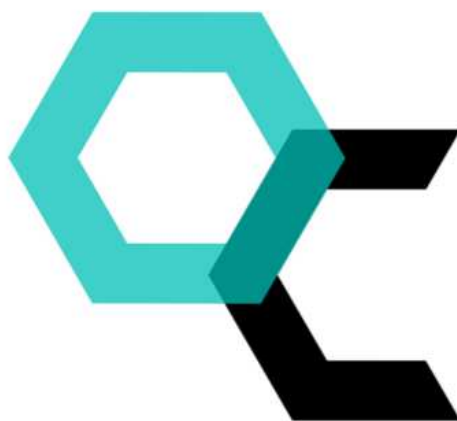


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Biologická aktivita lipofosfonoxinů – nových
antibakteriálních látek**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Klára Sigmundová

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie B1407

Vedoucí práce: Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.

Olomouc 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně. Použitou literaturu a všechny prameny uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....
Klára Sigmundová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Ing. Adéle Galandákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři a za připomínky při vypracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala celému Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci, za možnost vypracovat zde bakalářskou práci. Velké poděkování také patří Ing. Dominiku Rejmanovi Ph.D. z Ústavu organické chemie a biochemie, AV ČR za poskytnutí testovaných látek a Bc. Martě Vodičkové z Transfuzního oddělení FN OL za organizaci odběrů vzorků krve a kolektivu sestřiček z Transfuzního oddělení FN OL za realizaci odběrů. V neposlední řadě patří také velké díky mé rodině, která mě podporovala během celého studia.

Tato práce byla podpořena prostředky *RVO: 61989592 a grantem AZV ČR 17-29680A.*

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Klára Sigmundová
Název práce:	Biologická aktivita lipofosfonoxinů – nových antibakteriálních látek
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce:	Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.
Rok obhajoby:	2020

Abstrakt:

V ortopedii představuje infekce kloubních implantátů kritickou komplikací vedoucí k tvorbě bakteriálního biofilmu na povrchu implantátu. Jako prevence se používá kombinace kostního cementu s antibiotiky. Bohužel zvyšující se počet kmenů bakterií rezistentních vůči antibiotikům představuje v medicíně obecně závažný problém. Z tohoto důvodu jsou neustále hledány nové látky, které by vykazovaly antibakteriální aktivitu včetně aktivity proti multirezistentním kmenům. Potenciálně vhodnou skupinu látek představují nedávno objevené lipofosfonoxiny, které vykazují antibakteriální působení vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím včetně multirezistentních kmenů. Výhodou těchto látek je vedle jejich snadné přípravy také modularita jejich struktury, která umožňuje optimalizaci jejich biologických vlastností. V rámci bakalářské práce byla studována cytotoxicita a hemolytická aktivita lipofosfonoxinů 3. a 4. generace, které by mohly být využity jako přísady do kostních cementů k prevenci tvorby bakteriálního biofilmu.

Klíčová slova:	lipofosfonoxiny, cytotoxicita, hemolytická aktivita
Počet stran:	44
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Klára Sigmundová
Title: Biological activity of lipophosphonoxins – novel antibacterial compounds
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc
Supervisor: Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.
The year of presentation: 2020

Abstract:

In orthopaedics, the infection of joint implants represents a critical complication leading to the formation of a bacterial biofilm on the implant surface. As prevention, a combination of bone cement with antibiotics is used. However, the increasing number of antibiotics-resistant bacteria strains is a general serious problem in medicine. For this reason, new substances exhibiting antibacterial activity, including activity against multidrug-resistant strains are being developed. Recently discovered lipophosphonoxins represent a potentially suitable class of substances. They exhibit antibacterial activity against Gram-positive as well as Gram-negative bacteria, including multidrug-resistant strains. The advantage of these substances is, besides their simple synthesis, also the modularity of their structure, which enables the further optimization of their biological properties. In this bachelor thesis, 3rd and 4th generation of lipophosphonoxins were studied for their cytotoxicity and haemolytic activity, as these compounds represent a suitable additives to bone cements to prevent the bacterial biofilm formation.

Keywords: lipophosphonoxins, cytotoxicity, hemolytic activity
Number of pages: 44
Number of appendixes: 0
Language: Czech

Seznam zkratek

ATB	antibiotikum
PMMA	polymethylmetakrylát
MMA	methylmetakrylát
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
LPS	lipopolysacharidy
LPPO	lipofosfonoxiny
TPSCI	triisopropylbenzensulfonylchlorid
DMSO	dimethylsulfoxid
FBS	fetální bovinní sérum
DMEM	dulbecco's Modified Eagles médium
NCS	fetální telecí sérum

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část	10
2.1	Antibiotika.....	10
2.1.1	Mechanismy účinků antibiotik.....	10
2.1.1.1	Inhibice syntézy buněčné stěny.....	10
2.1.1.2	Poškození cytoplazmatické membrány	11
2.1.1.3	Inhibice proteosyntézy	11
2.1.1.4	Inhibice funkce nukleových kyselin.....	11
2.1.1.5	Inhibice syntézy kyseliny listové	11
2.2	Rezistence.....	12
2.2.1	Přirozená rezistence	12
2.2.2	Získaná rezistence	12
2.3	Antibiotika v kostním cementu	13
2.3.1	Gentamycin, tobramycin.....	14
2.3.2	Vankomycin	15
2.3.3	Erythromycin.....	15
2.3.4	Kolistin.....	15
2.3.5	Klindamycin.....	16
2.4	Lipofosfonoxiny	17
2.4.1	Obecná struktura LPPO.....	17
2.4.2	Příklad syntézy LPPO 1. generace	18
2.4.3	Příklad syntézy LPPO 2. generace	19
3	Cíl práce.....	20
4	Experimentální část.....	21
4.1	Biologický materiál	21
4.2	Chemikálie.....	21
4.3	Roztoky.....	21
4.4	Testované látky.....	22

4.5	Přístroje.....	22
4.6	Spotřební materiál	22
4.7	Metody.....	23
4.7.1	Stanovení cytotoxicity.....	23
4.7.2	Stanovení hemolytické aktivity.....	26
4.7.3	Statistické vyhodnocení	28
5	Výsledky	29
5.1	Studium cytotoxicity LPPO.....	29
5.2	Studium hemolytické aktivity.....	33
6	Diskuze	38
7	Závěr	40
8	Literatura.....	41

1 Úvod

Objev antibiotik znamenal obrovský pokrok v medicíně. Jejich používání výrazně snížilo úmrtnost a závažnost průběhu infekčních onemocnění. V současné době je používání antibiotik ohroženo zvyšujícím se počtem rezistentních kmenů bakterií. To vede k snížení účinnosti antibiotické léčby, což představuje velký zdravotní, ale také ekonomický problém.

V ortopedii je závažnou komplikací vznik infekce kloubních implantátů, která vede k tvorbě bakteriálního biofilmu na povrchu implantátu. Jako prevence je používána kombinace kostního cementu s antibiotiky.¹ Rezistence bakterií vůči antibiotikům používaným v ortopedii se rovněž stále zvyšuje, a proto je potřeba vyvíjet nové antibakteriální látky.

Nedávno byly vyvinuty lipofosfonoxiny, u kterých byla prokázána účinnost proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím včetně multirezistentních kmenů. Jejich baktericidní účinek spočívá v destrukci cytoplazmatické membrány. Bylo rovněž prokázáno, že mají nízký sklon k vývoji rezistence.²

2 Teoretická část

2.1 Antibiotika

Antibiotika (ATB) jsou látky produkované bakteriemi nebo houbami. Používají se při léčbě infekčních nemocí způsobených mikroorganismy s minimální toxicitou pro eukaryotní buňky. Na bakterie působí inhibicí růstu (bakteriostaticky) nebo usmrcením (baktericidně). Synteticky připraveným antimikrobiálním látkám se dříve říkalo chemoterapeutika. Dnes se pojem antibiotikum používá pro látky vykazující antibakteriální aktivitu bez ohledu na jejich původ.^{3,4}

První antibiotikum zvané penicilin objevil v roce 1928 Alexandr Fleming, který zjistil, že růst bakterií druhu *Staphylococcus aureus* v kultivační misce byl inhibován modrou plísní z rodu *Penicillium*. V roce 1944 byl objeven streptomycin, posléze chloramfenikol, tetracykliny, makrolidy a vankomycin.⁵ Za posledních 20 let bylo objeveno pouze 5 nových antibakteriálních tříd.⁶

ATB se dělí podle mechanismu účinku (inhibice syntézy buněčné stěny, kyseliny listové, inhibice proteosyntézy, inhibice funkce nukleových kyselin, poškození funkce cytoplazmatické membrány) nebo také podle jejich chemické struktury (β -laktamová, glykopeptidy, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, sulfonamidy atd.).⁷

2.1.1 Mechanismy účinků antibiotik

2.1.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Inhibice syntézy buněčné stěny je ideálním mechanismem působení ATB, protože lidské buňky nemají buněčnou stěnu. ATB zabraňují syntéze peptidoglykanu, který je nezbytnou součástí buněčné stěny grampozitivních i gramnegativních bakterií. Pokud se bakterie nachází ve fázi růstu, dochází k její lýze. Patří zde např. β -laktamová ATB, glykopeptidy atd.^{4,7}

2.1.1.2 Poškození cytoplazmatické membrány

Cytoplazmatická membrána představuje univerzální cíl pro antibakteriální látky. Morfologie membrány grampozitivních bakterií se liší od gramnegativních. Gramnegativní bakterie obklopují dvě membrány, cytoplazmatická membrána a vnější membrána složená převážně z lipopolysacharidů (LPS). Grampozitivní bakterie nemají vnější membránu, cytoplazmatickou membránu obklopuje pouze peptidoglykan.⁸ ATB mohou poškodit cytoplazmatickou membránu více způsoby. ATB se mohou chovat jako detergenty, kdy způsobí porušení membrány a následné vyplavení buněčného obsahu, což má za následek buněčnou smrt. Další možností může být interakce s fosfolipidy v membráně, kdy dochází k poškození permeability a integrity membrány. Některé ATB mohou vytvářet póry v membráně, což má za následek změnu elektrochemického gradientu a buněčnou smrt. Patří zde polymyxiny, lipopeptidy atd.⁷

2.1.1.3 Inhibice proteosyntézy

K inhibici syntézy proteinů dochází na ribozomech bakteriální buňky. ATB se vážou buď na 30S nebo na 50S podjednotku ribozomu, což vede k inhibici translace a elongace peptidového řetězce. Mezi inhibitory proteosyntézy řadíme aminoglykosidy, streptogaminy, linkosamidy a makrolidy.⁹

2.1.1.4 Inhibice funkce nukleových kyselin

ATB, která způsobují poruchu funkce nukleových kyselin, působí baktericidně a zasahují do DNA a transkripce RNA. Fluorochinolony inhibují bakteriální enzym gyrázu, a tím zabraňují především spojování přerušovaných vláken při replikaci DNA.¹⁰ Rifampicin zabraňuje přepisu informací z DNA do mRNA inhibicí enzymu RNA polymerázy. To má za následek blokaci syntézy proteinů.⁷

2.1.1.5 Inhibice syntézy kyseliny listové

Mezi inhibitory syntézy kyseliny listové patří sulfonamidy, které jsou schopny jako falešné substráty zabraňovat její tvorbě.¹⁰

2.2 Rezistence

Bakteriální rezistence je schopnost bakterií odolávat inhibiční koncentraci ATB. Dělíme ji na přirozenou a získanou.^{11,12} Vzdávající odolnost bakterií má za následek selhání antibiotické léčby, vyšší morbiditu a mortalitu pacientů.^{13,14}

2.2.1 Přirozená rezistence

Přirozená rezistence představuje vrozenou schopnost bakteriálního druhu odolávat určitému antimikrobiálnímu léčivu. Je způsobena nepřítomností cílového místa, přirozenou produkcí enzymů inaktivujících ATB, sníženou absorpcí ATB a vytlačováním ATB z buňky.¹⁵

2.2.2 Získaná rezistence

Získaná rezistence se vyvíjí u bakterií, které byly zpočátku citlivé na ATB. Vzniká mutací genu (chromozomální rezistence) nebo přenosem genetické informace od jiných rezistentních buněk (extrachromozomální rezistence).¹¹ Při mutaci genů dochází ke spontánní změně DNA, což způsobuje změnu strukturních a funkčních vlastností bakterií, např. změnu enzymu nebo buněčné struktury, která následně mění afinitu a účinnost ATB.¹⁵ Přenos genetické informace může být vertikální (při rozmnožování) nebo horizontální (z jedné bakterie na druhou).⁷ K horizontálnímu přenosu genů může dojít transformací (příjem DNA z okolního prostředí buňky), transdukcí (přenos DNA z jedné bakterie do druhé prostřednictvím bakteriofágů) nebo konjugací (přenos DNA přímým kontaktem z buňky do buňky) pomocí extrachromozomálních úseků DNA (plasmidů).^{7,16,15}

Bakterie mají různé mechanismy vzniku získané rezistence, díky kterým jsou odolné vůči působení ATB. Mezi ně patří změna struktury cílového místa, vylučování antibiotik (efflux) z bakteriální buňky, tvorba inaktivujících enzymů a změna permeability membrány.^{7,11}

2.3 Antibiotika v kostním cementu

Muskuloskeletální infekce kloubních náhrad představuje závažnou komplikaci, která může vést až k odstranění implantátu.¹⁷ Důležitou roli vedoucí k rozvoji infekce má celkový stav pacienta (např. předchozí infekce, stav imunity atd.).¹⁸ Muskuloskeletální infekce jsou spojeny s tvorbou biofilmu na povrchu implantátu. Počáteční přilnavost mikroorganismů závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a schopnosti adherovat na povrch implantátu, biologickém prostředí a také na povrchu biomateriálu.^{19,17,20} Prvním krokem tvorby biofilmu je adheze bakterií na povrch kloubního implantátu. Po přilnutí bakterií dojde ke změně jejich chování a fenotypu. Aktivují se geny, které produkují do okolí polysacharidy,²¹ které tvoří slizkou hmotu chránící bakterie před účinkem antimikrobiálních látek a imunitního systému hostitele.^{17,22} Hlavními původci jsou streptokoky a stafylokoky.^{1,23}

Nejčastější strategií v prevenci těchto infekcí je použití kostního cementu neboli polymethylmetakrylátu (PMMA) jako lokálního nosiče ATB společně se systémovým podáváním ATB.

PMMA je jedním z prvních biomateriálů,¹⁹ který se v ortopedii používá již více než 60 let k fixaci kloubních implantátů při terapii kostních a kloubních infekcí. Kostní cement se stal velmi používaným díky své tvárnosti a pevnosti v kompresi.^{24,25} Přípravuje se smícháním práškového PMMA s monomerním metylmetakrylátem (MMA) a jejich následnou polymerizací, při které PMMA tuhne a získává svoji tvrdost.^{19,24,26,27}

Systémové podání ATB poskytuje vysoké koncentrace v séru a moči, zatímco lokální podání zajišťuje vysokou koncentraci přímo v místě infekce (tj. na povrchu implantátu a v okolních tkáních).^{28,29} Kostní cement s obsahem ATB si však musí zachovat biokompatibilitu, fixační a mechanické vlastnosti.¹⁷ Dříve se používala tekutá ATB kvůli jejich vyšší eluci, ale dnes se od tekutých ATB ustupuje, protože bylo dokázáno, že oslabují kostní cement a snižují jeho mechanickou odolnost.^{24,30,31} ATB zabudovaná do kostního cementu musí mít široké antibakteriální spektrum (včetně gram pozitivních a gram negativních kmenů), dostatečnou baktericidní aktivitu, nízkou míru vzniku rezistence, vysokou rozpustnost ve vodě, výrazné uvolňování z kostního cementu, musí být dostupné v práškové formě a také musí být chemicky a tepelně

stabilní.¹⁹ V praxi se nejčastěji používá gentamycin, vankomycin, tobramycin, ale také erythromycin, kolistin nebo klindamycin.²⁵ Eluce ATB z kostního cementu může být ovlivněna různými faktory. Patří mezi ně typ, příprava, povrchové vlastnosti a pórovitost cementu, a množství a typ ATB.³² ATB se nejprve několik hodin/dnů uvolňují z povrchu, poté difúzí z pórů a trhlin kostního cementu.^{19,1}

Po zavedení implantátu jsou koncentrace ATB mnohem vyšší než minimální inhibiční koncentrace (MIC). Po pár dnech/týdnech koncentrace ATB klesá a bakterie jsou tak dlouhodobě vystavovány nižší koncentraci než je jejich MIC, což může vést ke vzniku bakteriální rezistence.^{19,24} Rezistence vzniká také pomalým nebo neúplným průnikem ATB do biofilmu nebo špatnou volbou ATB, na která daná bakterie není citlivá.³³ Dalším faktorem může být to, že bakterie v biofilmu jsou v klidovém stavu, množí se velmi pomalu a ATB, která působí pouze na rostoucí buňky, na ně neúčinkují.³⁴ Z důvodu rostoucí rezistence jsou potřebné nové sloučeniny s antibakteriálními účinky a nízkou náchylností ke vzniku bakteriální rezistence.¹

2.3.1 Gentamycin, tobramycin

Gentamycin a tobramycin řadíme mezi aminoglykosidy. Aminoglykosidy patří mezi nejčastěji používaná širokospektrá antibiotika. Drtivá většina působí baktericidně převážně na aerobní gramnegativní bakterie. Aminoglykosidy jsou multifunkční hydrofilní cukry, které mají několik aminoskupin a hydroxyskupin. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici proteosyntézy. Vážou se na místo A na 30S podjednotce ribosomu, tedy místo rozpoznávání kodonu mRNA a antikodonu tRNA. Tyto interakce ovlivňují správné spojování kodonu s antikodonem, což může mít za následek tvorbu nefunkčních proteinů.^{4,35,36} V kostním cementu se často kombinují s vankomycinem, protože tak působí proti širšímu spektru bakterií a zvyšují míru eluce.³²

Získaná rezistence bakterií k aminoglykosidům vzniká inaktivací ATB specifickými enzymy. Mezi ně patří acetyltransferázy, fosfotransferázy a nukleotidyltransferázy. Navázání enzymů na aminoglykosidy způsobuje změnu jejich struktury, a to znemožňuje vazbu aminoglykosidů na cílové místo. Dalším méně častým způsobem vzniku rezistence je mutace 30S podjednotky ribosomu nebo její methylace.³⁵

2.3.2 Vankomycin

Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum, které působí baktericidně proti stafylokokům, streptokokům a dalším grampozitivním bakteriím. Používá se při léčbě infekcí vyvolaných stafylokoky rezistentními na methicilin (MRSA).³⁷ Váží se na dvě koncové aminokyseliny (dva alaniny) pentapeptidového řetězce enzymu, který se podílí na biosyntéze buněčné stěny (peptidoglykanu). Zabraňují tak navázání pentapeptidu do řetězce peptidoglykanu a následnému zesíťování, což má za následek narušení syntézy buněčné stěny a následnou osmotickou lýzu.^{38,39}

Rezistenci bakterií na vankomycin způsobuje změna dipeptidového zbytku z D-ala-D-ala na D-ala-D-laktát nebo na D-ala-D-serin, což má za následek nižší afinitu k ATB.^{7,40} Další možností je zabránění vstupu ATB přes buněčnou stěnu, zesílením její peptidoglykanové vrstvy.⁴

2.3.3 Erythromycin

Erythromycin je makrolidová sloučenina, která obsahuje mnohočlenný laktonový kruh, na který jsou připojeny jeden nebo více sacharidů.⁴¹ Makrolidy působí bakteriostaticky na grampozitivní bakterie, některé také na gramnegativní. Inhibují proteosyntézu vazbou na 50S podjednotku ribosomu v těsné blízkosti centra peptidyltransferázy, která představuje nedílnou součást při vzniku proteinu. Erythromycin blokuje enzym peptidyltransferázu, tím zabraňuje tvorbě peptidové vazby a prodloužení peptidového řetězce. To má za následek předčasné oddělení neúplných peptidových řetězců.⁴²

Mechanismus rezistence erythromycinu spočívá v modifikaci cílového místa, vylučování ATB (effluxu) z bakteriální buňky a inaktivaci ATB pomocí enzymů. Modifikace cílového místa je zprostředkována methylázou, která snižuje afinitu erythromycinu k cílovému místu na 50S podjednotce ribosomu.⁴³

2.3.4 Kolistin

Kolistin neboli polymyxin E patří mezi cyklické peptidy. Kationtová struktura kolistinu se váže na aniontové LPS ve vnější membráně gramnegativních bakterií. Po navázání na fosfátové zbytky lipidu A, dochází k vytěsňování vápníku a hořčíku z

vnější membrány, což vede ke změně propustnosti membrány, úniku buněčného obsahu a následné buněčné smrti.^{44,45}

Výhodnou vlastností kolistinu je pomalý vývoj rezistence, která souvisí s úpravou struktury LPS ve vnější membráně gramnegativních bakterií. Dochází ke snížení celkového záporného náboje LPS, kladné molekuly kolistinu se tak nemohou vázat na LPS.⁴⁵

2.3.5 Klindamycin

Klindamycin patří do skupiny linkosamidů, které jsou účinné proti grampozitivním bakteriím. Působí bakteriostaticky vazbou na 50S podjednotku ribosomu, kde inhibuje enzym peptidyltransferázu a zabraňuje tak elongaci peptidového řetězce. Kromě toho se má za to, že usnadňuje fagocytózu a intracelulární zabíjení bakterií i při koncentraci léčiva nižší než MIC.^{41,46}

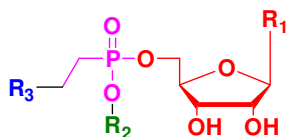
Rezistence na klindamycin se může vyvinout ribozomální mutací, kdy se do centra ribozomální RNA navážou dvě methylové skupiny.^{7,41}

2.4 Lipofosfonoxiny

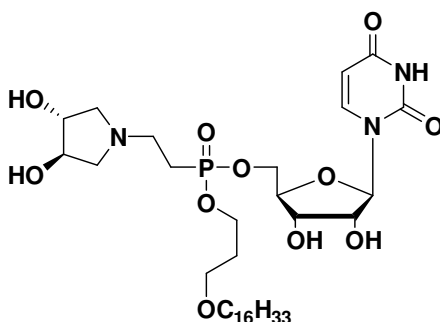
Lipofosfonoxiny (LPPO) jsou nedávno objevené sloučeniny, které vykazují antibakteriální aktivitu. LPPO 1. generace působí proti gram pozitivním bakteriím, včetně multirezistentních kmenů, mezi které patří např. enterokoky rezistentní na vankomycin nebo *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicilin.^{2,47,48} LPPO 2. generace jsou účinné proti gramnegativním patogenům, jako jsou kmeny *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella enteritidis*. Mechanismus jejich účinku spočívá v destrukci cytoplazmatické membrány, což vede k narušení buňky a následné buněčné smrti.^{1,49}

2.4.1 Obecná struktura LPPO

Obecná struktura LPPO (Obr. 1) se skládá se čtyř modulů: **nukleosidový** (ribosa + uracil, cytosin, thymin), **spojovací** (ethylfosfonová kyselina), **hydrofobní** (lipofilní alkylový řetězec – hexadecyloxypropyl, tetradecyloxyethyl atd.) a **polární modul** (deriváty pyrrolidinu a piperidinu).^{2,50}



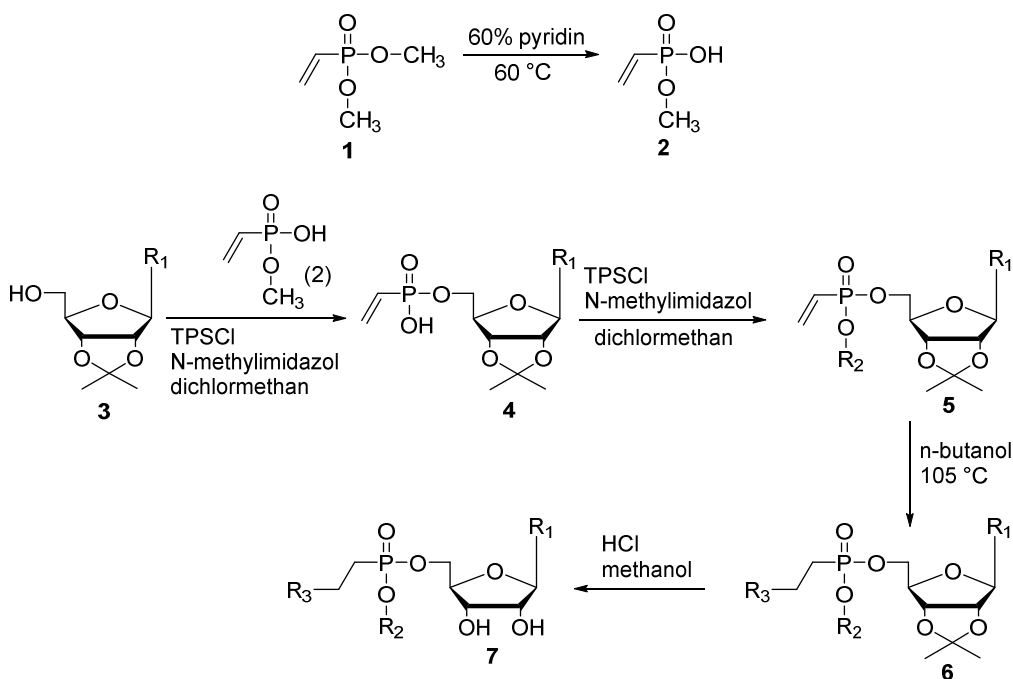
Obr. 1: Obecná struktura LPPO



Obr. 2: Konkrétní příklad LPPO 1. generace (hexadecyloxypropyluridin-5'-yl-2-([3R, 4R])-3,4-dihydroxypyrrolidin-1-N-yl)ethylfosfonát)

2.4.2 Příklad syntézy LPPO 1. generace

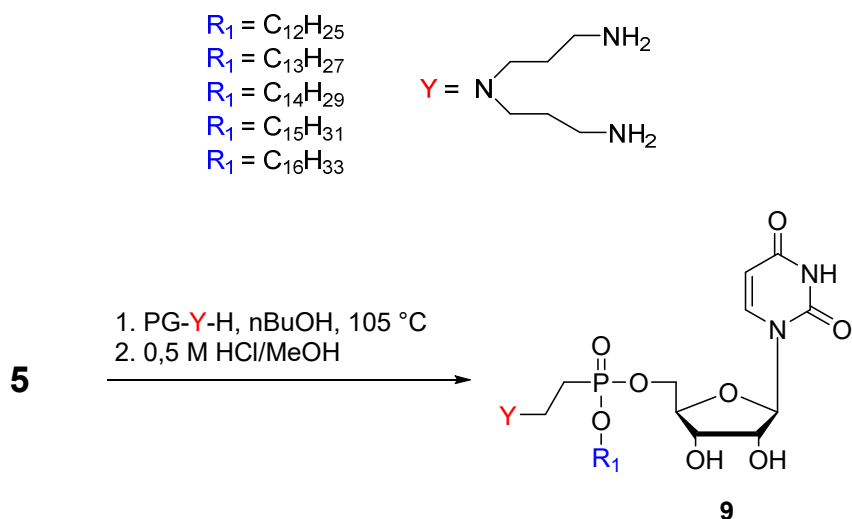
Výchozí látkou při syntéze LPPO 1. generace (Obr. 3) byl komerčně dostupný dimethylvinylfosfonát, který reagoval s 60% (v/v) vodným pyridinem za vzniku methylvinylfosfonátu (60 °C; přes noc). Ten následně reagoval s volnou 5'-hydroxylovou skupinou nukleosidu, který byl v polohách 2',3' chráněný např. skupinou 2',3'-isopropylidenu. Tato esterifikace byla provedena pomocí triisopropylbenzensulfonylchloridu (TPSCI) za katalýzy N-methylimidazolu v dichlormethanu. Získaný methylester byl izolován chromatografií na sloupci silikagelu (lineární gradient ethanolu v chloroformu). Methylová esterová skupina byla odstraněna reakcí s 60% (v/v) vodným pyridinem (60 °C; přes noc). Vzniklá vinylfosfonová kyselina byla izolována chromatografií na sloupci silikagelu (lineární gradient směsi ethylacetát : aceton : ethanol : voda; 4:1:1:1) a následně esterifikována alkoholem pomocí TPSCI za katalýzy N-methylimidazolu v dichlormethanu. Vinylfosfonát byl oddělen chromatografií na sloupci silikagelu (lineární gradient ethanolu v chloroformu). Následovala adice sekundárního aminu na vinylovou skupinu tzv. Michaelova adice, která byla provedena zahříváním v n-butanolu (105 °C; 4 až 12 hodin). Poté byly chránicí skupiny na nukleosidu odstraněny působením HCl (0,5 mol/l) v methanolu (pokojová teplota, přes noc). Konečný produkt byl izolován chromatografií na sloupci silikagelu (lineární gradient směsi ethylacetát : aceton : ethanol : voda; 4:1:1:1).⁵⁰



Obr. 3: Syntéza LPPO 1. generace

2.4.3 Příklad syntézy LPPO 2. generace

LPPO 2. generace (Obr. 4) byly připraveny stejným způsobem jako LPPO 1. generace s tím rozdílem, že Michaelova adice byla provedena s N-(3-aminopropyl)-N,N'-bis(tercbutyloxycarbonyl)propan-1,3-diaminem.⁴⁹ Produkt Michaelovy adice byl získán chromatografií na sloupci silikagelu (lineární gradient ethanolu v chloroformu (0-10%)). Poté byly chránící skupiny odstraněny působením HCl (0,5 mol/l) v methanolu (pokojová teplota, 12 hod). Reakční směs byla zakoncentrována přibližně na poloviční objem na rotační odparce a přidána do vychlazeného ethylacetátu (20 ml). Získaný produkt byl filtrován a sušen.⁵¹



Obr. 4: Syntéza LPPO 2. generace

3 Cíl práce

Stanovení toxicity a hemolytické aktivity nově syntetizovaných lipofosfonoxinů 3. a 4. generace, které by mohly být použity jako aditiva do polymethylmetakrylátových kostních cementů jako prevence proti tvorbě bakteriálního biofilmu.

4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál

Myší fibroblasty BALB/c (ECACC No. 86110401) byly zakoupeny od ECACC (The European Collection of Cell Cultures, UK). Lidská krev byla získaná od dobrovolných dárců na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Odběr se uskutečnil při standardním odběru krve dobrovolným dárcům. Odběr a zpracování vzorku bylo prováděno s povolením etické komise v souladu s českou legislativou.

4.2 Chemikálie

Dulbecco`s modified Eagle`s médium (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS), fetální telecí sérum (NCS), stabilizovaný roztok penicilinu se streptomycinem, trypsin – EDTA (0,25% roztok), trypanová modř (0,4% roztok), dimethylsulfoxid (DMSO), Triton X-100, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). NH₃, ethanol, NaCl, NaHCO₃, KCN, K₃[Fe(CN)₆] byly zakoupeny od firmy Pliva-Lachema (ČR).

4.3 Roztoky

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

10x PBS: NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), Na₂HPO₄ (0,00896 mol/l), KH₂PO₄ (0,00147 mol/l), pro experimenty byl zásobní roztok 10krát zředěn.

Roztoky pro stanovení cytotoxicity:

Zásobní roztok MTT (5 mg/ml; PBS)

Roztoky pro kultivaci *buněčné linie Balb/c*:

Kultivační médium: DMEM, penicilin (100 U/l), streptomycin (100 mg/l), FBS (5 %, v/v), NCS (5 %, v/v)

Bezserové médium: DMEM, penicilin (100 U/l), streptomycin (100 mg/l)

Roztoky pro stanovení hemolytické aktivity:

Fyziologický roztok: NaCl (150 mmol/l)

Drabkinův roztok: 1 g NaHCO₃, 50 mg KCN, 200 mg K₃[Fe(CN)₆] do 1 litru deionizované vody

4.4 Testované látky

LPPO 3. a 4. generace (V66, V68, ddp050_1, ddp068_1, ddp047_1, ddp024_1, V69), které byly poskytnuty Ústavem organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR, v. v. i.

4.5 Přístroje

Laminární box *MSC-9 Standard* (Jouan, Francie)

Centrifuga *BR4-i* (Jouan, Francie)

Spectrofotometr *Infinite 200 Pro* (Tecan, Rakousko)

Chlazená centrifuga *Mikro 22* (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Inkubátor *IG-750* (Jouan, Francie)

Mikroskop *CK2-TR* (Olympus, Japonsko)

Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)

4.6 Spotřební materiál

Kultivační láhve, kultivační desky (96-jamkové), centrifugační zkumavky (50 ml), filtry (Techno Plastic, Biotech, ČR)

Plastové zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml) (Eppendorf, Německo)

Automatické pipety a špičky (Eppendorf, Německo)

Odběrové zkumavky na krev s K₃EDTA (Dialab, ČR)

4.7 Metody

4.7.1 Stanovení cytotoxicity

Kultivace myších fibroblastů Balb/c

Myší fibroblasty Balb/c byly kultivovány v kultivační lahvi (75 cm²) v kultivačním médiu v inkubátoru při 37 °C, v atmosféře 5% CO₂ a 95% vlhkosti až do dosažení monovrstvy. Poté byly použity do experimentů.

Výsev buněk pro experimenty

Před vyšetím byla morfologie buněk v kultivační láhvi (75 cm²) zkontrolována pod mikroskopem. Poté bylo kultivační médium z láhve vylito, buňky promyty 2krát sterilním PBS a přidán 1 ml trypsinu na 2-3 minuty, aby došlo k uvolnění buněk z povrchu láhve. Následně bylo přidáno 9 ml kultivačního média a buňky byly centrifugovány (25 °C, 3 min, 300 g). Supernatant byl vylit a pelet buněk byl resuspendován v 5 ml kultivačního média. Pro snadnější počítání buněk byl objem v centrifugační zkumavce doplněn kultivačním médiem do 30 ml a pelet buněk pomocí pipety důkladně rozmíchán. Z takto připravené buněčné suspenze bylo odebráno 10 µl, smícháno s 10 µl trypanové modři, nanášeno na Bürkerovu komůrku a buňky byly spočítány pod mikroskopem. Následně byla suspenze naředěna kultivačním médiem tak, aby výsledná koncentrace byla 2×10⁵ buněk/ml. Buňky byly vysety na 96-jamkovou destičku tak, že do okrajových jamek bylo napipetováno 200 µl kultivačního média a do ostatních jamek bylo nanášeno 200 µl buněčné suspenze (Obr. 5). Destička s buňkami byla inkubována v inkubátoru při 37 °C, v atmosféře 5% CO₂ a 95% vlhkosti po dobu 24 hod.

m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
m	Buňky										m
m											m
m											m
m											m
m											m
m											m
m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

Obr. 5: Schéma vyšetří buněk na 96-jamkovou destičku.

Příprava a nanesení LPPO

Zásobní roztoky V68, ddp047_1, V69 (0,49-62,5 mg/l) a V66, ddp024_1, ddp050_1, ddp068_1 (3,9-500 mg/l) byly připraveny v DMSO tak, aby výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,5 % (v/v).

K 10 µl zásobního roztoku LPPO ve zkumavce typu eppendorf (1,5 ml) bylo přidáno 990 µl média bez séra. Z takto připraveného roztoku bylo pipetováno 100 µl na destičku a přidáno 100 µl média bez séra. LPPO byly na destičku pipetovány dle schématu na obr. 6. Kontrolní buňky byly inkubovány ve 200 µl média bez séra s příslušným objemem DMSO. Po nanesení LPPO byla destička inkubována v inkubátoru při 37 °C, v atmosféře 5% CO₂ a 95% vlhkosti po dobu 24 hod.

m+DSMO	m+DSMO	Látky								m	m+DSMO
m+DSMO	m+DSMO									m	m+DSMO
m+DSMO	m+DSMO									m	m+DSMO
m+DSMO	m+DSMO									m	m+DSMO
m+DSMO	m+DSMO									m	m+DSMO
m+DSMO	m+DSMO									m	m+DSMO
m+DSMO	m+DSMO									m	m+DSMO
m+DSMO	m+DSMO									m	m+DSMO

nejvyšší koncentrace

nejnižší koncentrace

Obr. 6: Schéma nanášení látek na 96-jamkovou destičku.

Stanovení cytotoxicity

Při studiu cytotoxicity je obvykle stanovována hodnota IC_{50} , což je koncentrace, která usmrtí 50 % testovaných buněk. Cytotoxicita byla stanovena pomocí kolorimetrického MTT testu, který je založen na redukci žluté tetrazoliové soli MTT na ve vodě nerozpustné fialové krystalky formazanu. Redukce probíhá mitochondriálními dehydrogenázami metabolicky aktivních buněk. Množství formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk.⁵²

Provedení:

Pracovní roztok MTT byl připraven smícháním 1 ml zásobního roztoku MTT a 10 ml média bez séra. Obsah 96-jamkové destičky byl odstraněn, do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l pracovního roztoku MTT a destička byla inkubována (2 hod, 37 °C, inkubátor). Poté byl pracovní roztok MTT odstraněn, fialové krystalky formazanu rozpuštěny přidávkem 200 μ l DMSO + NH_3 (1 %, v/v) a po 5 min byla změřena absorbance při 540 nm. V případě, že naměřená absorbance byla vyšší než 1, byl obsah jamek naředěn tak, že z každé jamky bylo odpipetováno 40 μ l na novou destičku, přidáno 100 μ l DMSO + NH_3 (1 %, v/v) a opět byla změřena absorbance při 540 nm.

Vyhodnocení:

Z naměřených hodnot absorbancí jednotlivých koncentrací LPPO, blanku a kontroly byly vypočítány průměry, které byly následně dosazeny do vzorce a vypočtena životnost buněk.

$$\text{Životnost buněk (\%)} = \frac{A_v - A_b}{A_k - A_b} \cdot 100$$

A_v ... absorbance vzorku (buňky inkubované s LPPO)

A_b ... absorbance blanku (DMSO+ NH_3)

A_k ... absorbance kontroly (buňky inkubované s DMSO)

4.7.2 Stanovení hemolytické aktivity

Izolace erythrocytů z periferní krve

Odebrané vzorky krve (6 ml), vždy od tří dobrovolných dárců, byly z odběrových zkumavek obsahujících K₃EDTA přelity do centrifugační zkumavky (50 ml), promíchány a centrifugovány (4 °C, 10 min, 1000 RCF). Supernatant (plazma) byl odebrán a pelet krvinek byl 3krát promýván 15 ml fyziologického roztoku a centrifugován (4 °C, 10 min, 1000 RCF). Zásobní suspenze erythrocytů byla následně použita do experimentů.

Příprava lipofosfonoxinů

Zásobní roztoky V66, ddp024_1, ddp050_1, ddp068_1, V68, ddp047_1 (3,9-500 mg/l) a V69 (0,49-62,5 mg/l) byly připraveny v DMSO tak, aby výsledná koncentrace DMSO byla 0,5 % (v/v).

Příprava 4% suspenze erythrocytů

Ze zásobní suspenze erythrocytů bylo odebráno 3,2 ml a smícháno se 76,8 ml fyziologického roztoku.

Hemolytická aktivita

Hemolytická aktivita je určována na základě uvolněného množství hemoglobinu při destrukci erythrocytů. Množství uvolněného hemoglobinu bylo stanoveno Drabkinovou metodou, která je založena na oxidaci uvolněného hemoglobinu kyanidem draselným na cyanmethemoglobin, jehož barevná intenzita je měřena spektrofotometricky.⁵³

Provedení:

K 10 µl zásobního roztoku LPPO ve zkumavce typu eppendorf (1,5 ml) bylo přidáno 990 µl fyziologického roztoku. Negativní kontrola byla připravena smícháním fyziologického roztoku s příslušným objemem DMSO. Jako pozitivní kontrola byl použit Triton X-100 (finální koncentrace 1%).

250 µl 4% suspenze erythrocytů bylo pipetováno do zkumavek typu eppendorf (1,5 ml) obsahujících 250 µl příslušného roztoku (LPPO, pozitivní a negativní kontroly). Zkumavky byly inkubovány při 37 °C, po dobu 3 hod. Každých 30 minut

byly zkumavky opatrně promíchány. Po 3 hod inkubaci byly zkumavky centrifugovány (4 °C, 5 min, 1000 RCF). Na 96-jamkovou destičku bylo do okrajových jamek pipetováno 40 µl fyziologického roztoku a do ostatních jamek 40 µl supernatantu dle schématu na obr. 7. Následně bylo do jamek přidáno 200 µl Drabkinova roztoku a po 10 min byla změřena absorbance při 540 nm.

NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
NaCl	negativní kontrola	1	2	3	4	5	6	7	8	pozitivní kontrola	NaCl
NaCl											NaCl
NaCl											NaCl
NaCl											NaCl
NaCl											NaCl
NaCl											NaCl
NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
nejnižší koncentrace						nejvyšší koncentrace					

Obr. 7: Schéma nanášení vzorků na 96-jamkovou destičku.

Vyhodnocení:

Z naměřených hodnot absorbancí jednotlivých koncentrací LPPO, blanku, negativní a pozitivní kontroly byly vypočítány průměry, které byly následně dosazeny do vzorce a vypočten index hemolýzy.

$$Index\ hemolýzy\ (\%) = \frac{A_v - A_b}{A_{PK} - A_b} \cdot 100$$

A_v ... absorbance vzorku (erythrocyty inkubované s LPPO)

A_b ... absorbance blanku (fyziologický roztok)

A_{PK} ... absorbance pozitivní kontroly (erythrocyty inkubované s 1% Tritonem X-100)

4.7.3 Statistické vyhodnocení

Experimenty zaměřené na stanovení cytotoxicity byly provedeny v šestipletech ve třech nezávislých opakováních. Experimenty zaměřené na vyhodnocení hemolytické aktivity byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD.

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu MS Excel 2000 (Microsoft, USA) pomocí *t*-testu.

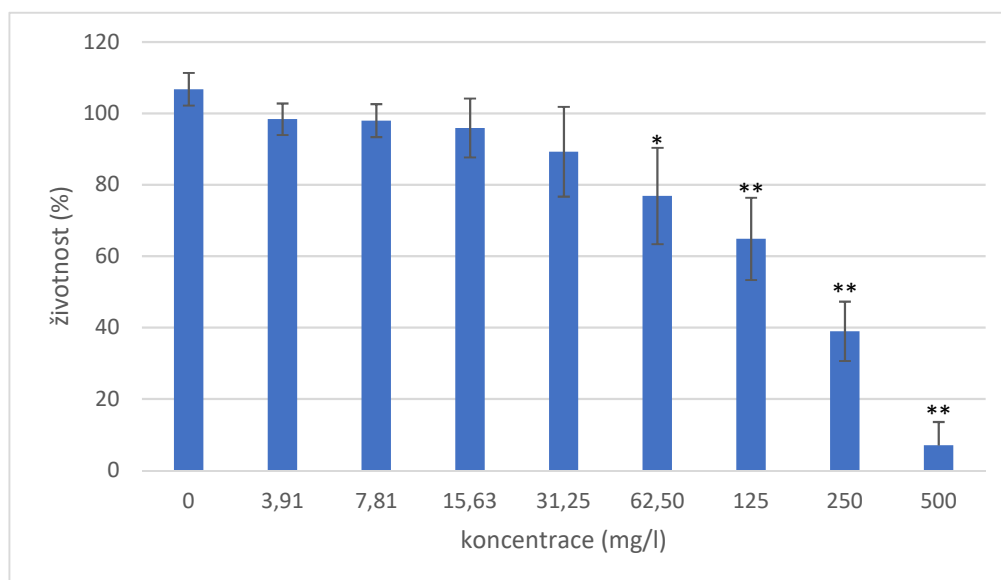
5 Výsledky

Následující kapitola shrnuje výsledky cytotoxicity a hemolytické aktivity 3. a 4. generace lipofosfonoxinů.

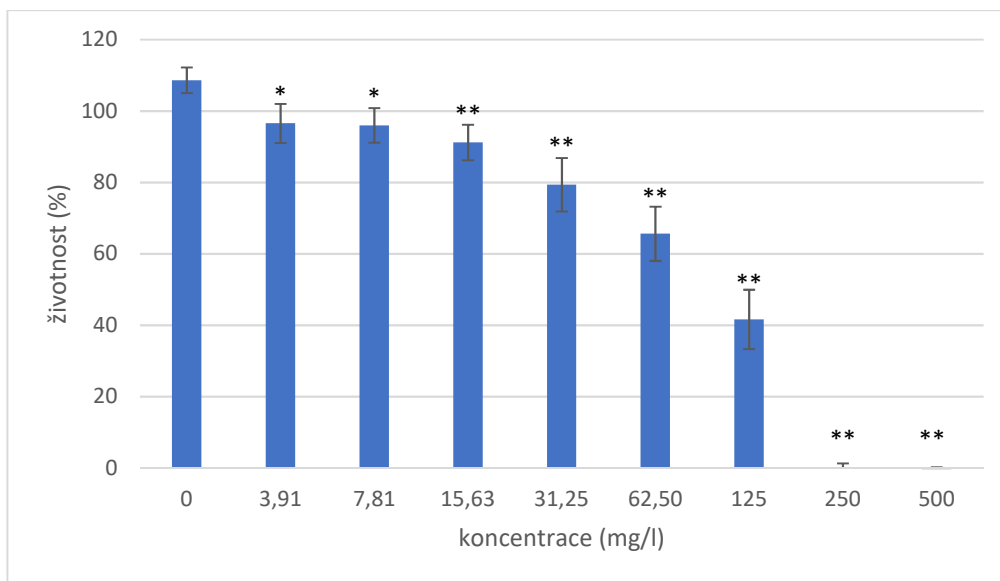
5.1 Studium cytotoxicity LPPO

Cytotoxicita LPPO V68, ddp047_1, V69 (0,49-62,5 mg/l) a V66, ddp024_1, ddp050_1, ddp068_1 (3,9-500 mg/l) byla stanovena MTT testem na buněčné linii myších fibroblastů Balb/c po 24 hod inkubaci.

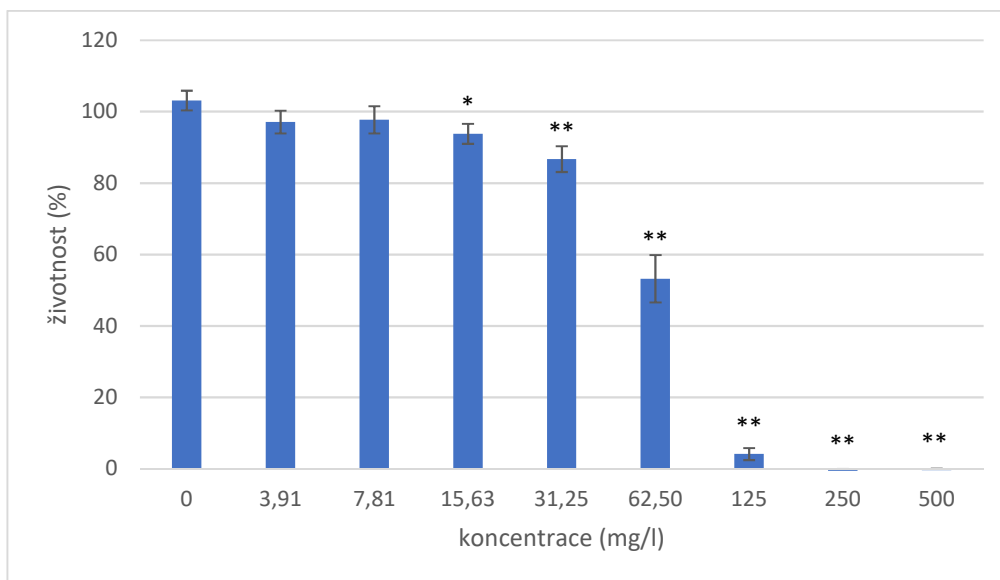
Nejnižší cytotoxicita byla pozorována u látek ddp024_1 a ddp068_1 (Graf 1 a 2), u kterých byla zaznamenána hodnota IC_{50} vyšší než 100 mg/l. Vyšší cytotoxicitu vykazovaly látky V66 a ddp050_1 (Graf 3 a 4), u kterých se hodnota IC_{50} pohybovala kolem 50 mg/l. Nejvyšší cytotoxicita byla zjištěna u látek ddp047_1 (Graf 5) s hodnotou IC_{50} kolem 20 mg/l, a V68 a V69 (Graf 6 a 7), u kterých byla zjištěna hodnota IC_{50} dokonce nižší než 10 mg/l. Přesné hodnoty $IC_{50} \pm SD$ (mg/l) jsou uvedeny v tabulce 1.



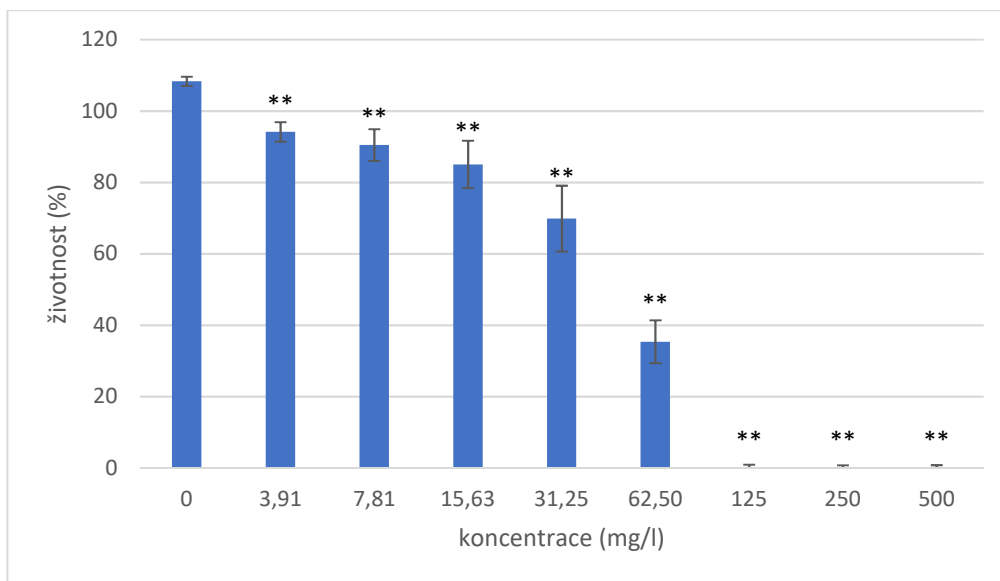
Graf 1: Vliv ddp024_1 na životnost buněčné linie myších fibroblastů Balb/c. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



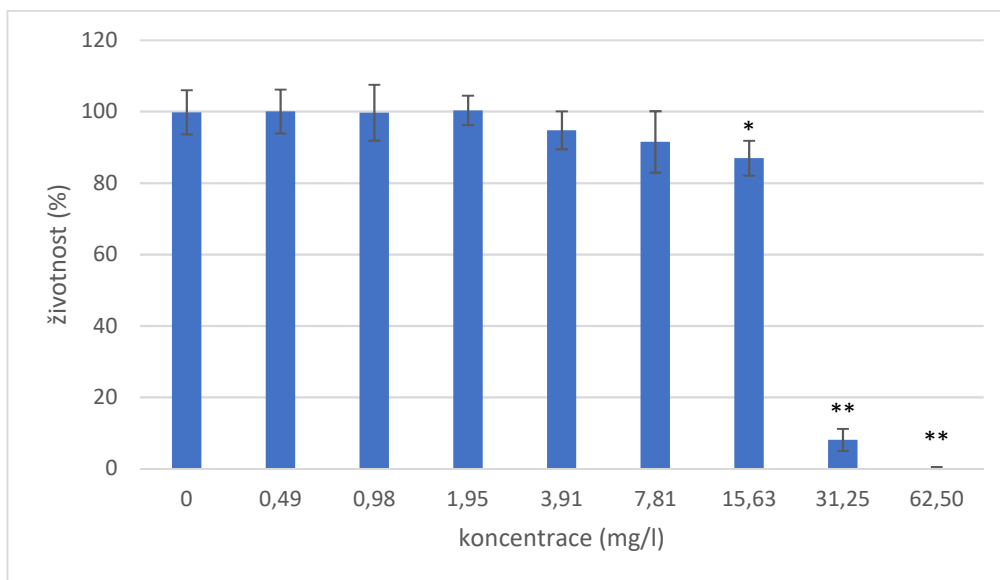
Graf 2: Vliv ddp068_1 na životnost buněčné linie myších fibroblastů Balb/c. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



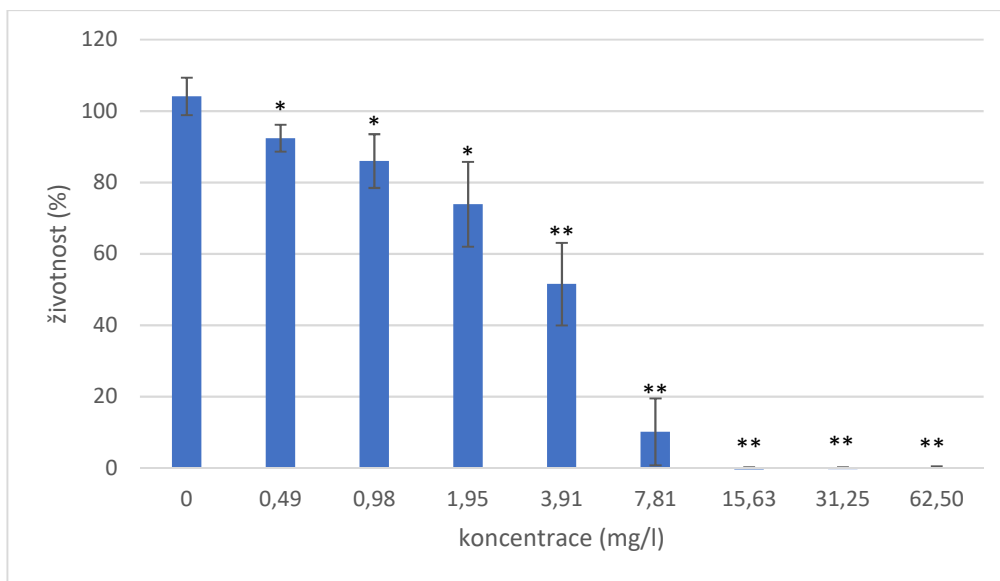
Graf 3: Vliv V66 na životnost buněčné linie myších fibroblastů Balb/c. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



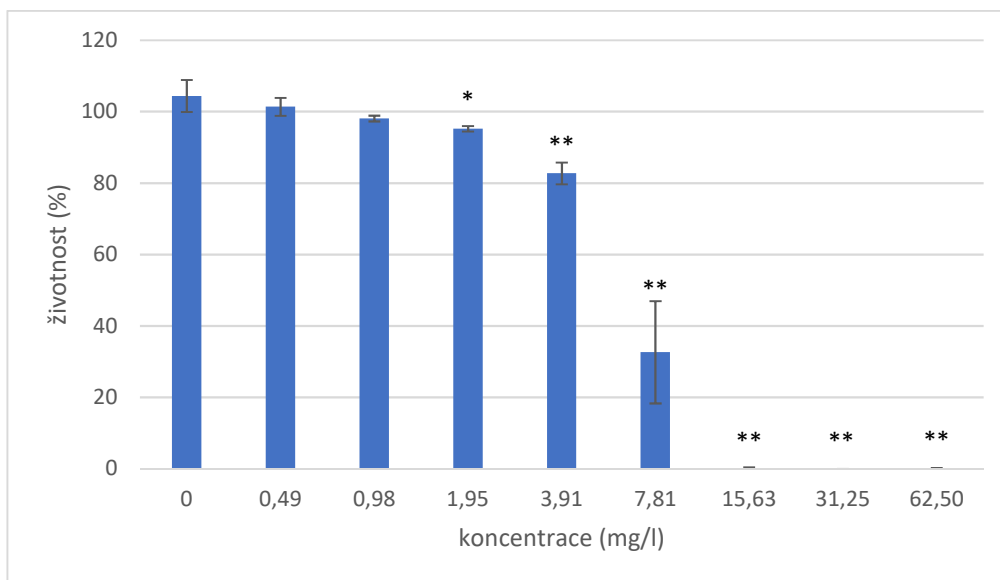
Graf 4: Vliv ddp050_1 na životnost buněčné linie myších fibroblastů Balb/c. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. ** hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,01.



Graf 5: Vliv ddp047_1 na životnost buněčné linie myších fibroblastů Balb/c. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



Graf 6: Vliv V68 na životnost buněčné linie myších fibroblastů Balb/c. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.

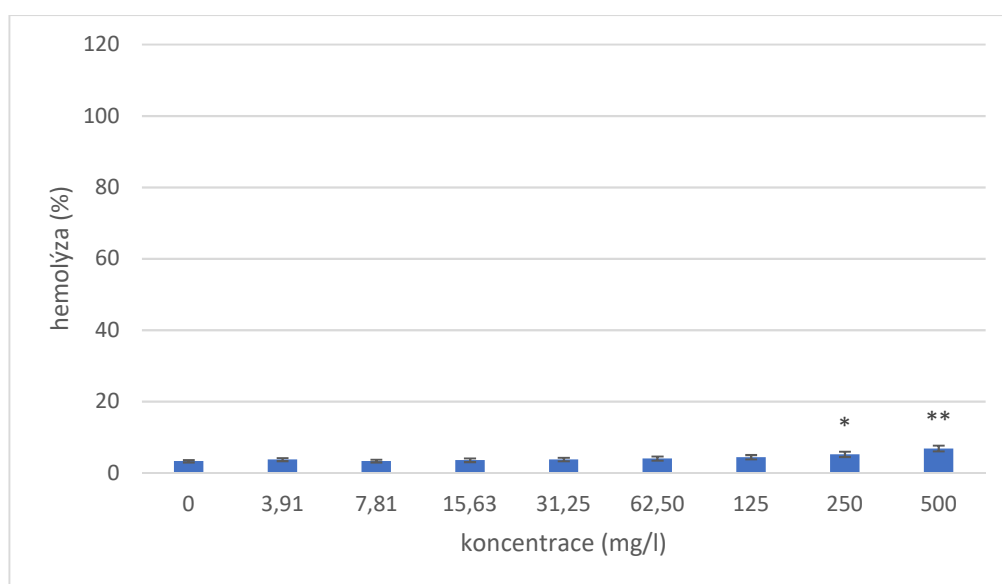


Graf 7: Vliv V69 na životnost buněčné linie myších fibroblastů Balb/c. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v hexapletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.

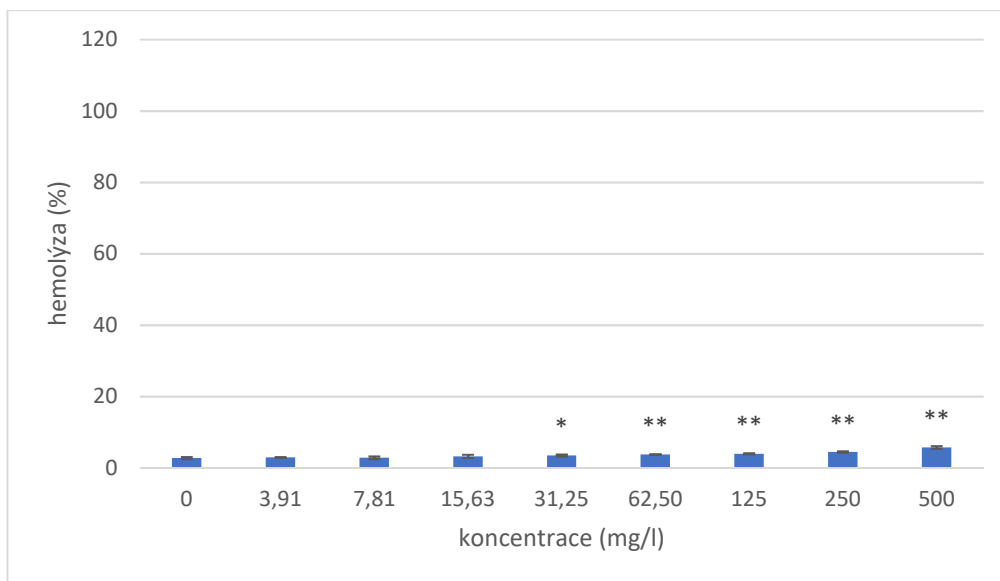
5.2 Studium hemolytické aktivity

Hemolytická aktivita LPPO ddp024_1, ddp047_1, ddp050_1, ddp068_1, V68, V66 (3,9-500 mg/l) a V69 (0,49-62,5 mg/l) byla stanovena Drabkinovou metodou na lidských erythrocytech po 24 hod inkubaci.

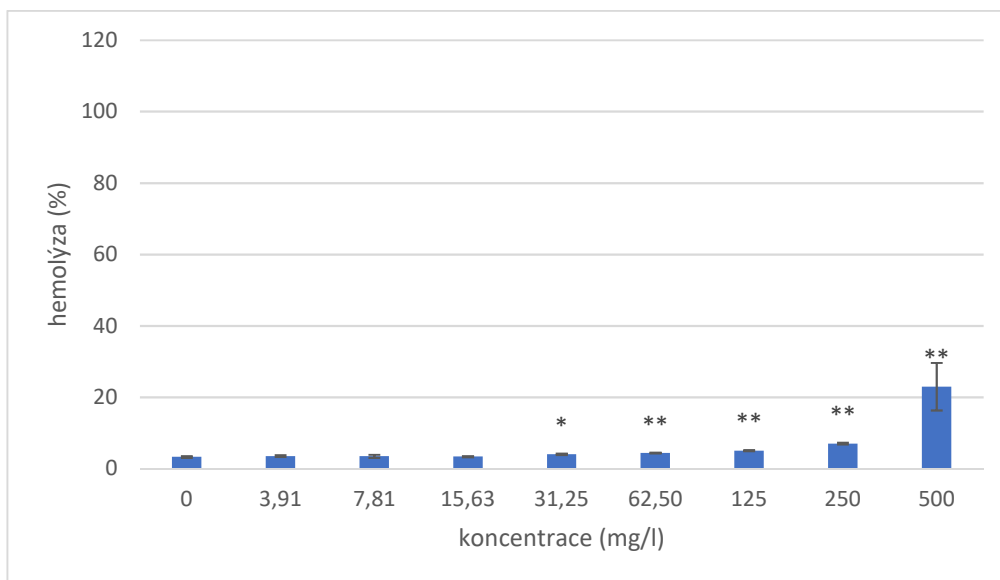
Látky ddp024_1, ddp068_1, V66 a ddp050_1 (Graf 8, 9, 10 a 11) nevykazovaly hemolytickou aktivitu až do nejvyšší testované koncentrace 500 mg/l. U látek ddp047_1 a V68 (Graf 12 a 13) byla stanovena hodnota HC_{50} nad 100 mg/l. Nejvyšší hemolytická aktivita byla pozorována u látky V69 (Graf 14), u které byla stanovena hodnota HC_{50} 18,3 mg/l. Hodnoty $HC_{50} \pm SD$ (mg/l) jsou uvedeny v tabulce 1.



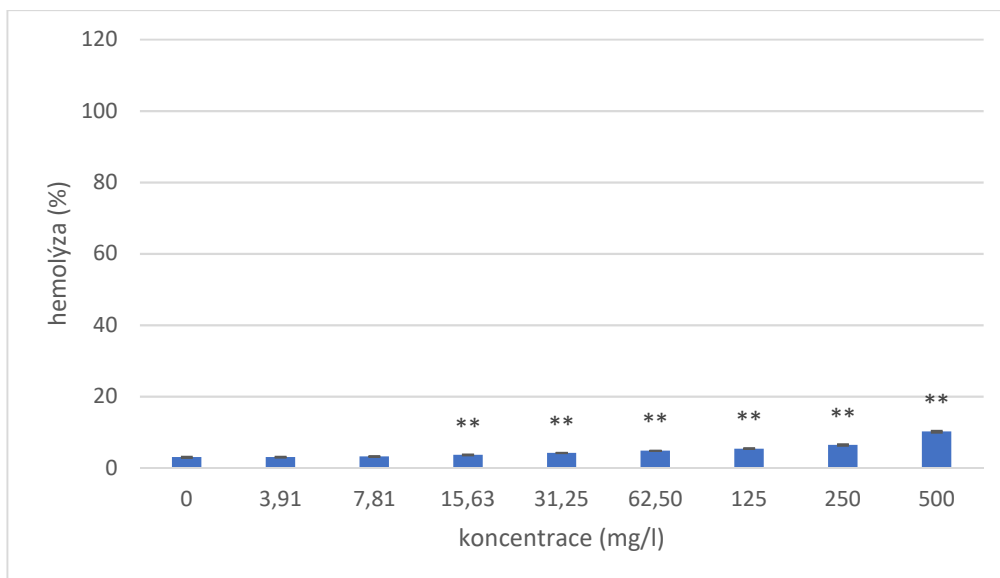
Graf 8: Vliv ddp024_1 na hemolýzu erythrocytů. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v tripletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



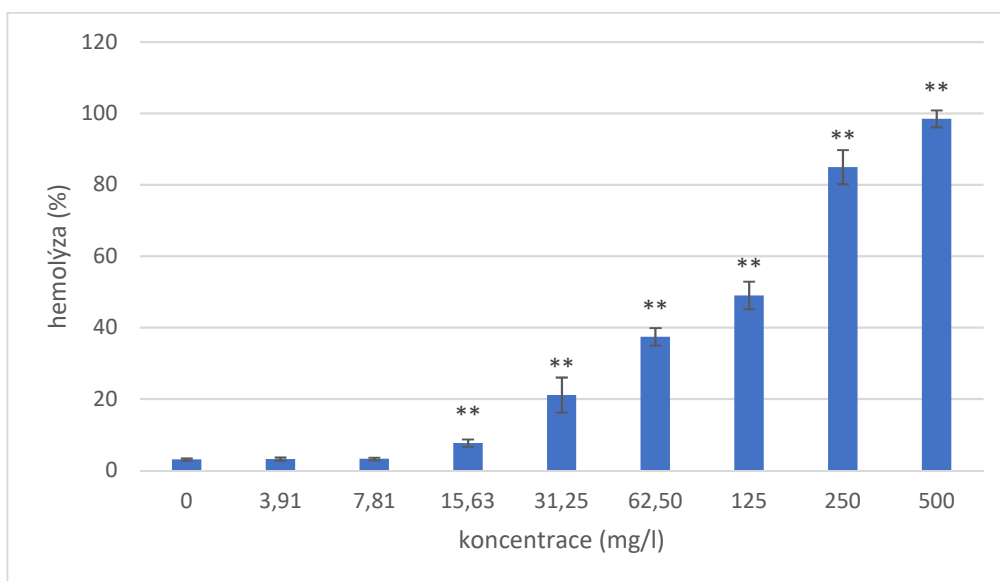
Graf 9: Vliv ddp068_1 na hemolýzu erythrocytů. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v tripletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



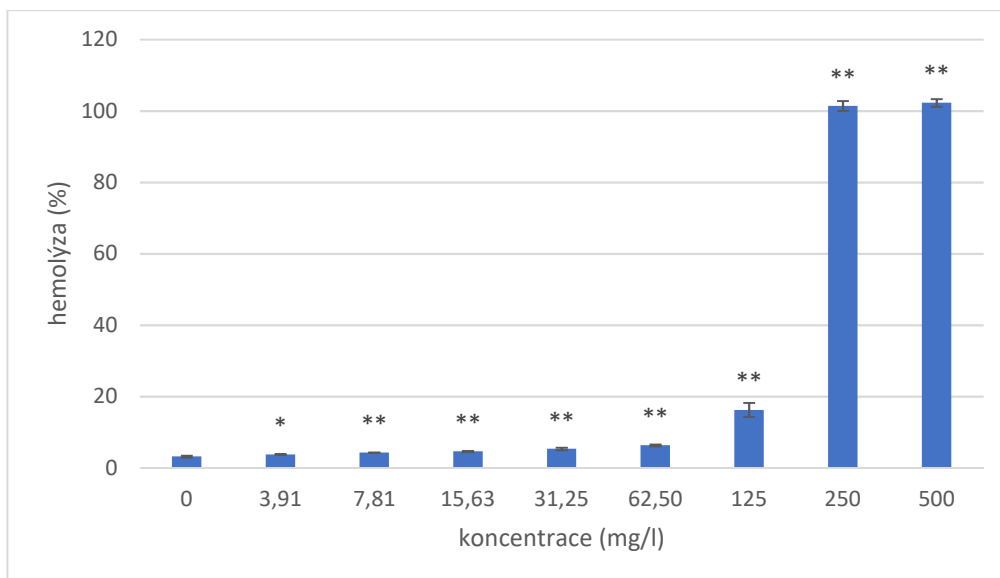
Graf 10: Vliv V66 na hemolýzu erythrocytů. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v tripletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



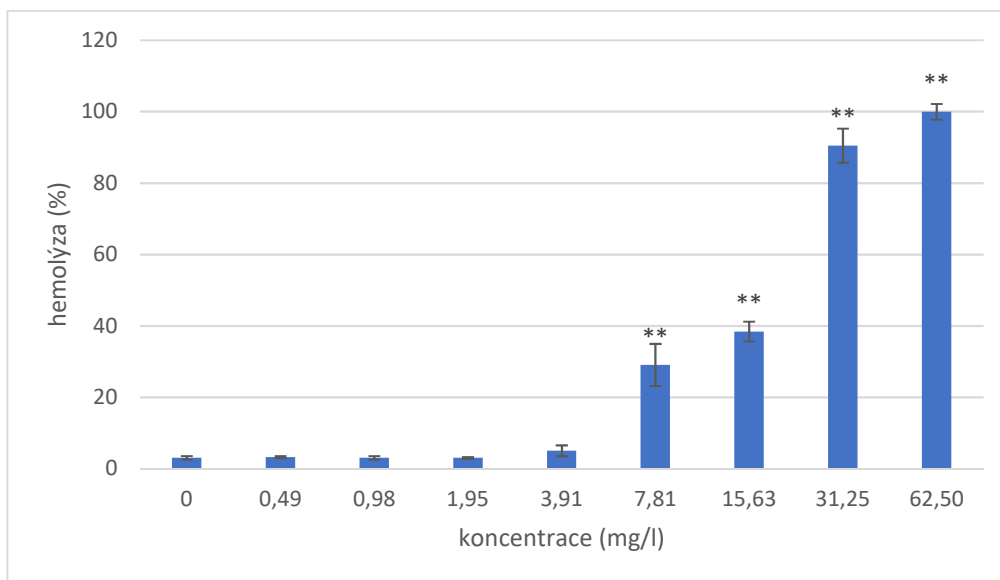
Graf 11: Vliv ddp050_1 na hemolýzu erythrocytů. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v tripletu. ** hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,01.



Graf 12: Vliv ddp047_1 na hemolýzu erythrocytů. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v tripletu. ** hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,01.



Graf 13: Vliv V68 na hemolýzu erythrocytů. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v tripletu. * hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05; ** na hladině 0,01.



Graf 14: Vliv V69 na hemolýzu erythrocytů. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření provedených v tripletu. ** hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,01.

Tab. 1 Hodnoty IC₅₀ stanovené na buněčné linii Balb/c a HC₅₀ stanovené na lidských erythrocytech po 24 hod inkubaci.

LPPO	IC₅₀ ± SD (mg/l)	HC₅₀ ± SD (mg/l)
ddp024_1	188,3 ± 47,0	> 500
ddp068_1	100,1 ± 23,6	> 500
V66	65,2 ± 6,0	> 500
ddp050_1	46,5 ± 6,3	> 500
ddp047_1	21,7 ± 0,8	126,0 ± 12,5
V68	3,9 ± 1,0	164,7 ± 2,5
V69	6,3 ± 0,8	18,3 ± 0,4

6 Diskuze

Muskuloskeletální infekce kloubních náhrad je náročnou komplikací nejen pro ortopedy, ale zejména pro samotné pacienty, protože může vést až k odstranění implantátu. I přes zavádění přísných preventivních opatření není možné infekce kloubních náhrad zcela eliminovat. V posledních letech se tomuto tématu věnuje stále více pozornosti a to jak v oblasti výzkumu, tak v klinické praxi. Pokroky a inovace v této oblasti však nejsou příliš rychlé.⁵⁴

Základem prevence a léčby závažných infekcí při ortopedických zraněních je lokální aplikace antibiotik. Cílem této strategie je zvýšit místní koncentraci antibiotik v místě poranění bez systémového působení, což významně snižuje riziko toxicity. Ve studiích na zvířatech, ale také v klinických studiích bylo prokázáno potlačení infekce po aplikaci antibiotik v kombinaci s kostním cementem do rány s prokázanou infekcí nebo s rizikem nákazy.⁵⁵ K zajištění vysokých lokálních koncentrací v místě poranění se používají různá antibiotika, která musí splňovat celou řadu požadavků jako široké antibakteriální spektrum, vhodná forma pro zabudování do kostního cementu a termostabilita.²⁷ V současné době se nejčastěji používají aminoglykosidy (tobramycin a gentamicin) v kombinaci s glykopeptidy (vankomycinem), protože splňují požadovaná kritéria. Avšak zrychlující se vznik bakteriální rezistence vůči současným antibiotikům vede k naléhavé potřebě vývoje nových účinných antimikrobiálních sloučenin. Alternativní výběr antibiotik k běžně používaným aminoglykosidům a glykopeptidům může pomoci přizpůsobit léčbu specifických patogenů a snížit riziko vzniku rezistentních kmenů.³² V tomto ohledu jsou potenciálně vhodnou skupinou látek nedávno objevené lipofosfonoxiny (LPPO), které vykazují antibakteriální aktivitu vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím včetně multirezistentních kmenů. LPPO jsou navíc snadno připravitelné a modularita jejich struktury umožňuje další úpravy a tím optimalizaci biologických vlastností.⁴⁹

Cílem bakalářské práce bylo studium cytotoxicity LPPO 3. a 4. generace na buněčné linii myších fibroblastů Balb/c a hemolytické aktivity na lidských erythrocytech. Z naměřených výsledků je zřejmé, že cytotoxicita koreluje s hemolytickou aktivitou (viz. Tabulka 1). LPPO (ddp047_1, V68 a V69), u kterých byla zjištěna vysoká cytotoxicita (IC_{50} 6,3-21,7 mg/l), vykazovaly také vyšší hemolytickou aktivitu (HC_{50} 18,3-126 mg/l). Naopak, u LPPO (ddp024_1, ddp068_1,

V66 a ddp050_1), u kterých byla stanovena nižší cytotoxicita (IC_{50} 46,5-188 mg/l), nebyla zaznamenána hemolytická aktivita do nejvyšší testované koncentrace 500 mg/l. Získané výsledky jsou unikátní, protože LPPO jsou nově připravené a uvedené biologické vlastnosti dosud nebyly studovány. Nicméně Seydlová a kol. publikovali cytotoxicitu LPPO 2. generace stanovenou na lidských fibroblastech (IC_{50} 29,1-30,7 mg/l), epiteliální buněčné linii RPE-1 (IC_{50} 34,8-43,0 mg/l) a lidské hepatomové linii HepG2 (IC_{50} 33,2-40,3 mg/l).⁴⁹ Podle těchto výsledků LPPO 2. generace vykazují vyšší cytotoxicitu než LPPO 3. a 4. generace testované v této bakalářské práci (ddp024_1, ddp068_1, V66 a ddp050_1). Rovněž hemolytická aktivita stanovená stejnými autory pro LPPO 2. generace s hodnotami HC_{50} v rozmezí 16-30 mg/l je vyšší⁴⁹ ve srovnání hemolytickou aktivitou LPPO 3. a 4. generace (ddp024_1, ddp068_1, V66 a ddp050_1), u kterých byla hodnota HC_{50} vyšší než 500 mg/l.

Ze získaných výsledků této práce vyplývá, že některé LPPO 3. a 4. generace (ddp047_1, V68 a V69) vykazují stejnou cytotoxicitu a hemolytickou aktivitu jako LPPO 2. generace, ale jsou mezi nimi sloučeniny (ddp024_1, ddp068_1, V66 a ddp050_1), které jsou méně cytotoxické a mají nižší hemolytickou aktivitu. Pokud se potvrdí i jejich antibakteriální účinek, představují tyto látky vhodné kandidáty pro použití v klinické praxi například při léčbě muskuloskeletální infekcí kloubních náhrad.

7 Závěr

Bakalářská práce se zabývala stanovením cytotoxicity a hemolytické aktivity nově syntetizovaných LPPO 3. a 4. generace.

- Byla otestována cytotoxicita na buněčné linii myších fibroblastů Balb/c pomocí MTT testu. Získané hodnoty IC_{50} u látek ddp024_1, ddp068_1, ddp050_1 a V66 jsou srovnatelné nebo vyšší v porovnání s LPPO předchozích generací.
- Byla otestována hemolytická aktivita na lidských erythrocytech izolovaných z periferní krve dobrovolných dárců za použití Drabkinovy metody. Získané hodnoty HC_{50} u látek ddp024_1, ddp068_1, ddp050_1 a V66 jsou vyšší v porovnání s LPPO předchozích generací.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že LPPO ddp024_1, ddp068_1, ddp050_1 a V66 jsou méně toxické a mají nižší hemolytickou aktivitu než LPPO předchozích generací, a v případě, že se prokáže jejich antibakteriální aktivita, jsou slibnými kandidáty pro využití v prevenci proti tvorbě bakteriálního biofilmu a k léčbě infekcí kloubních náhrad. Další studium testovaných LPPO bude pokračovat zejména s ohledem na jejich účinnost a bezpečnost při praktickém použití.

8 Literatura

- (1) Zborníková, E.; Gallo, J.; Večeřová, R.; Bogdanová, K.; Kolář, M.; Vítovská, D.; Do Pham, D. D.; Pačes, O.; Mojr, V.; Šanderová, H.; et al. Evaluation of Second-Generation Lipophosphonoxins as Antimicrobial Additives in Bone Cement. *ACS Omega* **2020**, *5* (7), 3165–3171.
- (2) Rejman, D.; Rabatinová, A.; Pombinho, A. R.; Kovačková, S.; Pohl, R.; Zborníková, E.; Kolář, M.; Bogdanová, K.; Nyč, O.; Šanderová, H.; et al. Lipophosphonoxins: New Modular Molecular Structures with Significant Antibacterial Properties. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (22), 7884–7898.
- (3) Yim, G.; Huimi Wang, H.; Davies, J. The Truth about Antibiotics. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, *296* (2–3), 163–170.
- (4) Štefan, M. *Antibiotika v Klinické Praxi*; Galén, 2019.
- (5) Saga, T.; Yamaguchi, K. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. *Japan Med. Assoc. J.* **2009**, *52* (2), 103–108.
- (6) Součková, L.; Ruzsíková, A. Nová Antibiotika v Klinické Praxi a Výzkumu. *Klin. Farmakol. a Farm.* **2016**, *30* (3), 27–32.
- (7) Beneš, J. *Antibiotika Systematika, Vlastnosti, Použití*; Grada, 2018.
- (8) Epanand, R. M.; Walker, C.; Epanand, R. F.; Magarvey, N. A. Molecular Mechanisms of Membrane Targeting Antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858* (5), 980–987.
- (9) Cocito, C.; et al. Inhibition of Protein Synthesis by Streptogramins and Related Antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, *39* (suppl_1), 7–13.
- (10) Lüllmann, H. *Barevný Atlas Farmakologie*; Grada, 2012.
- (11) Lochmann, O. *Základy Antimikrobiální Terapie*; Triton, 1994.
- (12) Jedličková, A. *Antimikrobiální Terapie*; Maxdorf, 2009.
- (13) Kolář, M.; Urbánek, K.; Hanulík, V.; Vojtová, V. Vliv Antibiotické Léčby Na Vývoj Bakteriální Rezistence. *Klin. Farmakol. Farm.* **2010**, *24* (4), 181–183.
- (14) Kolář, M.; Štrbová, P. Vývoj Rezistence Invazivních Bakterií v Souvislosti Se Spotřebou Antibiotik. *Klin. Farmakol. a Farm.* **2015**, *29* (2), 49–52.
- (15) Abebe, E.; Tegegne, B.; Tibebe, S. A Review on Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Eur. J. Appl. Sci.* **2016**, *8* (5), 301–310.

- (16) Chinedum, I. E. Microbial Resistance to Antibiotics. *African J. Biotechnol.* **2005**, 4 (13), 1606–1611.
- (17) Gallo, J.; Holinka, M.; Moucha, C. S. Antibacterial Surface Treatment for Orthopaedic Implants. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, 15 (8), 13849-13880.
- (18) Soldatović, G. Bone Infections and Antibiotics Use In. *Acta Fac. Med. Naiss.* **2004**, 21 (4), 245–252.
- (19) Van de Belt, H.; Neut, D.; Schenk, W.; Van Horn, J. R.; Van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. Infection of Orthopedic Implants and the Use of Antibiotic-Loaded Bone Cements. *Acta Orthop. Scand.* **2001**, 72 (6), 557–571.
- (20) Bertazzoni Minelli, E.; Della Bora, T.; Benini, A. Different Microbial Biofilm Formation on Polymethylmethacrylate (PMMA) Bone Cement Loaded with Gentamicin and Vancomycin. *Anaerobe* **2011**, 17 (6), 380–383.
- (21) Schindler, J. Mikrobiální Biofilm. *Vesmír* **2001**, 80, 203–206.
- (22) Musil, D. Infekce Endoprotéz – Doporučení Antibiotické Léčby. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* **2017**, 84 (3), 219–230.
- (23) Jahoda, D.; Nyč, O.; Pokorný, D.; Landor, I.; Sosna, A. Antibiotika v Prevenci Infekčních Komplikací u Operací Kloubních Náhrad. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* **2006**, 73 (2), 108–114.
- (24) Svoboda, M.; Gallo, J.; Mrňková, M. Antibiotika v Kostním Cementu. *Klin. Farmakol. a Farm.* **2017**, 31 (4), 18–24.
- (25) Večeřová, R.; Bogdanová, K.; Rejman, D.; Gallo, J.; Kolář, M. Vliv Lipofosfonoxinů Na Inhibici Bakteriální Kolonizace Kostních Cementů. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2016**, 65 (3), 171–176.
- (26) Bistolfi, A.; Massazza, G.; Verné, E.; Massè, A.; Deledda, D.; Ferraris, S.; Miola, M.; Galetto, F.; Crova, M. Antibiotic-Loaded Cement in Orthopedic Surgery: A Review. *ISRN Orthop.* **2011**, 2011, 1–8.
- (27) Wininger, D. A.; Fass, R. J. Antibiotic-Impregnated Cement and Beads for Orthopedic Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40 (12), 2675–2679.
- (28) Kühn, K. D.; Lieb, E.; Berberich, C. Pmma Bone Cement: What Is the Role of Local Antibiotics? *Maîtrise Orthopédique* **2016**, N°243, 12–18.

- (29) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Speziale, P.; Arciola, C. R. Antibiotic-Loaded Biomaterials and the Risks for the Spread of Antibiotic Resistance Following Their Prophylactic and Therapeutic Clinical Use. *Biomaterials* **2010**, *31* (25), 6363–6377.
- (30) Klekamp, J.; Dawson, J. M.; Haas, D. W.; DeBoer, D.; Christie, M. The Use of Vancomycin and Tobramycin in Acrylic Bone Cement. *J. Arthroplasty* **1999**, *14* (3), 339–346.
- (31) Chohfi, M.; Langlais, F.; Fourastier, J.; Minet, J.; Thomazeau, H.; Cormier, M. Pharmacokinetics, Uses, and Limitations of Vancomycin-Loaded Bone Cement. *Int. Orthop.* **1998**, *22* (3), 171–177.
- (32) Penner, M. J.; Masri, B. A.; Duncan, C. P. Elution Characteristics of Vancomycin and Tobramycin Combined in Acrylic Bone-Cement. *J. Arthroplasty* **1996**, *11* (8), 939–944.
- (33) Stewart, P. S.; Costerton, J. W. Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135–138.
- (34) Jahoda, D. *Infekční Komplikace Kloubních Náhrad*; Triton, 2008.
- (35) Kotra, L. P.; Haddad, J.; Mobashery, S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (12), 3249–3256.
- (36) Yoshizawa, S.; Fourmy, D.; Puglisi, J. D. Structural Origins of Gentamicin Antibiotic Action. *EMBO J.* **1998**, *17* (22), 6437–6448.
- (37) Wilhelm, M. P. Vancomycin. *Mayo Clin. Proc.* **1999**, *74* (9), 928–935.
- (38) Healy, V. L.; Lessard, I. A. D.; Roper, D. I.; Knox, J. R.; Walsh, C. T. Vancomycin Resistance in Enterococci. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (5), 109–119.
- (39) Popieniek, P. H.; Pratt, R. F. Kinetics and Mechanism of Binding of Specific Peptides to Vancomycin and Other Glycopeptide Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (6), 2264–2270.
- (40) Gardete, S.; Tomasz, A. Mechanisms of Vancomycin Resistance in Staphylococcus Aureus. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (7), 2836–2840.
- (41) Smilack, J. D.; Wilson, W. R.; Cockerill, F. R. Tetracyclines, Chloramphenicol, Erythromycin, Clindamycin, and Metronidazole. *Mayo Clin. Proc.* **1991**, *66* (12), 1270–1280.
- (42) Jelić, D.; Antolović, R. From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials. *Antibiotics* **2016**, *5* (3).

- (43) Kataja, J.; Seppälä, H.; Skurnik, M.; Sarkkinen, H.; Huovinen, P. Different Erythromycin Resistance Mechanisms in Group C and Group G Streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42* (6), 1493–1494.
- (44) Trimble, M. J.; Mlynářčik, P.; Kolář, M.; Hancock, R. E. W. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (10).
- (45) Bialvaei, A. Z.; Samadi Kafil, H. Colistin, Mechanisms and Prevalence of Resistance. *Curr. Med. Res. Opin.* **2015**, *31* (4), 707–721.
- (46) Kasten, M. J. Clindamycin, Metronidazole, and Chloramphenicol. *Mayo Clin. Proc.* **1999**, *74* (8), 825–833.
- (47) Rosenberg, I. Chemie Fosfonátových Analogů Nukleotidů a Oligonukleotidů – Stručná Reminiscence a Současnost. *Chem.listy* **2014**, *108*, 375–386.
- (48) Panova, N.; Zborníková, E.; Šimák, O.; Pohl, R.; Kolář, M.; Bogdanová, K.; Večeřová, R.; Seydlová, G.; et al. Insights into the Mechanism of Action of Bactericidal Lipophosphonoxins. *PLoS One* **2015**, *10* (12), 1–28.
- (49) Seydlová, G.; Pohl, R.; Zborníková, E.; Ehn, M.; Šimák, O.; Panova, N.; Kolář, M.; et al. Lipophosphonoxins II: Design, Synthesis, and Properties of Novel Broad Spectrum Antibacterial Agents. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (14), 6098–6118.
- (50) Rejman, D.; et al. Lipophosphonoxins, Method of Their Preparation and Use. EP2527351A1, **2012**.
- (51) Rejman, D.; et al. Lipophosphonoxins of Second Generation, and Their Use. WO2017/186200A1, **2017**.
- (52) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (53) Drabkin, D. The Standardization of Hemoglobin Measurement. *Am. J. Med. Sci.* **1949**, *217*, 710–711.
- (54) Hake, M. E.; Oh, J. K.; Kim, J. W.; et al. Difficulties and Challenges to Diagnose and Treat Post-Traumatic Long Bone Osteomyelitis. *Eur J Orthop Surg Traumatol* **2015**, *25* (1), 1–3.
- (55) Zalavras, C. G.; Patzakis, M. J.; Holtom P. Local Antibiotic Therapy in the Treatment of Open Fractures and Osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* **2004**, *427*, 86–93.