

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Michaela Zappeová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vybrané galliem-68 značené siderofory pro detekci
bakterie *Klebsiella pneumoniae***

Bakalářská práce

Michaela Zappeová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: MVDr. Kateřina Dvořáková Bendová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela ZAPPEOVÁ**
Osobní číslo: **R21766**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Vybrané galliem-68 značené siderofory pro detekci bakterie *Klebsiella pneumoniae***
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Studentka bude v rámci své bakalářské práce testovat možnost využití vybraných sideroforů pro detekci bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Součástí práce bude vypracování literární rešerše k dané problematice. Dále se studentka bude zabývat radioaktivním značením sideroforů, kontrolou radiochemické čistoty vzniklých komplexů a testováním jejich *in vitro* vlastností. Následně bude zkoumán *in vitro* uptake značených sideroforů v kmenech *Klebsiella pneumoniae* a sledována biodistribuce vybraných sideroforů v laboratorních zvířatech.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Lázníček M, Komárek P. Základy radiofarmacie. 1. vyd. Praha: Karolinum; 1998.

Koranda P et al. Nukleární medicína. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého; 2014.

Kiessling F, Pichler BJ. Small Animal Imaging. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2011.

Fan D, Fang Q. Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics. Int. J. Pharm. 2021, 579, 120306.

Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016; 80(3):629-661.

Vedoucí bakalářské práce:

MVDr. Kateřina Dvořáková Bendová

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 26. února 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2023

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Michaela Zappeová
Název práce:	Vybrané galliem-68 značené siderofory pro detekci bakterie <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	MVDr. Kateřina Dvořáková Bendová
Rok obhajoby práce:	2024

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá testováním vybraných radioaktivně značených sideroforů (enterobaktin, salmochelin S4, ferrirubin a koprogen) pro detekci infekce vyvolané bakterií *Klebsiella pneumoniae*.

Teoretická část práce je nejprve zaměřena na klasifikaci, charakteristiku a diagnostickou problematiku této bakterie. Následně je popsán mechanismus fungování sideroforů. Tato část rovněž pojednává o radionuklidech, specificky o galliu-68, jeho přípravě a využití. Dále jsou popsány rozdíly v principech zobrazovacích metod nukleární medicíny.

V experimentální části byly testovány *in vitro* vlastnosti galliem-68 značených sideroforů, a byl zkoumán jejich bakteriální uptake. Pomocí zobrazovacích metod nukleární medicíny byla sledována biodistribuce vzniklých komplexů v laboratorních zvířatech.

Na základě výsledků této práce bylo zjištěno, že vhodným zobrazovacím prostředkem pro detekci infekce vyvolané bakterií *Klebsiella pneumoniae* by se mohl stát galliem-68 značený ferrirubin.

Klíčová slova:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , gallium-68, siderofory, enterobaktin, salmochelin S4, ferrirubin, koprogen, PET/CT zobrazení
Počet stran:	57
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname:	Michaela Zappeová
Title:	Selected gallium-68 labelled siderophores for <i>Klebsiella pneumoniae</i> detection
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
Supervisor:	MVDr. Kateřina Dvořáková Bendová
The year of presentation:	2024

Summary:

This bachelor thesis focuses on the testing of selected radiolabelled siderophores (enterobactin, salmochelin S4, ferrirubin and coprogen) for the detection of *Klebsiella pneumoniae* infection.

The theoretical part of the thesis begins with the classification, characterization and diagnostic challenges of this bacterium, followed by a description of the mechanism of action of the siderophores. This part also discusses radionuclides, especially gallium-68, its preparation and application. Furthermore, the differences in the principles of nuclear medicine imaging methods are described.

In the experimental part, the *in vitro* properties of gallium-68 labelled siderophores were tested, and their bacterial uptake was investigated. The biodistribution of the resulting complexes in the laboratory animals was monitored using nuclear medicine imaging methods.

The results of this work suggest that gallium-68 labelled ferrirubin may be a suitable imaging agent for the detection of *Klebsiella pneumoniae* infection.

Key words:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , gallium-68, siderophores, enterobactin, salmochelin S4, ferrirubin, coprogen, PET/CT imaging
Number of pages:	57
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně na základě uvedených literárních zdrojů pod vedením MVDr. Kateřiny Dvořákové Bendové.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce MVDr. Kateřině Dvořákové Bendové za veškeré cenné rady a připomínky, trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování teoretické i experimentální části této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu v průběhu studia.

Tato práce byla podpořena Národním institutem virologie a bakteriologie (program EXCELES, ID projekt číslo LX22NPO5103) - financováno z prostředků Evropské unie, Next generation EU



Funded by the
European Union
NextGenerationEU



National Institute
of Virology and Bacteriology

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
3.1.1	Taxonomie	3
3.1.2	Rod <i>Klebsiella</i>	3
3.1.3	Obecná charakteristika a patogenita	4
3.1.4	Antibiotická rezistence	5
3.1.5	Diagnostika	7
3.2	Siderofory	8
3.2.1	Bakterie a železo	8
3.2.2	Mechanismus fungování sideroforů	8
3.2.3	Siderofory <i>K. pneumoniae</i>	11
3.2.4	Xenosiderofory	12
3.2.5	Využití sideroforů	13
3.3	Radionuklidy	14
3.3.1	Příprava radionuklidů	15
3.3.2	Radionuklid gallium-68 (⁶⁸ Ga)	16
3.4	Zobrazovací metody nukleární medicíny	18
3.4.1	Magnetická rezonance (MRI)	19
3.4.2	Výpočetní tomografie (CT)	19
3.4.3	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT)	19
3.4.4	Pozitronová emisní tomografie (PET)	20
3.4.5	Hybridní zobrazovací metody	21
4	MATERIÁL A METODY	22
4.1	Biologický materiál	22
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	22
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23

4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
4.4.1	Stanovení optimálních podmínek radioaktivního značení	24
4.4.2	Radioaktivní značení	25
4.4.3	Kontrola kvality radioaktivního značení	25
4.4.4	<i>In vitro</i> testy stability	25
4.4.5	Stanovení rozdělovacího koeficientu	26
4.4.6	Stanovení vazby na plazmatické proteiny	26
4.4.7	<i>In vitro</i> uptake v mikrobiálních kulturách	27
4.4.8	<i>In vivo</i> PET/CT zobrazování	28
5	VÝSLEDKY	30
5.1	Stanovení optimálních podmínek radioaktivního značení	30
5.2	Radioaktivní značení a kontrola kvality	31
5.3	<i>In vitro</i> testy stability	32
5.4	Stanovení rozdělovacího koeficientu	33
5.5	Stanovení vazby na plazmatické proteiny	33
5.6	<i>In vitro</i> uptake v mikrobiálních kulturách	34
5.6.1	<i>In vitro</i> uptake v různých kmenech <i>K. pneumoniae</i> kultivovaných v různých médiích	34
5.6.2	Vliv doby inkubace na <i>in vitro</i> uptake sideroforů	36
5.6.3	<i>In vitro</i> studie blokace uptake sideroforů	36
5.6.4	Vliv stáří kultury na <i>in vitro</i> uptake sideroforů	37
5.7	<i>In vivo</i> PET/CT zobrazování	38
5.7.1	Biodistribuce značených sideroforů ve zdravých myších	38
5.7.2	Detekce <i>K. pneumoniae</i> v infikovaných myších pomocí značených sideroforů..	40
5.7.3	Dynamické PET/CT zobrazení biodistribuce [⁶⁸ Ga]Ga-FR v infikované myši ...	41
5.7.4	Testování <i>in vivo</i> specificity [⁶⁸ Ga]Ga-FR pro detekci <i>K. pneumoniae</i>	42
6	DISKUSE	43
7	ZÁVĚR	47
8	LITERATURA	48

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP-binding cassette (ATP-vázající doména)
ACN	Acetonitril
AD	Absorbed dose (absorbovaná dávka)
ATP	Adenosintrifosfát
Cas	CRISPR-associated proteins (proteiny asociované s CRISPR)
CFU	Colony-forming unit (jednotka tvořící kolonie)
COP	Koprogen
CPM	Counts per minute (počet rozpadů za minutu)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice)
CT	Computed tomography (výpočetní tomografie)
DFO-B	Desferrioxamin B
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DOTANOC	DOTA-(NaI ³)-oktreotid
DOTATATE	DOTA-(tyrosin ³)-oktreotát
DOTATOC	DOTA-(tyrosin ³)-oktreotid
DTPA	Diethylentriaminpentaoctová kyselina
EC	Electron capture (elektronový záchyt)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (enzymem značená imunovazebná metoda)
ENTB	Enterobaktin
ESKAPE	Akronym pro skupinu život ohrožujících nozokomiálních patogenů: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a bakterie rodu <i>Enterobacter</i>
FDG	Fluorodeoxyglukóza

FOX E	Ferrioxamin E
FR	Ferrirubin
HU	Hounsfield unit (Hounsfieldova jednotka)
hvKp	Hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> (hypervirulentní <i>Klebsiella pneumoniae</i>)
ID	Injected dose (podaná dávka)
iTLC-SG	Instant thin layer chromatography using silica gel (instantní chromatografie na tenké vrstvě)
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification (izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou)
Log <i>P</i>	Partition coefficient (rozdělovací koeficient)
LT	Laboratorní teplota
M9	Minimal salts medium (minimální médium s obsahem solí)
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem)
MDRKp	Multidrug-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> (multirezistentní <i>Klebsiella pneumoniae</i>)
MH	Mueller-Hinton broth (Mueller-Hintonovo médium)
MRI	Magnetic resonance imaging (magnetické rezonanční zobrazování)
NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
NRPS	Non-ribosomal peptide synthetases (neribozomální peptidové syntetázy)
OMR	Outer membrane receptor (receptor vnější membrány)
ORNB	Ornibaktin
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PET	Positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie)
PSP	Periodická soustava prvků

SAL	Salmochelin
SPECT	Single-photon emission tomography (jednofotonová emisní výpočetní tomografie)
TAFC	Triacetylfusarinin C

Seznam obrázků

- Obrázek 1:** Mukózní vzhled kolonií *Klebsiella pneumoniae* kultivované na Columbia krevním agaru po dobu 24 hodin při 37 °C.
- Obrázek 2:** Schématické znázornění mechanismu bakteriálního uptake vzniklého komplexu Fe-siderofor, a recyklace sideroforu.
- Obrázek 3:** Chemická struktura sideroforu (A) enterobaktinu a (B) salmochelinu S4.
- Obrázek 4:** Chemická struktura sideroforu (A) ferrirubinu a (B) koprogenu.
- Obrázek 5:** Kontrola kvality radioaktivně značených komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$.
- Obrázek 6:** *In vitro* uptake radioaktivně značených sideroforů v mikrobiálních kulturách čtyř kmenů *K. pneumoniae* kultivovaných po dobu 24 hodin v MH médiu.
- Obrázek 7:** *In vitro* uptake radioaktivně značených sideroforů v mikrobiálních kulturách čtyř kmenů *K. pneumoniae* kultivovaných po dobu 24 hodin v M9 médiu.
- Obrázek 8:** *In vitro* uptake radioaktivně značených sideroforů v různých časech inkubace v mikrobiální kultuře kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivované v M9 médiu.
- Obrázek 9:** *In vitro* uptake radioaktivně značených sideroforů po 45 minutách inkubace v normální kultuře kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivované v M9 médiu, ve srovnání s teplem inaktivovanou kulturou a kulturou předinkubovanou s FeCl_3 .
- Obrázek 10:** *In vitro* uptake komplexu (A) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$ a (B) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ po 45 minutách inkubace v mikrobiálních kulturách čtyř kmenů *K. pneumoniae* kultivovaných po dobu 4, 24, 48 a 72 hodin v M9 médiu.
- Obrázek 11:** PET/CT snímek *in vivo* biodistribuce (A) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, (B) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, (C) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$, (D) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ v neinfikovaných myších 30 a 90 minut od podání galliem-68 značených sideroforů.

- Obrázek 12:** PET/CT snímek *in vivo* biodistribuce **(A)** [⁶⁸Ga]Ga-ENTB, **(B)** [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4, **(C)** [⁶⁸Ga]Ga-FR, **(D)** [⁶⁸Ga]Ga-COP po 45 minutách od retroorbitálního podání radioaktivně značeného sideroforu myším se svalovou infekcí vyvolanou kmenem *K. pneumoniae* NCTC 13465 aplikovanou 5 hodin před snímáním do levé zadní končetiny.
- Obrázek 13:** PET/CT *in vivo* zobrazení biodistribuce [⁶⁸Ga]Ga-FR po 45 minutách od jeho podání v myším modelu svalové infekce vyvolaném kulturou kmene *K. pneumoniae* 8157 aplikované **(A)** 5 hodin a **(B)** 24 hodin před snímáním do levé zadní končetiny.
- Obrázek 14:** Dynamické PET/CT *in vivo* zobrazení biodistribuce [⁶⁸Ga]Ga-FR v myším modelu svalové infekce vyvolané kulturou kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 aplikované těsně před snímáním do levé zadní končetiny.
- Obrázek 15:** PET/CT *in vivo* zobrazení biodistribuce [⁶⁸Ga]Ga-FR po 45 minutách od jeho podání v myším modelu svalové infekce *K. pneumoniae* kmene 13465 aplikované 5 hodin před snímáním do levé zadní končetiny a kontrol do pravé zadní končetiny. Kontrola **(A)** fyziologický roztok, **(B)** terpentýnový olej, **(C)** teplem inaktivovaná bakteriální kultura.

Seznam tabulek

- Tabulka 1:** Příklad rozpadové řady uměle vyrobeného radionuklidu germania.
- Tabulka 2:** Podmínky radioaktivního značení jednotlivých sideroforů.
- Tabulka 3:** Optimalizace podmínek radioaktivního značení sideroforu **(A)** SAL S4 a **(B)** FR.
- Tabulka 4:** Výsledky *in vitro* charakterizace komplexu **(A)** [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 a **(B)** [⁶⁸Ga]Ga-FR.

1 ÚVOD

Bakterie *Klebsiella pneumoniae* působí jako oportunní patogen vyvolávající především pneumonii, infekci močových cest a bakteriemi. Zatímco klasické kmeny *K. pneumoniae* jsou často spojeny s nozokomiálními infekcemi, hypervirulentní a multirezistentní kmeny způsobují komunitní přenos onemocnění a vyznačují se schopností infikovat zdravé jedince jakéhokoliv věku. Právě rychlé šíření zmíněných kmenů představuje naléhavý problém současnosti, a z tohoto důvodu je pro dobrou prognózu důležitá včasná detekce a přesná diagnóza vysoce rizikové infekce, pro kterou jsou zapotřebí citlivé a specifické diagnostické nástroje.

Nejčastěji jsou používány metody založené na fenotypové identifikaci, metody sérologické a molekulárně biologické. Ty se však mohou vyznačovat sníženou specificitou a citlivostí. Z tohoto důvodu se začaly častěji používat zobrazovací metody nukleární medicíny, které k detekci infekce využívají radioaktivně značené látky poskytující vysokou citlivost, nicméně se vyznačují neschopností odlišit infekci od zánětlivých procesů. Pro překonání těchto omezení by mohly sloužit radioaktivně značené siderofory.

Siderofory, které patří mezi hlavní faktory virulence *K. pneumoniae*, jsou produkovány bakteriemi v podmínkách s nízkým obsahem železa, jehož přítomnost je nezbytná v mnoha metabolických procesech. Přestože hlavní úlohou sideroforů je chelatace železitých iontů, mohou vázat také z chemického hlediska velmi podobné ionty gallité. V kombinaci s radioaktivním galliem-68 by se z nich mohly na základě mechanismu bakteriálního uptake stát optimální zobrazovací prostředky pro specifickou PET/CT detekci infekce vyvolané touto bakterií.

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
- 2) Radioaktivní značení sideroforů, kontrola radiochemické čistoty vzniklých komplexů a testování jejich *in vitro* vlastností, zkoumání *in vitro* uptake značených sideroforů v kmenech *Klebsiella pneumoniae* a sledování biodistribuce vybraných sideroforů v laboratorních zvířatech.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Klebsiella pneumoniae*

3.1.1 Taxonomie

Na základě průkazů vlastností a vzájemného příbuzenského vztahu prokaryot, lze tyto mikroorganismy zařadit do taxonomických jednotek s konečným cílem je charakterizovat. Klasifikační úroveň taxonomické hierarchie bakterie *Klebsiella pneumoniae* je následující:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Pro bacteria*

Třída: *Alphaproteobacteria*

Řád: *Enterobacteriales*

Čeleď: *Enterobacteriaceae*

Rod: *Klebsiella*

Druh: *Klebsiella pneumoniae*

Pod čeleď *Enterobacteriaceae* se spolu s bakteriemi rodu *Klebsiella* řadí například i další klinicky významné bakterie rodu *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia* (Sedláček, 2007).

3.1.2 Rod *Klebsiella*

Rod *Klebsiella* je rod nozokomiálních bakteriálních patogenů, který byl v roce 2017 zařazen Světovou zdravotnickou organizací na seznam bakterií, pro které je kriticky naléhavý výzkum a vývoj nových léčiv. Patogeny tohoto rodu jsou totiž spojeny s vysokou mortalitou a morbiditou (Allemailem, 2021).

Bakterie rodu *Klebsiella* jsou gram-negativní rovné opouzdržené a nepohyblivé tyčinky, které se mohou vyskytovat jednotlivě, po dvou nebo v krátkých řetězcích. Na agarovém médiu mohou mít kolonie mukózní vzhled, který je dán polysacharidovou kapsidou připojenou ke vnější bakteriální membráně (viz Obrázek 1). Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní a jejich metabolismus je respiratorního i fermentativního typu. Optimální teplotou pro růst těchto bakterií je 37 °C, přičemž nevyžadují žádné speciální růstové faktory. Po provedení oxidázového a katalázového testu jsou bakterie oxidáza negativní a kataláza pozitivní. Jako

výhradní zdroj uhlíku používá většina zástupců citrát a glukózu. Jednotlivé druhy rodu *Klebsiella* jsou v přírodě hojně zastoupeny a běžně se vyskytují především v půdě a ve vodě. Bakterie je přítomna zejména u lidí a zvířat, může však napadat i rostliny (Sedláček, 2007; Martin *et* Bachman, 2018).



Obrázek 1: Mukózní vzhled kolonií *Klebsiella pneumoniae* kultivované na Columbia krevním agaru po dobu 24 hodin při 37 °C. Převzato z (Doğan *et al.*, 2024).

Pro rod *Klebsiella* bylo celkem identifikováno jedenáct druhů, mezi které patří například *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* a již zmíněná *Klebsiella pneumoniae* (Patro *et* Rathinavelan, 2019).

3.1.3 Obecná charakteristika a patogenita

Klebsiella pneumoniae byla poprvé izolována roku 1875 patologem a předchůdcem bakteriologie Edwinem Klebsem z dýchacích cest pacienta umírajícího na pneumonii, přičemž později v roce 1882 byla tato bakterie popsána německým bakteriologem Carlem Friedländerem (Chang *et al.*, 2021).

Klebsiella pneumoniae je nesporeující bakterie, která je součástí běžného lidského a zvířecího střevního mikrobiomu (Tyll *et al.*, 2023). Některé kmeny *K. pneumoniae* působí jako oportunní patogeny a infikují kriticky nemocné a imunokompromitované pacienty. Tyto kmeny jsou příčinou několika typů infekcí zahrnujících pneumonii, infekci močových cest, bakteriemií a vznik jaterních abscesů. U člověka se *K. pneumoniae* soustřeďuje zejména na

slizničních površích. Tedy kromě gastrointestinálního traktu se vyskytuje také v nosohltanu, přes který se dostává do krevního oběhu nebo jiných tkání, a následně vyvolává infekci (Martin *et* Bachman, 2018; Wang *et al.*, 2020b).

Aby bakterie mohla vyvolat infekci, musí nejprve překonat mechanické bariéry a složky imunitního systému. Byly dopodrobna charakterizovány čtyři hlavní faktory virulence *K. pneumoniae*, mezi které patří kapsula, lipopolysacharid, fimbrie a siderofory. U odlišných kmenů *K. pneumoniae* hrají tyto faktory virulence rozdílnou roli v různých typech infekce. Kapsula, ochranné pouzdro složené z polysacharidů, je nezbytná pro vyvolání patologických účinků. U neopouzdřených kmenů byla zjištěna mnohem menší schopnost vyvolat onemocnění. Druhý faktor virulence, lipopolysacharid také známý jako endotoxin, nezbytná součást vnější buněčné membrány všech gram-negativních bakterií, je v průběhu infekce výhodou, ale zároveň i překážkou, protože může být také silným imunitním aktivátorem. Mezi další faktory virulence patří fimbrie, které jsou důležitými mediátory adheze bakterie. Posledním důležitým faktorem virulence jsou siderofory (Paczosa *et* Mecsas, 2016).

K. pneumoniae způsobuje až 10 % nozokomiálních infekcí. Tyto infekce často vznikají až v průběhu poskytování zdravotní péče, kdy při přijetí pacientů do nemocnice je u nich infekce nepřítomna, ale může se objevit až 48 hodin poté. K rozvoji infekcí dochází v různých prostředích poskytovatelů zdravotní péče, včetně nemocnic, zařízení dlouhodobé péče a ambulantních zařízení (Asri *et al.*, 2021). Lidé trpící imunodeficiencí, jsou vystaveni mnohem většímu riziku infekcí kmeny *K. pneumoniae* než běžná populace. K rizikovým faktorům patří malignita, cukrovka, chronické onemocnění jater, transplantace orgánů a dialýza. Dalšími rizikovými faktory pro vznik nozokomiální infekce jsou chemoterapie, léčba kortikosteroidy, či stavy vedoucí k neutropenii. Mezi rizikové skupiny se řadí novorozenci a starší lidé (Paczosa *et* Mecsas, 2016).

Z tohoto důvodu je pro dobrou prognózu nezbytně důležitá včasná detekce a diagnóza vysoce rizikové infekce, pro kterou jsou zapotřebí citlivé a specifické diagnostické prostředky. Již zmíněné siderofory hrají významnou roli ve virulenci patogenů, čímž se stávají slibnými kandidáty pro cílené zobrazování infekce (Fan *et* Fang, 2021).

3.1.4 Antibiotická rezistence

V období rozvoje antibiotik se tato bakterie stala jedním z hlavních původců nozokomiálních nákaz a rizikovým faktorem závažných komunitních infekcí. V prvopočátku sloužily k léčbě baktericidní antibiotika nazývané aminoglykosidy, které byly později postupně

nahrazeny fluorochinolinovými a betalaktamovými antibiotiky, mezi které patří karbapenemy a cefalosporiny. V průběhu tohoto rozvoje docházelo u kmenů odvozených od klasické *K. pneumoniae* k získávání mechanismů rezistence vůči antibiotikům, včetně enzymů modifikujících léčiva (Wang *et al.*, 2020b). Vzhledem ke zvyšujícímu se počtu rezistentních kmenů k různým antibiotikům, významné morbiditě a mortalitě infikovaných pacientů, se *K. pneumoniae* dostává do popředí pozornosti vědeckých výzkumů. Kromě toho jsou bakterie rodu *Klebsiella* známým rezervoárem genů rezistentních vůči antibiotikům, které se mohou přenášet a šířit mezi dalšími gram-negativními bakteriemi (Bengoechea *et Sa Pessoa*, 2019). Velká část infekcí způsobených *K. pneumoniae* je tedy zprostředkována dvěma doposud známými hlavními patotypy, a to multirezistentním (MDRKp) a hypervirulentním (hvKp) klonem, u kterých je známo, že procházejí další evolucí a vytvářejí tak fenotypově nové kmeny (Dong *et al.*, 2022).

U kmenu MDRKp jsou pozorovány dva hlavní typy rezistence. Jeden mechanismus zajišťuje expresi širokospektrých beta-laktamáz, které způsobují rezistenci vůči cefalosporinům a monobaktamům. Druhým mechanismem rezistence, který je ještě více znepokojující, je exprese karbapenemáz, které činí bakterii rezistentní vůči téměř všem dostupným laktamům, včetně karbapenemů (Paczosa *et Meccas*, 2016). Kmen hvKP je kromě rezistence k ampicilinu běžně citlivý k celé řadě antibiotik, včetně cefalosporinů a karbapenemů. Na rozdíl od klasické *K. pneumoniae* vede ke komunitnímu přenosu onemocnění, vyznačuje se schopností infikovat zdravé jedince jakéhokoli věku a má sklon vyskytovat se v těle na více místech a následně se šířit dále. Hypervirulentní fenotyp propůjčují zejména geny virulence přítomných na plasmidech a v integrovaných chromozomálních elementech (Russo *et Marr*, 2019; Zhu *et al.*, 2021).

Vzhledem k život ohrožujícím a smrtelným infekcím byla multirezistentní i hypervirulentní *K. pneumoniae* klasifikována jako patogen ESKAPE, což je akronym pro bakterie druhu *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie rodu *Enterobacter* (Stojowska-Swędryńska *et al.*, 2022). Vývoj nových terapeutik k léčbě infekcí způsobených patogeny ESKAPE je nezbytný, protože jsou schopny uniknout biocidnímu účinku antimikrobiálních látek. S každým dalším rokem se ovšem celkový počet antibiotik účinných proti ESKAPE snižuje, a to vede do budoucna ke ztrátě efektivity antibiotik. Patogeny ESKAPE jsou zodpovědné za většinu nozokomiálních infekcí především u imunokompromitovaných jedinců (Mulani *et al.*, 2019).

3.1.5 Diagnostika

Nejčastěji využívané diagnostické metody používané k detekci *K. pneumoniae* lze rozdělit na metody založené na fenotypové identifikaci, sérologické metody a na molekulárně-biologické metody. Mezi konvenční postupy fenotypové identifikace patří mikroskopická vyšetření, hodnocení morfologie a makroskopických rysů vzniklých kolonií, různé biochemické identifikace (test na tvorbu indolu, ureázy a citrátu a fermentaci laktózy), a použití nově vyvinutých automatických přístrojů pro identifikaci bakterií jako je systém VITEK[®] 2. Takové metody jsou však časově náročné, vyžadují několikadenní inkubaci, získání výsledků trvá obvykle 1 až 3 dny, a vyznačují se nízkou citlivostí a specifíčností, což může vést k falešně negativním výsledkům a nepřesné detekci. I přesto jsou díky své jednoduchosti, minimálním požadavkům na vybavení a jejich snadné obsluze, hlavními metodami používanými především pro běžný screening (Dong *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2023).

Dále jsou používány sérologické metody, které vyšetřují přítomnost specifických protilátek proti patogenům. Tyto metody jsou nenáročné na odběr vzorků. Kromě vzorku krevního séra lze použít také vzorek slin a jiných tělních tekutin. Analýza je nejčastěji prováděna pomocí metody ELISA. Nevýhodou sérologických vyšetření je ovšem snížená citlivost (Haselbeck *et al.*, 2022).

Klíčem k včasné diagnóze a rychlé kontrole šíření infekčních onemocnění se stala detekce nukleových kyselin. V posledních letech došlo k rozšíření používání molekulárně biologických metod, mezi které patří například metoda PCR. Ta vykazuje uspokojivé výsledky, avšak k provedení testů jsou zapotřebí drahé a vysoce přesné přístroje. Dalším omezením je nízká účinnost a relativně dlouhá reakční doba (Qiu *et al.*, 2022). Technologií, která překonává tato omezení, je izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP), která je široce využívána k detekci patogenů. Nedostatkem této metody je ale poměrně vysoká míra falešně pozitivních výsledků (Dong *et al.*, 2015). Další důležitou metodou identifikace bakterií je technologie MALDI-TOF MS, která porovnává hmotnostní spektra bakterií s referenčními spektry mikroorganismů v databázích. Ve srovnání s ostatními metodami je výhodou jednoduchost, rychlost, nízké náklady a vysoká citlivost. Nevýhodou jsou vysoké nároky na přípravu vzorku (Huang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023). Dále bylo vyvinuto několik detekčních platforem založených na principu CRISPR/Cas, systému adaptivní imunitní odpovědi bakterií. Vyznačující se vysokou citlivostí a specifitou, nicméně většina sestává z dvoukrokových testů,

čímž se zvyšuje riziko křížové kontaminace v procesu detekce (Qiu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023).

Vzhledem k tomu, že současné populární metody detekce *K. pneumoniae* mají své nedostatky, jsou aktivně zkoumány nové detekční technologie, které rozšíří možnosti a urychlí míru včasné detekce (Zhang *et al.*, 2023).

3.2 Siderofory

3.2.1 Bakterie a železo

Železo je čtvrtým nejhojněji se vyskytujícím prvkem zemské kůry. Řadí se mezi přechodné kovy, přičemž může existovat ve dvou oxidačních stavech, a to jako železnaté a železité ionty. Právě tato proměnná mocenství hrají klíčovou roli v redoxních reakcích. Přítomnost železa je nezbytná v mnoha metabolických procesech mikroorganismů, včetně elektronového transportního řetězce, citrátového cyklu, oxidativní fosforylace a fixace dusíku. Taktéž reguluje biosyntézu porfyrinů, vitamínů, toxinů, sideroforů a syntézu DNA a RNA. Zároveň je také zásadní pro tvorbu biofilmu, protože reguluje povrchovou pohyblivost a stabilizuje polysacharidový matrix (Ahmed *et* Holmström, 2014; Saha *et al.*, 2016). Dále bylo zjištěno, že má také vliv na virulenci patogenních bakterií prostřednictvím regulace několika faktorů virulence, které jsou ovlivněny množstvím dostupného železa.

Navzdory tomu, že je železo obsaženo v zemské kůře ve velkém množství, jeho biologická dostupnost je velmi nízká, protože jej atmosférický kyslík oxiduje na málo rozpustné hydroxidy železa. Zároveň také není obvykle volně dostupné pro patogeny v živočišných i rostlinných hostitelích, protože bývá navázáno na bílkoviny jako je feritin, hemoglobin a transferin. Aby docházelo k zajištění přísunu železa, které je nezbytné pro přežití v podmínkách s nízkým obsahem tohoto prvku, využívají patogenní i nepatogenní bakterie různé mechanismy k jeho zisku. Mezi tyto mechanismy patří přímý uptake železitých iontů, uptake a degradace hemu, a produkce sideroforů vyznačujících se vysokou afinitou především k trojmocnému železu (Petrik *et al.*, 2017; Khasheii *et al.*, 2021).

3.2.2 Mechanismus fungování sideroforů

V posledních letech byla sideroforům věnována velká pozornost vzhledem k jejich potenciální roli a využití v různých oblastech výzkumu. Jsou to organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností pohybující se v rozmezí 500 až 1500 kDa, které jsou produkovány mikroorganismy a některými houbami a rostlinami rostoucími v podmínkách

s nízkým obsahem železa. Siderofory se vyznačují schopností chelatovat železo z prostředí a dodávat ho do buněk prostřednictvím specifických receptorů (Ahmed *et* Holmström, 2014; Fan *et* Fang, 2021). Přestože jejich hlavní úlohou je chelatace železa, mohou vázat také celou řadu dalších kovů, včetně měďnatých, zinečnatých, olovnatých, nikelnatých, rtuťnatých, hlinitých a gallitých iontů (Hofmann *et al.*, 2020). Plní i další funkce, mezi které patří ochrana před oxidativním stresem a buněčná signalizace. Zároveň jsou zprostředkovatelé interakcí mezi mikrobiálními společenstvy (Soares, 2022).

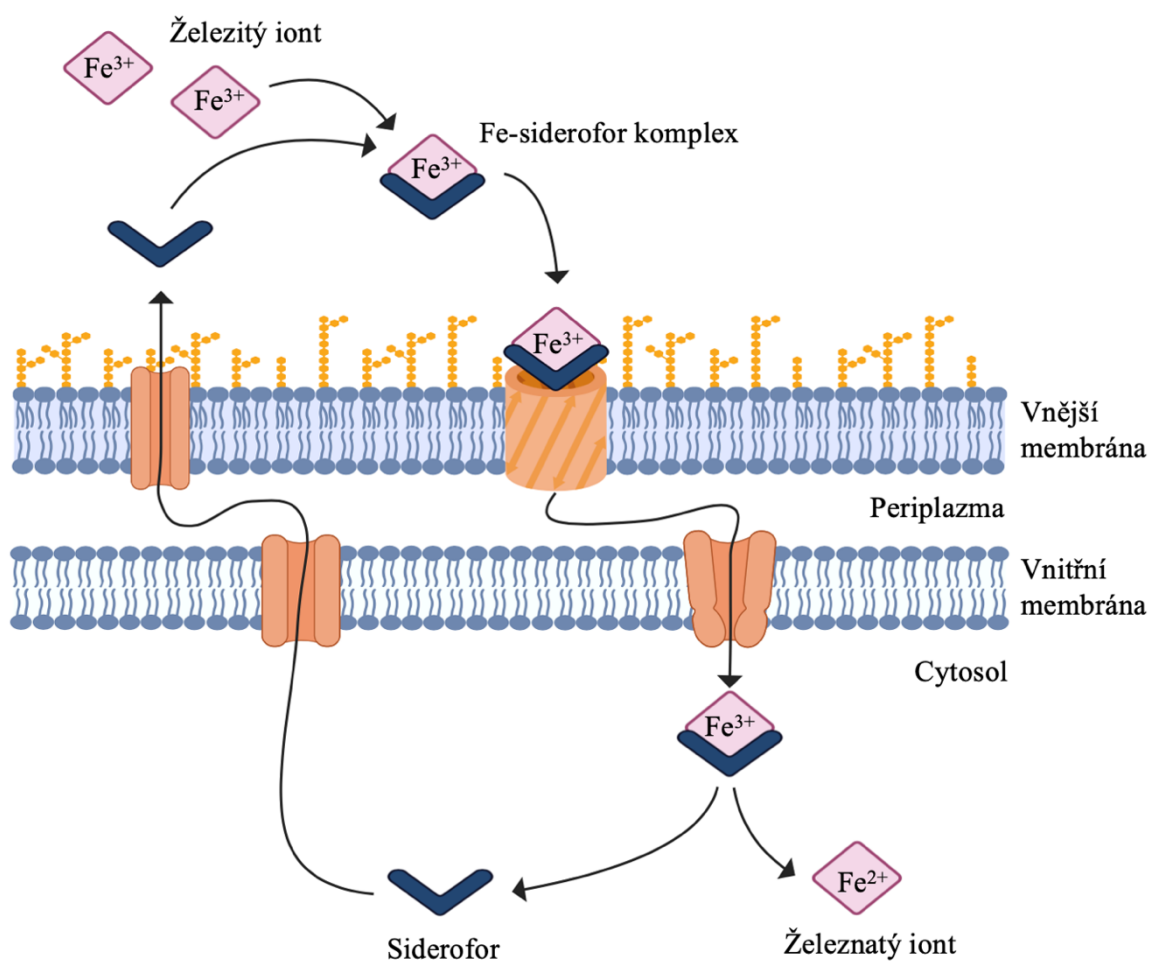
V současnosti je známo více než 500 různých druhů sideroforů, z nichž zhruba 270 bylo strukturně charakterizováno. Dle funkčních skupin, které koordinují se železem, je lze rozdělit do čtyř hlavních tříd, a to katecholátové, fenolátové, hydroxamátové a karboxylátové siderofory. Zároveň jsou také známy siderofory smíšeného typu (Fan *et* Fang, 2021). Siderofory mají nejčastěji hexadentátní strukturu obsahující šest donorových atomů kyslíku, které vytvářejí pevné vazby s železitým iontem za vzniku stabilních komplexů (Hider *et* Kong, 2010). Stabilitu celého komplexu zvyšuje cyklizace chemických skupin sideroforu (Soares, 2022).

Biosyntéza sideroforů probíhá v závislosti na jejich chemické povaze různými mechanismy. Obecně lze však tyto dráhy rozdělit na závislé a nezávislé na neribozomální peptidové syntetáze (NRPS) (Miethke *et* Marahiel, 2007). NRPS jsou multienzymové komplexy představující sestavovací linie specializovaných domén, které spojují aminokyseliny prostřednictvím thioesterových intermediátů. Domény uskutečňující adenylaci, připojení k peptidyl nosnému proteinu a kondenzaci, jsou nutné pro tvorbu peptidové vazby. Poté jsou ve většině případů peptidové řetězce ze syntetázy uvolněny cyklizací katalyzovanou C-terminálně umístěnými thioesterázovými doménami. Syntézu NRPS aktivují promotory, které jsou citlivé na vyčerpání železa (Miethke *et* Marahiel, 2007; Hider *et* Kong, 2010).

Po biosyntéze zpravidla dochází k sekreci sideroforů. Vzhledem k tomu, že jsou siderofory obecně polární, vyžaduje jejich export specifické proteiny známé jako efluxní pumpy. Transport efluxními pumpami probíhá aktivně za spotřeby ATP, nejčastěji přes ABC transportéry (Miethke *et* Marahiel, 2007; Soares, 2022).

Jakmile je trojmocné železo ve vnějším prostředí mobilizováno a zachyceno vyloučenou molekulou sideroforu, vytvoří se komplex a nastává buněčný příjem. K tomuto kroku může docházet dvěma obecnými způsoby. Jedním způsobem je uvolnění železa redukcí ze sideroforu na extracelulární povrch, přičemž je následně přijato jako jednotlivý iont. Druhým, mnohem častějším způsobem, je import celého komplexu do cytosolu (viz Obrázek 2). U gramnegativních bakterií je komplex rozpoznán a vázán specifickými receptory vnější

membrány (OMR), mezi které patří například β -barely. Poté co je ligand navázán, podléhá receptor konformační změně a přemísťuje siderofor s navázaným železem do periplazmatického prostoru. Energie potřebná k uskutečnění procesu je dodávána TonB komplexem. Pomocí ABC transportéru je komplex dále přenesen do cytosolu. Mezi mechanismy vedoucí k uvolňování železa patří například redukce trojmocného železa vázaného na siderofor na dvojmocné železo pomocí specifických reduktáz. Poté následuje jeho spontánní uvolnění (Miethke *et* Marahiel, 2007; Kramer *et al.*, 2020; Fan *et* Fang, 2021). Po uvolnění železa jsou siderofory degradovány nebo dochází k jejich recyklaci prostřednictvím systému efluxní pumpy (Saha *et al.*, 2016).



Obrázek 2: Schématické znázornění mechanismu bakteriálního uptake vzniklého komplexu Fe-siderofor, a recyklace sideroforu. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

Bakterie přísně regulují enzymy a transportní systémy, které umožňují biosyntézu sideroforů, jejich sekreci, zpětný uptake a uvolňování přijatého železa. Tato genová regulace je zprostředkována především na transkripční úrovni represorovými proteiny. U všech

gramnegativních bakterií je nejdůležitějším represorem protein Fur (Miethke *et* Marahiel, 2007; Hider *et* Kong, 2010). Po doplnění zásob se Fur protein spojuje s železem a vzniklý komplex se poté váže na promotorovou oblast genů syntézy sideroforů nebo genů regulačních aktivátorů a blokuje transkripci. V případě nedostatku železa je represor uvolňován a dochází k indukci biosyntézy (Kramer *et al.*, 2020).

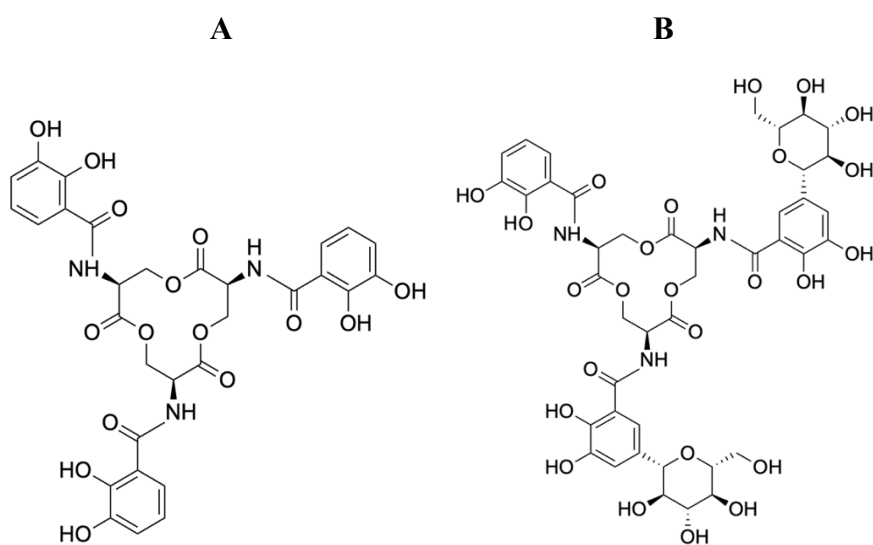
3.2.3 Siderofory *K. pneumoniae*

Kmeny *K. pneumoniae* kódují několik sideroforů, jejichž exprese a příspěvek k virulenci se liší (Paczosa *et* Meccas, 2016). Bylo zjištěno, že bakteriální kmeny, které produkují více sideroforů, jsou vysoce virulentní a vyznačují se lepší schopností kolonizovat hostitele v průběhu infekce (Khasheii *et al.*, 2021). V případě produkce více druhů sideroforů lze úspěšněji kolonizovat různé tkáně hostitele, a také zabránit případné neutralizaci jednoho sideroforu hostitelem. Mezi exprimované siderofory bakterie *K. pneumoniae* se řadí enterobaktin, salmochelin, yersiniabaktin a aerobaktin. Největší afinitou k železu se vyznačuje enterobaktin, naopak nejnižší schopnost vázat železo má aerobaktin (Paczosa *et* Meccas, 2016).

Enterobaktin, také znám pod názvem enterochelin, je exprimován téměř všemi klasickými i hypervirulentními kmeny *K. pneumoniae*, a z tohoto důvodu je považován za primární systém uptake železa využívaný touto bakterií. Patří mezi katecholátové siderofory a jedná se o cyklický trimer 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serinu. Obsahuje tři katecholátové skupiny, přičemž každá poskytuje při chelataci železitého iontu dva atomy kyslíku (viz Obrázek 3A) (Paczosa *et* Meccas, 2016; Soares, 2022). Enterobaktin je však silně vázán sérovým albuminem, a proto dochází v lidském séru k jeho inaktivaci. Molekula, která je vylučována hostitelským organismem se schopností inhibovat enterobaktin jeho neutralizací, se nazývá lipokalin-2 (neutrofilní s gelatinázou aktivovaný lipokalin) (Raymond *et al.*, 2003). Lipokalin-2 je multifunkční protein, který se vyznačuje velkým rozsahem antimikrobiálních schopností. V průběhu infekce je vylučován především neutrofilními granulocyty jako složka vrozené imunitní odpovědi savců. Pokud je tedy lipokalin-2 přítomen, pak jsou kmeny *K. pneumoniae* produkující pouze enterobaktin likvidovány (Müller *et al.*, 2009; Paczosa *et* Meccas, 2016). Produkce enterobaktinu je rozšířena především mezi bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae* (Peralta *et al.*, 2016). Poprvé byl purifikován a charakterizován z bakterií rodu *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* (Crosa, 1989).

V reakci na to jsou některými kmeny bakterie produkovány salmocheliny, které nedokáží být zachyceny lipokalinem-2, a tudíž nedochází k jejich neutralizaci. Tímto byla

podpořena myšlenka, že strukturní rozmanitost a funkční nadbytek umožňují vyhnout se imunitním faktorům hostitele (Holden *et* Bachman, 2015). Salmocheliny jsou rozlišovány na salmochelin S4, S2, S1 a SX. Tyto jednotlivé druhy se liší postupnou úrovní degradace dvěma hydrolázami produkovanými bakteriální buňkou (Zhu *et al.*, 2005). Klíčovým sideroforem je salmochelin S4, derivát enterobaktinu glukosilovaný v C5 poloze dvou katecholových kruhů (viz Obrázek 3B) (Johnstone *et* Nolan, 2015). Bakterie produkující siderofor salmochelin S4 je tedy virulentnější, a z tohoto důvodu je využíván především hvKp kmeny (Paczosa *et* Meccas, 2016). Stejně jako enterobaktin, tak i salmochelin je produkován bakteriemi rodu *Salmonella* a uropatogenními kmeny *E. coli* (Zhu *et al.*, 2005).



Obrázek 3: Chemická struktura sideroforu (A) enterobaktinu a (B) salmochelinu S4. Vytvořeno pomocí ChemDraw.

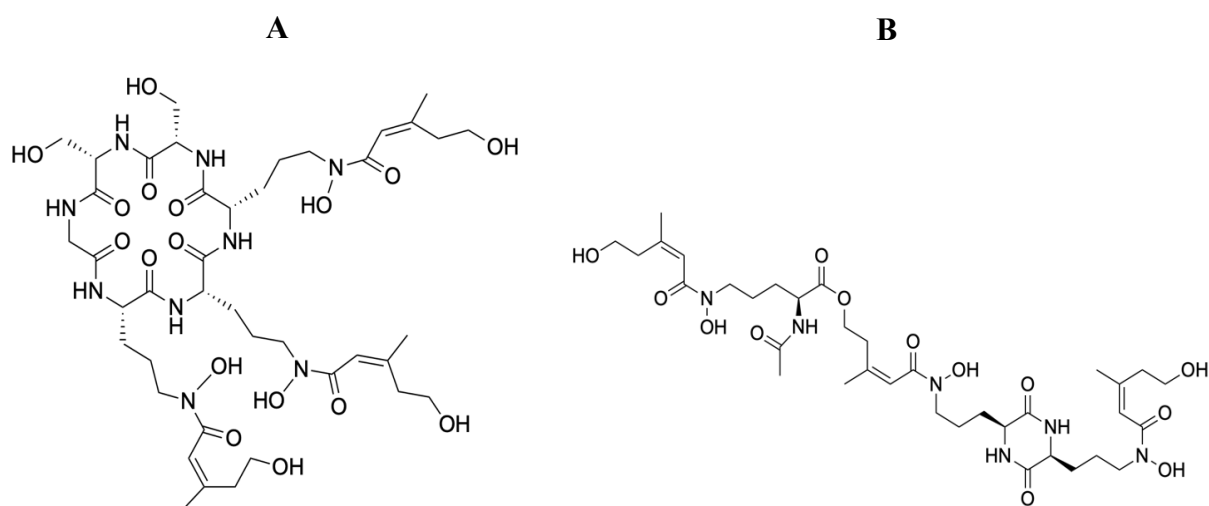
3.2.4 Xenosiderofory

Bakterie se však málokdy vyskytují osamoceně. Ve většině případů rostou ve společenstvích, přichyceny k různým povrchům, a to především ve formě biofilmu. To má zásadní vliv na využití sideroforů, neboť se mohou jednotlivé bakterie při získávání železa spoléhat i na siderofory vylučované buňkami v jejich blízkosti (Kramer *et al.*, 2020). Pokud tedy dochází k uptaku železa ze sideroforů produkovaných jinými mikroorganismy, pak jsou tyto siderofory označovány jako xenosiderofory. Jejich využití je v permanentním boji o železo zásadní výhodou (Miethke *et al.*, 2013). Bakterie využívající siderofory se vyznačují schopností lépe získávat železo z různých zdrojů, a lépe se vyhýbají imunitnímu systému hostitele (Johnstone *et* Nolan, 2015). Mezi xenosiderofory využívané *K. pneumoniae* patří například

ferrirubin a koprogen, přičemž oba spadají dle funkčních skupin pod hydroxamátové siderofory (Aguiar *et al.*, 2021). Hydroxamátové siderofory, které jsou produkované houbami, lze rozdělit do čtyř strukturních skupin, a to ferrichromy, koprogeny, fusarininy a kyseliny rhodotorulovou (Haas, 2014).

Mezi siderofory ferrichromového typu skládající se z cyklické hexapeptidové struktury, patří již zmíněný ferrirubin, a dále například ferrirhodin a ferrichrom A (Keller-Schierlein, 1963). Jejich struktura zabraňuje rychlé degradaci proteázami, což z nich činí nejstabilnější molekuly přenášející železo mezi siderofory. Ferrichromy obsahují tři hydroxamátové skupiny a jsou typicky produkovány houbami stopkovýtrusnými, ke kterým patří například rod *Ustilago*, a houbami vřecovýtrusnými rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Neurospora*. Ferrirubin obsahuje acylovou skupinu, kyselinu *cis*-anhydromevalononovou (viz Obrázek 4A) (Heymann *et al.*, 2000). Zároveň je izomerní s ferrirhodinem, jehož acylová skupina je v konfiguraci *trans* (Fidelis *et al.*, 1990).

Koprogeny patří mezi lineární hydroxamátové siderofory složené z *trans*-fusarinových jednotek. Koprogen se skládá ze tří hydroxamátových skupin a obsahuje diketopiperazinový kruh (viz Obrázek 4B) (Renshaw *et al.*, 2002). Je produkován například houbami rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Neurospora* (Aguiar *et al.*, 2021).



Obrázek 4: Chemická struktura sideroforu (A) ferrirubinu a (B) koprogenu. Vytvořeno pomocí ChemDraw.

3.2.5 Využití sideroforů

Siderofory se vyznačují širokou škálou uplatnění v oblastech zemědělství a životního prostředí (Sajeed *et al.*, 2013). V zemědělství jsou siderofory využívány jako hnojiva,

biokontrolní činidla nebo v boji proti chloróze způsobené nedostatkem železa. V oblastech životního prostředí slouží například při bioremediaci těžkých kovů, přičemž snížením jejich biologické dostupnosti minimalizují případný negativní dopad. Dále mohou mít roli biosenzorů, protože jsou vhodnou sondou pro detekci přítomnosti kovových iontů v biologických vzorcích nebo pro detekci bakterií (Soares, 2022).

Siderofory lze však využít především v různých oblastech medicíny, zejména v diagnostice a terapii, díky jejich schopnostem chelatovat železo. Jsou účinným prostředkem k léčbě nemocí způsobených přetížením železa, hepatitidy, malárie a Parkinsonovy choroby. Mohou také inhibovat proces vývoje nádorů narušením metabolismu železa v neoplastických buňkách (Fan *et Fang*, 2021; Soares, 2022). V případě výskytu bakterií rezistentních vůči antibiotikům lze siderofory použít k selektivnímu podání antibiotik pomocí strategie známé pod názvem Trojský kůň. Princip spočívá ve vytvoření komplexu siderofor-léčivo, a následného vstupu tohoto komplexu do buňky prostřednictvím vnějších membránových receptorů. Poté dochází k hydrolýze konjugátu, léčivo je uvolněno a způsobuje buněčnou smrt (Sajeed *et Vidhale*, 2013; Soares, 2022). Příkladem přírodních konjugátů jsou sideromyciny, mezi které patří nejvíce studovaný albomycin produkovaný řadou druhů rodu *Streptomyces* (Hider *et Kong*, 2010; Fan *et Fang*, 2021).

Siderofory jsou také schopny inkorporovat radionuklidy, například gallium ^{68}Ga , zirkonium ^{89}Zr a indium ^{111}In , které mohou být dále využity v molekulárním zobrazování infekcí (Petrik *et al.*, 2017; Fan *et Fang*, 2021). Tato metoda lokalizace a charakterizace infekce by se mohla stát důležitým prvkem pro včasnou a spolehlivou diagnózu, a to zejména u rizikových pacientů (Petrik *et al.*, 2017).

3.3 Radionuklidy

Nuklid, atomové jádro prvku, je charakterizován atomovým číslem značícím počet protonů v jádře, a hmotnostním číslem udávajícím počet nukleonů (tj. počet protonů a neutronů) v jádře. Nuklidy téhož chemického prvku se stejným počtem protonů se nazývají izotopy (Ziessman *et al.*, 2013). Radionuklidy jsou nestabilní nuklidy, které při radioaktivním rozpadu emitují elektromagnetické záření nebo nabitě částice, čímž se snaží dosáhnout stability, a tedy se samovolně přeměňují na jádra jiná. Atomová jádra jsou stabilní pouze v případě vhodného poměru počtu protonů a neutronů. Tento proces přeměny se nazývá radioaktivita (Lázníček *et Komárek*, 1998; Ziessman *et al.*, 2013).

Radioaktivita byla objevena roku 1896 Henri Becquerelem. Správnou interpretaci tohoto jevu však podali až manželé Curieovi roku 1898 (Lázníček *et* Komárek, 1998). Příslušnou veličinou je aktivita, která je definována počtem jader, které se přeměňují za jednotku času. Aktivita radionuklidu tedy klesá s časem při rozpadu původního jádra. Jednotkou aktivity je 1 Bq (becquerel), představující 1 radioaktivní rozpad za 1 sekundu (Ullmann, 2009).

Lze rozlišit tři základní typy radioaktivních přeměn, a to přeměnu alfa, přeměny beta a přeměny gama, přičemž musí být vždy dodrženo zachování hmotnosti, energie a náboje radionuklidů. Mezi přeměny beta, které jsou nejčastějším a nejdůležitějším typem přeměn, se řadí přeměna β^- , přeměna β^+ a elektronový záchyt. Přeměna β^- nastává v případě nadbytku neutronů v jádře, které se tak stává nestabilním. Dochází k emisi záporně nabitých elektronů a také k emisi antineutrína, přičemž se zvyšuje atomové číslo o jednotku. V případě nadbytku protonů či nedostatku neutronů v jádře jsou při přeměně β^+ emitovány kladně nabitě pozitrony a neutrino, čímž dochází ke snížení atomového čísla. Elektronový záchyt je alternativním procesem k přeměně β^+ u jader s přebytkem protonů (Lázníček *et* Komárek, 1998; Ullmann, 2009).

V současnosti je identifikováno více než 2 000 radioaktivních izotopů patřících k 104 chemickým prvkům. Tyto radionuklidy jsou rozdělovány na přirozené, které se nacházejí v přírodě, a umělé (Koranda *et al.*, 2014).

3.3.1 Příprava radionuklidů

Přirozeně se vyskytující radionuklidy se obvykle vyznačují dlouhým poločasem rozpadu trvajícím často i tisíce let (Currie *et al.*, 2011). Z tohoto důvodu jsou pro účely nukleární medicíny připravovány radionuklidy pouze uměle, a to primárními zdroji radionuklidů, ke kterým patří jaderný reaktor a cyklotron, nebo sekundárními zdroji v radionuklidových generátorech (Koranda *et al.*, 2014). Při přípravě radionuklidů v jaderných reaktorech obecně dochází k nadbytku neutronů. Tyto radionuklidy se tak nejčastěji rozpadají přeměnou β^- , a z tohoto důvodu jsou vhodné zejména pro radioterapii. Naopak cyklotronem produkované radionuklidy se vyznačují převážně nedostatkem neutronů a rozpadají se přeměnou β^+ a elektronovým záchytem, a tedy jsou využívány zvláště pro diagnostická vyšetření (Qaim, 2012).

V jaderných reaktorech lze radionuklidy připravit dvěma způsoby. Prvním způsobem je ozáření terčového materiálu v reaktoru neutronovým svazkem. Dochází tak k aktivaci jader,

kteřá byla doposud stabilní. Druhým způsobem je izolace radionuklidů ze štěpných produktů uranu ^{235}U . Oběma procesy lze získat například molybden ^{99}Mo (Koranda *et al.*, 2014). Molybden-99 je mateřským nuklidem pro přípravu izotopu technecia $^{99\text{m}}\text{Tc}$ s poločasem rozpadu 6 hodin. Tento izotop je v nukleární medicíně celosvětově využíván při více než 45 milionech diagnostických procedur ročně (Youker *et al.*, 2017).

V cyklotronech, nazývaných také jako urychlovače nabitých částic, jsou stabilní terče obvykle ozařovány částicemi α , deuterony nebo protony, které jsou urychlovány na vysoké energie k překonání Coulombovské bariéry ozařovaného jádra. Cyklotron se skládá ze dvou dutých elektrod připomínajících tvar písmene D, ke kterým je připojen střídavý elektrický proud. Celé zařízení je umístěno v magnetickém poli (Willowson, 2019). Takto mohou být získány například radioizotopy kyslík ^{15}O , dusík ^{13}N a fluor ^{18}F (Koranda *et al.*, 2014). Dále je pomocí cyklotronu vyráběno například germanium ^{68}Ge ze stabilního izotopu gallia ^{69}Ga (Velikyan, 2015).

V radionuklidovém generátoru dochází ke změně mateřského radionuklidu s delším poločasem rozpadu, který byl získán z primárního zdroje, na radionuklid dceřiný, který se vyznačuje krátkým poločasem rozpadu (Koranda *et al.*, 2014). Výhodou generátoru je možnost opakované produkce těchto radionuklidů, které po aplikaci do organismu způsobují minimální radiační zátěž a zároveň umožňují vysokou kvalitu zobrazení (Lázníček *et Komárek*, 1998). V závislosti na poločasech rozpadu obou radionuklidů, může docházet k pravidelné separaci a extrakci dceřiného radionuklidu metodou eluce. Separace je založena na odlišných fyzikálních a chemických vlastnostech obou radionuklidů (Currie *et al.*, 2011). V posledních letech došlo k výraznému nárůstu využití radionuklidu ^{68}Ga v zobrazovacím metodách. Tento radionuklid je produkován pomocí $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru (Synowiecki *et al.*, 2018).

3.3.2 Radionuklid gallium-68 (^{68}Ga)

Gallium bylo objeveno roku 1875 ve Francii pomocí metod spektroskopie. Jedná se o kov III.A skupiny PSP s atomovým číslem $Z = 31$. Ze zemské kůry se získává jako vedlejší produkt při těžbě hliníkových a zinkových rud (Chitambar, 2016). Gallium má lesklou, stříbrobílou barvu. Teplota tání dosahuje hodnoty $28,77\text{ }^{\circ}\text{C}$, a tedy se jedná o kov, který je jako jeden z mála při pokojové teplotě téměř tekutý (Chitambar, 2010). Tento prvek se nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu Ga^{3+} (Cotton *et al.*, 1999). Neradioaktivní formy gallia jsou využívány zejména v elektronickém průmyslu, například ve formě arsenidu gallia (GaAs),

který má polovodičové vlastnosti. Je tedy vhodný pro výrobu optických zařízení, jako jsou pokročilé polovodiče, digitální víceúčelové disky a laserové diody (Chen *et al.*, 2012).

V nukleární medicíně patří mezi nepoužívanější radionuklidy gallia ^{67}Ga s poločasem rozpadu 72,3 hodin, a ^{68}Ga s poločasem rozpadu 68 minut. Gallium-67 se přeměňuje elektronovým záchytem na zinek ^{67}Zn . Přestože je méně používaným radionuklidem pro SPECT zobrazování, má potenciál pro širší využití. Jeho celosvětově nejvýrazněji používaným indikátorem je ^{67}Ga -citrát uplatňující se v různých zánětlivých studiích vedoucích k detekci nádorů a infekcí. ^{68}Ga se přeměňuje především radioaktivním rozpadem β^+ na ^{68}Zn (Synowiecki *et al.*, 2018). Tento izotop gallia je uplatňován především pro značení peptidů, malých efektorových a haptenových molekul, a dalších radiofarmak. Většina zobrazovacích prostředků je syntetizována pomocí techniky značení, při níž je vektorová molekula nejprve konjugována s chelátorovou částicí pro následnou kompletaci s ^{68}Ga . Nejčastěji používanými chelátory jsou deriváty DOTA a NOTA. Nejnámějšími galliem-68 značenými radiofarmaky jsou ^{68}Ga -DOTATATE, ^{68}Ga -DOTATOC a ^{68}Ga -DOTANOC, které hrají významnou roli především v detekci neuroendokrinních nádorů pomocí metod PET a PET/CT. ^{68}Ga je tedy využíváno obzvláště v onkologické diagnostice, přičemž se stalo možným kandidátem pro další teranostická využití. Jeho potenciál byl však prokázán i pro zobrazení infekce, zánětu, a perfuze myokardu a plic (Velikyan, 2015; Synowiecki *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

Nejběžnější metodou získávání radionuklidu ^{68}Ga je pomocí $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru. Mateřský nuklid ^{68}Ge s poločasem rozpadu 270,95 dní, je imobilizován na stacionární fázi, která je obvykle tvořena anorganickými sorbenty, protože jsou méně citlivé na radiolýzu. Mezi anorganické sorbenty patří TiO_2 , SnO_2 , ZrO_2 a CeO_2 . Organickým sorbentem je *N*-methylglukamin. ^{68}Ge se tedy přeměňuje elektronovým záchytem (EC) na radionuklid ^{68}Ga , který se poté rozpadá na ^{68}Zn (viz Tabulka 1). Germanium-68 zaručuje možnost průběžné zásoby ^{68}Ga pro klinické použití až po dobu jednoho roku (Schönfeld *et al.*, 1994; Velikyan, 2015; Nelson *et al.*, 2022).

Tabulka 1: Příklad rozpadové řady uměle vyrobeného radionuklidu germania.

Mateřský radionuklid ($T_{1/2}$)	Typ rozpadu	Dceřiný radionuklid ($T_{1/2}$)	Typ rozpadu	Výsledný nuklid
^{68}Ge , (270,95 dní)	EC	^{68}Ga (68 min)	β^+ , EC, γ	^{68}Zn

Legenda: ($T_{1/2}$) - poločas rozpadu

Postupné pokroky v radiochemii vedly k dostupnosti generátorů poskytujících $^{68}\text{Ga}^{3+}$ v eluátu kyseliny chlorovodíkové. Eluovaný radionuklid ve formě $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ lze použít k následnému radioaktivnímu značení (Nelson *et al.*, 2022). Mezi kontaminanty eluátu se řadí některé kovy, především Ge a Zn. Vysoká pozitronová emise frakce ^{68}Ga a krátký poločas rozpadu, poskytují dostatečnou úroveň radioaktivity pro vysoce kvalitní zobrazovací snímky s minimální radiační dávkou pro organismus. Zároveň umožňují opakovaná vyšetření a vyžadují krátkou dobu skenování (Velikyan, 2015).

Z chemického hlediska se Ga^{3+} podobá Fe^{3+} co se týče iontového poloměru, elektronegativity, elektronové afinity a koordinačního čísla (Sun *et al.*, 2023). Na základě toho se Ga^{3+} mohou vázat prakticky na jakýkoliv komplex nebo sloučeninu, která váže Fe^{3+} , což je pro biologické systémy obtížné rozlišit. Mezi tyto sloučeniny lze zařadit například protoporphyrin, proteiny jako je laktoferin, transferin a feritin, a již zmíněné siderofory, které by za normálních okolností vázaly železité ionty (Kelson *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022). Jelikož siderofory hrají významnou roli ve virulenci patogenů, jsou považovány za slibné kandidáty pro jejich detekci. Siderofory v kombinaci s galliem, které je prostřednictvím mechanismu uptake vzniklého komplexu přijato do bakteriálních buněk, jsou vhodné pro diagnostiku infekční onemocnění pomocí radiologického nebo optického zobrazování (Fan *et Fang*, 2021).

3.4 Zobrazovací metody nukleární medicíny

Mezi klinicky dostupné zobrazovací metody infekce se zařazují například magnetická rezonance (MRI) a výpočetní tomografie (CT), které jsou však založeny na změnách v anatomii nebo morfologii tkání. Tyto změny jsou ale často opožděné vzhledem k procesu onemocnění. Proto jsou tyto strukturální zobrazovací metody nespecifické a mohou reflektovat kombinaci infekce a zánětlivé reakce. Molekulárně zobrazovací metody, mezi které patří jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) a pozitronová emisní tomografie (PET), poskytují informace o probíhajících metabolických procesech v tkáních. Současné zobrazovací prostředky pro SPECT a PET metody zvyšují citlivost detekce, ale jsou omezené, protože zobrazují fyziologické změny, které jsou součástí zánětlivého procesu a reakce hostitele na infekci. Tato nedostatečná specifita je hlavní překážkou zmíněných metod (Ordonez *et al.*, 2019).

3.4.1 Magnetická rezonance (MRI)

Magnetická rezonance je zobrazovací technologie, která se vyznačuje vynikajícím kontrastem měkkých tkání s vysokým prostorovým rozlišením, tomografickým trojrozměrným zobrazením a schopností znázorňovat dynamické fyziologické změny na základě nukleární magnetické rezonance. Provádí se neinvazivním způsobem, který umožňuje bezpečné opakování skenování (Plewes *et* Kucharczyk, 2012). Metoda MRI kombinuje vysoce silná magnetická pole s neionizujícím radiofrekvenčním zářením, a využívá vlastnosti atomových jader s lichým počtem nukleonů, které mají nenulový magnetický moment nebo spin (Kiessling *et* Pichler, 2011). Snímky jsou vytvářeny pomocí signálů vznikajících pohybem jader atomů v silném magnetickém poli. Předmětem zájmu jsou především signály z jader vodíku, který je součástí tkáňové vody a lipidů (Schmidt *et* Payne, 2015). Technika MRI je nejvíce využívána k analýze mozku, zejména k detekci Alzheimerovy choroby, roztroušené sklerózy, vaskulární demence, meningiomu a glioblastomu. Dále může být použita k predikci různých onemocnění, například prostaty, ledvin a páteře (Lundervold *et* Lundervold, 2019). Také umožňuje snadnou detekci infekcí močových cest a abscesů (El-Ghar *et al.*, 2021).

3.4.2 Výpočetní tomografie (CT)

Výpočetní tomografie je radiografická zobrazovací metoda poskytující trojrozměrné vyobrazení relativního útlumu rentgenových záření při průchodu různými tkáněmi. Rentgenové záření vychází v podobě tenkého svazku z rentgenky, následně prochází objektem, a nakonec dopadá na velkoplošný detektor záření, který je umístěn naproti rentgence. Celá sestava se lineárně posouvá a zároveň se otáčí o malý úhel kolem podélné osy subjektu. Kompletní soubor transmisních snímků je poté matematicky rekonstruován. CT snímky jsou běžně parametrizovány v Hounsfieldových jednotkách (HU) (Kiessling *et* Pichler, 2011). Hodnoty HU se pro většinu měkkých tkání, které jsou nejčastějším předmětem zájmu, pohybují v rozsahu od -100 do +100. V současnosti jsou rozlišovány výpočetní tomografy celkem čtyř generací (Goldman, 2007). Pomocí metody CT lze detekovat například akutní pneumonii a jaterní abscesy vyvolané *K. pneumoniae* (Okada *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2015).

3.4.3 Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT)

Podstata této zobrazovací technologie spočívá v detekci gama záření emitovaného radionuklidu, které se rozpadají v tkáni subjektu (Alqahtani, 2023). Jednotlivé fotony záření jsou detekovány scintilační kamerou neboli gamakamerou, která se skládá z kolimátoru, scintilačního krystalu, světlovodiče a několika fotonásobičů (Kiessling *et* Pichler, 2011).

Kolimátor je zhotoven z olova a působí jako filtr, který propouští pouze fotony letící v žádaném směru, a to nejčastěji kolmo k povrchu scintilačního krystalu (Koranda *et al.*, 2014). Scintilační krystal, většinou jodid sodný aktivovaný thalliem, detekuje fotony, které prošly kolimátorem, a převádí jejich energii na viditelné světlo. Tyto záblesky jsou pomocí světlovodiče převedeny na soustavu fotonásobičů, které konvertují světelný signál na signál elektrický. Výstupní signály jsou poté vyhodnocovány (Alqahtani, 2023). Typická SPECT zařízení obsahují jednu, dvě nebo více gamakamer, které rotují kolem objektu a pořizují projekční snímky (Kießling *et Pichler*, 2011). Ze série projekcí je poté v počítači rekonstruován trojrozměrný obraz ukazující distribuci radioaktivní látky ve vyšetřované oblasti (Koranda *et al.*, 2014). Mezi nejpoužívanější radionuklidy pro SPECT zobrazování patří ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{111}In a ^{123}I (Signore *et Glaudemans*, 2011). SPECT zobrazování se používá především k vizualizaci průtoku krve, diagnostice mozku a detekci nádorů (Payolla *et al.*, 2019).

3.4.4 Pozitronová emisní tomografie (PET)

Zobrazovací technologie PET je založená na koincidenční detekci dvou kolineárních fotonů (Kießling *et Pichler*, 2011). Pro zobrazování jsou používány radionuklidy, které emitují pozitrony a vyznačují se relativně krátkým poločasem rozpadu. Mezi nejpoužívanější pozitronové zářiče patří ^{11}C , ^{18}F a ^{15}O (Tai *et Piccini*, 2004). Dále jsou využívány například radionuklidy ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{64}Cu a ^{82}Rb (Brandt *et al.*, 2018). Nejčastěji používaným radiofarmakem pro klinické PET zobrazování je ^{18}F -FDG, dále například již zmíněný ^{68}Ga -DOTATATE (Voss, 2023). Princip metody je založen na pohybu emitovaných pozitronů v tkáni na velmi krátkou vzdálenost do té doby, než jsou spolu s elektronem z okolí anihilovány. V průběhu tohoto procesu vznikají dva fotony o stejné energii 511 keV, které se pohybují v opačných směrech (Tai *et Piccini*, 2004). Tradičně se používají blokové detektory, které se skládají z několika scintilačních krystalů (Kießling *et Pichler*, 2011). V případě, že jsou oba fotony zachyceny protilehlými detektory současně, vznikne koincidenční událost. Lze tedy předpokládat, že se poloha místa emise nachází na spojnici dvou bodů na detektorech, které signál přijaly. Z tohoto důvodu není nutné používat olovené kolimátory jako v případě SPECT. Tento faktor uděluje metodě PET podstatně vyšší citlivost. Pomocí údajů, které byly získány detekcí velkého počtu anihilačních fotonů, lze sestavit trojrozměrný obraz distribuce radioaktivně značené látky (Koranda *et al.*, 2014). PET se aktivně využívá v různých aplikacích především v onkologii, neurologii a kardiologii (Wang *et al.*, 2020a).

3.4.5 Hybridní zobrazovací metody

Metody SPECT a PET jsou často používány v kombinaci se strukturálním zobrazením MRI a CT k poskytnutí anatomické reference (Ordonez *et al.*, 2019). Dostupnost hybridních systémů SPECT/CT, SPECT/MRI, PET/CT a PET/MRI nabízí vyšší specifitu s možností hodnocení rozsahu patologie (Mokoala *et al.*, 2023). Konkrétně PET/CT je v současné době nejčastěji používanou nukleární zobrazovací technikou pro diagnostiku infekčních onemocnění. Nejvíce využívanou zobrazovací látkou je ^{18}F -FDG, která poskytuje dostatečnou diagnostickou přesnost pro mnoho infekcí, avšak může vykazovat určitá omezení, zejména ve specifitě. Infekce i zánět totiž zvyšují vychytávání FDG, a proto může být jejich rozlišení diagnostickým problémem (Pijl *et al.*, 2021).

Pro překonání těchto omezení by mohly sloužit radioaktivně značené siderofory, které by zároveň mohly splňovat požadavky pro optimální zobrazovací prostředek. (Petrik *et al.*, 2017). Bylo prokázáno, že pro zobrazování a včasnou diagnostiku infekcí způsobených houbami druhu *Aspergillus fumigatus*, například invazivní aspergilózy, mohou být použity galliem-68 značené siderofory triacetylfusarinin C (TAFC) a ferrioxamin E (FOX E) (Petrik *et al.*, 2014). Dále lze k detekci infekcí způsobených bakteriemi rodu *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* použít [^{68}Ga]Ga-DFO-B (Petrik *et al.*, 2021). Z tohoto důvodu se předpokládá, že by k PET/CT detekci infekce způsobené bakterií *K. pneumoniae* mohly být využity radioaktivně značené siderofory.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

K provedení experimentů byly použity mikrobiální kultury bakterie *Klebsiella pneumoniae* celkem čtyř kmenů:

- *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13368
- *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13465
- *Klebsiella pneumoniae* NCTC 24292/A
- *Klebsiella pneumoniae* 8157

Kmeny byly poskytnuty ze sbírky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Kmeny NCTC pochází z britské sbírky National Collection of Type Cultures a kmen 8157 je klinický izolát. Kmeny byly kultivovány v Petriho miskách obsahujících Columbia krevní agar (OXOID, PB5008A) po dobu 24 hodin při 37 °C. Po kultivaci na pevném médiu byly bakteriální kolonie přeneseny do Erlenmeyerových baněk obsahujících Mueller-Hintonovo médium (BioRad, kat. č. 69444) nebo M9 médium (Thermo Scientific, kat.č. A13744-01) a třepány při 150 rpm po dobu 4 až 72 hodin při 35 °C.

Experimenty byly prováděny na myších kmene Balb/c (Envigo, Horst) v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání (číslo 246/1992 Sb.), se souhlasem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-24421/2021-4) a Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Lidské krevní sérum bylo poskytnuto transfúzním oddělením Fakultní nemocnice v Olomouci.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Acetonitril - ACN (ROTH, kat.č. 8825,2)
- Cyklofosfamid - Endoxan (Baxter)
- Deionizovaná voda - diH₂O
- Fosfátový pufr - PBS, pH =7,4 (Thermo Scientific, kat. č. 10010-023)
- Fyziologický roztok - 0,9% NaCl (B Braun, kat.č. 5/395478/1109)
- Chlorid železitý (Sigma-Aldrich, kat.č. 157740-100G)
- Isofluran - Aerrane 100% (Baxter, kat.č. 1476143)

- Kyselina diethylenetriaminpentaoctová - DTPA (Sigma-Aldrich, kat.č. D1133-250G)
- Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, kat.č. 96208-250ML-F)
- Methanol (VWR Chemicals, kat.č. 20850.296)
- Octan amonný (Sigma-Aldrich, kat.č. 73432-100G-F)
- Octan sodný (Merck, kat.č. 1.06267.0500)
- Oktanol (VWR chemicals, kat.č. 20864.32)
- Siderofory: enterobaktin, salmochelin S4, ferrirubin a koprogen (EMC Microcollections GmbH)
- Terpentýnový olej (Proxim, kat.č. 650-002-00-6)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan - TRIS (Sigma-Aldrich, kat. č. 252859-500G)

Použité soupravy

- Gelové kolony pro purifikaci - MicroSpin G-50 Columns (Illustra™, 27533001)

Použité roztoky a jejich příprava

- 0,1 M roztok chloridu železitého: 1,62 g chloridu železitého rozpuštěno ve 100 ml diH₂O
- 1 M roztok octanu amonného: 77,1 g octanu amonného rozpuštěno v 1 l diH₂O
- 1,1 M roztok octanu sodného: 310 mg trihydrátu octanu sodného rozpuštěno ve 2 ml diH₂O
- 10mM Tris NaCl (pH = 7,3): 121,1 mg TRIS rozpustit ve 100 ml diH₂O
- 6mM roztok DTPA: 236 mg DTPA rozpuštěno ve 100 ml diH₂O
- Eluční činidlo - 0,1 M HCl: 12,29 g 30% HCl + 1 l diH₂O
- Roztok enterobaktinu: 0,5 mg enterobaktinu rozpuštěno v 1 ml ACN
- Roztoky salmochelinu S4, ferrirubinu, koprogenu: 1 mg sideroforu rozpuštěn v 1 ml diH₂O

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátor (Eckert & Ziegler Eurotope GmbH)
- Analytická váha AS 220.3Y (Radwag)
- Automatické pipety Research plus (Eppendorf)
- Automatický gama počítač AMG (Hidex)
- Cyclone Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer)
- Chladnička Type 6 6064 4 (Liebherr MediLine)

- Chromatografický papír ze skleněných vláken impregnovaných silikagelem (Varian)
- Inhalační anestezie FORANE (Summit)
- Inkubátor MD-02N (Thermo Scientific)
- Inkubátor s funkcí třepačky Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan)
- Mikrocentrifuga Smart 15 (Hanil Science Industrial)
- Minicentrifuga CD-1008 (PHOENIX Instrument)
- Software Mediso InterView FUSION (Mediso Medical Imaging Systems)
- Software Nucline™ (Mediso Medical Imaging Systems)
- Software OptiQuant (Perkin Elmer)
- Termoblok Thermo-Shaker TS-100 (Biosan)
- Třepačka Lab Dancer (IKA)
- Vortex Genius 3 (IKA)
- Zobrazovací zařízení NanoScan PET/CT pro malá laboratorní zvířata (Mediso Medical Imaging Systems)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Stanovení optimálních podmínek radioaktivního značení

Při radioaktivním značení hrají zásadní roli tři faktory, mezi které patří množství značeného sideroforu, doba značení a teplota značení. Pro testování je potřeba stanovit optimální podmínky.

Pro značení sideroforů SAL S4 a FR byly testovány tyto podmínky:

- a) Množství sideroforu: 0,01; 0,1; 1; 5 a 10 μg
- b) Doba značení: 1, 5, 10, 15 a 20 min
- c) Teplota prostředí: laboratorní teplota (LT) a 90 °C

Pro dosažení nižších koncentrací sideroforů byly siderofory ředěny pomocí roztoku PBS. Do všech připravených mikrozkušavek bylo pipetováno vždy 30 μl octanu sodného, příslušné množství sideroforu, a nakonec 300 μl získaného eluátu (viz podkapitola Radioaktivní značení). Reakční směsi byly zvortexovány a inkubovány za příslušné teploty. V každém čase byly ze všech vzorků odebrány 2 μl , které byly přeneseny na proužky silikagelem impregnovaného porézního chromatografického papíru se skleněnými mikrovlákny. Chromatografický papír byl vyvíjen po dobu 15 min v mobilní fázi v nasycené chromatografické komoře obsahující 5 ml methanolu a 5 ml 1M octanu amonného. Poté byla provedena radioanalýza značených

komplexů pomocí instantní chromatografie na tenké vrstvě (iTLC-SG) (viz podkapitola Kontrola kvality radioaktivního značení).

4.4.2 Radioaktivní značení

Frakcionovaná eluce radioaktivního $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru byla provedena pomocí elučního činidla 0,1 M HCl. Byla odebrána střední frakce eluátu o objemu 1-1,5 ml s aktivitou v rozmezí 100-200 MBq. Reakční směsi byly připraveny smícháním 30 μl octanu sodného, 300 μl eluátu, a příslušného množství jednotlivých sideroforů dle Tabulky 2.

Tabulka 2: Podmínky radioaktivního značení jednotlivých sideroforů.

Název značeného sideroforu	Objem přidaného sideroforu [μl]	Doba inkubace reakční směsi [min]
Enterobaktin	20	15
Salmochelín S4	10	5
Ferrirubin	5	5
Koprogen	10	15

Po uplynutí inkubační doby jednotlivých reakčních směsí při pokojové teplotě bylo upraveno pH na hodnotu v rozmezí 5–6 přidáním 100 μl octanu sodného. Následně byla provedena kontrola kvality radioaktivního značení stanovením radiochemické čistoty.

4.4.3 Kontrola kvality radioaktivního značení

Kontrola kvality radioaktivního značení vzniklých komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ byla provedena pomocí iTLC-SG tak, jak je popsáno výše. Poté byl každý proužek chromatografického papíru skenován pomocí systému Cyclone Plus Storage Phospor a vyhodnocen v programu OptiQuant.

4.4.4 *In vitro* testy stability

Po provedení kontroly kvality radioaktivního značení byly provedeny různé *in vitro* testy stability ověřující vlastnosti vzniklého komplexu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$.

Byly připraveny sady vzorků dle prováděného testu:

- a) Test stability v PBS: 100 μ l radioaktivně značeného sideroforu + 100 μ l PBS
- b) Test stability v prostředí s konkurenčním chelátorem: 100 μ l radioaktivně značeného sideroforu + 100 μ l 6mM DTPA
- c) Test stability v prostředí se železem: 100 μ l radioaktivně značeného sideroforu + 100 μ l 0,1 M FeCl₃
- d) Test stability v krevním séru: 100 μ l radioaktivně značeného sideroforu + 300 μ l lidského séra

Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 30, 60 a 120 min při 37 °C. V každém časovém intervalu byly odebrány 2 μ l z jednotlivých vzorků s výjimkou vzorku obsahující sérum, a byla provedena radioanalýza pomocí metody iTLC-SG. Ze vzorku obsahující sérum bylo v každém čase odebráno 100 μ l, ke kterým bylo pipetováno 150 μ l acetonitrilu. Takto vzniklé vzorky byly zvortexovány a dále centrifugovány po dobu 3 min při 15 000 rpm. Byl odebrán supernatant, který byl analyzován pomocí metody iTLC-SG.

4.4.5 Stanovení rozdělovacího koeficientu

Byla stanovena hodnota rozdělovacího koeficientu pro značené siderofory [⁶⁸Ga]Ga-FR a [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4, která udává míru lipofility testované sloučeniny na základě poměru rozpustnosti ve dvou nemísitelných fázích, v oktanolu a ve vodě (Lipinski *et al.*, 2001).

Nejprve byl vytvořen zásobní roztok smícháním 350 μ l značeného sideroforu se 450 μ l PBS. Bylo připraveno šest mikrozkušavek vzorků obsahujících 50 μ l zásobního roztoku, 450 μ l PBS a 500 μ l oktanolu. Takto připravené vzorky byly zvortexovány a umístěny na třepačku po dobu 20 min při 350 rpm. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 1 min při 15 000 rpm. Vzorky byly takto rozděleny na fázi oktanolovou a vodnou. Z každé fáze bylo opatrně pipetou odebráno 50 μ l vzorku. Jednotlivě odebrané vzorky fází byly rozděleny do mikrozkušavek. Odebrané vzorky byly analyzovány pomocí automatického gama počítače a ze získaných dat byla vypočítána hodnota rozdělovacího koeficientu dle vzorce:

$$\log P = \log \frac{CPM \text{ oktanol}}{CPM \text{ voda}}$$

4.4.6 Stanovení vazby na plazmatické proteiny

Byla testována vazba komplexů [⁶⁸Ga]Ga-FR a [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 na proteiny lidského krevního séra, která testuje zadržování farmaka v krvi. Pro toto stanovení byla použita gelová

permeační chromatografie, která separuje látky na základě rozměrů molekul. Větší molekuly procházejí na základě rozměrů pórů gelu kolonu rychleji, zatímco látky s menší molekulovou hmotností pronikají do nitra částic gelu, a jsou tak eluovány později nebo zůstávají navázány na koloně (Degano, 2019).

Vzorky [⁶⁸Ga]Ga-FR a [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 o objemu 440 µl byly naředěny 560 µl fyziologického roztoku. Z těchto ředění byly odebrány 3 vzorky od každého sideroforu o objemu 50 µl, které byly smíchány s 450 µl lidského krevního séra nebo PBS jako kontroly. Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 30, 60 a 120 min. V jednotlivých časových intervalech byla provedena separace vzorku v krevním séru pomocí gelové permeační chromatografie. Pro kontrolu vazby byla separace vzorku v PBS provedena pouze po dobu 30 min. Na připravené kolony bylo nanášeno 25 µl vzorku a kolony byly stočeny při 2 000 g po dobu 2 min. Pomocí gama počítače byla následně změřena aktivita zvláště v koloně a zvláště v eluátu. Naměřená data byla použita k výpočtu procentuálního zastoupení signálu v eluátu, a na základě výsledku byla stanovena vazba na plazmatické proteiny.

4.4.7 *In vitro* uptake v mikrobiálních kulturách

Po provedení kontroly kvality radioaktivního značení sideroforů ENTB, SAL S4, FR a COP, byly provedeny *in vitro* testy uptake v mikrobiálních kulturách několika kmenů *K. pneumoniae* za různých podmínek. Radioaktivně značené siderofory byly zředěny do 3 ml PBS na výslednou koncentraci pohybující se v rozmezí 100–200 nM. Do mikrozkuvek bylo napipetováno 500 µl mikrobiálních kultur, ke kterým bylo aplikováno vždy 50 µl jednotlivých zředěných sideroforů. Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 45 min při teplotě 37 °C a 300 rpm. Po inkubaci byly vzorky zcentrifugovány po dobu 5 min při 15 000 rpm. Následně byl odsán supernatant a vzniklý sediment byl promyt 500 µl ledového Tris pufru. Vzorky byly zvortexovány a centrifugace byla opakována. Vzniklý supernatant byl opět důkladně odsán. Mikrozkuvky obsahující mikrobiální sediment byly zváženy, a spolu s připravenými standardy pro každý siderofor byly podrobeny analýze pomocí automatického gama počítače.

4.4.7.1 *In vitro* uptake v různých kmenech *K. pneumoniae* kultivovaných v různých médiích

Pro vyhodnocení bakteriálního uptake sideroforů byly použity 4 bakteriální kmeny: *K. pneumoniae* NCTC 13368, *K. pneumoniae* NCTC 13465, *K. pneumoniae* NCTC 24292/A a *K. pneumoniae* 8157. Vzorky jednotlivých kmenů byly kultivovány po dobu 24 h před

provedením experimentu, a to buď v MH nebo M9 médiu, a následně zpracovány tak, jak je popsáno výše.

4.4.7.2 Vliv doby inkubace na *in vitro* uptake sideroforů

Vzorky bakteriálního kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivované v médiu M9 byly smíchány se siderofory, a následně inkubovány v různých inkubačních časech (1, 5, 15, 30, 45, 60 a 90 min). Se vzorky bylo dále pracováno tak, jak je popsáno výše.

4.4.7.3 *In vitro* studie blokace uptake sideroforů

Pro otestování, zda dochází k bakteriálnímu vychytávání sideroforů aktivním procesem vyžadujícím živé nenasyčené bakterie, byla kultura bakteriálního kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 narostlá v médiu M9 před smícháním se siderofory rozdělena na tři sady vzorků:

- a) Normální kultura
- b) Kultura inaktivovaná teplem (20 min, 90 °C)
- c) Kultura předinkubovaná s 50 µl FeCl₃ (20 min, 37 °C, 300 rpm)

Takto předpřipravené kultury byly smíchány se siderofory a zpracovány tak, jak je popsáno výše.

4.4.7.4 Vliv stáří kultury na *in vitro* uptake sideroforů

Pro zjištění vlivu stáří kultury na *in vitro* uptake sideroforů byly kultury bakteriálních kmenů *K. pneumoniae* NCTC 13368, *K. pneumoniae* NCTC 13465, *K. pneumoniae* NCTC 24292/A a *K. pneumoniae* 8157 kultivovány v M9 médiu v různých časových intervalech (4, 24, 48 a 72 h). Následně byly takto připravené kultury zpracovány a smíchány se siderofory, které v předchozích experimentech vykazovaly nejvyšší míru uptake, tedy s [⁶⁸Ga]Ga-FR nebo [⁶⁸Ga]Ga-ENTB. Se vzorky bylo následně pracováno tak, jak je popsáno výše.

4.4.8 *In vivo* PET/CT zobrazování

Pro *in vivo* PET/CT zobrazování byly použity myši kmene Balb/c, které byly uspány pomocí 4% isofluranové inhalační anestezie pro retroorbitální aplikaci radioaktivně značených sideroforů o objemu 100–150 µl a radioaktivitě 5–7 MBq. Statické i dynamické skenování bylo provedeno pomocí zobrazovacího zařízení NanoScan PET/CT pro malá laboratorní zvířata. Během skenování byly myši udržovány ve 2% isofluranové inhalační anestezii. Získaná data byla zrekonstruována a následně zpracována pomocí softwaru Mediso InterView FUSION.

4.4.8.1 Biodistribuce značených sideroforů ve zdravých myších

Nejprve byla sledována biodistribuce radioaktivně značených sideroforů ve zdravých laboratorních myších. Statické PET/CT skenování bylo provedeno v časech 30 a 90 min od aplikace.

4.4.8.2 Detekce *K. pneumoniae* v infikovaných myších pomocí značených sideroforů

Pro PET/CT zobrazování byl připraven model svalové infekce na laboratorních myších imunosuprimovaných cyklofosfamidem Endoxan, a to 5 dní a 1 den před infekcí v dávkách $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Myším bylo 5 nebo 24 hodin před zobrazováním intramuskulárně aplikováno 50 μl kultury *K. pneumoniae* NCTC 13465 nebo *K. pneumoniae* 8157 v dávce $5 \cdot 10^7$ CFU do svalu levé zadní končetiny. Následně byly myším v inhalační anestezii aplikovány značené siderofory 45 min před PET/CT zobrazováním.

4.4.8.3 Dynamické PET/CT zobrazení biodistribuce [^{68}Ga]Ga-FR v infikované myši

Pro dynamické sledování biodistribuce [^{68}Ga]Ga-FR v časových intervalech v myším modelu svalové infekce, bylo imunosuprimované laboratorní myši intramuskulárně aplikováno 50 μl kultury *K. pneumoniae* NCTC 13465 v dávce $5 \cdot 10^7$ CFU do svalu levé zadní končetiny bezprostředně před skenováním. Následně byl myši aplikován [^{68}Ga]Ga-FR. Ihned po aplikaci byla myš umístěna do zobrazovacího PET/CT zařízení, a bylo okamžitě zahájeno skenování, ve kterém byla myš snímána v 10 minutových intervalech po dobu 90 min.

4.4.8.4 Testování *in vivo* specificity [^{68}Ga]Ga-FR pro detekci infekce *K. pneumoniae*

Pro testování specificity *in vivo* uptake [^{68}Ga]Ga-FR bylo laboratorním myším 5 hodin před zobrazováním intramuskulárně aplikováno 50 μl kultury *K. pneumoniae* NCTC 13465 v dávce $5 \cdot 10^7$ CFU do svalu levé zadní končetiny. Do svalu pravé zadní končetiny byla aplikována vždy jedna z kontrol:

- a) 50 μl fyziologického roztoku (5 hodin před zobrazováním);
- b) 50 μl terpentýnového oleje pro vyvolání sterilního zánětu (24 hodin před zobrazováním);
- c) 50 μl teplem inaktivované bakteriální kultury (20 min, 90 °C) v dávce $5 \cdot 10^7$ CFU (5 hodin před zobrazováním)

Následně byly myším v inhalační anestezii aplikovány značené siderofory 45 min před PET/CT zobrazováním a myši byly zobrazovány tak, jak je popsáno výše.

5 VÝSLEDKY

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo otestovat *in vitro* vlastnosti radioaktivně označených sideroforů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$, a následně vybrat vhodný siderofor pro detekci infekce vyvolané bakterií *Klebsiella pneumoniae*.

5.1 Stanovení optimálních podmínek radioaktivního značení

Pomocí iTLC-SG bylo na základě tří testovacích podmínek (množství sideroforu, doby značení a teploty prostředí) provedeno stanovení optimálních podmínek radioaktivního značení sideroforů SAL S4 a FR.

Pro SAL S4 bylo pozorováno, že se vzrůstajícím množstvím sideroforu roste hodnota radiochemické čistoty. Lze říci, že 10 μg tohoto značeného sideroforu vykazuje nejvyšší hodnoty radiochemické čistoty pro všechny zmíněné doby i teploty značení. Zeleně zvýrazněné hodnoty znázorňují požadovanou, vyšší než 95% radiochemickou čistotu (viz Tabulka 3A). Pro většinu měření s různým množstvím SAL S4 lze pozorovat, že jsou hodnoty radiochemické čistoty celkově nejvyšší po 5 minutovém značení. Také bylo možné pozorovat, že zvýšení teploty v průběhu inkubace nemá vliv na značení sideroforu. Pro následující experimenty se SAL S4 byly tedy zvoleny podmínky: 10 μg SAL S4 značených galliem-68 po dobu 5 minut za LT.

Vzorky $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ obsahující 1, 5 a 10 μg tohoto sideroforu, vykazovaly vysoké hodnoty radiochemické čistoty ve všech časech a obou teplotách značení (viz Tabulka 3B). Vzhledem k tomu, že lze FR označit s potřebnou radiochemickou čistotou i při nižším množství tohoto sideroforu a při kratší době značení, byly pro další experimenty s FR byly zvoleny podmínky: 5 μg FR značených galliem-68 po dobu 5 minut za LT.

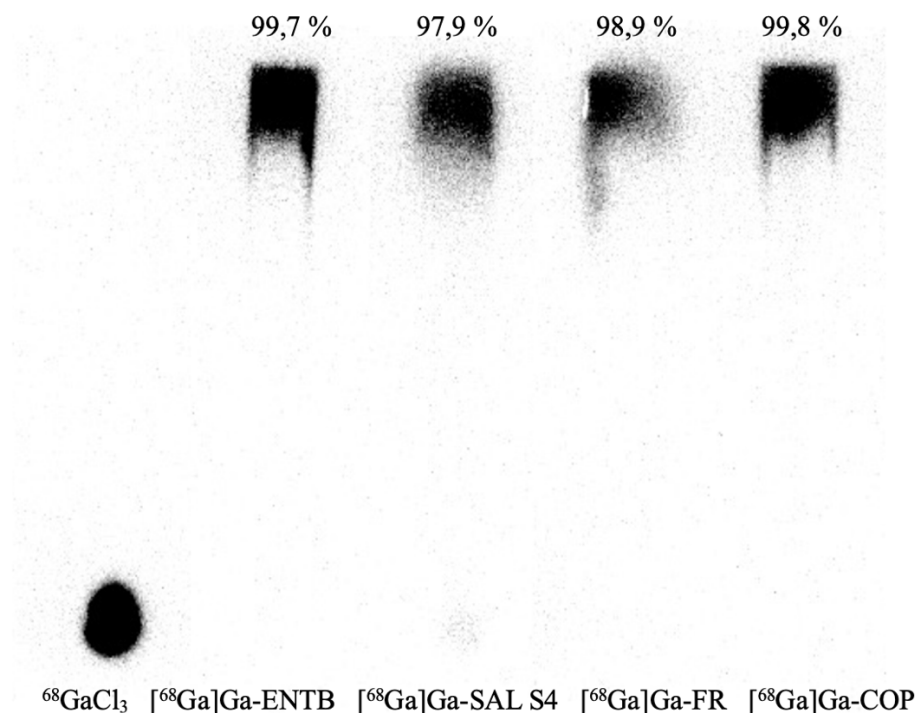
Tabulka 3: Optimalizace podmínek radioaktivního značení sideroforu (A) SAL S4 a (B) FR.

Siderofor	Teplota značení	Doba značení [min]	1	5	10	15	20
		Množství sideroforu [μg]	Výsledná radiochemická čistota [%]				
(A) SAL S4	LT	0,01	23,3	37,4	11,3	3,9	4,1
		0,1	33,6	36,7	21,5	10,9	11,0
		1	56,4	50,0	41,5	28,7	29,3
		5	90,3	96,0	88,5	97,5	91,8
		10	98,0	99,4	95,4	99,6	98,2
	90 °C	0,01	10,3	32,9	9,1	17,7	15,0
		0,1	17,3	53,2	18,9	30,1	26,2
		1	47,6	84,2	43,3	62,3	59,8
		5	83,5	95,4	84,3	90,3	89,3
		10	97,9	98,1	95,0	96,1	95,4
(B) FR	LT	0,01	1,4	9,6	5,6	5,7	7,9
		0,1	19,7	53,7	59,5	49,9	67,3
		1	87,3	95,1	96,4	97,3	98,1
		5	97,1	97,9	99,1	99,4	99,0
		10	98,1	98,7	99,2	99,7	99,7
	90 °C	0,01	14,0	17,1	18,1	18,4	18,1
		0,1	90,1	92,8	92,0	92,8	91,8
		1	99,2	99,6	99,5	99,7	99,8
		5	99,6	99,8	99,9	99,5	99,8
		10	99,9	99,9	99,9	99,1	99,9

Legenda: (LT) - laboratorní teplota

5.2 Radioaktivní značení a kontrola kvality

Po provedení radioaktivního značení a kontroly kvality značení pomocí iTLC-SG bylo zjištěno, že siderofory ENTB, SAL S4, FR a COP byly značeny galliem-68 s vysokou radiochemickou čistotou dosahující více než 95 % (viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Kontrola kvality radioaktivně značených komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$.

Legenda: ($^{68}\text{GaCl}_3$) - kontrolní vzorek

5.3 *In vitro* testy stability

Byla provedena analýza *in vitro* testů stability radioaktivně značených sideroforů SAL S4 a FR.

Vzniklý komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ vykazoval nejvyšší stabilitu v PBS, protože byly naměřeny hodnoty radiochemické čistoty vyšší než 97 % pro všechny inkubační časy. Naopak téměř nulovou stabilitu vykazoval komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ v prostředí s 0,1M FeCl_3 . Naměřené hodnoty radiochemické čistoty komplexu v prostředí s konkurenčním chelátorem DTPA se v závislosti na délce inkubace snižovaly z 53,7 % na 24,2 %. Zhruba 90% radiochemická čistota byla naměřena pro $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ v lidském séru. *In vitro* charakteristika komplexu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ je shrnuta v Tabulce 4A.

Komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ vykazoval vysokou stabilitu v lidském séru i PBS, přičemž naměřené hodnoty radiochemické čistoty pro všechny inkubační časy byly vyšší než 99 %. Naopak nejnižší stabilitu vykazoval komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ v prostředí s konkurenčních chelátorem DTPA, přičemž se hodnota radiochemické čistoty postupně snižovala, a po

dvouhodinové inkubaci klesla na pouhých 54,90 %. Komplex se také postupně rozpadal v prostředí s 0,1 M FeCl₃, ale hodnota radiochemické čistoty i po 120 minutách zůstala vyšší než 95 %. *In vitro* charakteristika komplexu [⁶⁸Ga]Ga-FR je shrnuta v Tabulce 4B.

5.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu

Z dat získaných automatickým gama počítačem byla na základě vypočítání hodnoty rozdělovacího koeficientu stanovena míra lipofility vzniklých komplexů [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 a [⁶⁸Ga]Ga-FR. Bylo zjištěno, že hodnota rozdělovacího koeficientu pro [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 je rovna $-4,04 \pm 0,13$, a tedy lze říci, že komplex vykazuje hydrofilní vlastnosti (viz Tabulka 4A). Vypočítaná hodnota Log *P* pro [⁶⁸Ga]Ga-FR je rovna $-2,62 \pm 0,03$, a tedy tento komplex vykazuje také vlastnosti hydrofilní (viz Tabulka 4B).

5.5 Stanovení vazby na plazmatické proteiny

Vazba na proteiny komplexu [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 se po 30–120 min inkubace při 37 °C pohybovala v rozmezí od 23,44 % do 25,31 % se směrodatnou odchylkou $\pm 0,23$ –1,42 (viz Tabulka 4A). Vazba na proteiny komplexu [⁶⁸Ga]Ga-FR byla nižší, pohybovala se v rozmezí 5,78 % do 6,7 % se směrodatnou odchylkou $\pm 2,26$ –2,52 (viz Tabulka 4B).

Tabulka 4: Výsledky *in vitro* charakterizace komplexu (A) [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 a (B) [⁶⁸Ga]Ga-FR.

Komplex	Log <i>P</i> [%]	Délka inkubace [min]	Stabilita v PBS [%]	Stabilita v 6mM DTPA [%]	Stabilita v 0,1M FeCl ₃ [%]	Stabilita v lidském séru [%]	Vazba na proteiny [%]
(A)	$-4,04 \pm 0,13$	30	98,6	53,7	0,3	90,8	$23,44 \pm 0,62$
		60	98,0	29,5	0,1	90,0	$25,18 \pm 1,42$
		120	97,3	24,2	0,1	89,7	$25,31 \pm 0,23$
(B)	$-2,62 \pm 0,03$	30	99,4	95,8	96,5	99,8	$5,78 \pm 2,26$
		60	99,2	85,7	95,7	99,9	$6,55 \pm 1,97$
		120	99,3	54,9	95,4	99,8	$6,70 \pm 2,52$

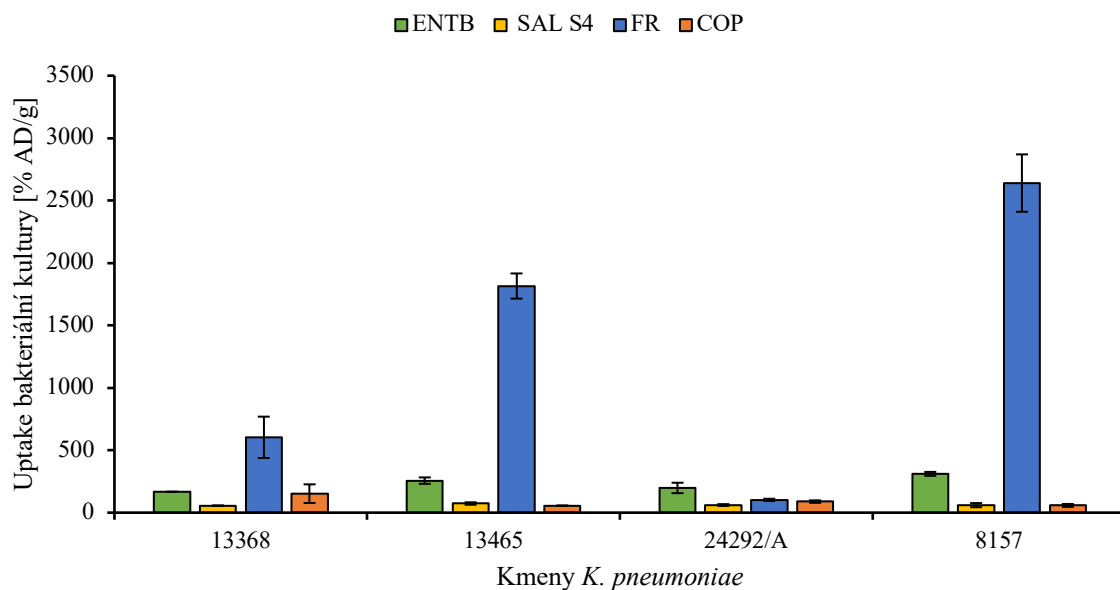
5.6 *In vitro* uptake v mikrobiálních kulturách

Byla provedena analýza *in vitro* uptake vzniklých komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ v mikrobiálních kulturách několika kmenů *K. pneumoniae* za různých podmínek.

5.6.1 *In vitro* uptake v různých kmenech *K. pneumoniae* kultivovaných v různých médiích

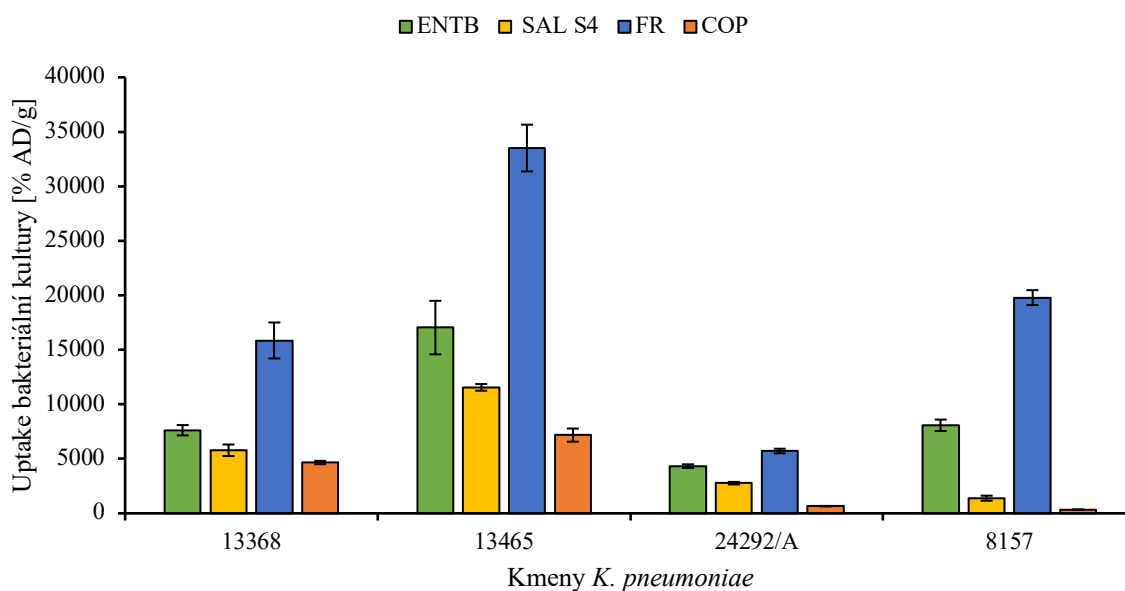
Při testování vlivu média na *in vitro* uptake komplexů bylo zjištěno, že bakteriální kmeny kultivované v MH médiu po dobu 24 hodin se vyznačují celkově nejvyššími hodnotami *in vitro* uptake komplexu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$, s výjimkou kmene *K. pneumoniae* NCTC 24292/A. Naopak komplexy $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ se vyznačovaly nejnižšími hodnotami bakteriálního uptake ve všech kmenech *K. pneumoniae* (viz Obrázek 6).

V případě 24 hodinové kultivace bakteriálních kmenů v M9 médiu byly pozorovány výrazně vyšší hodnoty bakteriálního uptake než při kultivaci kmenů v MH médiu. Bylo zjištěno, že všechny kultury *K. pneumoniae* vykazovaly nejvyšší hodnoty uptake pro komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$. Zároveň bylo zjištěno, že nejvyšší hodnoty uptake $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ i $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$, byly naměřeny konkrétně pro kmen *K. pneumoniae* NCTC 13465. Naopak nejnižšími hodnotami bakteriálního uptake se vyznačoval komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ (viz Obrázek 7). Na základě toho výsledku byla pro další dva experimenty používána mikrobiální kultura kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivovaná v M9 médiu.



Obrázek 6: *In vitro* uptake komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ v mikrobiálních kulturách kmene *K. pneumoniae* NCTC 13368, *K. pneumoniae* NCTC 13465, *K. pneumoniae* NCTC 24292/A a *K. pneumoniae* 8157, kultivovaných po dobu 24 hodin v MH médiu.

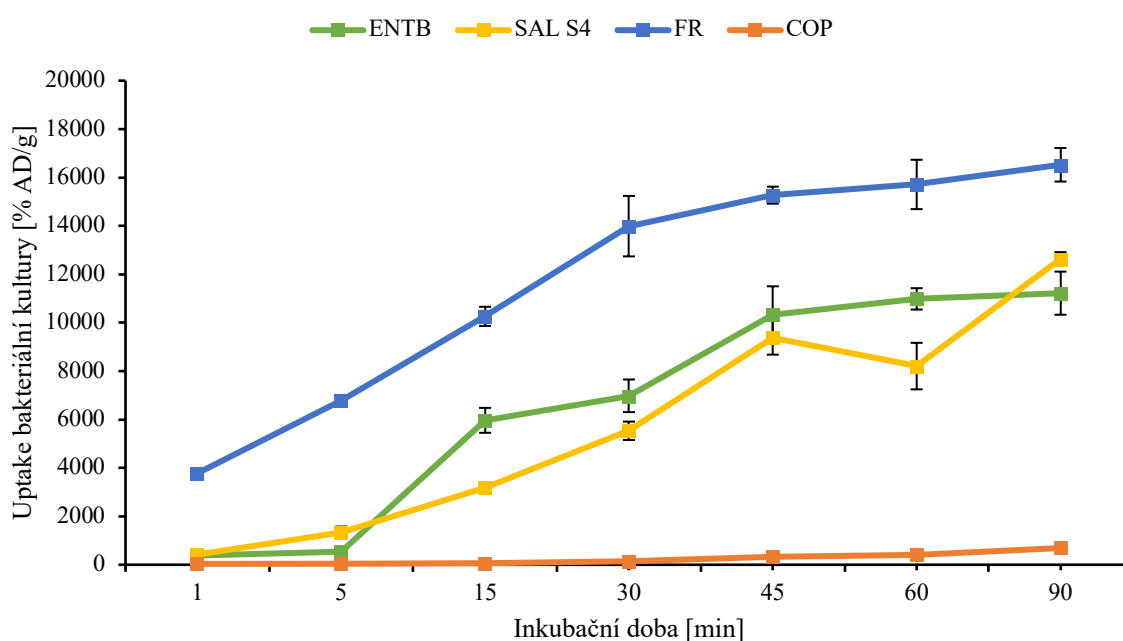
Legenda: (% AD/g) - procento absorbované dávky na gram



Obrázek 7: *In vitro* uptake komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ v mikrobiálních kulturách kmene *K. pneumoniae* NCTC 13368, *K. pneumoniae* NCTC 13465, *K. pneumoniae* NCTC 24292/A a *K. pneumoniae* 8157, kultivovaných po dobu 24 hodin v M9 médiu.

5.6.2 Vliv doby inkubace na *in vitro* uptake sideroforů

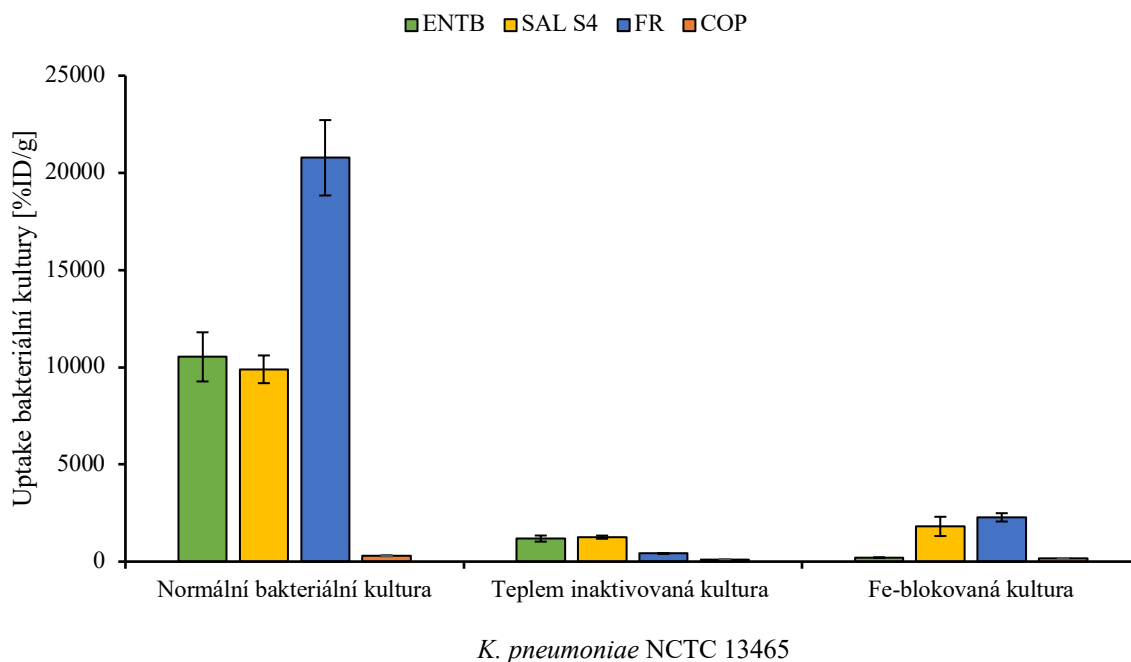
Při testování vlivu doby inkubace na *in vitro* uptake komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$, bylo prokázáno, že se zvyšující se inkubační dobou postupně rostou hodnoty uptake jednotlivých komplexů kulturou kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivovanou v M9 médiu. Nicméně nejvyšší nárůst hodnoty uptake byl pozorován zhruba do 45 minut od startu inkubace. Delší doba inkubace vykazovala pouze mírné zvýšení uptake (viz Obrázek 8). Vzhledem k poločas rozpadu ^{68}Ga byla tedy pro další experimenty zvolena inkubační doba 45 minut.



Obrázek 8: *In vitro* uptake komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ v různých časech inkubace v mikrobiální kultuře kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivované v M9 médiu.

5.6.3 *In vitro* studie blokace uptake sideroforů

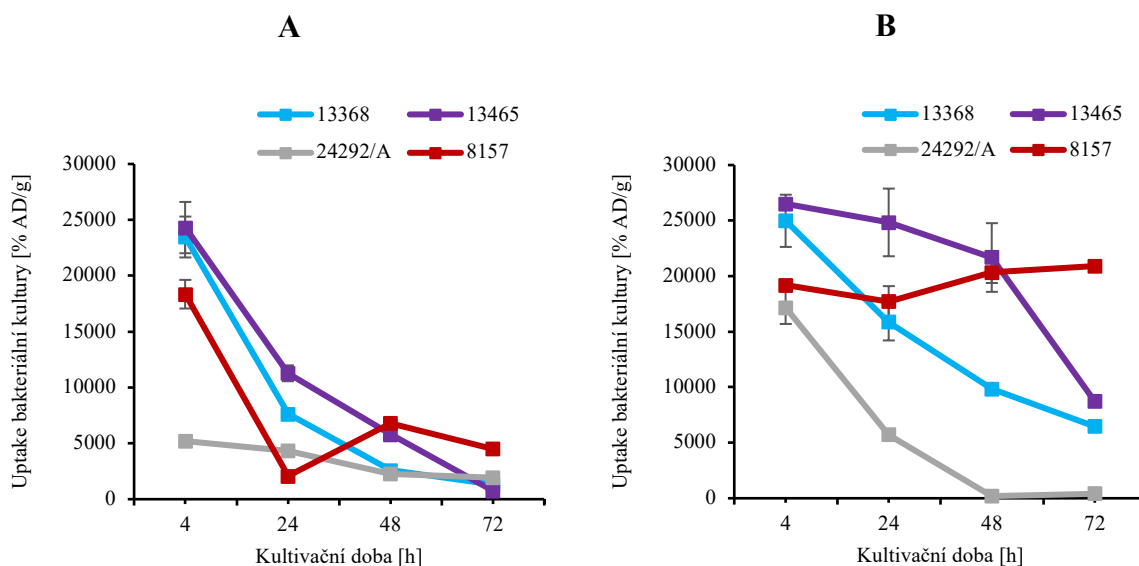
V tomto experimentu bylo prokázáno, že dochází k bakteriálnímu vylučování sideroforů aktivním procesem vyžadujícím živé nenasycené bakterie. Teplem inaktivovaná bakteriální kultura stejně jako kultura předinkubovaná s železem, vykazovaly po 45 minutách výrazně nižší hodnoty uptake vzniklých komplexů, než normální kultura bakteriálního kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivovaná v M9 médiu. (viz Obrázek 9).



Obrázek 9: *In vitro* uptake komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ po 45 minutách inkubace v normální kultuře kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 kultivované v M9 médiu, ve srovnání s teplem inaktivovanou kulturou (20 minut, 90 °C) a kulturou předinkubovanou s FeCl_3 .

5.6.4 Vliv stáří kultury na *in vitro* uptake sideroforů

Zkoumáním vlivu stáří kultury na *in vitro* uptake vzniklých komplexů bylo možné pozorovat, jak se v závislosti na stáří bakteriálních kultur kultivovaných v M9 médiu mění hodnoty uptake vzniklých komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$. Bakteriální uptake komplexu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$ byl nejvyšší po 4 hodinové kultivaci kultur u všech čtyř bakteriálních kmenů (viz Obrázek 10A). Hodnoty uptake komplexu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ byly nejvyšší po 4 hodinové kultivaci v kulturách bakteriálních kmenů *K. pneumoniae* NCTC 13368 a *K. pneumoniae* NCTC 13465. Zároveň bakteriální uptake dosahoval vysokých hodnot po uplynutí 24 hodinové inkubační doby (viz Obrázek 10B). Na základě těchto výsledků byla tedy pro porovnání *in vivo* uptake galliem-68 značených sideroforů zvolena inkubační doba infekce 5 a 24 hodin.



Obrázek 10: *In vitro* uptake komplexu (A) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$ a (B) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ po 45 minutách inkubace v mikrobiálních kulturách kmene *K. pneumoniae* NCTC 13368, *K. pneumoniae* NCTC 13465, *K. pneumoniae* NCTC 24292/A a *K. pneumoniae* 8157 kultivovaných po dobu 4, 24, 48 a 72 hodin v M9 médiu.

5.7 *In vivo* PET/CT zobrazování

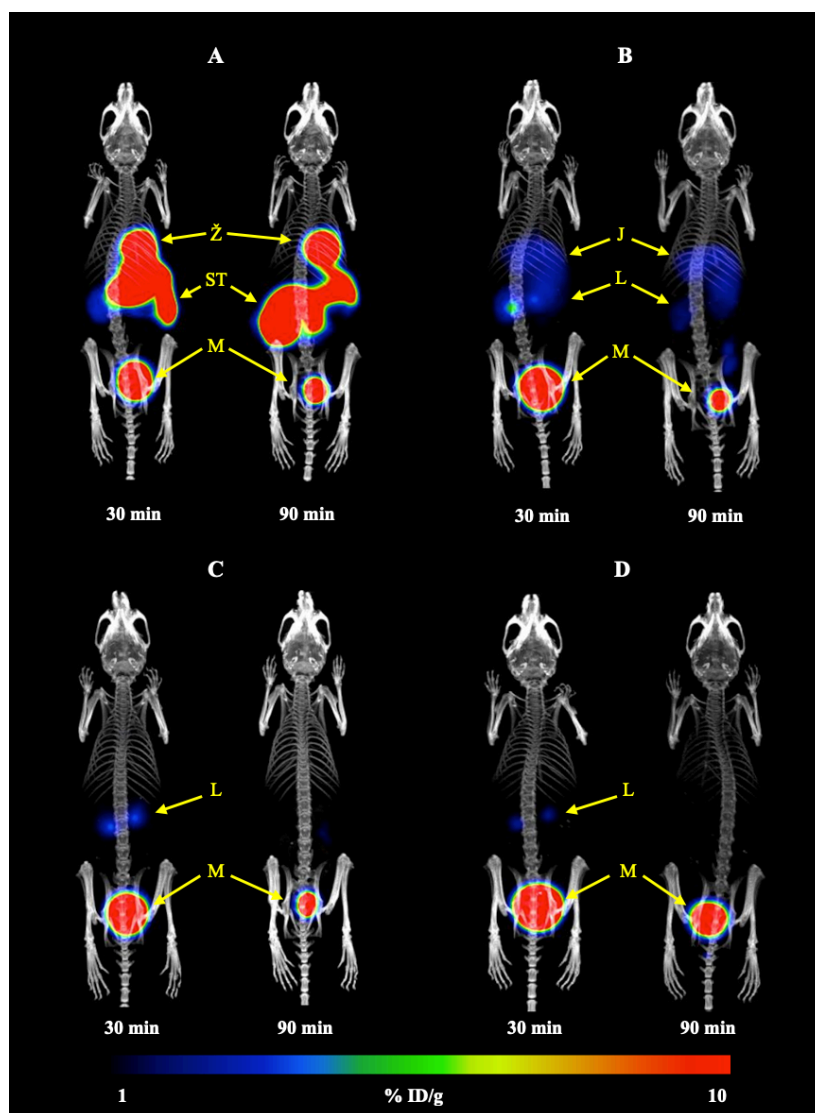
Po úspěšném radioaktivním značení sideroforů, kontrole kvality jejich značení a testování *in vitro* charakteristik vzniklých komplexů, bylo možné provést *in vivo* zobrazování pomocí PET/CT systému pro malá laboratorní zvířata.

5.7.1 Biodistribuce značených sideroforů ve zdravých myších

Nejprve byla sledována biodistribuce komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ ve zdravých laboratorních myších skenovaných v časech 30 a 90 minut od jejich aplikace.

Po uplynutí 30 minut od podání $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$ bylo možné na základě radioaktivního signálu pozorovat, že dochází k výrazné akumulaci tohoto komplexu ve žlučníku a střevech. Dále byl signál pozorován také v močovém měchýři a ledvinách. Po uplynutí 90 minut od aplikace $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$ byl signál i nadále detekován ve žlučníku, nejvíce však ve střevech. Signál z močového měchýře s časem slábl (Obrázek 11A). Komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ se po 30 minutách od jeho podání neinfikované myši mírně hromadil v játrech a ledvinách. Nejvyšší intenzita signálu byla pozorována v močovém měchýři. Skenování po 90 minutách od aplikace komplexu ukázalo, že intenzita signálu ze zmíněných orgánů mírně slábla (viz Obrázek 11B).

Po uplynutí 30 minut od aplikace $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ byl pozorován radioaktivní signál pouze v ledvinách a močovém měchýři. Po 90 minutách od aplikace komplexu signál z ledvin téměř vymizel a postupně se zmenšoval i v močovém měchýři (viz Obrázek 11C). Podobně byl zobrazen i radioaktivní signál z komplexu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$, který byl po 30 minutách od podání také pozorován v ledvinách i močovém měchýři. Po 1 hodině od prvního skenu signál z ledvin vymizel úplně (viz Obrázek 11D). Bylo tedy prokázáno, že komplexy $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ jsou z krevního oběhu vylučovány výhradně ledvinami, a nevykazují žádnou akumulaci v hlavních orgánech.



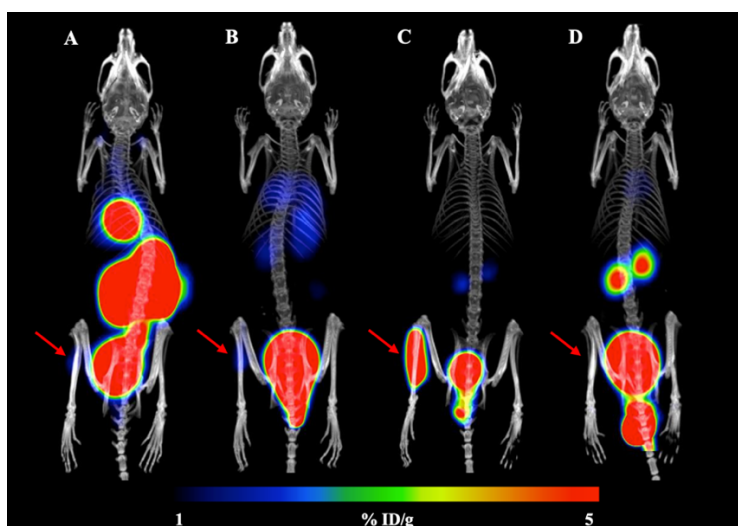
Obrázek 11: PET/CT snímek *in vivo* biodistribuce (A) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$, (B) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$, (C) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$, (D) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ v neinfikovaných myších 30 a 90 minut od podání galliem-68 značených sideroforů.

Legenda: (% ID/g) - procento podané dávky na gram, (J) - játra, (L) - ledviny, (M) - močový měchýř, (ST) - střeva, (Ž) - žlučník

5.7.2 Detekce *K. pneumoniae* v infikovaných myších pomocí značených sideroforů

Následovalo PET/CT zobrazování komplexů [⁶⁸Ga]Ga-ENTB, [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4, [⁶⁸Ga]Ga-FR a [⁶⁸Ga]Ga-COP v myších infikovaných mikrobiální kulturou kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 aplikovanou 5 hodin před snímáním.

Po uplynutí 45 minut od podání [⁶⁸Ga]Ga-ENTB byl v místě infekce detekován pouze minimální radioaktivní signál (viz Obrázek 12A). Tento výsledek byl pozorován i pro komplex [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4 (viz Obrázek 12B). Nejvyšší pozorovaná intenzita signálu v místě infekce byla způsobena vychytáváním komplexu [⁶⁸Ga]Ga-FR (viz Obrázek 12C). Naopak v případě [⁶⁸Ga]Ga-COP nebyl v místě infekce detekován žádný signál (viz Obrázek 12D). Na základě těchto i předchozích výsledků byl v dalších experimentech testován pouze komplex [⁶⁸Ga]Ga-FR.



Obrázek 12: PET/CT snímek *in vivo* biodistribuce (A) [⁶⁸Ga]Ga-ENTB, (B) [⁶⁸Ga]Ga-SAL S4, (C) [⁶⁸Ga]Ga-FR, (D) [⁶⁸Ga]Ga-COP po 45 minutách od retroorbitálního podání radioaktivně značeného sideroforu myším se svalovou infekcí vyvolanou kmenem *K. pneumoniae* NCTC 13465 aplikovanou 5 hodin před snímáním do levé zadní končetiny (červená šipka).

Legenda: (% ID/g) - procento podané dávky na gram

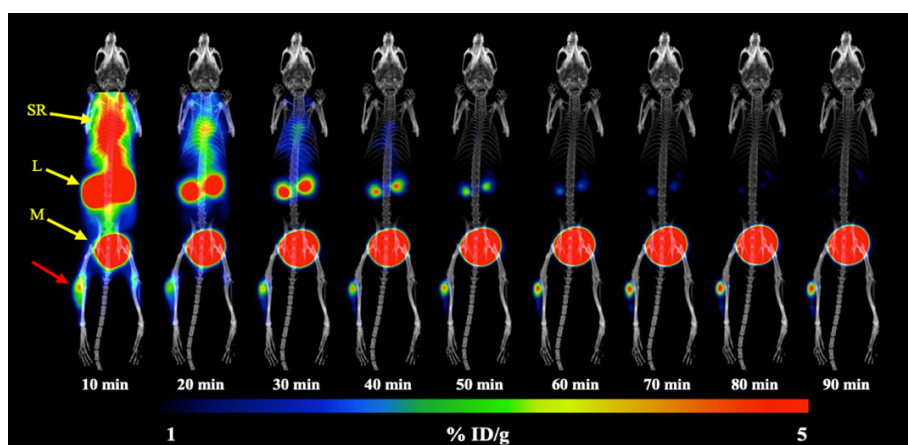
Dále byla sledována biodistribuce tohoto komplexu v myších infikovaných kulturou kmene *K. pneumoniae* 8157, která byla aplikována 5 a 24 hodin před snímáním. Po uplynutí 5 hodin od aplikace kultury byla pozorována vysoká intenzita signálu způsobená [⁶⁸Ga]Ga-FR v místě infekce (viz Obrázek 13A). Dalším skenem ukázal, že s časem postupně klesá intenzita signálu (viz Obrázek 13B).



Obrázek 13: PET/CT *in vivo* zobrazení biodistribuce [^{68}Ga]Ga-FR po 45 minutách od jeho podání v myším modelu svalové infekce vyvolaném kulturou kmene *K. pneumoniae* 8157 aplikované (A) 5 hodin a (B) 24 hodin před snímáním do levé zadní končetiny (červená šipka).

5.7.3 Dynamické PET/CT zobrazení biodistribuce [^{68}Ga]Ga-FR v infikované myši

S pomocí dynamického PET/CT zobrazování byla sledována biodistribuce komplexu [^{68}Ga]Ga-FR v 10 minutových intervalech v laboratorní myši infikované kulturou kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465. Již v 10. minutě byl pozorován radioaktivní signál z komplexu v místě infekce, který postupně sílil po celou dobu skenování až do 90. minuty. Dále bylo možné sledovat biodistribuci [^{68}Ga]Ga-FR v srdci a ledvinách. Radioaktivní signál ze srdce zcela vymizel zhruba v 50. minutě skenování, z ledvin pak zhruba v 80. minutě (viz Obrázek 14).

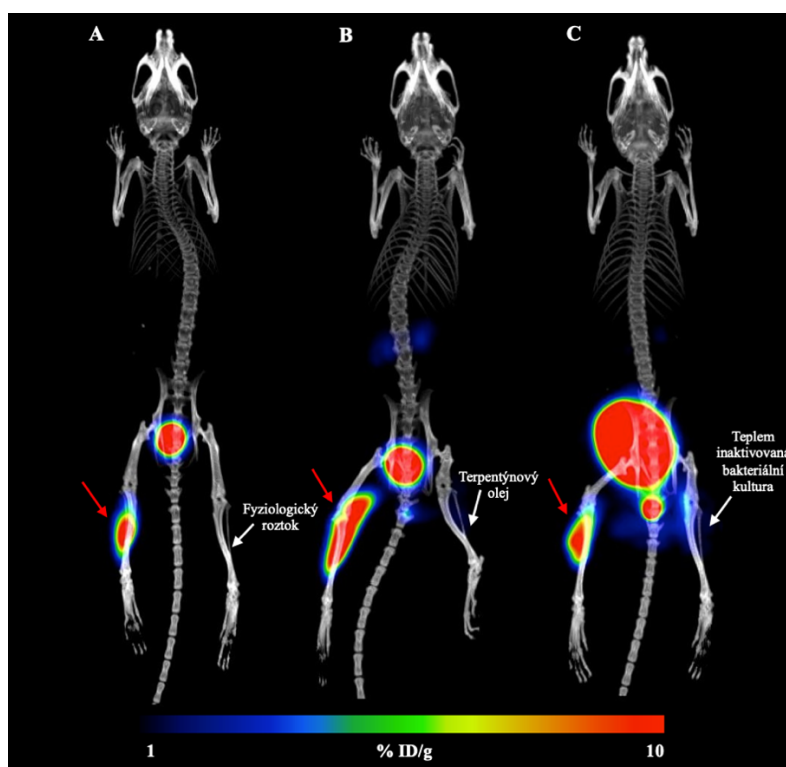


Obrázek 14: Dynamické PET/CT *in vivo* zobrazení biodistribuce [^{68}Ga]Ga-FR v myším modelu svalové infekce vyvolané kulturou kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465 aplikované těsně před snímáním do levé zadní končetiny (červená šipka).

Legenda: (L) - ledviny, (M) - močový měchýř, (SR) - srdce

5.7.4 Testování *in vivo* specificity [⁶⁸Ga]Ga-FR pro detekci *K. pneumoniae*

Nakonec byla testována *in vivo* specificita uptake [⁶⁸Ga]Ga-FR v laboratorní myši infikované kulturou kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465. Po uplynutí 45 minut od podání se [⁶⁸Ga]Ga-FR hromadil v levé infikované končetině myši. Jako kontrola byl použit fyziologický roztok aplikovaný do pravé zadní končetiny, ve které nebyla pozorována žádná akumulace komplexu (viz Obrázek 15A). Použitím terpentýnového oleje, který vyvolal sterilní zánět, bylo potvrzeno, že signál pozorovaný v infikované končetině byl způsoben výhradně bakteriální kulturou (viz Obrázek 15B). V porovnání s aplikací teplem inaktivované bakteriální kultury bylo možné na základě slabého signálu v místě aplikace sledovat, že je [⁶⁸Ga]Ga-FR vychytáván pouze živou bakteriální kulturou (viz Obrázek 15C).



Obrázek 15: PET/CT *in vivo* zobrazení biodistribuce [⁶⁸Ga]Ga-FR po 45 minutách od jeho podání v myším modelu svalové infekce *K. pneumoniae* kmene 13465 aplikované 5 hodin před snímáním do levé zadní končetiny (červená šipka) a kontrol do pravé zadní končetiny (bílá šipka). Kontrola (A) fyziologický roztok, (B) terpentýnový olej, (C) teplem inaktivovaná bakteriální kultura (20 min, 90 °C).

6 DISKUSE

V roce 2017 se infekční onemocnění stala hlavní příčinou nemocnosti, a třetí nejčastější příčinou úmrtnosti celosvětově. Většina těchto úmrtí je způsobována několika málo patogeny, ke kterým patří i bakterie rodu *Klebsiella* (Ordonez *et al.*, 2019). I přes rozsáhlé úsilí v boji proti bakteriálním infekcím a jejich rezistenci, je třeba zdokonalit používané diagnostické metody, které se mnohdy vyznačují sníženou specificitou a citlivostí (Jain, 2017; Ordonez *et al.*, 2019). Z tohoto důvodu se začínají více používat zobrazovací metody, mezi které patří například CT, MRI, SPECT a PET (Ordonez *et al.*, 2018). Tyto metody využívají klinicky schválené zobrazovací prostředky, které poskytují vyšší citlivost, nicméně se vyznačují neschopností rozlišit infekci od zánětlivých procesů a jiných patologií (Signore *et al.*, 2011; Welling *et al.*, 2019).

Ideální zobrazovací látka pro bakteriální infekce by měla být citlivá a specifická pro detekci místa infekce. Také by měla být netoxická, snadno dostupná, rychle připravená a cenově přijatelná. Rovněž by se měla vyznačovat ideálními biochemickými vlastnostmi, například hydrofilní povahou, slabou vazbou na plazmatické proteiny a metabolickou stabilitou. Zároveň by měla vykazovat optimální farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti (Bayly *et al.*, 2008; Ordonez *et al.*, 2018). Tyto požadavky by mohly splňovat například radioaktivně značené siderofory (Petrik *et al.*, 2017).

Siderofory jsou organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, jejichž primární úlohou je chelatace železa (Ahmed *et al.*, 2014). Zároveň jsou schopny inkorporovat například radionuklid ^{68}Ga , který je produkován pomocí jednoduchého a poměrně levného $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru (Velikyan, 2014; Petrik *et al.*, 2017). Doposud bylo zjištěno, že by pro zobrazování a včasnou diagnostiku infekcí způsobených houbami druhu *A. fumigatus* mohly být použity galliem-68 značené siderofory triacetylfusarinin C a ferrioxamin E (Petrik *et al.*, 2014). Dále byly prokázány slibné výsledky použití $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DFO-B}$ k detekci infekcí způsobených bakteriemi rodu *P. aeruginosa* a *S. aureus* (Petrik *et al.*, 2021). Velký potenciál pro zobrazování infekcí způsobených bakteriálními kmeny patřícími do *Burkholderia cepacia* komplexu vykazuje galliem-68 značený siderofor ornibaktin (ORNB) (Bendova *et al.*, 2023).

Cílem této bakalářské práce bylo vybrat vhodný zobrazovací prostředek pro PET/CT detekci bakterie *K. pneumoniae*. Pro testování byly zvoleny siderofory produkované touto bakterií, tedy ENTB a SAL S4. Dále byly vybrány xenosiderofory FR a COP, jelikož byla na vnější membráně *K. pneumoniae* zjištěna přítomnost receptorů pro tyto siderofory (Rabsch

et Winkelmann, 1991; Holden et al., 2018). Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na otestování *in vitro* vlastností radioaktivně označených sideroforů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$. *In vitro* vlastnosti komplexů $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ENTB}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-COP}$ byly již zkoumány v předchozích studiích, přičemž bylo zjištěno, že by tyto komplexy mohly být vhodnými kandidáty pro další testování (Petrik *et al.*, 2012; Budošová, 2022). Následně byl zkoumán *in vitro* uptake značených sideroforů v kmenech *K. pneumoniae* a byla sledována jejich biodistribuce v laboratorních zvířatech.

Aby mohly být siderofory značeny s potřebnou radiochemickou čistotou, musely být nejprve stanoveny vhodné podmínky radioaktivního značení. Jako optimální množství bylo zvoleno 10 μg SAL S4 a 5 μg FR, přičemž pro oba siderofory se k dosažení více než 95% radiochemické čistoty jevila jako ideální pouze 5 minutová doba značení ^{68}Ga za laboratorní teploty.

In vitro testy stability v PBS prokázaly, že oba komplexy $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ dosahují požadované radiochemické čistoty ve všech inkubačních časech. Nejvyšší stabilita byla pozorována pro komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ v lidském séru. S délkou inkubační doby obou komplexů v prostředí s konkurenčním chelátorem DTPA docházelo k postupnému poklesu hodnot stability. To bylo pravděpodobně způsobeno vytěsněním $^{68}\text{Ga}^{3+}$ z obou komplexů, který se přednostně vázal na DTPA (Price *et Orvig*, 2014). V prostředí s 0,1M železem vykazoval komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-SAL S4}$ téměř nulovou stabilitu. Avšak množství železa bylo v testovaném prostředí podstatně více, než je klinicky relevantní (Nairz *et Weiss*, 2020). Snížení hodnoty stability je pravděpodobně způsobeno vysokou afinitou a selektivitou sideroforů k železitým iontům, v tomto případě tedy docházelo k vytěsnění $^{68}\text{Ga}^{3+}$ z vazby výměnou za Fe^{3+} (Hider *et Kong*, 2010). Naopak vysoká radiochemická čistota byla v témže prostředí naměřena pro $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$. V porovnání mezi těmito dvěma komplexy lze říci, že komplex $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ je všeobecně stabilnější.

Hodnota rozdělovacího koeficientu $\text{Log } P$, na základě které lze stanovit míru lipofility, byla pro oba testované komplexy záporná, což naznačuje jejich hydrofilní povahu, díky které mají komplexy tendenci být rychle vylučovány přes ledviny a močový měchýř. Hydrofilní vlastnosti jsou zároveň potřebné pro splnění podmínek pro ideální zobrazovací látku (Bayly *et al.*, 2008; Ordonez *et Jain*, 2018). Bylo prokázáno, že hydrofilními vlastnostmi se vyznačují i další galliem-68 značené siderofory jako TAFC, FOXE i DFO-B (Petrik *et al.*, 2012, 2021). V případě testování vazby na plazmatické proteiny bylo zjištěno, že pro $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FR}$ jsou hodnoty podstatně nižší ve srovnání například s komplexem $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DFO-B}$, zatímco

hodnoty pro [^{68}Ga]Ga-SAL S4 byly o něco vyšší než hodnoty zmíněného komplexu (Petrik *et al.*, 2021). Nízké hodnoty vazby na plazmatické proteiny jsou žádoucí pro zobrazování (Ordonez *et Jain*, 2018). S vyššími hodnotami vazby na proteiny by mohlo souviset například delší zadržení tohoto komplexu v krvi při sledování *in vivo* biodistribuce (Moein *et Halldin*, 2020).

Na základě testování *in vitro* uptake [^{68}Ga]Ga-ENTB, [^{68}Ga]Ga-SAL S4, [^{68}Ga]Ga-FR a [^{68}Ga]Ga-COP v různých kmenech *K. pneumoniae* bylo zjištěno, že M9 médium je mnohem vhodnější pro studování *in vitro* uptake než MH médium, které obsahuje ionty železa. Nejvyšší hodnoty uptake byly pozorovány pro kulturu kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465. Hodnoty uptake jednotlivých komplexů se lišily mezi jednotlivými bakteriálními kmeny, což bylo pozorováno i v případě *in vitro* uptake [^{68}Ga]Ga-DFO-B (Petrik *et al.*, 2021). Také bylo dále zjištěno, že se zvyšující se inkubační dobou postupně rostou hodnoty uptake komplexů kulturou kmene *K. pneumoniae* NCTC 13465. Nicméně vzhledem k poločasu rozpadu ^{68}Ga byla zvolena jako vhodná inkubační doba 45 minut. Zároveň bylo prokázáno, že k bakteriálnímu vychytávání sideroforů dochází aktivním procesem vyžadujícím živé nenasycené bakterie, protože byly pozorovány blokace uptake kulturou předinkubovanou s železem a teplem inaktivovanou kulturou. Podobné výsledky byly pozorovány i u jiných radioaktivně značených sideroforů, například pro komplex [^{68}Ga]Ga-ORNB. *In vitro* uptake [^{68}Ga]Ga-ORNB kulturou *B. multivorans* se s časem zvyšoval, přičemž byl také blokován kulturou předinkubovanou s železem a teplem inaktivovanou kulturou (Bendova *et al.*, 2023). Na základě vlivu stáří kultury na *in vitro* uptake vzniklých komplexů byla pro porovnání *in vivo* uptake gallium-68 značených sideroforů zvolena inkubační doba infekce 5 a 24 hodin.

Při *in vivo* zobrazování pomocí PET/CT systému pro malá laboratorní zvířata bylo zjištěno, že [^{68}Ga]Ga-FR a [^{68}Ga]Ga-COP vykazují optimální farmakokinetické vlastnosti ve zdravých myších. Oba tyto komplexy jsou vylučovány močí a nedochází k jejich akumulaci v hlavních orgánech. Tyto optimální farmakokinetické vlastnosti vykazují například i [^{68}Ga]Ga-DFO-B a [^{68}Ga]Ga-ORNB (Petrik *et al.*, 2021; Bendova *et al.*, 2023). Naopak [^{68}Ga]Ga-ENTB se akumuloval ve žlučníku a ve střevech, a [^{68}Ga]Ga-SAL S4 se hromadil v játrech a ledvinách. Infekci vyvolanou kmenem *K. pneumoniae* NCTC 13465 aplikovanou 5 hodin před snímáním bylo možné detekovat na základě intenzivního radioaktivního signálu [^{68}Ga]Ga-FR po 45 minutách od jeho aplikace. Signál z [^{68}Ga]Ga-ENTB a [^{68}Ga]Ga-SAL S4 byl detekován pouze minimální, z [^{68}Ga]Ga-COP nulový. Tímto bylo potvrzeno, že získané *in vitro* výsledky odpovídají výsledkům *in vivo*.

Na základě vhodných biochemických vlastností, vysokých hodnot *in vitro* uptake kulturami *K. pneumoniae*, optimálních farmakokinetických vlastností a intenzivního radioaktivního signálu v místě infekce, byl pro další experimenty zvolen FR. Při dynamickém zobrazování byla sledována biodistribuce [⁶⁸Ga]Ga-FR v infikované myši, přičemž bylo možné pozorovat, že radioaktivní signál v místě infekce postupně sílí po celou dobu skenování, a že byl komplex z ledvin rychle vyloučen. Při testování *in vivo* specifity [⁶⁸Ga]Ga-FR bylo zjištěno, že je tento komplex vychytáván pouze živou bakteriální kulturou. V místě aplikace sterilního zánětu a teplem inaktivované kultury nebyl detekován radioaktivní signál žádný, nebo pouze minimální. Tuto specifitu vykazují i [⁶⁸Ga]Ga-DFO-B a [⁶⁸Ga]Ga-ORNB (Petrik *et al.*, 2021; Bendova *et al.*, 2023).

Podářilo se tedy ukázat, že by radioaktivně značené siderofory mohly být využity k detekci infekce vyvolané *K. pneumoniae*. Na základě porovnání výsledků vykazoval neoptimálnější vlastnosti pro vhodný zobrazovací prostředek siderofor FR. Nicméně k potvrzení případného využití pro diagnostické účely je třeba provést další experimenty, včetně zobrazování v plicním modelu infekce.

7 ZÁVĚR

V rámci experimentální části této bakalářské práce byly testovány *in vitro* vlastnosti galliem-68 značených sideroforů salmochelinu S4 a ferrirubinu. Následně byl zkoumán *in vitro* uptake galliem-68 značených sideroforů enterobaktinu, salmochelinu S4, ferrirubinu a koprogenu v mikrobiálních kulturách *Klebsiella pneumoniae*. Nakonec byla pomocí zobrazovacích metod nukleární medicíny sledována biodistribuce vzniklých komplexů v laboratorních zvířatech.

Všechny zmíněné siderofory byly značeny galliem-68 s vysokou radiochemickou čistotou. Takto značený ferrirubin vykazoval vysokou stabilitu v lidském séru a také v prostředí konkurenčních železitých iontů, ve kterém byla naopak stabilita značeného salmochelinu S4 téměř nulová. Oba vzniklé komplexy se vyznačovaly vhodnou hydrofilní povahou a poměrně nízkou vazbou na plazmatické proteiny.

Hodnoty uptake všech radioaktivně značených sideroforů se lišily mezi jednotlivými bakteriálními kmeny, nejvyšší však byly pro kulturu kmene *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13465. Zároveň bylo prokázáno, že k bakteriálnímu vychytávání sideroforů dochází aktivním procesem vyžadujícím živé nenasyčené bakterie.

Získané *in vivo* výsledky biodistribuce ve zdravých laboratorních zvířatech prokázaly optimální farmakokinetické vlastnosti radioaktivně značeného ferrirubinu a koprogenu. Naopak k akumulaci komplexů v hlavních orgánech docházelo po aplikaci galliem-68 značeného enterobaktinu a salmochelinu S4. V infikovaných myších byl pozorován intenzivní radioaktivní signál značeného ferrirubinu. Signál ze značeného enterobaktinu a salmochelinu S4 byl detekován pouze minimální, z koprogenu nulový.

Dynamické zobrazování biodistribuce radioaktivně značeného ferrirubinu v infikované myši ukázalo, že signál v místě infekce postupně sílil s časem. Také bylo prokázáno, že je tento komplex specificky vychytáván pouze živou bakteriální kulturou.

Ze získaných dat vyplývá slibný potenciál galliem-68 značeného ferrirubinu, který by se mohl stát vhodným zobrazovacím prostředkem pro PET/CT detekci infekce vyvolané bakterií *Klebsiella pneumoniae*.

8 LITERATURA

- Aguiar M., Orasch T., Misslinger M., Dietl A. M., Gsaller F., Haas H. (2021). The siderophore transporters Sit1 and Sit2 are essential for utilization of ferrichrome-, ferrioxamine- and coprogen-type siderophores in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 7(9), 768.
- Ahmed E., Holmström S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208.
- Allemailem K. S. (2021). A comprehensive computer aided vaccine design approach to propose a multi-epitopes subunit vaccine against genus *Klebsiella* using pan-genomics, reverse vaccinology, and biophysical techniques. *Vaccines*, 9(10), 1087.
- Alqahtani F. F. (2023). SPECT/CT and PET/CT, related radiopharmaceuticals, and areas of application and comparison. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 31(2), 312–328.
- Asri N. A. M., Ahmad S., Mohamud R., Hanafi N. M., Zaidi N. F. M., Irekeola A. A., Shueb R. H., Yee L. C., Noor N. M., Mustafa F. H., Yean C. Y., Yusof N. Y. (2021). Global prevalence of nosocomial multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: A systematic review and meta-analysis. *Antibiotics*, 10(12), 1508.
- Bayly S. R., King R. C., Honess D. J., Barnard P. J., Betts H. M., Holland J. P., Hueting R., Bonnitcha P. D., Dilworth J. R., Aigbirhio F. I., Christlieb M. (2008). *In vitro* and *in vivo* evaluations of a hydrophilic ⁶⁴Cu-bis(thiosemicarbazonato)-glucose conjugate for hypoxia imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(11), 1862–1868.
- Bendova K., Raclavsky V., Novotny R., Luptakova D., Popper M., Novy Z., Hajduch M., Petrik M. (2023). [⁶⁸Ga]Ga-Ornibactin for *Burkholderia cepacia* complex Infection Imaging Using Positron Emission Tomography. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(11), 7584–7593.
- Bengoechea J. A., Sa Pessoa J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(2), 123–144.
- Brandt M., Cardinale J., Aulsebrook M. L., Gasser G., Mindt T. L. (2018). An overview of PET radiochemistry, part 2: Radiometals. *Journal of Nuclear Medicine*, 59(10), 1500–1506.

- Budošová V. (2022). Predklinické testovanie vybraných rádioaktívne značených sideroforov. Bakalárska práca. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- Cotton F. A., Wilkinson G., Murillo C. a., Bochmann M. (1999). *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th Edition. Wiley-Interscience, New York.
- Crosa J. H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, 53(4), 517–530.
- Currie G. M., Wheat J. M., Davidson R., Kiat H. (2011). Radionuclide production. *Journal of Medical Radiation Sciences*, 58(3), 46–52.
- Degano I. (2019). Liquid chromatography: Current applications in Heritage Science and recent developments. *Physical Sciences Reviews*, 4(5), 205–226.
- Doğan E., Sydow K., Heiden S. E., Eger E., Wassilew G., Proctor R. A., Bohnert J. A., Idelevich E. A., Schaufler K., Becker K. (2024). *Klebsiella pneumoniae* exhibiting a phenotypic hyper-splitting phenomenon including the formation of small colony variants. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1372704.
- Dong D., Liu W., Li H., Wang Y., Li X., Zou D., Yang Z., Huang S., Zhou D., Huang L., Yuan J. (2015). Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China. *Frontiers in Microbiology*, 6, 519.
- Dong N., Yang X., Chan E. W. C., Zhang R., Chen S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine*, 79, 103998.
- El-Ghar M. A., Farg H. M., Sharaf D. E., El-Diasty T. (2021). CT and MRI in urinary tract infections: A spectrum of different imaging findings. *Medicina (Lithuania)*, 57(1), 32.
- Fan D., Fang Q. (2021). Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 597, 120306.
- Fidelis K., Hossain M. B., Jalal M. A., van der Helm D. (1990). Structure and molecular mechanics of ferrirhodin. *Acta crystallographica. Section C, Crystal structure communications*, 46 (Pt 9), 1612–1617.

- Goldman L. W. (2007). Principles of CT and CT technology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 35(3), 115–130.
- Haas H. (2014). Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Natural Product Reports*, 31(10), 1266–1276.
- Haselbeck A. H., Im J., Prifti K., Marks F., Holm M., Zellweger R. M. (2022). Serology as a Tool to Assess Infectious Disease Landscapes and Guide Public Health Policy. *Pathogens*, 11(7), 732.
- Heymann P., Ernst J. F., Winkelmann G. (2000). Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 186(2), 221–227.
- Hider R. C., Kong X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637–657.
- Hofmann M., Retamal-Morales G., Tischler D. (2020). Metal binding ability of microbial natural metal chelators and potential applications. *Natural Product Reports*, 37(9), 1262–1283.
- Holden V. I., Bachman M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*, 7(6), 986–995.
- Holden V. I., Wright M. S., Houle S., Collingwood A., Dozois C. M., Adams M. D., Bachman M. A. (2018). Iron Acquisition and Siderophore Release by Carbapenem-Resistant Sequence Type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*, 3(2), e00125-18.
- Huang Y., Li J., Wang Q., Tang K., Li C. (2022). Rapid detection of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China based on MALDI-TOF MS. *Journal of Microbiological Methods*, 192, 106385.
- Chang D., Sharma L., Dela Cruz C. S., Zhang D. (2021). Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750662.

- Chang Z., Zheng J., Ma Y., Liu Z. (2015). Analysis of clinical and CT characteristics of patients with *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses: An insight into risk factors of metastatic infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 33, 50–54.
- Chen W. T., Tsai L. C., Tsai F. C., Shu C. M. (2012). Recovery of Gallium and Arsenic from Gallium Arsenide Waste in the Electronics Industry. *Clean - Soil, Air, Water*, 40(5), 531–537.
- Chitambar C. R. (2010). Medical applications and toxicities of gallium compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(5), 2337–2361.
- Chitambar C. R. (2016). Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(8), 2044–2053.
- Jain S. K. (2017). The Promise of Molecular Imaging in the Study and Treatment of Infectious Diseases. *Molecular Imaging and Biology*, 19(3), 341–347.
- Johnstone T. C., Nolan E. M. (2015). Beyond iron: Non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Transactions*, 44(14), 6320–6339.
- Keller-Schierlein W. (1963). Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 45. Mitteilung. Über die Konstitution von Ferrirubin, Ferrirhodin und Ferrichrom A. *Helvetica Chimica Acta*, 46(6), 1920–1929.
- Kelson A. B., Carnevali M., Truong-Le V. (2013). Gallium-based anti-infectives: Targeting microbial iron-uptake mechanisms. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(5), 707–716.
- Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A. (2021). Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiological Research*, 250, 126790.
- Kiessling, F., Pichler B. J. (2011). Small animal imaging: Basics and practical guide. In *Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide*.
- Koranda P. (2014). Nukleární medicína. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Kramer J., Özkaya Ö., Kümmerli R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152–163.

- Lázníček M., Komárek P. (1998). *Základy radiofarmacie*. Karolinum.
- Li F., Liu F., Huang K., Yang S. (2022). Advancement of Gallium and Gallium-Based Compounds as Antimicrobial Agents. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 827960.
- Lipinski C. A., Lombardo, F. Dominy, B. W. Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26.
- Lundervold A. S., Lundervold A. (2019). An overview of deep learning in medical imaging focusing on MRI. *Zeitschrift für Medizinische Physik*, 29(2), 102–127.
- Martin R. M., Bachman M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JAN), 4.
- Miethke M., Kraushaar T., Marahiel M. A. (2013). Uptake of xenosiderophores in *Bacillus subtilis* occurs with high affinity and enhances the folding stabilities of substrate binding proteins. *FEBS Letters*, 587(2), 206–213.
- Miethke M., Marahiel M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413–451.
- Moein M. M., Halldin C. (2020). Sample preparation techniques for protein binding measurement in radiopharmaceutical approaches: A short review. *Talanta*, 219, 121220.
- Mokoala K. M. G., Ndlovu H., Lawal I., Sathekge M. M. (2023). PET/CT and SPECT/CT for Infection in Joints and Bones: An Overview and Future Directions. *Seminars in Nuclear Medicine*, S0001-2998(23)00087-9. Advance online publication.
- Mulani M. S., Kamble E. E., Kumkar S. N., Tawre M. S., Pardesi K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 539.
- Müller S. I., Valdebenito M., Hantke K. (2009). Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *BioMetals*, 22(4), 691–695.

- Nairz M., Weiss G. (2020). Iron in infection and immunity. *Molecular Aspects of Medicine*, 75, 100864.
- Nelson B. J. B., Andersson J. D., Wuest F., Spreckelmeyer S. (2022). Good practices for ⁶⁸Ga radiopharmaceutical production. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 7(1), 27.
- Okada F., Ando Y., Honda K., Nakayama T., Kiyonaga M., Ono A., Tanoue S., Maeda T., Mori H. (2009). Clinical and pulmonary thin-section CT findings in acute *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *European Radiology*, 19(4), 809–815.
- Ordonez A. A., Jain S. K. (2018). Pathogen-Specific Bacterial Imaging in Nuclear Medicine. *Seminars in Nuclear Medicine*, 48(2), 182–194.
- Ordonez A. A., Sellmyer M. A., Gowrishankar G., Ruiz-Bedoya C. A., Tucker E. W., Palestro C. J., Hammoud D. A., Jain S. K. (2019). Molecular imaging of bacterial infections: Overcoming the barriers to clinical translation. *Science Translational Medicine*, 11(508), eaax8251.
- Osman E. A., El-Amin N., Adrees E. A. E., Al-Hassan L., Mukhtar M. (2020). Comparing conventional, biochemical and genotypic methods for accurate identification of *Klebsiella pneumoniae* in Sudan. *Access Microbiology*, 2, acmi000096.
- Paczosa M. K., Mecsas J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661.
- Patro L. P. P., Rathinavelan T. (2019). Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 367.
- Payolla F. B., Massabni A. C., Orvig C. (2019). Radiopharmaceuticals for diagnosis in nuclear medicine: A short review. *Ecletica Quimica*, 44(3), 11–19.
- Peralta D. R., Adler C., Corbalán N. S., Paz García E. C., Pomares M. F., Vincent P. A. (2016). Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS one*, 11(6), e0157799.

- Petrik M., Haas H., Laverman P., Schrettl M., Franssen G. M., Blatzer M., Decristoforo C. (2014). ^{68}Ga -triacetylfusarinine C and ^{68}Ga -ferrioxamine for *Aspergillus* infection imaging: Uptake specificity in various microorganisms. *Molecular Imaging and Biology*, 16(1), 102–108.
- Petrik M., Haas H., Schrettl M., Helbok A., Blatzer M., Decristoforo C. (2012). In vitro and in vivo evaluation of selected ^{68}Ga -siderophores for infection imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(3), 361–369.
- Petrik M., Umlaufova E., Raclavsky V., Palyzova A., Havlicek V., Pfister J., Mair C., Novy Z., Popper M., Hajduch M., Decristoforo C. (2021). ^{68}Ga -labelled desferrioxamine-B for bacterial infection imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 48(2), 372–382.
- Petrik M., Zhai C., Haas H., Decristoforo C. (2017). Siderophores for molecular imaging applications. *Clinical and Translational Imaging*, 5(1), 15–27.
- Pijl J. P., Nienhuis P. H., Kwee T. C., Glaudemans A. W. J. M., Slart R. H. J. A., Gormsen L. C. (2021). Limitations and Pitfalls of FDG-PET/CT in Infection and Inflammation. *Seminars in Nuclear Medicine*, 51(6), 633–645.
- Plewes D. B., Kucharczyk W. (2012). Physics of MRI: A primer. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 35(5), 1038–1054.
- Price E. W., Orvig C. (2014). Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*, 43(1), 260–290.
- Qaim S. M. (2012). The present and future of medical radionuclide production. *Radiochimica Acta*, 100(8–9), 635–651.
- Qiu X., Liu X., Ma X., Wang R., Chen S., Li F., Li Z. (2022). One-Pot Isothermal LAMP-CRISPR-Based Assay for *Klebsiella pneumoniae* Detection. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e01545-22.
- Rabsch W., Winkelmann G. (1991). The specificity of bacterial siderophore receptors probed by bioassays. *Biology of Metals*, 4(4), 244–250.

- Raymond K. N., Dertz E. A., Kim S. S. (2003). Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3584–3588.
- Renshaw J. C., Robson G. D., Trinci A. P. J., Wiebe M. G., Livens F. R., Collison D., Taylor R. J. (2002). Fungal siderophores: Structures, functions and applications. *Mycological Research*, 106(10), 1123–1142.
- Russo T. A., Marr C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00001-19.
- Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B. K., Bhattacharjee S., Tribedi P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984–3999.
- Sajeed A. S., Vidhale N. N. (2013). Bacterial Siderophore and their Application: A review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(12), 303–312.
- Sedláček I. (2007). *Taxonomie prokaryot (ilustroval Petr ONDROVČÍK)*. Masarykova univerzita.
- Schmidt M. A., Payne G. S. (2015). Radiotherapy planning using MRI. *Physics in Medicine and Biology*, 60(22), 323–361.
- Schönfeld E., Schötzig U., Günther E., Schrader H. (1994). Standardization and decay data of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga. *Applied Radiation and Isotopes*, 45(9), 955–961.
- Signore A., Glaudemans A. W. J. M. (2011). The molecular imaging approach to image infections and inflammation by nuclear medicine techniques. *Annals of Nuclear Medicine*, 25(10), 681–700.
- Soares E. V. (2022). Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(11), 3985–4004.
- Stojowska-Swędryńska K., Łupkowska A., Kuczyńska-Wiśnik D., Laskowska E. (2022). Antibiotic heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 449.

- Sun W., Qi M., Cheng S., Li C., Dong B., Wang L. (2023). Gallium and gallium compounds: New insights into the “Trojan horse” strategy in medical applications. *Materials and Design*, 227, 111704.
- Synowiecki M. A., Perk L. R., Nijsen J. F. W. (2018). Production of novel diagnostic radionuclides in small medical cyclotrons. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 3(1), 3.
- Tai Y. F., Piccini P. (2004). Applications of positron emission tomography (PET) in neurology. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 75(5), 669–676.
- Tyll T., Novotný D., Beran O., Bartáková E., Pudil J., Králová L. I., Rára A. (2023). Multilocular infection caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 72(1), 54–58.
- Ullmann V. (2009). *Jaderná a radiační fyzika*. Ostravská univerzita v Ostravě, Fakulta zdravotnických studií.
- Velikyan I. (2014). Prospective of ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical development. *Theranostics*, 4(1), 47–80.
- Velikyan I. (2015). ⁶⁸Ga-based radiopharmaceuticals: Production and application relationship. *Molecules*, 20(7), 12913–12943.
- Voss S. D. (2023). SPECT/CT, PET/CT and PET/MRI: oncologic and infectious applications and protocol considerations. *Pediatric Radiology*, 53(7), 1443–1453.
- Wang G., Rahmim A., Gunn R. N. (2020a). PET Parametric Imaging: Past, Present, and Future. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences*, 4(6), 663–675.
- Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L., Wang H. (2020b). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278.
- Welling M. M., Hensbergen A. W., Bunschoten A., Velders A. H., Roestenberg M., van Leeuwen F. W. B. (2019). An update on radiotracer development for molecular imaging of bacterial infections. *Clinical and Translational Imaging*, 7(2), 105–124.

- Willowson K. P. (2019). Production of radionuclides for clinical nuclear medicine. *European Journal of Physics*, 40(4), 043001.
- Youker A. J., Chemerisov S. D., Tkac P., Kalensky M., Heltemes T. A., Rotsch D. A., Vandegrift G. F., Krebs J. F., Makarashvili V., Stepinski D. C. (2017). Fission-produced ⁹⁹Mo without a nuclear reactor. *Journal of Nuclear Medicine*, 58(3), 514–517.
- Zhang Q. B., Zhu P., Zhang S., Rong Y. J., Huang Z. A., Sun L. W., Cai T. (2023). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* detection methods: a minireview. *Archives of microbiology*, 205(10), 326.
- Zhu J., Wang T., Chen L., Du H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 12, 642484.
- Zhu M., Valdebenito M., Winkelmann G., Hantke K. (2005). Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology*, 151(7), 2363–2372.
- Zhu W., Cheng Y., Wang X., Yao S., Bai C., Zhao H., Jia R., Xu J., Huo L. (2020). Head-to-head comparison of ⁶⁸Ga-DOTA-JR11 and ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT in patients with metastatic, well-differentiated neuroendocrine tumors: A prospective study. *Journal of Nuclear Medicine*, 61(6), 897–903.
- Ziessman H. A., O'Malley J. P., Thrall J. H., Fahey F. H. (2013). *Nuclear Medicine: Fourth Edition*. Elsevier Inc.