

APVV-22-0006: Hodnotenie biokompatibility lipofosfonoxínov novej generácie na liečbu infekcie rán (Biocompatibility assessment of new generation lipophosphonoxins for wound infection management)

Najmä rozsiahle a hlboké rany môžu viesť k rozvoju šoku, infekcii, sepse a smrti. Bakteriálna infekcia často predstavuje vážny život ohrozujúci zdravotný stav so zlou prognózou. V prezentovanom projekte plánujeme vyvíjať a testovať nové generácie lipofosfonoxínov (LPPO). Predovšetkým plánujeme zodpovedať otázky toxicity a biokompatibility pre eukaryotické bunky pri baktericídnych koncentráciách. Projekt je preto zameraný na nájdenie optimálneho typu a koncentrácie LPPO v sérii in vitro (bunky podieľajúce sa na hojení rán) a in vivo (potkan/prasa) experimentov.

a) testovanie antimikróbnej aktivity (MIC) nových molekúl LPPO

Na základe hodnôt MIC (Obr. 1) sme vybrali účinné koncentrácie ďalších 20 novo syntetizovaných molekúl LPPO (syntetizované na Ústave organickej chémie a biochémie AVČR v Prahe), ktoré sme podrobili sérii in vitro a in vivo experimentov pre overenie účinnosti a biokompatibility.

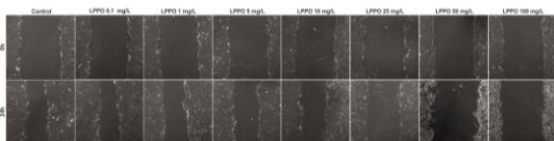
Compound (LEGO-LPPO)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25952 = CCM 3954	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 = CCM 3955	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 = CCM 4224	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 = CCM 4223	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12221	<i>Staphylococcus aureus</i> 4591	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 49619	<i>Escherichia coli</i> CEM5595	<i>Escherichia coli</i> common resistant	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R	HC ₅₀ ± SD mg/L
ddp174	0.5	2	4	0.5	1	1	8	1	1	2	>200
I76DR_34P1	2	16	2	1	2	1	32	2	2	4	196
I76DR_526P1	2	8	4	1	1	2	64	16	16	8	>200
ddp117_1	2	4	4	2	1	2	64	2	4	4	>1000
ddp176	0.2	2	2	0.5	0.5	1	4	1	1	2	172 ± 33
I76DR_362P1	0.5	4	4	1	1	1	64	4	8	4	>200
I76DR_556P1	4	16	32	1	2	1	128	8	8	16	>200
DR7072	0.5	2	1	0.5	0.5	1	8	1	nd	2	162
I76DR_63P1	1	2	2	0.5	0.5	1	8	1	1	2	262

Obr. 1 Antimikróbna aktivita testovaných LPPO molekúl.

b) Detailné štúdium molekuly I76DR_7072

Na základe hodnôt minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) testovaných molekúl LPPO na vybraných bakteriálnych kmeňoch sme pre detailné štúdium vybrali molekulu I76DR_7072.

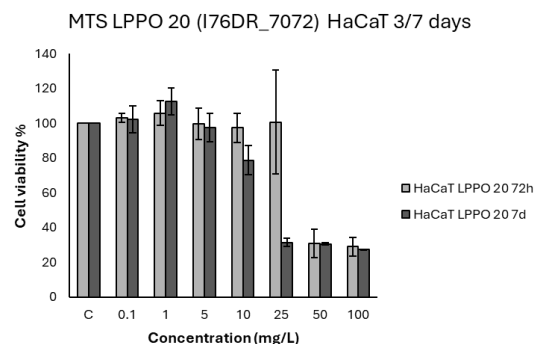
Zistili sme, že testovaná molekula v baktericídnych koncentráciách neinhibuje migráciu keratinocytov (Obr. 2).



Obr. 2 Test migrácie na keratinocytoch HaCaT pestovaných s rôznymi koncentraciami LPPO I76DR_7072.

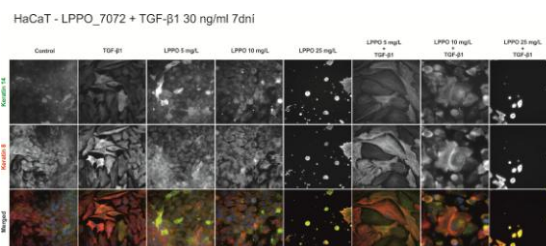
Avšak dlhodobějšía kultivácia keratinocytov HaCaT s I76DR_7072 viedla k poklesu

prežívaniu buniek aj pri nižších testovaných koncentráciách (Obr. 3).



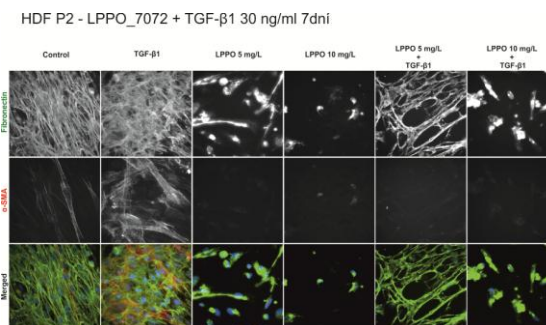
Obr. 3 Test cytotoxicity HaCaT keratinocytov pestovaných 3/7 dní s LPPO I76DR_7072.

Na druhej strane sa po pridaní LPPO zásadne nemenil fenotyp keratinocytov (Obr. 4). Podobne nemala testovaná molekula zásadný vplyv ani na efekt cytokínu TGF-β1 (pozitívna kontrola).



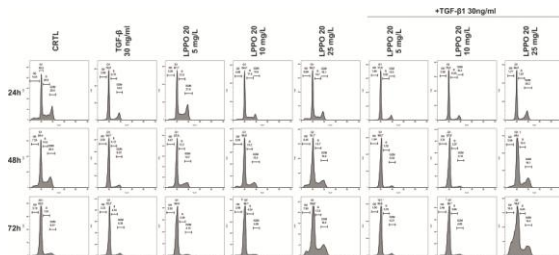
Obr. 4 Expresia keratinov 8 a 14 pestovaných s LPPO I76DR_7072. Cytokín TGF-β1 (30ng/mL) - pozitívna kontrola.

Zaujímavé bolo pozorovanie u kožných fibroblastov, že testovaná molekula znižovala produkciu medzibunkovej hmoty (fibronektín) a expresiu hladkosvalového aktínu alfa (α-SMA), a to aj v prítomnosti pozitívnej kontroly TGF-β1 (Obr. 5).



Obr. 5 Expresia fibronektínu a hladkosvalového aktínu (α-SMA) u fibroblastov pestovaných s LPPO I76DR_7072. TGF-β1 (30ng/mL) - pozitívna kontrola.

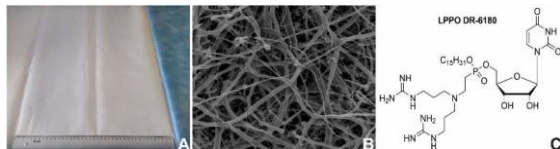
Molekulu LPPO sme taktiež podrobili analýze jej vplyvu na bunkový cyklus keratinocytov HaCaT (Obr. 6). V experimente sme nepozorovali len slabý inhibičný účinok LPPO na proliferáciu buniek.



Obr. 6 Bunkový cyklus u keratinocytov HaCaT pestovaných s LPPO I76DR_7072. TGF-β1 (30ng/mL) - pozitívna kontrola.

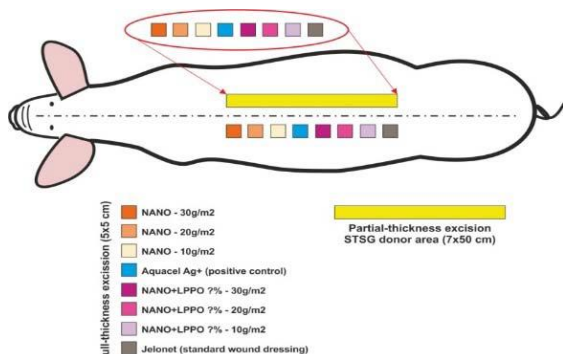
c) Predklinický experiment na prasati

Paralelne od týchto animálnych experimentov sme taktiež realizovali test biokompatibility nami vyvinutého nanovláknového krytia s LPPO I76DR_6180 (Obr. 7), ktoré bolo pôvodne testované na myšiach (Sci Rep. 2021; 11(1):17688).



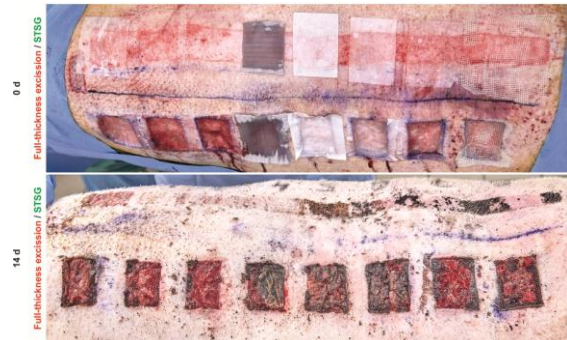
Obr. 7 Nanovláknó z polykaprolaktónu (PCL) nasýtené s LPPO I76DR_6180.

Pred samotným humánnym klinických testovaním bolo nevyhnutné otestovať krytie na animálnom modeli evolučne a fyziologicky bližšom človeku. Za týmto účelom sme zvolili ako vhodný model ošpanú (Obr. 8).



Obr. 8 Schéma rozloženia rán u prasat'a.

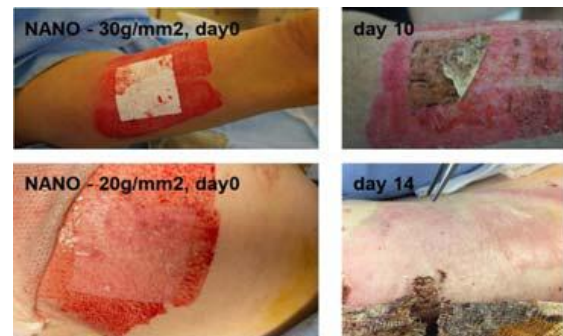
Animálne experiment realizovaný na prasati ukázal, ktorá gramáž nanovláknového krytia je vhodná pre povrchovú resp. hlbokú ranu. Rany boli hodnotené po 14 dňoch od operácie. Najhrubšie testované nanovláknó (30 g/m²) je vhodné pre hlbokú ranu, na druhej strane pre povrchovú ranu je najvhodnejšie stredne hrubé nanovláknó (20 g/m²) (Obr. 9).



Obr. 9 Aktívne krytie rán na báze nanovláknového nosiča a LPPO DR_6180 v deň operácie a po 14 dňoch.

d) Kazuistika

Vyvinutý koncept nanovláknového krytia sme si overili aj v klinickej praxi. Na dvoch rozsiahle popálených pacientoch sme testovali dve gramáže. Ukázalo sa, tieto výsledky korelujú s experimentom realizovaným na prasati. To znamená, že povrchovú ranu, ktorá vzniká po odbere dermo-epidermálneho štetu je lepšie kryť tenším nanovláknom, ktoré sa rýchlejšie rozpadá a stimuluje hojenie (Obr. 9).



Obr. 10 Test krytia rán na báze nanovláknó v deň odboru dermo-epidermálneho štetu a po 10/14 dňoch.

e) Klinický význam

Z našich *in vivo* experimentov vyplýva, že LPPO zásadne znižuje bakteriálnu nálož v ranách a vykazuje len minimálnu systémovú absorpciu. Zaujímavé je pozorovanie, že I76DR_7072 blokuje diferenciáciu fibroblastov na myofibroblasty a produkciu ECM v netoxických koncentráciách. Z tohto pohľadu môžeme predpokladať, že aktívne krytie rán založené na báze študovaných látok môže mať potenciál nie len liečiť infikované rany, ale taktiež pôsobiť antifibroticky. Ideálne by sme tak mohli vytvoriť a aplikovať do klinickej praxe antibakteriálne krytie rán, ktoré by zároveň modulovalo proces hojenia a predchádzalo rozvoju hypertrofickej jazvy.