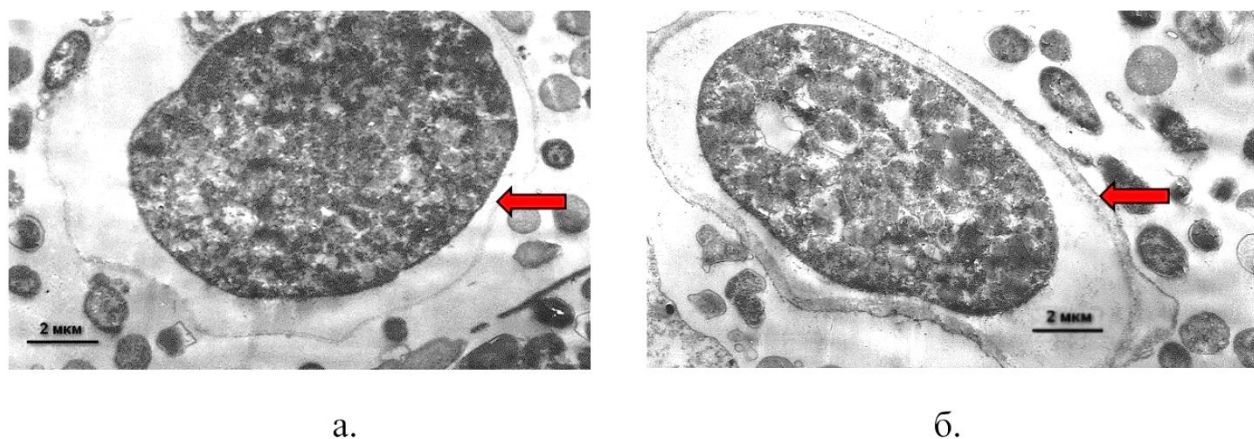


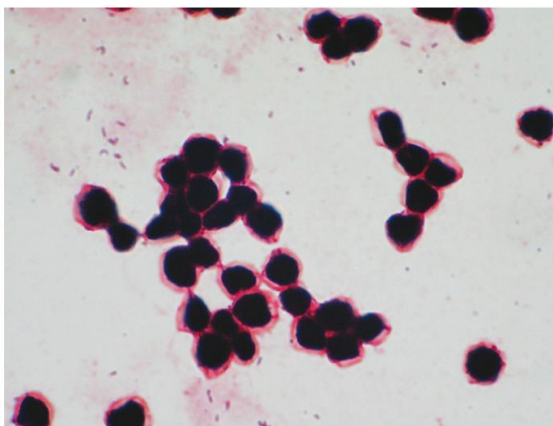
Рис. 3.6 – Прецисти акантамеб штаму *Krum* на ранньому етапі інцистування. TEM (а-б). Стрілками відмічено гомогенний прозорий обідок, на основі якої в подальшому формується ектоциста.

Таким чином, комплекс морфологічних і ультраструктурних ознак прецист свідчить про їхній перехідний характер, що поєднує збереження трофічної активності з поступовим формуванням захисної оболонки.

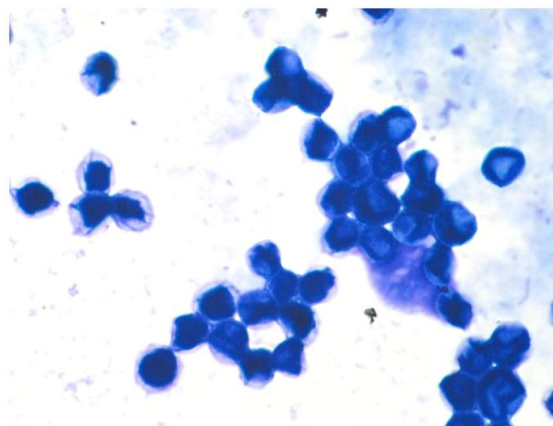
Вивчення структури та морфології цист акантамеб

Цисти є метаболічно неактивними формами, які зберігають життєздатність і генетичний матеріал упродовж тривалого часу, включаючи несприятливі умови довкілля. Проведені дослідження показали, що формування цист усіх досліджуваних штамів акантамеб розпочиналося з другої доби культивування на щільному поживному середовищі.

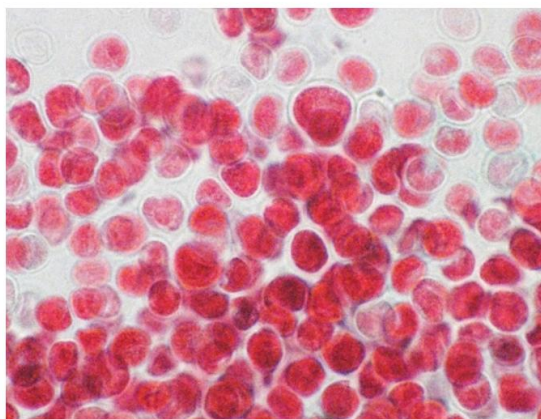
Морфометричний аналіз показав, що середній діаметр цист усіх досліджених ізолятів акантамеб становив $11,4 \pm 0,84$ мкм. Уточнені показники для окремих штамів були такими: *Karpaty* (Горбське родовище) – $12,35 \pm 0,89$ мкм; *Крут* (Курцівське родовище) – $11,1 \pm 0,74$ мкм; *Cherkasy* (Дашуківське родовище) – $10,7 \pm 0,97$ мкм; ґрунтові ізоляти – *Kyiv* – $11,7 \pm 0,85$ мкм та *Soil* – $12,1 \pm 0,73$ мкм (рис. 3.7). Відповідно до морфологічної класифікації Pussard and Pons [53], усі п'ять ізольованих штамів акантамеб були віднесені до другої морфологічної групи, представники якої найчастіше зустрічаються у зразках із навколишнього середовища.



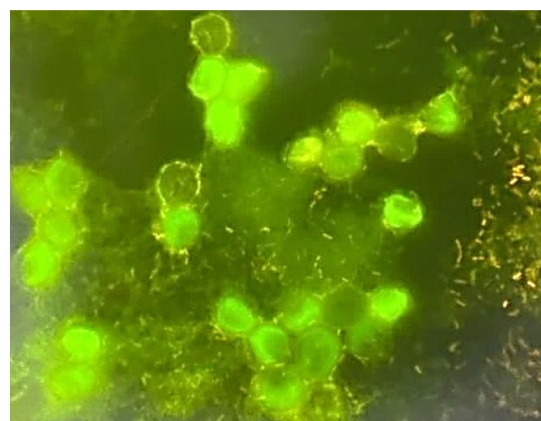
а.



б.



в.



г.

Рис. 3.7 – Мікрофотографії цист акантамеб: а – забарвлення за Грамом; б – забарвлення за Романовським-Гімзою; в – трихромове забарвлення; г – люмінесцентна мікроскопія.

Мікроскопічні дослідження показали, що цисти всіх досліджуваних штамів акантамеб мають характерну двоконтурну оболонку, яка складається з внутрішнього шару – ендоцисти та зовнішнього шару – ектоцисти. Така структура забезпечує високий рівень захисту клітини від несприятливих зовнішніх впливів, зокрема дії фізичних і хімічних чинників. Електронно-мікроскопічний аналіз зрізів досліджуваних акантамеб, виготовлених із зафіксованих агарових блоків, підтвердив наявність чітко відмежованих ендо- та ектоцисти, а також міжоболонкового простору. У центральній частині цисти виявлялась електронно-щільна структура, здебільшого кулястої форми (рис. 3.8 а). Однак встановлено, що форма серцевини може варіювати залежно від площини зрізу. У деяких випадках вона набуває асиметричної або неправильної конфігурації. Це свідчить про те, що спостережувані відмінності можуть відображати різні просторові ракурси однієї й тієї ж клітини, а не справжні морфологічні варіації (рис. 3.8 б).

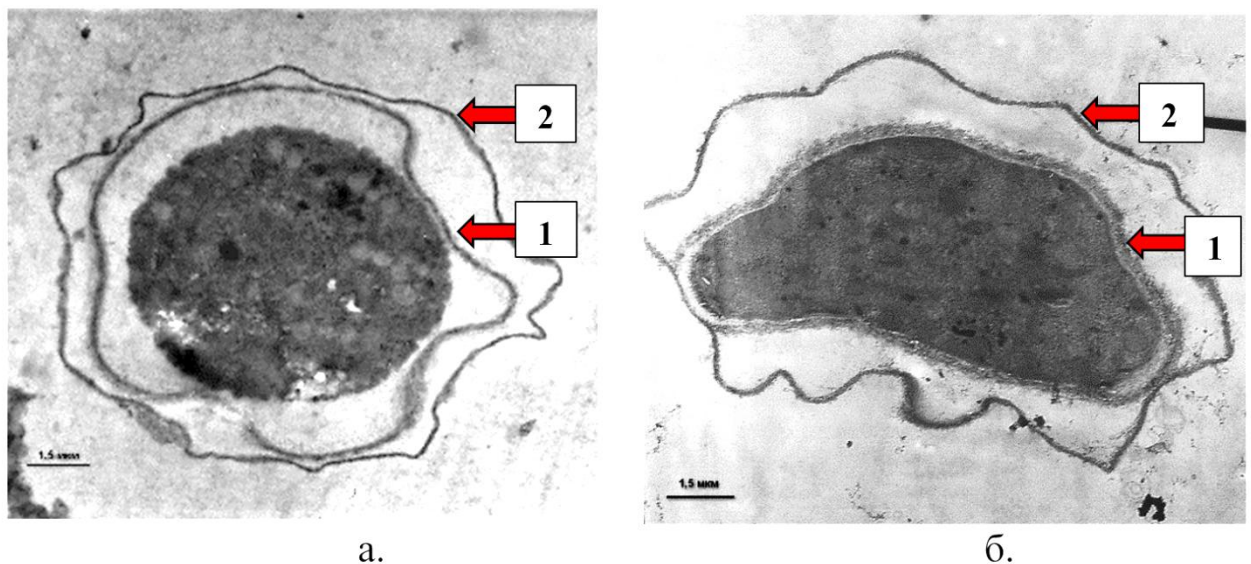


Рис. 3.8 – Цисти акантамеб штам *Krypt.* TEM (а – серцевина кулястої форми, б – серцевина неправильної форми): 1 – внутрішня оболонка (ендоциста), 2 – зовнішня оболонка (ектоциста)

У ході електронно-мікроскопічного дослідження цист акантамеб усіх штамів встановлено, що вони мають одну або дві апікальні пори (остіюли), розташовані на полюсах клітини. У цих зонах спостерігається злиття зовнішньої та внутрішньої оболонок, у результаті чого формується спеціалізована структура – оперкулюм (кришечка) (рис. 3.9, а-б). Основна функція остіол полягає в моніторингу умов довкілля – наявності поживних речовин, температурного режиму, вологості, осмотичного тиску та інших факторів, що сигналізують про настання сприятливого періоду для життєдіяльності. За таких умов активується процес ексцистування – вихід трофозоїта з цисти та відновлення метаболічної активності.

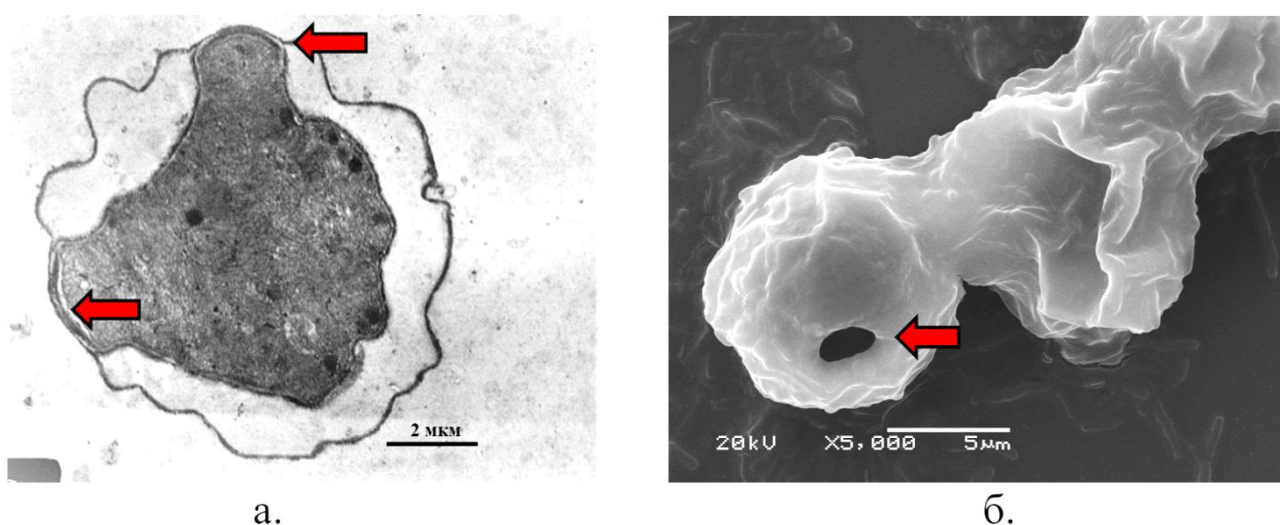


Рис. 3.9 – Апікальні пори акантамеб штам *Krum*: а – ТЕМ, б – СЕМ

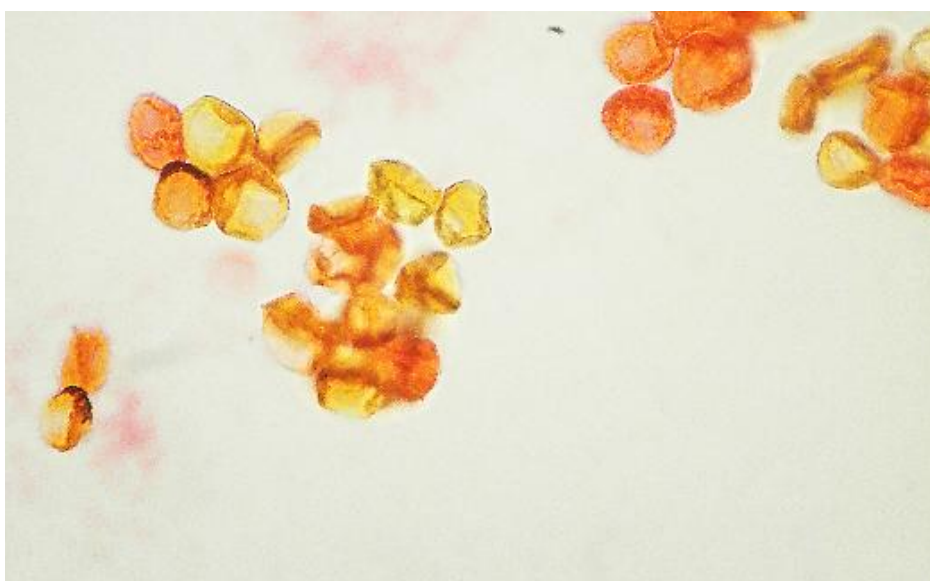
Отримані результати досліджень морфологічних особливостей цист акантамеб свідчать, що вони є високоспеціалізованою адаптивною формою, яка забезпечує виживання цих найпростіших у несприятливих умовах середовища.

3.3. Дослідження процесу ексцистування акантамеб

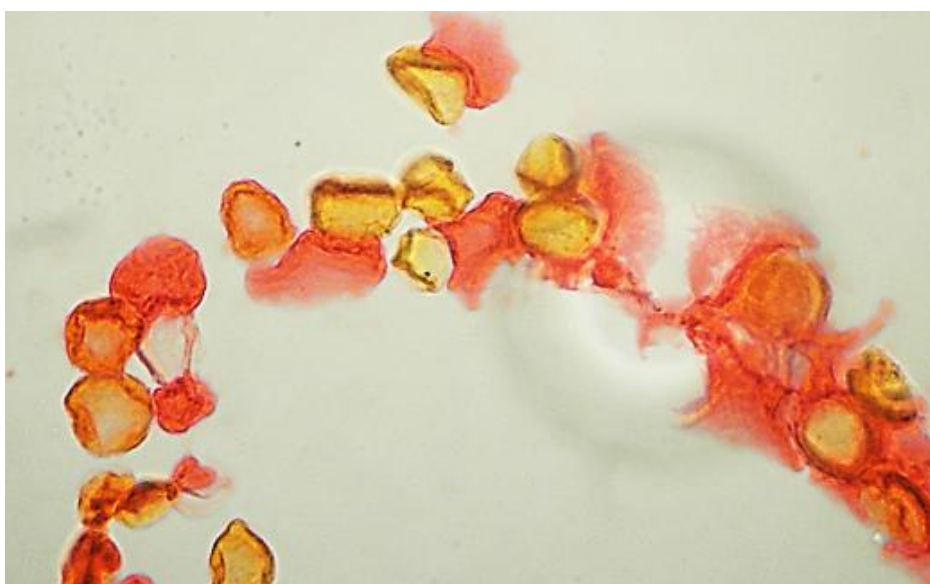
Отримані результати продемонстрували, що за сприятливих умов середовища – зокрема в присутності достатньої кількості поживних речовин, за оптимальної температури, вологості та рН – акантамеби ексцистуються, тобто переходять зі стану сплячої цисти у метаболічно-активну трофозоїтну форму.

Експериментальні дослідження дозволили охарактеризувати процес ексцистування досліджуваних акантамеб, яке відбувалося після інокуляції цист у поживне середовище PYG [104]. Уже на другу добу після початку культивування

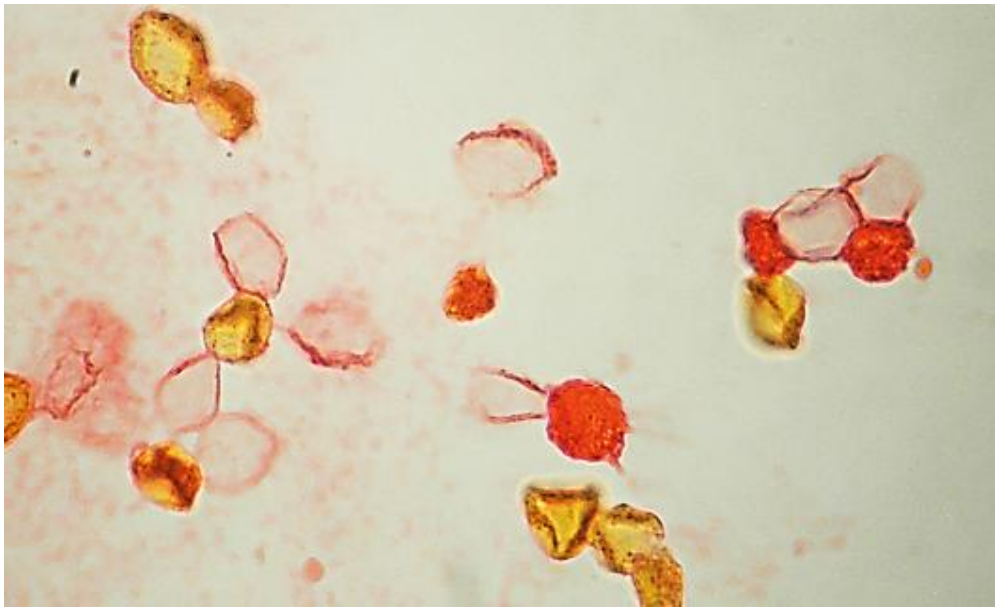
під час проведення мікроскопічного дослідження суспензії акантамеб, було продемонстровано поступове зменшення кількості цист і поява трофозоїтів. Для морфологічної диференціації різних стадій життєвого циклу акантамеб використовували метод забарвлення за Дональдсом (йод + еозин), який забезпечував чітку диференціацію клітинних форм (рис. 3.10 а–г). Вегетативні форми забарвлювалися в рожевий колір, тоді як цисти та їхні оболонки – у жовто-коричневий. Фіксація мазків методом фламбування спричиняла втрату типової амебоїдної форми, проте дала змогу чітко ідентифікувати внутрішньоклітинні структури, зокрема ядро та вакуолі.



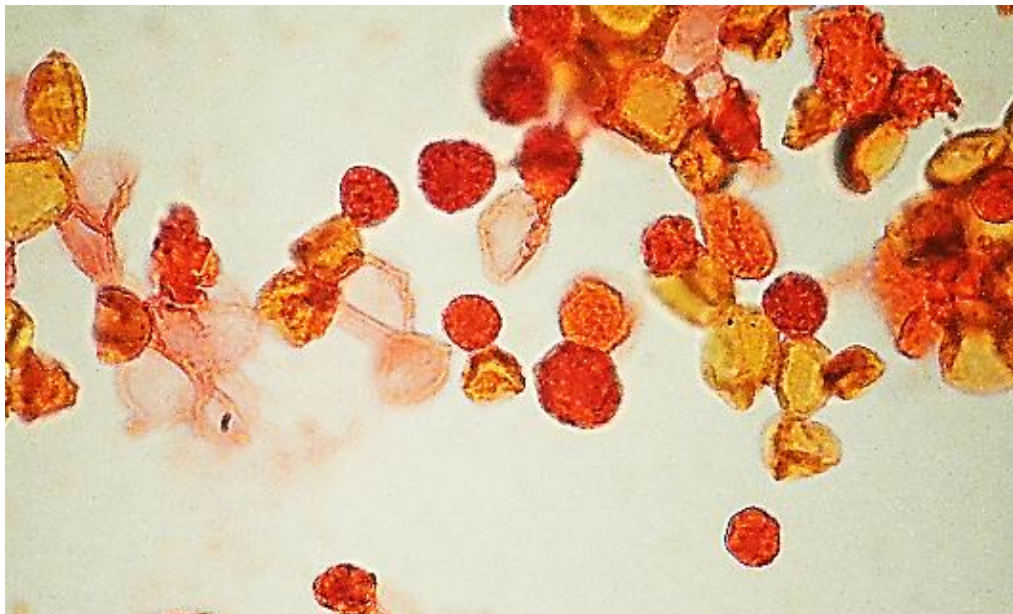
а.



б.



В.

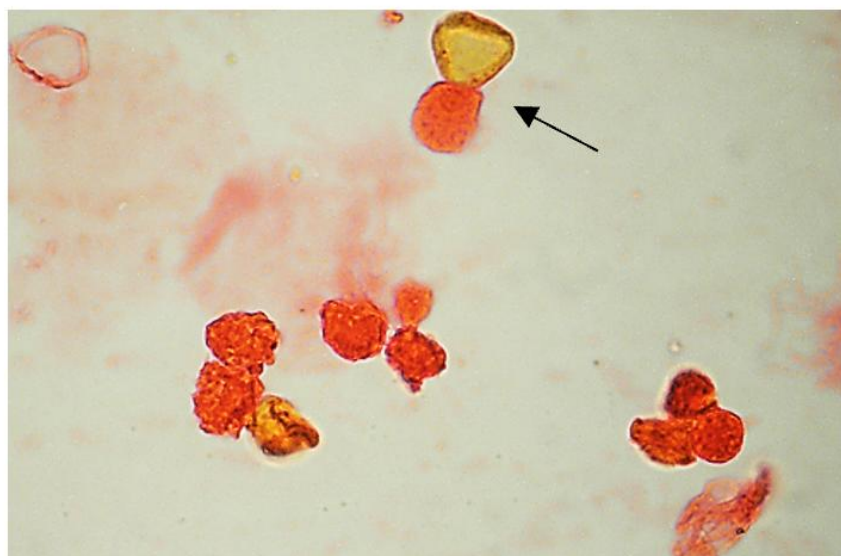


Г.

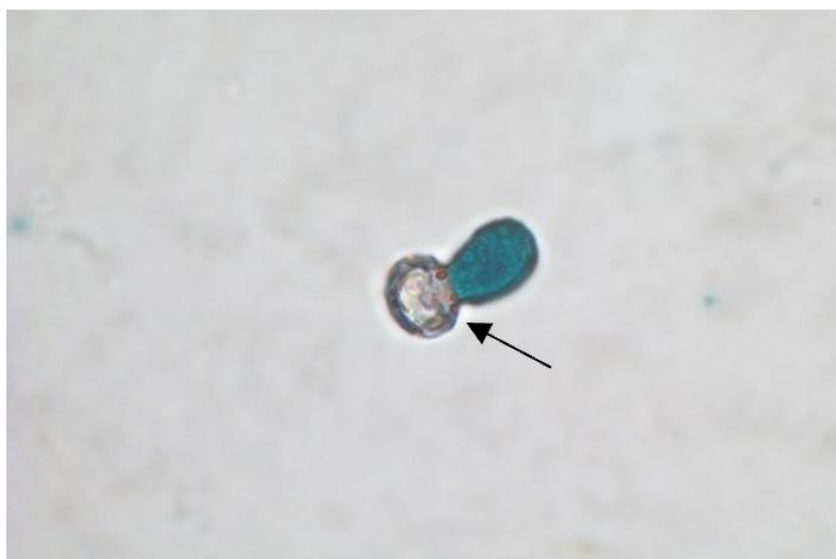
Рис. 3.10 – Ексцистування акантамеб: а – цисти (одразу після інокуляції у середовище PYG); б – 24 год. інкубації; в – 48 год.; г – 72 год. Цисти амеб жовто-коричневого кольору, трофозоїти – рожеві (збільшення $\times 1000$)

Застосування забарвлення за Дональдсом, а також трихромового барвника дало змогу детально відстежити морфологічні трансформації, притаманні процесу ексцистування акантамеб. Встановлено, що в момент виходу з цисти трофозоїт набуває чітко виражених структурних ознак – зокрема добре окресленого ядра, внутрішньоклітинних органел та численних травних вакуоль, що свідчить про відновлення метаболічної активності клітини. Під час ексцистування трофозоїт

поступово вивільняється через остіолу, залишаючи після себе двошарову оболонку, яка забезпечувала захист у несприятливих умовах (Рис. 3.11).



а.



б.

Рис. 3.11 – Процес ексцистування: а. – фарбування за Дональдсом, б. – забарвлення трихромовим барвником (збільшення $\times 1000$)

Отже, процес ексцистування акантамеб являє собою складний процес, який запускається за сприятливих умов навколишнього середовища та забезпечує відновлення клітиною вегетативної активності після перебування у метаболічно неактивному стані.

3.4. Культивування досліджуваних акантамеб

Для моноксенічного культивування вільноживучих амеб традиційно застосовується «голодний» агар (NNA), засіяний клітинами *Escherichia coli* [132]. У ході експериментальних досліджень на початкових етапах було проведено низку спроб культивування ізольованих акантамеб на різних грамнегативних бактеріях, зокрема *E. coli*, *Ps.aeruginosa* та *A.baumannii*. Отримані результати виявилися малоефективними: ріст найпростіших був мінімальним і спостерігався лише у зоні інокуляції, при цьому культури акантамеб швидко втрачали життєздатність. Такі дані засвідчили, що зазначені штами бактерій не можуть забезпечити належні умови живлення і, відповідно, не придатні для культивування досліджуваних штамів акантамеб у лабораторних умовах.

У зв'язку з низькою ефективністю традиційних підходів до моноксенічного культивування акантамеб, в дисертаційному дослідженні запропоновано альтернативне рішення – використання автохтонних бактеріальних штамів, виділених із середовища природного існування акантамеб. При вивченні мікрофлори бентонітових глин Курцівського родовища шляхом прямого висіву на поживний агар вдалося ізолювати декілька бактеріальних культур. Серед них найбільш придатним бактеріальним субстратом для акантамеб виявився штам бактерій, ідентифікований як *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*. При засіві цист акантамеб на даний бактеріальний субстрат, було зафіксовано активне ексцистування, що проявлялося швидкою появою трофозоїтів впродовж перших 24 годин культивування. Застосування зазначеного поживного мікробного компоненту створювало оптимальні умови для трансформації клітин акантамеб у вегетативну форму, сприяло збереженню їх життєздатності та активізувало ріст популяції. Отримані дані засвідчують доцільність використання цих бактеріальних культур як живильного субстрату для ефективного культивування акантамеб у лабораторних умовах.

У ході експериментальних досліджень з метою оптимізації умов моноксенічного культивування акантамеб на газоні бактерій *Cellulosimicrobium* штам *bent-1* було протестовано низку поживних середовищ, збагачених різними типами вуглеводів. Встановлено, що найсприятливішим для росту акантамеб є

поживний агар із додаванням 1% глюкози. Саме в цьому середовищі спостерігався інтенсивний ріст досліджуваних акантамеб вже на третю добу культивування. Подібний позитивний вплив на ріст і розмноження найпростіших також був зафіксований при додаванні до поживного середовища сахарози та арабінози. Отримані результати показали, що при додаванні лактози, мальтози та сорбіту ріст акантамеб був значно менш інтенсивним, а при використанні інших вуглеводних субстратів, ріст взагалі не спостерігався. Це підкреслює важливість глюкози, сахарози й арабінози, як джерел необхідних хімічних елементів для культивування акантамеб.

Під час вирощування досліджуваних штамів акантамеб у поживному бульйоні з додаванням 1% глюкози (HiMedia®, Індія) ріст відбувався повільно, поверхнево, із формуванням білуватого нашарування на стінках пробірок. Це свідчить про аеробний характер метаболізму досліджуваних акантамеб і їхню здатність до прикріплення на твердій поверхні. Значно кращі результати спостерігалися під час культивування в тонкому шарі поживного середовища (2–4 мм) у колбах Ерленмейєра, де забезпечувався кращий доступ до кисню та більша площа контакту зі скляною поверхнею.

У ході дослідження встановлено, що при моноксенічному культивуванні на поживному агарі з додаванням 1% глюкози акантамеби здатні розмножуватись в широкому температурному діапазоні – від 4 °C до 38 °C. Водночас інтенсивність росту значно варіювала залежно від температури. Найбільш активне розмноження та найшвидшу появу видимих ознак росту на бактеріальному газоні зафіксовано при температурі 36 ± 1 °C, що свідчить про оптимальність цього температурного режиму для культивування досліджуваних штамів акантамеб у лабораторних умовах. З огляду на отримані результати, саме температура 36 ± 1 °C була обрана як базова (контрольна) у подальших експериментальних дослідженнях, спрямованих на вивчення життєвого циклу акантамеб, процесів інцистування та ексцистування, оцінку життєздатності, а також визначення чутливості до лікарських засобів.

Під час посіву усіх досліджуваних штамів акантамеб на бактеріальний газон *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*, вирощений на поживному агарі з додаванням

1% глюкози, на 2–3 добу спостерігали поступову гіалінізацію та просвітлення бактеріального шару. Він набував шкіроподібної консистенції, що вказує на активне засвоєння бактеріальної маси акантамебами. Зона просвітлення поступово збільшувалась на ~0,5 см щодоби, що відображає характерний повзучий тип росту акантамеб на поверхні агару (рис. 3.14).



Рис. 3.14 – Повзучий ріст акантамеб штам *Krut* на поживному агарі, 4 доба після посіву

Отримані дані свідчать про чутливість досліджуваних штамів акантамеб до складу поживного середовища, зокрема до вуглеводів. Найбільш сприятливі умови для росту були зафіксовані при 36 ± 1 °C. Крім того, показано високу адаптивність акантамеб до моноксенічного культивування на газоні бактерій *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*. Сукупність цих параметрів дозволяє вважати зазначені умови оптимальними для подальших експериментальних досліджень.

3.5. Характеристика бактеріальних ізолятів, що використовувались для культивування досліджуваних акантамеб

У процесі дослідження було проведено комплексний аналіз ізольованих бактерій, що охоплював їхні морфологічні, культуральні, біохімічні та молекулярно-генетичні властивості. Бактерії роду *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1* – це грампозитивні, рухливі, некислотостійкі мікроорганізми, паличкоподібної

форми, в середньому 4-6 мкм в довжину, іноді можуть бути кокоподібними, що не утворюють спор (рис.3.12).

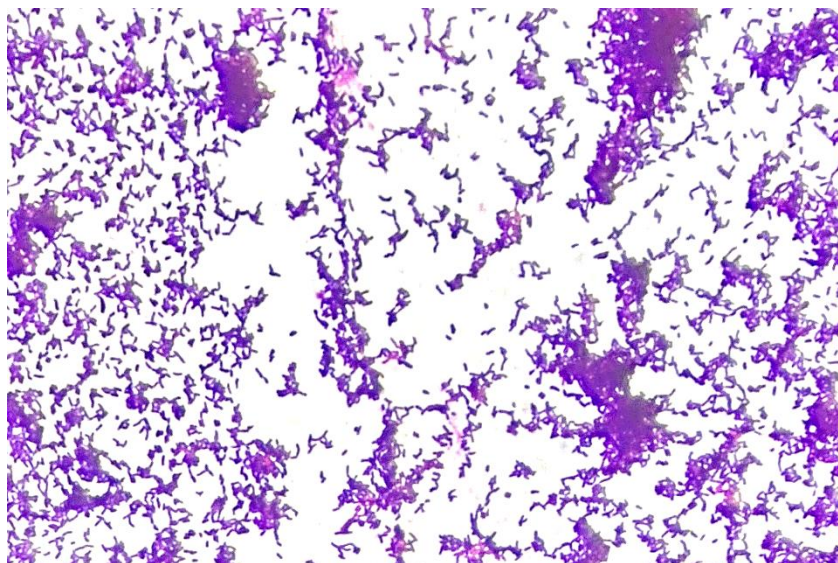


Рис.3.12 – Бактерії, що використовувались у якості харчового субстрату для акантамеб при моноксенічному культивуванні. Фарбування за Грамом. Світлова мікроскопія. Збільшення $\times 1000$

Дані бактерії добре ростуть на органічних поживних середовищах, утворюють колонії S-форми (круглі, опуклі, гладкі, блискучі). На поживному агарі (HiMedia®, Індія) можуть утворювати пігмент жовтого кольору. Здатні рости при рН від 6,0 до 10,0 та у температурному інтервалі 18-40°C (діапазон спостереження). За типом дихання – факультативні анаероби. Каталазопозитивні, а також володіють рядом гідролітичних та протеолітичних властивостей (таблиця 3.1). Індол та сірководень не утворюють.

Таблиця 3.1

Біохімічна характеристика *Cellulosimicrobium* sp. штам bent-1

№ з/п	Характеристика	Бактерії
1.	Гемолітичні властивості	+ (α -гемоліз)
2.	Пігментоутворення	+
3.	Відновлення нітратів	–
4.	Ферментація вуглеводів	
	Глюкоза	+
	D-Маніт	–

	Сахароза	+
	L-Арабіноза	–
	Лактоза	+
	Мальтоза	–
	Дульцит	–
	D-Сорбіт	–
	Саліцин	+
	Рафіноза	–
	Маноза	–
5.	Каталазна активність	+
6.	Гідроліз:	
	Крохмалю	+
	Казеїну	+
	Желатину	+
7.	Ріст в межах pH	6,0-10,0
8.	Температурний діапазон росту	18-40°C
9.	Утворення індолу	–
10.	Утворення сірководню	–

З метою геноідентифікації бактерій, використаних для моноксенічного культивування досліджуваних акантамеб, було проведено аналіз нуклеотидної послідовності гена, що кодує 16S рРНК. Після секвенування та вирівнювання отриманих послідовностей за допомогою інструмента BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) встановлено родову належність досліджуваних ізолятів. Результати аналізу засвідчили, що ізоляти належать до роду *Cellulosimicrobium*. Порівняння отриманих послідовностей з референтними даними показало 99% ідентичність із представниками *Cellulosimicrobium cellulans* та *Cellulosimicrobium funkei*. Даний штам був названий *Cellulosimicrobium* sp., штам *bent-1*, а відповідна нуклеотидна послідовність депонована в базі GenBank під номером MH517543 (рис.3.13).

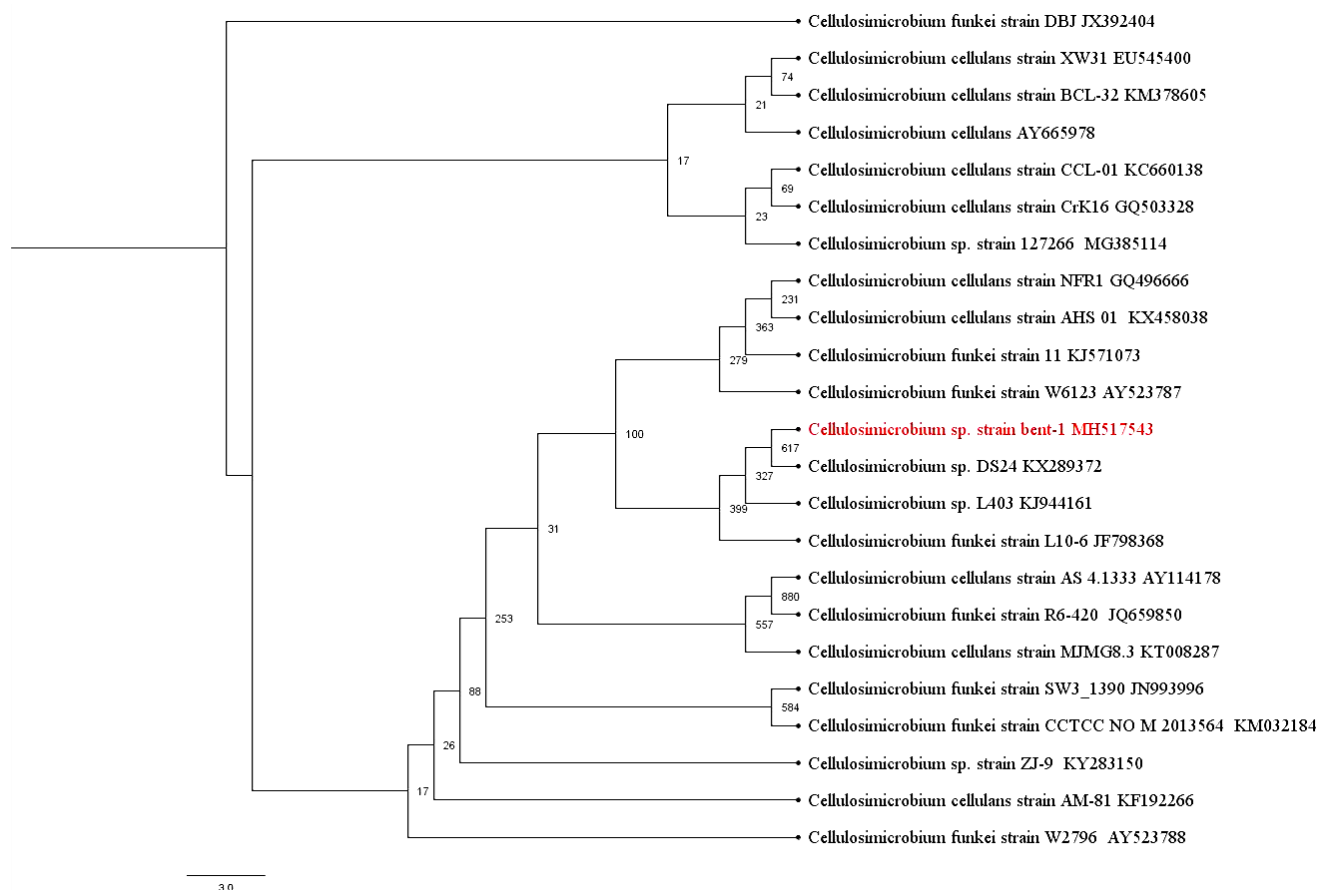


Рис. 3.13 – Філогенетичне дерево бактерій *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1* MH517543

Оскільки нуклеотидні послідовності генів *C. cellulans* та *C. funkei* демонструють майже повну (~100%) ідентичність, їх диференціація можлива лише на основі фенотипових характеристик. Типовими відмінностями *C. funkei* від *C. cellulans* є рухливість та відсутність здатності до ферментації інуліну або рафінози. Крім того, деякі штами *C. funkei* виявляють уреазну активність і не здатні відновлювати нітрати [133]. Ізольовані бактерії *Cellulosimicrobium* sp. штам bent-1 характеризувалися відсутністю ферментації рафінози та нездатністю відновлювати нітрати до нітритів, що дозволило класифікувати їх як представників виду *C. funkei*. Це підкреслює важливість комплексного підходу, що поєднує фенотипові ознаки з молекулярно-генетичними методами, для надійної ідентифікації бактерій із близьким генетичним профілем.

Представники *C. funkei* переважно трапляються у ґрунтових біотопах і стічних водах. Вони відносяться до умовно-патогенної мікрофлори, однак за умов

імунодефіциту можуть спричиняти клінічно значущі інфекції, включно з бактеріємією, інфекційним ендокардитом, ураженням кістково-суглобового апарату, перитонітом, асоційованим із перитонеальним діалізом, та ендoftальмітом [134].

3.6. Феномен бляшкоутворення

Використовуючи модифіковану методику агарових шарів, яка традиційно застосовується для виявлення бляшок бактеріофагів [135], академіком Широбоковим В.П. було продемонстровано здатність акантамеб формувати і шарі м'якого агару, інокульованому *Cellulosimicrobium* штам *bent-1*, зони лізису – бляшки, добре помітні неозброєним оком.

У результаті експериментальних досліджень встановлено, що всі п'ять досліджуваних штамів акантамеб демонструють здатність до формування бляшок під час культивування в товщі поживного середовища, інокульованому бактеріями *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*. У середньому бляшки візуалізувалися на третю добу після інокуляції. Водночас спостерігалися штамоспецифічні відмінності: штами *Kyiv*, *Krym* та *Cherkasy* характеризувалися швидшим формуванням, чіткими краями та більшими розмірами бляшок, тоді як штами *Karpaty* і *Soil* демонстрували уповільнене зростання та менші розміри бляшок.

Отримані результати показали, що бляшки на бактеріальному газоні мали переважно округлу форму з чіткими межами та гладкими краями, відрізняючись підвищеною прозорістю порівняно з ділянками, де зберігався ріст бактерій. Такий ефект, ймовірно, пов'язаний зі зниженням щільності бактеріального росту внаслідок активного живлення трофозоїтів. Локальне утворення цих просвітлених ділянок ймовірно, відображає високу фагоцитарну активність акантамеб. Характерною особливістю поверхневих бляшок є наявність кратероподібного заглиблення в агарі, що значно полегшує візуалізацію та морфологічну ідентифікацію утворень. Механізми їх виникнення залишаються не до кінця з'ясованими й потребують подальшого вивчення (рис. 3.14).

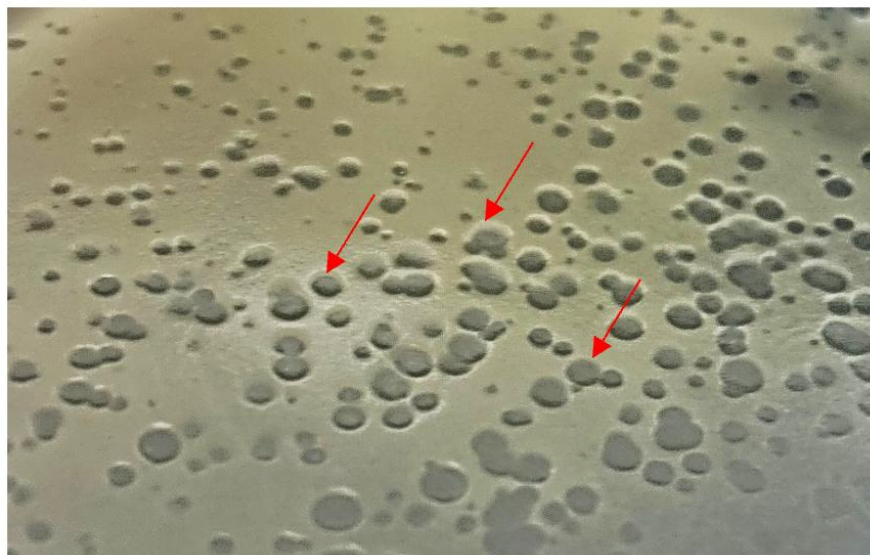


Рис. 3.14 – Бляшки акантамеб штам *Kyiv* на 1%ГМПА

Феномен утворення бляшок дозволяє не лише виявляти життєздатні клітини акантамеб, а й застосовувати цей підхід для кількісної оцінки їх концентрації в суспензії. Аналогічно до методики підрахунку фагових часток, можна припустити, що кожна бляшка утворюється в результаті проліферації однієї акантамебної клітини. Відповідно, кількість бляшок відповідає числу життєздатних форм у досліджуваному зразку. Це дає підстави вважати метод бляшкоутворення ефективним засобом як для якісної, так і кількісної оцінки популяції акантамеб, а також для визначення їхньої біологічної активності в умовах лабораторного культивування.

Longfei Shu et al. описали соціальну поведінку вільноживучих амеб роду *Dictyostelium discoideum*, яких називають «примітивними фермерами», оскільки вони мають стабільні зв'язки зі своїми симбіотичними бактеріями протягом усього життєвого циклу. Ці фермерські клони амеб можуть переносити бактерії і висівати їх, як нові джерела їжі [136]. Подібне явище спостерігалось також при тривалому культивуванні досліджуваних акантамеб.

У ході дослідження встановлено, що акантамеби за наявності достатньої кількості бактеріального субстрату в поживному середовищі активно формують бляшки, які поступово збільшуються в розмірах унаслідок фагоцитозу бактеріальної маси. Після виснаження бактеріального шару спостерігалось зменшення інтенсивності росту акантамеб. Проте встановлено, що акантамеби

здатні утримувати частину фагоцитованих бактерій у життєздатному стані всередині клітини, а згодом – вивільняти їх у зовнішнє середовище, стимулюючи повторне зростання бактеріальної популяції. Після досягнення необхідної щільності бактеріального шару акантамеби знову активізували фагоцитоз і поновлювали ріст колоній (рис. 3.15), що свідчить про складні трофічні взаємодії та здатність найпростіших до регуляції мікробного середовища в межах бляшки.

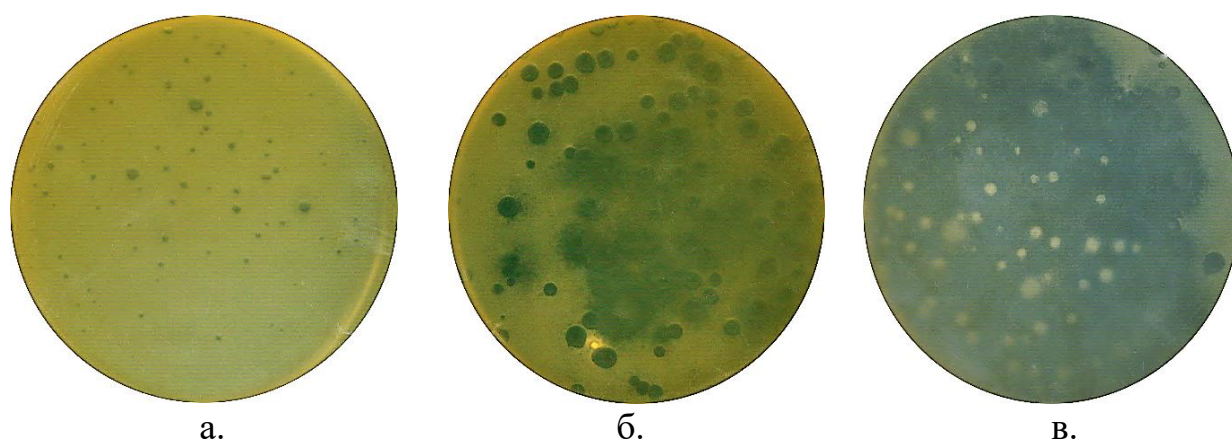


Рис. 3.15 – «Ріст» бляшок на 1% глюкозному поживному агарі: а. – 3-тя доба культивування; б. – 7 доба культивування; в. – 14 доба культивування

Явище тісного симбіозу між бактеріями роду *Cellulosimicrobium* штам *bent-1* та досліджуваними акантамебами, ізольованими з бентонітових глин і ґрунтів України, було неодноразово підтверджене під час тривалого лабораторного культивування. У процесі серійного пасажування культур за розробленими умовами стабільно фіксувалась присутність клітин *Cellulosimicrobium* штам *bent-1* у суспензіях акантамеб. Це свідчить про потенційну здатність цих бактерій адаптуватися до перебування всередині клітин акантамеб, що вказує на можливість розвитку симбіотичних взаємодій.

3.7. Визначення патогенного потенціалу виділених акантамеб

З метою попередньої оцінки патогенного потенціалу акантамеб, ізольованих із різних природних субстратів, було проведено комплекс термотолерантних та осмоотолерантних тестів. Ці методи є загальноприйнятими у протозоологічній практиці як скринінгові підходи для визначення потенційної патогенності. Встановлено, що здатність акантамеб адаптуватися до підвищеної температури та

високого осмотичного тиску корелює з їхнім патогенним потенціалом і може розглядатися як один із маркерів ризику інфікування людини [61, 137, 138].

Узагальнені результати термотолерантного та осмотолерантного тестування, наведені в таблиці 3.2, дозволяють провести порівняльну оцінку адаптивного потенціалу досліджуваних штамів акантамеб і сформулювати висновки щодо рівня їх потенційної патогенності.

Таблиця 3.2

**Порівняльна характеристика термо- та осмотолерантності ізолятів
Acanthamoeba spp.**

Штам ізольованих акантамеб	Осмотолерантний Тест		Термотолерантний тест		
	Концентрація D-маніту 0,5 М	Концентрація D-маніту 1,0 М	T – 25°C	T – 37°C	T – 40°C
<i>Krym</i>	+	–	+	+	–
<i>Karpaty</i>	+	–	+	+	–
<i>Cherkasy</i>	+	–	+	+	–
<i>Kyiv</i>	+	–	+	+	–
<i>Soil</i>	+	–	+	+	–

* + - спостерігається активний ріст амєб, – - відсутність росту амєб

Доведено, що всі досліджувані штами акантамеб зберігали здатність до росту при температурах 25°C і 37°C, що свідчить про їхню адаптованість до умов, наближених до температури тіла людини. Водночас, жоден з досліджуваних штамів акантамеб не демонстрував росту при 40°C, що вказує на відсутність ознак гіпертермотолерантності, характерної для патогенних штамів *Acanthamoeba* spp. [31, 139].

У тесті на осмотолерантність усі ізоляти акантамеб зберігали життєздатність у присутності 0,5 М D-манітолу, що свідчить про їхню помірну стійкість до осмотичного навантаження. Проте при концентрації 1,0 М D-манітолу ріст не спостерігався, що вказує на обмежену здатність до адаптації за умов вираженого осмотичного тиску, характерного для внутрішньотканинного середовища

організму людини. Такі властивості відповідають потенційно непатогенним формам акантамеб [140].

Отримані результати свідчать, що ізолювані штами акантамеб не проявляють гіпертермотолерантності та мають низький рівень осмотичної стійкості, що дозволяє класифікувати їх як непатогенні. Це визначає їхню безпечність для застосування в лабораторних умовах, оскільки ризик інфікування людини під час експериментів є мінімальним.

3.8. Генотипування та філогенетичний аналіз досліджуваних акантамеб

З метою визначення родової належності акантамеб, ізолюваних із бентонітових глин та ґрунтів, було проведено секвенування нуклеотидних послідовностей, довжина яких становила від 1373 до 1707 пар нуклеотидів. Ампліфіковані ділянки охоплювали вісім варіабельних регіонів гена GTSA.B1, який є частиною гена 18S рДНК – одного з найбільш інформативних молекулярних маркерів для ідентифікації найпростіших. Порівняльний аналіз отриманих послідовностей із референсними зразками з міжнародних баз даних (зокрема GenBank) засвідчив, що всі ізолювані культури належать до роду *Acanthamoeba*, який є одним з найпоширеніших серед ізолятів з довкілля і клінічних зразків та асоціюється з патогенними формами, зокрема збудниками АК та ГАЕ.

Молекулярна ідентифікація також дозволила встановити видовий статус досліджуваних ізолятів: штами *Krym*, *Cherkasy* та *Karpaty* відносяться до виду *A. castellanii*; штаму *Kyiv* було віднесено до виду *A. hatchetti*, а штаму *Soil* – до *A. terricola* (рис. 3.16). Ідентифіковані нуклеотидні послідовності три штами були депоновані в базу даних GenBank, де отримали наступні реєстраційні номери: *Karpaty* – MH620775, *Krym* – MH620776, *Cherkasy* – MH620777. На час написання отримані нуклеотидні послідовності штаму *Soil* та *Kyiv* подані GenBank та проходять реєстрацію (SUB15731538 та SUB15731486 відповідно).

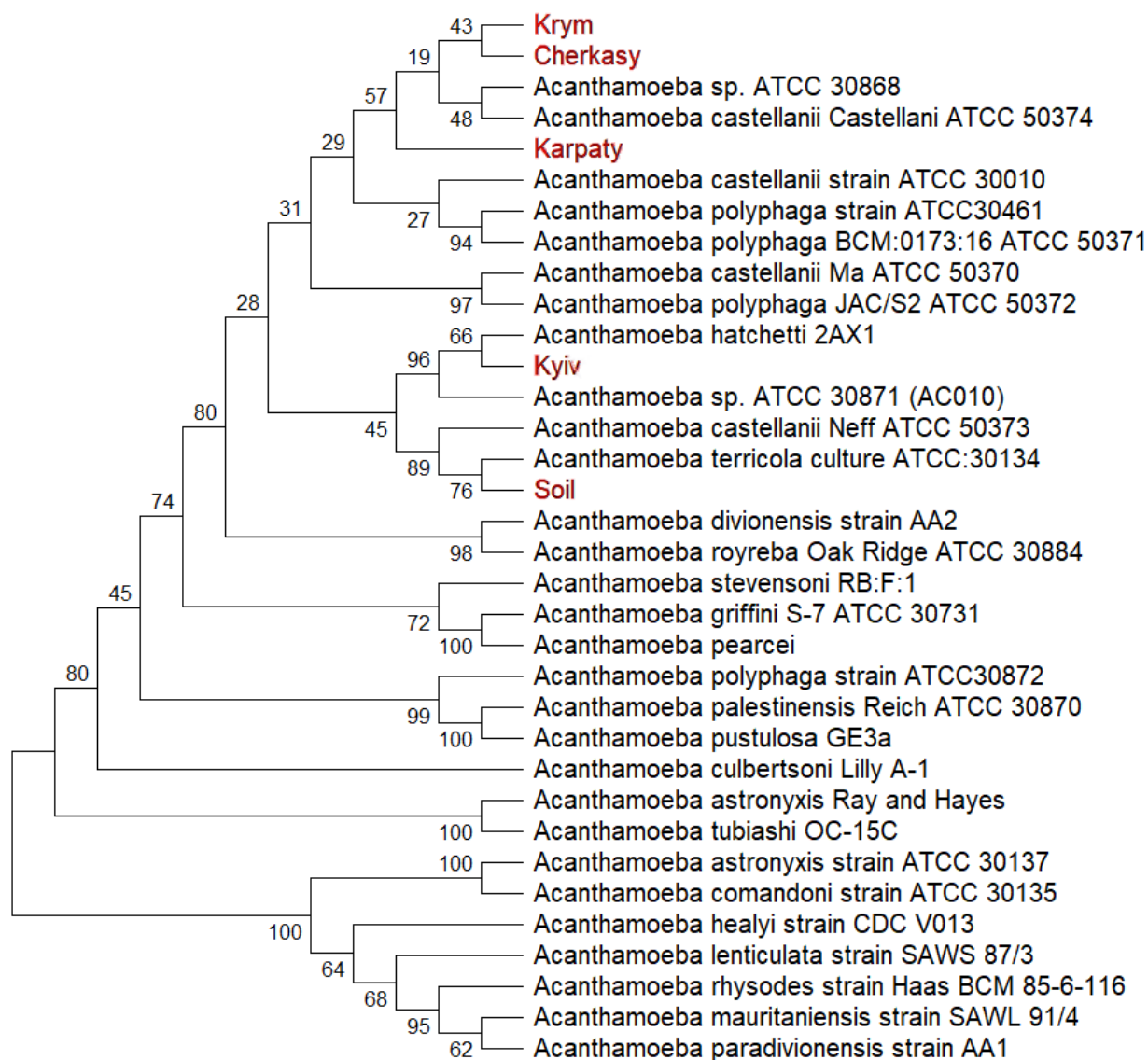


Рис.3.16 – Філогенетичні взаємозв'язки *Acanthamoeba* spp., отриманих із об'єктів навколишнього середовища, встановлені на основі порівняльного аналізу послідовностей гена 18S рРНК. Філогенетичне дерево побудовано методом мінімальної еволюції (ME) на основі еволюційних дистанцій, обчислених за підходом максимальної складеної правдоподібності. Оптимізацію топології виконано алгоритмом CNI у програмі MEGA12. Значення бутстреп-підтримки (1 000 реплікатів) виражені у відсотках та наведено біля відповідних гілок.

Результати дослідження підтвердили ефективність молекулярно-генетичних методів для точної ідентифікації акантамеб, дозволили визначити видовий склад ізолятів, поширених на території України, та сформували основу для подальшого вивчення їхньої біології, екологічних особливостей і потенційної патогенності.

Підводячи підсумки третього розділу можна зробити наступні висновки:

1. Вперше в Україні досліджено штами вільноживучих амеб роду *Acanthamoeba* з колекції кафедри мікробіології, паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця, що були ізольовані із бентонітових глин Курцівського, Горбського та Дашуківського родовищ, а також із ґрунтових зразків м. Києва.

2. За допомогою світлової, фазово-контрастної та електронної мікроскопії докладно охарактеризовано морфологічні стадії життєвого циклу акантамеб. Встановлено характерні ознаки трофозоїтів – поліморфізм, наявність акантоподій та високу фагоцитарну активність. Уперше описано перехідну форму – прецисту. Для цист підтверджено наявність двошарової оболонки, міжоболонкового простору та остіол, функціонально пов'язаних із процесами інцистування та ексцистування. Відповідно до морфологічної класифікації за Pussard and Pons, цисти всіх досліджуваних штамів акантамеб віднесено до II групи.

3. Запропоновано використання бактерій *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* (GenBank: MH517543), ізольованого з Курцівського родовища бентонітових глин, у якості харчового субстрату для моноксенічного культивування акантамеб. Експериментальні дані свідчать про наявність тісного симбіотичного зв'язку між досліджуваними акантамебами та зазначеними бактеріями, що проявляється у спільному культивуванні, «фермерських» відносинах та стабільній присутності бактерій у суспензіях протягом пасажів.

4. Вперше виявлено й описано утворення бляшок акантамебами при співкультивуванні бактерій та акантамеб у шарі напівтвердого поживного агару. Методика дозволила проводити кількісний облік життєздатних форм та оцінювати їхню біологічну активність.

5. Результати термо- та осмотолерантного тестування засвідчили, що ізолювані штами не проявляють ознак гіпертермотолерантності та характеризуються обмеженою стійкістю до осмотичного стресу, що є типовим для непатогенних форм. Це підтверджує їхню біологічну безпечність і придатність для використання в умовах лабораторних досліджень.

6. Молекулярно-генетичний аналіз фрагментів гена 18S рРНК підтвердив приналежність усіх ізолюваних культур до роду *Acanthamoeba*. Згідно з результатами філогенетичного аналізу, ізоляти демонструють найбільшу спорідненість із референсними штамми *A. castellanii*, *A. hatchetti* та *A. terricola*. Отримані нуклеотидні послідовності були депоновані в базі даних GenBank, що забезпечує їх доступність для подальших міжнародних порівняльних досліджень.

РОЗДІЛ 4.

АКАНТАМЕБИ ЯК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИСТОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ

Вільноживучі амеби роду *Acanthamoeba* є одними з найбільш перспективних модельних об'єктів, що активно використовуються у мікробіологічних та фармакологічних дослідженнях. Вони застосовуються для вивчення механізмів фагоцитозу, симбіотичних та паразитарних взаємодій, а також для тестування протистоцидної активності хімічних сполук.

Одним із ключових факторів, що забезпечують ефективність застосування акантамеб як експериментальної моделі, є їхнє широке поширення у природному середовищі, простота ізоляції та здатність до стабільного культивування в лабораторних умовах. У попередніх дослідженнях нами було проведено всебічний аналіз штамів *Acanthamoeba* spp., ізольованих із бентонітових глин та ґрунтових зразків різних регіонів України. Розроблені та оптимізовані умови моноксенічного культивування акантамеб із використанням бактерій *Cellulosimicrobium* sp. (штам *bent-1*) у якості бактеріального субстрату забезпечили підтримання життєздатності культур протягом тривалого періоду та високу відтворюваність експериментальних результатів.

Вищеописаний феномен бляшкоутворення, заснований на здатності трофозоїтів акантамеб локально лізувати бактерії в агаровому шарі, є важливим інструментом для оцінки їхньої життєздатності та метаболічної активності, а також для дослідження впливу різних хімічних сполук.

Значущим з точки зору біобезпеки є також той факт, що результати термо- та осмотолерантного тестування досліджуваних штамів *Acanthamoeba* spp. не виявили ознак гіпертермотолерантності чи високої осмотичної стійкості, що є типовим для потенційно патогенних ізолятів. Таким чином, досліджені штами можна охарактеризувати як непатогенні, що підтверджує їхню безпечність для використання у стандартних лабораторних умовах.

У даному розділі представлено експериментальні методики, що застосовувались для оцінки чутливості досліджуваних штамів акантамеб до вже

відомих протистокцидних засобів, а також для аналізу ефективності амебоцидної активності біологічно активних сполук.

4.1. Дифузійні методи визначення протистокцидної активності

Диско-дифузійний метод

Диско-дифузійний метод, відомий у класичному варіанті як модифікація Кірбі–Бауера, широко застосовується у клінічній мікробіології для визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів [141, 142]. У дисертаційному дослідженні цей підхід було адаптовано до вивчення протистокцидної активності хіміотерапевтичних агентів відносно вільноживучих амеб роду *Acanthamoeba*. Суть методу полягає у виявленні впливу сполук на здатність акантамеб утворювати бляшки на бактеріальному газоні, що слугує показником їх життєздатності та активності.

Для приготування тест-системи використовували поживний агар із додаванням 1% глюкози. Середовище розплавляли та охолоджували до температури 45 °C. До охолодженого середовища додавали суспензію акантамеб у концентрації понад 10^3 клітин, а також 500 мкл бактеріальної суспензії *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* у концентрації 10^8 КУО/мл, яка виконувала роль харчового субстрату. Отриману суміш ретельно перемішували та рівномірно розливали у стерильні чашки Петрі. Після застигання середовище інкубували при температурі 36 ± 1 °C протягом 24 годин для формування суцільного бактеріального газону.

Через 24 години на поверхні агарового шару розміщували паперові диски, попередньо просочені різними препаратами досліджуваних лікарських засобів. Відтермінування внесення дисків було необхідним, оскільки передчасне додавання препаратів могло призвести до пригнічення росту бактерій і, відповідно, спотворити результати експерименту.

Результати оцінювали поетапно: перше спостереження проводили на третю добу інкубації, остаточне – на п'яту. У разі виявлення протистокцидної активності тестованої речовини навколо диска спостерігалася зона інтенсивного росту бактерій *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* без утворення бляшок – зона редукції

бляшок. У контрольних зразках (диск без препарату), а також за умови низької активності досліджуваної речовини, акантамеби формували типові бляшки в зоні навколо диска, руйнуючи бактеріальний газон.

Відсутність бляшкоутворення в присутності тестованої сполуки трактувалася як прояв її амебоцидної активності та свідчила про пригнічення життєдіяльності акантамеб (рис. 4.1).

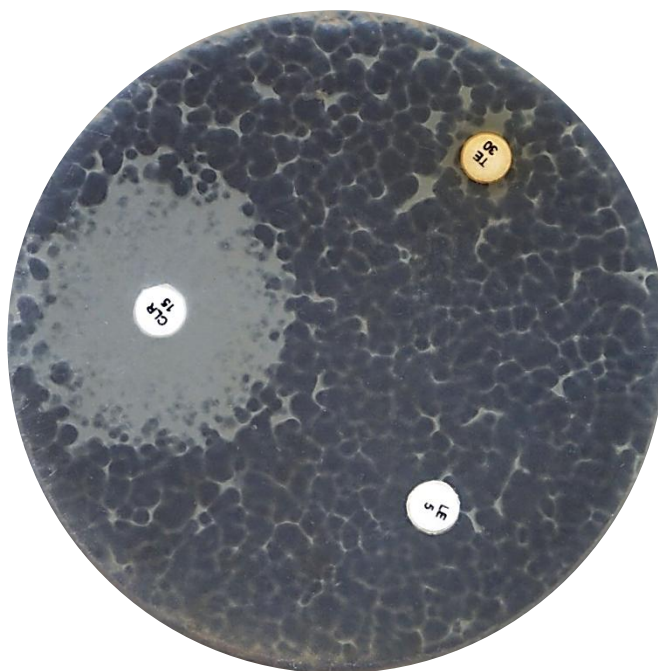


Рис. 4.1 – Зона редукції бляшок під дією кларитроміцину

Лунко-дифузійний метод

У результаті проведених досліджень була розроблена та апробована експериментальна методика оцінки амебоцидної активності хімічних сполук, заснована на поєднанні феномену бляшкоутворення та агарової дифузії, проте на відміну від вищеописаної методики препарати використовувались у розчиненому стані.

На першому етапі в чашки Петрі із тонким шаром 1% глюкозного поживного агару (4 мл) встановлювали наконечники для дозаторів (200 мкл), орієнтовані широким кінцем донизу. У розплавлений агар, охолоджений до $\approx 45^{\circ}\text{C}$, додавали суспензію акантамеб (10^3 клітин) та 500 мкл бактеріальної маси *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* (10^8 КУО/мл), яка виконувала роль живильного субстрату для

найпростіших. Після застигання агару наконечники видаляли, формуючи рівномірні лунки.

Подальша інкубація протягом 18-24 годин при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ забезпечувала утворення щільного бактеріального шару. Такий підхід дозволяв обмежити антибактеріальний вплив тестованих речовин, зосереджуючи їхню дію безпосередньо на акантамебах.

У кожную з лунок вносили по 50 мкл розчину досліджуваної сполуки (1000 мкг/мл), приготовленої на основі етанол-водної суміші (1:1). Контрольні лунки містили лише розчинник. Чашки повторно інкубували протягом 72 годин за температури $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

У разі вираженої амебоцидної активності навколо лунок формувалися зони редукції бляшок (ЗРБ) – ділянки часткового або повного пригнічення росту акантамеб, що свідчило про ефективність досліджуваних речовин. Вимірювання діаметра ЗРБ проводили електронним штангенциркулем або міліметровою лінійкою з фіксацією в міліметрах; окремо враховували ступінь редукції (повна / часткова) (Рис.4.2).



Рис.4.2 – Формування ЗРБ під впливом різних концентрацій досліджуваних препаратів

Таким чином дифузійні методики продемонстрували високу ефективність як прості, наочні та відтворювані підходи. Додатковими перевагами цих методів є

економність та здатність одночасно тестувати велику кількість зразків. Завдяки поєднанню двох незалежних підходів вони є зручними для первинного скринінгу та порівняльної оцінки нових потенційно активних хімічних сполук.

4.2. Метод редукції бляшок в кількісному варіанті

Метод редукції бляшок є інформативним підходом для оцінки цистоцидної активності хіміотерапевтичних речовин, оскільки дозволяє безпосередньо аналізувати вплив досліджуваних препаратів на цисти *Acanthamoeba* spp. у лабораторних умовах. Його сутність полягає у попередньому інкубуванні акантамеб з досліджуваними сполуками перед засівом у поживне середовище, що забезпечує прямий вплив хімічних агентів на клітини найпростіших.

На початковому етапі готували суспензію цист акантамеб, яку змішували з досліджуваним препаратом у заданій концентрації та інкубували 24 години в термостаті при 36 ± 1 °C. Така процедура забезпечувала безпосередній контакт клітин акантамеб із тестованою речовиною та дозволяла ініціювати можливі цитотоксичні ефекти. Після інкубації суміш вносили у розплавлене та охолоджене до ≈ 45 °C поживне середовище з додаванням 1% глюкози та інокулювали 500 мкл суспензії бактерій *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* (10^8 КУО/мл), які слугували живильним субстратом для акантамеб, ретельно перемішували та розливали у стерильні чашки Петрі. Інкубацію здійснювали при 36 ± 1 °C протягом 5 діб.

Результати оцінювали на третю добу, остаточні дані фіксували на п'яту. Кількість життєздатних клітин визначали за кількістю бляшок, сформованих акантамебами на бактеріальному газоні. Зменшення кількості бляшок у дослідних зразках порівняно з контролем свідчило про цистоцидну активність тестованої речовини.

Для кількісної оцінки використовували показник відсотка редукції бляшок за формулою:

$$R = \frac{C - E}{C} \times 100$$

R – відсоток редукції (ступінь пригнічення росту акантамеб), **C** – кількість бляшок у контролі (що відповідає 100% життєздатності акантамеб), **E** – кількість бляшок у дослідному зразку після дії препарату.

Отримані значення дозволили оцінити інтенсивність цистоцидної дії досліджуваних сполук. Високий показник R (наближений до 95–100%) свідчив про повне пригнічення утворення бляшок і відповідав інгібуючій концентрації IC_{95} . Значення $R \approx 50\%$ узгоджувалося з IC_{50} і вказувало на середній рівень специфічної активності. Натомість значення R нижче 20% свідчили про низьку ефективність сполуки проти акантамеб і характеризували препарати з обмеженою або слабкою цистоцидною дією. Таким чином, інтерпретація кількості утворених бляшок слугувала важливим критерієм для класифікації сполук за ступенем їх антимікробної активності.

Метод редукції бляшок відзначається простотою виконання та дає змогу дослідити безпосередній вплив досліджуваної сполуки на цисти акантамеб, що дозволяє оцінити її потенційну цистоцидну активність.

Зважаючи на викладене в розділі 4 можна зробити такі висновки:

1. Вільноживучі амеби роду *Acanthamoeba* продемонстрували свою ефективність як експериментальна модель для оцінки протистотичної активності хімотерапевтичних агентів. Завдяки здатності існувати у двох морфологічних формах – трофозойтній та цистній – вони дозволяють комплексно оцінювати вплив препаратів на метаболічно активні та «сплячі» стадії життєвого циклу.

2. Розроблені й апробовані методики – дифузійні та редукційні методи в поєднанні з феноменом бляшкоутворення акантамеб забезпечують високу відтворюваність і чутливість результатів. Їх поєднання дозволяє отримувати достовірну кількісну оцінку чутливості акантамеб до досліджуваних сполук у експериментальних умовах.

3. Запропоновані моделі є маловитратними, простими у виконанні та придатними для стандартизації в умовах мікробіологічних лабораторій. Їх використання дозволяє скоротити тривалість доклінічного скринінгу потенційних

протистоцидних агентів і визначити ефективність хіміотерапевтичних сполук уже на ранніх етапах дослідження.

4. Отримані результати підтверджують, що досліджувані штами акантамеб є перспективною біологічною системою для апробації нових хіміотерапевтичних засобів, а розроблені методики можуть бути використані для тестування клінічних ізолятів *Acanthamoeba* spp. з метою оптимізації лікування акантамебних інвазій і розробки нових антипротозойних препаратів.

РОЗДІЛ 5.
ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИСТОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ ТА
ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ХІМІЧНИХ СПОЛУК ГРУПИ
1-АЛКІЛ(АРИЛ)ОКСИ-3-АМІНО-2-ПРОПАНОЛІВ

5.1. Скринінгове дослідження протистоцидної активності хімічних сполук

У ході експериментального скринінгу протистоцидної активності щодо ізольованих штамів акантамеб було досліджено 418 хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів. Вказані сполуки було надано в межах співпраці між кафедрою мікробіології, паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця та Інститутом органічної хімії НАН України. Для оцінки амебоцидної активності використовували модифікований лунко-дифузійний метод, розроблений і апробований у ході проведених досліджень. У якості препарату порівняння застосовували клотримазол, відомий за даними літератури своєю антиакантамебною активністю [108, 109], [110] [111]. Наші результати також підтвердили стабільно високу протистоцидну дію клотримазолу ($M = 44$ мм, $SD = 1$ мм, $CI = 2,27$ %, $p < 0,001$), що обґрунтовує його використання як контрольного препарату для порівняльної оцінки активності досліджуваних сполук.

Для систематизації результатів експериментального дослідження та порівняльної оцінки протистоцидної активності досліджуваних хімічних сполук нами була запропонована умовна шкала класифікації за рівнем специфічної дії на акантамеби. Згідно з цією класифікацією, всі сполуки розподілялися на чотири групи залежно від середнього діаметра зони редукції бляшок (ЗРБ): до сполук із високою активністю відносили ті, що формували ЗРБ діаметром >35 мм; середня активність – ЗРБ у межах 30-34 мм; низьку активність – при значеннях 20-30 мм; мінімальну активність – при діаметрі ЗРБ менше 20 мм.

Запропонований підхід дозволив оцінити специфічну активність протестованих речовин та класифікувати їх за рівнем біологічної активності:

- Високу протистоцидну активність (>35 мм) продемонстрували 26 сполук (7%), серед яких найефективнішими виявилися АМ-392 (44 мм), АМ-166 (39,67

мм), АМ-177 (39,33 мм), АМ-175 (39 мм) та АМ-359 (38,67 мм). Дані сполуки спричиняли значне пригнічення росту акантамеб, утворюючи чітко виражені зони редукції бляшок, ефективність яких була співставною з дією контрольного препарату – клотримазолу.

- Середню активність (30-35 мм) продемонстрували 75 сполук (18%), зокрема АМ-110, АМ-118, АМ-159 і АМ-257. Для цієї групи характерним було формування менш виражених зон редукції бляшок.

- Низький рівень активності (20-29 мм) зафіксовано у 131 сполуки (31%), серед яких – АМ-104 (23,67 мм), АМ-115 (27,67 мм), АМ-260 (27 мм). При цьому зони редукції бляшок були меншими, а по відношенню для деяких штамів акантамеб мінімальними.

- Мінімальну активність (<20 мм) проявили 184 речовини (44%), значна частина яких, не проявляли жодного інгібуючого ефекту щодо акантамеб.

Отримані результати свідчать, що більшість досліджених сполук демонструють помірну або низьку протистоцидну активність, проте близько 7% речовин проявили високу ефективність, співставну з дією контрольного препарату клотримазолу. Ці сполуки забезпечували виражене пригнічення росту бляшок акантамеб, формуючи чітко окреслені ЗРБ, що підтверджує їхню перспективність для подальших фармакологічних досліджень.

Графічне відображення результатів подано на рисунку 5.1, який демонструє відсотковий розподіл усіх досліджених сполук за рівнем протистоцидної активності. Діаграма наочно показує переважання сполук із мінімальною або низькою дією, водночас виокремлюючи невелику, але високopersпективну групу активних хімічних речовин. Така структура розподілу підкреслює певний інтерес подальшої оптимізації хімічної модифікації у межах групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів для підвищення їхньої біологічної ефективності.

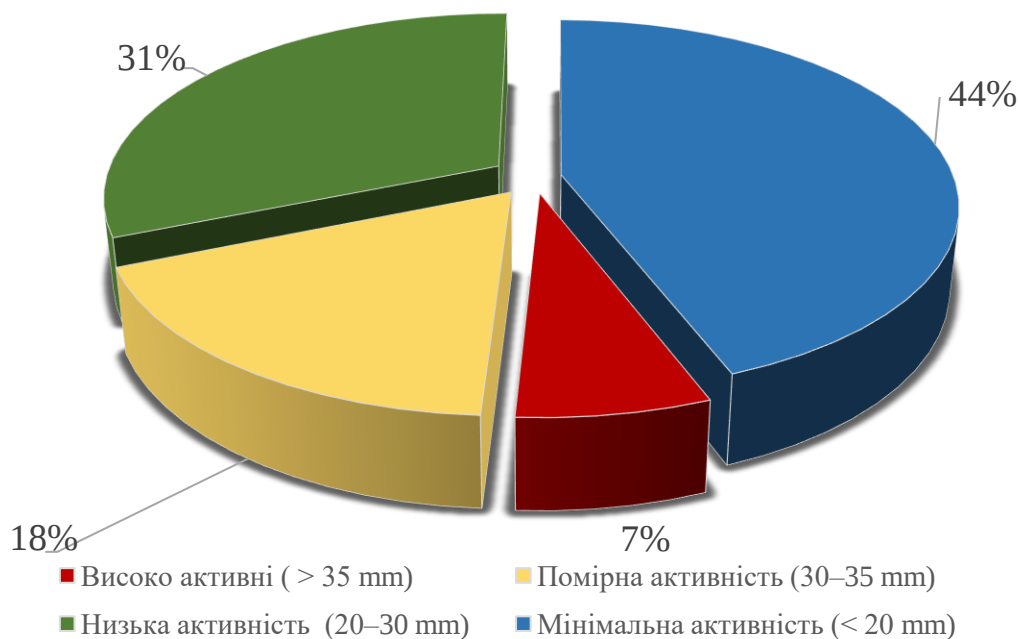


Рис 5.1 – Відсоткова структура розподілу 418 протестованих речовин за діаметром ЗРБ

Результати дослідження підтвердили неоднорідність протистоцидної активності серед досліджених хімічних сполук, що дало змогу класифікувати їх за рівнем біологічної ефективності. За підсумками проведеного аналізу було відібрано 26 сполук із вираженою протистоцидною дією, які становлять особливий інтерес для подальших доклінічних випробувань як потенційні амебоцидні агенти.

5.2. Аналіз протистоцидної активності найефективніших сполук

На основі проведеного первинного скринінгу серед 418 хімічних речовин групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів було відібрано 26 сполук, які продемонстрували найвищу протистоцидну активність (діаметр зон редукції бляшок понад 35 мм). Саме ці зразки становлять найбільший науковий та практичний інтерес для подальшого дослідження, оскільки їхня протистоцидна активність наближається до активності референтного препарату – клотримазолу. Детальний аналіз специфічної активності цих речовин дозволив оцінити їх вибірковість відносно різних штамів *Acanthamoeba* spp., ізольованих із різних екологічних джерел України.

У таблиці 5.1 наведено порівняльні результати дослідження протистцидної активності 26 найбільш ефективних хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, а також референтного препарату клотримазолу щодо трьох лабораторних штамів вільноживучих амеб роду *Acanthamoeba*, ізольованих із природного ґрунту (Kyiv) та бентонітових глин (Krym, Cherkasy).

Таблиця 5.1

Протистцидна дія найбільш активних сполук щодо штамів

Acanthamoeba spp. різного походження

№ з/п	Код сполуки	R ₁ *	R ₂ *	Штам Krym (ЗРБ в мм)	Штам Cherkasy (ЗРБ в мм)	Штам Kyiv (ЗРБ в мм)
1.	AM-137	1-адамантил	4-бензил піперидин	36,3±1,53	37,0±1	18,7±1,53
2.	AM-166	1-адамантил метил	1-феніл етиламін	39,7±0,58	38,0±1	23,3±2,08
3.	AM-167	4-феніл феніл	1-феніл етиламін	36,0±1	33,7±1,15	23,7±2,52
4.	AM-175	3-метил.4-ізопропіл феніл	N-2-піридин піперазин	39,0±1	40,3±1,53	22,0±5,29
5.	AM-177	o-Br-феніл	N-2-піридин піперазин	39,3±1,15	38,0±1	23,7±2,52
6.	AM-179	o-Cl-Феніл	N-2-піридин піперазин	39,0±1,73	37,7±1,15	24,3±1,53
7.	AM-181	2,4-Br-феніл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	35,0±2,65	32,7±1,53	17,7±1,53
8.	AM-182	2-вторбутил феніл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	38,7±1,53	39,3±1,53	19,0±1
9.	AM-225	4-Br-феніл	4-F-феніл піперазин	39,0±1	37,3±0,58	20,7±2,52
10.	AM-232	3.4.-індан-феніл	N-2-CH ₃ O-фенілпіперазин	38,0±1	32,3±3,79	21,7±3,21
11.	AM-262	2.4-Cl-феніл	N-4-CH ₃ O-фенілпіперазин	38,0±1	39,3±1,53	26,0±1
12.	AM-287	2-Cl-феніл	N-4-CH ₃ O-феніл піперазин	36,0±1	32,7±0,58	15,7±0,58
13.	AM-318	4-CL-бензил	феніл піперазин	37,7±0,58	35,7±1,53	26,7±1
14.	AM-321		4-F-феніл піперазин	37,7±0,58	36,0±1	23,0±1,53
15.	AM-322		тетрагідроізохінолін	37,3±1,15	41,3±3,21	26,7±2,65
16.	AM-323		N-4-CH ₃ O- феніл піперазин	36,3±2,08	35,0±1	25,0±0,58
17.	AM-327	бензодіоксан	N-4-F-феніл піперазин	37,7±0,58	35,7±0,58	18,3±2

18.	AM-328		N-феніл піперазин	36,3±0,58	36,0±1	25,3±0,58
19.	AM-336	4-ізопропіл,5 метил феніл	N-4-CH ₃ O-феніл піперазин	37,3±0,58	36,0±1	26,0±1
20.	AM-337	4-F-феніл	N-4-CH ₃ O-феніл піперазин	36,7±0,58	35,7±1	25,7±1
21.	AM-339	4-трет бутил циклогексил	N-4-CH ₃ O-феніл піперазин	35,3±1,15	35,3±1	27,7±0,58
22.	AM-348	4-Cl-феніл	тетрагідроізохінолін	35,0±1	35,7±1,53	22,0±1,53
23.	AM-359	3,4-метилен діоксі бензил	N-2-CH ₃ O-фенілпіперазин	38,7±0,58	36,7±1,53	23,3±2,65
24.	AM-364	4-ізопропіл,5-метил феніл	N-2-CH ₃ O-фенілпіперазин	35,0±1	36,0±1,73	24,0±3,06
25.	AM-392	трет-аміл	N-4-F-феніл піперазин	44,0±1	39,0±1	26,7±3,61
26.	AM-408	циклогексил	N-2-CH ₃ -5-Cl-феніл піперазин	35,0±1	34,7±1,53	26,7±1,53
27.	Клотримазол			44,0±1	39,0±1	41,3±3,21

*R₁ та R₂ — це варіабельні структурні фрагменти (радикали) в молекулі 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, які заміщують певні положення в основному хімічному скелеті сполуки.

Отримані результати свідчать, що штами *Krym* і *Cherkasy* демонструють вищу чутливість до більшості протестованих сполук, тоді як ізолят *Kyiv* характеризується нижчою сприйнятливістю. Наприклад, сполука AM-137 виявила високу активність щодо штамів *Krym* (36,3 ± 1,53 мм) і *Cherkasy* (37,0 ± 1,0 мм), але мінімальну – проти штаму *Kyiv* (18,7 ± 1,53 мм). Аналогічна тенденція простежується і для інших речовин, таких як AM-181 (35,0 ± 2,65 мм і 32,7 ± 1,53 мм проти 17,7 ± 1,53 мм) чи AM-408 (34 мм проти понад 26,7 мм). Виявлена варіабельність активності, ймовірно, зумовлена видовими відмінностями акантамеб та адаптаційними механізмами, сформованими під впливом різних екологічних умов.

Отже, результати дослідження обґрунтовують доцільність подальшого вивчення 26 хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, які продемонстрували виражену протистотоксичну активність. Їхні властивості свідчать про перспективність використання цих сполук як кандидатів для доклінічного дослідження, зокрема визначення мінімальної інгібуючої концентрації та рівня цитотоксичності на культурах клітин.

5.3. Визначення цитотоксичності досліджуваних хімічних сполук

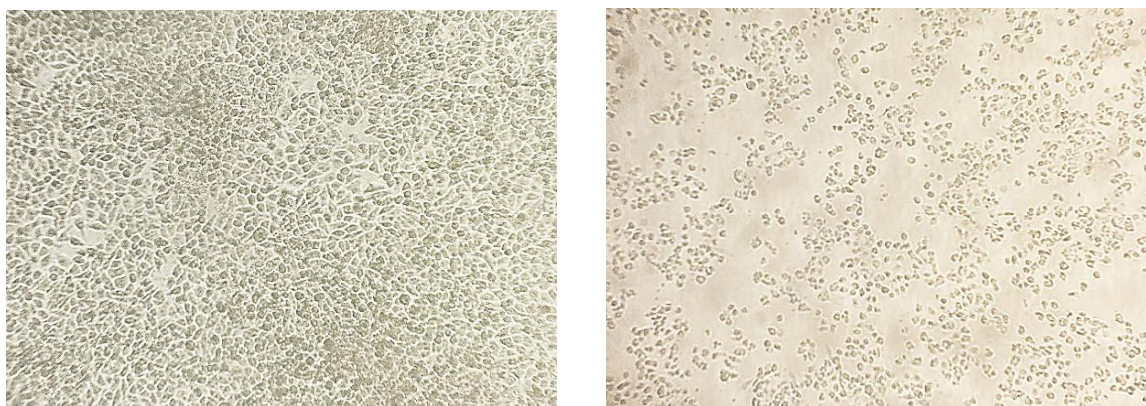
Дослідження цитотоксичності хімічних сполук має важливе практичне значення, оскільки ці сполуки можуть слугувати основою для створення нових

лікарських засобів. Оцінка цитотоксичності є ключовим етапом доклінічних досліджень, що дозволяє визначити безпеку потенційних препаратів для клітин людини та оцінити їхню біологічну сумісність. Це особливо актуально з огляду на необхідність мінімізації побічних ефектів і забезпечення ефективності терапії. Визначення токсичності *in vitro* на культурах клітин належить до найбільш поширених і ефективних підходів у цій галузі. Його основні переваги полягають у гуманності, оскільки він дає змогу уникнути використання лабораторних тварин, що відповідає сучасним етичним стандартам, а також у відносній економічності, адже застосування культур клітин є менш затратним порівняно з *in vivo* моделями. Крім того, визначення токсичності *in vitro* на культурах клітин забезпечує високу точність та швидкість отримання результатів завдяки стандартизованим умовам проведення експериментів, а також гарантують відтворюваність у різних лабораторіях, що підвищує достовірність отриманих даних. Використання культур клітин людського походження для оцінки цитотоксичності є більш коректним порівняно з тваринними моделями, оскільки показники токсичності для людини і тварин можуть істотно відрізнятися внаслідок відмінностей у фізіологічних і біохімічних процесах.

Для оцінки цитотоксичної дії хімічних сполук із групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів було обрано клітинну лінію HEp-2C, отриману з карциноми гортані людини. Ця лінія широко застосовується у дослідженнях токсичності *in vitro* завдяки високій чутливості до широкого спектра хімічних сполук. Клітини HEp-2C характеризуються високим ступенем адгезії до поверхні лабораторного посуду, утворюють щільний моношар і добре пристосовані до умов культивування *in vitro* [121].

Для визначення цитотоксичності досліджуваних сполук у лунки з сформованим моношаром клітин вносили різні концентрації речовин (від 500 мкг/мл до 0,48 мкг/мл). Як негативний контроль використовували лунку без додавання препарату. Інкубацію проводили протягом 24 годин. Оцінювання цитотоксичності здійснювали у два етапи: одразу після завершення експозиції препаратів із клітинною культурою проводили мікроскопічну оцінку

цитопатичного ефекту (ЦПЕ), звертаючи увагу на характерні морфологічні зміни клітин, зокрема: відшарування клітин, зміну їхньої форми, вакуолізацію цитоплазми та руйнування моношару (Рис.5.2).



а.

б.

Рис.5.2 – Зміни клітинного моношару під дією хімічних сполук: а – контрольна культура без ознак пошкодження, б – деградація моношару внаслідок цитотоксичної дії

На другому етапі оцінювання цитотоксичності здійснювали за допомогою МТТ-тесту [122], відповідно до стандартних методик. Значення ОЩ у лунках із досліджуваними препаратами порівнювали з контролем, на основі чого визначали відсоток життєздатних клітин (рис.5.3). Рівень цитотоксичності обчислювали як різницю між 100% та відсотком життєздатних клітин.

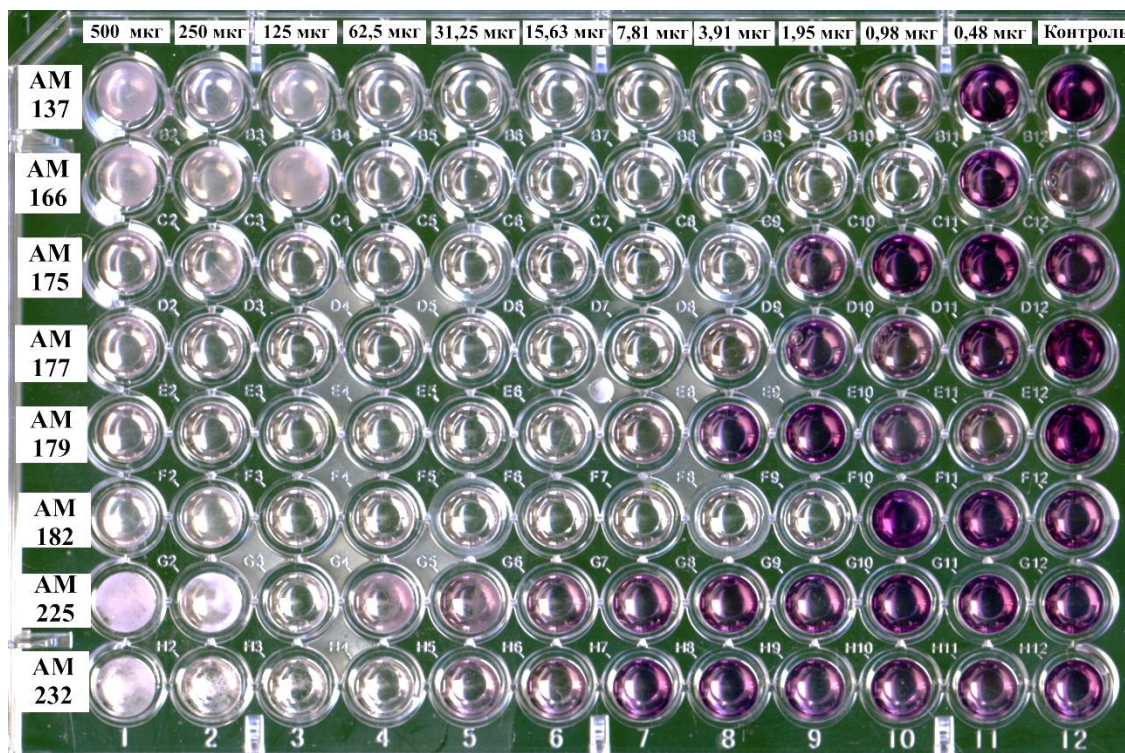


Рис. 5.3 – Результати МТТ-аналізу життєздатності клітин HEp-2C після впливу досліджуваних хімічних сполук

Під час аналізу цитотоксичності досліджуваних хімічних сполук було встановлено, що їх токсична дія залежить від концентрації. На високих концентраціях (500, 250 та 125 мкг/мл) у деяких випадках спостерігалось парадоксальне зростання оптичної щільності, що призводило до від'ємних значень цитотоксичності. Такий ефект, ймовірно, пов'язаний із фізико-хімічними змінами в системі: зокрема, кристалізацією сполук внаслідок зниження концентрації спирту після додавання препаратів до культурального середовища. Утворені кристали осідали на поверхні клітин, формуючи захисний бар'єр, який частково перешкоджав дії токсичних агентів і зберігав цілісність клітинного моношару. З урахуванням цього, для подальшої стандартизованої оцінки цитотоксичності було обрано концентрацію 62,5 мкг/мл як контрольну для порівняння ефективності різних сполук.

Результати однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) засвідчили наявність статистично значущих відмінностей між рівнями цитотоксичності досліджуваних сполук ($F = 65.34$, $p < 0.001$), що вказує на широку варіабельність їхнього токсикологічного профілю. З метою деталізації міжгрупових відмінностей

проведено пост-хок аналіз за критерієм Даннета щодо порівняння з клотримазолом ($M = 42.14\%$, $SD = 0.25\%$), який використовувався як контрольна сполука. Згідно з отриманими даними, 20 із 27 (%) сполук виявили достовірні відмінності в цитотоксичності порівняно з клотримазолом ($p < 0.05$). Серед них сполука АМ 167 продемонструвала найвищу цитотоксичність в концентрації 62,5 мкг/мл (90.00%, $SD = 4.87\%$, 95% CI = [80.29; 99.71], тест Даннета < 0.001), тоді як сполука АМ 225, навпаки, характеризувалася найнижчим рівнем токсичності при тій же концентрації (8.02%, $SD = 7.85\%$, 95% CI = [-4.88; 20.91], тест Даннета < 0.001), що дозволяє класифікувати її як нецитотоксичну. Аналогічно, сполука АМ 336 із показником 17.58% ($SD = 2.93\%$) також мала статистично достовірну відмінність від клотримазолу та низький рівень токсичності. Водночас сім сполук – АМ-177, АМ-179, АМ-182, АМ-262, АМ-318, АМ-321 та АМ-359 – не виявили статистично значущих відмінностей у рівні цитотоксичності порівняно з контрольним препаратом. Це свідчить про подібний токсикологічний профіль до референтної сполуки, що підтверджує їх відносну безпечність і потенційну придатність для подальших фармакологічних досліджень (Рис. 5.4).

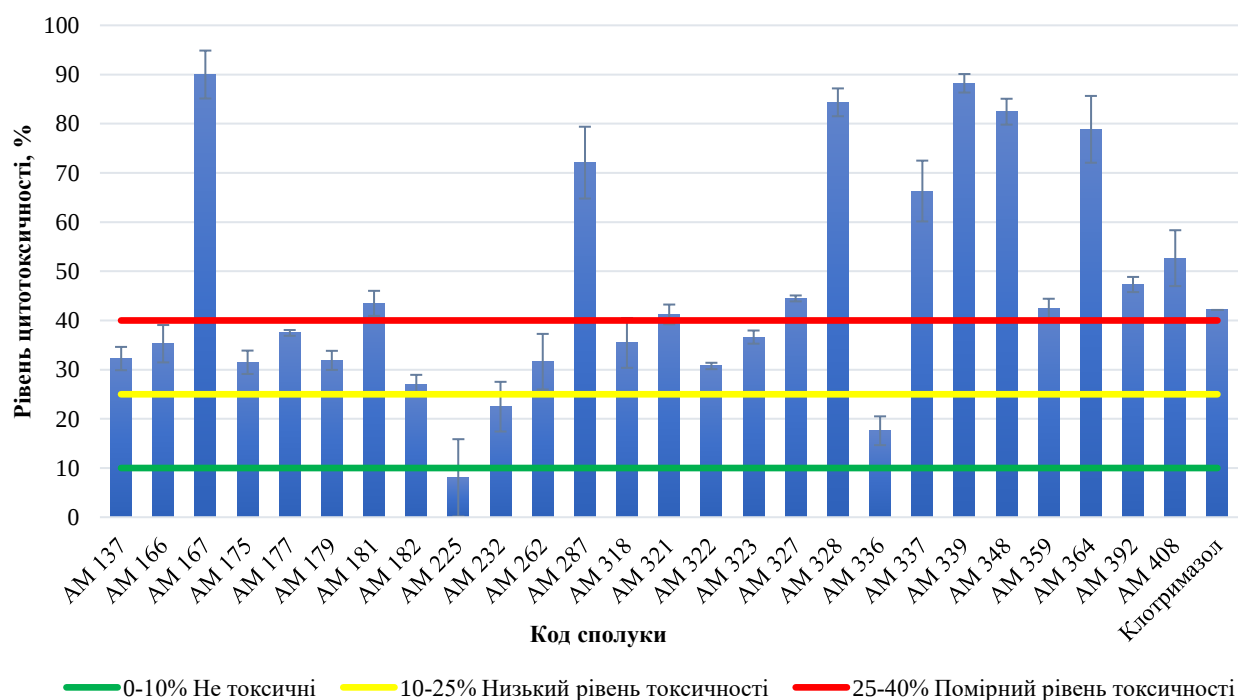


Рис 5.4 – Цитотоксична активність досліджуваних хімічних сполук при концентрації 62,5 мкг/мл за даними МТТ-тесту. Кольорові порогові лінії розділяють рівні токсичності

Одержані результати цитотоксичності досліджуваних сполук дозволив розподілити сполуки за ступенем цитотоксичності на наступні групи:

- високий рівень токсичності (>40%) – 13 сполук: АМ-167, АМ-181, АМ-287, АМ-321, АМ-327, АМ-328, АМ-337, АМ-339, АМ-348, АМ-359, АМ-364, АМ-392 та АМ-408.
- помірна цитотоксичність (25–40%) – 9 сполук: АМ 137, АМ 166, АМ 175, АМ 177, АМ 179, АМ 182, АМ 262, АМ 318, АМ 322.
- низький рівень токсичності (10–25%) – 2 сполуки: АМ 232 та АМ 336.
- нецитотоксична сполуки – АМ 225.

Аналіз отриманих даних свідчить, що характер радикалів у положеннях R₁ та R₂ відіграє важливу роль у формуванні цитотоксичного профілю досліджених сполук. Встановлено, що не лише окремі радикали, але й їхнє поєднання визначає ступінь токсичності, що, ймовірно, пов'язано з їхнім впливом на фізико-хімічні властивості молекули, зокрема ліпофільність, просторову конфігурацію та здатність до взаємодії з клітинними мембранами. Проведений МТТ-аналіз дозволив виділити потенційно перспективні сполуки з низьким або відсутнім цитотоксичним ефектом. Дані сполуки становлять особливий інтерес для створення безпечних протистостатичних препаратів. Зокрема для подальшого фармакологічного скринінгу та вивчення специфічної дії на найпростіші були обрані хімічні сполуки, які мали рівень цитотоксичності нижче 40% при концентрації препарату 62,5 мкг/мл: АМ-137, АМ-166, АМ-175, АМ-177, АМ-179, АМ-182, АМ-225, АМ-232, АМ-262, АМ-318, АМ-322 та АМ-336.

5.4. Мінімальна інгібуюча концентрація найактивніших хімічних сполук

МІК є одним із базових параметрів при оцінці антимікробної активності перспективних хімічних сполук. Визначення МІК дозволяє кількісно охарактеризувати специфічну активність молекул щодо патогенних мікроорганізмів, зокрема найпростіших роду *Acanthamoeba* [143].

Результати проведених експериментів з визначення МІК виявили суттєву варіабельність специфічної протистостидної активності досліджуваних сполук, що прямо залежала від особливостей їхньої хімічної будови, насамперед від природи замісників у положеннях R₁ та R₂. Значення мінімальної інгібуючої концентрації варіювали в діапазоні 31,25-250 мкг/мл, що свідчить про широкий спектр специфічної активності досліджуваних речовин (Рис. 5.5).

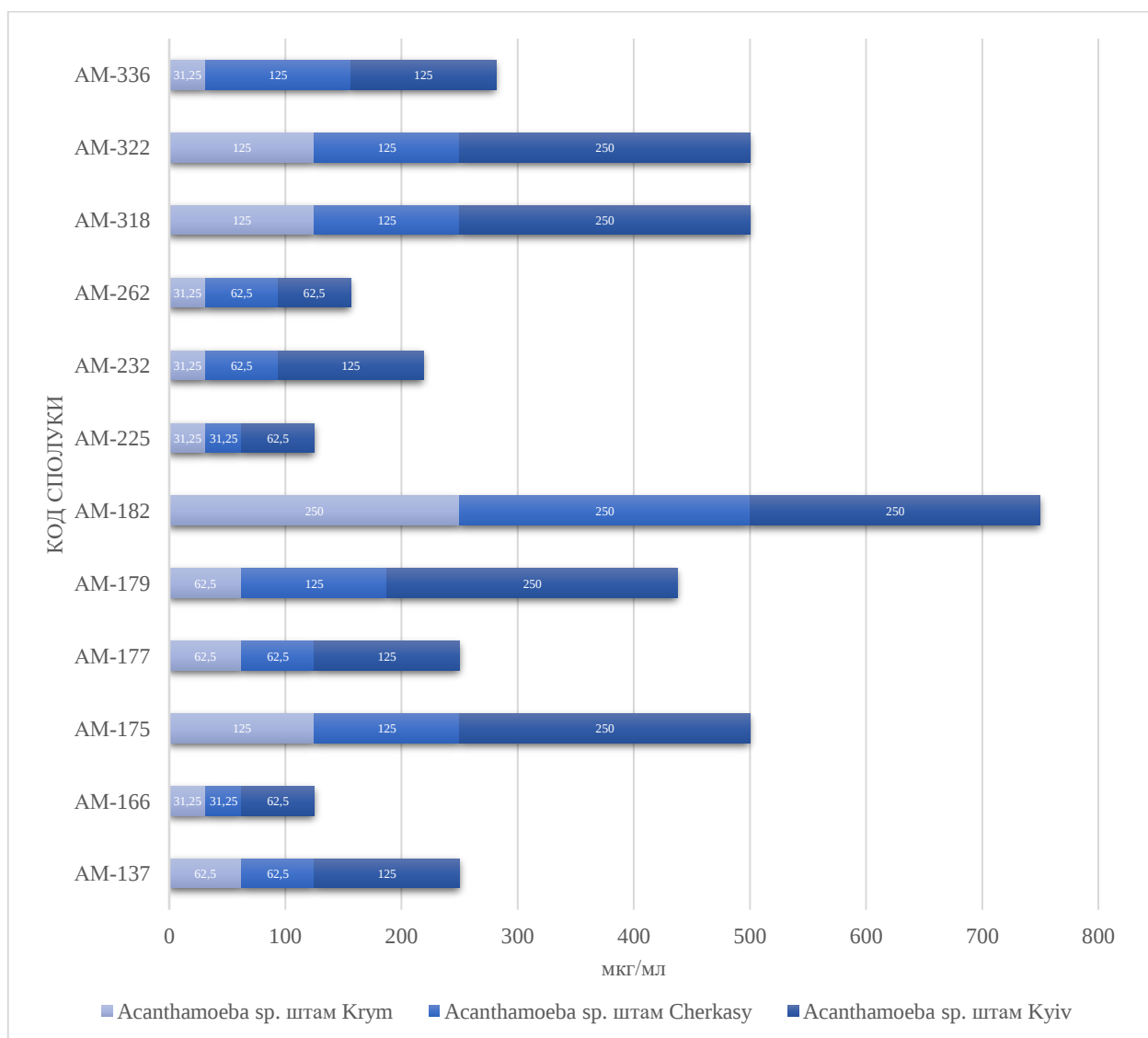


Рис 5.5 – Оцінка МІК найбільш перспективних сполук 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів щодо *Acanthamoeba* spp.

Сполуки з найнижчими значеннями МІК вирізняються специфічними структурними особливостями, які суттєво впливають на їх амебоцидну активність та токсикологічні властивості:

- АМ-166 (R_1 – 1-адамантилметил; R_2 – 1-фенілетиламін): середнє значення МІК становило $\approx 41,7$ мкг/мл (для ізолятів *Krym* та *Cherkasy* – 31,25 мкг/мл; для *Kyiv* – 62,5 мкг/мл). Рівень цитотоксичності в межах 25–40 % свідчить про прийнятну біобезпеку.

- АМ-225 (R_1 – 4-бромфеніл; R_2 – N-4-фторфенілпіперазин): продемонструвала значення МІК $\approx 41,7$ мкг/мл, аналогічне до АМ-166, однак без вираженої цитотоксичності, що робить її перспективною для подальших досліджень.

- АМ-232 (R_1 – 3,4-інданфеніл; R_2 – N-2-метоксифенілпіперазин): МІК становило ≈ 72 мкг/мл; рівень цитотоксичності був нижчим за 15%, що дозволяє розглядати її як безпечний прототип для подальших структурних модифікацій.

- АМ-262 (R_1 – 2,4-дихлорфеніл; R_2 – N-4-метоксифенілпіперазин): демонструвала помірну активність (МІК ≈ 52 мкг/мл); цитотоксичність близько 30%, що потребує подальшої оптимізації структури з метою покращення біобезпеки.

- АМ-336 (R_1 – 4-хлорфеніл; R_2 – N-4-метоксифенілпіперазин): МІК становило ≈ 58 мкг/мл; рівень цитотоксичності не перевищував 20%, що свідчить про низьку токсичність і потенціал для подальшого вивчення.

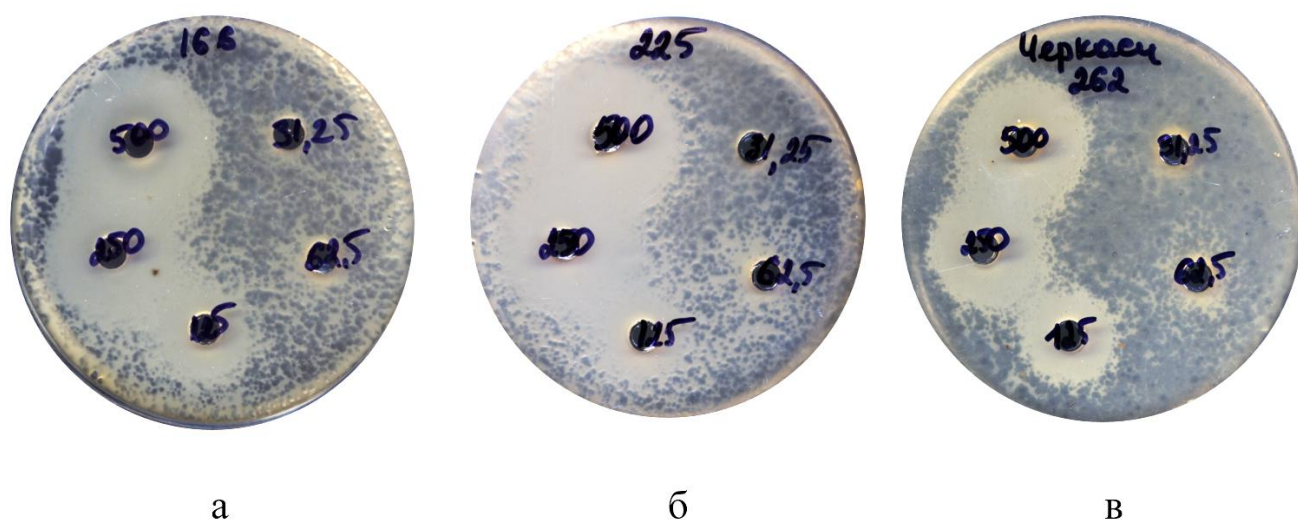


Рис. 5.6 – Зони редукції бляшок акантамеб (штам *Cherkasy*) навколо лунок з різними концентраціями досліджуваних сполук: а – сполука АМ 166, б – сполука АМ-225, в – сполука АМ-262

Таким чином, сполуки АМ-166, АМ-225, АМ-232, АМ-262 і АМ-336 демонструють найбільш збалансоване поєднання активності та безпечності. Серед них АМ-225 за ефективністю подібна до контрольної сполуки (клотримазол) і не має цитотоксичного впливу на культури клітин.

Середній рівень МІК для групи активних сполук становив від 41 до 83 мкг/мл, що є нижчим або співставним з пороговими значеннями для низки відомих протистоксичних засобів, включаючи азоли. Для порівняння, клотримазол, сполука, що використовувалась у якості позитивного контролю, у дослідженнях Qubais Saeed et al. демонструвала МІК на рівні 62,5–125 мкг/мл, що підтверджує конкурентоспроможність досліджуваних нами сполук [144].

Таким чином, визначення МІК дало змогу кількісно оцінити специфічну активність досліджуваних хімічних сполук. Отримані дані можуть стати підґрунтям для подальших досліджень з вивчення механізмів дії та фармакокінетики відібраних молекул.

5.5. Визначення цистоцидної активності п'яти найперспективніших хімічних сполук

Особливу увагу в дослідженні було приділено оцінці впливу найбільш активних сполук – АМ-166, АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336 – на цистні форми *Acanthamoeba* spp., які характеризуються високою резистентністю до більшості відомих хіміотерапевтичних засобів, що застосовуються для лікування акантамебних інвазій.

Для оцінювання цистоцидної дії досліджуваних хімічних сполук було застосовано метод редукції бляшок із використанням різних концентрацій препаратів (62,5; 31,25; 15,6 та 7,8 мкг/мл), який передбачає визначення кількості життєздатних цист акантамеб після 24-годинної експозиції. Такий підхід дав змогу не лише якісно й кількісно оцінити залишкову життєздатність цист, встановити ступінь пригнічення росту, а й визначити концентрації, що забезпечують повне знищення цистових форм *Acanthamoeba* spp.

Отримані експериментальні дані підтверджують наявність чітко вираженої дозозалежної цистоцидної дії досліджуваних хімічних сполук. Найвищу активність

продемонстрували сполуки АМ-166, АМ-225 та АМ-262: за концентрації 62,5 мкг/мл кількість бляшок зменшувалась до 0–30 БУО/чашку, що відповідає 0–7,3 % порівняно з контрольним зразком (409 БУО/чашку). Ці дані свідчать про те, що інгібуюча концентрація IC_{95} для зазначених сполук становить 62,5 мкг/мл і вказує на майже повне пригнічення життєздатності цист *Acanthamoeba* spp. Крім того, значення IC_{50} для цих речовин є меншим за 7,8 мкг/мл, що свідчить про високу специфічну активність навіть при мінімальних концентраціях.

Сполука АМ-336 також проявила виражену цистоцидну активність, хоча й менш потужну порівняно з вищезгаданими препаратами. При концентрації 62,5 мкг/мл кількість бляшок становила 79 БУО/чашку (19,3 %), що значно менше, ніж у контролі. Водночас при зниженні концентрації до 7,8 мкг/мл кількість бляшок збільшувалася до 326 БУО/чашку (79,7 %), що свідчить про збереження життєздатності більшості цист. Розраховане значення IC_{50} для цієї сполуки становить 31,25 мкг/мл.

Натомість сполука АМ-232 не виявила чіткої дозозалежної динаміки: у межах усього діапазону концентрацій кількість бляшок залишалася на рівні приблизно 50 % відносно контролю. Така стабільність може вказувати на обмежену ефективність сполуки, що зумовлює необхідність подальшої оптимізації її хімічної структури (Рис. 5.7).

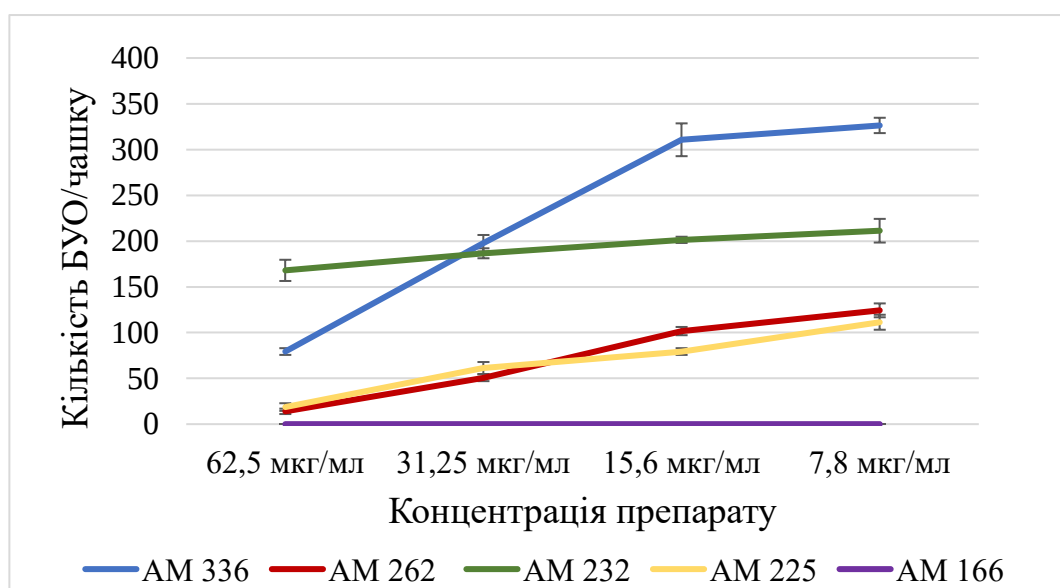


Рис. 5.7 – Дозозалежне пригнічення екзистування *Acanthamoeba* spp. під дією сполук АМ-166, АМ-225, АМ-232, АМ-336 та АМ-262.

Таким чином, сполуки АМ-166, АМ-225 та АМ-262 продемонстрували найвищу цистостидну активність, що підтверджується низькими значеннями IC_{95} (62,5 мкг/мл) та IC_{50} (<7,8 мкг/мл), що свідчить про високу специфічність їхньої дії. Сполуки АМ-336 та АМ-232, попри помірну активність ($IC_{50} = 31,25$ мкг/мл і $\approx 62,5$ мкг/мл відповідно), демонструють потенціал для подальшої структурної оптимізації з метою підвищення ефективності. Отримані результати підтверджують доцільність подальших досліджень зазначених сполук як перспективної основи для створення нових селективних протистостидних засобів.

5.6. Спектр антибактеріальної та протигрибкової активності обраних сполук

Зважаючи на високу протистостидну активність сполук АМ-166, АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336, виявлену під час проведених досліджень, було здійснено додаткову оцінку їхнього впливу на бактеріальні та грибові культури. Результати показали, що сполуки АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336 не виявляли антибактеріальної або протигрибкової активності: вони не пригнічували ріст ані грампозитивних, ані грамнегативних бактерій, а також не проявляли токсичного впливу на гриби роду *Candida*. Ці дані свідчать про високу вибірковість дії вказаних речовин щодо акантамеб і вказують на обмежений спектр їх антимікробної активності.

Серед протестованих сполук лише АМ-166 продемонструвала широкий спектр біологічної активності. Найбільш чутливими до її дії виявилися бактерії, *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*, що використовувались нами для культивування акантамеб в лабораторних умовах. В даному випадку МІК реєструвався на рівні 31,25 мкг/мл. Серед клінічно значущих патогенів чутливість до даного препарату була відмічена у грампозитивних бактерій, зокрема МІК для *Enterococcus faecalis* DSM 346 та *Staphylococcus aureus* DSM 346 становила 62,5 мкг/мл, що свідчить про виражений антибактеріальний ефект. Натомість, грамнегативні бактерії (*Escherichia coli* DSM 1103, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Acinetobacter baumannii* DSM 30007) залишалися резистентними до дії вказаної сполуки в

тестованому діапазоні концентрацій (8,75–500 мкг/мл), що вказує на селективність дії АМ-166.

Дослідження протигрибкової активності показало, що мінімальна інгібуюча концентрація щодо *Candida albicans* DSM 1386 становила 31,25 мкг/мл, що підтверджує специфічну активність цієї сполуки проти дріжджоподібних грибів.

Таким чином, сполука АМ-166 володіє протистоцидною, вибірковою антибактеріальною (дія щодо грампозитивної флори) та протигрибковою активністю, що робить її перспективною для подальших доклінічних досліджень як хіміотерапевтичного агент широкого спектру дії. Натомість, сполуки АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336 залишаються вузькоспецифічними і демонстрували активність виключно проти акантамеб.

5.7. Зв'язок хімічної структури 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів з протистоцидною активністю

У процесі вивчення антимікробної активності хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів було проведено комплексний аналіз, що включав визначення мінімальної інгібуючої концентрації щодо ізолятів *Acanthamoeba* spp., оцінку бактерицидних і фунгіцидних властивостей, дослідження цитотоксичності на клітинних культурах, а також аналіз взаємозв'язків між отриманими результатами та структурними особливостями досліджуваних сполук.

Результати проведеного аналізу свідчать, що наявність у структурі досліджуваних сполук гідрофобних радикалів, зокрема заміщеного 1-адамантилметилу, істотно підвищує їхню протистоцидну активність. Зокрема, сполука АМ-166, яка містить у положенні R₁ 1-адамантилметил, а в положенні R₂ – 1-фенілетиламін (рис. 5.8), продемонструвала високий рівень специфічної активності щодо всіх трьох ізолятів *Acanthamoeba* spp., із середнім значенням МІК 41,7 мкг/мл. Підвищена ліпофільність та здатність проникати через мембрани пояснюються присутністю адамантанового фрагмента, що, згідно з літературними даними [145], здатен підсилювати мембранотропну дію та біодоступність біологічно активних речовин.

Крім протистоцидної активності, сполука АМ-166 виявила також антибактеріальні та протигрибкові властивості. Вона ефективно пригнічувала ріст грампозитивних бактерій, зокрема *Ent. faecalis* DSM 346 та *St. aureus* DSM 346 (МІК – 62,5 мкг/мл), а також виявила активність проти дріжджоподібних грибів *C. albicans* DSM 1386 (МІК – 3,25 мкг/мл). Водночас сполука не проявляла активності проти грамнегативних бактерій, що свідчить про її вибіркову антимікробну дію.

Цитотоксичність на рівні 35,27 % свідчить про помірний токсикологічний профіль сполуки. Це вказує на необхідність подальших *in vivo* досліджень для комплексної оцінки профілю безпеки та доцільності її подальшого фармакологічного застосування як багатофункціонального хіміотерапевтичного агента.

У межах скринінгового аналізу було додатково досліджено чотири сполуки (АМ-162 – АМ-165), які мали спільний радикал в положенні R₁ - 1-адамантилметил. Однак, на відміну від сполуки АМ-166, ці речовини не проявили вираженої протистоцидної активності: діаметр ЗРБ не перевищував 32 мм. Це свідчить про те, що наявність лише адамантильного фрагмента недостатня для реалізації повноцінної специфічної протистоцидної дії.

Висока біологічна активність сполуки АМ-166, імовірно, зумовлена вдалою комбінацією двох структурних фрагментів – 1-адамантилметилу в положенні R₁ та 1-фенілетиламіну в положенні R₂. Такий синергічний вплив радикалів забезпечує оптимальний баланс між ліпофільністю та проникністю до клітинних мішеней акантамеб. Отже, поєднання певних радикалів у різних позиціях молекули є ключовим чинником досягнення вираженої протистоцидної активності.

Натомість сполука АМ-225, до складу якої входять 4-бромфеніл у положенні R₁ та N-4-фторфенілпіперазин у положенні R₂ (рис. 5.8), містить два галогензаміщених ароматичних радикали (Br та F), які, згідно з літературними даними, підвищують ліпофільність, сприяють зв'язуванню з клітинними мембранами та можуть покращувати біодоступність [146, 147]. Сполука виявила високий протистоцидний ефект (МІК = 41,7 мкг/мл). Однак, на відміну від АМ-166, вона не виявляла цитотоксичності щодо клітинної лінії НЕр-2С. Цей результат є

надзвичайно важливим, оскільки поєднання високої ефективності з безпечним токсикологічним профілем визначає доцільність подальших доклінічних досліджень.

Водночас, сполука АМ-227, яка має такий самий радикал у положенні R_1 – 4-бромфеніл, а у положенні R_2 – N-2-фторфенілпіперазин, не проявила протистотоксичної активності щодо жодного зі штамів *Acanthamoeba* spp. Це може свідчити про критичну роль просторової орієнтації замісників у положенні R_2 для реалізації біологічної дії. Зокрема, заміна положення атома фтору у фенільному кільці з пара- (в АМ-225) на орто- (в АМ-227) призводить до повної втрати активності. Ймовірно, це пов'язано з впливом просторових і електронних чинників на здатність молекули взаємодіяти з біологічною мішенню.

Прикладом вдалого поєднання ефективності й безпечності є сполука АМ-232, яка містить індановий радикал у положенні R_1 та N-4-метоксифенілпіперазин у положенні R_2 (рис. 5.8). Її структура включає ліпофільний фрагмент індану з конденсованою ароматичною системою та метоксизаміщений фенілпіперазин. Така комбінація формує збалансований полярно-гідрофобний профіль, що, ймовірно, сприяє кращій проникності молекули через цистову оболонку [148]. Сполука продемонструвала $МК = 72,9$ мкг/мл та низький рівень цитотоксичності (12,1%), що є прийнятним для подальшої фармакологічної розробки.

Подібні властивості виявила й сполука АМ-262 (із радикалами 2,4-дихлорфеніл у R_1 та N-4-метоксифенілпіперазин у R_2), значення $МК$ на рівні 52,1 мкг/мл і цитотоксичність 30,9%, що дозволяє класифікувати її як помірно токсичну. Відомо, що наявність хлор- та метоксизаміщених груп у фенільних фрагментах підвищує ліпофільність і стабільність молекул, однак також може сприяти зростанню їх цитотоксичності. Висока активність цих сполук частково може бути зумовлена саме впливом цих функціональних груп, які, згідно з літературними даними, підвищують проникність та стійкість молекул у фізіологічних середовищах [143].

Результати проведеного аналізу засвідчили, що наявність заміщених ароматичних радикалів у положеннях R_1 та R_2 чинить суттєвий вплив на

протистоцидну активність досліджуваних сполук. Так, сполука АМ-336, яка містить 4-ізопропіл-5-метилфенільний фрагмент у положенні R₁ та N-4-метоксифенілпіперазиновий радикал у положенні R₂, продемонструвала помірну активність щодо *Acanthamoeba* spp. (МК = 58 мкг/мл). Наявність хлор- і метоксизаміщених фенільних фрагментів сприяє формуванню збалансованої полярно-гідрофобної поверхні молекули, що, ймовірно, підвищує її здатність до взаємодії з біологічними мішенями [146, 147].

Об'ємні гідрофобні групи у положенні R₁ можуть покращувати мембранну проникність, тоді як електронодонорні властивості метоксигрупи в R₂ потенційно впливають на афінність молекули до мішеней у клітині. Водночас встановлено, що сполука АМ-336 має низький рівень цитотоксичності (17,58 %), що свідчить про її сприятливий токсикологічний профіль та потенційну придатність для подальших доклінічних досліджень.

Одним із важливих структурних чинників, що впливає на протистоцидну активність досліджуваних сполук, є наявність заміщеного фенільного фрагмента у положенні R₁. Так, сполуки АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336, які продемонстрували виражену біологічну активність, містять у цьому положенні відповідно 4-бромфеніл, 3,4-інданфеніл, 2,4-дихлорфеніл та 4-хлорфеніл. Це свідчить про роль ароматичних замісників у підвищенні ліпофільності молекул і, відповідно, сприянні їх проникненню через оболонку *Acanthamoeba* spp.

Водночас, повторюваність однакового фрагмента в положенні R₂ у трьох з п'яти найбільш активних сполук (зокрема – N-4-метоксифенілпіперазину) вказує на його потенційну роль як ключового структурного елементу, необхідного для реалізації протистоцидної дії. Стабільна присутність цього радикала в комбінації з різними замісниками в положенні R₁ дозволяє припустити, що саме R₂-група забезпечує специфічну взаємодію з клітинними мішенями акантамеб.

У межах дослідження було проведено скринінг 36 сполук, що містили однаковий R₂-фрагмент – N-4-метоксифенілпіперазин. Попри наявність цього спільного структурного елементу, високий рівень активності та низьку токсичність продемонстрували лише ті молекули, в яких R₁ був представлений індановим (АМ-

232) або галогензаміщеним фенільним (АМ-336) фрагментом. Це вказує на необхідність поєднання активного R₂-фрагмента з певними просторово та електронно сприятливими замісниками в положенні R₁.

Таким чином, отримані дані підтверджують наявність синергічного ефекту між ароматичним піперазиновим радикалом у R₂-позиції та об'ємними або електронноакцепторними групами в R₁. Подібне поєднання структурних характеристик, ймовірно, забезпечує високу селективність взаємодії з клітинними мішенями *Acanthamoeba* spp. при збереженні прийняттого профілю цитотоксичності, що робить ці сполуки перспективними для подальшої фармакологічної розробки.

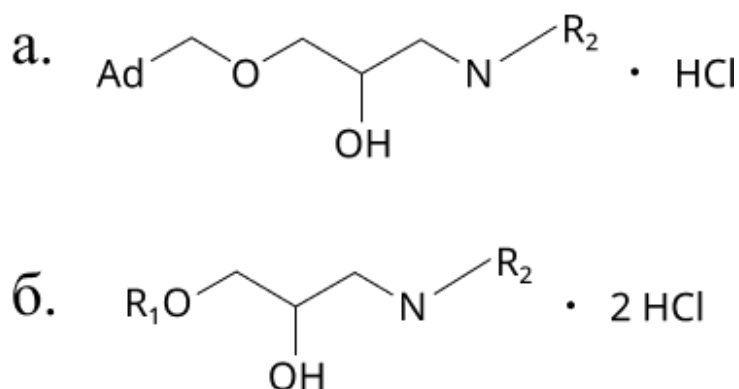


Рис. 5.8 – Хімічні структури сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, які продемонстрували найвищу специфічну активність проти акантамеб: а – структура сполуки АМ-166, де Ad – 1-адамантилметил R₂ – 1 - фенілетиламін; б – загальна формула для сполук АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336, де R₁. Відповідно – 4-бромфеніл, 3,4-інданфеніл, 2,4-дихлорфеніл та 4-хлорфеніл, а R₂ – заміщені N-феніл піперазини

Загалом, серед протестованих сполук найперспективнішою виявилася АМ-225, яка продемонструвала винятково сприятливе поєднання хімічної стабільності, високої специфічної активності проти *Acanthamoeba* spp. та низької цитотоксичності. Її цистоцидна дія проявлялася вже при концентрації 62,5 мкг/мл, що відповідає IC₉₅, а IC₅₀ для цієї сполуки становила менше ніж 7,8 мкг/мл, що свідчить про ефективне пригнічення життєздатності цист навіть за мінімальних доз.

Таким чином, результати дослідження дали змогу ідентифікувати низку структурних фрагментів, які ймовірно відіграють ключову роль у формуванні протистоцидної активності та впливають на токсикологічний профіль досліджуваних сполук. Виявлені закономірності можуть становити важливу основу для подальшого дизайну потенційно безпечних і високоефективних антипротозойних засобів.

Узагальнення результатів, висвітлених у розділі 5, дозволяє сформулювати наступні висновки:

1. Скринінг 418 хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів модифікованим лунко-дифузійним методом продемонстрував виражену гетерогенність амебоцидної активності даних сполук: близько 7% сполук продемонстрували високу ефективність (>35 мм), близько 18% – помірну, 31% – мінімальна активність, натомість 44% не проявили суттєвої дії. Серед них відібрано 26 найактивніших сполук для детального вивчення МІК, цитотоксичності, структурного аналізу та цистоцидної активності.

2. Дослідження цитотоксичності 27 хімічних сполук (26 досліджуваних та клотримазол) на клітинній лінії HEp-2C засвідчило суттєву варіабельність токсикологічного профілю серед досліджуваних зразків, що підтверджується статистично значущими відмінностями (ANOVA, $p < 0.001$). На основі отриманих результатів сполуки було класифіковано за рівнем токсичності: від високої ($>40\%$) до нецитотоксичної. Особливу увагу привернули сполуки АМ-225 та АМ-336, які виявили найнижчу цитотоксичність, що свідчить про їхній високий потенціал як безпечних протистоцидних агентів. Для подальших досліджень мінімальної інгібуючої концентрації було обрано 12 хімічних сполук з токсичністю менше 40%.

3. Мінімальні інгібуючі концентрації активних сполук варіювали в межах 31,25 – 83 мкг/мл, що є конкурентоспроможним показником порівняно з клотримазолом (62,5–125 мкг/мл). Сполуки АМ-166, АМ-225, АМ-262 продемонстрували найнижчі МІК, проте АМ-166 і частково АМ-262 характеризувалися помірним рівнем цитотоксичності (25–40%), що вимагає структурної оптимізації. Навпаки, АМ-225 не проявляла цитотоксичної дії,

зберігаючи високу активність щодо всіх тестованих штамів *Acanthamoeba* spp., що дозволяє класифікувати її як найперспективніший прототип майбутнього лікарського засобу.

4. Цистоцидна активність виявлена як ключова перевага для трьох сполук – АМ-166, АМ-225 та АМ-262. При концентрації 62,5-7,8 мкг/мл проявляли дозозалежне інгібування (при вищій концентрації кількість бляшок була меншою). АМ-225 забезпечувала цистоцидний ефект без токсичного впливу на клітини людини (HEp-2C), тоді як АМ-166, незважаючи на високу активність, потребує додаткового вивчення через помірний рівень цитотоксичності. Отримані результати мають практичне значення для розробки нових лікарських засобів проти цист акантамеб.

5. Єдиною сполукою з комбінованою протистоцидною, антибактеріальною та протигрибковою дією є АМ-166. Вона виявляла активність щодо бактерій, що використовуються для моноксенічного культивування акантамеб *Cellulosimicrobium* sp.штам *bent-1* (МІК 31,25 мкг/мл), грампозитивних бактерій (*St. aureus*, *Ent. faecalis*; МІК 62,5 мкг/мл), і дріжджеподібних грибів *Candida albicans*. (МІК 31,25 мкг/мл), але залишалась неактивною проти грамнегативних бактерій. На відміну від неї, сполуки АМ-225, АМ-232, АМ-262 та АМ-336 проявили вибіркову антипротозойну дію без впливу на бактерії та гриби, що може бути перевагою при розробці специфічних протиакантамебних засобів.

РОЗДІЛ 6.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вільноживучі найпростіші, зокрема представники роду *Acanthamoeba*, є об'єктом активного дослідження вчених у всьому світі. Вивчення цих мікроорганізмів охоплює широкий спектр напрямів – від екологічних і молекулярно-біологічних аспектів до питань патогенності, міжвидових взаємодій та впливу на здоров'я людини. Акантамеби є одними з найдавніших еукаріотичних мікроорганізмів, що демонструють виняткову пластичність і адаптаційні можливості в різних середовищах існування [47].

З одного боку, низка штамів *Acanthamoeba* spp. відома своєю здатністю спричиняти тяжкі, а іноді летальні захворювання у людей, включно з АК [149] і ГАЕ, останній з яких характеризується вкрай високим рівнем смертності (до 97%) [150]. З іншого боку, представники роду *Acanthamoeba* мають важливе екологічне значення, виконуючи функції природних регуляторів мікробних спільнот. Вони беруть участь у процесах мінералізації органічних речовин, регулюють чисельність бактеріальних популяцій і забезпечують трофічні зв'язки, будучи джерелом поживних речовин для інших мікроорганізмів і дрібних тварин [151]. Бібліографічні дані також підтверджують, що *Acanthamoeba* spp. виступає не лише «хижаками» для бактерій, але й екологічними резервуарами, де бактерії набувають резистентності до антимікробних засобів [152].

Окремі представники вільноживучих амеб виявляють здатність до природного біоконтролю, пригнічуючи розвиток фітопатогенних бактерій і грибів, що може мати прикладне значення в агробіотехнологіях. Крім того, завдяки своїй унікальній клітинній організації та здатності до фагоцитозу, акантамеби широко застосовуються як модельні об'єкти в біомедичних і молекулярно-генетичних дослідженнях, зокрема для вивчення процесів взаємодії хазяїн-патоген, внутрішньоклітинного паразитизму, механізмів резистентності тощо [153].

Вільноживучі амеби роду *Acanthamoeba* є убіквітарними мешканцями довкілля, що трапляються у ґрунтах, прісних водоймах, осадових породах, пилу та навіть у мінеральних відкладеннях [47, 49]. У нашому дослідженні вперше описано

виділення акантамеб із бентонітових глин трьох українських родовищ – Курцівського, Дашуківського та Горбського, а також зі зразків ґрунту м. Києва. Варто зазначити, що виділення акантамеб з мінеральних середовищ залишається рідкісним явищем. Це підкреслює унікальність мінеральних субстратів як середовища існування протистів. Разом з тим, сучасні дослідження підтверджують здатність цих амеб колонізувати навіть екстремальні екосистеми. Наприклад, Mooney et al. описали ізоляти *Acanthamoeba* spp. із солончаків Пуна (Аргентина), які містили унікальні внутрішньоклітинні бактеріальні симбіонти [154]. Подібні результати наведені Ramírez-Flores et al., які виявили солестійкі патогенні штами *Acanthamoeba* spp. у різних екологічних системах Мексики [155]. Водночас, ці дані підтверджують високу екологічну пластичність акантамеб та їх універсальну здатність адаптуватися до широкого спектра фізико-хімічних умов.

Таким чином, результати нашого дослідження розширюють сучасні уявлення про екологічне різноманіття та адаптивність акантамеб, підкреслюють роль мінеральних субстратів як потенційних екологічних резервуарів і створюють підґрунтя для подальшого вивчення взаємодії між мікроорганізмами у природних та штучних біоценозах.

Морфологія акантамеб традиційно описується через дві основні форми – активні трофозоїти та спокійні цисти, однак останні дослідження дедалі частіше звертають увагу на проміжні форми – прецисти. У трофозойтному стані клітини мають амебоїдну форму з псевдоподіями, характеризуються активною рухливістю та здатністю до фагоцитозу. Під мікроскопом чітко видно ядро, травні та скоротливі вакуолі, а також численні мітохондрії та інші цитоплазматичні структури. Завдяки феноменальній здатності до інцистування ці організми здатні виживати в екстремальних умовах, включно з висушуванням, ультрафіолетовим опроміненням, високими концентраціями солей та низькими температурами. Їхнє вивчення має як екологічне, так і медичне значення, оскільки акантамеби можуть бути як безпечними сапрофітами, так і резервуарами патогенних мікроорганізмів, що зберігаються в біоценозах [156, 157].

Цисти *Acanthamoeba* spp. мають характерну двошарову структуру оболонки, що складається з зовнішнього шару – ектоцисти, та внутрішнього – ендоцисти, між якими знаходиться міжоболонковий простір. Зовнішній шар може набувати різноманітної морфології: бути гладким, зморшкуватим або містити складки й гребені, що визначається як видовими особливостями, так і умовами культивування. Внутрішня оболонка зазвичай має складну геометрію – зірчасту, багатогранну або з численними заглибленнями. На основі морфології оболонок цисти поділяються на три типи: I, II та III. Найбільш поширеною вважається морфологічна група II, що є типовою для ізолятів з потенційною патогенністю. Для цієї групи характерний середній діаметр менше ніж 18 мкм та чітко виражений міжоболонковий простір [158]. Згідно з отриманими морфологічними характеристиками, досліджені в межах нашого дослідження штами акантамеб також належать до II морфотипу, що відповідає літературним даним щодо ізолятів з навколишнього середовища. У сучасних наукових дослідженнях останніх років детально характеризуються процеси формування цистої оболонки, зокрема морфологія її зовнішнього шару, особливості міжоболонкового простору, а також будова остіол – структур, які можна виявити виключно за допомогою високороздільної електронної мікроскопії (ТЕМ, СЕМ). Так, у роботах, присвячених *A. castellanii*, простежено послідовні етапи морфогенезу цисти – від ущільнення цитоплазми до формування багатошарової оболонки [159].

Окрім класичних форм, окремі автори описують прецисти – перехідні форми акантамеб, які демонструють ознаки раннього формування оболонки, але ще зберігають риси трофозоїтів. Зокрема, у роботі Zhang et al. термін «прециста» використовують для опису структури з одношаровою оболонкою, що формується на початковому етапі інцистування, де клітини мають проміжні ознаки обох форм [6]. Виявлення таких структур є надзвичайно рідкісним, тому факт їх ідентифікації в нашому дослідженні становить вагомий внесок у розуміння життєвого циклу акантамеб, який включає не лише класичні, а й перехідні стадії.

У межах дисертаційного дослідження морфологічні особливості акантамеб вивчалися з використанням комплексу мікроскопічних методів – світлової, фазово-

контрастної, трансмісійної та скануючої електронної, а також із застосуванням різноманітних методик забарвлення. Порівняно з більшістю опублікованих робіт, використаний нами підхід є системним і комплексним: було досліджено не лише трофозоїти та зрілі цисти, але й виявлено прецистні форми, що свідчить про глибоке охоплення життєвого циклу акантамеб та його проміжних етапів. Такий підхід дозволяє краще зрозуміти механізми переходу клітин у стан спокою та формування оболонок, що має важливе значення для подальшої оцінки чутливості до протистоксидних препаратів.

Таким чином, акантамеби демонструють значну морфологічну варіабельність у межах свого життєвого циклу, а виділення прецист у нашому дослідженні є новим і важливим доповненням до існуючих даних. З методологічної точки зору, поєднання мікроскопічних методів і технік забарвлення, використаних у роботі, відповідає найкращим практикам сучасної протистології та дозволяє коректно охарактеризувати особливості ультраструктури досліджуваних штамів акантамеб.

Філогенетичний аналіз досліджених ізолятів *Acanthamoeba* spp. продемонстрував видове та екологічне різноманіття популяцій, отриманих із різних біотопів України. Встановлено, що ізоляти з бентонітових глин штами – *Krym* та *Cherkasy*, а також *Karpaty*, належать до виду *Acanthamoeba castellanii*, який є одним із найпоширеніших представників роду. Цей вид широко представлений у прісноводних та ґрунтових екосистемах і часто ізолюється як з природних, так і з антропогенних середовищ – систем водопостачання, контактних лінз чи басейнів [46, 160]. Виділений з ґрунту штам *Kyiv*, був ідентифікований як *Acanthamoeba hatchetti*. Цей вид уперше описано Page (1981) з солоних океанічних відкладень [161], проте сучасні дослідження свідчать про його широку екологічну амплітуду, включно з континентальними біотопами. *A. hatchetti* має виражену термо- та осмоотолерантність, а окремі його ізоляти асоційовані з патологічними процесами у тварин [162]. Ці дані свідчать, що *A. hatchetti* потенційно може бути умовно-патогенним видом, здатним адаптуватися до різних екологічних ніш.

Особливу наукову цінність має ґрунтовий ізолят штаму *Soil*, ідентифікований як *Acanthamoeba terricola*. Згідно з оновленим описом, поданим Corsaro et al., цей вид характеризується типовими для ґрунтових форм морфологічними ознаками – наявністю щільної полігональної оболонки цисти з добре вираженими порами та щільною гранулярною ендоплазмою [163]. *A. terricola* вирізняється високою толерантністю до температурних коливань і здатністю тривалий час перебувати у стані спокою в умовах висушеного ґрунту. Завдяки цим властивостям вид розглядають як важливий природний резервуар мікроорганізмів, у тому числі потенційно патогенних бактерій.

Культивування вільноживучих амеб роду *Acanthamoeba* є важливою складовою експериментальних досліджень, що дає змогу оцінювати їхню біологічну активність, стійкість і взаємодію з мікроорганізмами. Залежно від умов росту, розрізняють аксенічні (без бактерій) та моноксенічні культури, у яких акантамеби розвиваються у присутності певного виду бактерій.

Моноксенічне культивування є одним із найпоширеніших методів підтримання життєздатності акантамеб. Воно передбачає вирощування амеб на непоживному агарі (non-nutrient agar, NNA), поверхня якого засіяна бактеріями – природними субстратами для живлення трофозоїтів [164]. Як правило, з даною метою застосовуються штами *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* та інші сапрофітні штами [165]. У низці модифікованих протоколів використовують середовища типу PYG або AC6, що забезпечують стабільний ріст амеб за умов обмеженого бактеріального субстрату [166]. Перевагою моноксенічних культур є збереження природної морфології клітин і легке спостереження за циклами інцистування [167].

У нашому дослідженні для культивування акантамеб було застосовано бактерії роду *Cellulosimicrobium* sp. штаму *bent-1* як альтернативний живильний субстрат. Цей підхід є новим і більш екологічно релевантним, оскільки бактерії були ізольовані з того самого природного середовища – бентонітових глин, у яких було знайдено акантамеби (Курцівське родовище). Представники роду *Cellulosimicrobium* належать до грампозитивних бактерій, що характеризуються

високою адаптивністю до різних екосистем, зокрема ґрунтів, мулових осадів, компостів і біоплівок [168].

Найвідомішими видами цього роду є *C. cellulans* та *C. funkei*, які описані як сапрофіти, здатні до утилізації целюлози, та умовно-патогенні мікроорганізми, що зрідка спричиняють інфекції в імунокомпрометованих осіб [134]. Останні геномні дослідження показали, що *C. funkei* володіє широким набором гідролітичних ферментів, що зумовлює його виживання у багатих органікою середовищах, включаючи пустельні біотопи [168]. Такі властивості роблять *Cellulosimicrobium* sp. оптимальним симбіотичним партнером для акантамеб, оскільки вони створюють мікрооточення, подібне до природних умов існування найпростіших.

Важливою частиною дослідження стало також встановлення температурної та осмотичної толерантності ізолятів амеб. Підвищення температури до 40°C та концентрації маніту до 1.0 М призводило до повної втрати життєздатності в усіх досліджуваних штамів. Таким чином, можна зробити висновки, що ці ізоляти не мають гіпертермотолерантних та гіперосмотолерантних властивостей, характерних для патогенних штамів *Acanthamoeba castellanii*, що підтверджує їхню екологічну, а не клінічну природу. Подібні результати були отримані у роботах Abdul Halim et al. та Khedri et al, які здійснювали молекулярну ідентифікацію вільноживучих амеб, ізольованих із природних об'єктів в Ірані та Малайзії. У ході досліджень автори також не виявили термотолерантності або ознак потенційної вірулентності в більшості екологічних ізолятів, що узгоджується з результатами нашого аналізу [28, 31].

Сучасні підходи до визначення протистоцидної активності щодо *Acanthamoeba* spp. здебільшого базуються на мікробульйонних методах у 96-лункових планшетах, які дозволяють кількісно визначати МІК або відсоток пригнічення життєздатності. У таких дослідженнях найчастіше застосовують колориметричні або метаболічні індикатори, зокрема МТТ, резаурин (AlamarBlue) або АТФ-люмінесцентні системи [169]. Ці методи добре підходять для стандартизованого скринінгу, однак залежні від хімічного складу середовища та

можуть давати спотворені результати через взаємодію сполук з барвниками або їх адсорбцію на пластикових поверхнях [170].

Для підвищення точності та інформативності все частіше застосовуються високосмістовні (high-content) технології, що поєднують мікроскопію з автоматизованим аналізом зображень та дозволяють оцінювати морфологічні зміни, ступінь пошкодження клітин і життєздатність трофозоїтів або цист [169]. Попри високу точність, такі системи є дороговартісними, потребують складного програмного забезпечення та недоступні для більшості рутинних лабораторій.

Паралельно розвиваються молекулярні підходи до оцінки ефективності протистоцидних агентів, серед яких viability-PCR (v-PCR), що дозволяє розрізняти життєздатні та нежиттєздатні клітини після дії препарату за допомогою фотореактивних барвників, які інгібують ампліфікацію ДНК лише в мертвих клітинах [171]. Метод скорочує час до отримання результату порівняно з культуральними тестами, однак є підтверджувальним, а не скринінговим, і вимагає високого рівня лабораторної стандартизації.

Цистоцидні моделі, спрямовані на оцінку впливу на стійкі форми акантамеб, мають високу клінічну значущість, оскільки саме цисти є резистентними до найпоширеніших лікарських засобів. Проте такі моделі є тривалими, технологічно складними і залежать від значної варіабельності умов ексистикування [89, 172].

Особливої уваги заслуговує розроблена у нашому дослідженні модифікована методика визначення чутливості акантамеб до протистоцидних препаратів, заснована на феномені бляшкоутворення, яка вперше адаптована для дослідження акантамеб. На відміну від класичних агарових методів, цей підхід поєднує наявність бактерій в 0,7% шарі агару, як харчовий субстрат для трофозоїтів амеб, дифузію сполуки в агар та кількісне вимірювання зони редукції бляшок як показника амебоцидної активності. Подібну методику не описано у літературних джерелах, присвячених скринінгу антиакантамебних агентів, що підтверджує її новизну. Основними перевагами цього методу є простота виконання, можливість застосування у звичайних мікробіологічних лабораторіях, низька собівартість та відтворюваність результатів. Метод забезпечує візуальне та кількісне оцінювання

ефекту (діаметр ЗРБ) та легко адаптується для скринінгу великої кількості речовин. Таким чином, запропонована методика може бути рекомендована як перший етап у стандартизованому багаторівневому підході до оцінки протистоксидної активності.

У сучасних наукових дослідженнях пошук ефективних протистоксидних агентів проти *Acanthamoeba* spp. ґрунтується переважно на синтезі та тестуванні нових органічних молекул з різною хімічною природою. За останні п'ять років описано низку сполук із підтвердженою амебоцидною або цистицидною активністю. Так, похідні імідазотіазолу проявили виражений амебоцидний ефект (IC_{50} 8–16 мкг/мл) проти *Acanthamoeba castellanii* за одночасно низької токсичності для еукаріотичних клітин [173]. Катионні карбосілянові дендрони з 4-фенілбутиратом також показали високу активність проти трофозоїтів та цист *A. castellanii*, що зумовлено їхньою взаємодією з клітинною мембраною амеб [92]. Abdel-Hakeem et al. продемонстрували, що екстракт бурої водорості *Padina pavonica* інгібує трофозоїти та цисти *Acanthamoeba* ($IC_{50} \approx 4,6$ мкг/мл) завдяки вмісту фенольних ліпофільних сполук [174]. Додатково повідомлено про активність нових триазольних та індолових похідних (МІК 125–150 мкг/мл), які блокують метаболічні процеси амеб або порушують цілісність їхніх мембран [144, 175].

Таким чином, результати нашого дослідження вкладаються в загальносвітовий тренд пошуку малих органічних молекул із протистоксидним потенціалом, однак мають важливу відмінність – вперше було проведено масштабний скринінг саме для сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, не представлених у попередній науковій літературі як антиакантамебні агенти. Серед 418 протестованих сполук 7 % проявили високу активність (ЗРБ >35 мм), що відповідає світовим даним про низьку частку високоактивних речовин у первинних бібліотеках. Найактивніші сполуки (АМ-166, АМ-225, АМ-262, АМ-359, АМ-392) показали ефекти, співставні з клотримазолом, який визнаний одним із еталонних препаратів із доведеною антиакантамебною дією [173].

Порівняння з іншими класами молекул демонструє, що отримані нами значення МІК (31,25–83 мкг/мл) є конкурентними відносно триазолів (125–150 мкг/мл) [144] та близькими до деяких імідазотіазолів [144]. Особливо перспективною у цьому контексті є сполука АМ-225 (МІК 41,7 мкг/мл), що поєднує високу активність із відсутністю цитотоксичності, тоді як у багатьох інших класів сполук (імідазотіазоли, індоли) описано потенційну токсичність у високих концентраціях [175].

На відміну від більшості відомих досліджень, де фокус зосереджено переважно на антитрофозоїтній дії, у нашій роботі додатково доведено виражену цистицидну активність трьох сполук (АМ-166, АМ-225, АМ-262). Це вирізняє їх серед описаних раніше сполук, оскільки стійкість цист є головним фактором резистентності та проблем з лікуванням акантамебних інвазій. Так, для багатьох активних триазолів та індолів описано лише уповільнення ексцистування, але не повне його пригнічення [144, 175].

Окремої уваги заслуговує сполука АМ-166, яка, подібно до окремих рослинних метаболітів (*Padina pavonica*) або синтетичних дендронів, проявила комбінований протистоцидний, антибактеріальний та протигрибковий вплив. Така багатофункціональність потенційно може бути перевагою у терапії поліетіологічних кератитів, коли приєднується вторинна бактеріальна або грибова інфекція [174].

Отримані результати підтверджують високу екологічну пластичність представників роду *Acanthamoeba*, їхню здатність колонізувати різноманітні природні та мінеральні субстрати, а також демонструють складну морфологічну та біологічну організацію, що узгоджується з даними попередніх досліджень у різних географічних регіонах. Морфологічна диференціація трофозоїтів, цист і прецист, виявлених у нашій роботі, відповідає класичним та сучасним уявленням про життєвий цикл акантамеб, зокрема морфотипу II, який часто асоціюється з екологічними, умовно-патогенними штамами акантамеб.

Результати молекулярної ідентифікації та екологічної характеристики ізолятів підтверджують їх належність до роду *Acanthamoeba* spp., який є домінуючим як у

природних, так і в клінічних умовах, що повністю узгоджується з даними сучасної літератури. Встановлена термо- та осморезистентність більшості штамів дозволяє класифікувати їх як непатогенні, що збігається з висновками дослідників, які вивчали аналогічні ізоляти з ґрунтів, водойм та інших природних біотопів.

Використання нової модифікації методу редукції бляшок для скринінгу хімічних сполук продемонструвало свою ефективність, простоту та відтворюваність, дозволяючи швидко виявляти речовини з потенційною амебоцидною дією. Результати хімічного скринінгу підтвердили високу активність окремих сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, зокрема АМ-225, АМ-166 та АМ-262, що співставно або перевершує ефективність відомих референтних препаратів, таких як клотримазол. Наявність комбінованої протимікробної активності у деяких сполук узгоджується з тенденціями світових досліджень щодо створення мультифункціональних засобів для терапії змішаних інфекцій.

Таким чином, дані, отримані в межах цього дослідження, не лише підтверджують вже відомі наукові положення щодо біології та екології *Acanthamoeba* spp., але й доповнюють їх новими фактичними матеріалами. Виявлені морфологічні, екологічні, генетичні та фармакологічні характеристики досліджених ізолятів є співставними з результатами інших науковців і водночас розширюють уявлення про природне різноманіття та потенційну чутливість акантамеб до нових хімічних агентів.

ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі комплексно досліджено морфологічні та культуральні властивості акантамеб, ізольованих із бентонітових глин та ґрунтів України. З використанням світлової, фазово-контрастної та електронної мікроскопії детально вивчено трофозоїти, прецисти та цисти акантамеб, що дозволило охарактеризувати ключові структурні особливості даних стадій життєвого циклу цих найпростіших. Результати геноідентифікації засвідчили, що ізоляти *Krym*, *Cherkasy* та *Karpaty* мають 99% нуклеотидну подібність з видом *Acanthamoeba castellanii*, ізолят *Kyiv* – з *Acanthamoeba hatchetti*, а ізолят *Soil* – з *Acanthamoeba terricola*. На основі отриманих даних встановлено філогенетичне положення всіх акантамеб, що використані в дослідженнях. Одержані нуклеотидні послідовності депоновано в міжнародній базі даних GenBank.

2. Вперше запропоновано моноксенічне культивування в умовах *in vitro* представників роду *Acanthamoeba* з використанням бактеріальної культури *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*. Дані бактерії були ізольовані з бентонітових глин, охарактеризовані на основі морфологічних і біохімічних ознак та ідентифіковані молекулярно-генетичним методом. Отриману при секвенуванні нуклеотидну послідовність депоновано в базі даних GenBank.

3. Розроблено та апробовано нову модель для скринінгу протистоцидної активності перспективних хіміотерапевтичних сполук, що заснована на здатності акантамеб формувати бляшки в напіврідкому агарі інокульованому бактеріями роду *Cellulosimicrobium* sp. штам *bent-1*. Модифікований лунко-дифузійний метод і метод редукції бляшок, забезпечує високу відтворюваність, чутливість і швидкість аналізу. Запропонована модель дозволяє на ранніх етапах досліджень оцінювати вплив препаратів на життєздатність трофозоїтів і цист акантамеб, з мінімальними витратами часу та ресурсів.

4. Застосовуючи розроблену скринінгову модель, проведено первинне дослідження протистоцидної активності 418 хімічних сполук класу 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів, наданих Інститутом органічної хімії НАН України. Відібрано 26 сполук із вираженою специфічною активністю щодо

трофозоїтів і цист акантамеб. Дослідження цитотоксичності на лінії клітин НЕр-2С показали, що сполуки з протистоцидною активністю не мають істотного токсичного впливу в досліджуваних концентраціях (62,5 мкг/мл), що підтверджує їх потенціал в якості безпечних антипротозойних агентів.

5. У процесі аналізу структури досліджених 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолів виявлено ряд закономірностей, що впливають на рівень їх протистоцидної активності. Встановлено, що наявність у положенні R_1 гідрофобних радикалів – зокрема адамантил-, інданіл- або ізопропіл-груп – суттєво підвищує специфічну активність сполук. У положенні R_2 найвищу ефективність проявили галогензаміщені арильні фрагменти (особливо фтор- та хлор-фенільними групами). Комбінація таких радикалів асоціювалась із значним підвищенням амебоцидної дії.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Carnt, N.A., Subedi, D., Lim, A.W., Lee, R., Mistry, P., Badenoch, P.R., Kilvington, S., Dutta, D.: Prevalence and seasonal variation of *Acanthamoeba* in domestic tap water in greater Sydney, Australia. Clin Exp Optom. 103, 782–786 (2020). <https://doi.org/10.1111/cxo.13065>.
2. Gabr, N.S., Mohamed, R.M., Belal, U.S., Abdel-Fatah, M.M., Ahmed, R.F., Abdel Gaber, N.A.T., Abdel-Hafeez, E.H.: Isolation and Identification of Pathogenic *Acanthamoeba* Species from Air Conditioning Systems, Egypt. Jpn J Infect Dis. 74, 180–186 (2021). <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.049>.
3. Pazoki, H., Niyiyati, M., Javanmard, E., lasjerdi, Z., Spotin, A., Mirjalali, H., Behravan, M.R.: Isolation and Phylogenetic Analysis of Free-Living Amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, and *Vermamoeba*) in the Farmland Soils and Recreational Places in Iran. Acta Parasitol. 65, 36–43 (2020). <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00126-9>.
4. Marinho, B.T.S., Santos, D.L. dos, Santos, D.L. dos, Rott, M.B.: First report of free-living amoebae in watercourses in southern Brazil: molecular diagnosis and phylogenetic analysis of *Vermamoeba vermiformis*, *Naegleria gruberi*, and *Acanthamoeba* spp. J Water Health. 21, 972–980 (2023). <https://doi.org/10.2166/wh.2023.126>.
5. Ariyadasa, S., van Hamelsveld, S., Taylor, W., Lin, S., Sitthirit, P., Pang, L., Billington, C., Weaver, L.: Diversity of Free-Living Amoebae in New Zealand Groundwater and Their Ability to Feed on *Legionella pneumophila*. Pathogens. 13, (2024). <https://doi.org/10.3390/pathogens13080665>.
6. Zhang, Y., Xu, X., Wei, Z., Cao, K., Zhang, Z., Liang, Q.: The global epidemiology and clinical diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. J Infect Public Health. 16, 841–852 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.03.020>.
7. Kofman, A., Guarner, J.: Infections Caused by Free-Living Amoebae. J Clin Microbiol. 60, (2022). <https://doi.org/10.1128/JCM.00228-21>.

8. Kot, K., Łanocha-Arendarczyk, N.A., Kosik-Bogacka, D.I.: Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. *Ann Parasitol.* 64, 299–308 (2018). <https://doi.org/10.17420/ap6404.164>.
9. Szentmáry, N., Daas, L., Shi, L., Laurik, K.L., Lepper, S., Milioti, G., Seitz, B.: *Acanthamoeba* keratitis - Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *J Curr Ophthalmol.* 31, 16–23 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.09.008>.
10. Haapanen, S., Patrikainen, M.S., Parkkila, S.: Ultrasensitive and rapid diagnostic tool for detection of *Acanthamoeba castellanii*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 107, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116014>.
11. Yera, H., Ok, V., Lee Koy Kuet, F., Dahane, N., Arie, F., Hasseine, L., Delaunay, P., Martiano, D., Marty, P., Bourges, J.L.: PCR and culture for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *British Journal of Ophthalmology.* 105, 1302–1306 (2021). <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-316730>.
12. Di Valerio, E., Justice, J.M., Gushiken, A.C.: Case Report: Management of *Acanthamoeba* Rhinosinusitis in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Trop Med Hyg.* 111, 48–50 (2024). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.23-0582>.
13. Megha, K., Sharma, M., Sharma, C., Gupta, A., Sehgal, R., Khurana, S.: Evaluation of in vitro activity of five antimicrobial agents on *Acanthamoeba* isolates and their toxicity on human corneal epithelium. *Eye (Basingstoke).* 36, 1911–1917 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01768-8>.
14. Teh, J.S.K., Tam, P.C.K., Badenoch, P.R., Adamson, P.J., Brennan, C., Marshman, G., Gordon, D.L.: Successful treatment of cutaneous *Acanthamoeba castellanii* infection with miltefosine in a patient with chronic lymphocytic leukaemia on ibrutinib. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 77, 539–541 (2022). <https://doi.org/10.1093/jac/dkab397>.
15. Spottiswoode, N., Haston, J.C., Hanners, N.W., Gruenberg, K., Kim, A., DeRisi, J.L., Wilson, M.R.: Challenges and advances in the medical treatment of granulomatous amebic encephalitis. *Ther Adv Infect Dis.* 11, (2024). <https://doi.org/10.1177/20499361241228340>.

16. Fanselow, N., Sirajuddin, N., Yin, X.-T., Huang, A.J.W., Stuart, P.M.: Acanthamoeba Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. *Pathogens*. 10, 323 (2021). <https://doi.org/10.3390/pathogens10030323>.
17. Gajula, S.N., Nalla, L.V.: Fighting with brain-eating amoeba: challenges and new insights to open a road for the treatment of *Naegleria fowleri* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 21, 1277–1279 (2023). <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2263644>.
18. Lee, D.-I., Park, S.H., Baek, J.H., Yoon, J.W., Jin, S.I., Han, K.E., Yu, H.S.: Identification of Free-Living Amoebas in Tap Water of Buildings with Storage Tanks in Korea. *Korean J Parasitol.* 58, 191–194 (2020). <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.191>.
19. Pradhan, N.: Etymologia: *Acanthamoeba*. *Emerg Infect Dis.* 26, 1855–1855 (2020). <https://doi.org/10.3201/eid2608.ET2608>.
20. Bunsuwansakul, C., Mahboob, T., Hounkong, K., Laohaprapanon, S., Chitapornpan, S., Jawjit, S., Yasiri, A., Barusrux, S., Bunluepuech, K., Sawangjaroen, N., Salibay, C.C., Kaewjai, C., Pereira, M. de L., Nissapatorn, V.: *Acanthamoeba* in Southeast Asia – Overview and Challenges. *Korean J Parasitol.* 57, 341–357 (2019). <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.4.341>.
21. De Jonckheere, J.F.: A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* 41, 309–342 (2002).
22. Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U., Tahir, I.M., Akram, M., Ali Shah, S.M., Zulfqar, A., Zainab, R.: *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 47, 199–212 (2020). <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13192>.
23. Bhosale, N.K., Parija, S.C.: *Balamuthia mandrillaris*. *Trop Parasitol.* 11, 78–88 (2021). https://doi.org/10.4103/tp.tp_36_21.
24. Henderson, T.C., Garcia-Gimeno, L., Beasley, C.E., Fry, N.W., Bess, J., Brown, M.W.: High above the rest: standing behaviors in the amoebae of *Sappinia* and *Thecamoeba*. *Eur J Protistol.* 94, 126082 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2024.126082>.

25. Milanez, G.D., Masangkay, F.R., Scheid, P., Dionisio, J.D., Somsak, V., Kotepui, M., Tangpong, J., Karanis, P.: *Acanthamoeba* species isolated from Philippine freshwater systems: epidemiological and molecular aspects. *Parasitol Res.* 119, 3755–3761 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06874-2>.
26. Rayamajhee, B., Williams, N.L.R., Siboni, N., Rodgers, K., Willcox, M., Henriquez, F.L., Seymour, J.R., Potts, J., Johnson, C., Scanes, P., Carnt, N.: Identification and quantification of *Acanthamoeba* spp. within seawater at four coastal lagoons on the east coast of Australia. *Science of The Total Environment.* 901, 165862 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165862>.
27. Salazar-Ardiles, C., Pérez-Arancibia, A., Asserella-Rebollo, L., Gómez-Silva, B.: Presence of Free-living *Acanthamoeba* in Loa and Salado Rivers, Atacama Desert, Northern Chile. *Microorganisms.* 10, (2022). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122315>.
28. Khedri, M., Fallah, M., Saidijam, M., Matini, M., Bazzazi, N., Maghsood, A.H.: Genotyping of Environmental Isolates of *Acanthamoeba* in Ham-adan, West of Iran. *Iran J Parasitol.* 18, 1–9 (2023). <https://doi.org/10.18502/ijpa.v18i1.12374>.
29. Vijayakumar, R.: Isolation, identification of pathogenic *Acanthamoeba* from drinking and recreational water sources in Saudi Arabia. *J Adv Vet Anim Res.* 5, 439–444 (2018). <https://doi.org/10.5455/javar.2018.e296>.
30. Latifi, A., Salami, M., Kazemirad, E., Soleimani, M.: Isolation and identification of free-living amoeba from the hot springs and beaches of the Caspian Sea. *Parasite Epidemiol Control.* 10, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00151>.
31. Abdul Halim, R., Mohd Hussain, R.H., Aazmi, S., Halim, H., Ahmed Khan, N., Siddiqui, R., Shahrul Anuar, T.: Molecular characterisation and potential pathogenicity analysis of *Acanthamoeba* isolated from recreational lakes in Peninsular Malaysia. *J Water Health.* (2023). <https://doi.org/10.2166/wh.2023.186>.
32. Hagosojos, B., Masangkay, F., Fernandez, J.B., Lazaro, J.A., Medroso, D.E., Olaguera, B., Pastores, C.M., Santos, J., Milanez, G.: Molecular identification of *Acanthamoeba* sp. in Lake Buhi, Philippines. *Ann Parasitol.* 66, (2020). <https://doi.org/10.17420/ap6601.245>.

33. Khorsandi Rafsanjani, M., Hajjalilo, E., Saraei, M., Alizadeh, S.A., Javadi, A.: Isolation and Molecular Identification of *Acanthamoeba* and *Naegleria* from Agricultural Water Canal in Qazvin, Iran. *Iran J Parasitol.* 15, 393–402 (2020). <https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i3.4204>.
34. Khan, N.A.: *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 30, 564–595 (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>.
35. Abedi, B., Azadi, D., Hajihosseini, R., Khodashenas, S., Ghaffari, K., Mosayebi, M.: Isolation and molecular identification of *Acanthamoeba* spp. from hospital dust and soil of Khomein, Iran, as reservoir for nosocomial infection. *Parasite Epidemiol Control.* 15, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00224>.
36. Pazoki, H., Niyayati, M., Javanmard, E., Iasjerdi, Z., Spotin, A., Mirjalali, H., Behravan, M.R.: Isolation and Phylogenetic Analysis of Free-Living Amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, and *Vermamoeba*) in the Farmland Soils and Recreational Places in Iran. *Acta Parasitol.* 65, 36–43 (2020). <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00126-9>.
37. Castro-Artavia, E., Retana-Moreira, L., Lorenzo-Morales, J., Abrahams-Sandí, E.: Potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotype T4 isolated from dental units and emergency combination showers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 112, 817–821 (2017). <https://doi.org/10.1590/0074-02760170147>.
38. Wopereis, D.B., Bazzo, M.L., De Macedo, J.P., Casara, F., Golfeto, L., Venancio, E., De Oliveira, J.G., Rott, M.B., Caumo, K.S.: Free-living amoebae and their relationship to air quality in hospital environments: Characterization of *Acanthamoeba* spp. obtained from air-conditioning systems. *Parasitology.* 147, 782–790 (2020). <https://doi.org/10.1017/S0031182020000487>.
39. Mohammady, A., Dalimi, A., Ghafarifar, F., Akbari, M., Pirestani, M.: Genotyping of *Acanthamoeba* Isolated from Hospital Environments and Thermal Water of Recreational Baths in Markazi Province, Iran. *Iran J Parasitol.* 18, 38–47 (2023). <https://doi.org/10.18502/ijpa.v18i1.12378>.

40. Tolba, M.M., Elhadad, H., Abu Kabsha, S.H., El-Kady, N.S., Khalil, S.S., Mohamed, A.H., El-Taweel, H.A.: *Acanthamoeba* spp. in Dialysis Water: Assessing the Potential Risk of Transmission to Hemodialysis Patients. *Acta Parasitol.* 70, 58 (2025). <https://doi.org/10.1007/s11686-025-00992-6>.
41. Lorenzo-Morales, J., Khan, N.A., Walochnik, J.: An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment . *Parasite.* 22, 10 (2015). <https://doi.org/10.1051/parasite/2015010>.
42. Saberi, R., Nakhaei, M., Fakhar, M., Zarrinfar, H., Sharifpour, A., Hezarjaribi, H.Z.: Molecular identification and genotyping of *Acanthamoeba* spp., in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompetent patients with chronic respiratory disorders (CRD). *Parasitol Res.* 121, 3013–3017 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07609-1>.
43. Jercic, M.I., Aguayo, C., Saldarriaga-Córdoba, M., Muiño, L., Chenet, S.M., Lagos, J., Osuna, A., Fernández, J.: Genotypic diversity of *Acanthamoeba* strains isolated from Chilean patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Parasit Vectors.* 12, (2019). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3302-5>.
44. Corsaro, D.: Update on *Acanthamoeba* phylogeny. *Parasitol Res.* 119, 3327–3338 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06843-9>
45. Balczun, C., Scheid, P.L.: Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses.* 9, (2017). <https://doi.org/10.3390/v9040065>.
46. Siddiqui, R., Khan, N.A.: Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors.* 5, 6 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>.
47. Wang, Y., Jiang, L., Zhao, Y., Ju, X., Wang, L., Jin, L., Fine, R.D., Li, M.: Biological characteristics and pathogenicity of *Acanthamoeba*. *Front Microbiol.* 14, (2023). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1147077>.
48. Niederkorn, J.Y.: The biology of *Acanthamoeba* keratitis. *Exp Eye Res.* 202, 108365 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108365>.
49. Masangkay, F.R., Rona, F.C., Poricallan, A.J.G., Padua, R.L.M., Reyes, M.S.S., Ricacho, J.K.M., Samar, M.J.E., Santos, M.C.I., Tangpong, J., Kotepui, M.,

Padua, M.F.F.E., Milanez, G.D., Karanis, P.: First report on the long-term viability of *Acanthamoeba* species in unpreserved environmental freshwater samples stored at room temperature. *J Water Health*. 22, 2194–2205 (2024). <https://doi.org/10.2166/wh.2024.391>.

50. Mooney, R., Richardson, K., Rodgers, K., Giammarini, E., Williams, R., Kelly, S., Amaeze, N., Inkster, T., Henriquez, F.L., Mackay, W.: *Acanthamoeba* as a protective reservoir for *Pseudomonas aeruginosa* in a clinical environment. *Journal of Hospital Infection*. (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2024.08.010>.

51. Choaji, M., Samba-Louaka, A., Fechtali-Moute, Z., Aucher, W., Pomel, S.: Encystment and Excystment Processes in *Acanthamoeba castellanii*: An Emphasis on Cellulose Involvement. *Pathogens*. 14, 268 (2025). <https://doi.org/10.3390/pathogens14030268>.

52. Lambrecht, E., Baré, J., Claeys, M., Chavatte, N., Bert, W., Sabbe, K., Houf, K.: Transmission electron microscopy sample preparation protocols for the ultrastructural study of cysts of free-living protozoa. *Biotechniques*. 58, 181–8 (2015). <https://doi.org/10.2144/000114274>.

53. Pussard M, P.R.: Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. Vol. 13, 557–598 (1977).

54. Megha, K., Gupta, A., Sehgal, R., Khurana, S.: An improvised medium for axenic cultivation of *Acanthamoeba* spp. *Indian J Med Microbiol*. 35, 597–599 (2017). https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_17_151.

55. Schuster, F.L.: Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*. 15, 342–54 (2002). <https://doi.org/10.1128/cmr.15.3.342-354.2002>.

56. Megha, K., Gupta, A., Sehgal, R., Khurana, S.: An improvised medium for axenic cultivation of *Acanthamoeba* spp. *Indian J Med Microbiol*. 35, 597 (2017). https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_17_151.

57. Niyyati, M., Abedkhozasteh, H., Salehi, M., Farnia, S., Rezaeian, M.: Axenic cultivation and pathogenic assays of *acanthamoeba* strains using physical parameters. *Iran J Parasitol*. 8, 186–9 (2013).

58. Hernández-Martínez, D., Castro Pot, E., Hernández Olmos, P., Guzmán Hernández, E.A., Cobos, D.S., Villa Ramírez, S., Villamar Duque, T.E., Durán Díaz, Á., Omaña-Molina, M.: *Acanthamoeba castellanii* trophozoites that survive multipurpose solutions are able to adhere to cosmetic contact lenses, increasing the risk of infection. *Heliyon*. 9, e19599 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19599>.
59. Campolo, A., Pifer, R., Walters, R., Thomas, M., Miller, E., Harris, V., King, J., Rice, C.A., Shannon, P., Patterson, B., Crary, M.: *Acanthamoeba* spp. aggregate and encyst on contact lens material increasing resistance to disinfection. *Front Microbiol*. 13, (2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1089092>
60. Behniafar, H., Niyati, M., Lasjerdi, Z.: Molecular Characterization of Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from Drinking and Recreational water in East Azerbaijan, Northwest Iran. *Environ Health Insights*. 9, 7–12 (2015). <https://doi.org/10.4137/EHI.S27811>.
61. Nageeb, M.M., Eldeek, H.E.M., Attia, R.A.H., Sakla, A.A., Alkhalil, S.S., Farrag, H.M.M.: Isolation and morphological and molecular characterization of waterborne free-living amoebae: Evidence of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Vahlkampfiidae* in Assiut, Upper Egypt. *PLoS One*. 17, (2022). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267591>.
62. Duarte, J.L., Furst, C., Klisiowicz, D.R., Klassen, G., Costa, A.O.: Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Exp Parasitol*. 135, 9–14 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.013>.
63. Diehl, M.L.N., Paes, J., Rott, M.B.: Genotype distribution of *Acanthamoeba* in keratitis: a systematic review. *Parasitol Res*. 120, 3051–3063 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07261-1>.
64. Possamai, C.O., Loss, A.C., Costa, A.O., Falqueto, A., Furst, C.: *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. *Parasitol Res*. 117, 1389–1400 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5824-8>

65. Otero-Ruiz, A., Gonzalez-Zuñiga, L.D., Rodriguez-Anaya, L.Z., Lares-Jiménez, L.F., Gonzalez-Galaviz, J.R., Lares-Villa, F.: Distribution and Current State of Molecular Genetic Characterization in Pathogenic Free-Living Amoebae. *Pathogens*. 11, 1199 (2022). <https://doi.org/10.3390/pathogens11101199>.
66. Gast, R.J., Ledee, D.R., Fuerst, P.A., Byers, T.J.: Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol*. 43, 498–504 (1996). <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04510.x>.
67. Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A., Byers, T.J.: The Evolutionary History of the Genus *Acanthamoeba* and the Identification of Eight New 18S rRNA Gene Sequence Types. *J Eukaryot Microbiol*. 45, 45–54 (1998). <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x>.
68. Horn, M., Fritsche, T.R., Gautam, R.K., Schleifer, K.-H., Wagner, M.: Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol*. 1, 357–367 (1999). <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00045.x>.
69. Gast, R.J.: Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol*. 48, 609–15 (2001). <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00199.x>.
70. Hewett, M.K., Robinson, B.S., Monis, P.T., Saint, C.P.: Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool*. 42, 325–329 (2003).
71. Corsaro, D., Venditti, D.: Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res*. 107, 233–238 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1870-6>
72. Magliano, A.C.M., Teixeira, M.M.G., Alfieri, S.C.: Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): Characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic

inferences. Parasitology. 139, 45–52 (2012).
<https://doi.org/10.1017/S0031182011001648>.

73. Qvarnstrom, Y., Nerad, T.A., Visvesvara, G.S.: Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 60, 626–633 (2013).
<https://doi.org/10.1111/jeu.12069>.

74. Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galván-Díaz, A.L., Izquiedo, F., Fenoy, S., Del Aguila, C.: Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Res*. 113, 2845–2850 (2014).
<https://doi.org/10.1007/s00436-014-3945-2>.

75. Visvesvara, G.S., Booton, G.C., Kelley, D.J., Fuerst, P., Sriram, R., Finkelstein, A., Garner, M.M.: In vitro culture, serologic and molecular analysis of *Acanthamoeba* isolated from the liver of a keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). *Vet Parasitol*. 143, 74–78 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.010>.

76. Tice, A.K., Shadwick, L.L., Fiore-Donno, A.M., Geisen, S., Kang, S., Schuler, G.A., Spiegel, F.W., Wilkinson, K.A., Bonkowski, M., Dumack, K., Lahr, D.J.G., Voelcker, E., Clauß, S., Zhang, J., Brown, M.W.: Expansion of the molecular and morphological diversity of *Acanthamoebidae* (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biol Direct*. 11, (2016).
<https://doi.org/10.1186/s13062-016-0171-0>.

77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CDEZ000000000.1>.

78. Putaporntip, C., Kuamsab, N., Nuprasert, W., Rojrungr, R., Pattanawong, U., Tia, T., Yanmanee, S., Jongwutiwes, S.: Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. *Sci Rep*. 11, (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96690-0>.

79. Megha, K., Sehgal, R., Khurana, S.: Genotyping of *Acanthamoeba* spp. isolated from patients with granulomatous amoebic encephalitis. *Indian J Med Res*. 148, 456–459 (2018). https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1564_17

80. Rodríguez-Pérez, E.G., Escandón-Vargas, K., Ancer, A.: Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* sp. in an immunocompetent Mexican adult.

Rev Soc Bras Med Trop. 50, 432–432 (2017). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0166-2016>.

81. Roshni Prithiviraj, S., Rajapandian, S.G.K., Gnanam, H., Gunasekaran, R., Mariappan, P., Sankalp Singh, S., Prajna, L.: Clinical presentations, genotypic diversity and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* species causing keratitis. J Med Microbiol. 69, 87–95 (2020). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001121>.

82. Fan, W., Li, P., Wei, Q., Liu, X., Cai, Y., Li, B., Lu, Y.: Metagenomic next-generation sequencing-assisted diagnosis of a rare case of primary cutaneous acanthamoebiasis in an HIV patient: a case report. Front Cell Infect Microbiol. 14, (2024). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1356095>.

83. Kot, K., Łanocha-Arendarczyk, N., Kosik-Bogacka, D.: Immunopathogenicity of *Acanthamoeba* spp. in the Brain and Lungs. Int J Mol Sci. 22, 1261 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22031261>.

84. Borges, S. da L., de Macedo, E. da S., da Silva, F.A.V., Ataíde, B.J. de A., Mendes, N. de S.F., Passos, A. da C.F., de Moraes, S.A.S., Herculano, A.M., Oliveira, K.R.H.M., Bahia, C.P., Dolabella, S.S., Batista, E. de J.O.: Experimental Granulomatous Amebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba castellanii*. Trop Med Infect Dis. 9, (2024). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9070145>

85. Khurana, S., Sharma, C., Radotra, B.D., Mewara, A., Tanwar, P., Datta, P., Sehgal, R.: Molecular Diagnosis of Encephalitis/Meningoencephalitis Caused by Free-Living Amoebae from a Tertiary Center in India. Pathogens. 11, (2022). <https://doi.org/10.3390/pathogens11121509>.

86. Somani, S.N., Ronquillo, Y., Moshirfar, M.: Acanthamoeba Keratitis. (2025) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549863/>.

87. Raghavan, A., Rammohan, R.: Acanthamoeba keratitis – A review. Indian J Ophthalmol. 72, 473–482 (2024). https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_2627_23.

88. Azzopardi, M., Chong, Y.J., Ng, B., Recchioni, A., Logeswaran, A., Ting, D.S.J.: Diagnosis of Acanthamoeba Keratitis: Past, Present and Future. Diagnostics. 13, 2655 (2023). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13162655>.

89. Shareef, O., Shareef, S., Saeed, H.N.: New Frontiers in *Acanthamoeba* Keratitis Diagnosis and Management. *Biology* (Basel). 12, 1489 (2023). <https://doi.org/10.3390/biology12121489>.
90. Siripurapu, G., Samad, S.A., Fatima, S., Wig, N., Srivastava, M.V.P.: Successful management of post-COVID-19 acanthamoebic encephalitis. *International Journal of Infectious Diseases*. 110, 226–228 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.07.046>.
91. Ashtari, F., Mahami-Oskoue, M., Spotin, A., Ahmadpour, E., Aali, H., Mahmoodpour, H., Kohansal, M.H.: Effect of aqueous extract of *Eucalyptus Microtheca* on *Acanthamoeba* genotype T5, an in vitro study. *BMC Complement Med Ther*. 25, 127 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12906-025-04869-z>.
92. López-Barona, P., Verdú-Expósito, C., Martín-Pérez, T., Gómez-Casanova, N., Lozano-Cruz, T., Ortega, P., Gómez, R., Pérez-Serrano, J., Heredero-Bermejo, I.: Amoebicidal activity of cationic carbosilane dendrons derived with 4-phenylbutyric acid against *Acanthamoeba griffini* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites and cysts. *Sci Rep*. 12, 14926 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19200-w>.
93. Abdelnasir, S., Anwar, A., Kawish, M., Anwar, A., Shah, M.R., Siddiqui, R., Khan, N.A.: Metronidazole conjugated magnetic nanoparticles loaded with amphotericin B exhibited potent effects against pathogenic *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *AMB Express*. 10, (2020). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01061-z>.
94. Aykur, M.: Amoebicidal effect of Fluconazole and Verapamil together against trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*. 12, 104–110 (2023). <https://doi.org/10.46810/tdfd.1259142>.
95. Sangkanu, S., Siyadatpanah, A., Norouzi, R., Chuprom, J., Mitsuwan, W., Surinkaew, S., Boonhok, R., Paul, A.K., Mahboob, T., Sama-ae, I., Oliveira, S.M.R., Jimoh, T.O., Pereira, M. de L., Wilairatana, P., Wiart, C., Rahmatullah, M., Sakolnapa, M., Nissapatorn, V.: Efficacy of propolis extract and eye drop solutions to suppress encystation and excystation of *Acanthamoeba triangularis* WU19001-T4 genotype. *PeerJ*. 12, e16937 (2024). <https://doi.org/10.7717/peerj.16937>.

96. Ozpinar, N., Ozpinar, H., Bakay, B.B., Tunc, T.: Amoebicidal activity of benzothiazole on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites and its cytotoxic potentials. *Acta Trop.* 203, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105322>.
97. Mitsuwan, W., Sama-ae, I., Sangkanu, S., Khan, D.A., Biswas, P., Hasan, Md.N., Chuprom, J., Jimoh, T.O., Wiart, C., Zulkipli, M.B., Abdullah, N.H., Pereira, M. de L., Oliveira, S.M.R., Saravanabhavan, S.S., Wilairatana, P., Mahboob, T., Nissapatorn, V.: Amebicidal and Antiadhesion Activities of *Knema retusa* Extract Against *Acanthamoeba triangularis* T4 Genotype on Contact Lenses and Modeling Simulation of Its Main Compound, E2N, Against *Acanthamoeba* Beta-Tubulin. *Scientifica (Cairo)*. 2025, (2025). <https://doi.org/10.1155/sci5/4311313>.
98. Zhao, L., Tian, L., Sun, N., Sun, Y., Chen, Y., Wang, X., Zhao, S., Su, X., Zhao, D., Cheng, M.: Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of L-amino alcohol derivatives as broad-spectrum antifungal agents. *Eur J Med Chem.* 177, 374–385 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.047>.
99. Hafidi, Z., El achouri, M., Francisco, F.F., Pérez, L.: Antifungal activity of amino-alcohols based cationic surfactants and in silico, homology modeling, docking and molecular dynamics studies against lanosterol 14- α -demethylase enzyme. *J Biomol Struct Dyn.* 40, 7762–7778 (2022). <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1902396>.
100. Vrynchanu, N., Korotkij, Y., Hrynchuk, N., Boiko, I., Smertenko, E., Bondarenko, L.: Antimicrobial activity of novel 1-[(2,4-(di-tert-butylphenoxy))-3-dialkylamino-2-propanol] derivatives. *One Health & Risk Management.* 2, 27–33 (2021). <https://doi.org/10.38045/ohrm.2021.3.04>.
101. Arias, M.H., Quiliano, M., Bourgeade-Delmas, S., Fabing, I., Chantal, I., Berthier, D., Minet, C., Eparvier, V., Sorres, J., Stien, D., Galiano, S., Aldana, I., Valentin, A., Garavito, G., Deharo, E.: Alsinol, an arylamino alcohol derivative active against *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: past and new outcomes. *Parasitol Res.* 119, 3503–3515 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06832-y>.
102. Coimbra, E.S., De Almeida, M. V., Júnior, C.O.R., Taveira, A.F., Da Costa, C.F., De Almeida, A.C., Reis, E.F.C., Da Silva, A.D.: Synthesis and antileishmanial

activity of lipidic amino alcohols. *Chem Biol Drug Des.* 75, 233–235 (2010).
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00923.x>.

103. Julianto, T.S., Rachmawaty, F.J., Tamhid, H.A., Putri, B.S.: The potential antimalarial drug of aryl amino alcohol derivatives from eugenol: synthesis, in-vitro and in-silico analysis of bioactivity. *Rasayan Journal of Chemistry.* 16, 1425–1434 (2023).
<https://doi.org/10.31788/RJC.2023.1636940>.

104. Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J.R., Russell, A.D.: *Acanthamoeba castellanii*: Growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *Journal of Infection.* 36, 43–48 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(98\)93054-7](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(98)93054-7).

105. Wu, T., Li, Y., Qiu, G., Yang, B., Wang, L., Wang, S.: Design and discovery of novel antifungal inhibitors targeting 14 α -demethylase: F11 as a promising antifungal candidate. *Results Chem.* 16, (2025). <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2025.102411>.

106. Sellers-Moya, Á., Nuévalos, M., Molina, M., Martín, H.: Clotrimazole-induced oxidative stress triggers novel yeast pkc1-independent cell wall integrity mapk pathway circuitry. *Journal of Fungi.* 7, (2021). <https://doi.org/10.3390/jof7080647>.

107. Hargrove, T.Y., Lamb, D.C., Wawrzak, Z., Hull, M., Kelly, S.L., Guengerich, F.P., Lepesheva, G.I.: Identification of Potent and Selective Inhibitors of *Acanthamoeba*: Structural Insights into Sterol 14 α -Demethylase as a Key Drug Target. *J Med Chem.* 67, 7443–7457 (2024). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00303>.

108. Sharma, V., Shing, B., Hernandez-Alvarez, L., Debnath, A., Podust, L.M.: Domain-swap dimerization of *Acanthamoeba castellanii* CYP51 and a unique mechanism of inactivation by isavuconazole. *Mol Pharmacol.* 98, 770–780 (2020).
<https://doi.org/10.1124/MOLPHARM.120.000092>.

109. Nienhaus, K., Sharma, V., Nienhaus, G.U., Podust, L.M.: Homodimerization Counteracts the Detrimental Effect of Nitrogenous Heme Ligands on the Enzymatic Activity of *Acanthamoeba castellanii* CYP51. *Biochemistry.* 61, 1363–1377 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00198>.

110. Elsheikha, H.M., Siddiqui, R., Khan, N.A.: Drug discovery against acanthamoeba infections: Present knowledge and unmet needs. *Pathogens.* 9, (2020).
<https://doi.org/10.3390/pathogens9050405>.

111. Kyle, D.E., Cassiopeia Russell, A., Troth, E. V., Rice, C.A.: Discovery of anti-amoebic inhibitors from screening the mmv pandemic response box on *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Acanthamoeba castellanii*. *Pathogens*. 9, 1–16 (2020). <https://doi.org/10.3390/pathogens9060476>.
112. World Health Organization: Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology. , Genev (1991)/
113. Климнюк С.І., Ситник І.О., Широбоков В.П.: Практична мікробіологія. Нова Книга, Вінниця (2018).
114. Michael J. Dykstra, Laura E. Reuss: Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. (2003).
115. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., Chobotar, A., Sałamatin, R.: Morphological, physiological and genetic characteristics of protozoa of genus *Acanthamoeba*, isolated from different deposit of bentonite in Ukraine. *Ann Parasitol*. 66, (2020). <https://doi.org/10.17420/ap6601.239>.
116. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., Chobotar, A., Sałamatin, R.: Applying of bacteria *Cellulosimicrobium* sp. for cultivation protozoa of genus *Acanthamoeba*. *Ann Parasitol*. 66, (2020). <https://doi.org/10.17420/ap6601.238>.
117. Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J.: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 28, 495–503 (1990). <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>.
118. Huai, T., Zhao, J., Zhang, X., He, H., Zhu, X., Ma, H., Zhang, L., Zhao, P., Liu, X., Si, D.: First Report of *Pseudomonas oryzihabitans* Causing Walnut Leaf Spot Disease in China. *Plant Dis*. (2023). <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-23-1634-PDN>.
119. Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J.: Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol*. 74, 2461–2470 (2008). <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>.
120. Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D. V, Markus, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J.: Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and

from sewage sludge. J Clin Microbiol. 39, 1903–11 (2001).
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001>.

121. Soltan-Dallal, M.M., Validi, M., Douraghi, M., Fallah-Mehrabadi, J., Lormohammadi, L.: Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEp-2 cell line by MTT assay. Microb Pathog. 113, 416–420 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.003>.

122. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I.: The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. Int J Mol Sci. 22, (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>.

123. Ozpinar, N., Culha, G., Kaya, T., Yucel, H.: The amoebicidal activity of three substances derived from benzothiazole on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites and its cytotoxic potentials. Acta Trop. 220, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105981>.

124. Гур'янов В.Г., Лях.Ю.Є., Парій .В.Д., Короткий.О.В., Чалий .О.В., Чалий.К.О., Цухмістер .Я.В.: Посібник з біостатистики аналіз результатів медичних досліджень у пакеті ezr (r-statistics). (2018).

125. Li, G.L., Zhou, C.H., Fiore, S., Yu, W.H.: Interactions between microorganisms and clay minerals: New insights and broader applications. Appl Clay Sci. 177, 91–113 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.04.025>.

126. Vachon, M.A., Engel, K., Beaver, R.C., Slater, G.F., Binns, W.J., Neufeld, J.D.: Fifteen shades of clay: distinct microbial community profiles obtained from bentonite samples by cultivation and direct nucleic acid extraction. Sci Rep. 11, 22349 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01072-1>.

127. Mitzscherling, J., Genderjahn, S., Schleicher, A.M., Bartholomäus, A., Kallmeyer, J., Wagner, D.: Clay-associated microbial communities and their relevance for a nuclear waste repository in the Opalinus Clay rock formation. Microbiologyopen. 12, (2023). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1370>.

128. Fomina, M., Skorochood, I.: Microbial Interaction with Clay Minerals and Its Environmental and Biotechnological Implications. Minerals. 10, 861 (2020). <https://doi.org/10.3390/min10100861>.

129. Широбоков В. П. Бобир В. В. Янковський Д. С. Димент Г.С.: Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей, (2009).
130. Shyrobokov, V.P., Poniatovskyi, V.A., Yuryshynets, V.I., Chobotar, A.P., Salamatin, R.V.: Free-Living Amoebas as a Representative of Bentonite Clay Prokaryotic-Eukaryotic Consortium. *Mikrobiol Zh.* 79, 106–114 (2017).
<https://doi.org/10.15407/mikrobiolj79.03.106>.
131. 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. *Sci Rep.* 9, (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>.
132. Pérez-Pérez, P., Reyes-Batlle, M., Rodríguez-Expósito, R.L., Perdomo-González, A., Sifaoui, I., Díaz-Peña, F.J., Morchón, R., Maciver, S.K., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J.: First Report of *Acanthamoeba* Genotype T4 from the Newly Formed Tajogaite Volcano Tephra (La Palma, Canary Islands). *Pathogens.* 13, (2024).
<https://doi.org/10.3390/pathogens13080626>.
133. Petkar, H., Li, A., Bunce, N., Duffy, K., Malnick, H., Shah, J.J.: *Cellulosimicrobium funkei*: First report of infection in a nonimmunocompromised patient and useful phenotypic tests for differentiation from *Cellulosimicrobium cellulans* and *Cellulosimicrobium terreum*. *J Clin Microbiol.* 49, 1175–1178 (2011).
<https://doi.org/10.1128/JCM.01103-10>.
134. Ioannou, P., Vorria, A., Samonis, G.: *Cellulosimicrobium* Infections in Humans—A Narrative Review. *Antibiotics.* 13, 562 (2024).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13060562>.
135. Glonti, T., Pirnay, J.-P.: In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses.* 14, 1490 (2022).
<https://doi.org/10.3390/v14071490>.
136. Shu, L., Qian, X., Brock, D.A., Geist, K.S., Queller, D.C., Strassmann, J.E.: Loss and resiliency of social amoeba symbiosis under simulated warming. *Ecol Evol.* 10, 13182–13189 (2020). <https://doi.org/10.1002/ece3.6909>.

137. Moreira, L.R., Ramírez, D.V., Linares, F., Ledezma, A.P., Garro, A.V., Osuna, A., Morales, J.L., Sandí, E.A.: Isolation of *Acanthamoeba* t5 from water: Characterization of its pathogenic potential, including the production of extracellular vesicles. *Pathogens*. 9, (2020). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020144>.
138. Kahraman, M., Akin Polat, Z.: Are Thermotolerant and Osmotolerant Characteristics of *Acanthamoeba*; Species an Indicator of Pathogenicity? *Turkish Journal of Parasitology*. 48, 15–20 (2024). <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2024.92408>.
139. Hussain, R.H.M., Ghani, M.K.A., Khan, N.A., Siddiqui, R., Anuar, T.S.: *Acanthamoeba* species isolated from marine water in Malaysia exhibit distinct genotypes and variable physiological properties. *J Water Health*. 20, 54–67 (2022). <https://doi.org/10.2166/WH.2021.128>.
140. Matos de Oliveira, Y.L., Lima, E.T.S., Rott, M.B., Fernandes, R.P.M., Jain, S., de Aragão Batista, M.V., Santana Dolabella, S.: Occurrence, molecular diversity and pathogenicity of *Acanthamoeba* spp. isolated from aquatic environments of Northeastern Brazil. *Int J Environ Health Res*. 33, 1686–1696 (2022). <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2117280>.
141. Schiller, H., Young, C., Schulze, S., Tripepi, M., Pohlschroder, M.: A Twist to the Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test: an Accessible Laboratory Experiment Comparing *Haloferax volcanii* and *Escherichia coli* Antibiotic Susceptibility to Highlight the Unique Cell Biology of Archaea. *J Microbiol Biol Educ*. 23, (2022). <https://doi.org/10.1128/jmbe.00234-21>.
142. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. (2009).
143. Alishba, Ahmed, U., Taha, M., Khan, N.A., Salar, U., Khan, K.M., Anwar, A., Siddiqui, R.: Potential anti-amoebic effects of synthetic 1,4-benzothiazine derivatives against *Acanthamoeba castellanii*. *Heliyon*. 10, (2024). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23258>.
144. Qubais Saeed, B., Hamdy, R., Akbar, N., Sajeevan, S.E., Khan, N.A., Soliman, S.S.M.: Azole-based compounds as potential anti- *Acanthamoeba* agents. *RSC Med Chem*. 15, 1578–1588 (2024). <https://doi.org/10.1039/D4MD00029C>.

145. Wanka, L., Iqbal, K., Schreiner, P.R.: The Lipophilic Bullet Hits the Targets: Medicinal Chemistry of Adamantane Derivatives. *Chem Rev.* 113, 3516–3604 (2013). <https://doi.org/10.1021/cr100264t>.
146. Ahmed, U., Anwar, A., Ong, S., Anwar, A., Khan, N.A.: Applications of medicinal chemistry for drug discovery against *Acanthamoeba* infections. *Med Res Rev.* 42, 462–512 (2022). <https://doi.org/10.1002/med.21851>.
147. Singh, S., Bharti, N., Mohapatra, P.P.: Chemistry and Biology of Synthetic and Naturally Occurring Antiamoebic Agents. *Chem Rev.* 109, 1900–1947 (2009). <https://doi.org/10.1021/cr068217k>.
148. Wu, L., Wang, X., Xu, W., Farzaneh, F., Xu, R.: The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. *Curr Med Chem.* 16, 4236–4260 (2009). <https://doi.org/10.2174/092986709789578187>.
149. Ilyas, M., Stapleton, F., Willcox, M.D.P., Henriquez, F., Peguda, H.K., Rayamajhee, B., Zahid, T., Petsoglou, C., Carnt, N.A.: Epidemiology of and Genetic Factors Associated with *Acanthamoeba* Keratitis. *Pathogens.* 13, 142 (2024). <https://doi.org/10.3390/pathogens13020142>.
150. Mungroo, M.R., Khan, N.A., Maciver, S., Siddiqui, R.: Opportunistic free-living amoebal pathogens. *Pathog Glob Health.* 116, 70–84 (2022). <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1985892>.
151. Nasher, F., Wren, B.W.: Unravelling mechanisms of bacterial recognition by *Acanthamoeba*: insights into microbial ecology and immune responses. *Front Microbiol.* 15, (2024). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1405133>.
152. Cecil, R.E., Yoder-Himes, D.R.: Examining the influence of environmental factors on *Acanthamoeba castellanii* and *Pseudomonas aeruginosa* in co-culture. *PLoS One.* 19, e0305973 (2024). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305973>.
153. Dinda, S.K., Hazra, S., De, A., Datta, A., Das, L., Pattanayak, S., Kumar, K., Dey, M.D., Basu, A., Manna, D.: Amoebae: beyond pathogens- exploring their benefits and future potential. *Front Cell Infect Microbiol.* 14, (2024). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1518925>.

154. Mooney, R., Rodgers, K., Carnicelli, S., Carnevale, M.E., Farias, M.E., Henriquez, F.L.: Isolation of *Acanthamoeba* Species and Bacterial Symbiont Variability in Puna Salt Plains, Argentina. *Environ Microbiol Rep.* 17, (2025). <https://doi.org/10.1111/1758-2229.70059>.
155. Ramírez-Flores, E., Bonilla-Lemus, P., Carrasco-Yépez, M.M., Ramírez-Flores, M.A., Barrón-Graciano, K.A., Rojas-Hernández, S., Reyes-Batlle, M., Lorenzo-Morales, J.: Saline-Tolerant Pathogenic *Acanthamoeba* spp. Isolated from a Geothermal Power Plant. *Pathogens.* 12, 1363 (2023). <https://doi.org/10.3390/pathogens12111363>.
156. Karimi, A., Kheirandish, F., Javadi Mamaghani, A., Taghipour, N., Mousavi, S.F., Aghajani, A., Zebardast, N., Faraji, M., Fallahi, S.: Identification and genotyping of *Acanthamoeba* spp. in the water resources of western Iran. *Parasite Epidemiol Control.* 22, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2023.e00308>.
157. Berrilli, F., Montalbano Di Filippo, M., Guadano-Procesi, I., Ciavurro, M., Di Cave, D.: *Acanthamoeba* Sequence Types and Allelic Variations in Isolates from Clinical and Different Environmental Sources in Italy. *Microorganisms.* 12, 544 (2024). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030544>.
158. Fakae, L.B., Zhong, J., Chan, K.L.A., Mekapothula, S., Cave, G.W. V., Zhu, X.-Q., Stevenson, C.W., Elsheikha, H.M.: Morphological and Chemical Changes in the Trophozoites and Cysts of *Acanthamoeba Castellanii* Induced by *Camellia Sinensis* Extracts. *Acta Parasitol.* 70, 63 (2025). <https://doi.org/10.1007/s11686-024-00941-9>
159. Fakae, L.B., Zhong, J., Chan, K.L.A., Mekapothula, S., Cave, G.W. V., Zhu, X.-Q., Stevenson, C.W., Elsheikha, H.M.: Morphological and Chemical Changes in the Trophozoites and Cysts of *Acanthamoeba castellanii* Induced by *Camellia Sinensis* Extracts. *Acta Parasitol.* 70, 63 (2025). <https://doi.org/10.1007/s11686-024-00941-9>
160. Pérez-Pérez, P., Rodríguez-Escolar, I., Piñero, J.E., Morchón, R., Lorenzo-Morales, J.: High Diversity and Prevalence of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae in Water Sources from Castilla y León, Spain. *Pathogens.* 14, 637 (2025). <https://doi.org/10.3390/pathogens14070637>

161. Sawyer, T.K., Visvesvara, G.S., Harke, B.A.: Pathogenic Amoebas from Brackish and Ocean Sediments, with a Description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. Science (1979). 196, 1324–1325 (1977). <https://doi.org/10.1126/science.867031>.
162. Begg, A.P., Todhunter, K., Donahoe, S.L., Krockenberger, M., Šlapeta, J.: Severe Amoebic Placentitis in a Horse Caused by an *Acanthamoeba hatchetti* Isolate Identified Using Next-Generation Sequencing. J Clin Microbiol. 52, 3101–3104 (2014). <https://doi.org/10.1128/JCM.01071-14>.
163. Corsaro, D., Mrva, M., Colson, P., Walochnik, J.: Validation and redescription of *Acanthamoeba terricola* Pussard, 1964 (Amoebozoa: Acanthamoebidae). Eur J Protistol. 94, 126091 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2024.126091>.
164. Penland, R.L., Wilhelmus, K.R.: Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. J Clin Microbiol. 35, 915–922 (1997). <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.915-922.1997>.
165. Martín-Pérez, T., Criado-Fornelio, A., Ávila-Blanco, M., Pérez-Serrano, J.: Development and optimization of new culture media for *Acanthamoeba* spp. (Protozoa: Amoebozoa). Eur J Protistol. 64, 91–102 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2018.04.002>.
166. Bilden, A., Ertaş, E., Kahraman, M., Tural, S., Tural, B., Çiçek, M.: Rapid Cultivation of *Acanthamoeba* spp. Isolated from Environmental Samples Using Nanocomposite and Leech Saliva on Non-Nutrient Agar. Acta Parasitol. 70, (2025). <https://doi.org/10.1007/s11686-025-01053-8>.
167. dos Santos, D.L., Chaúque, B.J.M., Matiazo, F.F., de Miranda Ribeiro, L., Rott, M.B.: Agar dehydration: a simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* spp. collection at room temperature. Parasitol Res. 123, 153 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00436-024-08172-7>.
168. Alnaimat, S.M., Abushattal, S., Dmour, S.M.: Comparative genomic characterization of *Cellulosimicrobium funkei* isolate RVMD1 from Ma'an desert rock varnish challenges *Cellulosimicrobium* systematics. Front Microbiol. 15, (2024). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1445943>.

169. Haapanen, S., Barker, H., Carta, F., Supuran, C.T., Parkkila, S.: Novel Drug Screening Assay for *Acanthamoeba castellanii* and the Anti-Amoebic Effect of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J Med Chem.* 67, 152–164 (2024). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01020>.
170. Loufouma Mbouaka, A., Lesiak-Markowicz, I., Heredero-Bermejo, I., Mazumdar, R., Walochnik, J., Martín-Pérez, T.: Assessing *Acanthamoeba* cytotoxicity: comparison of common cell viability assays. *Front Microbiol.* 14, (2023). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1175469>.
171. Veugen, J.M.J., Savelkoul, P.H.M., Nuijts, R.M.M.A., Dickman, M.M., Wolffs, P.F.G.: Enhancing *Acanthamoeba* diagnostics: rapid detection of viable *Acanthamoeba* trophozoites and cysts using viability PCR assay . *Microbiol Spectr.* 13, (2025). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01811-24>
172. Redd, T.K., Talbott, M., Cevallos, V., Lalitha, P., Seitzman, G.D., Lietman, T.M., Keenan, J.D.: In Vitro Comparison of the *Acanthamoeba* Cysticidal Activity of Povidone Iodine, Natamycin, and Chlorhexidine. *Ophthalmology Science.* 1, 100025 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.xops.2021.100025>
173. Akbar, N., El-Gamal, M.I., Saeed, B.Q., Oh, C.-H., Abdel-Maksoud, M.S., Khan, N.A., Alharbi, A.M., Alfahemi, H., Siddiqui, R.: Antiamoebic Activity of Imidazothiazole Derivatives against Opportunistic Pathogen *Acanthamoeba castellanii*. *Antibiotics.* 11, 1183 (2022). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091183>
174. Abdel-Hakeem, S.S., Hassan, F.A.M., Hifney, A.F., Salem, S.H.: Combating the causative agent of amoebic keratitis, *Acanthamoeba castellanii*, using *Padina pavonica* alcoholic extract: toxicokinetic and molecular docking approaches. *Sci Rep.* 14, 13610 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63691-8>
175. Sifaoui, I., Rodríguez-Expósito, R.L., Reyes-Batlle, M., Dumpiérrez Ramos, A., Diana-Rivero, R., García-Tellado, F., Tejedor, D., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J.: Amoebicidal effect of synthetic indoles against *Acanthamoeba* spp.: a study of cell death. *Antimicrob Agents Chemother.* 68, (2024). <https://doi.org/10.1128/aac.01651-23>

ДОДАТКИ

Додаток А. Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Ширококов В.П., Понятовський В. А., Юришинець В. І., **Чоботар. А. П.**, Саламатін Р. В. (2017). Вільноіснуючі амеби, як представники еукаріото-прокаріотичного консорціуму бентонітових глин. Мікробіологічний Журнал, 79(3), 98–106.
2. **Чоботар, А. П.** (2019). Акантамеби як резервуар патогенних бактерій та вірусів (огляд літератури). Інфекційні хвороби, 2 (96), 66-74. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2019.2.10328>
3. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., **Chobotar, A.**, & Sałamatin, R. (2020). Applying of bacteria *Cellulosimicrobium* sp. for cultivation protozoa of genus *Acanthamoeba*. Annals of Parasitology, 66(1), 61-67. <https://doi.org/10.17420/ap6601.238>
4. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., **Chobotar, A.**, & Sałamatin, R. Morphological, physiological and genetic characteristics of protozoa of genus *Acanthamoeba*, isolated from different deposit of bentonite in Ukraine (2020). Annals of Parasitology, 66(1), 69-75. <https://doi.org/10.17420/ap6601.239>
5. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., Poniatovska, V., **Romanchyshyna, A.**, & Sałamatin, R. (2024). Determination of the anti-protozoal activity of medicinal agents using the phenomenon of plaque formation by *Acanthamoeba* spp. Annals of parasitology, 70(1), 15-22. <https://doi.org/10.17420/ap7001.522>

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Volodymyr Shyrobokov, Vadym Poniatovskyi, **Anastasiia Chobotar**, Rusłan Sałamatin. Bacteria *Cellulosimicrobium* sp. as a food substrate for free-living amoebea (2019). Annals of parasitology, 65(supl.1), 244-245.
2. Використання бентонітових глин для виділення вільноживучих найпростіших з об'єктів довкілля. Ширококов В. П., **Романчишина А. П.** Матеріали наукової конференції “Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології” присвяченої 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології,

вірусології та імунології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України, 5 листопада 2019 року, м. Київ, Україна. 2019:155-156.

3. **Романчишина А.П.** Вільноживучі амеби, виділені з об'єктів навколишнього середовища в Україні. Третій національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 135-річчю ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова. НАМК України (за участю міжнародних спеціалістів), 20-21 травня 2021 року, м. Харків, Annals of Mechnikov Institute, N 2, 2021, с.57.

4. Широбоков В.П., Понятовський В.А., **Романчишина А.П.**, Короткий Ю.В. Визначення амебоцидної активності хімічних сполук з групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолу. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «МЕЧНИКОВСЬКІ ЧИТАННЯ – 2024» м. Харків, 1 листопада 2024 року, с.116-118.

5. Shyrobokov V.P., Poniatovskyi V.A., **Romanchyshyna A.P.**, Korotkyi Yu.V. New chemical compounds of 1-alkyl(aryl)oxy-3-amino-2-propanol group and their protistocidal activity. 35th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID Global 2025, 11 – 15 April 2025, Vienna, Austria)

Додаток Б. Перелік хімічних сполук групи 1-алкіл(арил)окси-3-аміно-2-пропанолу та їх протистоцидна активність

Номер п/п	Назва сполуки	Хімічна структура		Зона редукції бляшок (мм±δ)		
				Штам <i>Kyiv</i>	Штам <i>Cherkasy</i>	Штам <i>Kyiv</i>
1.	АМ-1	1-адамантил	2,6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0
2.	АМ-2	норборніл	2,6-диметил піперидин	10,33±8,96	12±1	0±0
3.	АМ-3	2-метилбутін	2,6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0
4.	АМ-4	1-циклопентил	2,6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0
5.	АМ-5	2-метил-бутін	2,2,6,6-тетра метилпіперидин	0±0	0±0	0±0
6.	АМ-6	1-циклогексил	2,2,6,6-тетра метилпіперидин	0±0	0±0	0±0
7.	АМ-7	третбутил	2,2,6,6-тетра метилпіперидин	0±0	0±0	0±0
8.	АМ-8	1-адамантилетил	N-піперазин, N-етил	0±0	0±0	0±0
9.	АМ-9	1-адамантилметил	N-етил, N-циклогексил	8,33±7,23	0±0	0±0
10.	АМ-10	1-адамантилетил	N-етил, N-бензил	9,33±8,14	0±0	0±0
11.	АМ-11	1-адамантилетил	2,6-диметил піперидин	18,33±1,53	20,67±1,53	16±1
12.	АМ-12	2,4-дитретбутилфеніл	2,2,6,6-тетра метилпіперидин	22,67±2,08	15,67±2,52	0±0
13.	АМ-13	2,4-дитретбутил феніл	N-етил, N-циклогексил	0±0	0±0	0±0
14.	АМ-14	1,1,3,3-тетраметилбутил	N-етил, N-циклогексил	0±0	0±0	0±0
15.	АМ-15	2,4-дитретбутил феніл	N-диметил, N-бензил	14,33±1,15	0±0	11,33±0,58
16.	АМ-16	2,4-дитретбутил феніл	N-бензил, N-метил піперидин	10,67±1,15	0±0	0±0
17.	АМ-17	2,4-дитретбутил феніл	N-бензил, N-піролідин	16,33±1,53	11,33±0,58	0±0
18.	АМ-18	2,4-дитретбутил феніл	N-бензил, N-піролідин	11,67±1,53	0±0	0±0

19.	AM-19	2,4-дитретбутил феніл	N-бензил,N- гексаметиленамін	14,33±1,53	0±0	0±0
20.	AM-20	1,1,3,3- тетраметилбутил феніл	N-диметил, N- бензил	14±1,73	0±0	11,67±1,15
21.	AM-21	1,1,3,3- тетраметилбутил феніл	N-бензил, N- гексаметиленамін	12,67±2,52	0±0	0±0
22.	AM-22	1,1,3,3- тетраметилбутил феніл	N-метил, N-піролідин	12±2	0±0	0±0
23.	AM-23	1,1,3,3- тетраметилбутил феніл	N-бензил N- гексаметиленамін	0±0	0±0	0±0
24.	AM-24	1,1,3,3- тетраметилбутил феніл	N-триметиламін	7±6,08	0±0	0±0
25.	AM-25	1-адамантилетил	N-триметиламін	0±0	0±0	0±0
26.	AM-26	1-адамантилетил	N-бензил N- гексаметиленамін	12±2	13±1	0±0
27.	AM-27	1-адамантилетил	N-метил, N-піролідин	0±0	0±0	0±0
28.	AM-28	1-адамантилетил	N-бензил, N-піролідин	20,67±3,06	14,67±1,53	11,33±0,58
29.	AM-29	1-адамантилетил	N-диметил, N-бензил	24,67±1,15	15,67±2,52	12,33±1,15
30.	AM-30	4-феніл феніл	N-диметил, N-бензил	13,33±2,08	12,33±1,53	7,33±6,35
31.	AM-31	4-феніл феніл	N-бензил N- гексаметиленамін	12,33±0,58	0±0	0±0
32.	AM-32	p-метил	N-диметил, N-бензил	0±0	0±0	0±0
33.	AM-33	p-метил	N-бензил, N-піролідин	0±0	0±0	0±0
34.	AM-34	2,4-дитретбутил	2,2,6,6-тетраметил піперидин	22,67±2,52	14±1	0±0
35.	AM-35	4- феніл феніл	2,6- диметилпіперидин	23±1	20,67±1,53	18,33±1,15
36.	AM-36	борніл	2,2,6,6-тетраметил піперидин	23,67±1,15	17±1	12,67±1,53
37.	AM-37	бутіл	2,2,6,6-тетраметил піперидин	0±0	0±0	0±0
38.	AM-38	4-третбутил циклогексил	2,6-диметил морфолін	23,33±0,58	23,67±0,58	14±1
39.	AM-39	4-третбутил циклогексил	2,6-диметил піперидин	23,67±1,15	27,67±0,58	13,67±0,58
40.	AM-40	4-третбутил циклогексил	3,5-диметил піперидин	7,67±6,66	25,67±2,08	0±0
41.	AM-41	4-третбутил циклогексил	2,2,6,6-тетраметил піперидин	26,33±1,53	25,33±1,15	21,33±0,58

42.	AM-42	ментил	N-етил, T-циклогексил	22,33±3,06	16±1	0±0
43.	AM-43	ментил	N-трет бутил	0±0	0±0	0±0
44.	AM-44	ментил	2,6-диметил піперидин	14,33±3,06	19,67±2,08	0±0
45.	AM-45	β-нафтил	2,6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0
46.	AM-46	β-нафтил	2,2,6,6-тетраметил піперидин	16±4,58	0±0	0±0
47.	AM-47	β-нафтил	N-ізопропил	0±0	0±0	0±0
48.	AM-48	α-нафтил	N-ізопропил	0±0	0±0	0±0
49.	AM-49	α-нафтил	N-третбутил	0±0	0±0	0±0
50.	AM-50	α-нафтил	N-1,1,3,3-тетраметил бутил	26,67±2,08	18,67±1,53	12±1
51.	AM-51	α-нафтил	2,2,6,6-тетрамети піперидин	23±2,65	13,33±2,08	0±0
52.	AM-52	1-адамантил етил	N-ізопропил	12,67±1,53	14,67±0,58	0±0
53.	AM-53	1-адамантил етил	N-трет бутил	13±1	18±1	0±0
54.	AM-54	орто-аліл феніл	N-ізопропил	0±0	0±0	0±0
55.	AM-55	орто-аліл феніл	2,6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0
56.	AM-56	орто-аліл феніл	N-1,1,3,3-тетраметил бутил	26±1	28,33±1,53	14±1
57.	AM-57	орто-аліл феніл	2,2,6,6-тетраметил піперидин	14,33±14,01	22,33±2,08	0±0
58.	AM-58	2-ізопропил,5-метид феніл	2,6-диметилпіперидин	9,67±8,39	0±0	0±0
59.	AM-59	4-ізопропил,3-метил феніл	2,6-диметилпіперидин	0±0	15,33±1,53	0±0
60.	AM-60	4-ізопропил,3-метил феніл	2,2,6,6-тетраметилпіперидин	16,67±4,16	15,67±0,58	0±0
61.	AM-61	Норборніл метил	2,2,6,6-тетраметилпіперидин	0±0	0±0	0±0
62.	AM-62	Норборніл етил	2,2,6,6-тетраметилпіперидин	15±5	19±1	0±0
63.	AM-63	1,1-біфеніл етил	2,2,6,6-тетраметилпіперидин	8,67±7,57	27,67±2,08	0±0
64.	AM-64	4-феніл феніл	2,2,6,6-тетраметилпіперидин	29,67±1,53	28,33±0,58	16±1
65.	AM-65	феніл	2,2,6,6-тетраметилпіперидин	0±0	0±0	0±0
66.	AM-66	α-нафтил	4-F-феніл піперазин	4±6,93	14±1	0±0

67.	AM-67	α -нафтил	5-Cl-феніл піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
68.	AM-68	α -нафтил	2-F-феніл-піперазин	23,33 $\pm$ 2,08	22,67 $\pm$ 1,53	0 $\pm$ 0
69.	AM-69	α -нафтил	Феніл піперазин	20,67 $\pm$ 1,15	23,67 $\pm$ 1,53	0 $\pm$ 0
70.	AM-70	α -нафтил	5-CF ₃ -феніл піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
71.	AM-71	β -нафтил	N-1,1,3,3-тетраметил бутіл	29,67 $\pm$ 2,52	20 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1
72.	AM-72	β -нафтил	4-F-феніл піперазин	13,33 $\pm$ 3,06	15,33 $\pm$ 0,58	0 $\pm$ 0
73.	AM-73	β -нафтил	2-піридин піперазин	29,33 $\pm$ 3,79	25 $\pm$ 1	16,33 $\pm$ 0,58
74.	AM-74	4-феніл феніл	1-дифеніл метил піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
75.	AM-75	4-феніл феніл	5-Cl-феніл піперазин	7,67 $\pm$ 6,66	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
76.	AM-76	4-феніл феніл	4-F-феніл піперазин	3,33 $\pm$ 5,77	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
77.	AM-77	4-феніл феніл	2-піридин піперазин	29,67 $\pm$ 5,03	24,67 $\pm$ 1,53	19 $\pm$ 1
78.	AM-78	4-феніл феніл	2,2,6,6-тетра мети-4-окси піперидин	3,67 $\pm$ 6,35	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
79.	AM-79	4-феніл феніл	Феніл піперазин	3,33 $\pm$ 5,77	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
80.	AM-80	2,4-Cl- феніл	N-1,1,3,3-тетраметил бутіл	28,33 $\pm$ 3,51	26 $\pm$ 1	21,33 $\pm$ 1,53
81.	AM-81	2,4-Cl- феніл	2,6-диметил піперазин	23 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
82.	AM-82	2,4-Cl- феніл	1-дифеніл метил піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
83.	AM-83	2,4-Cl- феніл	5-Cl,2-CH ₃ -феніл піперазин	3,67 $\pm$ 6,35	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
84.	AM-84	4-Br-2,6-F-феніл	N-1,1,3,3-тетраметил бутіл	30 $\pm$ 2	19,33 $\pm$ 2,08	0 $\pm$ 0
85.	AM-85	4-Br-2,6-F-феніл	1-дифеніл метил піперазин	14,67 $\pm$ 1,53	13 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
86.	AM-86	4-Br-2,6-F-феніл	2-піридин піперазин	34,33 $\pm$ 4,04	29 $\pm$ 1	14,33 $\pm$ 2,08
87.	AM-87	4-Br-2,6-F-феніл	2,2,6,6-тетраметилпіперидин	25,33 $\pm$ 0,58	13,67 $\pm$ 1,53	0 $\pm$ 0
88.	AM-88	4-Br-2,6-F-феніл	5-Cl-феніл піперазин	19,33 $\pm$ 2,52	17,67 $\pm$ 0,58	0 $\pm$ 0
89.	AM-89	4-Br-2,6-F-феніл	5-Cl-2-CH ₃ -феніл піперазин	19 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
90.	AM-90	4-Br-2,6-F-феніл	Феніл піперазин	20,33 $\pm$ 0,58	19 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
91.	AM-91	1-адамантил етил	5-CF ₃ -феніл піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
92.	AM-92	1-адамантил етил	5-Cl-феніл піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

93.	AM-93	β -нафтил	5-Cl-феніл піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
94.	AM-94	1- адамантил етил	бензімідазол	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
95.	AM-95	2.4-дитретбутил феніл	імідазол	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
96.	AM-96	2.4-дитретбутил феніл	2-метил імідазол	17,67 $\pm$ 2,52	20,67 $\pm$ 2,08	0 $\pm$ 0
97.	AM-97	2.4-дитретбутил феніл	2-метил бензімідазол	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
98.	AM-98	α -нафтил	імідазол	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
99.	AM-99	1.1.3.3-тетраметил бутил феніл	2,2,6,6- тетраметилпіпери дин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
100.	AM-100	4-феніл феніл	імідазол	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
101.	AM-101	1.1.3.3-тетраметил бутил феніл	2-піридин піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
102.	AM-102	4-третбутил циклогексил	2-піридин піперазин	24,67 $\pm$ 0,58	24 $\pm$ 1	16,67 $\pm$ 1,53
103.	AM-103	ментил	2-піридин піперазин	19,67 $\pm$ 2,52	24,67 $\pm$ 0,58	0 $\pm$ 0
104.	AM-104	4-третбутил	2-піридин піперазин	23,67 $\pm$ 1,15	23,33 $\pm$ 1,53	14,67 $\pm$ 0,58
105.	AM-105	1-адамантилетил	2-піридин піперазин	23,67 $\pm$ 2,52	21 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2
106.	AM-106	3.4-метилен-діокси феніл	2-піридин піперазин	3,67 $\pm$ 6,35	17,67 $\pm$ 2,08	0 $\pm$ 0
107.	AM-107	4-Br-феніл	2-піридин піперазин	26 $\pm$ 4,58	27,33 $\pm$ 1,53	14,33 $\pm$ 1,53
108.	AM-108	4-MeO-феніл	2-піридин піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
109.	AM-109	4-Cl-феніл	2-піридин піперазин	25 $\pm$ 1	29 $\pm$ 2	17,33 $\pm$ 2,08
110.	AM-110	2.4 -дихлор феніл	2-піридин піперазин	34,33 $\pm$ 1,15	35,67 $\pm$ 3,06	18,33 $\pm$ 1,53
111.	AM-111	2.4.6 -триметил феніл	2-піридин піперазин	18,33 $\pm$ 1,53	21 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
112.	AM-112	3.4-індан феніл	2-піридин піперазин	27 $\pm$ 3	34,33 $\pm$ 2,08	15,33 $\pm$ 2,08
113.	AM-113	2-Cl-феніл	2-піридин піперазин	27,67 $\pm$ 2,08	33,33 $\pm$ 1,53	0 $\pm$ 0
114.	AM-114	3.4-метилен-діокси бензил	2-піридин піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
115.	AM-115	2.3-диметил феніл	2-піридин піперазин	29,33 $\pm$ 1,15	30 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
116.	AM-116	4-Br- феноксietокси	2-піридин піперазин	27 $\pm$ 1,73	31 $\pm$ 1	14,67 $\pm$ 1,15
117.	AM-117	4-ацетил феніл	2-піридин піперазин	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
118.	AM-118	4-Cl,2-Me-феніл	2-піридин піперазин	33,33 $\pm$ 1,53	33,67 $\pm$ 1,15	17,67 $\pm$ 1,15
119.	AM-119	4-Cl,3.5-Me-феніл	2-піридин піперазин	27 $\pm$ 1	31 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1

120.	AM-120	4-Cl-бензил	2-піридин піперазин	26,33±1,15	27,33±2,52	12,33±1,53
121.	AM-121	4-Cl,3- Me-феніл	2-піридин піперазин	18,67±1,15	14,67±1,53	16,67±1,53
122.	AM-122	1-адамантил феніл	2-піридин піперазин	0±0	0±0	0±0
123.	AM-123	1.1.3.3. тетраметил бутил феніл	2.6-диметил морфолін	0±0	0±0	0±0
124.	AM-124	4-третбутил феніл	2.6-диметил морфолін	12,33±0,58	0±0	0±0
125.	AM-125	1-адамантилетил	2.6-диметил морфолін	12±0	0±0	0±0
126.	AM-126	4-Br- феноксietокси	2.6-диметил морфолін	0±0	21±2,65	0±0
127.	AM-127	2.4.6 триметил феніл	N-1,1,3,3- тетраметил бутил	8±6,93	30,33±2,52	0±0
128.	AM-128	2.3-диметил феніл	N-1,1,3,3- тетраметил бутил	3,67±6,35	24,33±2,08	0±0
129.	AM-129	2-Cl-феніл	N-1,1,3,3- тетраметил бутил	9,67±8,39	22,67±2,08	0±0
130.	AM-130	2-F-феніл	N-1,1,3,3- тетраметил бутил	0±0	14,67±2,08	0±0
131.	AM-131	4-третбутил феніл	N-1,1,3,3- тетраметил бутил	12,33±11,24	29,33±2,52	12±1
132.	AM-132	3.4-метилен- діокси феніл	N-1,1,3,3- тетраметил бутил	11,67±10,41	29,33±2,08	0±0
133.	AM-133	1-адамантилфеніл	4-метил піперидин	0±0	13,33±1,53	0±0
134.	AM-134	1-адамантил	4-метил піперидин	0±0	11,33±0,58	0±0
135.	AM-135	1-адамантилетил	4-метил піперидин	11±10,15	23,33±2,08	13±1
136.	AM-136	1.1.3.3 -тетраметил бутил феніл	4-метил піперидин	8±6,93	15±1,73	0±0
137.	AM-137	1-адамантил	4-бензил піперидин	36,33±1,53	37±1	18,67±1,53
138.	AM-138	1-адамантилетил	4-бензил піперидин	15±1	17±1	13±1
139.	AM-139	4-третбутил феніл	2.6-диметил піперидин	10±8,66	21,67±2,08	0±0
140.	AM-140	1-адамантилфеніл	2.6-диметил піперидин	9,33±8,14	0±0	14±1
141.	AM-141	1-адамантилфеніл	N-метил-N- циклогексил	7±6,08	0±0	0±0
142.	AM-142	1-адамантил	1-піперазин етанол	0±0	0±0	0±0
143.	AM-143	1-адамантилетил	1-піперазин етанол	0±0	0±0	0±0
144.	AM-144	4-третбутил феніл	1-піперазин етанол	0±0	0±0	0±0
145.	AM-145	4-Br-2,6-F-феніл	1-піперазин етанол	0±0	0±0	0±0
146.	AM-146	1-адамантил	N-бензімідазол	0±0	0±0	0±0

147.	AM-147	2,4-дитретбутил феніл	2-меркапто-1,2,4- триазол N-метил	0±0	0±0	0±0
148.	AM-148	2-метокси-4-алліл	4-Cl-бензил піперазин	33,33±1,53	0±0	19,67±1,53
149.	AM-149	2,4,6. триметил феніл	4-Cl-бензил піперазин	33,33±1,53	32±1	23±1
150.	AM-150	o-Br-феніл	4-Cl-бензил піперазин	30±2	34±1	15,67±1,53
151.	AM-151	4-Br-2,6-F-феніл	4-Cl-бензил піперазин	32,67±2,08	32±1	21,67±2,08
152.	AM-152	3,4-індан феніл	4-Cl-бензил піперазин	31±1	32,33±1,15	19±1
153.	AM-153	β-нафтил	4-Cl-бензил піперазин	24,33±0,58	25,33±1,53	16±1
154.	AM-154	1-адамантилетил	4-Cl-бензил піперазин	9±7,81	12,33±0,58	13±1
155.	AM-155	α-нафтил	N-ізопропіл, N- бензил	21,67±1,53	21,67±1,15	0±0
156.	AM-156	4-феніл феніл	N-бензил піперазин	22,33±2,08	30,33±1,53	16,33±0,58
157.	AM-157	4-феніл феніл	4-бензил піперидин	15±2	25,33±1,15	13±1
158.	AM-158	4-Br-2,6-F-феніл	N-бензил піперазин	30,33±1,53	32,67±2,08	0±0
159.	AM-159	2,4-Br-феніл	4-бензил піперидин	33,67±1,53	35,33±2,08	19,67±1,53
160.	AM-160	2,4-Br-феніл	циклогексил	29±1	30,33±1,53	14,33±1,53
161.	AM-161	2,4-Br-феніл	2,6 диметил піперидин	25,33±0,58	32,67±3,06	0±0
162.	AM-162	1-адамантил метил	4-бензил піперидин	29,33±2,08	33,67±2,08	21,67±1,53
163.	AM-163	1-адамантил метил	N-бензил піперазин	25,33±1,53	21±1	16,67±0,58
164.	AM-164	1-адамантил метил	N-бензімідазол	0±0	0±0	0±0
165.	AM-165	1-адамантил метил	циклогексил	33±1	26,33±2,08	13,67±1,15
166.	AM-166	1-адамантил метил	1-феніл етиламін	39,67±0,58	38±1	23,33±2,08
167.	AM-167	4-феніл феніл	1-феніл етиламін	36±1	33,67±1,15	23,67±2,52
168.	AM-168	борніл	1-феніл етиламін	32±1	30±1	17,67±0,58
169.	AM-169	β-нафтил	1-феніл етиламін	32,67±1,53	32±1,73	0±0
170.	AM-170	β-нафтил	N-бензил піперазин	30,33±3,06	24,33±1,53	0±0
171.	AM-171	2-втор бутил феніл	N-1,1,3,3- тетраметил бутил	29±1	26,67±1,15	17±2
172.	AM-172	2-втор бутил феніл	N-бензил піперазин	29,33±1,53	27,33±0,58	14,5±1,8
173.	AM-173	1,4-бензодіоксан	2-піридин піперазин	32±1	28,33±1,53	0±0
174.	AM-174	2-ізопропіл,5- метил феніл	2-піридин піперазин	26±1	24,67±0,58	13±2

175.	AM-175	3-метил.4-ізопропіл феніл	2-піридин піперазин	39±1	40,33±1,53	22±5,29
176.	AM-176	o-Br-феніл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	32,33±2,08	30,67±2,08	0±0
177.	AM-177	o-Br-феніл	2-F-феніл піперазин	39,33±1,15	38±1	23,67±2,52
178.	AM-178	o-Cl-Феніл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	20±1	19,67±1,15	0±0
179.	AM-179	o-Cl-Феніл	2-піридин піперазин	39±1,73	37,67±1,15	24,33±1,53
180.	AM-180	2-феніл феніл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	33±1	29,67±0,58	0±0
181.	AM-181	2,4-Br-феніл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	35±2,65	32,67±1,53	17,67±1,53
182.	AM-182	2-вторбутил феніл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	38,67±1,53	39,33±1,53	19±1
183.	AM-183	4-CH ₃ O-2-аліл феніл	N-2-F-феніл піперазин	24,67±0,58	30,67±3,06	12±1
184.	AM-184	2,6-CH ₃ O- феніл	N-2-F-феніл піперазин	17±1	14±1	0±0
185.	AM-185	2-третбутил феніл	N-2-F-феніл піперазин	16±1	21±2,65	0±0
186.	AM-186	2,6-диметид феніл	N-2-F-феніл піперазин	25±1	25±1	0±0
187.	AM-187	2,4-диметил феніл	N-2-F-феніл піперазин	27,67±1,53	23±2	13±1
188.	AM-188	2-Cl-феніл	N-2-F-феніл піперазин	29±1	28,67±1,53	14,33±1,15
189.	AM-189	1-ізопропіл феніл	N-2-F-феніл піперазин	20,67±1,53	19,67±1,53	11,67±2,08
190.	AM-190	2-CH ₃ O- феніл	N-2-F-феніл піперазин	13±1	11,67±1,15	0±0
191.	AM-191	4-CH ₃ O-2-трет бутил феніл	N-2-F-феніл піперазин	7±6,08	12,33±1,53	0±0
192.	AM-192	β-нафтил	N-2-F-феніл піперазин	18±2	20,33±0,58	14,33±1,15
193.	AM-193	2-ацетил феніл	N-2-F-феніл піперазин	15,67±1,53	23,33±2,52	11,67±1,15
194.	AM-194	4-Br-2,6-F-феніл	N-2-F-феніл піперазин	14,67±1,53	22±2,65	15±1
195.	AM-195	2-NO ₂ -феніл	N-2-F-феніл піперазин	15,67±0,58	11,67±1,15	0±0
196.	AM-196	2-втор бутил феніл	N-2-F-феніл піперазин	0±0	12,67±2,08	0±0
197.	AM-197	α-нафтил	N-2-F-феніл піперазин	19±1	27,33±1,53	0±0
198.	AM-198	4-аліл-2-CH ₃ O- феніл	N-2-F-феніл піперазин	23,33±1,53	32,33±3,21	11,33±0,58
199.	AM-199	2,4-Br-феніл	N-2-F-феніл піперазин	22±1	27±1	13±1
200.	AM-200	2,3-CH ₃ -феніл	N-2-F-феніл піперазин	32,67±1,53	32,33±1,15	14±1

201.	AM-201	бензодіаксанметил	N-2-F-феніл піперазин	30,33±1,53	30±1	11,67±1,15
202.	AM-202	4-метил- 2третбутил феніл	N-2-F-феніл піперазин	10,67±1,15	18,33±2,52	0±0
203.	AM-203	борніл	N-2-F-феніл піперазин	21,33±1,53	32±2,65	13±1
204.	AM-204	2-CH ₃ -феніл	N-2-CH ₃ -5-Cl- феніл піперазин	22±2,65	32,33±2,52	0±0
205.	AM-205	2-ізопропіл феніл	N-2-CH ₃ -5-Cl- феніл піперазин	0±0	15,67±3,06	0±0
206.	AM-206	2-вторбутил феніл	N-2-CH ₃ -5-Cl- феніл піперазин	0±0	0±0	0±0
207.	AM-207	2-Br-феніл	N-2-CF ₃ -феніл піперазин	11±1	22,33±3,21	11,33±0,58
208.	AM-208	2-ацетил феніл	2-піридин піперазин	0±0	8,33±7,37	0±0
209.	AM-209	o-Br-феніл	N-4-F-феніл піперазин	32,33±1,53	33,67±3,79	12,67±1,53
210.	AM-210	2-метил феніл	2 -піридин піперазин	13,67±1,53	22±3,61	0±0
211.	AM-211	2-метил-феніл	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	23,67±2,52	23,33±0,58	14±1
212.	AM-212	2-метил феніл	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	22,33±2,08	21,67±2,08	13,67±1,53
213.	AM-213	2-ізопропіл феніл	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	29±1	28,67±0,58	0±0
214.	AM-214	2,3 метил феніл	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	25,67±1,53	24,67±1,53	0±0
215.	AM-215	2,4 -Cl-феніл	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	32,33±1,53	29,67±1,53	11,33±0,58
216.	AM-216	α-нафтил	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	21,67±1,53	25,67±1,15	0±0
217.	AM-217	2-Cl-феніл	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	20,67±2,08	31,33±4,16	0±0
218.	AM-218	2-Br-феніл	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	21,67±2,08	31±2	0±0
219.	AM-219	2-втор бутил феніл	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	23±2	27±1,73	10,33±0,58
220.	AM-220	2-CH ₃ O-феніл	N-2-CH ₃ -O-феніл піперазин	0±0	0±0	0±0
221.	AM-221	4-F-феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	18,33±2,08	17±2	0±0
222.	AM-222	4-F-феніл	4-F- фенілпіперазин	33,67±1,53	32±1	16±1
223.	AM-223	4-Br-феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	30±2	25±1,73	14,33±1,15
224.	AM-224	4-Br-феніл	4-Cl-бензил піперазин	32,67±1,53	32,67±2,08	19,67±0,58
225.	AM-225	4-Br-феніл	4-F-феніл піперазин	39±1	37,33±0,58	20,67±2,52
226.	AM-226	4-Br-феніл	1-феніл-етиламін	32,33±1,53	35,33±2,52	13±1
227.	AM-227	4-Br-феніл	2-F-феніл піперазин	0±0	31,33±3,21	10,67±0,58

228.	AM-228	2.3.5.- триметилфеніл	2-піридин піперазин	32±1	27,67±1,53	0±0
229.	AM-229	2.3.5.- триметилфеніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	12,67±1,53	16,33±1,53	0±0
230.	AM-230	3.4.-індан-феніл	1-феніл етиламін	32,33±1,53	32,33±1,53	12,67±0,58
231.	AM-231	3.4.-індан-феніл	2-F-феніл піперазин	30±1	34±2,65	13±1
232.	AM-232	3.4.-індан-феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	38±1	32,33±3,79	21,67±3,21
233.	AM-233	3.4.-індан-феніл	N-1.1.3.3.-тетра метил бутіл	25,67±1,53	31,67±2,08	14±1
234.	AM-234	3.4.-індан-феніл	2-F-феніл піперазин	31,67±1,53	16±1,73	15,33±1,53
235.	AM-235	3.4.-індан-феніл	2-піридин піперазин	28,67±1,53	12±1	14±1
236.	AM-236	4-ізопропіл феніл	2-F-феніл піперазин	27±1	32±2,65	16,67±0,58
237.	AM-237	4-ізопропіл феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	32,67±1,53	31,33±1,53	14,67±0,58
238.	AM-238	4-ізопропіл феніл	2-F-феніл піперазин	27±1	25,33±1,15	11,33±0,58
239.	AM-239	4-ізопропіл феніл	2-піридин піперазин	27,33±1,15	24±1,73	13,67±0,58
240.	AM-240	4-ізопропіл феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	26±1	30,33±1,53	0±0
241.	AM-241	2-Br-феніл	1-дифеніл метил піперазин	0±0	0±0	0±0
242.	AM-242	2-Br-феніл	фенілпіперазин	31,33±1,15	30±1	13±1
243.	AM-243	2-Br-феніл	1-феніл етиламін	30±1	31,33±1,53	12,67±2,08
244.	AM-244	2-Br-феніл	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	34,33±0,58	33,67±2,52	17,33±1,53
245.	AM-245	2-Br-феніл	тетрагідроізохінол ін	32±1	24,67±3,21	12,33±0,58
246.	AM-246	3.5-диметил феніл	N-1.1.3.3.-тетра метил бутіл	23,33±2,08	24,33±0,58	0±0
247.	AM-247	3.5-диметил феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	20,67±2,08	18,33±1,53	0±0
248.	AM-248	3.5-диметил феніл	2 піридин піперазин	23,33±2,08	23±1	0±0
249.	AM-249	3.5-диметил феніл	2.6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0
250.	AM-250	3.5-диметил феніл	1-феніл етиламін	29±1	26,33±0,58	12,33±1,53
251.	AM-251	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	1-феніл етиламін	31±1	28,67±1,53	16,67±2,08
252.	AM-252	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	23±1	20,67±2,08	12,33±0,58
253.	AM-253	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	N-1.1.3.3.-тетра метил бутіл	24,67±1,53	23,33±0,58	17±2
254.	AM-254	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	Бензил піперазин	22,67±2,52	22±1	14,33±0,58
255.	AM-255	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	N-1.1.3.3.-тетра метил бутіл	34,67±1,53	29,67±1,53	17,33±1,15

256.	AM-256	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	2,6 – диметил піперазин	22,67±1,53	19,33±0,58	0±0
257.	AM-257	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	1-феніл етиламін	32±2	29,33±1,53	19±2
258.	AM-258	4-Cl-3,5-CH ₃ -феніл	2-піридин піперазин	25±1	23±2	10,67±0,58
259.	AM-259	4- CH ₃ -2 трет бутил феніл	4-F-феніл піперазин	17±1	14,67±1,15	0±0
260.	AM-260	1.1.-дифеніл етил	2-F-феніл піперазин	27±1	24,33±0,58	13±1
261.	AM-261	1.1.-дифеніл етил	4-F-феніл піперазин	23,33±2,08	30,33±2,08	17±1
262.	AM-262	2.4-Cl-феніл	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	38±1	39,33±1,53	26±1
263.	AM-263	4- CH ₃ O-2 аліл феніл	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	25,67±1,53	27,67±1,53	16,67±1,53
264.	AM-264	4-Cl-3-CH ₃ -феніл	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	30±1	32,67±2,08	19,67±2,08
265.	AM-265	β-нафтил	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	25±1	14±1,73	0±0
266.	AM-266	2 аліл феніл	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	7,67±6,66	17±1,73	12,67±1,15
267.	AM-267	4-Br-2,6 F-феніл	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	14,67±1,53	26,33±2,52	18,67±2,08
268.	AM-268	4-Br-2,6 F-феніл	4-F-феніл піперазин	30,33±1,53	24,33±3,79	15,33±1,53
269.	AM-269	3,5-CH ₃ -диметил феніл	4-F-феніл піперазин	30,67±1,53	27,67±2,08	14,33±0,58
270.	AM-270	2,6-CH ₃ -диметил феніл	4-F-феніл піперазин	19,67±1,53	17,33±0,58	15,67±1,53
271.	AM-271	4-Cl-3,5-CH ₃ - диметил феніл	4-F-феніл піперазин	30,33±1,53	28,67±2,08	0±0
272.	AM-272	4-трет-бутил-феніл	4-F-феніл піперазин	29,67±1,53	28,67±1,53	0±0
273.	AM-273	4-Cl-2-CH ₃ - диметил феніл	4-F-феніл піперазин	33±1	31,67±1,15	17,33±2,08
274.	AM-274	4-Cl-3-CH ₃ - диметил феніл	4-F-феніл піперазин	33±1	30,33±1,53	19,67±1,53
275.	AM-275	4- CH ₃ O- феніл феніл	4-F-феніл піперазин	33±0	29,67±1,15	0±0
276.	AM-276	4-феніл-феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	21,67±0,58	28,67±2,08	12,33±0,58
277.	AM-277	4-феніл-феніл	4-CH ₃ O- фенілпіперазин	33,33±2,08	29±1	0±0
278.	AM-278	4-феніл-феніл	4-F-феніл піперазин	17,67±1,53	28,67±0,58	0±0
279.	AM-279	4-феніл-феніл	тетрагідроізохінол ін	24,67±0,58	32±2,65	15,33±0,58
280.	AM-280	2,4-CH ₃ -диметил феніл	тетрагідроізохінол ін	30±1	33,33±1,53	11,33±0,58
281.	AM-281	2,4-CH ₃ -диметил феніл	2-піридин піперазин	29±1	32,67±1,53	11,33±0,58
282.	AM-282	2,4-CH ₃ -диметил феніл	4-F-феніл піперазин	33,67±1,53	31,67±0,58	14,33±1,53

283.	AM-283	2,4-CH ₃ -диметил феніл	1-феніл піперазин	29,67±1,53	32±1	13,33±0,58
284.	AM-284	2,4-CH ₃ -диметил феніл	феніл піперазин	23,67±2,08	21,67±0,58	11,33±0,58
285.	AM-285	2,4-CH ₃ -диметил феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	21,33±1,53	19,33±1,53	0±0
286.	AM-286	2,4-CH ₃ -диметил феніл	N-етил, N- циклогексил	22,33±1,53	23,67±1,53	0±0
287.	AM-287	2-Cl-феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	36±1	32,67±0,58	15,67±0,58
288.	AM-288	2-Cl-феніл	тетрагідроізохінол ін	32±1	31±1	11,33±0,58
289.	AM-289	2-Cl-феніл	4-F-феніл піперазин	31,67±2,08	28,67±1,53	14±1
290.	AM-290	2-Cl-феніл	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	30,33±1,53	28,33±0,58	13,67±1,53
291.	AM-291	3,4-індан феніл	феніл піперазин	30,33±1,53	16±2	17±1
292.	AM-292	3,4-індан феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	34,67±0,58	32,33±1,53	17,33±0,58
293.	AM-293	3,4-індан феніл	тетрагідроізохінол ін	31±1	34±2,65	14,67±1,53
294.	AM-294	3,4-індан феніл	N-етил, N- циклогексил	25,33±0,58	31,67±3,06	0±0
295.	AM-295	2-CH ₃ O- феніл	тетрагідроізохінол ін	0±0	16,33±1,53	0±0
296.	AM-296	2-CH ₃ O- феніл	4-F-феніл піперазин	25,33±2,08	22,33±1,53	0±0
297.	AM-297	2-CH ₃ O- феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	22,33±2,08	18,67±0,58	0±0
298.	AM-298	4-CH ₃ O- феніл	тетрагідроізохінол ін	24±1	22,67±0,58	0±0
299.	AM-299	4-Br-2,6-F-феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	29,67±0,58	29,33±1,53	15±1
300.	AM-300	4-Br-2,6-F-феніл	тетрагідроізохінол ін	29±1	28,67±1,53	14±1
301.	AM-301	2,4-Cl- феніл	тетрагідроізохінол ін	29±1	27±1,73	13,67±1,53
302.	AM-302	2,4-Cl- феніл	1-феніл етиламін	31,67±2,08	29,33±1,53	16±1
303.	AM-303	2,4-Cl- феніл	феніл піперазин	30,33±1,53	28,33±1,53	15±2
304.	AM-304	3-CH ₃ O-феніл	2-піридин піперазин	13,33±1,53	16,67±1,53	0±0
305.	AM-305	3-CH ₃ O-феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	7±6,08	12±1,73	0±0
306.	AM-306	3-CH ₃ O-феніл	тетрагідроізохінол ін	20±2	19,33±1,53	0±0
307.	AM-307	3-CH ₃ O-феніл	4-F-феніл піперазин	28,33±0,58	26,67±1,53	11,67±0,58
308.	AM-308	3-CH ₃ O-феніл	2-F-феніл піперазин	30,33±1,53	28,67±1,53	0±0
309.	AM-309	3-CH ₃ O-феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	33±1	31,33±1,53	0±0

310.	AM-310	3-CH ₃ -феніл	2-піридин піперазин	23,67±1,15	22,67±1,53	0±0
311.	AM-311	3-CH ₃ -феніл	тетрагідроізохінол ін	25±0	23,33±0,58	0±0
312.	AM-312	3-CH ₃ -феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	33±1	29,67±1,53	0±0
313.	AM-313	3-CH ₃ -феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	0±0	0±0	0±0
314.	AM-314	3-CH ₃ -феніл	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	23,33±1,53	19±1	19,67±6,35
315.	AM-315	4-CL-бензил	N-етил, N- циклогексил	0±0	0±0	0±0
316.	AM-316	4-CL-бензил	1-феніл етиламін	20,67±2,08	16,67±1,53	24±2,65
317.	AM-317	4-CL-бензил	N-1.1.3.3.-тетра метил бутіл	20±1	19,33±1,53	20,67±2,08
318.	AM-318	4-CL-бензил	феніл піперазин	37,67±0,58	35,67±1,53	28±1
319.	AM-319	4-CL-бензил	2-піридин піперазин	34±1	31,33±1,53	19,67±2,08
320.	AM-320	4-CL-бензил	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	25±1	30,67±2,08	0±0
321.	AM-321	4-CL-бензил	4-F-феніл піперазин	37,67±0,58	36±1	26,67±1,53
322.	AM-322	4-CL-бензил	тетрагідроізохінол ін	37,33±1,15	41,33±3,21	23±2,65
323.	AM-323	4-CL-бензил	4-CH ₃ O- феніл піперазин	36,33±2,08	35±2	26,67±0,58
324.	AM-324	бензодіоксан	тетрагідроізохінол ін	25,67±1,15	24,67±1,53	0±0
325.	AM-325	бензодіоксан	2.6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0
326.	AM-326	бензодіоксан	1-феніл етиламін	0±0	0±0	13,33±1,53
327.	AM-327	бензодіоксан	4-F-феніл піперазин	37,67±0,58	35,67±0,58	25±2
328.	AM-328	бензодіоксан	феніл піперазин	36,33±0,58	36±1	18,33±1,53
329.	AM-329	бензодіоксан	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	16,67±1,15	15,67±0,58	11,33±1,53
330.	AM-330	бензодіоксан	4-CH ₃ O-феніл піперазин	34,33±1,15	33,33±1,53	20,33±2,31
331.	AM-331	3,4- метилділксифеніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	32,33±1,53	31±1	18,33±1,53
332.	AM-332	2-ізопропіл-5- метил феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	23±2,65	23,67±2,52	16,67±0,58
333.	AM-333	бензил	4-CH ₃ O-феніл піперазин	7,67±6,66	11,67±0,58	15,67±1,53
334.	AM-334	4-трет бутіл феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	26,67±1,53	26,33±1,15	15,33±0,58
335.	AM-335	4-ізопропіл феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	34,33±1,15	23,67±3,21	21±3,61

336.	AM-336	4-ізопропіл,5 метил феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	37,33±0,58	36±1	25,33±0,58
337.	AM-337	4-F-феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	36,67±0,58	35,67±2,08	26±1
338.	AM-338	ментил	4-CH ₃ O-феніл піперазин	34,33±0,58	32±1	20±1,73
339.	AM-339	4-трет бутил циклогексил	4-CH ₃ O-феніл піперазин	35,33±1,15	35,33±1,15	25,67±0,58
340.	AM-340	4-CH ₃ O-феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	28±1	27,33±2,08	19,33±0,58
341.	AM-341	феніл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	25,33±0,58	24,33±1,53	19,33±1,15
342.	AM-342	феніл	тетрагідроізохінол ін	0±0	0±0	18,67±1,15
343.	AM-343	феніл	феніл піперазин	3,33±5,77	10,67±0,58	18,67±1,53
344.	AM-344	феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	7±6,08	11,67±1,15	18,67±1,53
345.	AM-345	4-Cl-феніл	феніл піперазин	31,67±1,53	30,33±1,53	21,67±3,06
346.	AM-346	4-Cl-феніл	4-F-феніл піперазин	26±1	23,33±0,58	26,33±1,53
347.	AM-347	4-Cl-феніл	3,4-метилендіоксі бензил піперазин	25±1	24,33±1,15	19±1
348.	AM-348	4-Cl-феніл	тетрагідроізохінол ін	35±1	35,67±1,53	27,67±1,53
349.	AM-349	4-Cl-феніл	2,6-диметил піперидин	20±1	22±2,65	0±0
350.	AM-350	4-Cl-феніл	4-бензил піперидин	30±1	29,33±0,58	20,67±2,08
351.	AM-351	4-Cl-феніл	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	27,67±1,53	28,33±1,15	18,67±1,53
352.	AM-352	4-Cl-феніл	N-етил,N- циклогексил	15±1	14,67±1,15	0±0
353.	AM-353	4-Cl-феніл	2-F-феніл піперазин	34±1	31±1	23±2
354.	AM-354	3,4-метилен діоксі бензил	феніл піперазин	20±1	20,67±0,58	15±1
355.	AM-355	3,4-метилен діоксі бензил	3,4-метилендіоксі бензил піперазин	0±0	0±0	0±0
356.	AM-356	3,4-метилен діоксі бензил	4-F-феніл піперазин	31,67±1,53	30±1	18,67±1,53
357.	AM-357	3,4-метилен діоксі бензил	N-етил,N- циклогексил	0±0	0±0	0±0
358.	AM-358	3,4-метилен діоксі бензил	тетрагідроізохінол ін	0±0	0±0	13±1
359.	AM-359	3,4-метилен діоксі бензил	2-CH ₃ O- фенілпіперазин	38,67±0,58	36,67±1,53	22±2,65
360.	AM-360	3,4-метилен діоксі бензил	N-2-CH ₃ -5-Cl- феніл піперазин	34±1	29,33±0,58	29,67±1,53
361.	AM-361	3,4-метилен діоксі бензил	2,6-диметил піперидин	0±0	0±0	0±0

362.	AM-362	4-ізопропіл,5-метил феніл	4-F-феніл піперазин	24,67±1,53	25,33±1,53	20±1
363.	AM-363	4-ізопропіл,5-метил феніл	1-феніл етиламін	30,33±0,58	28,67±1,15	25,67±2,52
364.	AM-364	4-ізопропіл,5-метил феніл	2-CH ₃ O-фенілпіперазин	35±1	36±1,73	23,33±3,06
365.	AM-365	4-ізопропіл,5-метил феніл	тетрагідроізохінолін	30±1	30,33±0,58	21,67±2,08
366.	AM-366	4-ізопропіл,5-метил феніл	2-F-феніл піперазин	22,67±1,53	25,67±0,58	0±0
367.	AM-367	бензил	2-піридин піперазин	15,67±1,53	15,33±1,53	0±0
368.	AM-368	бензил	2-F-феніл піперазин	24,67±1,53	22,33±0,58	0±0
369.	AM-369	бензил	4-F-феніл піперазин	30±1	30,67±0,58	0±0
370.	AM-370	бензил	2-CH ₃ O-фенілпіперазин	0±0	0±0	0±0
371.	AM-371	2-ізопропіл-5-метил феніл	тетрагідроізохінолін	27±1	25±0	21,33±1,53
372.	AM-372	2-ізопропіл-5-метил феніл	2-CH ₃ O-фенілпіперазин	24±1	22±1	15±1
373.	AM-373	2-ізопропіл-5-метил феніл	2-F-феніл піперазин	18±1	15,33±1,15	12,33±0,58
374.	AM-374	2-ізопропіл-5-метил феніл	1-феніл етиламін	29,67±1,53	28,67±0,58	20±6,56
375.	AM-375	2-ізопропіл-5-метил феніл	4-F-феніл піперазин	0±0	0±0	0±0
376.	AM-376	2,2-диметил бутін	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	32±1	31±1	13,33±1,53
377.	AM-377	2,2-диметил бутін	4-F-феніл піперазин	26±1	23,33±0,58	0±0
378.	AM-378	2,2-диметил бутін	2-F-феніл піперазин	16,33±1,53	15,33±0,58	0±0
379.	AM-379	2,2-диметил бутін	4-CH ₃ O-феніл піперазин	33±1	30±1	0±0
380.	AM-380	2,2-диметил бутін	2-CH ₃ O-фенілпіперазин	0±0	0±0	0±0
381.	AM-381	2,2-диметил бутін	тетрагідроізохінолін	0±0	0±0	0±0
382.	AM-382	3-метил-1-пентін	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	34±1	33±1	18±1
383.	AM-383	3-метил-1-пентін	4-F-феніл-піперазин	20±0	19,67±1,15	13±1
384.	AM-384	3-метил-1-пентін	5-Cl-феніл піперазин	28,67±1,15	29,33±1,53	16,67±0,58
385.	AM-385	3-метил-1-пентін	тетрагідроізохінолін	0±0	0±0	0±0
386.	AM-386	3-метил-1-пентін	феніл піперазин	0±0	0±0	0±0
387.	AM-387	3-метил-1-пентін	2-CH ₃ O-феніл-піперазин	0±0	0±0	0±0
388.	AM-388	3-метил-1-пентін	4-CH ₃ O-феніл-піперазин	0±0	0±0	10,67±0,58

389.	AM-389	3-метил-1-пентін	2-F-феніл піперазин	0±0	0±0	13±1,73
390.	AM-390	3-метил-1-пентін	1-дифеніл метил піперазин	0±0	0±0	0±0
391.	AM-391	Трет-аміл	тетрагідроізохінол ін	10±8,89	0±0	20,67±1,53
392.	AM-392	Трет-аміл	4-F-феніл піперазин	44±1	39±1	24±3,61
393.	AM-393	Трет-аміл	феніл піперазин	0±0	0±0	23,33±1,53
394.	AM-394	Трет-аміл	4-CH ₃ O-феніл піперазин	32,33±1,15	31±1	19±1
395.	AM-395	Трет-аміл	2-CH ₃ O-феніл піперазин	19,67±2,52	22,33±0,58	8,33±7,23
396.	AM-396	Трет-аміл	1-дифеніл метил піперазин	20±2,65	21,33±1,53	12,33±0,58
397.	AM-397	Трет-аміл	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	25,33±1,15	23±3	21,67±3,06
398.	AM-398	Трет-аміл	2-F-феніл піперазин	0±0	11,67±1,15	0±0
399.	AM-399	Трет-аміл	2.2.6.6-тетраметил піперидин	4,33±7,51	3,67±6,35	0±0
400.	AM-400	циклогексил	4-F-феніл піперазин	31,67±0,58	30,67±0,58	21,67±2,08
401.	AM-401	циклогексил	тетрагідроізохінол ін	19±1	18,33±1,53	18,67±0,58
402.	AM-402	циклогексил	N-5-CF ₃ -феніл піперазин	20,67±1,15	25,33±1,53	19±1
403.	AM-403	циклогексил	4-CH ₃ O-феніл піперазин	0±0	0±0	20,67±2,08
404.	AM-404	циклогексил	2 CH ₃ O-феніл піперазин	0±0	13±1,73	0±0
405.	AM-405	циклогексил	2-F-феніл піперазин	4,33±7,51	16±2,65	0±0
406.	AM-406	циклогексил	5-Cl-феніл піперазин	28,33±1,53	29±1	14,67±0,58
407.	AM-407	циклогексил	феніл піперазин	4,33±7,51	0±0	0±0
408.	AM-408	циклогексил	N-2-CH ₃ -5-Cl- феніл піперазин	35±1	34,67±1,53	26,67±1,53
409.	AM-409	циклогексил	4-F феніл піперазин	33,33±0,58	31±1	20±1
410.	AM-410	циклопентил	1-дифеніл метил піперазин	15±5	19,67±1,15	0±0
411.	AM-411	циклопентил	5-Cl-феніл піперазин	26,67±0,58	26,33±0,58	23,67±3,06
412.	AM-412	циклопентил	N-2-CH ₃ -5-Cl- феніл піперазин	9,33±8,14	0±0	21±3,61
413.	AM-413	циклопентил	феніл піперазин	26,33±0,58	24,33±0,58	0±0
414.	AM-414	циклопентил	тетрагідроізохінол ін	0±0	0±0	0±0
415.	AM-415	циклопентил	4-CH ₃ O-феніл піперазин	22,67±2,52	22,33±1,15	13±1

416.	AM-416	циклопентил	2-СН ₃ O-феніл піперазин	4±6,93	0±0	0±0
417.	AM-417	алліл	1-дифеніл метил піперазин	0±0	0±0	0±0
418.	AM-418	пропаргіл	1-дифеніл метил піперазин	0±0	0±0	0±0

Додаток В. Акти впровадження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-
педагогічної та навчальної
роботи
професор Власенко О.М.
2019 р.



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методика моноксенічного культивування вільноживучих аміб, виділених з об'єктів зовнішнього середовища, на культурі бактерій *Cellulosimicrobium sp.*

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

НМУ імені О.О. Богомольця, кафедра мікробіології, вірусології та імунології.
Адреса: м. Київ, проспект Перемоги, 34.

Винахідники: Широбоков В.П., Понятовський В.А., Романчишина А.П.

3. Джерела інформації:

Широбоков В.П., Понятовський В.А. та ін. (2017). Вільноіснуючі амєби, як представники еукаріото-прокаріотичного консорціуму бентонітових глин. *Мікробіологічний журнал*. Т. 79, №3, 98-106.

4. Де і коли було впроваджено: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, науково-педагогічний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

5. Строки впровадження: з 1.09.2018 р. по 26.06.2019 р.

6. Кількість студентів, що прослухали курс: 700.

7. Результат використання: результати досліджень впроваджено у навчальний процес під час викладання розділу "Протозоологія".

8. Ефективність впровадження: - соціальний ефект: покращення підготовки студентів з актуальних питань сучасної протозоології.

9. Відмітки та пропозиції – немає.

«4» листопада 2019 року

Завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології
НМУ імені О.О. Богомольця
академік НАН та НАМН України
професор

Широбоков В.П.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України, професор



Гумінський Ю.Й.
11 2019 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Методика монохенічного культивування вільноживучих аміб, виділених з об'єктів зовнішнього середовища, на культурі бактерій *Cellulosimicrobium sp.*

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

НМУ імені О.О. Богомольця, кафедра мікробіології, вірусології та імунології.
Адреса: м. Київ, проспект Перемоги, 34.

Винахідники: Широбоков В.П., Понятовський В.А., Романчишина А.П.

3. Джерела інформації:

Широбоков В.П., Понятовський В.А. та ін. (2017). Вільноіснуючі аміби, як представники еукаріото-прокаріотичного консорціуму бентонітових глин. *Мікробіологічний журнал*. Т. 79, №3, 98-106.

4. Де і коли було впроваджено: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, науково-педагогічний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології (протокол № 14 від 26.06.2019 р.).

5. Строки впровадження: з 1.09.2018 р. по 26.06.2019 р.

6. Кількість студентів, що прослухали курс: 300.

7. Результат використання: результати досліджень впроваджено у навчальний процес під час викладання розділу "Протозоологія".

8. Ефективність впровадження: – соціальний: покращення підготовки студентів з актуальних питань сучасної протозоології.

9. Відмітки та пропозиції – немає.

Відповідальний за впровадження: к.мед.н., доцент

І.М. Вовк

Голова комісії
завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології
Вінницького національного
медичного університету
ім. М. І. Пирогова МОЗ України,
д.мед.н., професор

В.П. Ковальчук

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково педагогічної
роботи, доктор медичних наук,
професор, полковник медичної служби
Власенко О.М.
“ ” 2025 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Метод визначення протистоцидної активності, заснований на поєднанні лунко-дифузійного методу та феномену бляшкоутворення вільноживучих амєб роду *Acanthamoeba*.

2. Ким запропоновано, адреса виконавця:

НМУ імені О.О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології та паразитології з основами імунології.

Винахідники: Широбоков В.П., Понятовський В.А., Романчишина А.П.

3. Джерела інформації:

1. Shyrobokov, V., Poniatskyi, V., Poniatska, V., Romanchyshyna, A., & Salamatin, R. (2024). Determination of the anti-protozoal activity of medicinal agents using the phenomenon of plaque formation by *Acanthamoeba* spp. *Annals of parasitology*, 70(1), 15-22. <https://doi.org/10.17420/ap7001.522>

4. Де і коли було впроваджено: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, науково-педагогічний процес кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології,

5. Строки впровадження: з 1.09.2024 р. по 30.06.2025 р.

6. Кількість студентів, що прослухали курс: 1000

7. Форма впровадження: результати досліджень впроваджено у навчальний процес під час викладання розділу “Протистологія”.

8. Ефективність впровадження - соціально – економічний ефект: покращення підготовки студентів з актуальних питань сучасної паразитології.

«25» листопада 2025 року

Завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології,
академік НАН та НАМН України,
д.мед.н., професор



Широбоков В.П.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи та післядипломної освіти Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, професор
Олександр НАЗАРЧУК
24 10 2025 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження:

Метод визначення протистотичної активності, заснований на посднанні лунко-дифузійного методу та феномену бляшкоутворення вільноживучих аміб роду *Acanthamoeba*.

2. Установа-розробник:

НМУ імені О.О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології та паразитології з основами імунології.

Винахідники: Широбоков В.П., Понятовський В.А., Романчишина А.П.

3. Джерела інформації:

1. Shyrobokov, V., Poniatovskyi, V., Poniatovska, V., Romanchyshyna, A., & Salamat, R. (2024). Determination of the anti-protozoal activity of medicinal agents using the phenomenon of plaque formation by *Acanthamoeba spp.* Annals of parasitology, 70(1), 15-22. <https://doi.org/10.17420/ap7001.522>

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Заклад вищої освіти Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, кафедра мікробіології (протокол засідання №5 від 24 жовтня 2025 р.).

5. Строки впровадження: з 1.09.2024 р. по 30.06.2025 р.

6. Кількість студентів, що прослухали курс: 1000

7. Форма впровадження: результати досліджень впроваджено у навчальний процес під час вивчення біологічних властивостей збудників протозойних інфекцій.

8. Ефективність впровадження - соціально – економічний ефект: покращення підготовки студентів з актуальних питань сучасної паразитології.

Відповідальний за впровадження:
к.мед.н., доцент ЗВО

Надія ФОМІНА

Завідувач кафедри мікробіології
д.мед.н., професор

Валентин КОВАЛЬЧУК