

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2022

Valéria Budošová

Univerzita Palackého v Olomouci
Prírodovedecká fakulta
Katedra bunečnej biológie a genetiky



**Predklinické testovanie vybraných
rádioaktívne značených sideroforov**

Bakalárska práca

Valéria Budošová

Študijní program: Biológia

Študijní obor: Molekulárna a bunečná biológia

Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2022

Vedúci práce: PharmDr. Miloš Petřík, PhD.

Údaje na CD:

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora: Valéria Budošová

Názov práce: Predklinické testovanie vybraných rádioaktívne značených siderofórov

Typ práce: bakalárska

Pracovisko: Ústav molekulárnej a translačnej medicíny Lekárskej fakulty

Univerzity Palackého v Olomouci

Vedúci práce: PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Abstrakt:

Použitím zobrazovacích metód nukleárnej medicíny môže byť vykonaná diagnostika cielených orgánov alebo tkanív rádioaktívne značenými látkami bez invazívnych zásahov v reálnom čase. Siderofóry sú nízkomolekulárne chelátory železa produkované baktériami, hubami a rastlinami. Predchádzajúce štúdie preukázali vysokú stabilitu väzby medzi niektorými siderofórmi a rádioaktívnym gáliom-68 pre fyzikálne a chemické podobnosti v prípade Fe^{+3} a Ga^{+3} . Ďalej sa ukázalo, že rádioaktívne značené siderofóry by mohli byť perspektívnymi rádiofarmakmi pri detekcii bakteriálnych a hubových infekcií. Predmetom štúdia tejto bakalárskej práce boli dva siderofóry, aerobaktín a enterobaktín. Experimentálne sa vyhodnotili základné *in vitro* a *in vivo* vlastnosti rádioaktívne značeného aerobaktínu a enterobaktínu a následne sa vyhodnotila ich potenciálna využiteľnosť pre diagnostiku mikrobiálnych infekcií.

Kľúčové slova: siderofóry, aerobaktín, enterobaktín, gálium-68, zobrazovanie, pozitronová emisná tomografia

Počet strán: 73

Jazyk: slovenský

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Valéria Budošová

Title: Preclinical evaluation of selected radiolabelled siderophores

Type of thesis: bachelor

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine

Supervisor: PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract:

Targeted diagnostics of specific organs or organ tissues can be performed using nuclear medicine imaging methods with radiolabelled molecules without invasive intervention in real time. Siderophores are low molecular iron chelators produced by bacteria, fungi, and plants. Previous studies have demonstrated high binding stability of siderophores radiolabelled with gallium-68 because of the physicochemical similarities of Fe^{+3} and Ga^{+3} . Furthermore, it has been shown that radiolabelled siderophores could be promising radiopharmaceuticals for the detection of bacterial and fungal infection. Two selected siderophores, aerobactin and enterobactin, were studied within this bachelor thesis. The basic *in vitro* and *in vivo* properties of radiolabelled aerobactin and enterobactin were evaluated and their potential utility for the diagnosis of microbial infections was subsequently assessed.

Keywords: siderophores, aerobactin, enterobactin, gallium-68, imaging, positron emission tomography

Number of pages: 73

Language: Slovak

Čestné prehlásenie

Svojím podpisom čestne prehlasujem, že prácu na tému Predklinické testovanie vybraných rádioaktívne značených siderofórov som vypracovala samostatne, na základe literatúry a prameňov uvedených v práci pod odborným vedením PharmDr. Miloše Petříka, Ph.D.

V Olomouci dňa

.....

Valéria Budošová

Ďakujem PharmDr. Milošovi Petříkovi, Ph.D. za odbornú pomoc, trpezlivosť a povzbudzujúce vedenie pri plnení úloh spojených s touto prácou.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Ciele práce.....	3
3	Literárny prehľad.....	4
3.1.	Siderofóry.....	4
3.1.1.	Syntéza siderofórov.....	5
3.1.2.	Prírodne a umelo pripravené konjugáty siderofórov.....	9
3.1.3.	Aerobaktín.....	15
3.1.4.	Enterobaktín.....	17
3.2.	Železo.....	20
3.2.1.	Chemicko-fyzikálna charakteristika železa.....	20
3.2.2.	Úloha železa v organizme.....	20
3.2.2.1.	Mikrobiálne stratégie pre získavanie železa.....	21
3.3.	Zobrazovacie metódy nukleárnej medicíny.....	26
3.3.1.	Pozitrónová emisná tomografia.....	26
3.3.2.	Jednofotónová emisná výpočtová tomografia	28
4	Materiál a metódy.....	30
4.1.	Biologický materiál.....	30
4.1.1.	Experimenty na zvieratách.....	30
4.2.	Použité chemikálie, súpravy a roztoky.....	30
4.3.	Zoznam použitých prístrojov.....	31
4.4.	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	32
4.4.1.	Optimalizácia podmienok rádioaktívneho značenia vybraných ⁶⁸Ga-siderofórov.....	32
4.4.2.	Testy stability.....	32
4.4.3.	Rozdeľovací koeficient.....	33
4.4.4.	Väzba na plazmatické proteíny.....	33
4.4.5.	PET/CT zobrazovanie.....	33

4.4.6. <i>Ex vivo</i> biodistribúcia.....	34
5 Výsledky.....	35
5.1. ⁶⁸ Ga-Aerobaktín	35
5.1.1. Rádioaktívne značenie.....	35
5.1.2. Testy stability.....	36
5.1.3. Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny.....	36
5.1.4. PET/CT zobrazovanie.....	36
5.1.5. <i>Ex vivo</i> biodistribúcia u laboratórnych myší.....	38
5.2. ⁶⁸ Ga-Enterobaktín.....	39
5.2.1. Rádioaktívne značenie.....	39
5.2.2. Test stability.....	40
5.2.3. Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny.....	41
5.2.4. PET/CT zobrazovanie.....	41
5.2.5. <i>Ex vivo</i> biodistribúcia u myší.....	43
6 Diskusia.....	45
7 Záver.....	50
8 Literatúra.....	51

Zoznam použitých symbolov a skratiek

ABC transportér = ATP-viažúce kazetové transportéry

ACN = acetonitril

AD = AUG doména

ADP = adenosíndifosfát

Aero = aerobaktín

ahLys = N⁶-acetyl-N⁶-hydroxylyzín

AMP = adenosínmonofosfát

Atb-siderofór = komplex antibiotika naviazaného na siderofór

ATP = adenosíntrifosfát

ATPáza = adenosíntrifosfatáza

Cir proteín = transkripčný korepresor aktivity

CT = výpočtová tomografia

DFOB = Desferioxamín B

DHB = 2,3-dihydroxybenzoová kyselina

DHB-Ser = 2,3-dihydroxy-N-benzoylserín

DNA = deoxyribonukleová kyselina

DTPA = diethylentriaminpentaocetová kyselina

EFC = sigma faktory mimo cytoplazmy

Ent = enterobaktín

ent ABCDEF = gény pre syntézu enterobaktínu

EntB = enterobaktínový syntázový komponent B

EntD = enterobaktínový syntázový komponent D

EntE = enterobaktínový syntázový komponent E

EntF = enterobaktínový syntázový komponent F

exbBD proteín = vonkajší membránový transportný energizér

FDA = Správa potravín a liečiv

FDG = 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glukóza

FepBCDG = transportné membránové podjednotky (B, C, D, G)

aerobaktínu

FhuA = ferrichrómový vonkajší membránový transportér/fágový receptor

FhuB = permeázový proteín hydroxamátového importného systému

FhuC = hydroximátový importný ATP-viažúci sa proteín

FhuD = hydroximátový importný proteín

Fiu proteín = katecholátový siderofórový receptor

FsC = fusarinín C

Fur = regulátor príjmu železa

GIT = gastrointestinálny trakt

HS-pant-PCP = fosfopantatenát so serínovým reťazcom na doméne neribozómovej peptidylovej syntázy

IroD = katecholátová esteráza siderofóru

IroE = železitá esteráza enterobaktínu

ITLC-SG = chromatografia na tenkej vrstve so silikagélom

iuc ABCD = gény pre syntézu aerobaktínu

IucA = siderofórový biosyntetický proteín

IucC = proteín aerobaktínovej syntázy

iutA = gén kódujúci membránový receptor

iutA = *vonkajší membránový receptor*

LT = laboratórna teplota

NRPS = neribozómová peptidová syntáza

p. i. = po injekcii

PBS = fosfátový tlmivý roztok

PCP = peptidyl prenášajúci proteín

PET = pozitronová emisná tomografia

PKS = polyketídová syntáza

PP = periplazmatický priestor

P-pant časť = časť s pripojeným fosfopantatenátom

PPTáza = fosfopanteteinyltransferáza

r. o. = retroorbitálne

RCHČ = rádiochemická čistota

RT-PCR = polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase

SARS = koronavírus 1

SPECT = jednofotónová emisná výpočtová tomografia

STK = *system Trójskeho koňa*

TBDT = TonB závislý vonkajší transportér

TE = tioesteráza

TLC = tenkovrstvová chromatografia

TonB komplex = komplex vonkajších membránových receptorov

VP = väzbový proteín

WHO = Svetová zdravotnícka organizácia

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Reprezentatívne príklady rozdielnych typov siderofórov.....	4
Obrázok 2: Iniciácia syntézy siderofórov.....	7
Obrázok 3: Terminácia syntézy siderofórov.....	9
Obrázok 4: Ilustrácia interakcie FhuA ligandov s proteínmi zapojenými vo ferrichrómovom transporte.....	10
Obrázok 5: Schéma stratégie pre príjem komplexu Anb-siderofór známa ako Trojský kôň.....	12
Obrázok 6: Schéma štruktúry E-0702.....	13
Obrázok 7: Schématické znázornenie biosyntézy aerobaktínu.....	16
Obrázok 8: Chemická štruktúra aerobaktínu	16
Obrázok 9: Genetika a enzymológia biosyntézy <i>E. coli</i>	18
Obrázok 10: Chemická štruktúra enterobaktínu.....	18
Obrázok 11: Schéma syntézy Ent prírodnou a umelou cestou.....	19
Obrázok 12: Schéma príjmu a využitia hemoglobínu a hemu.....	23
Obrázok 13: Získavanie železa z laktoferínu a transferínu.....	24
Obrázok 14: Schéma príjmu trojmocného železa cez siderofóry.....	25
Obrázok 15: Schéma príjmu dvojmocného iónu železa.....	26
Obrázok 16: Záznamy dynamického PET skenu u Aero.....	37
Obrázok 17: Záznam zo statického PET/CT skenu u Aero.....	38
Obrázok 18: Záznamy dynamického PET skenu u Ent	42
Obrázok 19: Záznam zo statického PET/CT skenu u Ent.....	43

Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1 Optimalizácia podmienok pre značenie aerobaktínu galliom-68 za laboratórnej teploty (LT=25°C).....	35
Tabuľka č.2: Optimalizácia podmienok pre značenie aerobaktínu galliom-68 za laboratórnej teploty (LT=25°C) pri rôznom pH a čase inkubácie.....	35
Tabuľka č.3: <i>In vitro</i> stabilita ⁶⁸ Ga-Aerobaktínu v rôznom prostredí pri 37°C.....	36
Tabuľka č.4: Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny u ⁶⁸ Ga-aerobaktínu.....	36
Tabuľka č.5: Optimalizácia podmienok pre značenie enterobaktínu galliom-68 za laboratórnej teploty (LT= 25°C).....	40
Tabuľka č.6: Optimalizácia podmienok pre značenie enterobaktínu galliom-68 za laboratórnej teploty (LT= 25°C) pri rôznom pH a čase inkubácie.....	40
Tabuľka č.7: <i>In vitro</i> stabilita ⁶⁸ Ga-Enterobaktínu v rôznom prostredí pri 37°C.....	41
Tabuľka č.8: Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny u ⁶⁸ Ga-enterobaktínu	41

1 Úvod

Infekčné ochorenie v populácií predstavuje vážny ekonomický, zdravotnícky aj sociologický problém. Po nákuze prepukne po uplynutí určitej inkubačnej doby infekčné ochorenie s rozdielnou intenzitou nákazy. Intenzita odpovedi spravidla závisí na odpovedi imunitného systému a na sile a infekčnosti patogénu. Infekcie môžu byť prenášané znečisteným prostredím, napr. voda, vzduch alebo pôda, ale aj cez vektor/prenášač (napr. hmyz, baktéria, atď.). Za posledných sedemdesiat rokov sa zaznamenalo veľké množstvo nových infekčných ochorení, ktoré sú odpoveďou na prirodzenú evolúciu patogénov, ako aj nadmerné používanie širokospektrálnych antibiotík. Zaznamenal sa príchod nových ochorení ako napr. HIV-1, SARS alebo aj vzostupný trend návratu infekcií, ktoré sa v minulosti považovali za kompletne alebo čiastočne eradikované ochorenia (napr. borelióza). Aj práve tieto prípady poukazujú na potrebu nových diagnostických metód, ktorých hlavnou úlohou má byť včasná a presná diagnostika s minimálnym invazívnym zásahom do života pacienta.

Metódy na sledovanie infekcie sú veľmi variabilné, prispôsobujú sa potrebám pacienta i lekára, od imunoeseje (RT-PCR, antigénové testy, atď.) až po zobrazovacie techniky nukleárnej medicíny. Zobrazovacie metódy nukleárnej medicíny si vyžadujú použitie rádionarká na vyhodnotenie a diagnózu choroby. Špeciálne navrhnuté kamery dovoľujú lekárom sledovať pohyb rádionarká v tele v reálnom čase. Rádionarká sú zvyčajne aplikované v nepatrných množstvách a nemajú žiadne farmakologické účinky. Jedná sa o liečivé prípravky obsahujúce chemické alebo biologicky aktívne látky, ktorých účinnou zložkou je rádionuklid, ktorý je zdrojom ionizujúceho žiarenia.

Siderofóry sú sekundárne metabolity mikroorganizmov s vysokou afinitou k železu. V prípade nedostatku železa, začne väčšina mikroorganizmov produkovať a uvoľňovať siderofóry, ktoré sa v prostredí nasýtia železom a mikroorganizmy tieto komplexy následne prijímajú špecifickými receptormi späť. Železo je pre mikroorganizmy esenciálnym prvkom a do značnej miery môže ovplyvňovať priebeh infekcie a jej výsledok. Prírodné siderofóry využívajú rovnako aj rastliny, huby a baktérie ako signálne molekuly, a majú svoje miesto mimo iné aj v replikácii DNA, dýchacích procesoch aj deoxynukleotidovej syntéze ako katalyzátory enzymatických reakcií a práve preto našli svoje využitie aj v medicíne a poľnohospodárstve. Semi-syntetické siderofóry slúžia ako chelátory pri liečbe niektorých ľudských ochorení, slúžia aj ako špecifické nosiče antibiotík a môžu byť použité aj k detekcii mikrobiálnych infekcií pomocou zobrazovacích metód nukleárnej medicíny.

Predmetom tejto práce bolo zistiť možný potenciál dvoch vybraných siderofórov, aerobaktínu a enterobaktínu, pre použitie k detekcii mikrobiálnych infekcií. Úlohou bolo rádioaktívne ich označiť galliom-68, charakterizovať ich *in vivo* a *in vitro* správanie a vyhodnotiť ich potenciálne využitie pre zobrazovanie infekčných ochorení.

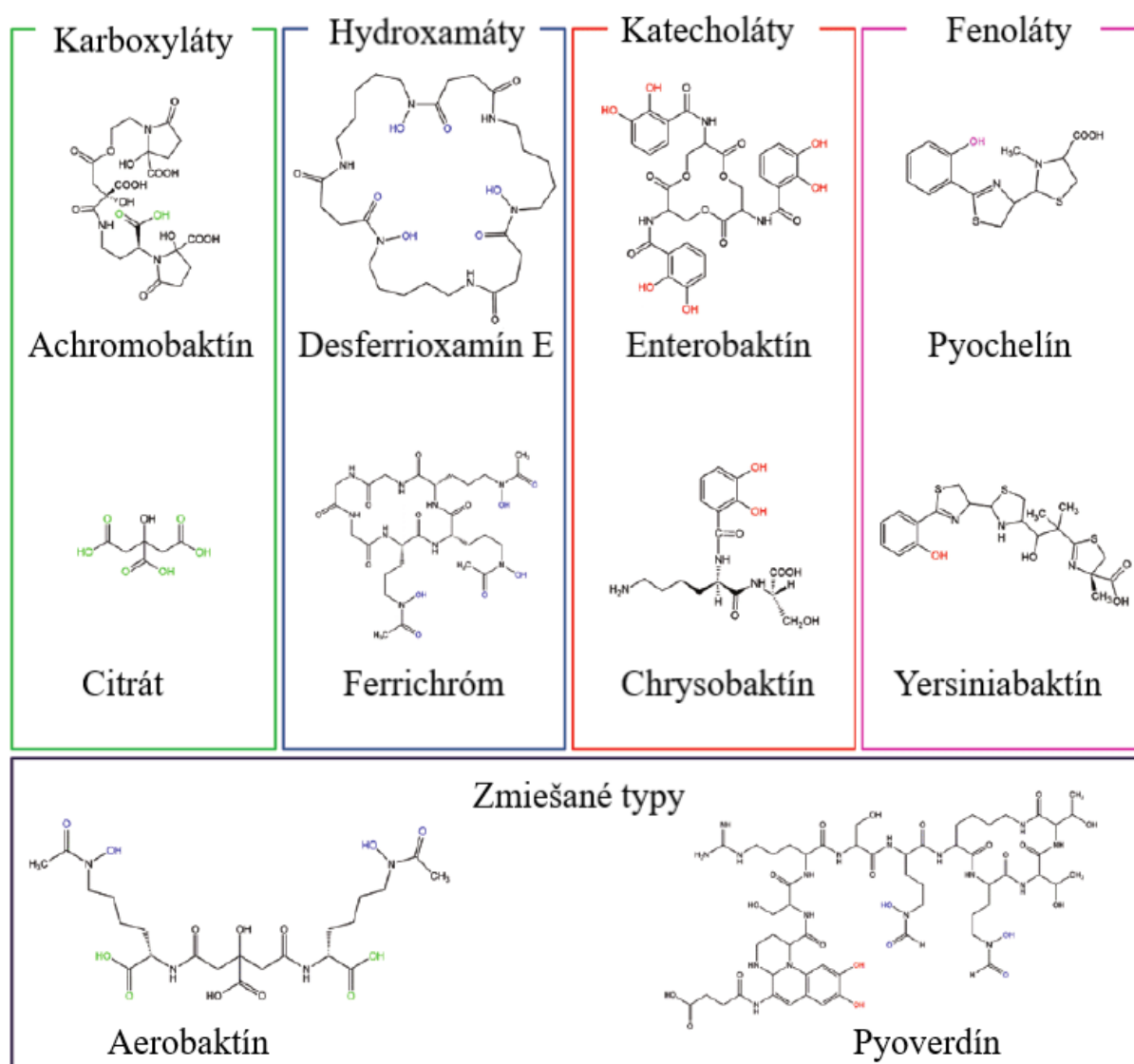
2 Ciele práce

Cieľom mojej bakalárskej práce bola príprava vybraných rádioaktívne značených siderofórov pre potenciálnu diagnostiku infekčných ochorení pomocou metód nukleárnej medicíny. Súčasťou tejto práce bola *in vitro* charakterizácia testovaných látok s následným štúdiom *in vivo* biologického správania v laboratórnych zvieratách. Posledným cieľom bolo vypracovanie literárnej rešerše na dané téma.

3 Literárny prehľad

3.1. Siderofory

Siderofóry (pôvod v gréckom jazyku, znamená nosiče železa) sú nízkomolekulárne látky, ktoré sú schopné prijímať železo zo svojho okolia (Neilands, J.B., 1995). Z chemického hľadiska ich môžeme rozdeliť do 5 skupín graficky znázornených na obrázku 1. Konkrétne sa jedná o katecholáty, hydroxamáty, karboxyláty, fenoláty a iné zmiešané štruktúry. Siderofóry sú sekundárne metabolity väčšiny mikroorganizmov pôsobiace ako chelátory rôznych kovov. Cheláciou rozumieme vytváranie koordinačnej väzby medzi atómom kovu a inou molekulou či iónom, pričom sa zväčša jedná o organické zlúčeniny (McNaught, A.D. *et* Wilkinson, A., 1997).



Obrázok 1: Reprezentatívne príklady rozdielnych typov siderofórov (Aznar, A. *et* Dellagi, A., 2015).

Siderofóry majú rozmanité použitie v poľnohospodárstve a medicíne. Využívajú sa ako potencionalne biopesticídy proti nebezpečným fytopatogénom a postupne nahrádzajú pesticídy získané organickou syntézou. Tiež sa používajú na bioremediáciu pôdy a ako biosenzory kontaminovaného prostredia (Řezanka, *et al.*, 2019). V medicíne nachádzajú siderofóry svoje uplatnenie pri príprave rôznych derivátov s antibiotikami (sideromycíny), čím sa zvyšuje sila odpovede aj na baktérie, ktoré sú voči pôsobeniu antibiotík rezistentné. Pod označením sideromycíny sa skrýva trieda antibiotík spojených kovalentnou väzbou so siderofórmami, pričom si zachovávajú antimikrobiálnu aktivitu voči odlišným bakteriálnym druhom (Möllmann, U., *et al.*, 2009; Braun, V., *et al.*, 2009). V poslednej dobe sa tiež intenzívne študuje možnosť použitia značených (napr. rádioaktívne alebo fluorescenčne) sideroforov za účelom molekulárneho zobrazovania, napr. v prípade preklinických i klinických štúdií zameraných na diagnostiku nádorových ochorení a mikrobiálnych infekcií (Koizumi, M., *et al.*, 1988; Heuveling, D.A., *et al.*, 2011; Börjesson, P.K., *et al.*, 2006; Pfister, J., *et al.*, 2020).

Baktérie a iné mikroby používajú siderofóry na cheláciu a následné získanie železa a ďalších kovov (napr. zinku) z prostredia. V literatúre boli zaznamenané mnohé prípady, kde išlo o získanie výhody proti konkurenčnému mikrobu okupujúcemu rovnaké prostredie (Lee, F. Y., *et al.*, 2001). Bola tiež zdokumentovaná medzidruhová interakcia sprostredkovaná siderofórmami (Stubbendieck, M.R., *et al.*, Straight, P.D., 2020).

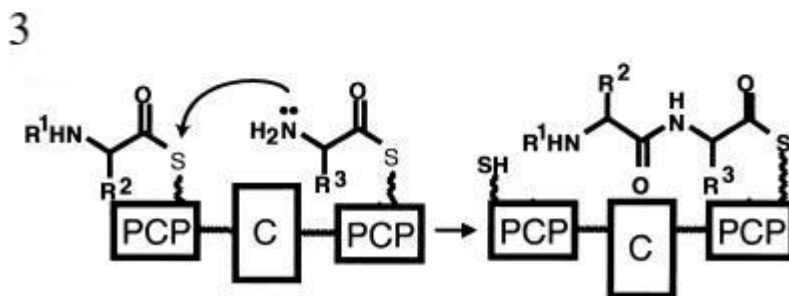
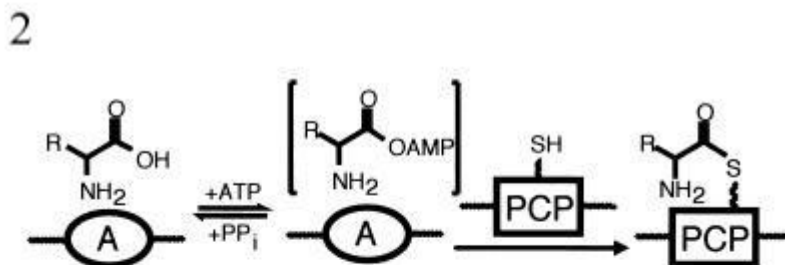
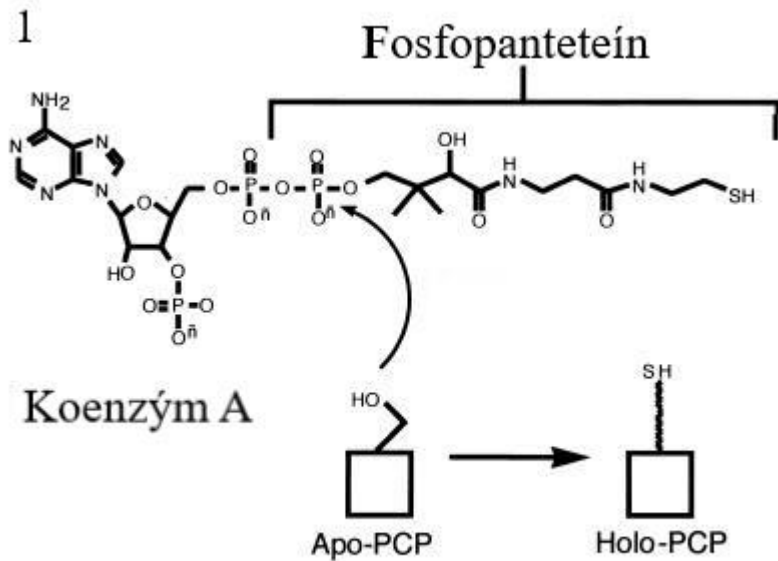
Najznámejším siderofórom používaným v poslednej dobe v klinickej praxi je desferioxamín B (DFOB). DFOB je lineárny trihydroxamátový siderofór produkovaný *Streptomyces pilosus*. V roku 1968 bol DFOB schválený Správou potravín a liečiv (FDA) pre lekárske použitie pod obchodným názvom Desferal[®] a je na zozname základných liečiv Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) (Kalinowski, D.S., *et al.*, Richardson, D.R., 2005). DFOB sa používa na liečenie hemochromatózy (Arifin, A.J., *et al.*, 2014), sideroblastickej anémie, autoimunitnej hemolytickej anémie (Petřík, M., *et al.*, 2020) a používa sa aj u pacientov, ktorí trpia β -talasémiou major a podstupujú časté transfúzie krvi (Flora, S.J.S., 2013; Gabutti, V., Piga, A., 1996; Brittenham, G.M., *et al.*, 1994; Borgna-Pignatti, C., *et al.*, 2004).

3.1.1. Syntéza siderofórov

Regulácia génov biosyntézy siderofórov zahŕňa všeobecný represor Fur, ktorý pôsobí v prítomnosti železa ako negatívny regulátor. Avšak bol zaznamenaný aj Fur-sprostredkovaný

regulačný mechanizmus, ktorý pôsobí súbežne s represorom Fur ako pozitívny regulačný mechanizmus v prípade nedostatku železa. Napriek týmto regulačným rozdielom podlieha biosyntéza rovnakej základnej enzýmovej logike, ktorá zahŕňa sériu predlžovania acylového konca komplexu enzým-substrát pri medziproduktoch na multimodulárnych proteínových mašinériách pomocou neribozomové peptidové syntázy (NRPS) (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002). NRPSs sú multimodulárne enzýmy, ktoré produkujú peptidové produkty určitej sekvencie bez RNA templátu. Namiesto toho je poradie aktivovaných monomérených aminokyselín a ich inkorporácia do reťazca riadená NRPS doménami (Kohli, R., *et al.*, 2001; Marahiel, M. A., *et al.*, 1997; Rowland, B. M., *et al.*, 1996). Podstatná časť štruktúr siderofórov je produkovaná pomocou NRPS pričom variácie sa získavajú v nasledovných krokoch napr. výberom fenolovej kyseliny ako N-čapíčky, úpravou aminokyselinových zvyškov počas reťazovej elongácie, typom terminácie a povahou zachyteného nukleotidu, ktorý je uvoľňovaný acylovým reťazcom siderofóru. Tento princíp modulárneho zostavenia je typický pre všetky známe siderofóry. Siderofóry sú pri svojej biosyntéze schopné miešať svoje domény v stavebných moduloch a dokonca bola zaznamenaná aj výmena samotných modulov (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).

Každá NRPS proteínová mašinéria je organizovaná na vykonanie štyroch typov katalytických operácií. V prvom kroku je každý peptidyl prenášajúci proteín alebo PCP doména (najmenšia NRPS doména, väčšinou sa jedná o 70-90 aminokyselín) konvertovaná z apo- na holo- formu, čím získava fosfopanteteinylové rameno (obrázok 2, časť 1). Ide o postranslačnú zmenu, ktorú musí absolvovať každý zainteresovaný membránový transportný proteín pre dosiahnutie plnej dĺžky produktu. Fosfopanteteinyltransferáza (PPTáza) katalyzuje reakciu na bočnej strane serínového reťazca, ktorý je zhodný s doménou membránového transportného proteínu. Bočný reťazec je spojený pyrofosfátovou väzbou s koenzýmom A. Nasleduje transfer fosfopantatenátu (P-pant časti) a uvoľnenie 3',5'-ADP ako rozpustného produktu (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002; Lambalot, R. H., *et al.*, 1996).

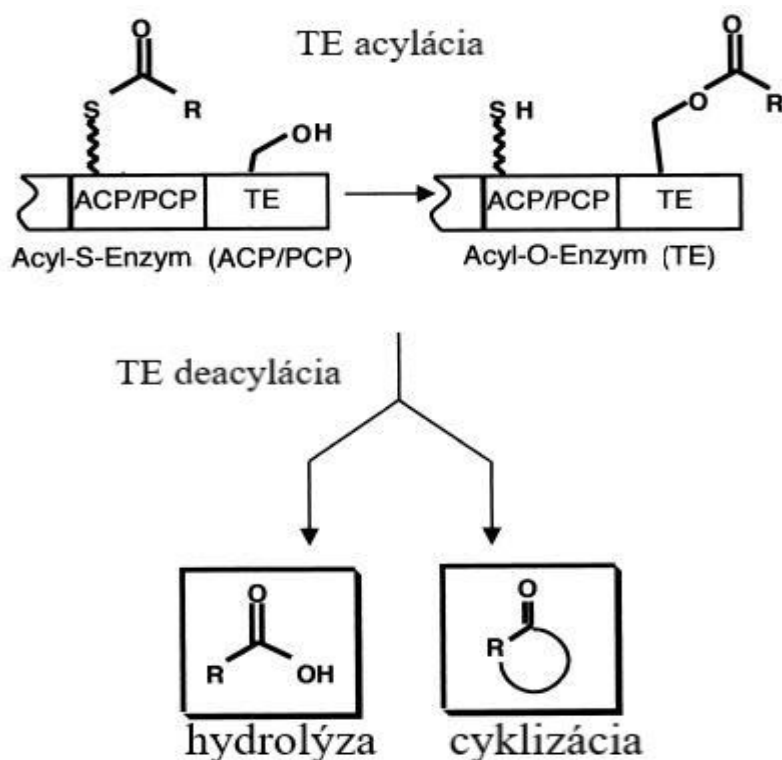


Obrázok 2: Iničiácia syntézy siderofórov. 1-PPTáza reaguje s apo-formou PCP, 2- dvojkroková reakcia A domény, 3- reakcia C domény (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).

V druhom kroku nastáva selekcia a aktivácia monomérov a ich následná inkorporácia na konkrétnu pozíciu v rastúcom reťazci. Vybrané karboxylové kyseliny a aminokyseliny sú aktivované selektívnou adenyláciou A domény, čo znamená, že aminoskupina vybraná aktívnou A doménou je konvertovaná cez kosubstrát ATP na aminoacyl-AMP (obrázok 2, časť 2). Tento termodynamicky aktivovaný monomér je následne transportovaný na príľahlú HS-pant-PCP doménu, kde kovalentne naviaže aminoacylový zvyšok tioesteru (aminoacyl-S-PCP) (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).

Tretia časť syntézy je elongácia (obrázok 2, časť 3) (Cane, D.E., *et al.*, 1998; Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002). Dĺžka reťazca je priamo úmerná uloženiu jeho častí. N-terminál PCP domény je dlhší ako C-terminál PCP domény. Katalytická doména peptidovej syntetázy je označovaná ako kondenzačná (C). Funkčný modul NRPS sa zvyčajne skladá z troch domén, C-A-PCP, pričom A doména je zodpovedná za výber a zakódovanie požadovanej aminokyseliny zatiaľ čo samotná peptidová väzba je sprostredkovaná C doménou, ktorá riadi reakciu medzi peptidyl-S-PCP donorovým kosubstrátom a akceptorovým aminoacyl-S-PCP substrátom. Translokovaný reťazec zväčšil svoju veľkosť o jednu peptidovú väzbu a stále je považovaný za termodynamicky aktivovaný acyl-S-PCP, ktorý je pripravený na ďalší elongačný cyklus riadený C doménou (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).

Štvrtá operácia zahŕňa termináciu a uvoľnenie neribozomálneho peptidu alebo siderofóru (Keating, K., *et al.*, 2001). Pretože peptidylové reťazce rastú ako elongačná kaskáda acyl-S-enzýmových intermediátov, keď dorazí reťazec so svojou plnou dĺžkou na PCP doménu je stále kovalentne ukotvený a vyžaduje chemické štiepenie reťazca. Uvoľnenie reťazca zahŕňa transfer z PCP domény na aktivovanú stranu serínového bočného reťazca v aktívnej strane tioesterázy (TE) pre získanie acyl-O-TE intermediátov (Rusnak, F. *et al.*, 1991). Obrázok 3 ukazuje ako intermediáty podliehajú dvom rozdielnym osudom: intermolekulárnej hydrolýze, ktorá uvoľňuje voľnú kyselinu alebo intramolekulárnemu záchytu OH alebo NH₂ skupinou v peptidylovom reťazci pri uvoľnení laktónu alebo laktamu (napr. enterobaktín alebo gramicidín) (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).



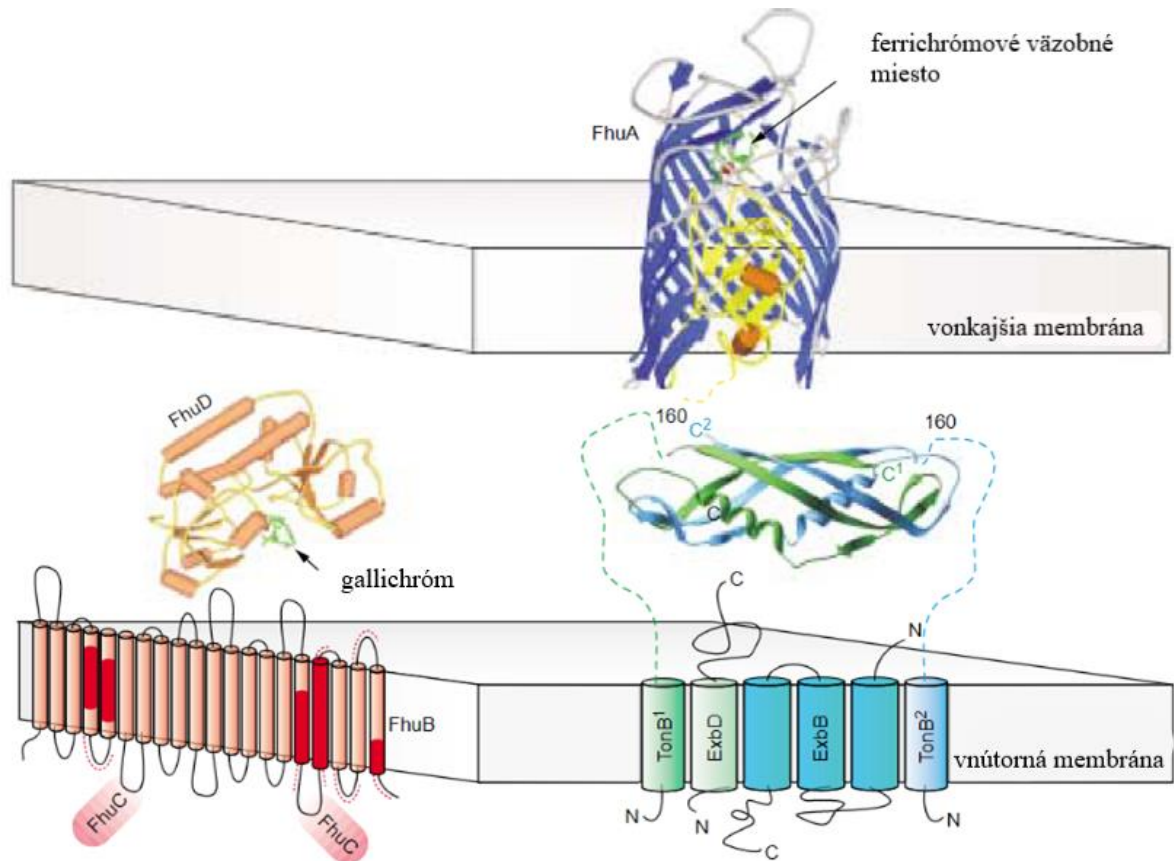
Obrázok 3: Terminácia syntézy siderofórov (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).

3.1.2. Prírodné a umelo pripravené konjugáty siderofórov

Cez evolučnú stratégiu pre prežitie v prostredí s nedostatkom železa si niektoré baktérie vytvorili prirodzené konjugáty siderofóru a antibiotík, známe pod označením sideromycíny. Jedná sa o triedu antibiotík spojených kovalentnou väzbou so siderofórnymi pričom vykazujú antimikrobiálnu aktivitu voči odlišným bakteriálnym druhom. Z chemického hľadiska ide o zlúčeniny štruktúrne podobné ich siderofórovou časťou hydroxamátovým siderofórom (Möllmann, U., 2009; Braun, V., et al., 2009).

Táto skupina konjugátov zahŕňa albomycíny, produkované *Actinomyces subtropicus* (vyskytuje sa u nich mikrobiálna aktivita voči gram-pozitívnym i negatívnym baktériám) (Gause, G.F., 1955; Reynolds, et al., 1947). Albomycíny boli používané v Sovietskom zväze už od päťdesiatych rokov 20. storočia napriek tomu, že sa ich chemická štruktúra objasnila až v osemdesiatych rokoch 20. storočia (Gause, G.F., 1955). Albomycín je po chemickej stránke nukleozidové antibiotikum obsahujúce síru konjugované se sideroforem ferrichromového typu (Zhang, J., et al., 2020).

Základným komponentom albomycínu zostávajú tri-hydroxamátové chelatačné komponenty, ktoré sa viažu s atómami železa. Albomycín je transportovaný do gram-negatívnych druhov baktérií ako napr. *Escherichia coli* cez TonB-závislé transportéry FhuA uložené na vonkajšej membráne, FhuD v periplazme, FhuB v cytoplazmatickej membráne a FhuC ATPáze, ktorá dodáva energiu potrebnú na transport cez vnútornú membránu (Braun, V., et Braun, M., 2002). Po transportovaní do cytoplazmy je albomycín naštiepený peptidázami, čím sa uvoľní antibakteriálna časť do cytoplazmy (Braun, V., 2009).

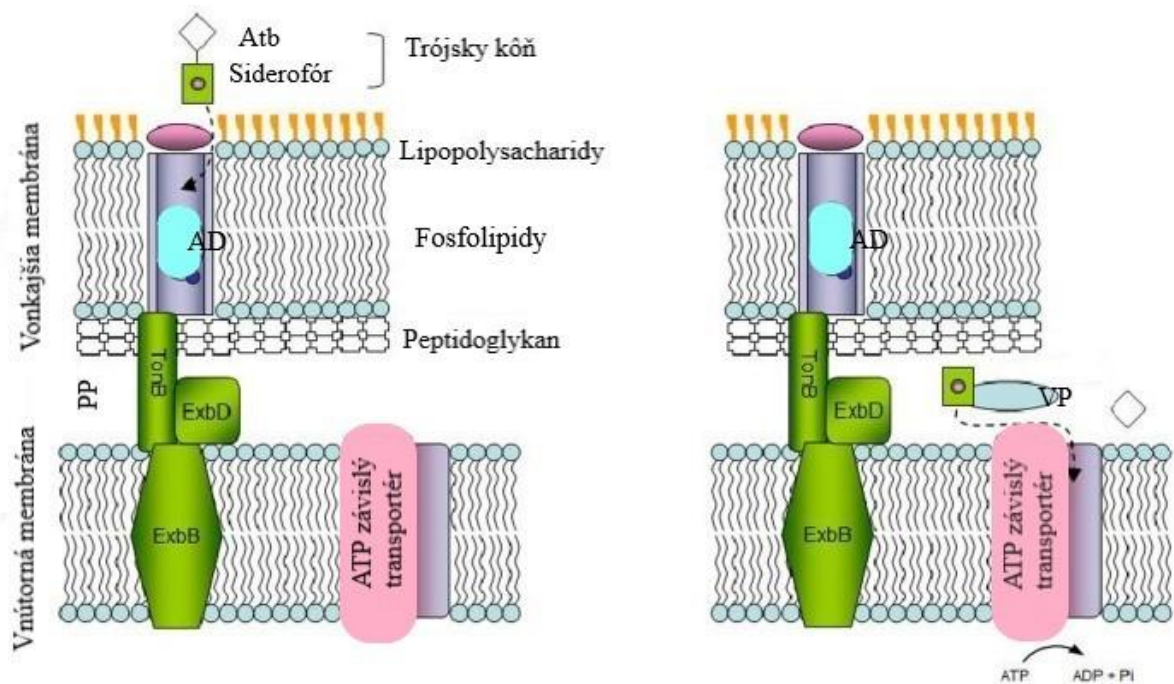


Obrázok 4: Ilustrácia interakcie FhuA ligandov s proteínmi zapojenými vo ferrichrómovom transporte (Braun, V. et Braun, M., 2002).

Na obrázku č. 4 môžeme sledovať zobrazenie FhuA v kryštalickej štruktúre bez reťazcov umiestnených vpredu pre lepšiu vizualizáciu globulínovej domény. TonB časť FhuA (zobrazená žltou farbou) je lokalizovaná na amino-terminálnom konci a viaže sa k reziduálnemu regiónu TonB (značeného 160). Kryštalická štruktúra dimerického fragmentu TonB je zobrazená ako spleť zelenej a modrej farby, ktorá doposiaľ nie je objasnená. C¹ (fragment v zelenom) obsahuje karboxylový terminálny koniec TonB monoméru, C² (fragment v modrom) indikuje karboxylový terminálny koniec ďalšieho monoméru v dimér TonB fragmente. Orientácia TonB fragmentu v periplazme nie je známa. Kryštalická štruktúra FhuD

zobrazuje povrch odkrytého gallichrómu v FhuD, ktorý pôsobí ako kontrast k ferrichrómu vo vnútri FhuA. Kryštalová štruktúra FhuA poskytuje statické vyobrazenie proteínu ale nezobrazuje vysoko dynamickú štruktúru zmien, ktoré nastanú pri vytváraní a uvoľňovaní väzieb ferrichrómu počas jeho transportu. Štrukturálna zmena môže byť predpovedaná pre FhuD po jeho naviazaní na FhuB a prenosu ferrichrómu z FhuD na FhuB. FhuC je ATPáza, ktorá dodáva energiu na transport ferrichrómu cez cytoplazmatickú membránu. Predpovedané transmembránové usporiadanie transdukujúceho proteínového komplexu TonB-ExbB-ExbD je zobrazeno pre ilustračné zámery na vyobrazenie stechiometrického pomeru proteínov 1:1. Červené miesta v FhuB korešpondujú k miestam ktoré sa spájajú s FhuD (Braun, V. *et* Braun, M., 2002).

Ďalej je možné stretnúť sa u niektorých mikroorganizmov napr. s ferrimycíny A1 a salmyciny A-D. Ferrimycíny A1 jsou produkované *Streptomyces griseoflavus* a rodom *Acremonium* (ferrimycín A1 a jeho deriváty sú *in vitro* inhibítory rastu *A. fumigatus*), a salmyciny A-D, produkované *Streptomyces violaceus* (mikrobiálna aktivita hlavne voči gram-pozitívnym baktériám z rodu *Staphylococcus* a *Streptococcus*) (Vassiliadis, G., *et al.*, 2010; Page, M.G., 2013; Tonziello, G. *et al.*, 2019). Veľa enterobaktérií vylučuje mikrocíny, ktoré sú konjugované po translácii s endogénne katecholovanými siderofórmami, ktoré zabraňujú rastu gram-negatívnym baktériám druhu *Enterobacteriaceae* (Hantke, K., *et al.*, 2003). Tieto molekuly používajú iný mechanizmus interakcie ale do cytoplazmy vnikajú rovnakým spôsobom cez systém Trójskeho koňa (STK), ktorý využíva prenos cez transportne proteíny katecholátových siderofórov vo vonkajšej i vnútornej vrstve membrán *Enterobacteriaceae* (Zhanel, G.G, 2019). STK používa na dodanie antibiotík príjmový systém železo-siderofór (obr. č. 5). Niektoré prírodné antibiotiká napodobujú substráty peptidov aby sa naviazali na siderofóry pri ich ceste do bunky (Zähner, H., *et al.*, 1977; Carvalho, C.C.R., Fernandes, P., 2014). Mikrocíny sú ribozomálne nesyntetizované peptidy, ktoré sú modifikované postranslačne cez pripojenie katecholátového siderofóru k funkčnej skupine s následnou transláciou indukovanou nízkou prítomnosťou železa v prostredí zachytenou cez Fur transkripčne regulačné proteíny (Vassiliadis, G., *et al.*, 2010).

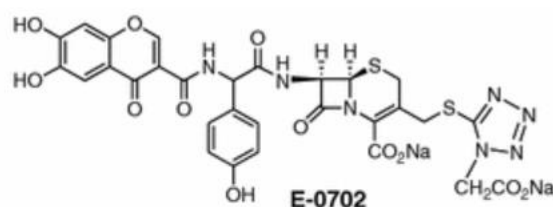


Obrázok 5: Schéma stratégie pre príjem komplexu Atb-siderofór známa ako Trojky kôň. Na obrázku sledujeme presun naviazaného antibiotika na siderofór u Gram-negatívnych baktérií cez periplazmatický priestor k TonB komplexu. V periplazme sú siderofóry sekvastrované periplazmatickými proteínmi, ktoré ich následne dodajú ATP-závislým transportérom. (PP- periplazmatický priestor, AD- AUG doména, VP- väzbový proteín) (Carvalho, C.C.R., Fernandes, P., 2014).

Stratégia Trojského koňa sa vyskytuje u baktérií v závislosti na systéme príjmu komplexu železo-siderofór pre dodanie antibiotickej zložky a mechanizmu, ktorý vykazujú určité druhy baktérií. Medzi známe Atb-siderofór komplexy radíme albomycíny, ferymicyíny a salmycíny. Siderofór s naviazanou skupinou antibiotík sa spoja s receptorom na vonkajšej strane membrány čím sa dostanú do periplazmatického priestoru interakciou s TonB komplexom. V periplazme dochádza k oddeleniu siderofóru periplazmatickým väzbovým proteínom, ktorý ho dodá ATP-závislým transportérom, ktoré zaistia vstup do bunky. Antibiotiká by inak nedokázali prejsť cez membránu (Möllmann, U., *et al.*, 2009; Carvalho, C.C.R., Fernandes, P., 2014).

Príprava syntetických alebo semi-syntetických konjugátov sideroforov sa stala predmetom záujmu už v sedemdesiatych rokoch minulého storočia (Zähner, H., *et al.*, 1977). Jeden z hlavných smerov vývoje nových liečiv proti gram-negatívnym organizmom vychádzal od prírodných sideromycínov a stratégia Trojského koňa bola použitá pri riešení špecifickej rezistencie. Konjugáty sideroforov využívajú väzbovú schopnosť komplexu železitých iónov a siderofóru pri interakcii s vonkajšou membránou s následným aktívnym transportom cez vonkajšiu aj vnútornú membránu cez periplazmatický priestor až do cytoplazmy (Tillotson, G. S., 2016).

Prvé pokusy o prípravu β -laktámových antibiotík konjugovaných so siderofórmami začali v roku 1987 cephalosporínovým konjugátom E-0702 (obrázok č. 6), s jeho typickou antimikrobiálnou aktivitou proti gram-negatívnym baktériám ako *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* (Tonziello, G., et al., 2019).



Obrázok 6: Chemická štruktúra E-0702 (Miller, M.J., et al., 2009).

Rezistencia baktérii spočívala v mutácii tonB génu, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri prijímaní železa sprostredkovaného siderofórmami. Experimenty ukázali, že E-0702 má najvyššiu antibakteriálnu aktivitu v prípade baktérií chudobných na železo, zatiaľ čo v prípade baktérií s dostatočným množstvom železa nebola zaznamenaná takmer žiadna antibakteriálna aktivita tohoto konjugátu. Toto pozorovanie viedlo k hypotéze inkorporácie E-0702 do baktérie cez tonB závislý transportný systém (Tonziello, G., et al., 2019). Tieto testy bunkových mechanizmov preukázali zahrnutie „Fiu“ a „Cir“ proteínov vonkajšej membrány pri transporte konjugátu a možnom mechanizme vývinu rezistencie. Ďalšie testy zahrňujúce siderofóry s pyrokatecholovou a hydroxamátovou kostrou preukázali naviazanie konjugátu carbacefalosporínu a siderofóru na rozdielne membránové proteínové receptory, a to FhuA a Cir receptory (Brochu, A., et al., 1992). *In vitro* štúdie poukázali na skutočnosť, že baktérie *E. coli* s mutantným receptorom na vonkajšej membráne pre hydroxamátovú skupinu (FhuA) alebo katecholátovú skupinu (Cir) na siderofórových konjugátoch boli viacnásobne preferované pri možnosti vzájomného výberu receptoru. Pri použití kombinácie hydroxamátovej a katecholovej skupiny sa vytvoril nový siderofórový konjugát, ktorý bol schopný eventuálne viazať oba receptory vonkajšej membrány, čím sa získala vyššia inhibičná aktivita so súčasne nízkou frekvenciou rezistencie (Minnick, A.A., et al., 1992; Pugsley, A.P., et al., 1987).

Medzi ďalšie významné umelo pripravené deriváty siderofórov patria konjugáty s ampicilínom a amoxicilínom, ktoré boli aktívne v prípade *P. aeruginosa* (Ji, C., et al., 2012).

Prvým siderofórovým konjugátom, ktorý dosiahol tretieho stupňa klinických štúdií bol cefiderocol (S-649266) (Saisho, Y., *et al.*, 2018). Z chemickej stránky sa jedná o konjugát katecholátu s inkorporovaným cefalosporínom, ktorý obsahuje ceftazidím a cefepím kombinované s katecholovými skupinami naviazanými cez tretí uhlík reťazca. Takýto spôsob utvárania väzby umožňuje naviazanie železitých iónov s následným transportom do bunky cez transportne proteíny siderofóru. Cefiderocol má vysokú *in vitro* a *in vivo* aktivitu voči viacerým gram-negatívnym organizmom, vrátane *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, a *Acinetobacter baumannii*. (Hackel, M.A., *et al.*, 2018).

Medzi konjugáty zahrňujúce použitie antibiotík bez β -laktamázovej skupiny sa radí semi-syntetizovaný siderofór-rifamycín (CGP 4832). Táto zlúčenina je schopná aktívneho transportu cez vonkajšiu membránu gram-negatívnych baktérií cez transportér FhuA, čím dosahuje vysokú koncentráciu v periplazmatickej oblasti so schopnosťou prechádzať pasívnou difúziou do cytoplazmy, kde sa rifamycín viaže na RNA polymerázu (Pugsley, A.P., *et al.*, 1987). Umelo pripravený konjugát siderofóru fimsbactinu, izolovaného z *A. baumannii*, s daptomycínovou skupinou reaguje vysoko selektívne voči *A. baumannii* (slabú reakciu poskytuje aj v prípade *S. aureus*). U ďalších testovaných baktérií ako napr. *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia spp.* a *E. coli* nebola antibakteriálna aktivita tohoto konjugátu pozorovaná (Ghosh, M., *et al.*, 2018).

Medzi ďalšie sideroforové deriváty sa zaraďujú napr. mykobaktíny ako lyzínové deriváty. Chemicky sú to 2-hydroxyl fenyl oxazolínové zlúčeniny obsahujúce siderofórové molekuly. *Mycobacterium tuberculosis* produkuje siderofóry s dvomi rozličnými chemickými štruktúrami, jedna je viac lipofilnej povahy, druhá je hydrofilnejšia. Chemický rozdiel pozostáva z prítomnosti hydroxylovaného lyzínu na N-acylovom konci reťazca (De Voss, *et al.*, 1999; Varma, *et Podila*, 2005).

Medzi ornitínové deriváty sa zaraďuje pyoverdín alebo pseudobactín, obsahujúci dihydroxychinolínovú časť. Peptidová štruktúra môže mať viac ako 40 obdôb, chromofór však svoju štruktúru mení iba v prípade *A. vinelandii*. Chromofór odvodený od 2,3-diamino-6,7-dihydroxychinolínu je spojený s peptidovými reťazcami, ktoré obsahujú dve hydroxamátové skupiny alebo jednu hydroxamátovú a jednu hydroxykarboxylátovú skupinu (Kloepper, J., *et al.*, 1980).

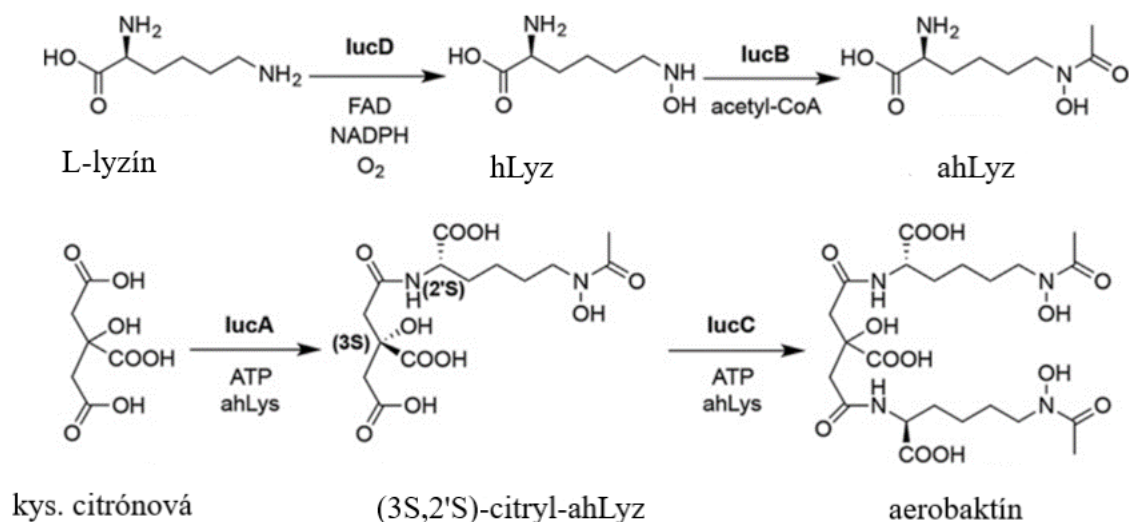
Anguibacín, histamínový derivát, bol izolovaný z morského patogénu *Vibrio anguillarum* (Jalal, *et al.*, 1989). Anguibacín pôsobí ako inhibítor príjmu železa v živých bunkách, vstrebáva

železo z tkaniva savcov, odstraňuje železo z ostatných siderofórov, železitých hydroxidov aj železitých vodných roztokov (Jalal, et al., 1989).

3.1.3. Aerobaktín

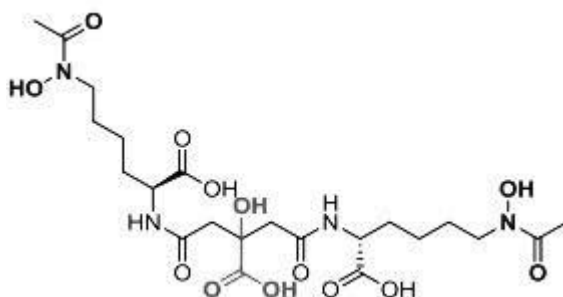
Aerobaktín je zlúčenina s nízkou molekulárnou hmotnosťou kódovaná piatimi génmi lokalizovanými na jednom operone. Medzi nimi, *iucA*, *iucB*, *iucC* a *iucD* sa zúčastňujú syntézy aerobaktínu, zatiaľ čo piaty gén *iutA* kóduje membránový receptor (Bindereif A., Neilands, J.B., 1985; Carbonetti, N.H., Williams, P.H., 1984; Gross, et al., 1984). Produkt *iucA* je považovaný za rozhodujúci krok v prvom kroku reakcie syntézy, *iucB* kóduje N-hydroxylyzín acetyltransferázu, *iucC* kóduje aerobaktín syntetázu a *iucD* pravdepodobne kóduje N-lyzín monooxygenázu (de Lorenzo, V., et al., 1986). Biosyntéza bola zmapovaná cez selektívnym vypínaním a preusporiadávaním *iuc* génových funkcií a odstraňovaním intermediátov syntézy (de Lorenzo, V., et al., 1986). *IucA* a *IucC* patria do rodiny ligáz charakterizovaných ako NRPS-nezávislé siderofórové syntetázy (Oves-Costales, D., et al., 2009; Challis, G.L., 2005). Testovaná *in vitro* rekonštitúcia potvrdila predpokladanú dráhu syntézy v prípade, že boli použité všetky štyri purifikované enzýmy *iucA-D* so substrátmi v reakčnej zmesi (de Lorenzo, V., Neilands, J.B., 1986).

Aerobaktín je hydroxamátový siderofór ktorého biosyntéza závisí od aktivity štyroch proteínov *IucABCD*. V prvom kroku pozorujeme syntézu N⁶-acetyl-N⁶-hydroxylyzínu (ahLys) cez sekvenčné aktivity hydroxylázy *IucD* a acetyltransferázy *IucB*. Dve molekuly ahLys sú pripojené na primárny karboxylát citrátu. Najskôr ide o stereošpecifické pridanie jednej molekuly ahLys cez *IucA* na primárny karboxylát s následným pridaním druhej molekuly ahLys cez syntetázu *IucC* (obr. č.7). *IucA* a *IucC* patria medzi ATP-dependentné ligázy, ktoré plnia svoju úlohu pri produkcii viacerých siderofórov, vrátane virulentných petrobactínov *S. aureus* (Russo, T.A., Gulick, A.M., 2019).



Obrázok 7: Schematické znázornenie biosyntézy aerobaktínu (Bailey, D.C., et al., 2018).

Po chemickej stránke sa jedná sa o bakteriálny siderofór s molekulárnym vzorcom $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{13}$ (Neilands, 1995; Johnson, et al., 1988).



Obrázok 8: Chemická štruktúra aerobaktínu (Buyer, et al., 1991).

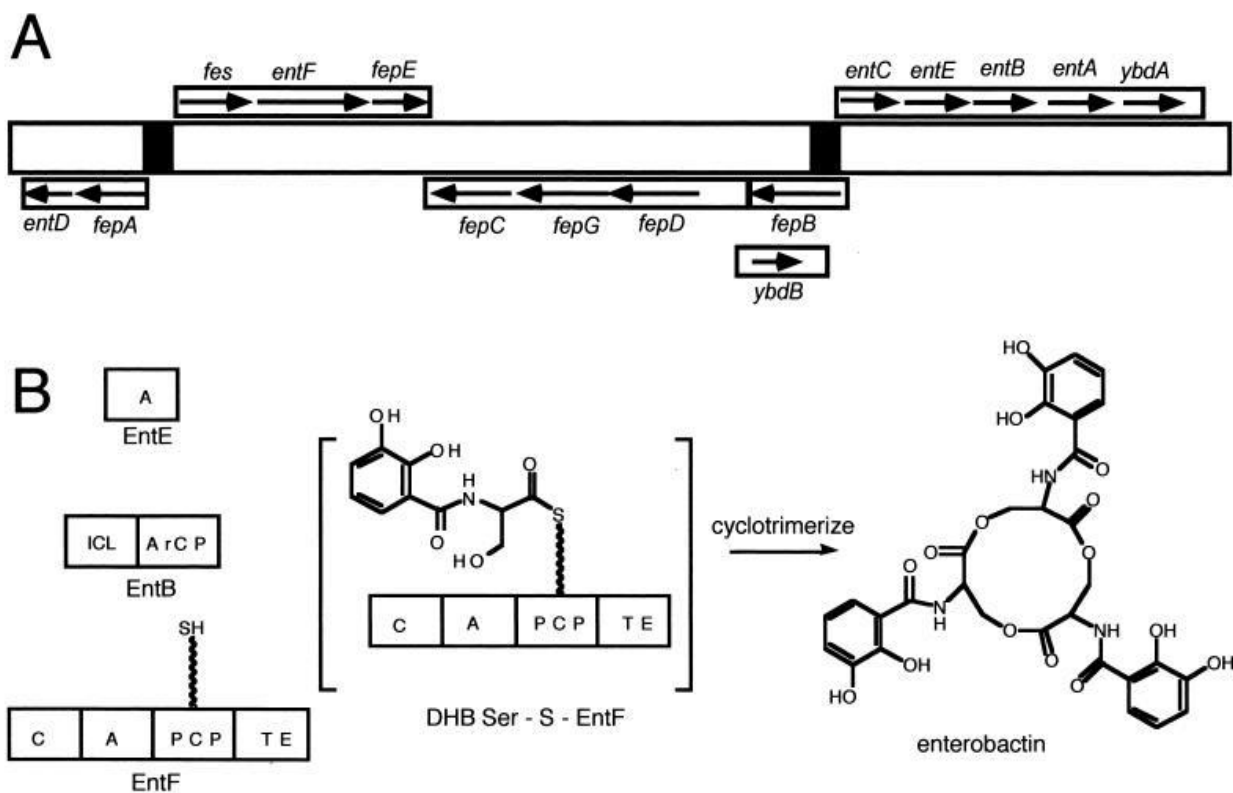
Je to exogénny siderofór rodu *Pseudomonas* (morského pôvodu), *K. pneumonia*, *A. aerogenes*, *E. coli* a mnohých ďalších baktérií (Buyer, et al., 1991). Jedná sa o virulentný faktor, ktorý umožňuje aj *E. coli* sekvestrovať železo z prostredia chudobného na železo. Pri podmienkach s nedostatočným prísunom železa bola dokázaná u rodu *Pseudomonas* produkcia aerobaktínu, ktorá sa predtým potvrdila iba v prípade čeľade *Enterobacteriaceae* (Zhanel, G.G., et al., 2019). Prvýkrát bol vyizolovaný v roku 1969 z kultúry v prostredí s nedostatkom železa u *Aerobacter aerogenes* Gibsonom a Magrathom (Gibson, F., et Magrath, D.I., 1969). Pokiaľ je prítomné dostatočné množstvo železa v médiu intenzita syntézy poklesne o 95% zatiaľ čo pridaním chelatačných činidiel do média, ako napríklad 2,2-dipyridy- alebo nitrilotriacetáty, sledujeme pokles množstva dostupného železa a syntéza sa stupňuje. Tento mechanizmus

zaručuje správny vývoj baktériám (Wayne *et al.*, 1976).

3.1.4. Enterobaktín

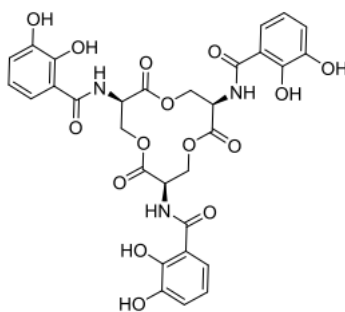
Enterobaktín bol prvý krát purifikovaný zo supernatantu sérovaru Typhimurium (*Salmonella enterica*) a *E. coli* kultúry (Earhart, C. F., 1996). Jeho purifikácia spôsobila v roku 1970 jeho prvú kontroverziu. Pollack a Neilands, ktorí izolovali zlúčeninu zo *Salmonella typhimurium*, ju pomenovali enterobaktín, zatiaľ čo O'Brien a Gibson, ktorí tú istú zlúčeninu izolovali z *E. coli* ju nazvali enterochelín. Aj napriek tomu že O'Brien a Gibson predložili svoj článok skôr, článok Pollacka a Neilandsa bol distribuovaný ako prvý a tým sa rozšírilo užívanie oboch mien (Pollack, J.R., Neilands, J.B., 1970; O'Brien, I.G., Gibson, F., 1970).

Z genetického pohľadu ide o interakciu troch hlavných génov. Obrázok 9 znázorňuje schematickú mapu génového klastru spolu s transkripčnými jednotkami a potenciálnymi regulačnými miestami. Iniciačný bod pre syntézu vyžaduje prítomnosť troch génov: *entC*, ktorý kóduje syntézu izochorizmatu, *entB*, ktorý kóduje 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoátovú syntetázu a *entA*, ktorý kóduje 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoátovú dehydrogenázu. Druhý stupeň sa zaoberá syntézou jednej molekuly enterobaktínu z troch setov molekúl 2,3-dihydroxybenzoovej kyseliny a L-serínu. Produkty génov *entD*, *entE*, *entF* a *entB* katalyzujú tento krok. Proteíny kódované spomenutými génmi sú uvoľňované cez osmotický šok (Armstrong, S. K., *et al.*, 1989; Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).



Obrázok 9: Genetika a enzymológia biosyntézy *E. coli*. A- schéma biosyntézy enterobaktínu a transport génov. B- schéma syntézy kódovanej génmi vyobrazenými na paneli A s finálnym produktom, enterobaktínom (Crosa, J. H. et Walsh, C. T., 2002).

Po chemickej stránke sa jedná sa o bakteriálny siderofór s molekulárnym vzorcom $C_{30}H_{27}N_3O_{15}$. (Ward, *et al.*, 1999).

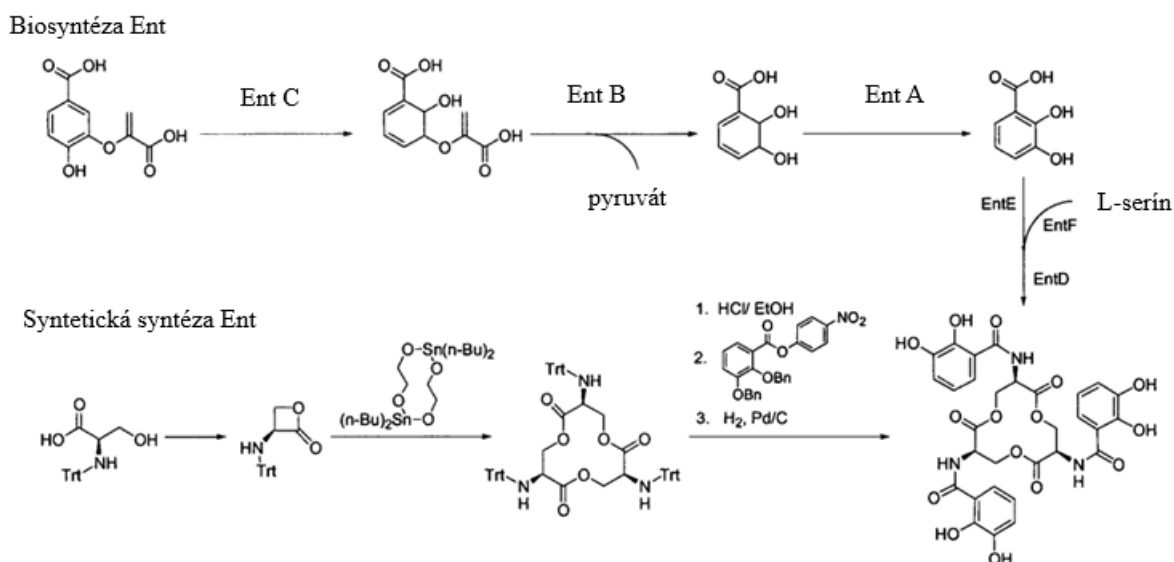


Obrázok 10: Chemický štruktúra enterobaktínu (Raymond, K.N, et al., 2003)

Biosyntéza Ent je zostavená pôsobením neribozomálnej peptidovej syntetázy. Je to dvojkrokový proces. Chorizmová kyselina, prekursor niektorých aromatických aminokyselín, je konvertovaný do formy isochorizmátu, následne 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoátu a finálne do 2,3-dihydroxybenzoovej kyseliny (DHB). Amidová väzba medzi DHB a L-serínom je katalyzovaná EntD, EntE, EntF a C-koncom arylového nosiča EntB. Serín je

aktivovaný adenyláciou a následne je naviazaný na doménu peptidylového nosného proteínu EntF ako acyl-S-pantoteínový intermediát. Konečná tioesterázová doména EntF následne vypustí enterobaktín hydrolýzou troch molekúl DHB-Ser cez vnútromolekulovú cyklizáciu (obr. č. 11) (Raymond, K.N, *et al.*, 2003).

Chemická syntéza Ent bola prvý krát zaznamenaná dvojicou Corey a Bhattacharyya (Corey, E. J., Bhattacharyya, S., 1977). Ich postup vyústil v produkciu Ent s relatívne nízkym výnosom. Následné syntézy Ent a jeho enantiomeru postupne zvyšovali výnosnosť. Jednokroková syntéza triserínového laktónu zvýšila výnosnosť na približne 50% (Shanzer, A., Libman, J., 1983; Seebach, D., *et al.*, 1992) a tiež umožnila funkcionalizáciu trilaktónu cez naviazanie aj iných chelatačných skupín než katecholamidov (Meyer, M. *et al.*, 1997; Ramirez, R. J. A. *et al.*, 1997).



Obrázok 11: Schéma syntézy Ent prírodnou a umelou cestou (Raymond, K.N, *et al.*, 2003).

Enterobaktíny sú produkované baktériami z rodiny *Enterobacteriaceae*, čo zahŕňa všetky baktérie kmeňa *E. coli*, ktoré majú vysokú afinitu k železu. Ďalšími známymi producentami enterobaktínu sú *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* a *E. herbicola*. Enterobaktín je známy pre jeho schopnosť chelátovať železo aj z prostredia s veľmi nízkou koncentráciou. Afinita Ent k železu je jedna z najsilnejšie zaznamenaných, $K = 10^{52} \text{ M}^{-1}$ (Carrano, C.J., *et* Raymond K.N., 1979). Enterobaktín *E. coli* má molekulovú hmotnosť 669 kDa, čo mu znemožňuje difúzovať cez vonkajšiu membránu, preto je transportovaný pomocou aktívneho transportného mechanizmu pre transport a zachytávanie železa (Hans, *et al.*, 2001; Gregory, *et*

al., 2012).

3.2. Železo

3.2.1. Chemicko-fyzikálna charakteristika železa

Železo je svetlo šedý až biely, druhý najrozšírenejší ťažký kov na Zemi. Patrí medzi prvky VIII. vedľajšej podskupiny s typickými vlastnosťami neprechodných kovov s centrovanou kubickou mriežkou s vysokou teplotou topenia a varu. Zlúčeniny železa sú často paramagnetické. Jeho prírodný výskyt v zemskej kôre sa limituje výhradne na zlúčeniny hematitu (Fe_2O), limonitu ($2\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), magnetitu (Fe_3O_4), sideritu (FeCO_3), pyritu (FeS_2) a malé množstvo je doprovodom rúd iných kovov (Kameníček, J., *et al.*, 1997).

Železo je najrozšírenejší prechodný prvok v ľudskom tele. Pre svoju schopnosť existovať v dvoch oxidačných stavoch je ideálnym redoxným katalyzátorom pre rôznorodé bunčné procesy, vrátane dýchacích procesov a replikácie DNA. Redoxný potenciál je zodpovedný za prípadnú toxicitu, preto musí byť distribúcia a koncentrácia starostlivo kontrolovaná organizmom (Cassat, J.E., *et Skaar*, E.P., 2013). Rozpustnosť železa v aeróbnom prostredí je veľmi nízka pri fyziologickom pH kvôli oxidácií železnatých iónoch na nerozpustné železité hydroxidy (Hider, R.C. *et Kong*, X., 2010). Železo môže katalyzovať Fentonovu reakciu a vygenerovať voľné radikály, ktoré sú schopné poškodiť tuky, DNA a proteíny (Cassat, J.E., *et Skaar*, E.P., 2013).

3.2.2. Úloha železa v organizme

Železo je esenciálna zložka pre rast, replikáciu a metabolizmus takmer všetkých foriem života vďaka svojej schopnosti koordinovať a aktivovať kyslík. Tieto vlastnosti sa podpísali pod jeho schopnosť vystupovať ako kofaktor v mnohých kľúčových enzýmových reakciách, vrátane ATP syntézy, nukleotídovej biosyntézy a DNA replikácie, transkripcie a opravných reakciách (Drakesmith, H., Prentice, A., 2008). Ľudský metabolizmus je veľmi účinný pri narábaní so zásobami železa, denne sa stratí maximálne 0,5-1 mg z približne 4-5 g zásoby železa nachádzajúcej sa v dospelom jedincovi (Nathan, *et al.*, 2003). Ľudský organizmus viaže a ukladá železo vo viacerých proteínových štruktúrach ako napr. hemoglobín, haptoglobín, transferín, feritín a lactoferrín, čím limituje prístup voľného železa pre patologické baktérie (Page, M.G.P., 2019).

Homeostáza železa u človeka sa uskutočňuje cez absorpciu v dvanástniku a recyklovanie

zásob železa. Za normálnych podmienok sú približne $\frac{3}{4}$ telesných zásob železa inkorporovaných v hemoglobíne. Zvyšok je uchovávaný intracelulárne ako ferritín alebo je naviazaný na extracelulárne proteíny (Brock, J.H., 1999). Poškodené tkanivo infekciou alebo zápalom mení homeostázu železa zvýšením absorpcie železa a sekvestráciou makrofágov (Wessling-Resnick, M., 2010; Ganz, T., et Nemeth, E., 2015).

Absorpcia železa u ľudí sa deje v duodéne, pričom priamo závisí na dostupných zásobách. Príjem je regulovaný hepcidínom, oligopeptidovým hormónom syntetizovaným v pečeni (Ganz, T., 2006; Nemeth, E., et Ganz, T., 2006). Produkcia hepcidínu je zvýšená počas infekcie, zápalu a bola zaznamenaná korelácia tohto javu s antimikrobiálnou aktivitou (Park, C.H., et al., 2001; Jiang, X.F., et al., 2017). Železo naviazané na hepcidín je transportované do buniek cez ferroportín, čo umožňuje makrofágom, hepatocytom a enterocytom získať železo, ktoré by v inom prípade bolo uvoľnené do krvného obehu (Page, M., 2019).

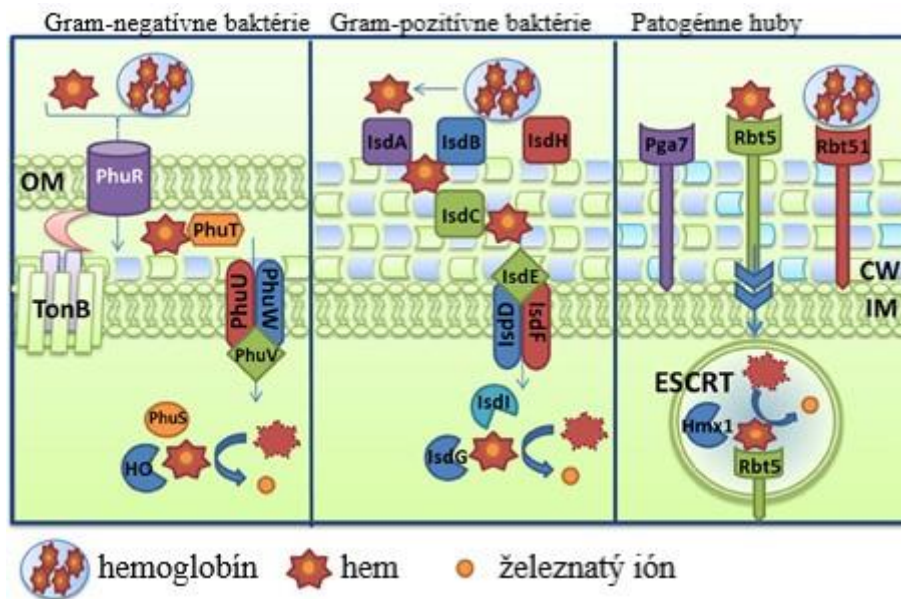
3.2.2.1. Mikrobiálne stratégie pre získavanie železa

Koncentrácia železa v organizme je tiež znížená v infekčnom prostredí kvôli neustálemu potlačovaniu príjmu železa mikrobiálnymi bunkami infekčného hostiteľa (Golonka, R., et al., 2019). Patogény si vyvinuli niekoľko spôsobov získavania železa z hostiteľského organizmu a prostredia. Medzi inými môže byť prijatý aktívnym transportom naviazaním na siderofóry, získaním železa z hem-obsahujúcich proteínov, z transferínu, laktoferínu alebo feritínu alebo prostredníctvom jeho dvojmocného iónu. (Page, M., 2019; Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).

K získavaniu železa z hemovej skupiny dochádza u niektorých patologických baktérií a húb vylučovaním hemolyzínov, čo vedie k degradácii erytrocytov so súčasným uvoľnením hemoglobínu, alebo degradáciou proteínov proteázami. Hemolyzíny boli identifikované u Gram-negatívnych baktérií ako napr. *E. coli*, *Vibrio cholerae* El-Tor (HlyA) a *Bordetella pertussis* (CyaA) (Felmlee, et al., 1985; Otto 1998; Ludwig, et al., 2004; Drago-Serrano, et al., 2006; Stoebner, Payne, 1988; Glasser, et al., 1988). V prípade Gram-pozitívnych baktérií sa jedná o *Staphylococcus epidermis* a *Bacillus cereus* (Verdon, J., et al., 2009; Senesi, S., Ghelardi, E., 2010). Medzi huby s hemolytickou aktivitou sa zaraďujú napr. pleseň *A. fumigatus*, polymorfná huba *C. albicans* alebo kvasinky *C. neoformans* (Yokota, K., et al., 1977; Manns, J.M., et al., 1994). Rozlišujeme priamy príjem hem-skupiny a príjem použitím siderofórov (hem-viažúce proteíny). Tieto štúdie sú podrobne preskúmané v prípade mnohých

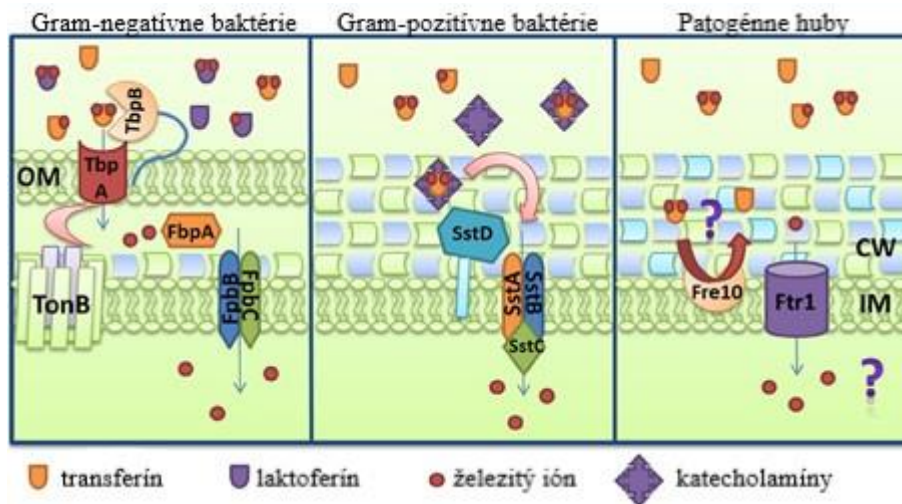
Gram-negatívnych baktérií, zatiaľ čo bolo zaznamenaných len pár príkladov Gram-pozitívnych baktérií a húb.

Priamy príjem hem-skupiny Gram-negatívnymi baktériami je sprostredkovaný rozpoznáním a naviazaním špecifického receptora na vonkajšiu membránu. Tieto membránové receptory sú schopné sa priamo naviazať na hem-skupinu a sprostredkovať jej transport. Zvyčajne sú schopné naviazať proteíny obsahujúce hem, napr. hemoglobín, haptoglobín-hemoglobín, hemopexín-hem a myoglobín (Wandersman, C., Delepelaire, P., 2004). V tomto prípade ide o extrakciu hem-skupiny z komplexov a následný transport do periplazmy (TonB-dependentný transport u Gram-negatívnych baktérií). TonB-ExbB-ExbD je komplex, ktorý prevádza energiu na receptory vonkajšej membrány s cieľom uvoľniť translokáciu špecifického nákladu (obr. č. 12) (Braun, V., Braun, M., 2002). Väčšina receptorov pre príjem hemu na vonkajšej membráne, rovnako ako transportéry siderofórov a transferín/laktoferínové receptory patria k TonB-závislým vonkajším transportérom (Ferguson, A.D., Deisenhofer, J., 2002). Gram-negatívne baktérie môžu využívať pre príjem hemu aj hemofóry. Jedná sa o špeciálne vylučované proteíny, ktoré majú schopnosť viazať hem alebo hem obsahujúce proteíny v extracelulárnom prostredí (Wandersman, C., Delepelaire, P., 2012). Tento systém sa následne potvrdil aj v prípade Gram-pozitívnych baktérií a húb ale v menšej miere (Letoffe, S., *et al.*, 1994; Cadieux, B., *et al.*, 2013; Wandersman, C., Delepelaire, P., 2012). Gram-pozitívne baktérie prijímajú hem-skupinu povrchovými receptormi, chaperónmi bunkovej steny (pomáhajú s včlenením hem skupiny), pomocou ABC transportérov (zodpovedných za membránovú translokáciu a oxygenázovú aktivitu ktorá finálne uvoľňuje železo z hemu) (Allen, C.E., Schmitt, M.P., 2009). V prípade húb ide o menej preskúmaný fenomén. Získavanie železa z hemu bolo prvý krát opísané v roku 1992 u *C. albicans* (Moors, M.A., *et al.*, 1992). *C. albicans* viaže erytrocyty akoby cez receptoru podobnú molekulu, ktorá obsahuje hemolytické faktory, mannoporteíny (Watanabe, T., *et al.*, 1999; Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).



Obrázok 12: Schéma príjmu a využitia hemoglobínu a hemu. Zobrazené mechanizmy sú nasledovné: Gram-negatívna baktéria *P. aeruginosa* cez Phu systém, Gram-positívna baktéria cez Isd systém. Prijem hubou *Candida albicans* je znázornený pomocou receptorov Rbt5, Rbt51, Pga7 (Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).

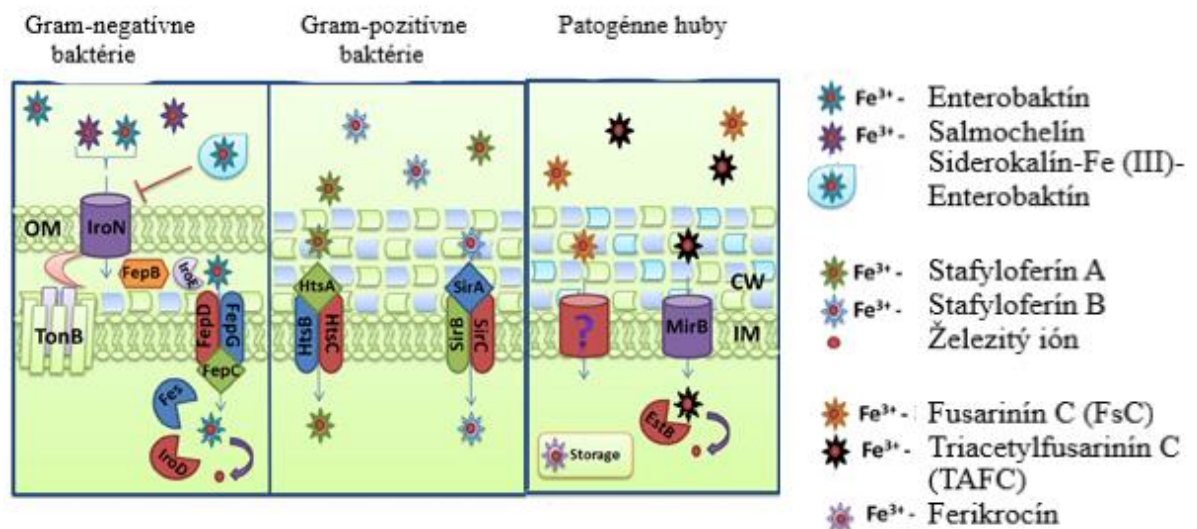
Získavanie železa cez laktoferín, transferín a ferritín prebieha u Gram-negatívnych baktérií, ako napr. *N. meningitidis* a *N. gonorrhoeae*, cez receptory TbpAB a LbpAB, ktoré sprostredkujú príjem trojmocného železa (Cornelissen, C.N., *et al.*, 1992; Biswas, G.D., Sparling, P.F., 1995). TbpAB systém sa skladá z dvoch transferín viažucich proteínov, ktoré sú sprostredkované operónom regulovaným cez Fur a kódované cez TonB-závislý proteín TbpA a lipoproteín TbpB, ktoré pôsobia ako ko-receptory (obr. č. 13) (Ronpirin, C., *et al.*, 2001). TbpA sa viaže na apo- a holo-transferín s rovnakou afinitou, zatiaľ čo TbpB preferuje naviazanie na transferín s už naviazaným železom (Cornelissen, C.N., Sparling, P.F., 1996; Boulton, I., *et al.*, 1998). TbpA je schopné vyťažiť železo z transferínu aj v prípade absencie jeho ko-receptoru, ale tento proces je viac výhodný v prípade, že TbpB je prítomný. Odhaduje sa, že viac ako polovica železa sa získava pomocou TbpB (Cornelissen, C.N., Sparling, P.F., 1996; Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).



Obrázok 13: Získavanie železa z transferínu a laktoferínu. V prípade Gram-negatívnej baktérie ide o mechanizmus *Neisseria gonorrhoeae* cez TbpAB-FbpABC transportéry. Gram-pozitívna baktéria *Staphylococcus aureus* cez SstABCD transportér a katecholamíny. Príjem železa v prípade patogénnej huby *Candida albicans* prebieha cez reduktázu Fre10 a Ftr1 (Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).

Internalizácia siderofórov u Gram-negatívnych baktérií typicky prebieha cez ABC transportéry. Aj napriek tomu, že v niektorých prípadoch bolo zaznamenané pôsobenie permeáz poháňaných protónovou pumpou, preferovaný spôsob príjmu železa je pomocou siderofórov. Siderofóry s naviazaným železom sú najskôr rozpoznané špecifickými povrchovými receptormi, ktoré patria do rodiny TonB-závislých vonkajších transportérov (TBĐT) rodiny a zvyčajne sú regulované pomocou Fur. Siderofór s naviazaným železom prechádza cez rozličné membrány a bunkovú stenu pomocou chaperónových proteínov. Keď sa molekula dostane do vnútorného priestoru nasleduje uvoľnenie železa cez degradáciu siderofóru alebo cez redoxné reakcie (Faraldo-Gomez, J.D., Sansom, M.S., 2003; Caza, M., Kronstad, J.W., 2013). Siderofóry s naviazaným železom potrebujú prestúpiť dve membrány a peptidoglykanovú bunkovú stenu aby dosiahli vnútrobunkový priestor. Za správne rozpoznanie a naviazanie sú zodpovedné špecifické receptory na povrchu membrány ako napr. FepA, IroN a PfeA u *E. coli*, *S. enterica* a *P. aeruginosa*. Jednokrokový transportný systém bol popísaný v prípade použitia aerobaktínu u *E. coli* cez receptory IutA a ABC transportér FhuBCD (De Lorenzo, V., et al., 1987). Tento transportér tiež sprostredkováva príjem terichrómu, koprogénu a rhodotorulovej kyseliny cez receptory FhuA, FhuE a Fiu (Fecker, L., Braun, V., 1983). Katecholátové siderofóry s naviazaným železom sú translokované po rozpoznaní receptorom FepA na vonkajšej membráne (len v prípade enterobaktínu) alebo pomocou IroN receptorov vyžadujúcich energiu na transdukciu cez TonB-ExbD-ExbB komplex (Pierce, J.R., et al., 1983). Siderofórový transport u Gram-pozitívnych baktérií prebieha tiež na základe translokácie cez ABC transportéry. V prípade *S. aureus* sledujeme

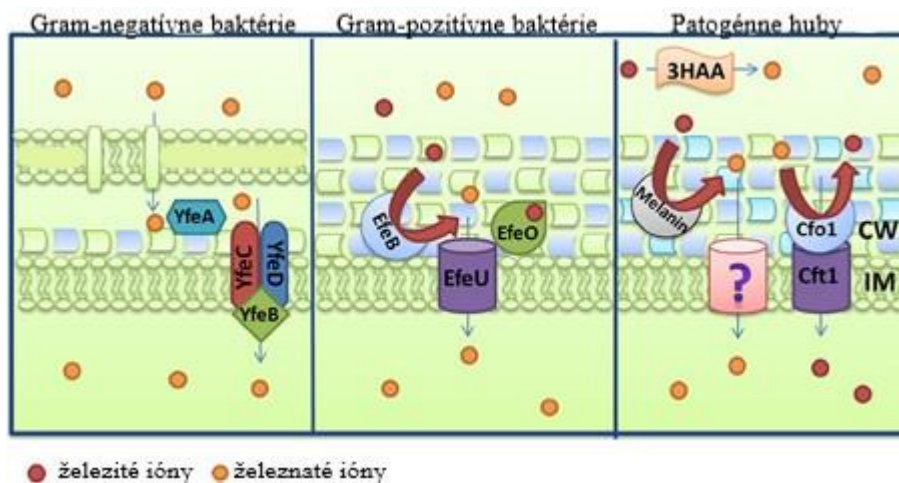
produkcii dvoch siderofórov, staphyloferrínu A a B, ktoré sú prenesené do cytoplazmy cez transportéry HtsABC a SirABC. Transportéry HtsA a SirA sa nachádzajú na povrchu membrány, zatiaľ čo HtsBC a SirBC sú komponentami membrány (obr. č. 14) (Skaar, E.P., *et al.*, 2004). V prípade patogénnych húb bola zaznamenaná účasť ferrichrómu, ktorého veľká štruktúrna komplexita vyústila v 20 štruktúrne odlišných hexapeptidov s mnohými modifikáciami, ako napr. pridanie hydroxymetylovej skupiny alebo metylovej skupiny na vedľajší reťazec (Winkelmann, G., 2007). Niektoré mikroorganizmy nie sú schopné produkcie vlastného siderofóru avšak vedia využívať xenosiderofóry získané pomocou špecifických transportérov. Xenosiderofóry sú siderofóry produkované jedným organizmom a využívané iným organizmom. Vo všeobecnosti tento spôsob preferujú oproti využívaniu ABC transportérov (Haas, H. *et al.*, 2008; Haas, H., *et al.*, 2003; Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).



Obrázok 14: Schéma príjmu trojmocného železa cez siderofóry. Receptor IronN, ABC transportér FepBCDG a esteráza Fes a IronDE sprostredkujú príjem siderofórov u Gram-negatívnych baktérií ako napr. *E. coli*. V prípade *Staphylococcus aureus* pôsobia ako ABC transportéry HstABC a SirABC. *Aspergillus fumigatus* vylučuje siderofóry FsC a TAFC, ktoré sú následne degradované EstB (Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).

Príjem dvojmocného železa sa vyskytuje u baktérií aj húb. Železnaté ióny existujú v kyslých prostrediach alebo voľne vznikajú pôsobením reduktáz. Dvojmocné železo je schopné sa voľne difundovať cez vonkajšiu membránu Gram-negatívnych baktérií s následným transportom do vnútornej membrány cez ABC transportér FeoABC (Kammler, M., 1993). FeoB je hlavný transmembránový transportér, ktorý pôsobí ako permeáza, zatiaľ čo FeoC pôsobí ako jeho regulátor (obr. č. 15). Úloha FeoA zatial' nie je dostatočne preskúmaná (Lau, C.K., *et al.*,

2013). Gram-pozitívne baktérie používajú EfeUOB komplex, ktorý je porovnateľný s Cfo1-Cft1 komplexom využívaným hubami (Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).



Obrázok 15: Schéma príjmu dvojmocného iónu železa. Gram-negatívna baktéria *Yersinia pestis* používa YfeABCD proteíny zatiaľ čo Gram-pozitívna baktéria *Bacillus subtilis* používa EfeUOB komplex. Fungálny patogén *Cryptococcus neoformans* používa Cfo1-Cft1 oxidázovo-permeázový komplex, pigment melanín a redukovanú kyselinu 3-hydroxyantranilovú na redukciu a príjem dvojmocného železa (Caza, M., Kronstad, J.W., 2013).

3.3. Využitie zobrazovacích metód nukleárnej medicíny v klinickej praxi a výskumu.

Nukleárna medicína je obor, ktorý využíva rádiofarmaka na vyhodnotenie, diagnostiku a liečbu rôznych ochorení. Špeciálne navrhnuté kamery dovoľujú lekárom sledovať pohyb rádiofarmak v tele v reálnom čase. Jednofotónová emisná výpočtová tomografia (SPECT) a pozitronová emisná tomografia (PET), sú dve najpoužívanejšie techniky na vytváranie záznamov v nukleárnej medicíny.

3.3.1. Pozitronová emisná tomografia

Pozitronová emisná tomografia (PET) je veľmi senzitívna technika používaná pre neinvazívne zobrazovanie molekulárnych procesov používaná od deväťdesiatych rokov aj v klinickej praxi. Táto technika rozlišuje rozdielne tkanivá na základe ich metabolizmu, a aj preto najčastejšie nachádza svoje využitie v kardiológii, neurológii a onkológii. Princíp zobrazovacej metódy spočíva v zachytávaní žiarenia z tela pacienta (resp. skúmaného objektu vo výskume) po aplikácii malého množstva rádioaktívnej látky. PET zobrazuje rôzne tkanivá na základe ich rôznej schopnosti akumulovať podanú rádioaktívnu látku (Shahhosseini, S.,

2011; Berger, A., 2003).

Rádiofarmakum podané pacientovi alebo testovanému objektu obsahuje pozitronový žiarič, ktorý pri svojej reťazovej premene na nerádioaktívny izotop vyžiari do okolia antičasticu elektrónu, tzv. pozitron, ktorý má krátky polčas rozpadu a zanikne najďalej jeden milimeter od miesta jeho vzniku (Bělohávek, O., 2009). Pozitron vyžiari pred svojím zánikom dva protichodné fotóny, ktoré majú presne 511 keV (Šámal, M., *et Štich, V.*, 2000). Tieto fotóny sú detekované koincidenčným detektorom. PET kamera sa skladá z jedného až troch prstencov, pričom každý z nich má niekoľko stoviek scintilačných kryštálov rozložených do ôsmich vrstiev (Trojanová, H., 2008; Šámal, M., *et Štich, V.*, 2000). Kryštály detekujú len dvojice fotónov, ktoré dopadli na dva protiľahlé detektory v rovnakú dobu pod uhlom 180° . Detektory pre PET systémy sú predovšetkým tvorené jodidom sodným dotovaným tháliom, alebo germanátom bizmutu, fluoridom bárnatým, gadoliniom orthosilikátom a lutéciom orthosilikátom (Sharp, P.F., *et al.*, 2005). Následná rekonštrukcia obrazu prebieha pomocou výpočtovej techniky.

Medzi rádiofarmaká používané v klinickej praxi patrí molekula glukózy modifikovaná izotopom ^{18}F . Chemický názov modifikovanej molekuly je 2-fluor-2-deoxy-D-glukóza (FDG). ^{18}F FDG našla svoje využitie pri detekcii oblastí s abnormálnym metabolizmom glukózy, lokalizácií primárneho nádoru u pacientov s metastatickým postihnutím a skúmaní demencie a mŕtvice (Berger, A., 2003). Ďalším uznávaným rádiofarmakom je amoniaku $^{13}\text{NH}_3$, ktorý sa používa pre hodnotenie prietoku krvi myokardu, ^{18}F -fluciclovín, predávaný pod obchodnou značkou Axumin, sa používa na zobrazenie preliečeného karcinómu prostaty. ^{18}F -flutemetamol (Vizamyl), ^{18}F -florbetaben (Neuraceq) spolu s ^{18}F -florbetapirom (Amyvid) sa používajú najmä v neurológii a neurochirurgii pre vizualizáciu funkčnosti mozgu a jeho kognitívnych cez približný odhad hustoty β -amyloidných plakov. $^{82}\text{RbCl}$ (CardioGen-82) sa používa na porovnanie myokardu vystaveného farmakologickému stresu a pokoju pre evaluáciu regionálnej perfúzie u dospelých pacientov s podozrením na ochorenie koronárnych artérií. ^{68}Ga -DOTATOC sa používa pre lokalizáciu somatostatínového receptora u pacientov s výskytom neuroendokrinných tumorov (<http://www.radiopharmaceuticals.info/pet-radiopharmaceuticals.html>).

3.3.2. Jednofotónová emisná výpočtová tomografia

Začiatok jednofotónovej emisnej výpočtovej tomografie (SPECT) sa pripisuje pionierom Kuhlovi a Edwardsovi (1963), ktorý položili základy novej metódy a neskôr Mirshanovovi, ktorý získal patent za kombiníciu transmizne-emisnej tomografie v roku 1987 (Mirshanov D.M., 1997; Mirshanov D.M., 1987). Ide o neinvazívnu techniku, ktorá poskytuje 3D zábery informujúce o funkčnosti organizmu s vysokou presnosťou. Metóda je založená na detekcii malého množstva rádionuklidu injekčne podaného pacientovi pričom sa detekuje vyžiarená prebytočná energia, ktorá vzniká pri prirodzenej premene rádionuklidu na jeho stabilnú formu (Accorsi, R., 2008). Hlavným rozdielom oproti PET metóde je detekcia iba jedného fotónu namiesto fotónového páru a využitie γ -žiariča namiesto pozitronových žiaričov (Trnka, J., 2015; Hrazdira, I. *et Mornstein*, V., 2001).

Scintigrafia, z ktorej metóda vychádza, je založená na princípe premeny fotónov gama žiarenia na svetelné žiarenie s následnou premenou na elektrický impulz. Presné miesto vzniku žiarenia je zaznamenané scintilačnou kamerou. Výsledným záznamom v čase je snímka biodistribúcie rádiofarmaka v tele (Lacko A. *et al.*, 2017). Táto zobrazovacia metóda umožňuje v klinickej praxi sledovať perfúziu a funkčnosť špecifických tkanív.

Jednofotónová emisná tomografia vytvára však trojdimenzionálny obraz zobrazujúci distribúciu rádiofarmaka zavedeného do pacienta pre diagnostické účely. Kombináciou konvenčnej scintigrafie a výpočtových tomografických metód je možné získať informácie o funkčnosti tkaniva v 3D vo vysokom rozlíšení. Väčšina SPECT skenerov dnes používa NaI(Tl) detektory. SPECT systém pozostáva z jednej alebo viacerých scintilačných kamier, ktoré zaznamenávajú 2D planárne projekcie, ktoré sa následne spoja do 3D záznamu (Tsui, B. M. W., 1996). Základná funkcia kamery je pri detekcii fotónov produkovaných gama rozpadom próby, ktoré sú emitované do všetkých smerov od pacienta. Kolimátor slúži ako filter zachytených fotónov, čím umožňuje časticiam ktoré sú paralelné na detektor prejsť skrz. Kolimátor teda sústreďuje radiáciu a ovplyvňuje senzitivitu a rezolúciu finálneho snímku (Khalil, M.M., *et al.*, 2011; Israel, O., *et al.*, 2019).

Význam metódy leží v jej schopnosti poskytnúť detailnú informáciu o fyziologickom stave tkanív cez produkciu a administráciu rádioaktívneho indikátora, sondy. Sondy sú vo všeobecnosti detekované cez gamakamery. Ide o rádioaktívny izotóp naviazaný na biologicky aktívny ligand špecifický určitému tkanivu (Hutton, B.F., 2014). Medzi známe γ -emitujúce

rádionuklidy používané v prípade SPECT metódy patria indium-111, metastabilné technécium-99m, jód-123. Aby sa rádionuklidy dostali na zoznam, ktorý ich označí za vhodné pre využitie v praxi, musia byť bez nosiča, netoxické, biologický polčas rozpadu nemôže byť väčší ako dĺžka štúdie, nemôžu interagovať s α a β emisnými časticami, musia mať nízku cenu a musia byť ľahko dostupné (Naqvi, S.A.R., Imran, M.B., 2020). Medzi FDA povolené rádiofarmaceutiká pre SPECT zobrazovanie patrí napr. joflupán (^{123}I) s obchodným názvom DaTscan pre vizualizáciu mozgu u pacientov s podozrením na Parkinsonovu chorobu alebo bikisát dihydrochlorid s obchodným názvom Neurolit, ktorý sa používa na lokalizáciu mŕtvice (<https://www.cardinalhealth.com/content/dam/corp/web/documents/fact-sheet/cardinal-health-fda-approved-radiopharmaceuticals.pdf>).

SPECT zobrazovacie techniky našli svoje uplatnenie aj v odvetví kardiologických chorôb, obzvlášť pri určovaní myokardiálnej perfúzie. Metóda sa využíva aj pri evaluácii pacientov s podozrením na demenciu, na lokalizáciu epileptického ohniska predoperačne, pri diagnóze encefalitídy, pri monitorovaní subarachnoidovej hemoragie, pri detekcii a ohodnotení cerebrovaskulárnych chorôb a v mnohých ďalších diagnostík (Khalil, M.M., *et al.*, 2011).

4 Materiál a metódy

4.1. Biologický materiál

- Ľudské krvné sérum- Transfúzne oddelenie Fakultnej nemocnice v Olomouci
- Laboratórne zvieratá

4.1.1. Experimenty na zvieratách

Všetky experimenty boli vykonané v súlade s reguláciami a smernicami zákona 246/1992 Sb. a s povolením Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy (MSMT-18933/2013-1) a Odborné komisie na ochranu zvierat proti týranu Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Všetky experimenty boli vykonané na samiciach myší kmeňa Balb/c.

4.2. Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie

- Methanol (BDH PROLABO, kat. č. 20864.320)
- Kyselina diethylentriaminpentaoctová – DTPA (Merck Millipore , kat. č. D1133)
- Oktanol (BDH PROLABO, kat. č. 20850.296)
- Chlorid železitý (Merck Millipore , kat.č. 157740-100G)
- 30% Kyselina chlorovodíková (Merck Millipore, kat.č. 96208)
- Hydrogén fosforečnan sodný (Merck Millipore, kat.č. 71643)
- Dihydrogén fosforečnan sodný (Merck Millipore, kat.č.71507)
- Chlorid sodný (Merck Millipore, kat.č.D1133-250G)
- Isofluran (Merck Millipore, kat.č. 792632)
- Kyselina chlorovodíková (Merck Millipore, kat.č.96208)
- Acetátový tlmivý roztok
- Octan amónny (Merck Millipore, kat. č.533004)
- Hydroxid sodný (Merck Millipore, kat.č.1310)
- Deionizovaná voda
- Enterobaktín (Microcollections)
- Aerobaktín (Microcollections)

Použité súpravy

- Gélové kolónky
- Chromatografický papier pre iTLC-SG

Použité roztoky a ich príprava

- fyziologický roztok- 0,9% NaCl (BBRAUN, kat.č. 5/395478/1109)
- 1M roztok octanu amónneho- 77,1 g octanu amónneho bolo rozpustených v 1 l diH₂O
- 1,1M roztok octanu sodného- 310 mg trihydrátu octanu sodného bolo rozpustených v 2 ml diH₂O
- 0,1M roztok chloridu železitého- 1,62 g chloridu železitého bolo rozpustených v 100 ml diH₂O
- 6mM roztok DTPA- 236 mg DTPA bolo rozpustených v 100 ml diH₂O
- PBS- 3,5 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O bolo rozpustených v 100 ml diH₂O a 2,7 g NaH₂PO₄ · H₂O v 100 ml diH₂O, 30 ml roztoku Na₂HPO₄ · 2 H₂O sa zmiešalo s 19,5 ml roztoku NaH₂PO₄ · H₂O. Objem sa doplnil na finálnych 100 ml
- 0,1M kyselina chlorovodíková- 1 l diH₂O bol zmiešaný s 12,18 g 30% kyseliny chlorovodíkovej

4.3. Zoznam použitých prístrojov

- ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátor (IGG; Eckert & Ziegler)
- hybridný zobrazovací systém PET/SPECT/CT pre malé laboratórne zvieratá (Albira; Bruker Biospis Corporation)
- automatický gama počítač (2480 Wizard², Perkin Elmer)
- trepačka pre inkubáciu (Vortex V1 plus Biosan)
- vortex Genius 3 (IKA VORTEX)
- centrifúga Smart 15 Micro Centrifuge (Hanil Science Industrial)
- analytické váhy AS 220.3Y (RADAWAG)
- termostat Thermo Scientific (Trigon Plus)
- inkubátor MD-02N (Major Science)

4.4. Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1. Optimalizácia podmienok rádioaktívneho značenia vybraných ⁶⁸Ga-siderofórov

Rádioaktívny izotop gália pre značenie siderofórov bol získaný z ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátora vo forme ⁶⁸GaCl₃. Použitým elučným činidlom bola 0,1M HCl. K získaniu ⁶⁸Ga bola vykonaná frakčná elúcia, pričom z 1ml odobraného eluátu bolo 300 µl eluátu s rádioaktivitou cca 15-30 MBq použitých k rádioaktívnemu značeniu.

Pre optimalizáciu rádioaktívneho značenia študovaných siderofórov bolo otestované rôzne množstvo siderofóru v reakčnej zmesi. Boli otestované množstvá 0,1, 1, 5, 10 a 20 µg. Následne bolo k siderofóru pridaných 300 µl rádioaktívnej zmesi a 30 µl 1,1M acetátového tlmivého roztoku. Inkubácia prebehla pri laboratórnej teplote s reakčnou dobou 5, 15 a 30 minút. Výsledná vzorka po úprave tlmivým roztokom vykazovala neutrálne pH. Rádiochemickú čistotu (RČ) bola stanovená pomocou tenkovrstvovej chromatografie na poréznom papieri vyrobenom z mikrovlákien impregnovaných silikagélom (ITLC-SG). Ako mobilná fáza bola použitá zmes 1M octanu amónneho a metanolu v pomere 1:1. Po vyvinutí bola stanovená rádiochemická čistota analýzou chromatogramov pomocou prístroja Cyclone Plus Storage Phosphor Imager. Výsledky analýzy boli spracované počítačovým softvérom OptiQuant.

4.4.2. Testy stability

Stabilita pripravených ⁶⁸Ga-sideroforů bola otestovaná v prítomnosti vysokej koncentrácie konkurenčného chelátoru (6mM kyseliny diethylentriaminpentaoctové (DTPA)), v prostredí nadbytku konkurenčného kovu (0,1M FeCl₃) a v ľudskom séru. Pri testovaní stability s konkurenčným chelátotvorným činidlom a kovom sa k 150 µl rádioaktívnej látky pridalo 150 µl roztoku DTPA v jednom a 150 µl roztoku FeCl₃ v druhom prípade. Následne bola zmes inkubovaná pri 37°C po dobu 30, 60 a 120 min.

Stabilita v ľudskom séru bola otestovaná zmiešaním 100 µl rádioaktívne značenej látky s 300 µl ľudského séra. Nasledovala inkubácia pri teplote 37°C po dobu 30, 60 a 120 min.

4.4.3. Rozdeľovací koeficient

Rádioaktívne značené siderofóry (50 µl z reakčnej zmesi) boli zmiešané s 500 µl oktanolu a 450 µl PBS. Takto bolo pripravených 6 vzoriek. Všetky skúmavky boli zvortexované a premiešané na trepačke približne 20 minút pri otáčkach 450 rpm. Neskôr sa vzorky sцентрифуговали 1 minútu pri otáčkach 15 000 rpm a bolo odobraných z každej skúmavky 50 µl vzorku z oktanolovej fázy a následne 50 µl vzorku z vodnej fázy, čiže PBS. Výsledné vzorky boli analyzované jednotlivo pomocou gama počítacza. Zo získaných dát boli následne vypočítané rozdeľovacie koeficienty testovaných ⁶⁸Ga-sideroforov. Rozdeľovací koeficient bol vypočítaný pomocou vzorca pre log P:

$$\log P = \log \frac{\text{CMP (\%)}_{\text{oktanolová fáza}}}{\text{CMP (\%)}_{\text{vodná fáza}}}$$

4.4.4. Väzba na plazmatické proteíny

Pre testovanie väzby rádioaktívne značených sideroforov na plazmatické proteíny boli pripravené reakčné zmesi, získané zmiešaním 10 µl značeného siderofóru so 190 µl ľudského séra. Ako kontrolné boli použité rovnakým spôsobom pripravené roztoky s PBS. Reakčné zmesi sa inkubovali pri 37°C po dobu 30, 60 a 120 min. Inkubácia bola ukončená odberom 25 µl zmesi a jej nanesením na gélovú mikrokolónku a následnou centrifugáciou po dobu 2 minút pri 2000 g. Rádioaktivita na gélovej kolónke a v eluáte bola zmeraná pomocou gama počítacza. Z nameraných dát boli vypočítané hodnoty väzieb testovaných ⁶⁸Ga-sideroforů na plazmatické proteíny.

4.4.5. PET/CT zobrazovanie

Pri zobrazovacích metódach so systémom PET/SPECT/CT, pre malé laboratórne zvieratá, bolo laboratórnym zvieratám aplikované retroorbitálne (r.o.) približne 100 µl rádioaktívne značenej látky s aktivitou 5 – 10 MBq. Zvieratá boli pri aplikácii a počas celého merania v inhalačnej anestézii (2% isofuran). Bylo provedeno vždy statické PET/CT skenovanie v časových intervaloch 30 a 90 minút od podania rádioaktívnej látky. Ihned po aplikácii ⁶⁸Ga značených sideroforů bylo také prováděno dynamické PET skenování po dobu 90 minut. Následne boli získané dáta zrekonštruované v počítačovom programe Albira Reconstructor. Po rekonštrukcii boli výsledné obrázky vytvorené a analyzované v príslušnom počítačovom programe (PMOD, Technologies Ltd., Zurich, Switzerland).

4.4.6 *Ex vivo* biodistribúcia

Skúmané rádioaktívne značené siderofóry boli po kontrole pH a kvality značenia nariadené 600 μ l fyziologickým roztokom a aplikované retroorbitálne laboratórnym zvieratám. Pri aktivite v rozmedzí 1-2 MBq bolo aplikované množstvo približne 100 μ l roztoku rádioaktívneho siderofóru. Následne sa v intervaloch 30 a 90 minút po aplikácii látky do tela zvieratá usmrtili a ich jednotlivé orgány vybrali a zmeralo sa množstvo rádioaktivity pomocí automatického gama počítaca. Výsledky sa zaznamenávali v krvi, slezine, pankrease, žalúdku, črevách, obličkách, pečeni, srdci, pľúcach, vo svaloch a stehennej kosti. Získaná dáta boli spracované ako percento podanej látky na gram orgánu (%ID/g).

5 Výsledky

5.1. ⁶⁸Ga-Aerobaktín

5.1.1 Rádioaktívne značenie

Po vykonaní testov pre zistenie optimálnych podmienok značenia boli ustanovené nasledujúce hodnoty, 300 µl eluátu bolo pridaných k 10 µg značeného siderofóru a 30 µl acetátového tlmivého roztoku pri reakčnej dobe 15 min za laboratórnej teploty. Tieto reakčné podmienky boli následne používané pre značení ⁶⁸Ga-aerobaktínu pri ďalších experimentoch.

Tabuľka č.1: Optimalizácia podmienok pre značenie aerobaktínu galliom-68 za laboratórnej teploty (LT=25°C).

Množstvo peptidu (µg)	RCHČ (%)
0,1	44,0
1	66,6
5	69,1
10	88,9
20	86,8

Pre úpravu pH na dosiahnutie požadovaných neutrálnych hodnôt 6-7 sme následne pridali podľa potreby acetátový tlmivý roztok. Rádiochemická čistota bola stanovená pomocou tenkovrstvovej chromatografie (ITLC-SG). Nameraná rádiochemická čistota pri použití optimálnych podmienok značenia sa pohybovala okolo 90%.

Tabuľka č.2: Optimalizácia podmienok pre značenie aerobaktínu galliom-68 za laboratórnej teploty (LT=25°C) pri rôznom pH a čase inkubácie.

Reakčná doba (min)	Teplota (°C)	Množstvo peptidu (µg)	RCHČ (%) bez pufru	RCHČ (%) s 30µl pufru	RCHČ (%) so 100µl pufru	RCHČ (%) s 300µl pufru
5	LT	A 10	0,2	77,0	83,8	86
15	LT	A 10	2,9	88,9	85,8	87,9
30	LT	A 10	3,8	84	91,5	90,9

5.1.2. Testy stability

Komplex ^{68}Ga -Aerobaktín mal veľmi nízku hodnotu stability v roztoku konkurenčného kovu $0,1\text{ M FeCl}_3$ a aj v prítomnosti konkurenčného chelátoru 6 mM DTPA . Naopak v ľudskom sére bol testovaný komplex stabilnejší. V časovom intervale 120 min po inkubácii bola zistená hodnota stability ^{68}Ga -aerobaktínu v ľudskom sére zhruba 60% .

Tabuľka č.3: *In vitro* stabilita ^{68}Ga -Aerobaktínu v rôznom prostredí pri 37°C .

Čas (min)	Fe	DTPA	Sérum
30	0,1	8,9	71,4
60	0,1	9,7	72,8
120	0,1	3,2	59,8

5.1.3. Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny

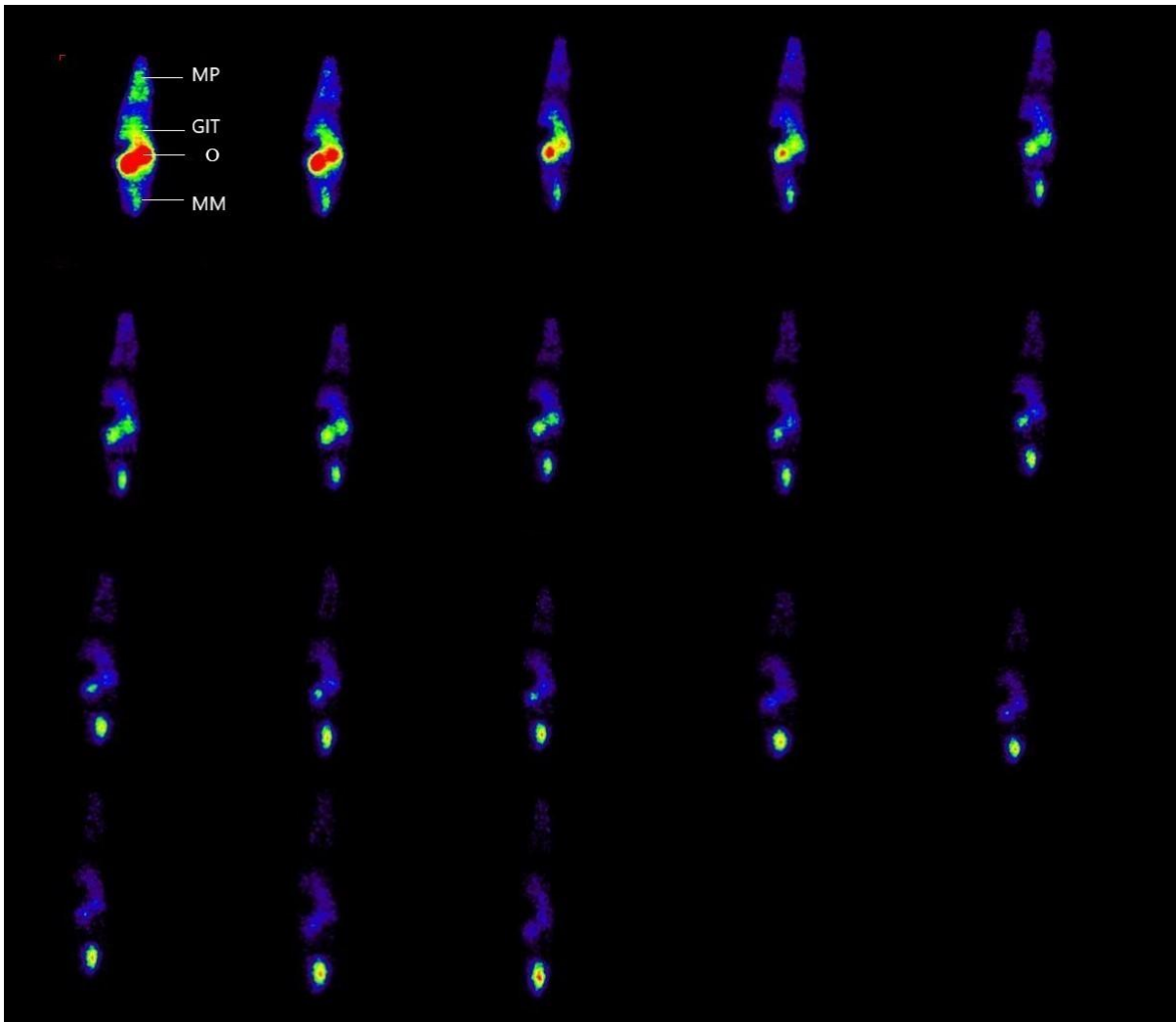
Hodnota rozdeľovacieho koeficientu ($\log P$) pre komplex ^{68}Ga -Aerobaktín, ktorá bola získaná z automatického gama počítacza ako podiel zastúpenia rádioaktivity v oktanolovej a vodnej fáze, bola výpočtom stanovená na $-3,2 \pm 0,1$. Testovaný komplex vykazoval veľmi nízku väzbu na plazmatické proteíny *in vitro*. Namerané hodnoty väzby ^{68}Ga -aerobaktínu na plazmatické proteíny nepresiahli po celou dobu inkubácie 3% .

Tabuľka č.4: Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny u ^{68}Ga -aerobaktínu.

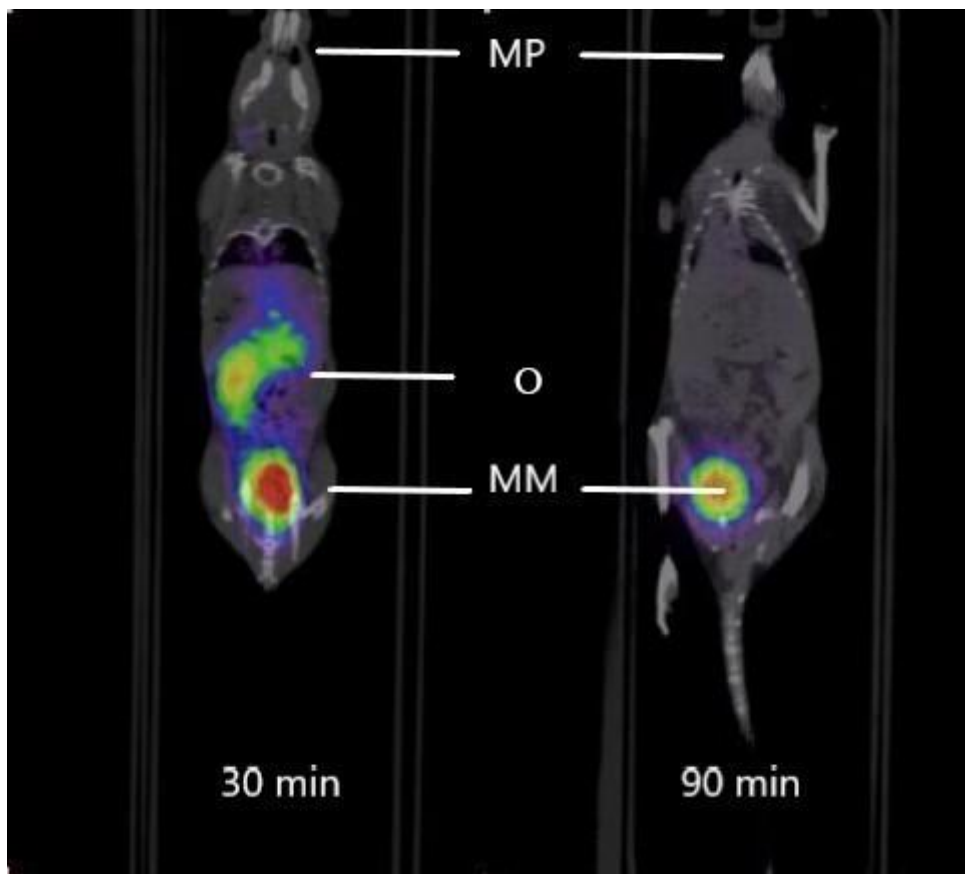
Reakčná doba (min)	Väzba na proteíny (%)	Log P \pm SD (n= 3)
30	1,2	
60	2,3	-3,2 \pm 0,1
120	2,1	

5.1.4. PET/CT zobrazovanie

Dynamické PET zobrazovanie ^{68}Ga -aerobaktínu v laboratórnych myšiach preukázalo relatívne uspokojivé farmakokinetické vlastnosti testovaného komplexu. Po retroorbitálnom vpichu ^{68}Ga -aerobaktínu bolo možné pozorovať pomerne rýchlu distribúciu a elimináciu obličkami do močového mechúra.



Obrázok 16: Záznamy dynamického PET skenu u Aero. Dynamické PET zobrazovanie laboratórnej myši po aplikácii ^{68}Ga -Aerobaktínu po dobu 90 min; koronárne rezy (MM = močový mechúr, O- obličky, GIT = gastrointestinálny trakt, MP = miesto podania).



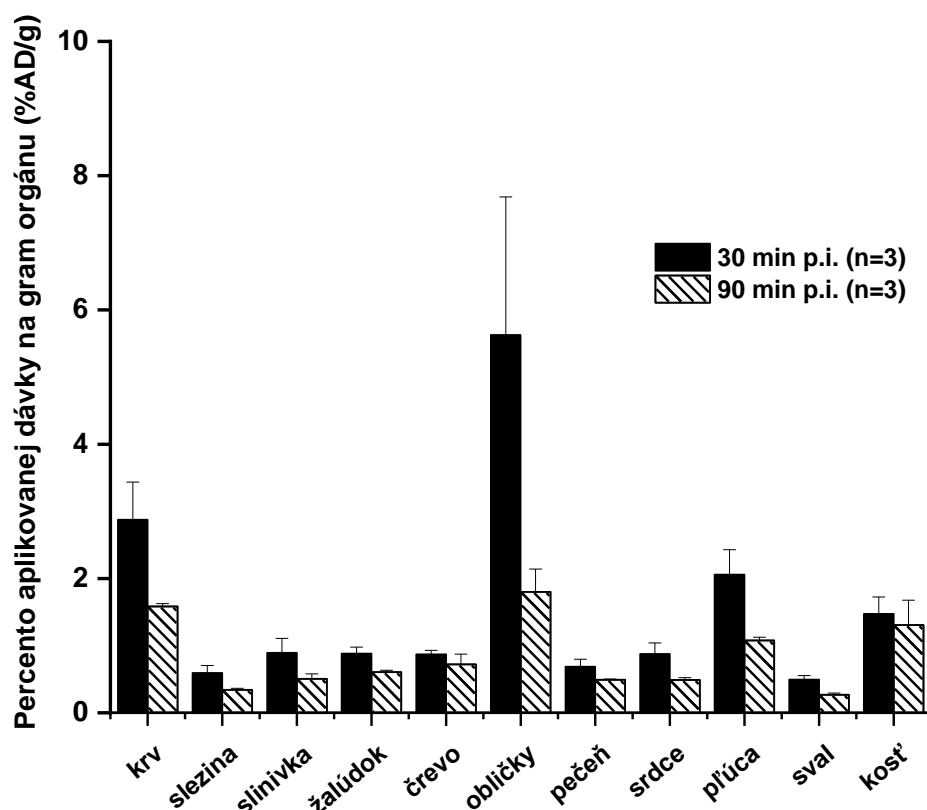
Obrázok 17: Záznam zo statického PET/CT skenu u Aero. Statické PET/CT zobrazovania myši po aplikácii ^{68}Ga -Aerobaktínu pri časovom intervale 30 min (vľavo) a 90 min (vpravo) po aplikácii; koronárne rezy (MP = miesto podania, O - obličky, MM = močový mechúr).

5.1.5. *Ex vivo* biodistribúcia u laboratórnych myší

^{68}Ga -Aerobaktín vykazuje pomerne rýchlu distribúciu z krvného obehu do organizmu s následnou elimináciou primárne cez obličky. 30 minút po aplikácii zmesi bolo možné pozorovať najväčšie nahromadenie podanej látky v obličkách ($5,62 \pm 2,05$ %ID/g), pľúcach ($2,05 \pm 0,06$ %ID/g) a kostiach ($1,47 \pm 0,25$ %ID/g). Zvýšená hodnota rádioaktivity bola zaznamenaná aj v krvi ($2,87 \pm 0,56$ %ID/g). Namerané hodnoty v zvyšných tkanivách a orgánoch 30 min po aplikácii ^{68}Ga -Aerobaktinu neprekročili 1,00 %ID/g.

90 minút po aplikácii ^{68}Ga -aerobaktinu myšiam pokleslo množstvo rádioaktívnej látky v krvi z $2,87 \pm 0,56$ %ID/g na $1,58 \pm 0,04$ %ID/g, a v prípade obličiek došlo k poklesu na hodnotu $1,8 \pm 0,33$ %ID/g. Podobne aj v pľúcach ($1,07 \pm 0,04$ %ID/g) a kostiach ($1,3 \pm 0,36$ %ID/g) došlo k zníženiu akumulácie ^{68}Ga -Aerobaktinu v porovnaní s hodnotami získanými 30 min po aplikácii.

Ex vivo biodistribučná štúdia ^{68}Ga -aerobaktínu potvrdila výsledky získané z PET/CT zobrazovania laboratórnych myší. Náhľad na vyhodnotenie príslušných dát poskytuje graf 1.



Graf 1: *Ex vivo* biodistribúcia ^{68}Ga -Aerobaktínu v laboratórnych myších 30 min a 90 min po aplikácii.

5.2. ^{68}Ga -Enterobaktín

5.2.1. Rádioaktívne značenie

Pri optimalizácii rádioaktívneho značenia enterobaktínu boli vyhodnotené ako ideálne nasledujúce podmienky značenia: 300 μl eluátu, 10 μg značeného siderofóru, 30 μl acetátového tlmivého roztoku, reakčný čas 15 minút pri laboratórnej teplote. Úprava pH následne prebehla pomocou acetátového tlmivého roztoku na požadovanú neutrálnu hodnotu v rozmedzí 6-7. Rádiochemická čistota bola stanovená pomocou ITLC-SG. Zaznamenaná hodnota rádiochemickej čistoty pri optimálnych podmienkach značenia bola zhruba 95%.

Tabuľka č.5: Optimalizácia množstva pre značenie enterobaktínu za laboratórnej teploty (LT= 25°C) s reakčnou dobou 15 min. Zvýraznená hodnota bola vybraná pre ďalšie experimenty.

Množstvo peptidu (µg)	RCHČ (%)
0,1	67,4
1	81,1
5	90,4
10	94,9
20	96,4

Tabuľka č.6: Optimalizácia podmienok pre značenie enterobaktínu galliom-68 za laboratórnej teploty (LT= 25°C) pri rôznom pH a čase inkubácie. Zvýraznené podmienky značenia boli vybrané ako ideálne pre následné experimenty.

Reakčná doba (min)	Teplota (°C)	Množstvo peptidu (µg)	RCHČ (%) bez pufru	RCHČ (%) s 30µl pufru	RCHČ (%) so 100µl pufru	RCHČ (%) s 300µlpufru
5	LT	E 10	11,2	94,0	97,6	95,1
15	LT	E 10	10,3	94,9	97	96,9
30	LT	E 10	8,8	96,3	97,2	97,9

5.2.2. Test stability

V prítomnosti konkurenčného kovu ukázal ⁶⁸Ga-Enterobaktín výraznou nestabilitu už od začiatku merania (30 min po inkubácii), naproti tomu v prítomnosti konkurenčného chelátoru, vykazoval ⁶⁸Ga-Enterobaktin pomerne uspokojivou stabilitu (cca 70 %) i 120 min po inkubácii. Pri testovaní stability ⁶⁸Ga-Enterobaktinu v ľudskom sére boli hodnoty stability pri všetkých sledovaných časoch relatívne vysoké (~90%).

Tabuľka č.7: *In vitro* stabilita ^{68}Ga -Enterobaktínu v rôznom prostredí pri 37°C

Čas (min)	Fe	DTPA	Sérum
30	0,1	88,4	93,2
60	0,1	67,4	93,3
120	0,1	71,7	90,3

5.2.3. Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny

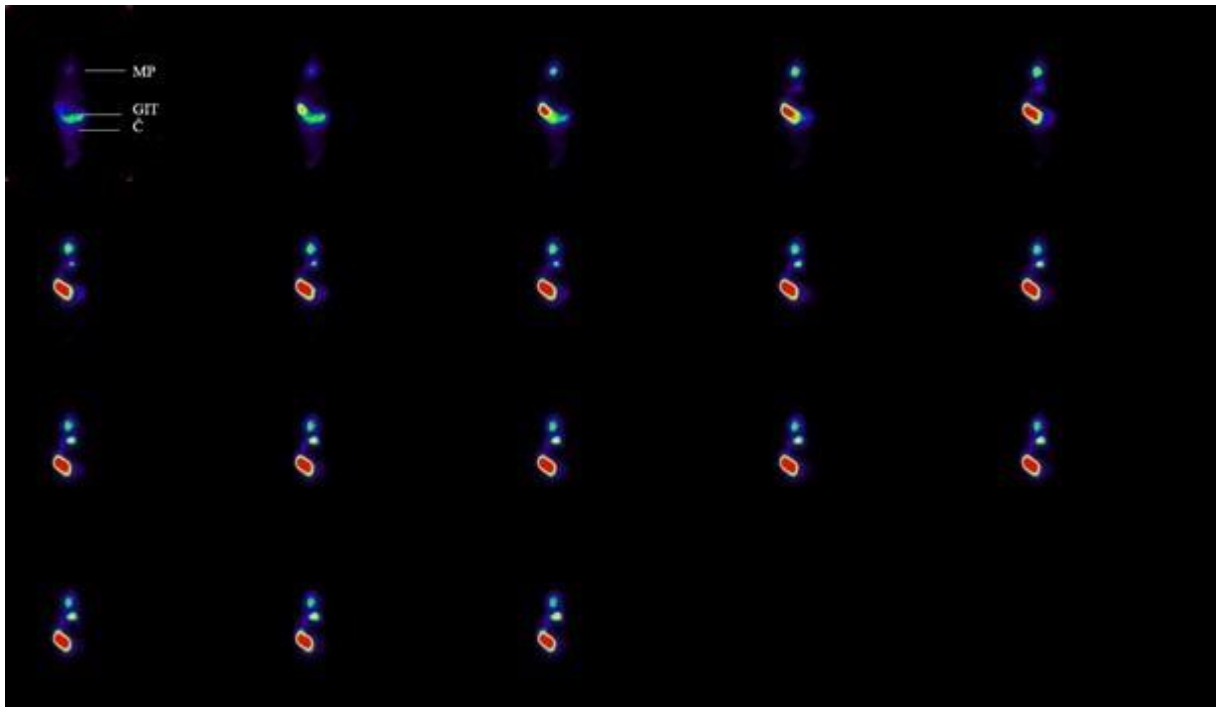
Hodnota rozdeľovacieho koeficientu (log P) ^{68}Ga -Enterobaktínu bola získaná z automatického gama počítača vydelením zastúpenia rádioaktivity v oktanolovej fáze a vo vodnej fáze. Výsledok bol $-3,2 \pm 0,1$. Väzba ^{68}Ga -Enterobaktínu na plazmatické proteíny bola už od prvého sledovaného časového intervalu pomerne vysoká (cca 50 %).

Tabuľka č.8: Rozdeľovací koeficient a väzba na plazmatické proteíny u ^{68}Ga -enterobaktínu.

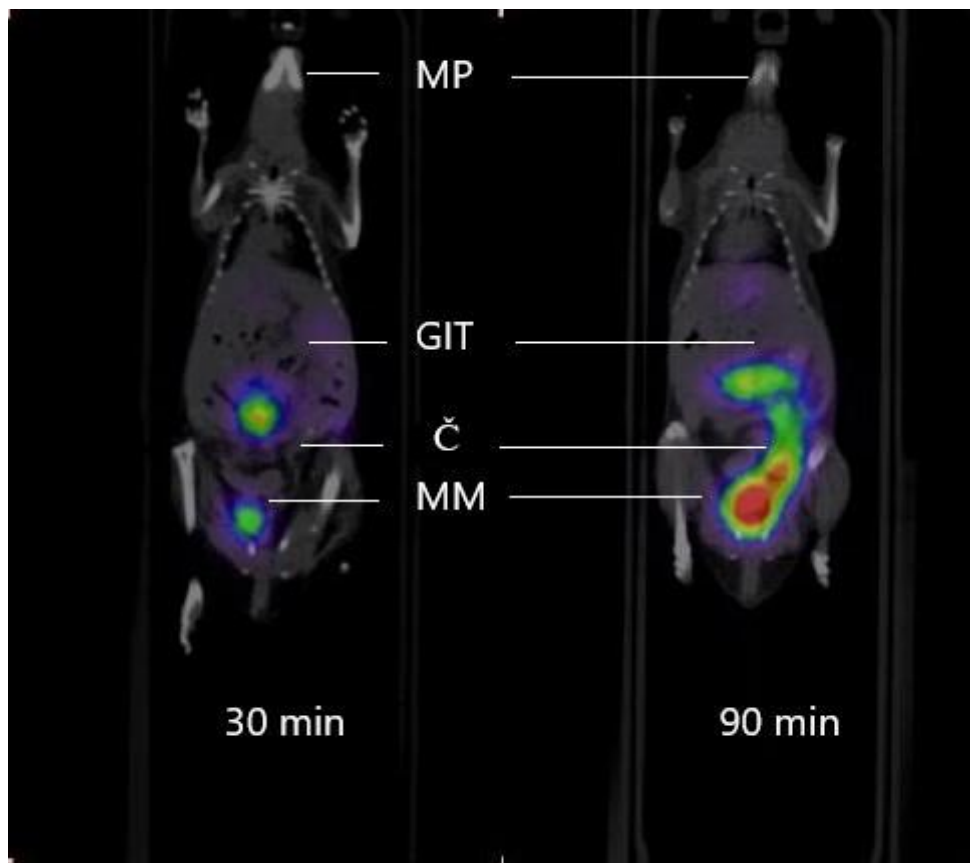
Reakčná doba (min)	Väzba na proteíny	Log P \pm SD (n= 3)
30	54,7	
60	56,6	-3,2 + 0,1
120	55,3	

5.2.4. PET/CT zobrazovanie

Po retroorbitálnej (r. o.) aplikácii bolo možné zaznamenať rýchle spracovanie komplexu organizmom s jeho nahromadením v črevách, ktoré začína už 20 minút po aplikácii látky do tela. Zábery potvrdzujú zachytávanie látky v gastrointestinálnom trakte začínajúce už v prvých piatich minútach. Snímky ďalej poukazujú na vysokú prítomnosť látky v črevách. Najvyššie zaznamenaná hodnota signálu bola práve v GIT. ^{68}Ga -Entb sa následne vychytáva organizmom v ľadvinách. Tieto zábery slúžia ako vizuálne potvrdenie meraní znázornených v nižšie priloženom grafe 2.



Obrázok 18: Záznamy dynamického PET skenu u Ent. Dynamické PET zobrazovanie laboratórnej myši po aplikácii ^{68}Ga -Enterobaktínu po dobu 90 min; koronárne rezy (MP = miesto podania, GIT = gastrointestinálny trakt, Č-črevá).



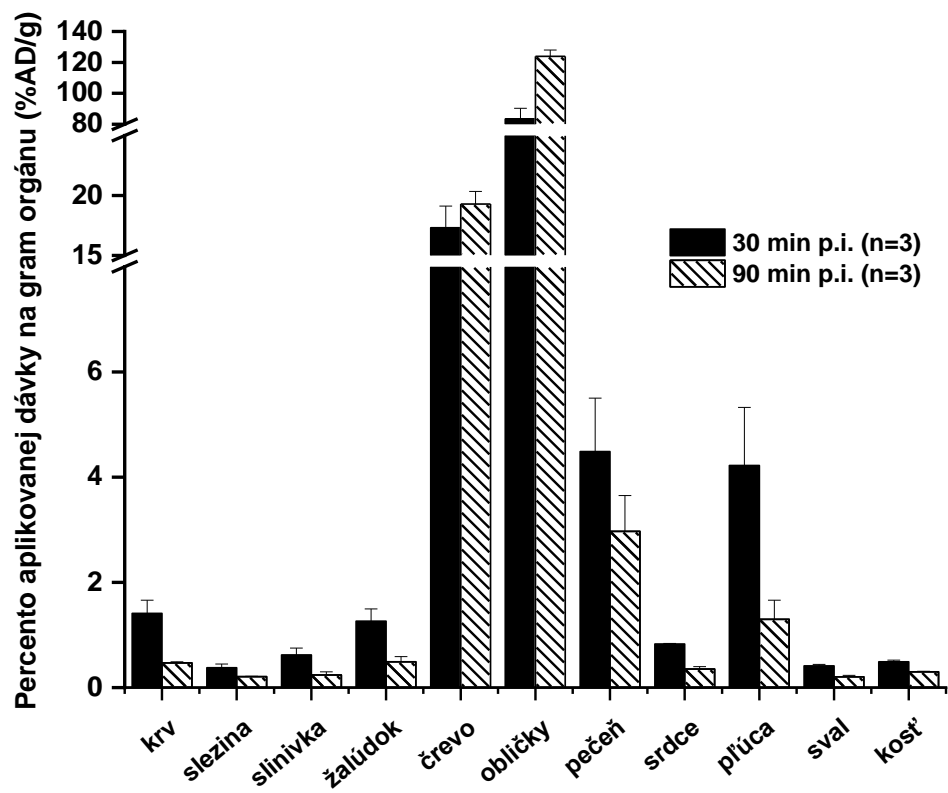
Obrázok 19: Záznam zo statického PET/CT skenu u Ent. Statické PET/CT zobrazovanie laboratórnej myši po aplikácii ^{68}Ga -Enterobaktínu pri časovom intervale 30 min (vľavo) a 90 min (vpravo) po aplikácii; koronárne rezy (MP = miesto podania, GIT- gastrointestinálny trakt, Č- črevá, MM = močový mechúr).

5.2.5. *Ex vivo* biodistribúcia u myší

Študovaný komplex ^{68}Ga -Enterobaktínu preukazuje pomerne rýchlu distribúciu z krvi s výrazným nahromadením a retenciou v obličkách a črevách. Zvýšená akumulácia rádioaktivity bola zaznamenaná tiež v pečeni a pľúcach. 30 minút po aplikácii bolo zaznamenané najväčšie nahromadenie sledovanej látky v obličkách s hodnotou $83,45 \pm 6,79\% \text{ID/g}$ a v prípade čriev s hodnotou $17,3 \pm 1,8\% \text{ID/g}$. V prípade pľúc sa hodnoty pohybovali na úrovni $4,22 \pm 1,1\% \text{ID/g}$ a u pečene bola zaznamenaná hodnota $4,48 \pm 1,01\% \text{ID/g}$.

90 minút po aplikácii bolo možné pozorovať výskyt najvyššie nameranej hodnoty rádioaktivity v obličkách ($123,91 \pm 4,03\% \text{ID/g}$). Vyššia akumulácia sa tiež potvrdila v prípade čriev, kde bol zaznamenaný vzostup na $19,28 \pm 1,04\% \text{ID/g}$. Prítomnosť rádioaktivity v pľúcach bola stanovená ako $1,29 \pm 0,36\% \text{ID/g}$.

Náhľad na vyhodnotenie príslušných dát poskytuje graf 2.



Graf 2: Ex vivo biodistribúcia komplexu ^{68}Ga -Enterobaktínu u laboratórnych myši 30 min a 90 min po aplikácii.

6 Diskusia

Infekčné ochorenia predstavujú jeden z najzávažnejších problémov dnešnej doby. Sú spôsobené organizmami ako sú baktérie, vírusy, huby a parazity. Môžu byť prenášané na človeka z človeka, zo zvierat'a či hmyzu, alebo cez kontaminované prostredie ako napr. znečistený vzduch, pôda alebo voda. Sila prepuknutej infekcie určuje intenzitu symptómov, medzi ktoré radíme únavu, horúčku, hnačku, bolesti svalov, kašeľ, atď. Niektorým infekčným ochoreniam sa dá predísť vakcináciou, napr. kiahne alebo osýpky (Lakshmi, P. K., 2007). Medzi rokmi 1940 a 2004 bol zaznamenaný v ľudskej populácii na globálnej škále príchod okolo 335 infekčných ochorení. Hlavným vznikom týchto ochorení je prirodzená evolúcia kmeňov patogénov ako reakcia na plošné používanie antibiotík, napr. multi-liečivová rezistentná tuberkulóza alebo chlorochín-rezistentná malária, alebo patogény, ktoré vstúpili do ľudskej populácie prvý krát, ako napr. HIV-1, SARS. Najnovšie sa na zoznam v roku 2019 pripísalo ochorenie COVID 19. Bol zaznamenaný aj trend vzostupu ochorení, ktoré boli považované za eliminované v populácii, ako napr. borelióza. (Jones, K.E., *et al.* 2008). Dôležitá je však skutočnosť, že veľká časť z týchto ochorení vychádza aj z terapeutického a diagnostického prístupu k pacientom. Práve z tohto dôvodu je zrejma dôležitosť správnej liečby ochorenia, ktorá stojí na presnej a včasnej diagnostike.

Dnešná analýza bakteriálnych infekcií spočíva v diagnóze klinických symptómov a v analýze telových tekutín, ako napr. krvi alebo moču pričom vyhodnotenie vychádza z biologických a genetických testov a pomocou hmotnostnej spektrometrie. Analýza telových tekutín nie je dostačujúca na zachytenie infekcie v rannom štádiu v štruktúrach ako sú napr. srdce, mozog alebo implantáty. Práve pre takéto prípady, prinášajú neinvazívne zobrazovacie techniky potenciál na skorú a správnu diagnostiku ochorenia (Peukert, C., *et al.*, 2021).

Zobrazovacie techniky nukleárnej medicíny by mohli nájsť svoje využitie pri diagnostike infekčných ochorení pri nešpecifickej lokalizácii choroboplodných ložísk alebo napomáhať pri navigácii v prípade invazívnych vyšetrení. Topografické zobrazovacie metódy, ako napr. PET alebo SPECT, sú veľmi citlivé neinvazívne techniky s dobrým rozlíšením a vysokou citlivosťou. Ich prípadná špecifickosť závisí od vhodne navrhnutých rádiofarmak. Za špecifickejšie metódy pri diagnostike infekčných ochorení môžu byť považované neinvazívne hybridné systémy PET/CT a PET/MRI, ktoré umožňujú súčasne skúmať anatómiu a funkciu daného tkaniva či orgánu.

Siderofóry sú nízkomolekulárne organické biochelátory produkované

mikroorganizmami za účelom získania a skladovania esenciálneho železa z vonkajšieho prostredia. Majú vysokú afinitu k železitým iónom, ktoré patria k esenciálnej výžive a majú vplyv aj na virulenciu mnohých patogénov (Winkelmann, G., 1991; Haas, H., 2003).

Rádiofarmaka sú špeciálne pripravené rádioaktívne látky používané na diagnostické a liečebné účely. Skladajú sa z nerádioaktívnej časti- farmaka, ktorá je zodpovedná za jeho selektívne vychytávanie v sledovanom tkanive či orgáne a malého množstva rádioaktívnej značky, ktorá svojím žiarením umožňuje vizuálne zobrazenie podanej látky v tkanive pomocou špeciálneho prístroja. Pre správne kovalentné naviazanie rádiofarmaka k sledovanej molekule je potrebné použiť bifunkčné chelatačné činidlá (Kupka, K, J., 2015). Bifurkačný chelátor je chelát s reaktívnou funkčnou skupinou, ktorý zaisťuje kovalentnú väzbu s molekulou vektora a vytvorí stabilný komplex s rádioaktívnym kovom (Krupka, K., *et al.*, 2015; Nabi, H.A., *et Doerr*, R.J., 1992).

Základné podmienky, ktoré musí rádionuklid splniť aby bol schválený na klinické používanie sú ľahká dostupnosť, vhodný polčas rozpadu a jednoduché a rýchle značenie v prípade rádiofarmak. Momentálne sa pre prípravu a štúdium nových rádiofarmak používa izotop ^{68}Ga , ktorého polčas rozpadu je 68 minút a je možné ho získať z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátora. Výhody generátorového ^{68}Ga vychádzajú z ľahkej dostupnosti rádionuklidu bez potreby cyklotrónu a možnosti priameho značenia. Najrozšírenejším chelatačným činidlom pre rôzne rádioaktívne kovy je 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (DOTA). Aj napriek odsledovanému nárastu používania gáliom značených rádiofarmak počet alternatív k DOTA chelátoru pre konjugáciu s biomolekulami je značne obmedzený a nové bifurkačné chelatačné činidlá, ako sú siderofóry, by mohli pomôcť ďalšiemu rozvoju rovnakého typu rádiofarmak (Velikyan, I., 2014).

Niektoré alternatívne prístupy na identifikáciu špecifického kmeňa baktérií popisujú označenie bielych krviniek alebo protilátok pomocou ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, alebo ^{111}In . Tento prístup sa využíva u zobrazovaní osteomyelitídy a infekcií protetických kĺbov (Peukert, C., *et al.*, 2021). Rádiofarmaka používané v onkológii sú navrhnuté tak, aby sa špecificky kumulovali v nádorových tkanivách. Medzi prvé a najpoužívanejšie rádiofarmakum používané v klinickej praxi pre diagnostiku nádorových ochorení patrí ^{18}F -fluorodeoxyglukóza (^{18}F -FDG). Medzi ďalšie používané rádiofarmaká patrí napr. ^{18}F FLT, ^{11}C -methionin a ^{18}F -tryptofan. Tieto látky však majú aj svoje obmedzenia a nevýhody. Napríklad v prípade ^{18}F -FDG môže jej použitie viesť k falošne pozitívnym aj falošne negatívnym výsledkom kvôli jej nešpecifickému

vychytávaníu v prípade zámény nádorových buniek za infekciu alebo zápal. Práve z tohto dôvodu sa naďalej hľadajú a testujú nové biologicky aktívne látky, ktoré by mohli po rádioaktívnom označení slúžiť ako špecifické rádiofarmaka (Doležalová, I., *et al.*, 2014).

Táto práca sa zaoberá hľadaním optimálnych podmienok prípravy, testovaním *in vitro* charakteristík, sledovaním *in vivo* kinetiky a biodistribúcie dvoch vybraných siderofórov-aerobaktínu (Aero) a enterobaktínu (Ent) za účelom vyhodnotiť ich potenciál pre rádiodiagnostiku infekčných ochorení. Značenie siderofórov prebehlo pomocou rádioaktívneho $^{68}\text{Ga}^{3+}$, jeho použitie nebolo náhodné ale bolo vybrané pre jeho ľahkú dostupnosť z generátora $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru a pre jeho podobné vlastnosti s Fe^{3+} .

Rádioaktívne značenie oboch siderofórov bolo nenáročné a rýchle. Rádiochemická čistota značenia bola pomerne vysoká, značenie prebiehalo po dobu 15 minút za laboratórnej teploty. Stabilita komplexu ^{68}Ga -Ent v krvnom sére bola vysoká, v prípade ^{68}Ga -Aero boli hodnoty o trochu nižšie. Naopak *in vitro* stabilita v prítomnosti konkurenčného chelatačného činidla DTPA a FeCl_3 bola veľmi nízka u ^{68}Ga -Aero a polovičná v prípade ^{68}Ga -Ent. V prípade roztoku FeCl_3 dochádzalo pravdepodobne k zámene katiónu gália za katión železa a v prípade roztoku DTPA dochádzalo pravdepodobne k translokácií $^{68}\text{Ga}^{3+}$ z komplexu so siderofórmí do komplexu s DTPA.

Hodnota rozdeľovacieho koeficientu ($\log P$) pre oba siderofóry bola $-3,2 \pm 0,1$. Hodnota poukazuje na nízku lipofilitu komplexov, čo odkazuje na ich vhodnú *in vivo* aplikáciu. Väzba na plazmatické proteíny bola najvyššia zaznamenaná pri 60 minútovej inkubácii a rovnala sa v prípade ^{68}Ga -Aero komplexu iba 2,3%, čo poukazuje na rýchlu metabolizáciu podanej látky. V prípade ^{68}Ga -Ent komplexu bola zaznamenaná najvyššia hodnota v rovnakom časovom intervale a to 56,6%. Sledovanie absorpcie študovaných komplexov poukázalo na *ex vivo* nahromadenie ^{68}Ga -Ent komplexu v mikroflóre gastrointestinálneho traktu a obličkách zatiaľ čo komplex ^{68}Ga -Aero bol nahromadený hlavne v obličkách a krvi.

In vivo chovanie študovaných látok v laboratórnych myšiach bolo sledované pomocou hybridného zobrazovacieho systému PET/CT. Farmakokinetika komplexu ^{68}Ga -Aero bola pomerne rýchla, už po 90 minútach bol zaznamenaný rapidný pokles rádiofarmaka. K eliminácii sledovaného komplexu dochádzalo primárne cez obličky a moč a nebola pozorovaná akumulácia alebo vytvorenie špecifickej väzby medzi inými tkanivami alebo orgánmi. Z nameraných hodnôt rádioaktivity z odobraných zvieracích orgánov bola

zaznamenaná najvyššia hodnota aktivity 30 minút po podaní látky v obličkách, pľúcach, kostiach a krvi. Už 90 minút po podaní látky sme sledovali pokles o 32%. V prípade komplexu ^{68}Ga -Ent sme sledovali pomalé odbúravanie podanej látky. K eliminácii pozorovaného komplexu dochádzalo postupne cez o pečeň, obličky a moč s akumuláciou v pľúcach a gastrointestinálnom trakte. Z nameraných hodnôt aktivity bola 30 minút po podaní najvyššia zaznamenaná hodnota v prípade obličiek s postupným poklesom hodnôt v prípade gastrointestinálneho traktu, pečeni, pľúc a krvi. V intervale 90 minút po podaní bol sledovaný nárast hodnôt rádioaktivity s najvyššími hodnotami v prípade obličiek a gastrointestinálneho traktu.

Získané výsledky boli porovnané s inými testovanými siderofórmami, ako napr. desferioxamín B (DFOB), triacetylfusarinín C (TAFC) a ferrioxamín E (FOX E). ^{68}Ga značený DFOB patrí medzi najvyužívanejšie siderofóry v klinickej praxi práve preto, že vykazuje hydrofilné vlastnosti a pomerne nízku väznosť na proteíny spolu s vysokou stabilitou v ľudskom sére a PBS. *In vitro* štúdie poukázali na jeho potencionálne využitie ako xenosiderofóru, práve pre jeho značný príjem rôznorodými mikroorganizmami v mikrobiálnych kultúrach. Príjem siderofórov je zvyčajne odlišný u Gram-pozitívnych a Gram-negatívnych baktérií avšak DFOB je jednou z výnimiek. Použitím DFOB nedochádzalo k vychytávaniu nešpecifickými tkanivami (Petřík, M., *et al.*, 2020).

Značený TAFC je hydrofilná látka ktorá vykazuje vysokú rádiochemickú čistotu aj stabilitu vzniknutého komplexu s rýchlym odbúravaním sa v organizme cez obličky do moču. Záznamy z *ex vivo* biodistribúcie komplexu ^{68}Ga -TAFC poukázali na fakt, že komplex nie je vychytávaný ani zadržovaný nešpecifickou väzbou v žiadnom ďalšom tkanive. Porovnaním s aerobaktínom sledujeme pokles v stabilite v prípade použitia ľudského séra aj DTPA. Enterobaktín vykazoval nižšiu farmakokinetiku s rádovo odlišnou schopnosťou viazať sa na proteíny ale testy stability vyšli porovnateľne (Petřík, M., *et al.*, 2014).

V prípade značeného FOX E bola zaznamenaná porovnateľne vysoká čistota aj stabilita komplexu s odbúravaním sa v organizme cez obličky. Rovnako bolo zaznamenané nešpecifické vychytávanie značeného komplexu mikroflórou v gastrointestinálnom trakte ako tomu bolo aj v prípade testovaného komplexu ^{68}Ga -enterobaktínu. Obe testované látky mali nižšie namerané hodnoty stability než ^{68}Ga -FOX E komplex (Petřík, M., *et al.*, 2014).

In vitro a *in vivo* vlastnosti testovaných ^{68}Ga -siderofórov nie sú v porovnaní s ďalšími študovanými rádioaktívne značenými siderofórmami optimálne ale k definitívnemu vyhodnoteniu

ich potenciálneho použitia pre diagnostiku infekčných ochorení je nevyhnutné vykonať experimenty na mikrobiálnych kultúrach a zvieracích infekčných modeloch.

7 Záver

Táto bakalárska práca bola zameraná na prípravu, *in vitro* charakterizáciu a štúdium farmakokinetických vlastností vybraných ^{68}Ga -siderofórov v laboratórnych myšiach. Testované siderofóry boli vybrané pre ich možné využitie pre diagnostikovanie infekčných ochorení pomocou zobrazovacích techník nukleárnej medicíny. Obidva testované siderofóry, aerobaktín aj enterobaktín, boli za laboratórnej teploty rádioaktívne označené izotopom ^{68}Ga s vysokou rádiochemickou čistotou. Nasledovali testy stability v ľudskom sére a v prostredí nadbytku konkurenčného kovu a chelátoru. Následne bol zistený rozdeľovací koeficient zmesi na základe zastúpenia rádioaktivity v oktanolovej a vodnej fáze. Inkubáciou v rôznom časovom rozmedzí pri stálej teplote odpovedajúcej hodnote teploty ľudského tela sa sledovala väzba na plazmatické proteíny. ^{68}Ga -aerobaktín aj ^{68}Ga -enterobaktín boli podané retroorbitálne laboratórnym myšiam a bolo vykonané dynamické aj statické PET/CT zobrazovanie pomocou zobrazovacieho systému pre malé zvieratá a konvenčná *ex vivo* biodistribúčná štúdia.

Oba skúmané siderofóry bolo možné rádioaktívne označiť gáliom-68 s pomerne vysokou rádiochemickou čistotou. ^{68}Ga -aerobaktín vykazoval hydrofilný charakter, nízku väzbu na plazmatické bielkoviny a značnú *in vitro* nestabilitu v testovaných médiách. *In vitro* testovanie ^{68}Ga -enterobaktínu ukázalo hydrofilný charakter tohto komplexu, jeho celkom uspokojivú stabilitu, ale pomerne vysokú väzbu na plazmatické bielkoviny. *In vivo* výsledky získané z PET/CT zobrazovania ukázali v prípade komplexu ^{68}Ga -aerobaktínu nahromadenie podanej látky v obličkách a krvi. V prípade komplexu ^{68}Ga -enterobaktínu išlo o nahromadenie značenej látky v obličkách, črevách (pravdepodobne čiastočná väzba na GIT mikroflóru), pečeni a pľúc. *Ex vivo* biodistribučné štúdie potvrdili výsledky získané z PET/CT záznamov.

Vykonané experimenty poukazujú na to, že galliom-68 značený aerobaktín ani enterobaktín nevykazujú optimálne *in vitro* a *in vivo* vlastnosti v porovnaní s inými rádioaktívne značenými siderofórmami. Ich potenciál pre použitie k detekcii mikrobiálnych infekcií pomocou zobrazovacích metód sa teda javí ako nepríliš vysoký avšak k definitívnemu rozhodnutiu bude potrebné ešte otestovať látky na bakteriálnych kultúrach a na zvieracích modeloch infekcie.

8 Literatúra

Accorsi, R. (2008): Brain single-photon emission CT physics principles. *American Journal of Neuroradiology*, 29, 7, 1247-1256.

Adjimani, J.P., Emery, T. (1988): Stereochemical aspects of iron transport in *Mycelia sterilia* EP-76. *Journal of Bacteriology*, 170, 3, 1377-9.

Ahmed, E., Holmström, S. J. (2014): Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology* 7, 3, 196–208.

Allen, C. E., and Schmitt, M. P. (2009): HtaA is an iron-regulated hemin binding protein involved in the utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal Bacteriology*, 191, 2638–2648.

Andrews, S. C., Robinson, A. K., Rodriguez-Quinones, F. (2003): Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 215–237.

Ardon, O., Nudelman, R., Caris, C., Libman, J., Shanzer, A., Chen, Y., Hadar, Y. (1998): Iron uptake in *Ustilago maydis*: tracking the iron path. *Journal Bacteriology*, 180, 2021–2026.

Arifin, A. J., Hannauer, M., Welch, I., and Heinrichs, D. E. (2014): Deferoxamine mesylate enhances virulence of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*, 16, 967.

Armstrong, S. K., G. S. Pettis, L. J. Forrester, McIntosh, M.A. (1989): The *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis gene. entD: nucleotide sequence and membrane localization of its protein product. *Molecular Microbiology*, 3, 757-766.

Aznar, A., Dellagi, A. (2015): New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany Advance Access* 66, 11.

Bailey, D.C., Alexander, E., Rice, M.R., Drake, E.J., Mydy, L.S., Aldrich, C.C., Gulick, A.M. (2018): Structural and functional delineation of aerobactin biosynthesis in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Biological Chemistry*, 293, 20, 7841–7852.

Bělohávek, O. (2009): Pozitronová emisní tomografie, Klinické PET a PET/CT, 13-20, Galén, Praha.

Bělohávek, O., Kabičková E. (2003): Pozitronová emisní tomografie v diagnostice dětských nádorů. Klinická onkologie 16, 97-99, ApS BRNO, spol. s.r.o.

Benamor, M., Ollivier, L., Brisse, H., Moulin-Romsee, G., Servois, V., Neuenschwander, S. (2007): PET/CT imaging: what radiologists need to know. Cancer Imaging, 1,7 A, S95-9.

Benz, G., Schröder, T., Kurz, J., Wünsche, C., Karl, W., Steffens, G., Pfitzner, J., Schmidt, D. (1982): Konstitution der Desferriform der Albomycine δ_1 , δ_2 , ϵ Angewandte Chemie International, 21,1322–1335.

Berger, A. (2003): How does it work? Positron emission tomography. British Medical Journal, 28, 326, 7404,1449.

Berti, V., Pupi, A., Mosconi, L. (2011): PET/CT in diagnosis of dementia. Annals of the New York Academy of Sciences, 1228, 81–92.

Bindereif, A., Neilands, J.B. (1985): Aerobaction genes in clinical isolates of *Esterichia coli*, Journal of Bacteriology, 161, 727-735.

Biswas, G. D., and Sparling, P. F. (1995): Characterization of lbpA, the structural gene for a lactoferrin receptor in Neisseria gonorrhoeae. Infection and Immunity, 63, 2958–2967.

Bohdiewicz, P.J. (1998): Indium-111 Satumomab Pendetide: The First FDA-Approved Monoclonal Antibody for Tumor Imaging, Journal of nuclear medicine technilogy, 26, 3, 155-163.

Borgna-Pignatti, C., Rugolotto, S., De Stefano, P., Zhao, H., Cappellini, M.D., Del Vecchio, G.C., Borgna-Pignatti, C., Rugolotto, S., De Stefano, P., Zhao, H., Cappellini, M.D., Romeo, M.A., Forni, G.L., Gamberini, M.R., Ghilardi, R., Piga, A., Cnaan, A. (2004): Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. Haematologica 89, 1187-93.

Börjesson, P.K., Jauw, Y.W., Boellaard, R., de Bree, R., Comans, E.F., Roos, J.C., Castelijns, J.A., Vosjan, M.J., Kummer, J.A., Leemans, C.R., Lammertsma, A.A., van Dongen, G.A. (2006): Performance of immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. Clin Cancer Res, 12, 7, 2133-40.

Boulton, I. C., Gorrige, A. R., Allison, N., Robinson, A., Gorinsky, B., Joannou, C. L. (1998): Transferrin-binding protein B isolated from *Neisseria meningitidis* discriminates between apo and diferric human transferrin. *Biochemical Journal*, 334, 269–273.

Braun, V., Braun, M. (2002): Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Current pinion in Microbiology* 5, 194-201.

Braun, V., Pramanik, A., Gwinner, T., Köberle, M., Bohn, E. (2009): Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals* 22, 1, 3-13.

Brittenham, G.M., Griffith, P.M., Nienhuis, A.W., McLaren, C.E., Young, N.S., Tucker, E.E., Allen, C.J., Farrell, D.E., Harris, J.W. (1994): Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *The New England Journal of Medicine*, 331, 567-73.

Brock, J.H. (1999): Benefits and dangers of iron during infection. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2, 6, 507-10.

Brochu, A., Brochu, N., Nicas, T.I., Parr, T.R. Jr., Minnick, A.A. Jr., Dolence, E.K., McKee, J.A., Miller, M.J., Lavoie, M.C., Malouin, F. (1992): Modes of action and inhibitory activities of new siderophore-beta-lactam conjugates that use specific iron uptake pathways for entry into bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 2166-75.

Cadieux, B., Lian, T., Hu, G., Wang, J., Biondo, C., Teti, G. (2013): The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Infectious Diseases*, 207, 1339–1347.

Cane, D. E., Khosla, C., Walsh, C. (1998): Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* 282, 63-68.

Carbonetti, N.H., Williams, P.H. (1984): A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid CoIV-K30. *Infection and Immunity*, 46, 7-12.

Carrano, C.J., Raymond, K.N. (1979): Ferric ion sequestering agents. 2. Kinetics and Mechanism of iron removal from transferrin by Enterobactin and synthetic tricatechols. *Journal of the American Chemical Society*, 101, 18, 5401-5404.

Carvalho, C.C.C.R., Fernandes, P. (2014): Siderophores as “Trojan Horses“ : Tackling

multidrug resistance? *Frontiers in Microbiology*, 5, 290.

Cassat, J. E., Skaar, E. P. (2013): Iron in infection and immunity. *Cell host & microbe*, 13, 5, 509–519.

Cattel L., Ceruti M., Dosio F. (2003): From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *Tumori* 89, 237-249.

Caza, M., Kronstad, J.W. (2013): Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 80.

Cloonan, S. M., Glass, K., Laucho-Contreras, M. E., Bhashyam, A. R., Cervo, M., Pabon, M. A., Konrad, C., Polverino, F., Siempos, II, Perez, E., Mizumura, K., Ghosh, M. C., Parameswaran, H., Williams, N. C., Rooney, K. T., Chen, Z. H., Goldklang, M. P., Yuan, G. C., Moore, S. C., Demeo, D. L., Rouault, T. A., D'Armiento, J. M., Schon, E. A., Manfredi, G., Quackenbush, J., Mahmood, A., Silverman, E. K., Owen, C. A., and Choi, A. M. (2016): Mitochondrial iron chelation ameliorates cigarette smoke-induced bronchitis and emphysema in mice. *Nature Medicine*, 22, 163.

Committee Opinion No. 723 (2017): Guidelines for Diagnostic Imaging During Pregnancy and Lactation. *Obstet Gynecol*, 130, 4, 210-216. doi: 10.1097/AOG.0000000000002355.

Corey, E. J., Bhattacharyya, S. (1977): Total synthesis of enterobactin, a macrocyclic iron transporting agent of bacteria. *Tetrahedron Lett.* No 45, 3919–3922.

Cornelis, P. (2010): Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1637–1645.

Cornelissen, C. N., Biswas, G. D., Tsai, J., Paruchuri, D. K., Thompson, S. A., and Sparling, P. F. (1992): Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *Journal of Bacteriology*, 174, 5788–5797.

Cornelissen, C. N., Sparling, P. F. (1996): Binding and surface exposure characteristics of the gonococcal transferrin receptor are dependent on both transferrin-binding proteins. *Journal of Bacteriology*, 178, 1437–1444.

Crichton, R. R. (2009): Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences. John Wiley & Sons, a comprehensive review, *Agriculture* 61, 97-114.

Crosa, J. H., Walsh, C. T. (2002): Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66, 2, 223–249.

D'Onofrio A., Crawford J. M., Stewart E. J., Witt K., Gavrish E., Epstein S., Clardy J., et Lewis K. (2010): Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry and Biology*, 17, 254.

de Barros, A.B., Tsourkas, A., Saboury, B., Cardoso, V.N., Alavi, A. (2012): Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2, 39.

de Lorenzo V., Bindereif A., Paw B.H., Neilands J.B. (1986): Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 165, 2, 570-8.

de Lorenzo V., Neilands J.B. (1986): Characterization of *iucA* and *iucC* genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 167, 1, 350-5.

De Pascale, G., Nazi, I., Harrison, P.H., Wright, G.D. (2011): β -Lactone natural products and derivatives inactivate homoserine transacetylase, a target for antimicrobial agents. *Journal of Antibiotics*, 64, 483–487.

de Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Barry III, C.E. (1999): Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 181, 4443–4451.

Dell'mour, M., Schenkeveld, W., Oburger, E., Fischer, L., Kraemer, S., Puschenreiter, M., Lämmerhofer M, Koellensperger G, Hann S (2012): Analysis of iron-phytosiderophore complexes in soil related samples: LC-ESI-MS/MS versus CE-MS. *Electrophoresis*, 33, 4, 726-33.

Desai, A., Bekelis, K., Thadani, V.M. (2013): Interictal PET and ictal subtraction SPECT: sensitivity in the detection of seizure foci in patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 54, 341–350.

Doležalová, I., Bolčák, K., Kuba, R. (2014): Využití pozitronové emisní tomografie (PET) v

neurologii. *Neurologie pro praxi*, 15, 16-21.

Donadio, S., Monciardini, P., Sosio, M. (2007): Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *National Product Reports*, 24, 1073–1109.

Drago-Serrano, M. E., Parra, S. G., and Manjarrez-Hernandez, H. A. (2006): EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiology Letters*, 265, 35–40.

Drakesmith, H., Prentice, A. (2008). Viral infection and iron metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 7, 541–552.

Earhart, C. F. (1996): Uptake and metabolism of iron and molybdenum, p. 1075-1090. *In* F. C. Neidhardt et al. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Ecker, D.J., Emery, T. (1983): Iron uptake from ferrichrome A and iron citrate in *Ustilago sphaerogena*. *Journal of Bacteriology*, 155, 2, 616-22.

Endicott, N.P., Lee, E., Wencewicz, T.A. (2017): Structural Basis for Xenosiderophore Utilization by the Human Pathogen *Staphylococcus aureus*. *ACS Infectious Diseases*, 3, 542–553.

Escolar, L., Pérez-Martín, J., de Lorenzo, V. (1999): Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the fur protein. *Journal of Bacteriology*, 181, 6223–6229.

Faraldo-Gomez, J. D., Sansom, M. S. (2003): Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 4, 105–116.

Fecker, L., Braun, V. (1983): Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 156, 1301–1314.

Felmler, T., Pellett, S., and Welch, R. A. (1985). Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *Journal of Bacteriology*, 163, 94–105.

Ferguson, A. D., and Deisenhofer, J. (2002): TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565, 318–332.

Flora, S.J.S. (2013): *Bioinorganic Fundamentals and Applications: Metals in Natural Living Systems and Metals in Toxicology and Medicine*. Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition). Elsevier 987-1013. ISBN 9780080965291

Fraum, T.J., Fowler, K.J., McConathy, J. (2016): PET/MRI:: emerging clinical applications in oncology. *Academic Radiology*, 23, 220–236.

Gabutti, V., Piga, A. (1996): Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematologica*, 95, 26-36.

Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., Schalk, I. J. (2017): Iron release from the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves three new actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chemical Biology*, 12, 1056–1065.

Ganz, T. (2006): Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *The American Society of Hematology Education Program*, 29-35, 507.

Ganz, T., Nemeth, E. (2015): Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Review Immunology*, 15, 8, 500-10.

Garbuzenko, O., Barenholz, Y., Priev, A. (2005): Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer, *Chemistry and Physics of Lipids*, 135, 117–129.

Gause, G.F. (1955): Recent studies on albomycin, a new antibiotic. *British Medical Journal*, 2, 4949, 1177-9.

Ghosh, M., Lin, Y.M., Miller, P.A., Möllmann, U., Boggess, W.C., Miller, M.J. (2018): Siderophore Conjugates of Daptomycin are Potent Inhibitors of Carbapenem Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *ACS Infectious Diseases*, 4, 10, 1529-1535.

Gibson, F., Magrath, D.I. (1969): The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 192, 2, 175-84.

Gilleland, H.E. Jr., Farley, L.B. (1982): Adaptive resistance to polymyxin in *Pseudomonas aeruginosa* due to an outer membrane impermeability mechanism. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 830–40.

Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., Pantopoulos, K. (2011): Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 3, 188–202.

Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., and Danchin, A. (1988): Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *The EMBO Journal*, 7, 3997–4004.

Golonka, R., Yeoh, B.S., Vijay-Kumar, M. (2019): The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *Journal of Innate Immunity*, 11, 3, 249-262.

Gotsbacher, M. P., Telfer, T. J., Witting, P. K., Double, K. L., Finkelstein, D. I., and Codd, R. (2017): Analogues of desferrioxamine B designed to attenuate iron-mediated neurodegeneration: synthesis, characterisation and activity in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Metallomics*, 9, 7, 852-864.

Gotthardt, M., Bleeker-Rovers, C. P., Boerma, O. C., Oyen, W. J. G. (2010): Imaging of Inflammation by PET, Conventional Scintigraphy, and Other Imaging Techniques. *The journal of nuclear medicine*, 51, 12, 1937-1949.

Gregory, J.A., Li, F., Tomosada, L.M., Cox, C.J. (2012): Topol AB, Algae – produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS ONE*, 7, 5, 371–379.

Gross, R., Engelbrecht, F., Braun, V. (1984): Genetic and biochemical characterization of the aerobactin synthesis operon on p CoIV. *Molecular and general genetics*, 196, 74-80.

Gulder, T.A., Moore, B.S. (2010): Salinosporamide natural products: Potent 20S proteasome inhibitors as promising cancer chemotherapeutics. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 9346–9367.

HAAS, H. (2003): Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 316-330.

Haas, H., Eisendle, M., Turgeon, B. G. (2008): Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 149–187.

Haas, H., Schoeser, M., Lesuisse, E., Ernst, J. F., Parson, W., Abt, B. (2003): Characterization of the *Aspergillus nidulans* transporters for the siderophores enterobactin and triacetylfusarinine

C. *Biochemical Journal*, 371, 505–513.

Hackel, M.A., Tsuji, M., Yamano, Y., Echols, R., Karlowsky, J.A., Sahm, D.F. (2018): In Vitro Activity of the Siderophore Cephalosporin, Cefiderocol, against Carbapenem-Nonsusceptible and Multidrug-Resistant Isolates of Gram-Negative Bacilli Collected Worldwide in 2014 to 2016. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62, 2.

Halpern, S.E. (1992): An overview of radioimmunoimaging. In: Maguire RT, Van Nostrand D, eds. *Diagnosis of colorectal and ovarian carcinoma: application of immunoscintigraphic technology*, 1-22, Marcel Dekker, Inc, New York.

Hamed, R.B., Henry, L., Gomez-Castellanos, J. R., Mecinović, J., Ducho, Ch., Sorensen, J. L., Claridge, T.D.W., Schofield, Ch.J. (2012): Crotonase catalysis enables flexible production of functionalized prolines and carbapenams. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 471–479.

Hans, P.F., Krastel, P., Muller, J., Gebhardt, K., Zeeck, A. (2001): Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by Streptomyces species. *FEMS Microbiology Letters*, 196, 2, 147–151.

Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., Winkelmann, G. (2003): Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor Iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 7, 3677-82.

Harris, D. J., Johnston, N. P. (1979): Effect of roughage source on rabbit performance. *Journal of Applied Rabbit Research*, 2, 4, 7.

Heuveling, D.A., Visser, G.W.M., Baclayon, M., Roos, W.H., Wuite, G.J.L., Hoekstra, O.S., Leemans, C.R., De Bree, R., & Van Dongen, G.A.M.S. (2011): ⁸⁹Zr-nanocolloidal albumin-based PET/CT lymphoscintigraphy for sentinel node detection in head and neck cancer: Preclinical results. *Journal of Nuclear Medicine*, 52, 10, 1580-1584.

Hider, R.C., Kong, X. (2010): Chemistry and biology of siderophores.. *Natural Product Reports*, 27, 5, 637-57.

Holdena, V. I., Bachman, M. A. (2015): Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*, 7, 986.

Hrazdira, I., Mornstein, V. (2001): *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1, vyd. 1. Brno.

<http://www.radiopharmaceuticals.info/pet-radiopharmaceuticals.html>, dňa 20.5.2022.

<https://www.cardinalhealth.com/content/dam/corp/web/documents/fact-sheet/cardinal-health-fda-approved-radiopharmaceuticals.pdf> , dňa 20.5.2022.

<https://www.lbic.lu.se/basic-principles-petct-and-spectct>, dňa 22.5.2022.

Hutton, B.F. (2014): the origins of SPECT and SPECT/CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 41, 3-16.

Challis, G. L., Hopwood, D. A. (2003): Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 14555.

Challis, G.L., (2005): A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, 6, 4, 601-11.

Imperi, F., Tiburzi, F., Visca, P. (2009): Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 20440–20445.

Israel, O., Pellet, O., Biassoni, L., De Palma, D., Estrada-Lobato, E., Gnanasegaran, G., Kuwert, T., la Fougère, C., Mariani, G., Massalha, S., Paez, D., Giammarile, F. (2019): Two decades of SPECT/CT - the coming of age of a technology: An updated review of literature evidence. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 46, 10, 1990-2012.

Jalal, M. A. F., Hossain, M. B., Helm, D., Sanders-Loehr, J., Actis, L. A., Crosa, J. H. (1989): Structure of anguibactin, a unique plasmid-related bacterial siderophore from the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of the American Chemical Society*, 111, 1, 292–296.

Ji, C., Miller, P.A., Miller, M.J. (2012): Iron transport-mediated drug delivery: practical syntheses and in vitro antibacterial studies of tris-catecholate siderophore-aminopenicillin conjugates reveals selectively potent antipseudomonal activity. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 24, 9898-901.

Jiang, X.F., Liu, Z.F., Lin, A.F., Xiang, L.X., Shao, J.Z. (2017): Coordination of Bactericidal

and Iron Regulatory Functions of Heparin in Innate Antimicrobial Immunity in a Zebrafish Model. *Scientific Reports*, 7, 1, 4265.

Jones, C. M., Wells, R. M., Madduri, A. V. R., Renfrow M. B., Ratledge C., Moody B.D., Niederweis M. (2014): Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by interrupting siderophore recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 1945–1950.

Jones, K. E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P. (2008): Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990-993.

Kalinowski, D. S., Richardson, D. R. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 57, 547.

Kameníček, J., Šindelář, Z., Pastorek, R., Kašpárek, F. (1997): *Anorganická chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci. Skripta 256-259.

Kammler, M., Schon, C., Hantke, K. (1993): Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175, 6212–6219.

Keating, T., Ehmann, D. E., Kohli, R. M., Marshall, C. G., Trauger, J., Walsh, C. (2001): Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis. *ChemBiochem*, 2, 101-109.

Khalil, M.M., Tremoleda, J.L., Bayomy, T.B., Gsell, W. (2011): Molecular SPECT Imaging: An Overview. *International Journal of Molecular Imaging*, 2011, 796025.

Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N. (1980): Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.

Kohli, R., Trauger, J., Schwarzer, D., Marahiel, M., Walsh, C. (2001): Exploring the generality of peptide cyclization by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 40, 7099-7108.

Koizumi, M., Endo, K., Kunimatsu, M., Sakahara, H., Nakashima, T., Kawamura, Y., Watanabe, Y., Saga, T., Konishi, J., Yamamuro, T., *et al.* (1988): ⁶⁷Ga-labeled antibodies for immunoscintigraphy and evaluation of tumor targeting of drug-antibody conjugates in mice. *Cancer Research*, 48, 5, 1189-94.

Kong., H., Cheng, W., Wei, H., Yuan, Y., Yang, Z., Zhang, X. (2019): An overview of recent progress in siderophore-antibiotic conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182, 111615.

Konishi, H., Fujiya, M., Tanaka, H., Ueno, N., Moriichi, K., Sasajima, J., Ikuta, K., Akutsu, H., Tanabe, H., and Kohgo, Y. (2016): Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nature Communications*, 7, 12365.

Kraemer, S.M., Crowley, D.E., Kretzschmar, R. (2006): Geochemical aspects of phytosiderophore promoted iron acquisition by plants. *Advances in Agronomy*, 91, 1–46.

Krewulak, K. D., Vogel, H. J. (2008): Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1781–1804.

Kupka, K., Kubinyi J., Šámal, M. (2015): *Radiofarmaka, Nukleární medicína*, 6. vyd., 37-38, Nakladatelství P3K, s.r.o., Praha. ISBN: 978-80-87343-54-8.

Lacko, A., Mokáň, M., Straka, J., Moravčíková, J., Urban, M., Hruboň, A., Čurilla, E., Rutowski, A.J., Tupý, J., Podoba, R., Stranovská, M., Chalachánová, I., Valko, P., Lacková, L., Gadušová, M., Lesňáková, A., Kadučáková, H., Madarasz, Š., Koleda, P., Kobela, J., Moravčíková, J., Domenik, J. (2017): *Metódy nukleárnej medicíny v klinickej praxi*. Verbum. 20-21, Katolícka univerzita v Ružomberku, SBN 978-80-561-0155-1.

Lakshmi, P.K. (2007): *Infectious Diseases, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 1-2.

Lall, M.S., Ramtohul, Y.K., James, M.N.G. & Vederas, J.C. (2002): Serine and threonine β -lactones: a new class of hepatitis A virus 3C cysteine proteinase inhibitors. *Journal of Organic Chemistry*, 67, 1536–1547.

Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., Lacelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., Walsh, C. (1996): A new enzyme superfamily: the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry and Biology*, 3, 923-936.

Lamont, I. L., Beare, P., Ochsner, U., Vasil, A. I., Vasil, M. L. (2002): Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 7072–7077.

- Lau, C. K., Ishida, H., Liu, Z., Vogel, H. J. (2013): Solution structure of *Escherichia coli* FeoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *Journal of Bacteriology*, 195, 46–55.
- Lee, F. Y., Barzilleri, R., Fairchild, C. R., Kim, S. H., Long, B. H., Reventos-Suarez, C., Vite, G. D., Rose, W. C., Kramer, R. A. (2001): In *Comprehensive Natural Products*. *Clinical Cancer Research*, 7, 1429–1437.
- Lejeune, C., Al Zahouri, K., Woronoff-Lemsi, M.C. (2005): Use of a decision analysis model to assess the medicoeconomic implications of FDG PET imaging in diagnosing a solitary pulmonary nodule. *The European Journal of Health Economics*, 6, 203–214.
- Leoni, L., Orsi, N., de Lorenzo, V., Visca, P. (2000): Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182, 1481–1491.
- Letoffe, S., Ghigo, J. M., and Wandersman, C. (1994): Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 9876–9880.
- Lewis, D.R., Kamisogul, K., York, A.W., Moghe, P.V. (2011): Polymer-based therapeutics: nanoassemblies and nanoparticles for management of atherosclerosis. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3, 400-420.
- Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R., Walsh, C. T. (2005): In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 11075–11084.
- Loyevsky, M., Lytton, S. D., Mester, B., Libman, J., Shanzer, A., Cabantchik, Z. I. (1993): The antimalarial action of desferal involves a direct access route to erythrocytic (*Plasmodium falciparum*) parasites. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 218.
- Ludwig, A., Von Rhein, C., Bauer, S., Huttinger, C., and Goebel, W. (2004): Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, 186, 5311–5320.
- Ma, J.F. (2005): Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical Review in Plant Sciences*, 24, 267–281.
- Mailänder, V., Landfester, K. (2009): Interaction of nanoparticles with cells.

Biomacromolecules, 10, 9, 2379-400.

Manns, J. M., Mosser, D. M., and Buckley, H. R. (1994): Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 62, 5154–5156.

Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., Mootz, H.D. (1997): Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, 97,2651-2673.

Meyer, M., Telford, J. R., Cohen, S. M., White, D. J., Xu, J., Raymond, K. N. (1997): High-yield synthesis of the enterobactin trilactone and evaluation of derivative siderophore analogs, *Journal of the American Chemical Society*, 119, 10093–10103.

Miethke, M., Marahiel, M.A. (2007): Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71, 413–451.

Miller, M.J., Zhu, H., Xu, Y. et al. (2009): Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *Biometals* 22, 61.

Minnick, A., McKee, J.A., Dolence, E.K., Miller, M.J. (1992): Iron transport-mediated antibacterial activity of and development of resistance to hydroxamate and catechol siderophore-carbacephalosporin conjugates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 4, 840-50.

Mirshanov, D.M. (1997): Transmission-Emission Computer Tomograph. Tashkent Branch, All-Union Research Surgery Center, USSR Academy of Medical Science, 38, 3, 177-198.

Mirshanov, D.M. (1987): Transmission-Emission Computer Tomograph. USSR Patent No. 621386:616-07320.01.87-SU-181935.

Möllmann, U., Heinisch, L., Bauernfeind, A., Köhler, T., Ankel-Fuchs, D. (2009): Siderophores as drug delivery agents: application of the "Trojan Horse" strategy. *Biometals*, 22, 4, 615-24.

Moors, M. A., Stull, T. L., Blank, K. J., Buckley, H. R., and Mosser, D. M. (1992): A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. *Journal of Experimental Medicine*, 175, 1643–1651.

Motta, S.S., Cluzel, P., Aldana, M. (2015): Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic

inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *PLoS One*, 10, 3, 0118464.

Nabi, H. A., & Doerr, R. J. (1992): Radiolabeled monoclonal antibody imaging (immunoscintigraphy) of colorectal cancers: Current status and future perspectives. *The American Journal of Surgery*, 163, 4, 448–456.

Naqvi, S. A. R., Imran, M. B. (2020): Single-photon emission computed tomography (SPECT) radiopharmaceuticals, IntechOpen, Medical Isotopes 1.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 34231, Enterobactin. Retrieved April 15, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enterobactin>.

Neilands J.B. (1981): Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual Review of Nutrition*, 1, 27-46.

Neilands, J.B. (1995): Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of biological chemistry* 270, 45, 26723-26726.

Nemeth, E., Ganz, T., (2006): Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annual Review of Nutrition*, 26, 323-42.

Neumann, W., Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M., Nolan, E. M. (2018): Esterase-catalyzed siderophore hydrolysis activates an enterobactin-ciprofloxacin conjugate and confers targeted antibacterial activity. *Journal of the American Chemical Society*, 140, 5193–5201.

Ong, S.T., Ho, J.Z., Ho, B., Ding, J.L. (2006): Iron homeostasis and the inflammatory response. *Immunobiology*, 211, 4, 295-314.

Oves-Costales, D., Kadi, N., Challis, G.L. (2009): The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, 43, 6530-41.

Pacák, J., Točík, Z., Černý, M. (1969): Synthesis of 2-DEoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, 2, 77.

Page M. G. P. (2013): Siderophore conjugates. *Antimicrobial Therapeutics Reviews*, 1277, 1, 115-26.

Page, M. G. P. (2019): The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69, 7, S529–S537.

Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., Devireddy, L. (2012): Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 51, 29, 5705–5724.

Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T. (2010): Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 11, 7806-10.

Pemble, C.W. IV, Johnson, L.C., Kridel, S.J., Lowther, W.T. (2007): Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14, 704–709.

Petrik, M., Franssen, G.M., Haas, H., Laverman, P., Hörtnagl, C., Schrettl, M., Helbok, A., Lass-Flörl, C., Decristoforo, C. (2012): Preclinical evaluation of two ⁶⁸Ga-siderophores as potential radiopharmaceuticals for *Aspergillus fumigatus* infection imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 39, 7, 1175-83.

Petřík, M., Haas, H., Decristoforo, C., Lass-Flörl, C., Franssen, G., Laverman, P. (2011): MicroPET imaging of invasive pulmonary aspergillosis using ⁶⁸Ga labelled siderophores. *Journal of Nuclear Medicine*, 52, 1, 1623.

Petřík, M., Haas, H., Dobrozemsky, G., Lass-Flörl, C., Helbok, A., Blatzer, M., Dietrich, H., Decristoforo, C. (2010): ⁶⁸Ga-siderophores for PET imaging of invasive pulmonary aspergillosis: proof of principle. *Journal of Nuclear Medicine*, 51, 4, 639-45.

Petřík, M., Vlckovaa A., Novya, Z., Urbanekb, L., Haasc, H., Decristoforo, C. (2014): Selected ⁶⁸Ga-siderophores versus ⁶⁸Ga-colloid and ⁶⁸Ga-citrate: biodistribution and small animal imaging in mice, *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, 159, 1.

Peukert, C., Langer, L.N.B., Wegener, S.M., Tutov, A., Bankstahl, J.P., Karge, B., Bengel, F.M., Ross, T.L., Bronstrup, M. (2021): Optimization of Artificial Siderophores as ⁶⁸Ga-Complexed PET Tracers for In Vivo Imaging of Bacterial Infections, *Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 16, 12359-12378.

Pfister, J., Summer, D., Petřík, M., Khoylou, M., Lichius, A., Kaeopookum, P., Kochinke, L.,

- Orasch, T., Haas, H., Decristoforo, C. (2020): Hybrid Imaging of *Aspergillus fumigatus* Pulmonary Infection with Fluorescent, ⁶⁸Ga-Labelled Siderophores. *Biomolecules*, 10, 2, 168.
- Pierce, J. R., Pickett, C. L., Earhart, C. F. (1983): Two *fep* genes are required for ferrienterochelin uptake in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 155, 330–336.
- Pollack, J. R., Neilands, J. B. (1970): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 989–992. 29.
- O'Brien, I. G., Gibson, F. (1970): *Biochimica et Biophysica Acta*, 215, 393–397.
- Pugsley, A. P., Zimmerman, W., Wehrli, W. (1987): Highly efficient uptake of a rifamycin derivative via the FhuA-TonB-dependent uptake route in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 133, 12, 3505-11.
- Pykett, I. L. (1982): NMR Imaging in Medicine. *Scientific American*, 246, 78-88.
- Ramirez, R. J. A., Karamanukyan, L., Ortiz, S., Gutierrez, C. G. (1997): A much improved synthesis of the siderophore enterobactin. *Tetrahedron Letters*, 38, 749–752.
- Ratledge, C., Dover, L. G. (2000): Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 881–941.
- Raymond, K. N., Dertz, E. A., Kim, S. S. (2003): Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *PNAS*, 100, 7, 3584–3588.
- Reynolds, D.M., Schatz, A., Waksman, S.A. (1947): Grisein, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces griseus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 64, 1, 50-4.
- Ronpirin, C., Jerse, A. E., and Cornelissen, C. N. (2001): Gonococcal genes encoding transferrin-binding proteins A and B are arranged in a bicistronic operon but are subject to differential expression. *Infection and Immunity*, 69, 6336–6347.
- Rowland, B. M., Grossman, T. H., Osburne, M. S., Tabor, H.W. (1996): Sequence and genetic organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding 2,3-dihydroxybenzoate biosynthetic enzymes. *Gene* 178, 119-123.
- Russo, T.A., Gulick, A.M. (2019): Aerobactin synthesis proteins as Antivirulence Targets in

Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, *ACS Infectious Diseases*, 5, 1052–1054.

Řezanka, T., Palyzová, A., Faltýsková, H., Sigler, K. (2019): Siderophores: Amazing Metabolites of Microorganisms. *Studies in Natural Products Chemistry*, 60, 157-188.

Sah, S., Singh, R. (2015): Siderophore: structural and functional characterisation – A Comprehensive Review, *Agriculture*, 61, 3, 97-114.

Saha, G.B. (1992): *Radiopharmaceuticals and Methods of Radiolabeling. Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. Springer, 80-108, ISBN: 978-1-4757-4027-1.

Saisho, Y., Katsube, T., White S, Fukase, H., Shimada, J. (2018): Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Cefiderocol, a Novel Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacteria, in Healthy Subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62, 3.

Sandoval-Motta, S., Aldana, M. (2016): Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8, 253–67.

Seebach, D., Muller, H. M., Burger, H. M. & Plattner, D. A. (1992): *Angewandte Chemie International Edition in English*, 31, 434–435.

Senesi, S., and Ghelardi, E. (2010): Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1690–1703.

Serafini, A.N. (1993): From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: an overview. *J. Nuc. Med.* 34, 3, 533-536.

Shahhosseini, S. (2011): PET Radiopharmaceuticals. *Iran. Journal of Pharmacy Research*, 10, 1, 1-2.

Shanzer, A., Libman, J. (1983): *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications* 15, 846–847.

Shanzer, A., Libman, J., Lytton, S. D., Glickstein, H., and Cabantchik, Z. I. (1991): Reversed siderophores act as antimalarial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 6585.

Sharp, P.F., Gemmell, H.G., Murray, A.D. (2005): *Practical Nuclear Medicine*, 3. vyd., 8,

Springer.

Sheldon, J. R., Heinrichs, D. E. (2015): Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiology Review*, 39, 592–630.

Shenhar, R., Norten, T.B., Rotello, V.M. (2005): Polymer-mediated nanoparticle assembly: Structural control and Applications. *Advances Materials*, 17, 6, 657-669.

Schalk, I. J., Guillon, L. (2013): Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids*, 44, 1267–1277.

Singh, J.S., Pandey, V.C., Singh, D.P. (2011): Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140, 339–353.

Skaar, E. P., Humayun, M., Bae, T., Debord, K. L., Schneewind, O. (2004): Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science*, 305, 1626–1628.

Stoebner, J. A., and Payne, S. M. (1988): Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 56, 2891–2895.

Stubbendieck, M. R., Straight, P. D. (2020): Specialized Metabolites for Bacterial Communication. *Comprehensive Natural Products III (Third Edition), Chemistry and Biology*, 3, 66-96.

Šámal, M., Štich, V. (2000): Emisní tomografie, *Nukleární medicína*, 36-42, Nakladatelství P3K, s.r.o., Praha. ISBN: 978-80-87343-54-8.

Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E., Kapaskelis, A., Gkegkes, I., Falagas, M. E. (2013): Iron deficiency and susceptibility to infections: evaluation of the clinical evidence. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 1253–8.

Tchanque-Fossuo, C. N., Dahle, S. E., Buchman, S. R., and Rivkah Isseroff, R. (2017): Deferoxamine: potential novel topical therapeutic for chronic wounds. *British Journal of Dermatology*, 176, 1056.

Tieu, W., Lifa, T., Katsifis, A., Codd, R. (2017): Octadentate Zirconium(IV)-Loaded

Macrocycles with Varied Stoichiometry Assembled From Hydroxamic Acid Monomers using Metal-Templated Synthesis, *Inorganic Chemistry*, 56, 6, 3719–3728.

Tillotson, G. S. (2016): Trojan Horse Antibiotics-A Novel Way to Circumvent Gram-Negative Bacterial Resistance? *Infectious Diseases*, 9, 45-52.

Tonziello, G., Caraffa, E., Pinchera, B., Granata, G., Petrosillo, N. (2019): Present and future of siderophore-based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases. *Infectious Diseases Reports*, 11, 2, 8208.

Torchilin, V.P. (2005): Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 145-160.

Trnka, J. (2015): Přístrojová technika nukleární medicíny, *Nukleární medicína*, 27-36, Nadkladatelství P3K, s.r.o., Praha. ISBN: 978-80-87343-54-8.

Trojanová, H. (2008): Přístrojová technika, *Nukleární kardiologie*, 25-34, Galén, Praha. ISBN:8072624812.

Troxell, B., Hassan, H. M. (2013): Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 59.

Tsui, B. M. W. (1996): The AAPM/RSNA physics tutorial for residents. *Radiographics*, 16, 173-183.

UPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-), ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

Vallabhajosula, S., Fuster, V. (1997): Atherosclerosis: Imaging Techniques and the Evolving Role of Nuclear Medicine. Department of Radiology, Division of Nuclear Medicine, *Journal of Nuclear Medicine*, 38, 11, 1788-96.

Van der Helm, D., Winkelmann, G. (1994): Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. *Metal Ions in Fungi*. 39–98, Marcel Dekker Inc., New York.

- Varma, A. Podila, G. K. (2005): Siderophore their biotechnological application. *Biotechnological Applications of Microbes*, 77–199.
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., Lombard, C., Rebuffat, S., Peduzzi, J. (2010): Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 1, 288-97.
- Velikyan, I. (2014): Prospective of ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics*, 4, 1, 47- 80. Accorsi, R. (2008): Brain single-photon emission CT physics principles. *American Journal of Neuroradiology*, 29, 7, 1247-1256.
- Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J. M., and Hechard, Y. (2009): delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides*, 30, 817–823.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004): Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58, 611–647.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2012): Haemophore functions revisited. *Molecular Microbiology*, 85, 618–631.
- Ward, T. R., Reas, L., Serge, P., Parel, J. E., Philipp, G., Peter, B., Chris, O. (1999): An iron-based molecular redox switch as a model for iron release from enterobactin via the salicylate binding mode. *Inorganic Chemistry*, 38, 22, 5007–5017.
- Watanabe, T., Takano, M., Murakami, M., Tanaka, H., Matsuhisa, A., Nakao, N. (1999): Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology*, 145, 3, 689–694.
- Wayne, R., Frick, K., Neilands, J.B. (1976): Siderophore protection against colicins M, B, V and Ia in *Esterichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 126, 7-12.
- Weiner, R.E., Thakur, M.L. (2001): Radiolabeled Peptides in Diagnosis and Therapy. *Seminars in Nuclear Medicine*, 31, 4, 296-311.
- Wencewicz, T. A., Long, T. E., Möllmann, U., Miller, M. J. (2013): Trihydroxamate siderophore-fluoroquinolone conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Staphylococcus aureus*. *Bioconjugate Chemistry*, 24, 3, 473-86.

Wencewicz, T. A., Miller, M. J. (2017): Sideromycins as pathogen-targeted antibiotics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 26, 151–184.

Wessling-Resnick, M. (2010): Benefits and dangers of iron during infection. *Annual Review of Nutrition*, 30, 105-22.

Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., Tsuji, Y. (2016): Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine*, 22, 12.

Winkelmann, G. (1991): *Handbook of Microbial Iron Chelates*, CRC Press, Florida. ISBN: 9781138559707.

Winkelmann, G. (2007): Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals*, 20, 379–392.

Winkelmann, G., Huschka, H.G. (1987): Molecular recognition and transport of siderophores in fungi. In: Winkelmann G, Helm van der D, Neilands JB, editors. *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*. 317–336, VCH Publishers, Weinheim. ISBN: 3-527-28567-8.

Xiong, Y., Lim, B., Skrabalak, S.E. (2009): Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics? *Angewandte Chemie International Edition in English*, 48, 60-103.

Yamasaki, T., Terai, S., Sakaida, I. (2011): Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 365, 576.

Yokota, K., Shimada, H., Kamaguchi, A., and Sakaguchi, O. (1977): Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus*. VII. Purification and some properties of hemolytic toxin (asp-hemolysin) from culture filtrates and mycelia. *Microbiology and Immunology*, 21, 11–22.

Zähner, H., Diddens, H., Keller-Schierlein, W., Nägeli, H. U. (1977): Some experiments with semisynthetic sideromycins. *The Japanese Journal of Antibiotics*, 30, 201-6.

Zhanel, G. G., Golden, A. R., Zelenitsky, S., Wiebe, K., Lawrence, C. K., Adam, H. J., Idowu, T., Domalaon, R., Schweizer, F., Zhanel, M. A. (2019): Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Drugs*, 79, 3, 271–289.

Zhang, J., Fan, P.H., Lin, G.M., Chang, W.C., Liu, H.W. (2020): Recent Progress in Unusual Carbohydrate-Containing Natural Products Biosynthesis. *Comprehensive Natural Products III*. Elsevier, 336-392.

Zheng, T., Nolan, E. M. (2012): Siderophore-based detection of Fe(III) and microbial pathogens. *Metallomics*, 4, 866.

Zhu, W., Winter, M. G., Spiga, L., Hughes, E. R., Chanin, R., Mulgaonkar, A., Pennington, J., Maas, M., Behrendt, C. L., Kim, J., Sun, X., Beiting, D. P., Hooper, L. V., Winter, S. E. (2020): Xenosiderophore Utilization Promotes *Bacteroides thetaiotaomicron* Resilience during Colitis. *Cell Host & Microbe* 27, 3, 376-388.