

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Biologie



Jaroslav Loch

Specifické interakce kationických antimikrobiálních látek s biologickou membránou
Specific interactions of cationic antimicrobials with biological membranes

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:
doc. RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 28.4. 2025

Podpis:

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Abstrakt

Kationické antimikrobiální látky (KAL) představují skupinu přírodních i syntetických molekul s významnou aktivitou vůči mikroorganismům, založenou především na narušení jejich cytoplazmatické membrány. Vyskytují se např. u obratlovců, členovců a rostlin, kde se podílejí na obranných mechanismech v epitelových strukturách nebo extracelulárním prostoru [Mahlapuu et al., 2016; Harris & Percival, 1956].

Mechanismus účinku membránově aktivních KAL spočívá v elektrostatické interakci mezi kationickými oblastmi molekul a záporně nabitými fosfolipidy bakteriálních membrán [Silhavy et al., 2010; Matsuzaki, 1999]. Tato interakce vede k destabilizaci lipidové dvojvrstvy, permeabilizaci membrány, úniku intracelulárního obsahu a v konečném důsledku k buněčné smrti [Venkatesh et al., 2017]. KAL tak představují možnou alternativu ke klasickým antibiotikům, jejichž účinnost je snižována rostoucí rezistencí [Kohanski et al., 2010].

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o faktorech týkajících se struktur, které ovlivňují biologickou aktivitu a selektivitu KAL. Zaměřuje se na typ a prostorové uspořádání kationických skupin, délku a distribuci hydrofobních segmentů, amfifility, konformační vlastnosti a vliv cílové membrány. Práce rovněž porovnává přírodní peptidy (např. LL-37) a syntetické deriváty (např. LEGO-lipophosphonoxiny) z hlediska účinku, toxicity a selektivity.

Klíčová slova

Kationické antimikrobiální látky, peptid-membránová interakce, selektivita, mechanismus účinku, elektrostatická interakce.

Abstract

Cationic antimicrobial agents (CAAs) comprise a group of natural and synthetic molecules with a broad spectrum of activity against microorganisms. Their mechanism of action primarily involves the disruption of the plasmatic membrane, rather than targeting specific intracellular components. CAAs are commonly found in innate immune systems of animals, plants, and invertebrates, where they function at epithelial surfaces or in extracellular fluids [Mahlapuu et al., 2016; Harris & Percival, 1956].

The membrane-targeting activity of CAAs is based on electrostatic interactions between their cationic domains and anionic phospholipids in bacterial membranes [Silhavy et al., 2010; Matsuzaki, 1999]. This interaction leads to destabilization of the lipid bilayer, membrane permeabilization, leakage of intracellular contents, and cell death [Venkatesh et al., 2017]. This mode of action is considered a promising strategy to overcome classical resistance mechanisms [Kohanski et al., 2010].

This thesis provides a literature-based analysis of the structural factors influencing the antimicrobial activity, selectivity, and toxicity of CAAs. It focuses on the nature and spatial arrangement of cationic groups, hydrophobic segment length, amphipathicity, and molecular conformation. Representative examples such as LL-37, polymyxin B, and LEGO-lipophosphonoxins are discussed in the context of membrane interaction models and structure–function relationships.

Keywords

cationic antimicrobial agents, peptide–membrane interaction, selectivity, mechanism of action, electrostatic interacti

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za odborné vedení této bakalářské práce, za jeho trpělivost vstřícnost a podporu během celého zpracování.

Velké poděkování patří také mé rodině a blízkým přátelům za jejich trvalou podporu, povzbuzení a trpělivost v průběhu celé mojí práce i studia.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP – antimikrobiální peptid (antimicrobial peptide)

KAL – kationická antimikrobiální látka

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

PG – fosfatidylglycerol

CL – kardiolipin

PE – fosfatidylethanolamin

PC – fosfatidylcholin

SM – sfingomyelin

LPS – lipopolysacharid

LTA – lipoteichoová kyselina

SUV – small unilamellar vesicle (malý unilamelární váček)

LUV – large unilamellar vesicle (velký unilamelární váček)

GUV – giant unilamellar vesicle (obří unilamelární váček)

BLM – bilayer lipid membrane (planární lipidová dvojvrstva)

SLB – supported lipid bilayer (podporovaná lipidová dvojvrstva)

CMC – kritická micelární koncentrace

LPPO – lipophosphonoxin

LEGO-LPPO – modulárně navržený lipophosphonoxin

OBSAH

1		1
2		3
2.1	3	
2.1.1	3	
2.1.2	5	
2.1.3	9	
2.1.4	12	
2.2	12	
2.2.1	12	
2.2.2	13	
2.2.3	14	
2.2.4	16	
2.3	16	
2.3.1	19	
3		20
3.1	22	
4		23
4.1	24	
4.2	26	
4.3	26	
5		27
6		30
LITERATURA		28

1 ÚVOD

Bakteriální infekce jsou jedním z hlavních globálních zdravotních problémů 21. století. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace by do roku 2050 mohly multirezistentní patogeny způsobovat až 10 milionů úmrtí ročně, pokud se nenajdou účinné alternativy k antibiotické léčbě [WHO, 2019]. Přestože máme k dispozici celou řadu antibiotik, jako jsou *amoxicilin* (širokospektrální penicilin používaný zejména u infekcí dýchacích cest), *cefixim* (cefalosporin třetí generace, indikovaný např. při infekcích močových cest) a *azithromycin* (makrolidové antibiotikum se širokým spektrem použití). Stále častěji čelíme bakteriím, které si vytvořily účinné mechanismy rezistence, například změnou cílových struktur (penicilin vázající receptory, ribozomální podjednotky a další), enzymatickou inaktivací nebo aktivním odčerpáváním (efluxem) léčiv pomocí multidrug-resistant pumpy [EMRO WHO, 2024; Ventola, 2015; Piddock, 2006]. Mezi rezistentní bakterie se řadí například *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentní; *Neisseria gonorrhoeae*, rezistentní k ceftriaxonu / fluorochinolonům; *Mycobacterium tuberculosis*, rifampicin-rezistentní (MDR/XDR-TB) [WHO, 2024]

Jedním z možných alternativních přístupů k řešení multirezistence jsou právě kationické antimikrobiální látky (KAL), které se přirozeně vyskytují v tělních tekutinách a epitelálních tkáních různých organismů, kde jsou součástí vrozené imunity [Mahlapuu et al., 2016]. Kationické antimikrobiální látky (KAL) jsou kladně nabitě sloučeniny, které vykazují antimikrobiální aktivitu (především bakteriocidní) primárně tím, že fyzikálně narušují integritu jejich plazmatické membrány. Protože nezasahují do specifických enzymatických či metabolických drah, ale zaměřují se na obecnou strukturu lipidové dvojvrstvy, vytvářejí mikroorganismům podstatně obtížnější podmínky pro vznik klasických rezistentních mechanismů [Zasloff, 2002].

Historické pozorování antimikrobiální aktivity sahá až do 30. let 20. století. Simms a Jones (1930) popsali látku obsaženou v kravském mléce, dnes označovanou jako *laktoperoxidázový systém*, která má baktericidní účinky. Později byly popsány i další kationické biomolekuly, jako histony a protaminy, izolované ze zvířecích tkání, které inhibovaly růst bakterií [Harris & Percival, 1956; Hirsch, 1958]. Tyto objevy podnítily zájem o přirozené antimikrobiální obranné mechanismy a o možnost jejich terapeutického využití v léčbě.

Od 80. let se výzkum začal více zaměřovat na syntetické analogy těchto látek, zejména peptidy a polymery s kationickým charakterem, schopné cílit na bakteriální membrány. Právě interakce těchto molekul s fosfolipidovou dvojvrstvou se ukázala jako klíčová pro jejich selektivitu a účinnost. Moderní přístup se tak přesouvá od vývoje univerzálních AMP (antimikrobiálních peptidů) směrem k cílenému návrhu strukturálně optimalizovaných látek účinné proti specifickým patogenům [Mookherjee et al., 2021; Do Pham et al., 2022]

Cíl práce

Cílem této práce je identifikovat a shrnout dosavadní poznatky o mechanismech účinku *kationických antimikrobiálních látek* (dále jako KAL). Zvláštní důraz je kladen na interakce KAL s biologickými membránami mikroorganismů. Práce se soustředí na to, jak klíčové strukturální parametry kationických antimikrobiálních látek. Zejména hustota kladného náboje, délka a rozložení hydrofobních segmentů a celková amfifilita určují jejich specifickou interakci s plazmatickými membránami mikroorganismů. Tyto vlastnosti ovlivňují selektivitu a účinnost KAL. Dílčím cílem práce je popsat rozdíly ve složení cytoplazmatických membrán bakterií a savčích buněk. Tyto rozdíly jsou zásadní, neboť určují míru citlivost vůči působení KAL. Dále práce diskutuje o principech, jak racionálně navrhnout KAL s optimalizovanou selektivitou vůči cílovým patogenům a co nejnižší toxicitou pro hostitelské (savčí) buňky.

2 PŘEHLED A ROZDĚLENÍ KATIONICKÝCH ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK

Kationické antimikrobiální látky (KAL) jsou krátké kladně nabitě peptidy nebo malé molekuly, které narušují obal mikroorganismů podobně jako „přírodní antibiotika“. Vyskytují se v kůži, slinách či na povrchu rostlin a představují první obrannou linii proti infekci [Zasloff 2002; Mahlapuu 2016]. Zatím nemají žádné mezinárodní ani univerzálně přijímané rozdělení, takže se v odborné literatuře setkáváme s různými přístupy k jejich klasifikaci. Autoři jednotlivých studií často volí rozdělení podle původu (přírodní vs. syntetické), chemické struktury, mechanismu účinku, spektra působení nebo i způsobu aplikace. Každé z těchto hledisek přináší jiný úhel pohledu a umožňuje pochopení jiných vlastností těchto látek.

Vzhledem k široké rozmanitosti KAL a jejich různým účinkům v závislosti na chemické povaze, se tato práce zaměřuje na strukturní charakteristiky a jejich interakce s biologickými membránami. V tomto kontextu je navrženo rozdělení KAL na základě chemické struktury a funkčních skupin, což nám umožňuje lépe porozumět jejich selektivě, účinnosti a možným aplikacím.

2.1 Peptidické kationické antimikrobiální látky (AMP)

2.1.1 Obecná charakteristika

Peptidové kationické antimikrobiální látky představují početnou a strukturálně pestrou rodinu molekul, které sdílejí dva komplementární motivy. Kationické úseky bohaté na lysin či arginin a hydrofobní segmenty složené převážně z aminokyselin, jako jsou leucin, isoleucin, valin nebo tryptofan. Pravidelné střídání nabitých a nepolárních zbytků umožňuje těmto peptidům výraznou amfifilitu což je vlastnost nezbytná pro jejich cílenou interakci s fosfolipidovou dvojvrstvou mikrobiálních membrán [Mahlapuu et al., 2016; Wang et al., 2020].

Na rozdíl od klasických antibiotik, která obvykle cílí na intracelulární procesy (syntézu DNA, RNA, proteosyntézu), peptidické KAL působí především přímou destabilizací plazmatické membrány prostřednictvím elektrostatických interakcí a následných fyzikálních změn v lipidové dvojvrstvě [Matsuzaki, 1999]. Baktericidní účinnost těchto peptidů vychází ze souhry tří vzájemně propojených vlastností. Vysoký netto kladný náboj při fyziologickém pH (celkem +2 až +6, izoelektrický bod $pI > 9$), střední hydrofobicita vyjádřená $\log D$ okolo 1–4 a rozestupy

4–7 Å mezi kladně nabitými zbytky v peptidovém řetězci společně zajišťují, že se molekula selektivně a pevně váže k anionickým fosfolipidům bakteriálních membrán. Netto náboj zde představuje prostý součet všech kladných a záporných postranních skupin v peptidu, tedy reálný elektrický náboj molekuly při daném pH. Tato kombinace parametrů jako je právě výrazný kladný náboj zajišťuje elektrostatickou přitažlivost k anionickým fosfolipidům bakteriálních membrán, zatímco vhodná hydrofobicita a prostorové uspořádání nábojů určují hloubku a stabilitu zakotvení v lipidové dvojvrstvě, selektivitu vůči mikroorganismům a minimální toxicitu i „ideální“ stav agregace (monomer → oligomer / micela). [Mahlapuu et al., 2016].

Strukturálně mohou peptidické KAL adoptovat různá sekundární uspořádání, jako jsou α -helikální struktury, β -skládané listy nebo zůstat nestrukturované. Tvar molekuly, rozložení náboje a hydrofobních oblastí zásadně ovlivňují jejich mechanismus účinku, stabilitu vůči enzymům a spektrum antimikrobiální aktivity [Mahlapuu et al., 2016].

Oproti lipopeptidům nemají peptidické KAL lipidový segment, což ovlivňuje jejich hydrofobicitu, stabilitu v membránovém prostředí a způsob interakce s lipidovou dvojvrstvou. Vzhledem k této strukturní rozmanitosti lze peptidické KAL dále členit podle typu sekundární struktury, kterou v lipidovém prostředí adoptují. V následující části se proto zaměříme na hlavní strukturální typy těchto peptidů a jejich specifické mechanismy interakce s cílovou membránou.

2.1.2 Klasifikace antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy (AMPs) tvoří širokou a strukturálně i funkčně různorodou skupinu molekul KAL, které se liší svou sekvencí, strukturou a mechanismem účinku. S rostoucími znalostmi o sekvenčních vztazích a funkčním chování těchto látek existuje několik způsobů, jak je klasifikovat.

Jedna z možných klasifikací je podle Bradshaw et al. (2003) rozlišují šest základních strukturálních skupin:

α -helikální peptidy; β -skládané (defensinového typu); lineární nestrukturované peptidy; lantibiotika s thioetherovými kruhy; peptaiboly obsahující neobvyklé aminokyseliny; a cyklické peptidy. Toto členění vychází z převládající sekundární struktury a úzce souvisí s tím, jak jednotlivé skupiny narušují bakteriální membránu. Klasifikace AMP je nejen důležitá pro porozumění jejich biologické aktivitě, ale i pro predikci účinnosti vůči specifickým mikroorganismům a jejich použití v terapii. Tato práce se zaměřuje především na tuto strukturální klasifikaci, která je relevantní pro výzkum zaměřený na interakci s biologickými membránami.

Strukturální klasifikace podle Bradshawa (2003)

Bradshaw et al. [2003] rozděluje AMPs do několika základních skupin na základě prostorové organizace peptidového řetězce, což má přímý vliv na jejich mechanismus účinku a schopnost interagovat s bakteriálními membránami. Toto základní členění vychází z prostorové konformace peptidu, která se může projevovat v různých typech interakcí s negativně nabitými fosfolipidy membrány cílených mikroorganismů. V následujících odstavcích jsou jednotlivé kategorie stručně charakterizovány a doplněny typickými zástupci.

1. α -helikální peptidy

Typickými zástupci této skupiny jsou magaininy a lidský peptid LL-37. Tyto peptidy vytvářejí α -helix stabilizovaný vodíkovými vazbami hydrofobní strana helixu se vkládá do lipidového jádra membrány, zatímco hydrofilní část směřuje k vodnému prostředí. Tato amfifilní architektura často vede k destabilizaci membrány, tvorbě pórů nebo přeuspořádání lipidů

[Matsuzaki, 1999]. Peptidy α -helikální třídy vykazují preferenční aktivitu vůči gram-negativním bakteriím.

2. β -skládané peptidy

Do této kategorie se řadí zejména defensiny. Tyto peptidy tvoří stabilní β -skládané struktury, které jsou zpevněné disulfidovými můstky. Disulfidové vazby poskytují vysokou stabilitu vůči proteolytickému štěpení, což zvyšuje jejich vhodnost pro klinické aplikace. Defensiny často působí proti gram-pozitivním bakteriím, přičemž mechanismus účinku zahrnuje narušení membrány a vazbu na specifické fosfolipidy, jako je fosfatidylserin (PS).

3. Lineární nestrukturované peptidy

Třetí hlavní skupinu představují lineární peptidy, typicky histatiny pocházející z lidských slin. Tyto peptidy postrádají stabilní sekundární strukturu v roztoku, ale vykazují vysokou míru interakce s negativně nabitými fosfolipidy. Kvůli absenci stabilizačních prvků jsou náchylnější k degradaci proteázami, což omezuje jejich využitelnost v systémové terapii [Wang et al., 2020]. Přesto vykazují výraznou antimikrobiální aktivitu, zejména vůči kvasinkám.

4. Lantibiotika s thioetherovými kruhy

Čtvrtou skupinu tvoří lantibiotika. Tato skupina peptidů obsahuje neobvyklé thioetherové kruhy (*lanthionin*, *methyllanthionin*), které vznikají během posttranslačních modifikací. Lantibiotika vykazují vysokou selektivitu vůči gram-pozitivním bakteriím. Například *nisin* se specificky váže na lipid II, klíčový prekurzor biosyntézy buněčné stěny, a tím inhibuje buněčný růst [Breukink et al., 1999].

5. Peptaiboly s neobvyklými aminokyselinami

Pátou kategorií zastupují peptaiboly, reprezentované zejména alamethicinem izolovaným z plísně *Trichoderma viride*. Peptaiboly obsahují neobvyklé aminokyseliny, jako je α -aminoisobutyryát, které podporují tvorbu stabilních α -helikálních struktur. Jejichž mechanismus účinku obvykle spočívá ve tvorbě iontových kanálů v membránách, což vede k permeabilizaci a kolapsu buněčné homeostáze. Přestože vykazují silnou antimikrobiální aktivitu, jejich širší terapeutické využití je omezeno vysokou cytotoxicitou [Whitmore et al., 2002].

6. Cyklické peptidy

Poslední významnou skupinou jsou cyklické peptidy, např. *kalata B1* z rostliny *Oldenlandia affinis*. Ty představují specifickou skupinu antimikrobiálních látek, kde je peptidová kostra uzavřena do kruhu kovalentními vazbami. Tato cyklická struktura výrazně zvyšuje stabilitu vůči proteolytickému štěpení a zároveň omezuje flexibilitu molekuly, čímž vytváří pevně definovanou prostorovou strukturu [Tam et al., 2015].

Na rozdíl od lineárních peptidů mohou cyklické molekuly díky své odolnosti specificky interagovat s vybranými fosfolipidy bakteriálních membrán bez rozsáhlého narušení lipidové

dvojvrstvy. Například výše zmiňovaná *kalata B1* tvoří kompaktní strukturu stabilizovanou disulfickými můstky (tzv. cysteinový uzel), která umožňuje cílenou vazbu na anionické fosfolipidy, jako je *fosfatidylserin* a *fosfatidylglycerol*, běžné v bakteriálních membránách [Wang et al., 2021].

Tento typ molekul tak kombinuje vysokou odolnost vůči degradaci s možností selektivního rozpoznávání specifických lipidových struktur, což je odlišuje od konvenčních lineárních kationických antimikrobiálních peptidů.

Funkčně-sekvenční přístup podle Wanga (2020):

S rostoucím porozuměním sekvenčních vztahů a funkcím mezi AMPs a rychlím vývojem bioinformatiky, někteří autoři navrhují alternativní klasifikaci k té Bradshawaově, která se zaměřuje na podobnosti sekvencí a předpokládaných funkcí:

Sekvenční homologii

Ta napomáhá klasifikovat AMP na základě podobnosti jejich aminokyselinových sekvencí, což může napomoci predikci jejich interakcí s membránami.

Biologického původu

U kterého je důležité, zda AMP pochází z živočišných, rostlinných nebo mikrobiálních zdrojů.

Funkční diverzita (dle funkce)

Tato kategorie označuje schopnost antimikrobiálních peptidů (AMP) ovlivňovat různé struktury a procesy v mikrobiálních buňkách. Neomezují se pouze na jeden mechanismus účinku, ale mohou například narušovat plazmatickou membránu, inhibovat syntézu buněčné stěny, zasahovat do proteosyntézy nebo modulovat imunitní odpověď hostitele.

Tento koncept je zvláště relevantní pro membránově aktivní kationické antimikrobiální látky (KAL), které se zaměřují primárně na interakci s bakteriálními membránami. Tato práce se zaměřuje na látky, které vykazují vysokou selektivitu vůči mikroorganismům prostřednictvím cílené destabilizace membrány a zároveň nízkou toxicitu vůči savcím buňkám.

2.1.3 Mechanismus účinků AMP

Standartní mechanismy účinku

Antimikrobiální peptidy (AMPs) způsobují narušení integrity buněčných membrán prostřednictvím elektrostatické interakce mezi postranními řetězci kationických aminokyselin (např. *lysine*, *arginine*) a záporně nabitými fosfolipidy na povrchu bakteriálních membrán vede k jejich přichycení a následné destabilizaci [Mahlapuu et al., 2016]. Hydrofobní části peptidů pak umožňují jejich vklouznutí do lipidové dvojvrstvy, kde často vytvářejí póry nebo tradičně porušují membránovou soudržnost. Tento mechanismus vede ke ztrátě iontové rovnováhy, kolapsu membránového potenciálu, a nakonec ke smrti buňky. Příkladem takto působících peptidů jsou magaininy a alamethicin [Wang et al., 2020; Hancock & Sahl, 2006].

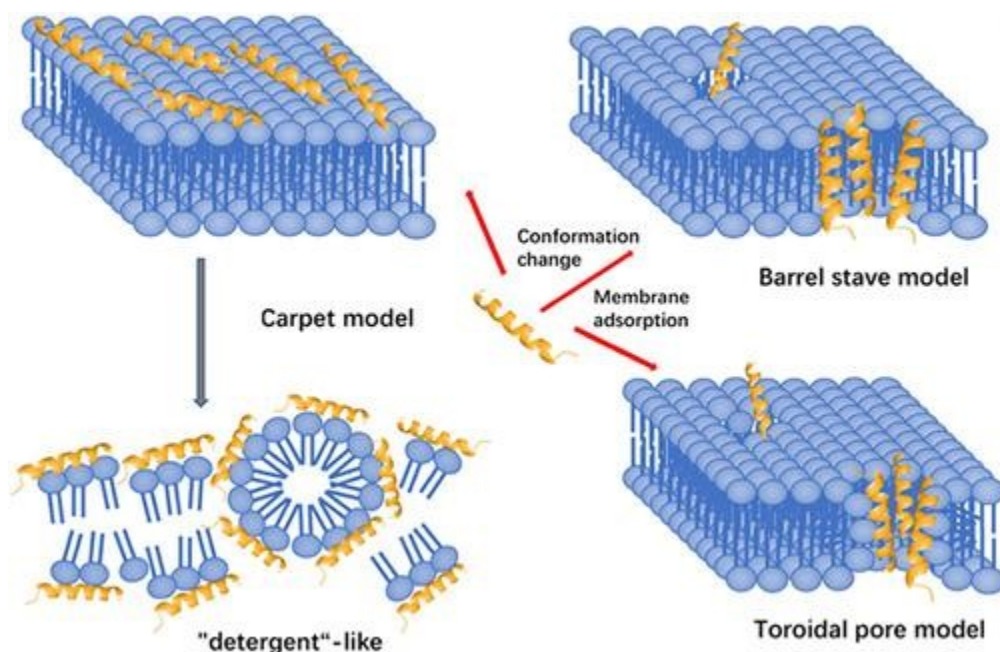
Některé AMPs však působí i intracelulárně – po překonání membrány vstupují do bakteriální cytoplazmy, kde cíleně narušují klíčové vnitrobuněčné procesy (například inhibici syntézy DNA, RNA nebo proteinů) [Mahlapuu et al., 2016]. Typicky inhibují syntézu DNA, RNA nebo proteinů, a to vazbou na polymerázy či ribozomy. Jiné peptidy ovlivňují enzymatické dráhy nebo přímo degradují genetický materiál [Mookherjee et al., 2021]. Vstup do buňky probíhá buď pasivně přes narušenou membránu, nebo aktivně prostřednictvím transportních systémů – např. *proline* *rich peptides* jsou schopny translokace bez destrukce membrány. Tento typ účinku také rozšiřuje možnosti využití AMPs i vůči bakteriím s méně náchylnými membránami.

Netypické účinky

Některé kationické antimikrobiální látky vykazují vedle přímé antimikrobiální aktivity také tzv. neklasické účinky, mezi něž patří schopnost ovlivňovat zánětlivou odpověď hostitele. Podle Mookherjee et al. (2021) mohou některé peptidy regulovat produkci cytokinů nebo přispívat k obnově poškozených tkání. Tyto efekty však předpokládají specifickou interakci s receptory eukaryotních buněk a nejsou typické pro většinu KAL. Primárním cílem KAL je bakteriální membrána ne eukaryotická. Jde tedy o rozšiřující funkci některých látek, která může být terapeuticky využitelná, ale nelze ji považovat za obecný mechanismus účinku v rámci této skupiny molekul [Mookherjee et al., 2021].

Po první elektrostatické adsorpci se mnoho KAL shlukuje do dimerů až vyšších oligomerů; hranicí je tzv. kritická agregační koncentrace (CAC). Pod CAC zůstávají peptidy převážně monomerní a mohou působit „carpet“ mechanismem, nad CAC se samovolně skládají do pór-

tvořících souborů potřebných pro barrel-stave či toroidal pore model. Typickým příkladem je magainin 2, jenž při submikromolárních koncentracích tvoří tetramery a octamery, které zalámují lipidovou dvojvrstvu do toroidálních pórů; naopak krátký indolicidin zůstává monomer a chová se detergentově. Oligomerizace zvyšuje rychlost permeabilizace, ale příliš nízká CAC zároveň zvyšuje hemolytickou toxicitu – proto je řízený agregační stav jedním z klíčových parametrů racionálního návrhu KAL [Matsuzaki, 1999; Sitaram & Nagaraj, 1999; Chen et al., 2013]



Obrázek 1: typy struktur plasmatických membrán po přesáhnutí kritické agregační koncentrace

Důvodem, proč některé KAL vykazují tyto netypické účinky, je jejich schopnost interagovat nejen s bakteriálními membránami, ale také s eukaryotními. Tato vlastnost umožňuje modulaci imunitní odpovědi. **LL-37**, peptid produkovaný lidskými neutrofily, je příkladem KAL, které mají silné protizánětlivé účinky. Tento peptid je schopen modulovat produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-6, IL-8 a TNF- α , a zároveň podporuje hojení ran. Významným mechanismem, který stojí za tímto účinkem, je interakce LL-37 s receptory na povrchu eukaryotických buněk, jako jsou Toll-like receptor 2 (TLR-2), což aktivuje signální dráhy zodpovědné za regulaci zánětu a hojení [Davidson et al., 2004; Semple et al., 2010]. Tento proces ukazuje, jak KAL mohou nejen zabít bakterie, ale také ovlivnit hostitelskou reakci.

Dalším příkladem KAL s netypickými účinky je *defensin*. Tato skupina peptidů, která je přítomná v lidských epiteliálních buňkách, hraje důležitou roli v obraně proti bakteriálním infekcím, ale také moduluje imunitní odpověď a zánětlivé procesy. Lidské defensiny jsou schopné ovlivnit chemotaxi (pohyb buněk směrem k infekčnímu místu), což pomáhá aktivovat imunitní odpověď na infekce. Tento účinek je silně závislý na jejich schopnosti interagovat s receptory, které jsou přítomné na buněčných membránách, a na jejich schopnosti aktivovat signální dráhy [Semple et al., 2010; Ghosh et al., 2011] .

Podobně jako defensiny a LL-37, také *magaininy* vykazují nejenom přímé antimikrobiální účinky, ale také imunomodulační funkce. *Magainin 2*, peptid izolovaný z žabí pokožky, byl prokázán jako schopný potlačovat zánětlivou odpověď a podpořit hojení ran, když je aplikován na infikované kožní léze [Choi et al., 2012]. Tyto KAL mohou regulovat specifické imunitní odpovědi (jak), což je činí cennými nejen pro jejich antibakteriální, ale i protizánětlivé schopnosti.

Všechny tyto účinky však nesmí být považovány za hlavní mechanismus účinku KAL. Zatímco některé peptidy vykazují neklasické účinky, většina KAL se stále zaměřuje především na narušení bakteriálních membrán a je neúčinná v interakcích s eukaryotními buňkami. Nicméně, rozšíření této funkcionality může znamenat větší terapeutické využití KAL, jak pro prevenci infekce, tak pro terapeutické aplikace v oblasti zánětlivých a infekčních onemocnění [Mookherjee et al., 2021; Choi et al., 2012].

Příklady AMP s netypickými účinky:

- LL-37: Tento peptid vykazuje nejen silné antimikrobiální účinky, ale také moduluje zánětlivou odpověď, podporuje regeneraci tkání a působí proti některým patogenním virům [Davidson et al., 2004] [Semple et al., 2010].
- Defensiny: Některé z defensinů, například lidské defensiny, mají schopnost modulovat imunitní odpověď a mohou regulovat produkci cytokinů v eukaryotních buňkách, což naznačuje jejich role ve zánětlivých procesech [Zhang et al., 2020].
- Magaininy: Tyto peptidy mají také schopnost modulovat zánětlivé procesy, přičemž jejich hlavní mechanismus účinku je zaměřen na destrukci bakteriálních membrán. Některé výzkumy ukazují, že mají i schopnost ovlivnit produkci cytokininů a podporovat hojení ran [Hancock et al., 2001].

2.1.4 Klinický potenciál a omezení

AMP vykazují řadu terapeuticky zajímavých vlastností. Typicky působí velmi rychle při narušení bakteriální membrány a útlum růstu se obvykle projevuje během několika minut po expozici [Mahlapuu et al., 2016]. Účinek těchto látek se projeví v koncentracích kolem 1–10 μM (MIC, minimální inhibiční koncentrace), přičemž bakteriální koncentrace (MBC, minimální bakteriální koncentrace) bývá jen mírně vyšší [Kaplan et al., 2011]. Díky primárnímu cílení na základní strukturní komponenty bakteriálních membrán, jako jsou anionické fosfolipidy nebo lipoové kyseliny, je riziko vzniku rezistence nižší než u běžných antibiotik [Mahlapuu et al., 2016].

2.2 Lipopeptidy

2.2.1 Obecná charakteristika

Lipopeptidy tvoří specifickou podskupinu antimikrobiálních látek, které kombinují krátký peptidový řetězec s hydrofobní lipidovou složkou. Přítomnost lipidového segmentu významně odlišuje tyto molekuly od čistě peptidických kationických antimikrobiálních látek (KAL) – kromě elektrostatických interakcí využívají lipopeptidy i silné hydrofobní zakotvení do lipidových dvojvrstev. To často vede k vyšší afinitě k membránám a umožňuje účinnost již při nižších koncentracích [Jangra et al., 2019].

Z hlediska struktury obsahují lipopeptidy kationickou peptidovou doménu, která zprostředkovává elektrostatickou vazbu na záporně nabitý povrch bakteriálních buněk, a hydrofobní lipidový řetězec, který umožňuje stabilní začlenění do lipidové vrstvy. Tato kombinace podporuje destabilizaci membrány, zvyšuje její propustnost a vede k rychlé buněčné smrti. Mechanismus účinku se může mezi jednotlivými lipopeptidy lišit – některé působí permeabilizací membrány, jiné indukují tvorbu pórů s různou velikostí.

Oproti peptidickým KAL, kde stabilita a vazba na membránu závisí čistě na rozložení hydrofobních a kationických oblastí v peptidovém řetězci, poskytuje lipidová složka lipopeptidů molekulám silnější zakotvení a odolnost v membránovém prostředí. Tento prvek zároveň moduluje fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly, včetně její rozpustnosti, biodistribuce a stability vůči biologickým tekutinám, což je klíčové pro farmaceutické využití.

Je však třeba zmínit, že existují i lipopeptidy, které nejsou kationické, například daptomycin. Ten využívá k interakci s membránou vazbu na ionty vápníku (Ca^{2+}) a cílenou tvorbu pórů, přestože jeho peptidová část sama o sobě nenesení kladný náboj. Vzhledem k zaměření této práce na kationické lipopeptidy s přímým membránovým působením [Trimble et al., 2022] bude daptomycin zmíněn pouze okrajově jako příklad odlišného mechanistického přístupu.

Vzhledem k rozmanitosti strukturálních motivů lipopeptidů je možné tyto látky dále členit podle charakteru peptidového řetězce, typu cyklizace a přítomnosti neobvyklých aminokyselin. Následující část se proto zaměří na hlavní strukturální typy kationických lipopeptidů a jejich specifické vlastnosti, které ovlivňují interakci s cílovou membránou a výsledný antimikrobiální účinek.

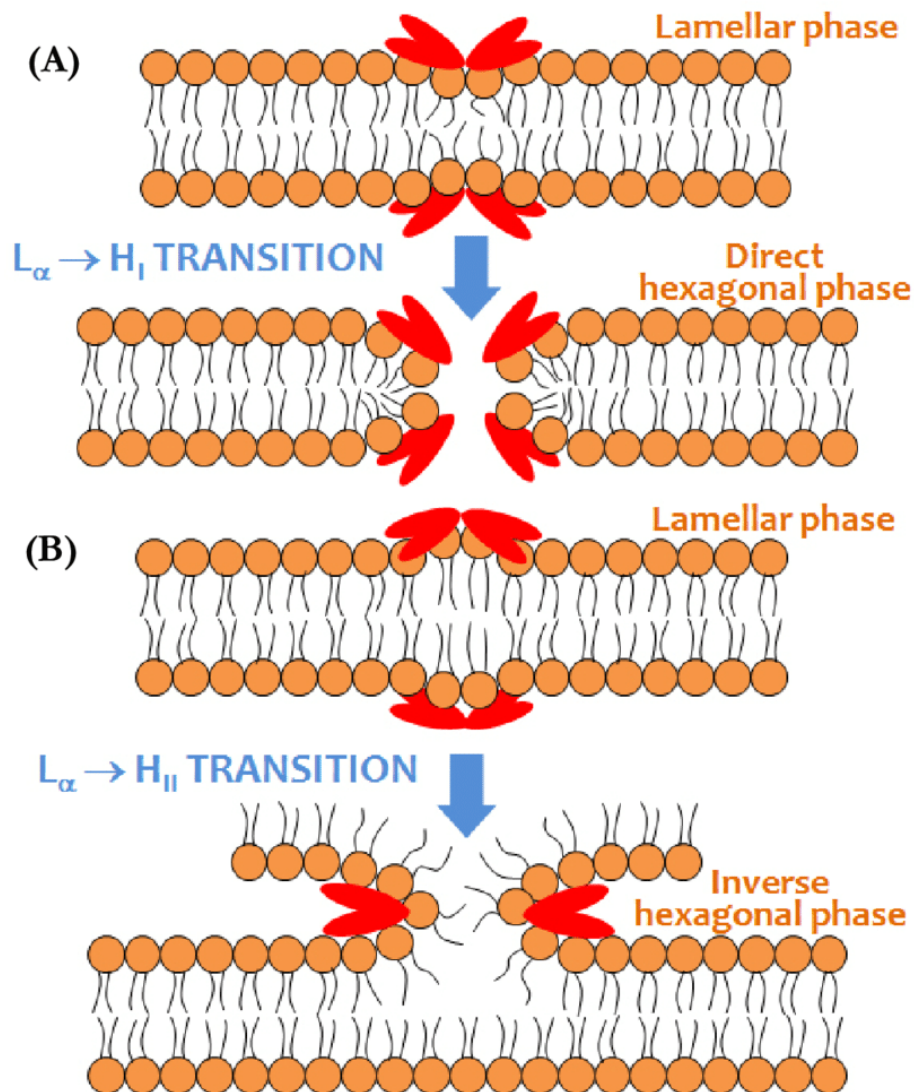
2.2.2 Struktura a mechanismus účinku lipopeptidů

Lipopeptidy se vyznačují strukturou, která kombinuje kationickou peptidovou část s hydrofobní lipidovou kotvou. Tato amfifilní architektura jim umožňuje cílenou interakci s lipidovými dvovrstvami mikrobiálních membrán [Straus & Hancock, 2006]. Lipidový řetězec usnadňuje zakotvení molekuly do hydrofobní vnitřní oblasti membrány, zatímco kationické aminokyseliny na peptidovém segmentu zprostředkovávají elektrostatickou vazbu na záporně nabitě fosfolipidy bakteriálního povrchu.

Mechanismus účinku lipopeptidů je vícestupňový. Po elektrostatické vazbě na povrch buňky následuje zakotvení hydrofobní části do membrány a narušení její organizace. Tato destabilizace není čistě mechanická, ale zahrnuje i biofyzikální reorganizaci lipidového uspořádání. Amfifilní molekuly mohou indukovat tzv. negativní Gaussovo zakřivení – typ povrchového zakřivení, který podporuje přechod z lamelární (vrstevnaté) struktury do tzv. nelamelárních fází, jako je inverzní hexagonální fáze (HII) [Sitaram & Nagaraj, 1999; Mookherjee et al., 2021]. V těchto oblastech dochází ke vzniku pórů, netěsností nebo ke změně permeability, což vede k úniku intracelulárního obsahu a smrti buňky [Poirel et al., 2017].

Lamelární fáze je typická pro stabilní biologické membrány a vzniká převážně při vysokém zastoupení bilayer-preferring lipidů, jako je fosfatidylcholin (PC) nebo sfingomyelin. Naproti tomu lipidy se zakřiveným tvarem, jako fosfatidylethanolamin (PE), a přítomnost amfifilních molekul (například některé lipopeptidy) podporují vznik nelamelárních struktur. Účinnost a

selektivita lipopeptidů tak závisí na rovnováze mezi délkou a složením lipidového segmentu, počtem a rozložením kationických skupin a celkovou amfifilitou molekuly.



Obrázek 2: Schéma přechodu plasmatické membrány z lamelární struktury do inverzní hexagonální fáze HII (

2.2.3 Hlavní typy lipopeptidů

Lipopeptidy tvoří strukturálně různorodou skupinu kationických antimikrobiálních látek, jejichž společným znakem je přítomnost peptidové části s kladným nábojem a hydrofobního lipidového segmentu. Díky této kombinaci vykazují výraznou afinitu k bakteriálním membránám a patří mezi nejúčinnější látky s membránově cíleným účinkem. Níže jsou shrnuty

vybrané zástupce přírodních i syntetických lipopeptidů, kteří byli nejlépe charakterizováni z hlediska struktury, účinku i terapeutického potenciálu.

Polymyxiny

Polymyxiny (např. polymyxin B a polymyxin E – kolistin) jsou cyklické deka-peptidy izolované z *Bacillus polymyxa*, u nichž je lipidový řetězec navázán na N-terminální konec peptidu. Kationický náboj je dán přítomností pěti reziduí 2,4-diaminobutyrátu (Dab), které umožňují elektrostatickou vazbu na lipopolysacharidy (LPS) vnější membrány gram-negativních bakterií. Interakce s LPS narušuje bariérovou funkci vnější membrány, čímž dochází k destabilizaci cytoplazmatické dvojvrstvy a následnému úniku intracelulárního obsahu. Polymyxiny se klinicky používají jako rezervní antibiotika u infekcí způsobených multirezistentními kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a dalších [Poirel et al., 2017].

Přírodní lipopeptidy z rodu Bacillus

Různé druhy rodu *Bacillus* produkují biologicky aktivní lipopeptidy s různými spektry účinku. Surfaktin je cyklický heptapeptid s β -hydroxy mastným řetězcem, který působí převážně detergentově a snižuje povrchové napětí membrán. Ituriny a fengyciny jsou antifungální lipopeptidy schopné narušovat cytoplazmatické membrány kvasinek a vláknitých hub. Jejich aktivita je spojena s vazbou na sterolové komponenty, jako je ergosterol, a zvýšením permeability membrány. Ačkoli jejich přesný mechanismus není zcela dořešen, předpokládá se synergický efekt elektrostatických a hydrofobních interakcí [Jangra et al., 2019].

Syntetické lipopeptidy a modulární systémy

Synteticky navržené lipopeptidy rozšiřují možnosti manipulace se strukturou molekuly s cílem zvýšit selektivitu a stabilitu. Například LEGO-lipophosphonoxiny (LEGO-LPPO), představují novou skupinu zaměřenou na narušení bakteriálních membrán. [Trimble et al., 2022; Do Pham et al., 2022]. Mezi další příklady podobných syntetických systémů patří například lipidované peptoidy [Chongsiriwatana et al., 2008], které napodobují strukturu peptidů, ale jsou odolnější

vůči enzymatické degradaci. Také byly vyvinuty dendrimerové kationické lipopeptidy, například série G3KL, které kombinují více kladně nabitých větví s hydrofobními segmenty a vykazují silnou aktivitu proti gram-negativním bakteriím [Zai et al., 2020]. Další strategii představují syntetické arylamidové amfifily, které napodobují chování AMPs bez nutnosti peptidového skeletu [Tew et al., 2002].

2.2.4 Klinický a farmaceutický kontext

Lipopeptidy jsou ceněny pro svou účinnost vůči patogenům, vůči nimž běžná antibiotika selhávají – zejména u gram-negativních bakterií s bariérovou vnější membránou nebo u mikroorganismů tvořících biofilmy. Výhodou je také rychlý nástup účinku, který často nastává během několika minut od expozice. Na druhou stranu jejich využití komplikuje několik faktorů: některé molekuly vykazují cytotoxicitu při koncentracích blízkých MIC (např. hemolytická aktivita), nízkou stabilitu v biologickém prostředí (vliv proteáz) nebo špatnou rozpustnost. U cyklických lipopeptidů bývá také limitujícím faktorem technologická náročnost syntézy [Kaplan et al., 2011; Jangra et al., 2019].

2.3 Syntetické analogy

Pro překonání omezení přírodních kationických antimikrobiálních látek (KAL), jako jsou nízká stabilita a vysoká toxicita, se vyvinuly syntetické analogy a peptidomimetika, které napodobují vlastnosti přírodních peptidů, ale mají zlepšené chování v organismu (testovacím subjektu). Syntetické deriváty KAL byly navrženy tak, aby měly vyšší stabilitu vůči proteolytickému štěpení, delší biologický poločas a často lepší farmakologické vlastnosti ve srovnání s přírodními peptidy [Lei et al., 2023].

Hlavními přístupy při vývoji syntetických analogů jsou:

Substituce aminokyselin – použití D-aminokyselin místo L-aminokyselin, což zvyšuje stabilitu peptidu vůči enzymatické degradaci a současně zajišťuje, že peptid zůstává aktivní.

Cyklické struktury – u některých peptidů je cyklizace využívána ke stabilizaci struktury, což vede k menší náchylnosti k proteolytickému štěpení a zlepšení jejich stability v biologických podmínkách.

PEGylace a lipidové modifikace – přidání polyethylenglykolu (PEG) nebo lipidových modulů ke struktuře peptidu může zlepšit jeho rozpustnost v biologických tekutinách a zároveň minimalizovat jeho cytotoxicitu pro savčí buňky [Mahlapuu et al., 2016].

Syntetické analogy a peptidomimetika se také liší v tom, jakým způsobem jsou konstruovány jejich kovalentní vazby. Zatímco přírodní peptidy mají peptidovou vazbu mezi aminokyselinami, syntetické deriváty mohou obsahovat i alternativní vazby, jako jsou esterové nebo etherové vazby, které mění konformaci molekuly a mohou zlepšit jejich interakci s cílovými membránami mikroorganismů. Tyto alternativní vazby poskytují peptidům lepší odolnost vůči enzymům a mohou mít lepší selektivitu pro specifické bakteriální cíle [Buchanan et al., 2020].

Příklady syntetických analogů:

Omiganan je syntetický kationický peptid vyvinutý na základě sekvence indolicidinu. Vykazuje antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru gram-pozitivních i gram-negativních bakterií a je stabilnější vůči proteolytickému štěpení [Yeung et al., 2011].

Pexiganan, syntetický analog magaininu 2, byl navržen pro léčbu infekcí u diabetických vředů. Pexiganan napodobuje mechanismus působení přírodních antimikrobiálních peptidů a vykazuje dobrou selektivitu vůči mikrobiálním membránám [Ge et al., 1999].

Lipophosphonoxiny obsahují lipidové segmenty, u nichž se jedná o plně syntetické molekuly a jejichž modulární struktura byla navržena s cílem ovlivňovat bakteriální membrány. Tyto sloučeniny vykazují vysokou účinnost proti gram-negativním bakteriím, jako je *Pseudomonas aeruginosa*, a zároveň mají nízkou hemolytickou toxicitu. Syntetické varianty LEGO-lipophosphonoxinů, například LEGO-LPPO L20v9, ukazují vynikající stabilitu a selektivitu proti bakteriálním biofilmům [Do Pham et al., 2022].

I když syntetické analogy KAL vykazují slibné vlastnosti, některé zůstávají náchylné k degradaci v biologických podmínkách nebo mají nežádoucí účinky na eukaryotní buňky, což omezuje jejich potenciální aplikace. [Kaplan et al., 2011; Jangra et al., 2019; Mahlapuu et al.,

2016]. Proto je nezbytné pokračovat ve výzkumu zaměřeném na optimalizaci stability a redukci toxicity těchto sloučenin, aby byly vhodné pro použití ve farmacii.

2.3.1 Syntetické směry a nové přístupy

Současný vývoj v oblasti kationických lipopeptidů se zaměřuje na racionální návrh molekul, které umožňují přesné ladění struktury a tím i biologické aktivity. Jedním z příkladů jsou výše zmíněné LEGO-lipophosphonoxiny (LEGO-LPPO), které kombinují peptidový segment s definovaným počtem kationických skupin a hydrofobní fosforovou jednotkou. Variabilita délky lipidového řetězce a uspořádání nábojových center umožňuje modulaci afinity k různým typům bakteriálních membrán. Některé deriváty, například LEGO-LPPO L20v9, dosahují vyšší účinnosti než polymyxin B při současném snížení hemolytické toxicity [Trimble et al., 2022; Do Pham et al., 2022].

Další směr představují tzv. „smart“ lipopeptidy, které jsou navrhovány s předdefinovaným spektrem aktivity. Tyto molekuly využívají poznatky o složení cílové membrány – například preferenci pro membrány bohaté na fosfatidylglycerol – a struktura je optimalizována tak, aby minimalizovala interakci s eukaryotními buňkami obsahujícími převážně neutrální lipidy [Wang et al., 2020]. Výsledkem je vyšší selektivita a snížené riziko toxicity.

Tyto principy racionálního návrhu byly názorně demonstrovány u LEGO-lipophosphonoxinů, které umožňují přesné ladění délky hydrofobních segmentů, počtu kationických skupin a jejich prostorového rozložení. Například derivát LEGO-LPPO L20v9 vykazuje vyšší selektivitu vůči gram-negativním bakteriím než polymyxin B, přičemž současně dosahuje nižší hemolytické toxicity [Vávrová et al., 2022].

Tabulka 1: Přehled strategií racionálního návrhu kationických antimikrobiálních látek a jejich výhod

Strategie	Princip návrhu	Hlavní výhoda
LEGO-lipophosphonoxiny	Modulární ladění hydrofobních segmentů a nábojů	Vysoká účinnost, nízká hemolytická toxicita
Smart lipopeptidy	Cílené přizpůsobení specifickému typu membrány	Vysoká selektivita vůči cílovým bakteriím
AMP-GAN / DeepAMP (AI návrh)	Predikce biologické aktivity a selektivity pomocí neuronových sítí	Rychlý screening a generování nových AMP

Podobné modulární přístupy byly dále uplatněny i u tzv. smart lipopeptidů, které jsou navrhovány s cílem cíleně ovlivnit vybraný typ bakteriální membrány na základě jejího lipidového složení [Wang et al., 2020]. Tyto systémy využívají rozdílné afinity k fosfolipidům bakteriálních a savčích membrán k dosažení vyšší selektivity.

Syntetické lipopeptidy tedy umožňují přesně cílit na strukturní rysy bakteriálních membrán, jako je vysoký obsah anionických fosfolipidů nebo absence sterolů. Tento přístup překonává omezení spojená s přírodními peptidy, jako je proteolytická nestabilita nebo nedostatečná selektivita, a představuje perspektivní strategii v boji proti multirezistentním patogenům [Mahlapuu et al., 2016].

3 ZÁKLADNÍ STRUKTURNÍ KOMPONENTY BAKTERIÁLNÍCH MEMBRÁN

Bakteriální membrány se skládají převážně z fosfolipidové dvojvrstvy, která tvoří základní strukturu membrány. U gram-pozitivních bakterií je membrána tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, která poskytuje mechanickou pevnost a stabilitu. Na povrchu této vrstvy se nacházejí lipoteichoové kyseliny (LTA), které jsou silně negativně nabitě a hrají důležitou roli při interakci s prostředím. Tyto kyseliny umožňují připojení různých molekul a ovlivňují stabilitu membrány. U těchto bakterií membrána obvykle stabilizuje buňku, ale interakce s KAL vede k její destabilizaci, což usnadňuje pronikání těchto látek a narušení integrity buněčné membrány. [Mahlapuu et al., 2016; Epanand & Epanand, 2009].

Gram negativní bakterie mají rozdílnou membránu, která je tvořena tenkou peptidoglykanovou vrstvou a je obklopena vnější membránou, obsahující lipopolysacharidy (LPS). Tyto LPS mají negativní náboj a umožňují interakci s kationickými peptidy a jinými antimikrobiálními látkami. Vnější membrána slouží jako bariéra, která brání průniku některých antimikrobiálních látek. Vnitřní fosfolipidová dvojvrstva, která obsahuje fosfatidylglycerol (PG) a fosfatidylserin (PS), je klíčová pro stabilitu a funkci této membrány a je hlavním cílem pro KAL. Tyto fosfolipidy jsou negativně nabitě, což umožňuje elektrostatickou interakci s KAL, což zároveň

vede k jejich integraci do membrány a následnému narušení její integrity [Mahlapuu et al., 2016; Epanand & Epanand, 2009].

Spektrum účinku KAL je široké – působí jak proti gram-pozitivním, tak gram-negativním bakteriím a vykazují účinnost proti některým plísním (například *Candida albicans*) a biofilmům. Biofilmy, které tvoří bakterie, představují problém, protože v těchto strukturách bakterie vykazují zvýšenou odolnost vůči běžným antibiotikům a imunitní odpovědi hostitele. KAL ukazují účinnost nejen proti bakteriálním biofilmům, ale i proti těm, které jsou smíšené, tedy obsahují jak bakterie, tak plísně. Příkladem takového biofilmu je infekce *Candida albicans*, která je často odolná vůči tradičním antibiotikům. KAL, zejména ty, které vykazují schopnost pronikat do biofilmu, mohou tuto bariéru překonat a zničit biofilmovou strukturu, což je činí slibnými kandidáty na léčbu těžkých infekcí [Mookherjee et al., 2021; Sahl et al., 2006].

Přesto všechno některé klinické aplikace KAL čelí několika zásadním omezením. Největší problém představuje nízká stabilita v biologických podmínkách, kde může docházet k rychlé degradaci proteolytickými enzymy [Mahlapuu et al., 2016]. Dalším problémem je cytotoxický účinek na eukaryotní buňky, protože hodnoty HC50 (koncentrace způsobující lýzu 50 % erytrocytů) se u některých látek překrývají s účinnými dávkami, což omezuje jejich bezpečné použití [Kaplan et al., 2011].

Novější molekuly, jako LEGO-lipophosphonoxiny, se snaží tato omezení překonat. Tyto látky vykazují účinnost v submikromolárních koncentracích a současně mají nízkou hemolytickou aktivitu ($HC50 > 100 \mu M$), což naznačuje příznivější terapeutické okno [Do Pham et al., 2022]. LEGO-lipophosphonoxiny jsou navrženy jako syntetické molekuly, které obsahují hydrofobní segmenty a kationické peptidy. Tento modulární design umožňuje flexibilní přizpůsobení struktury molekuly tak, aby cíleně interagovala s bakteriálními membránami, přičemž hydrofobní část se inkorporuje do membrány, zatímco hydrofilní část interaguje s vnějším prostředím.

Jedním z hlavních rysů LEGO-lipophosphonoxinů je možnost přizpůsobit u nich délku a složení hydrofobního segmentu, což umožňuje optimalizaci interakce s různými typy bakteriálních membrán. V praxi to znamená, že molekula může být navržena tak, aby byla účinná proti specifickým bakteriím nebo dokonce proti bakteriálním biofilmům. Tento typ molekuly se ukazuje jako slibný kandidát pro překonání některých běžných omezení u klasických KAL, jako je nízká stabilita a toxicita [Do Pham et al., 2022].

Příklady konkrétních LEGO-lipophosphonoxinů zahrnují varianty, které byly navrženy na základě specifických fosfolipidových cílů v membránách gram-pozitivních nebo gram-negativních bakterií. Tato přizpůsobitelnost zajišťuje, že KAL mohou být aplikovány na širokou škálu bakterií, včetně těch rezistentních vůči běžným antibiotikům. LEGO-lipophosphonoxiny tak představují novou generaci antimikrobiálních látek, které vykazují nízkou toxicitu a vysokou účinnost, čímž by mohly být využívány v klinických aplikacích pro léčbu obtížně léčitelných infekcí [Do Pham et al., 2022].

3.1 Vlastnosti cílové membrány

Složení cytoplazmatické membrány zásadně ovlivňuje interakci s kationickými antimikrobiálními látkami. Bakteriální membrány jsou charakterizovány vysokým obsahem anionických fosfolipidů, zejména fosfatidylglycerolu (PG) a kardiolipinu (CL), které umožňují elektrostatickou vazbu s kladně nabitými molekulami [Venkatesh et al., 2017]. Naproti tomu membrány savčích buněk obsahují převážně neutrální lipidy, jako je fosfatidylcholin (PC) a sfingomyelin (SM), což snižuje jejich afinitu ke kationickým látkám [Mahlapuu et al., 2016].

Výjimku představují některé eukaryotní mikroorganismy, jako jsou kvasinky a vláknité houby, které sice patří mezi eukaryota, ale disponují buněčnou stěnou bohatou na chitin a β -glukany. Tato struktura může ovlivňovat dostupnost cytoplazmatické membrány pro antimikrobiální látky a tím modifikovat jejich účinnost [Epanand & Epanand, 2009].

Rozdíly ve složení fosfolipidů se dále projevují mezi jednotlivými skupinami bakterií. Gram-pozitivní bakterie mají membrány s vyšším podílem PG a CL, zatímco u gram-negativních dominuje fosfatidylethanolamin (PE) s menším zastoupením PG a CL [Epanand & Epanand, 2009]. Mykobakterie jsou specifické přítomností komplexních lipidů s mykolovými kyselinami, které vytvářejí silně hydrofobní obal s nízkou propustností.

Tabulka 1: Přehled hlavních typů membrán a jejich dominantních fosfolipidových složek shrnuje následující tabulka; PG – fosfatidylglycerol, CL – kardiolipin, PE – fosfatidylethanolamin, PC – fosfatidylcholin, SM – sfingomyelin, PI – fosfatidylinositol, PS – fosfatidylserin.

Typ buňky	Dominantní fosfolipidy
Gram pozitivní bakterie (<i>Bacillus subtilis</i>)	PG, CL, PE
Gram negativní (<i>Escherichia coli</i>)	PE (hlavní), PG, CL
Mykobakterie (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	PE, PI, komplexní lipidy s mykolovými kyselinami
Eukaryotní buňky (např. savčí buňky)	PC, SM, cholesterol, PS (většinou neutrální lipidy)

Rozdíly v zastoupení fosfolipidů určují nejen elektrostatickou přitažlivost molekul k cílové membráně, ale i fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je tekutost, schopnost tvorby nelamelárních fází nebo stabilita lipidové dvojvrstvy. Tyto faktory hrají zásadní roli v účinnosti a selektivitě kationických antimikrobiálních látek [Epanand & Epanand, 2009; Mahlapuu et al., 2016].

4 MECHANISMY ÚČINKU KATIONICKÝCH ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK NA BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY

Kationické antimikrobiální látky (KAL) působí primárně narušením cytoplazmatické membrány bakterií, kterou rozpoznávají díky přítomnosti záporně nabitých fosfolipidů, jako jsou fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (CL) [Venkatesh et al., 2017; Mahlapuu et al., 2016]. Vazba KAL na anionické fosfolipidy představuje iniciační krok jejich účinku. Následující destabilizace lipidové dvojvrstvy zvyšuje její permeabilitu, narušuje integritu buněčného prostředí a v konečném důsledku vede k buněčné smrti [Chen et al., 2013; Takahashi et al., 2013]. Povaha tohoto účinku je silně ovlivněna strukturálními parametry molekuly, jako jsou úroveň amfifility, rozmístění kationických skupin a délka hydrofobních segmentů [Takahashi et al., 2013].

Účinnost KAL je však ovlivněna i přítomností dalších strukturálních bariér. Gram-pozitivní bakterie disponují silnou vrstvou peptidoglykanu, která může zpomalit přístup molekul k cytoplazmatické membráně. U Gram-negativních bakterií tvoří vnější membrána bohatá na lipopolysacharidy (LPS) efektivní difuzní bariéru, která selektivně omezuje průnik velkých a hydrofobních molekul [Silhavy et al., 2010]. Některé patogenní kmeny, například *Klebsiella*

pneumoniae nebo *Bacillus anthracis*, navíc produkují polysacharidová pouzdra, která dále snižují dostupnost cílových struktur a tím zvyšují odolnost vůči účinku antimikrobiálních látek [Cryz et al., 1984; Prazak et al., 2022].

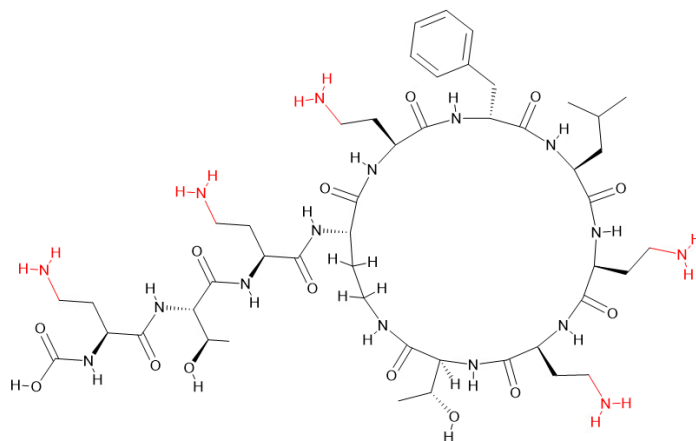
Tyto strukturální překážky významně ovlivňují nejen rychlost nástupu účinku, ale také selektivitu a celkovou účinnost kationických antimikrobiálních látek

4.1 Strukturální faktory ovlivňující účinek

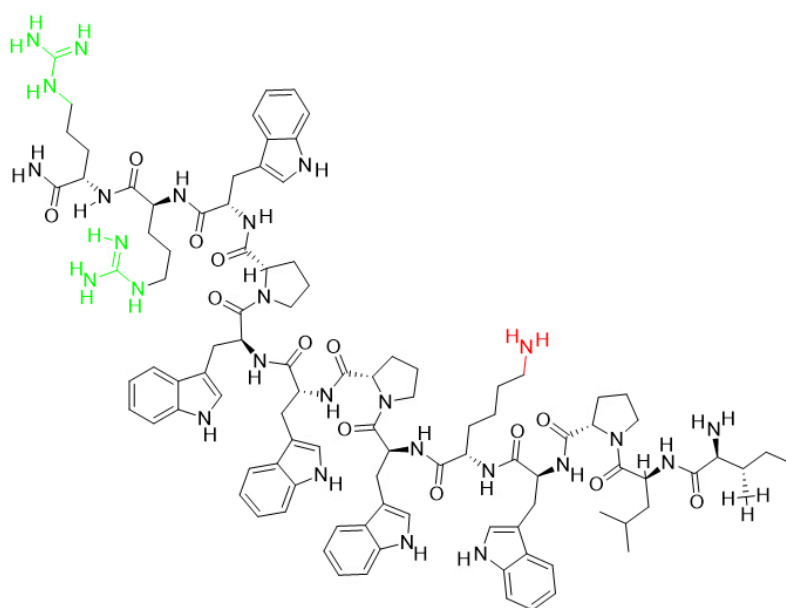
Účinnost kationických antimikrobiálních látek (KAL) na membrány je výrazně ovlivněna jejich chemickou strukturou a prostorovým uspořádáním. Klíčové jsou následující faktory:

Typy kationických skupin

Rozložení a chemický charakter kationických skupin, jako jsou primární, sekundární a terciární aminy, guanidiny a kvartérní amoniové ionty, určují sílu elektrostatické interakce s membránou [Chen et al., 2013]. Guanidinové skupiny umožňují silnější vazbu na fosfolipidy díky schopnosti tvořit vodíkové vazby [Mahlapuu et al., 2016].



Obrázek 1: Antibiotikum Polymyxin B; oranžově vyznačeny skupiny primárních aminů (vytvořeno autorem v programu ChemDraw)



Obrázek 2: Antibiotikum Indolicidin; zelenou barvou jsou označeny skupiny guanidinu (vytvořeno autorem v programu ChemDraw)

Hydrofobita a délka řetězců

Hydrofobní segmenty molekul umožňují začlenění do lipidové dvojvrstvy. Délka těchto segmentů významně ovlivňuje účinnost i toxicitu. Příliš krátké řetězce snižují schopnost narušit membránu, zatímco příliš dlouhé mohou zvyšovat cytotoxicitu vůči eukaryotním buňkám [Venkatesh et al., 2017].

Amfifilita

Přítomnost prostorově oddělených hydrofobních a hydrofilních oblastí je důležitým faktorem umožňujícím správnou orientaci molekuly v lipidovém prostředí a efektivní destabilizaci membrány [Takahashi et al., 2013].

Architektura molekuly

Lineární, cyklické a dendritické struktury ovlivňují stabilitu a způsob interakce s membránou. Cyklické molekuly bývají stabilnější a méně náchylné k enzymatické degradaci, což prodlužuje jejich biologickou aktivitu [Macromolecular Bioscience, 2013].

4.2 Specifita a selektivita účinku

Selektivita KAL vyplývá z rozdílů ve složení plazmatických membrán mezi bakteriemi a eukaryotními buňkami.

Gram-pozitivní bakterie

U bakterií jako *Bacillus subtilis* je cytoplazmatická membrána bohatá na fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (CL), přičemž přítomnost teichoových a lipoteichoových kyselin v peptidoglykanu zvyšuje záporný povrchový náboj [Takahashi et al., 2013].

Gram-negativní bakterie

U organismů typu *Escherichia coli* dominuje fosfatidylethanolamin (PE), doplněný PG a CL. Vnější membrána obsahuje lipopolysacharidy (LPS), které tvoří difuzní bariéru, ale zároveň poskytují záporně nabitě vazebné místo [Poirel et al., 2017].

Mykobakterie

Mycobacterium tuberculosis disponuje buněčnou stěnou bohatou na mykolové kyseliny a arabinogalaktan, což vytváří hydrofobní bariéru s nízkou propustností.

Eukaryotní buňky

Savčí buňky mají membrány tvořené převážně neutrálními fosfolipidy, jako je fosfatidylcholin (PC) a sfingomyelin (SM), což omezuje jejich interakci s kationickými látkami [Mahlapuu et al., 2016; Chen et al., 2013]. Rozdíly v zastoupení fosfolipidů tedy přímo ovlivňují selektivitu účinku KAL, jejich schopnost cíleně rozlišovat mezi patogenními a hostitelskými buňkami.

4.3 Mykobakterie a další výjimečné případy

Bakterie rodu *Mycobacterium*, například původce tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis*, představují specifickou výzvu pro vývoj kationických antimikrobiálních látek (KAL). Jejich

buněčný obal je tvořen klasickou cytoplazmatickou membránou, silnou peptidoglykanovou vrstvou, a především komplexní vnější strukturou složenou z arabinogalaktanu a mykolových kyselin. Tato hydrofobní a hutná vrstva výrazně omezuje prostupnost běžných antimikrobiálních molekul a snižuje dostupnost cílové membrány [Wang et al., 2020].

Přesto byly identifikovány některé KAL, které jsou schopny překonat tuto bariéru. Například syntetický peptid D-hLF 1-11, odvozený od lidského laktoferricinu, vykazuje inhibiční účinek proti *M. tuberculosis* při koncentracích MIC 0,8–1,6 μM , s nízkou cytotoxicitou vůči lidským buňkám [Boix et al., 2021]. D-hLF 1-11 obsahuje kompaktní řadu kationických reziduí a krátký hydrofobní segment, což usnadňuje jeho interakci s hydrofobními částmi buněčného obalu.

Dalším příkladem je lidský β -defenzin HBD-3, který prokazuje aktivitu proti *Mycobacterium avium*, a to jak extracelulárně, tak intracelulárně uvnitř infikovaných makrofágů [Hiratsuka et al., 2020]. HBD-3 je malý kationický peptid se strukturou tří disulfidických můstků, které stabilizují jeho prostorové uspořádání, a umožňuje cílenou vazbu na negativně nabitě struktury v mykobakteriální stěně.

Úspěch těchto látek ukazuje, že pečlivé doladění hydrofobicity, kationické hustoty a struktury molekuly je zásadní pro překonání specifických bariér, jako jsou voskovité vrstvy mykobakterií.

5 MODELOVÉ SYSTÉMY, EXPERIMENTÁLNÍ POZNATKY A NOVÉ SMĚRY VÝVOJE

Studium interakce kationických antimikrobiálních látek (KAL) s biologickými membránami často využívá modelové systémy, které umožňují přesně sledovat mechanismy účinku pod kontrolovanými podmínkami. Mezi nejčastěji používané patří unilamelární liposomy (SUV, LUV), giant unilamellar vesicles (GUVs), planární lipidové dvojvrstvy (BLM) a supported lipid bilayers (SLB) [Zhao et al., 2001].

Modelové membrány jsou obvykle tvořeny definovanými fosfolipidy podle typu cílové buňky.

Často se používají:

- POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) – jako model pro anionické bakteriální membrány,
- SOPC (1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) – pro neutrální vrstvy eukaryot,
- DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) – pro modelování rigidních fosfatidylcholinových membrán,
- cholesterol – k simulaci eukaryotní membránové stability [Joondan et al., 2014].

Ve studii Zhao et al. (2001) byly pomocí těchto lipidů připraveny modelové membrány různých typů (monovrstvy, LUVs, GUVs), na kterých byla sledována interakce AMP magaininu 2 a indolicidinu. Zaznamenali zvýšenou afinitu těchto látek k membránám obsahujícím POPG, zatímco přítomnost cholesterolu tuto vazbu modifikovala [Zhao et al., 2001].

Další studie využila DPPC jako model eukaryotní membrány k testování interakce amfifilních esterů derivovaných od L-fenylalaninu a L-tyrosinu. Výsledky ukázaly, že antibakteriální aktivita těchto látek koreluje s délkou hydrofobního řetězce a kritickou micelární koncentrací (CMC), přičemž kratší estery byly neúčinné a látky s vyšší hydrofobicitou vykazovaly vyšší účinnost [Joondan et al., 2014].

Vliv má rovněž agregační stav molekul – některé KAL působí jako monomery, jiné vytvářejí oligomery nebo micely při překročení určité koncentrace. Agregace může zásadně změnit způsob interakce s membránou i výsledný typ poškození [Mahlapuu et al., 2016].

Dále se ukazuje, že účinnost KAL není dána pouze nábojem, ale i dalšími parametry:

- izoelektrický bod (pI) – ideálně nad 9,
- distribuční koeficient (logD) – v rozmezí 1–4,
- rozestup kladných nábojů – optimálně 4–7 Å.

Tyto vlastnosti byly například důsledně optimalizovány u LEGO-lipophosphonoxinů, jako je LPPO L20v9, které vykazují vysokou účinnost a selektivitu vůči gram-negativním bakteriím při nízké hemolytické toxicitě [Vávrová et al., 2022].

Další varianty, např. L19v4 nebo L19v8, demonstrují, jak změna délky hydrofobního řetězce nebo počtu kationických skupin ovlivňuje účinnost i stabilitu molekuly. V posledních letech se rozvíjejí i návrhové přístupy založené na strojovém učení a hlubokých neuronových sítích, které

umožňují predikci biologické aktivity, selektivity i toxicity návrhovaných struktur. Systémy jako AMP-GAN nebo DeepAMP využívají tréninkové databáze AMP k tvorbě molekul s definovanými parametry. Přestože jsou zatím nejčastěji aplikovány na peptidické AMP, postupně se rozšiřují i na syntetické a hybridní struktury [Veltri et al., 2018; Nagarajan et al., 2023].

6 ZÁVĚR

Tato rešeršní práce shrnuje současné poznatky o mechanismech účinku kationických antimikrobiálních látek (KAL), se zaměřením na jejich interakci s biologickými membránami a strukturálními faktory ovlivňujícími selektivitu a účinnost. KAL představují slibnou alternativu k tradičním antibiotikům, zejména v kontextu narůstající antibiotické rezistence. Jejich mechanismus účinku je založen na cílené elektrostatické interakci s negativně nabitou cytoplazmatickou membránou mikroorganismů, což umožňuje rychlé narušení membránové integrity a vyřazení patogenu z metabolického provozu.

Z provedené rešerše vyplývá, že biologická aktivita KAL není dána izolovanými vlastnostmi (např. pouze kationicitou), ale vzniká jako výsledek interakce více parametrů: kationického náboje, úrovně hydrofobicity, prostorového uspořádání a flexibility molekuly. Tyto faktory ovlivňují jak afinitu k membráně, tak i typ výsledné poruchy (např. modely „carpet“, „toroidal pore“ nebo „barrel-stave“).

Zásadní význam má také struktura cílové membrány – především poměr anionických fosfolipidů a přítomnost dalších membránových komponent (např. LPS, mykolové kyseliny, steroly). Ukazuje se, že membránová selektivita je důležitější než samotná molekulová toxicita. Schopnost navrhovat látky s afinitou k mikrobiálním membránám, které zároveň minimálně interagují s eukaryotními buňkami, představuje klíčový rozdíl mezi úspěšnými a neúspěšnými KAL.

Výsledky rešerše také ukazují, že přístup založený na vývoji univerzálních AMP je překonaný. Moderní směr vývoje spočívá v cíleném molekulovém návrhu, který zohledňuje jak strukturu cílového patogenu, tak vlastnosti membránových systémů. Tento přístup je potvrzen příklady jako LEGO-lipophosphonoxiny, které demonstrují možnost přesného ladění hydrofobních segmentů, náboje a struktury molekuly za účelem dosažení vysoké selektivity a stability.

Znalost fyzikálně-chemických vlastností membrán tedy nepředstavuje pouze doplňující informaci, ale aktivní návrhový nástroj. Budoucnost vývoje KAL tak spočívá ve spojení biofyzikální analýzy s racionálním molekulárním designem, který respektuje konkrétní membránové prostředí cílových mikroorganismů.

LITERATURA

- BRADSHAW, J. P. 2003. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *BioDrugs*.
- CHEN, Y. et al. 2013. HBcARD peptide exhibits broad-spectrum antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- CRYZ, S. J. et al. 1984. Experimental efficacy of lipopolysaccharide-outer membrane protein vaccines. *Infection and Immunity*.
- DO PHAM, T. et al. 2022. LEGO-lipophosphonoxins: a novel approach in designing membrane targeting antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- EPAND, R. M. & EPAND, R. F. 2009. Lipid clustering by cationic antimicrobial peptides: a charge cluster mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- HANCOCK, R. E. W. & SAHL, H.-G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*.
- HARRIS, H. & PERCIVAL, E. 1956. The antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk. *Nature*.
- HIRSCH, J. G. 1958. Bactericidal action of histone. *Journal of Experimental Medicine*.
- JANGRA, M. et al. 2019. Tridecaptin M affects proton kinetics in ATP synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- JONES, R. N. 1930. Isolation of lactenin, an antimicrobial peptide from milk. *Journal of Dairy Science*.
- KAPLAN, J. B. 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J. & COLLINS, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*.
- MAHLAPUU, M. et al. 2016. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- MATSUZAKI, K. 1999. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? *Biochemical Society Transactions*.
- MECHLER, A. et al. 2014. Specific and selective antimicrobial activity of designed peptides. *Biophysical Journal*.
- MOOKHERJEE, N. et al. 2021. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- NAGY, I. et al. 2015. Distinct mechanisms for the antimicrobial effects of NCR peptides revealed by atomic force microscopy. *Genes, Brain and Behavior*.
- PAPO, N. & SHAI, Y. 2003. Exploring peptide membrane interaction using designed helical amphipathic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*.

- PERCIVAL, E. 1956. The antibacterial activity of histones. *Nature*.
- PHAM, T. T. et al. 2022. Antimicrobial peptides: a new frontier in antifungal therapy. *Journal of Fungi*.
- POIREL, L., JAYOL, A. & NORDMANN, P. 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*.
- PRAŽÁK, F. et al. 2022. Stability and selectivity of amphiphilic lipopeptides: correlation of activity and structural integrity. *ChemBioChem*.
- SAHL, H.-G. et al. 2006. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *Journal of Leukocyte Biology*.
- SILHAVY, T. J., KAHNE, D. & WALKER, S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- SITARAM, N. & NAGARAJ, R. 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- SPITZNAGEL, J. K. 1961. Antibacterial effects associated with changes in bacterial cytology produced by cationic polypeptides. University of North Carolina.
- TAKAHASHI, D. et al. 2013. Structural determinants of host defense peptides. *Biochimie*.
- TRIMBLE, M. J. et al. 2022. Polymyxins: alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- VENKATESH, M. P. et al. 2017. Antimicrobial activity and cell selectivity of synthetic and biosynthetic cationic polymers. *International Journal of Molecular Sciences*.
- ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*.