

Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta



Autoreferát disertační práce

Antimikrobiální, cytotoxické a antiproteinázové  
vlastnosti stříbra používaného pro léčbu  
chronických infikovaných ran

Mgr. Vojtěch Pavlík

2021

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor, předseda oborové rady:  
Fyziologie a patofyziologie člověka,  
prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště:

Dermatovenerologická klinika,  
3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Autor: Mgr. Vojtěch Pavlík

Školitel: doc. MUDr. Monika Arenbergerová, Ph.D.

Školitel konzultant (byl-li): -

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne                      v                      hod.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě  
3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

## Souhrn

Chronické rány představují závažný socio-ekonomický problém. Příčin, proč se rána zcela nezhojí nebo je hojení protrahované, je celá řada. Jedním z významnějších důvodů je infekce rány. V důsledku bakteriální infekce jsou také zvýšené hladiny proteináz, které degradují mezibuněčnou hmotu.

Kvůli snížení bakteriální nálože jsou chronické rány ošetřovány antiseptiky. To jsou antimikrobiální látky působící převážně nespecifickými mechanismy. Tato neselektivita představuje výhodu, ale i nevýhodu. Kromě bakterií jsou antiseptiky zasaženy i hostitelské buňky v ráně. Poškození oněch hostitelských buněk však komplikuje zacelení rány. Toto nespecifické poškození eukaryotických i prokaryotických buněk je způsobeno i pravděpodobně nejrozšířenějším antiseptikem v léčbě chronických ran – stříbrem.

Disertační práce se komplexně věnuje efektům, které stříbro vyvolává v *in vitro* kontextu co nejrelevantnějšímu chronické ráně. Byly srovnávány vlastnosti čtyř komerčně dostupných krytů chronických ran obsahujících stříbro. Sledovali jsme jejich antimikrobiální působení a cytotoxicitu. Bylo také změřeno množství stříbra obsaženého v jednotlivých krytech. Zjistili jsme, že množství stříbra neodpovídá přímo jeho antimikrobiální aktivitě. Také v míře cytotoxicity byly pozorovány rozdíly. Ukázali jsme, že stříbro z krytů proniká do prasečí dermis *ex vivo*. S průnikem stříbra do kůže byl spjat i nárůst DNA poškození a genové exprese charakteristické pro stresovou odpověď. Ukázali jsme, že stříbro má schopnost snižovat prozánětlivou odpověď neutrofilů (u monocytů se efekt neprojevil), ovšem za cenu jejich buněčné smrti.

V lidských chronických ranách byla sledována distribuce stříbra po dvou a šesti týdnech léčby komerčně dostupným krytem se stříbrem. Stříbro bylo nalezeno v makrofázích, asociované s mezibuněčnou hmotou a okolo kapilár. Vedle krytu se stříbrem bylo na ránu aplikováno také krytí obsahující antiseptikum oktenidin dihydrochlorid a kyselinu hyaluronovou. Na histologické úrovni bylo zjištěno, že se rány hojily rychleji krytem obsahujícím oktenidin a kyselinu hyaluronovou. Rovněž byla spodina ran méně povleklá při použití krytu s oktenidinem a hyaluronanem. Genová exprese metalothioneinů byla zvýšená v částech ran léčených stříbrným krytem.

Antiproteinázová aktivita antiseptik stříbra, oktenidinu, chlorhexidinu a jódu proti eukaryotickým a prokaryotickým proteinázám byla sledována pomocí želatinové zymografie a fluorogenní metody. Všechna čtyři antiseptika snížila v závislosti na dávce aktivitu sledovaných proteináz. Rozdíl mezi antiseptiky byl patrný u snížení aktivity endogenních proteináz v prasečí kůži. Nejvíce inhibovalo proteinázy stříbro, poté chlorhexidin, jód a poté oktenidin. Tyto výsledky odrážejí zřejmě schopnost antiseptik pronikat skrz mezibuněčnou hmotu.

Stříbro proniká do ran a má více než jen antimikrobiální aktivitu. Při jeho předepisování je na místě obezřetnost a volba expozice rány jen po nezbytně nutnou dobu, případně volba jiného antiseptika s příznivějšími vlastnostmi (např. oktenidin dihydrochloridu).

## Summary

Chronic wounds pose a socioeconomic problem and burden to patients worldwide. There are several causes of wound chronicity. One of the major issues of the non-healing state of a wound is its infection, which raises proteolytic activity in the wound.

Antiseptics are used to lower the bacterial burden in chronic wounds. Antiseptics exert a nonspecific mode of action, which may be their asset as well as drawback. Apart from bacteria, host cells are caught in the crossfire as antiseptics may also damage eukaryotic cells. Silver, one of the most favourite antiseptics on the wound-healing market, is also suspected of inducing nonspecific damage to eukaryotic and prokaryotic cells.

This doctoral thesis is aimed at investigating the multitude of effects that silver may exhibit. Four commercially available wound healing dressings impregnated with silver were compared side-by-side. The antimicrobial properties of the dressings, as well as their cytotoxicity were investigated. The silver content in the dressings or dressing extracts was evaluated with ICP-OES. We observed that the antimicrobial activity did not directly correspond to silver content.

Similarly, the dressing extracts differed in their cytotoxic effect. We showed that silver penetrated the porcine dermis and caused DNA damage and the upregulation of stress-response genes. We showed that silver may decrease proinflammatory response of neutrophils (in contrast to monocytes) caused by cell death.

We investigated the distribution of silver in chronic human wounds treated with a silver dressing and a dressing with octenidine in different parts. Silver was observed in macrophages, as well as associated with ECM and capillaries. The wounds healed faster under the dressing with octenidine, where inflammation receded faster, and collagen matured more prominently. Wound slough decreased more prominently in the parts treated with the dressing with hyaluronan and octenidine. The gene expression of metallothioneins was increased in the parts of the wounds treated with the silver dressing.

The antiprotease activity of silver lactate, octenidine dihydrochloride, chlorhexidine digluconate and povidone-iodine was evaluated using gelatin zymography and a fluorogenic method. All four antiseptics decreased protease activity dose-dependently. The antiseptics inhibited endogenous proteases in porcine skin. The proteases were inhibited by silver, chlorhexidine > iodine > octenidine.

Silver penetrates into wounds and exerts more than just antimicrobial activity. The prescription of wound healing dressings with silver should be limited to the necessary period only, or dressings with other antiseptics (octenidine dihydrochloride) should be considered

# Obsah

1. ÚVOD.....	6
1.1. Chronická kožní rána .....	6
1.2. Antiseptika .....	6
1.3. Stříbro v léčbě chronických ran .....	6
1.4. Oktenidin – antiseptikum používané v léčbě chronických ran .....	7
1.5. Zvýšená proteolytická aktivita v chronických ranách.....	7
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	8
3. MATERIÁL A METODIKA.....	9
1.6. Testované bandáže .....	9
1.7. Příprava výluhů bandáží.....	9
1.8. Kultivace kůže ex vivo .....	9
1.9. Imunohistologické a histologické barvení.....	9
1.10. Protokol in vivo studie.....	10
1.11. Histologické hodnocení .....	10
1.12. Zdroje proteináz.....	11
1.13. Zymografie in situ .....	11
2. VÝSLEDKY .....	12
2.1. Antimikrobiální účinnost studovaných bandáží .....	12
2.2. Srovnání cytotoxicity různých stříbrných krytů in vitro .....	12
2.3. DNA poškození vlivem stříbrných krytů .....	13
2.4. Genová exprese stresových genů vyvolaná stříbrnými kryty.....	15
2.5. Distribuce stříbra v chronických ranách.....	15
2.6. Srovnání hojení v částech léčených OCT-HA a Ag-CMC .....	16
2.7. Vliv stříbra na aktivitu proteináz in vitro .....	19
2.8. Vliv stříbra na aktivitu proteináz ex vivo.....	20
4. DISKUZE .....	22
2.9. In vitro a ex vivo antimikrobiální a cytotoxické efekty stříbra .....	22
2.10. Stříbro v chronických ranách.....	23
2.11. Vliv stříbra a jiných antiseptik na proteinázy .....	24
5. ZÁVĚRY .....	26
6. POUŽITÁ LITERATURA .....	28
7. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	33
2.12. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace .....	33
2.13. Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace.....	33

# 1. ÚVOD

## 1.1. Chronická kožní rána

Chronické rány zůstávají nezhojené déle než čtyři týdny (Pospíšilová nedatováno). Mají původ v řadě příčin, například venózní, arteriální, infekční, hypertenzní, *trombangiitis obliterans*, atrophie blanche, krevní poruchy, neuropatie, autoimunní, metabolické (diabetické), tlakové (dekubity), arteficiální, nádorové nebo vrozené defekty (Pospíšilová nedatováno).

Chronické rány se dělí podle etiologie na *ulcus cruris venosum*, *ulcus cruris arteriosum*, dekubitus, diabetický vřed, chronickou posttraumatickou ránu, chronickou ránu způsobenou zářením nebo nádorem (Pokorná a Mrázová 2012). U některých ran hovoříme o smíšené etiologii.

## 1.2. Antiseptika

Jedním z komplikujících faktorů hojení rány jsou bakterie. Pro léčbu infekce v chronických ranách roste použití antiseptik. Jedná se prakticky o návrat antiseptik, která se používala před objevením antibiotik. Mezi ně patří stříbro, jód a chlornany. Došlo k vylepšení forem těchto antiseptik, což zlepšilo jejich využitelnost. Komplexace jódu do polyvinylpyrolidonu (PVP-I) vedla k prodloužení uvolnění jódu. Vytvořením nanočástic stříbra došlo k jejich zvýšené antimikrobiální účinnosti, stejně tak byla zvýšená antimikrobiální účinnost v kombinaci antibiotika sulfadiazinu se stříbrem (SSD). U chlornanů (kyseliny chlorné) bylo dosaženo stabilizace v roztoku pro praktické použití. Kromě toho byla objevena jiná, dnes běžná antiseptika jako chlorhexidin diglukonát, oktenidin dihydrochlorid, polyhexamethylen biguanid (PHMB), triklosan a další (McDonnell a Russell 1999).

Nicméně ne všechna dostupná antiseptika jsou doporučována pro léčbu chronických ran (Kramer et al. 2018). Všechna mohou vyvolat podráždění kůže. Nicméně některá z nich (chlorhexidin, PHMB) byla spojována se zvýšeným výskytem kontaktní alergické dermatitidy (Lachapelle 2014). Vůči několika antiseptikům (stříbro, triklosan, chlorhexidin, kvarterní amoniové soli) byla nalezena bakteriální rezistenci, kdežto u jiných to nebylo pozorováno (PVP-I) (Lachapelle et al. 2013).

## 1.3. Stříbro v léčbě chronických ran

Stříbro bylo empiricky používáno jako antimikrobiální látka po tisíciletí. Dnes jsou jím ošetřovány povrchy řady materiálů, které mají plnit také antimikrobiální funkci. Takovou skupinou materiálů jsou i kryty ran. Stříbro je účinné proti širokému spektru aerobních, anaerobních, gramnegativních i grampozitivních bakterií (Barnea et al. 2010; McShan et al. 2014).

Kvůli nesespecifickému mechanismu účinku je stříbro (a v různé míře i jiná antiseptika) toxické pro hostitelské buňky (např. fibroblasty, keratinocyty, a leukocyty) (Punjataewakupt et al. 2019). Stříbro je těžký kov, který se v organismu vyskytuje normálně pouze ve stopovém množství, a není organismem odbouráváno.

Stříbro může pronikat skrz porušenou kůži. Pacienti léčení kryty obsahujícími stříbro měli zvýšenou hladinu stříbra v krevním séru, ale i v játrech, ledvinách a jiných orgánech. (Rigo et al. 2013; Coombs et al.

1992; Hadrup et al. 2018a). U pacientů s popáleninami se hladina stříbra v krevním séru pohybovala podle velikosti popálené a léčené plochy od 2 do více jak 200 µg/l (Coombs et al. 1992).

Studií ukazujících distribuci stříbra v lidské chronické ráně je velmi málo. V nedávné studii ukázal Roman a kol. distribuci stříbra a jeho kolokalizaci (na co se pravděpodobně váže) v chronických ranách čtyř pacientů (Roman et al. 2020).

#### *1.4. Oktenidin – antiseptikum používané v léčbě chronických ran*

Relativně nové antiseptikum oktenidin, který představuje kationickou, povrchově aktivní látku, je používán také při léčbě chronických ran (Hübner et al. 2010). Oktenidin narušuje bakteriální buněčné membrány skrze destabilizaci fosfolipidů (Kodedová et al. 2011; Malanovic et al. 2020). Buněčná smrt vyvolaná oktenidinem nastává jiným mechanismem než u stříbra. Oktenidin je efektivní vůči rezistentním bakteriím (MRSA, VRE) dokonce i když jsou v biofilmovém fenotypu (Günther et al. 2021). Oktenidin je považován za bezpečné antiseptikum, nevyvolává poškození kůže v předčasně narozených novorozencích, ani nevyvolává nežádoucí efekty při aplikaci do chronické rány (Bührer et al. 2002; Vanscheidt et al. 2012). Oktenidin navíc vykazuje nízkou penetraci skrz kůži v *ex vivo* podmínkách (Stahl et al. 2011).

#### *1.5. Zvýšená proteolytická aktivita v chronických ranách*

Dalším faktorem komplikujícím hojení chronických ran je kromě bakterií zvýšená proteolytická aktivita proteináz (především matrix metaloproteináz, MMPs). Aby mohlo hojení zdárně pokračovat, nadměrná proteolytická aktivita musí klesnout (Rayment et al. 2008). V nedávné metaanalýze byla zvýšená aktivita proteináz nebo zvýšený poměr proteináz k inhibitorům proteináz spojený se statisticky významným zhoršením hojení chronických ran (Westby et al. 2020). Naopak zvýšené množství inhibitorů proteináz bylo spojeno se zlepšeným hojením chronických ran. Kromě proteináz produkovaných pacientovými buňkami, přispívají ke zvýšené proteolytické aktivitě v ráně bakterie, které produkují své proteinázy. Bakteriální proteinázy mohou synergicky s hostitelskými proteinázami přispívat k degradaci nově vytvořené granulační tkáně a růstových faktorů (McCarty a Percival 2013).

Byly vyvinuty kryty zaměřené na snížení aktivity hostitelských metaloproteináz a serinových proteináz (např. neutrofilové elastázy a kathepsinu G). Toho je možné dosáhnout nespécifickou vazbou proteinázy na bandáž (McCarty et al. 2015) nebo zakomponování alternativní štěpitelné “návnady” ve formě kolagenového substrátu (Kloeters et al. 2016). Bylo ukázáno, že jód inhibuje ranové proteinázy (Eming et al. 2006) a chlorhexidin inhibuje matrix metaloproteinázy (Trufello et al. 2014).

## 2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Stříbro je používáno v různých formách v řadě komerčně dostupných krytů k léčbě chronických kožních ran, protože má prokázané antimikrobiální účinky. Tyto účinky nejsou specifické pro bakterie, postihují i eukaryotické buňky. To může vést ke zbrzdění hojení rány, v závislosti na řadě jiných okolností, například zda stříbro prochází do rány. Část efektů stříbra je dána jeho vazbou na proteiny, jejichž funkce je tím narušena. Kvůli nespecifické interakci stříbra s proteinázami může dojít k ovlivnění aktivity těchto enzymů. Byly proto stanoveny následující hypotézy (H) a z nich vycházející cíle (C).

H1: Stříbro z krytů používaných pro léčbu chronických ran se bude projevovat antimikrobiálně a cytotoxicky.

C1: Sledovat, zda se liší cytotoxicita stříbra v závislosti na jeho antimikrobiální účinnosti.

C2: Detekovat, jestli stříbro proniká do dermis a jestli zde dochází k cytotoxickým efektům.

H2: Bude pozorován rozdíl v hojení chronické rány léčené z části krytem se stříbrem a z části krytem s oktenidinem.

C1: Určit distribuci stříbra v chronické ráně během jejího hojení.

C2: Sledovat základní parametry hojení – granulaci a zánět a porovnat mezi sebou části ran léčené rozdílnými kryty.

H3: Stříbro bude snižovat aktivitu proteináz relevantních pro hojení chronických ran.

C1: Určit aktivitu lidských a bakteriálních proteináz za přítomnosti stříbra i jiných antiseptických látek *in vitro*.

C2: Zjistit, zda stříbro může inhibovat endogenní proteinázy v kůži *ex vivo*.



### 3. MATERIÁL A METODIKA

Plné znění metod a materiálů je k dispozici v disertační práci nebo v publikacích, z nichž tato práce vychází (Pavlík et al. 2019; Nešporová et al. 2020; Pavlík et al. 2021). Zde jsou uvedeny především metody, které nejsou běžně používány a jsou specifické pro pochopení výsledků.

#### 1.6. Testované bandáže

Byly porovnány tyto bandáže obsahující stříbro: Acticoat (Smith&Nephew, Velká Británie; zkratka užívaná v této práci je Ac), Aquacel Ag+ Extra (Convatec, Velká Británie; zkráceno zde jako Aq), Silvercel Hydro-Alginate (Systagenix, Velká Británie; zkratka užívaná v této práci je Sc) a Ialugen Plus (IBI, Česká republika; zkratka užívaná v této práci je Ia).

Ostatní chemikálie byly zakoupeny od Sigma–Aldrich (St. Louis, USA), pokud není uvedeno jinak.

#### 1.7. Příprava výluhů bandáží

V několika testech bylo nutné sledovat efekty výluhů z krytů, protože nebylo možné použít pevnou formu samotných krytů. Tyto výluhy byly připraveny z fyziologického roztoku (0,9% (w/v) NaCl) nebo kultivačního média s 10% fetálním bovinním sérem (FBS). Na 4 ml roztoku byl přidán 1 cm<sup>2</sup> krytu. Luhování probíhalo po 72 hodin při pokojové teplotě za neustálého třepání. Extrakty byly sterilizovány průchodem přes 0,2 µm filtr a uchovány při 4 °C.

#### 1.8. Kultivace kůže *ex vivo*

Uši z vepřů (zdroj Bocus, viz výše) byly zpracovány čerstvě po porážce (1-2 hod), což se ukázalo kritické pro opakovatelnost experimentu. Uši byly důkladně omyty mýdlem a roztokem Betadine (Egis Pharma, Maďarsko) a opláchnuty vodou. Z vnitřní strany boltců byly vyříznuty kousky kůže (1×1 cm) a inkubovány v antibiotickém roztoku (penicilin-streptomycin, 10 000 U/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin) 30 min při 37 °C za atmosferického obsahu O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>. Vzorky s ponechanou epidermis byly inkubovány dermální stranou vzhůru v šestijamkových kultivačních destičkách s 3 ml NHDF růstového média s 10% FBS. Na kůži byly vloženy čtverečky testovaných krytů nebo gázy o velikosti 1×1 cm. Ke zvlhčení čtverečků bylo použito 300 µl kultivačního média. Vzorky byly inkubovány po 24 nebo 48 h. Následně byla kůže opláchnuta v PBS a každá kůže byla roztřetěna. První část byla vložena do 4% paraformaldehydu a uchovávána při 4 °C, druhá část určená pro analýzu Westernovým přenosem byla šokově zmrazena v tekutém dusíku a poslední část sloužící pro analýzu genové exprese byla inkubována přes noc při 4 °C v roztoku RNAlater (Thermo Fisher Scientific) a následně uchovávána při -80 °C.

#### 1.9. Imunohistologické a histologické barvení

Pro barvení stříbra byla použita stříbrná autometalografie (Danscher et al. 1994). Marker DNA poškození γH2AX byl detekován imunofluorescencí (1:1000, ANTI-PHOS-HIST H2A.X S139, klon JBW301,

Millipore, MA, USA). Inkubace se sekundární protilátkou probíhala po dobu 1 h (1:10 000, ab150114, Abcam, Cambridge, Velká Británie).

### *1.10. Protokol in vivo studie*

Po debridementu byla rána každého pacienta pomyslně rozdělena na dvě části, které byly randomizovány pro léčbu. Rány byly léčeny krytem OCT-HA (Sorelex, Contipro a.s, Dolní Dobruč, Czech Republic) a Ag-CMC (Aquacel Ag+, Convatec, Berkshire, Velká Británie). Oba kryty byly kryty sekundárním obvazem – sterilní gázou, který byl měněn každý den. Bylo ověřeno, že se primární kryty nemohou v rámci rány pohybovat mimo určenou oblast, a tak potenciálně ovlivnit hojení ran mimo zamýšlenou oblast rány. Posunutí krytu bylo méně pravděpodobné také proto, že byli pacienti hospitalizováni během celé léčby. Procentuální pokryv rány povlakem byl určen 0., 2., 4. a 6. týden léčby. Pomocí bioptického průbojníku (4 mm, Kai Medical, Seki, Japonsko) byly odebírány vzorky rány po lokálním umrtvení (1,8 mL roztoku Marcaine 5 minut před odběrem) v 0., 2. a 6. týdnu. Biopsie byly odebírány co nejdále od části léčené druhým krytem, aby bylo předcházeno vzájemnému ovlivnění pozorovaných veličin. Stříbrá autometalografie vzorků z OCT-HA části ran potvrdila, že stříbro z Ag-CMC krytu neprosáklo do částí léčených OCT-HA. Biopsie byly odebírány minimálně 3 cm od místa předchozí biopsie, aby byl minimalizován možný efekt způsobený hojením blízkého odběrového místa. Odběr biopsií z rány neovlivnilo celkové hojení (Panuncialman et al. 2010). Přesto byla místa po odběru biopsií sledována, jestli v nich nedocházelo ke komplikacím hojení.

### *1.11. Histologické hodnocení*

Následující parametry byly hodnoceny histopatologem, jemuž nebylo známo, které vzorky patří ke které léčbě pomocí mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

Histopatologické skóre bylo určeno součtem šesti parametrů (Tabulka 1). Parametry 1 až 4 byly hodnoceny ve vzorcích barvených hematoxylinem a eosinem, parametry 5 a 6 byly hodnoceny ve vzorcích barvených Massonovým trichromem. Stav hojení podle histologie je možno rozdělit podle skóre do třech kategorií jako horší (6–11), střední (12–15), nebo dobrý (16–20).

**Tabulka 1.** Histopatologické skóre podle Sultany a kol. (Sultana et al. 2009). Tyto parametry byly použity k hodnocení biopsií ran sedmi pacientů, kteří dokončili studii, histologem neobeznámeným s přiřazením vzorků k experimentálním skupinám.

Parametr	Semikvantitativní skóre
1 - Množství granulační tkáně	1 – vysoké, 2 – střední, 3 – ojediněle, 4 - nepřítomno
2 - Zánětlivý infiltrát	1 – vysoké, 2 – střední, 3 – malé množství buněk
3 - Orientace kolagenních vláken	1 – vertikální, 2 – smíšená, 3 - horizontální
4 - Vzor kolagenních vláken	1 – retikulární, 2 – smíšený, 3 - snopcovitý
5 - Množství časného kolagenu	1 – značné, 2 – střední, 3 – minimální, 4 - nepřítomný
6 - Množství pozdního kolagenu	1 – značné, 2 – střední, 3 – minimální

Míra povlaku rány byla hodnocen v řezech barvených hematoxylin-eozinem na semikvantitativní škále jako 1 – vysoká, 2 – střední, 3 – nízká, 4 – fokální, 5 – nepřítomná. Stupně 1–3 představovaly povlak, který pokrýval celou spodinu rány v hodnoceném vzorku.

### 1.12. Zdroje proteináz

Izoláty z lidských chronických ran bakterií druhů *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* a *Serratia liquefaciens* byly použity jako zdroje proteináz (Kucera et al. 2014). Bakterie byly inokulovány do Boltonova média (Merck Life Science, Německo) s 2% želatinou (Thermo Fisher Scientific, USA) a kultivovány přes noc (37 °C, 150 rpm). Kultury včetně média byly dvakrát zamrazeny a rozmrazeny a byl tak získán supernatant obsahující bakteriální proteinázy.

Lidské neutrofile byly izolovány z periferní krve na Ficoll-Paque gradientu (Merck Life Science, Německo) podle protokolu výrobce a následně lyzovány dvěma cykly zmrazení a rozmrazení. Lyzát byl centrifugován (2000 g, 10 min) a byl použit supernatant. Keratinocytární a fibroblastové proteinázy byly indukovány použitím UV-B a následně bylo použito kultivační médium.

### 1.13. Zymografie in situ

Vzorky prasečí kůže inkubované s antiseptiky ve Franzových celách s antimikrobiálními látkami nebo proteinázovými inhibitory byly opláchnuty v PBS, fixovány v zinkovém pufru a zpracovány podle postupu popsanému v jiném článku (Hadler-Olsen et al. 2010). Kryořezy byly inkubovány s DQ želatinou jakožto fluorescenčním substrátem po 1 h při 37 °C nebo při -20 °C (kontrola nespecifického barvení). Řezy byly následně skenovány fluorescenčním mikroskopem (Eclipse-Ti, Nikon, Japan). Intenzita fluorescence byla změřena ve čtverci o definovaném rozměru v programu Fiji. Průměrná intenzita fluorescence pro každou experimentální skupinu (n = 4) byla porovnána s kontrolou ovlivněnou PBS (n = 4).

## 2. VÝSLEDKY

V této práci jsme sledovali čtyři zástupce komerčně dostupných krytů chronických ran se stříbrem - Aquacel Ag Hydrofiber (Aq), Acticoat (Ac), Ialugen (Ia) a Silvercel Hydroalginate (Sc). Jen někteří výrobci uvedli množství stříbra v bandážích. Toto bylo zveřejněno jen pro Aq a Ia, které obsahovaly shodně 0,12 mg Ag na 1 cm<sup>2</sup> krytu. Proto jsme určili množství stříbra v Ac a Sc pomocí ICP-OES (Nešporová et al. 2020).

### 2.1. Antimikrobiální účinnost studovaných bandáží

Antimikrobiální účinek krytů proti běžným patogenům ran – *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* – byl testován nejprve difúzní metodou na agaru. Okolo všech krytů se stříbrem se vytvořily zóny inhibice bakteriálního růstu (Nešporová et al. 2020). Ia vytvořil největší inhibiční zónu. Žádné větší rozdíly mezi efektivitou vůči gram pozitivnímu *S. aureus* a gramnegativní *P. aeruginosa* jsme nepozorovali.

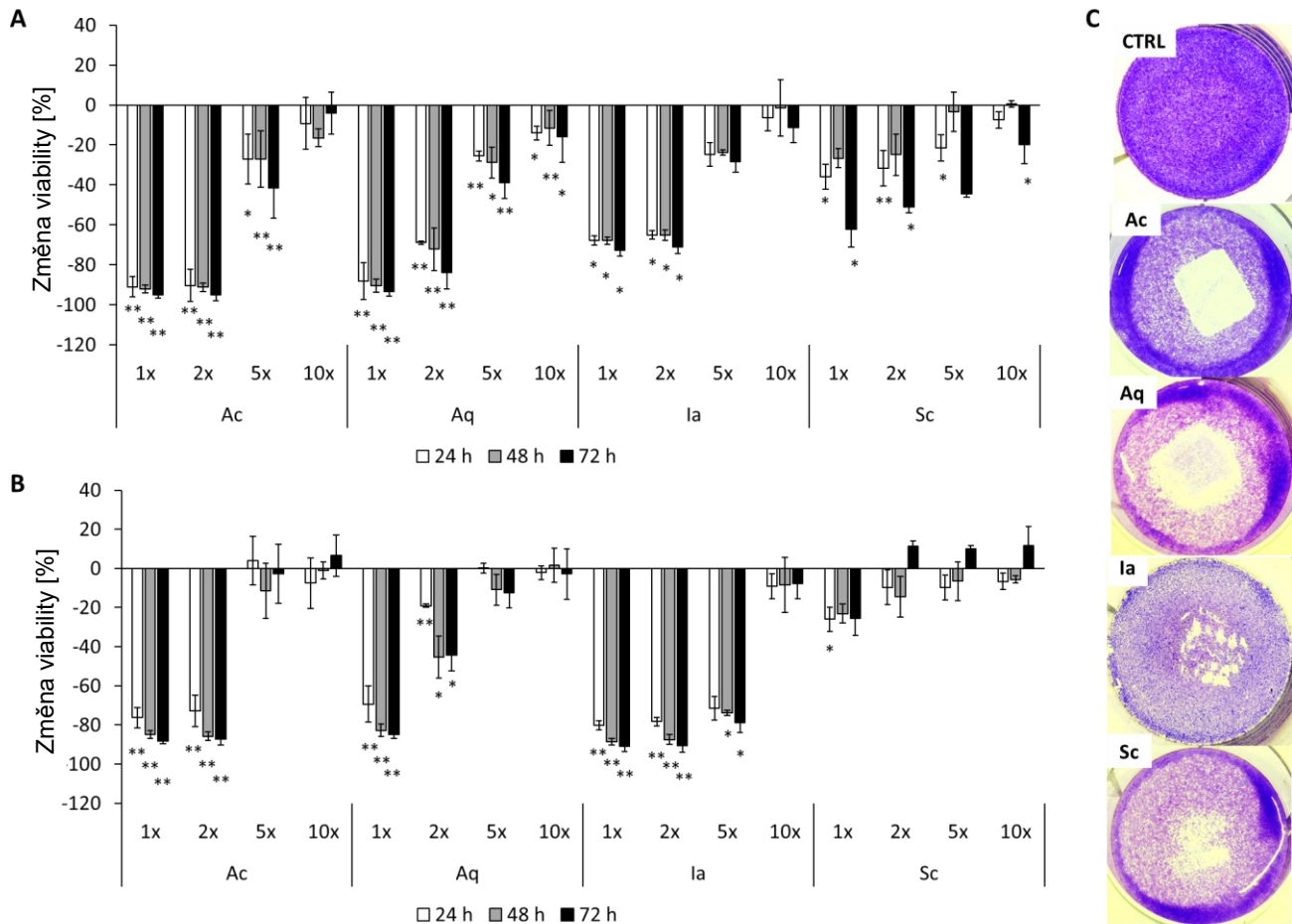
Bandáže byly extrahovány do média s FBS. Minimální inhibiční koncentrace daného extraktu byla ta, jež dokázala zabránit viditelnému růstu bakterií. Tabulka 2 ukazuje, že antimikrobiální efekty extraktů krytů odpovídají do jisté míry množství stříbra, které se do média extrahovalo. Výjimkou je Aq. Extrakt Sc byl antimikrobiálně stejně účinný jako Aq, ale Aq extrakt obsahoval pětikrát více stříbra. Sc byl ale méně cytotoxický než Aq. Výluhy z Ia a Ac inhibovaly růst bakterie *S. aureus* a byly dvakrát účinnější než Sc nebo Aq proti *P. aeruginosa*. Ia obsahující dvakrát větší množství stříbra než Ac byl stejně antimikrobiálně účinný jako Ac.

**Tabulka 2.** Minimální inhibiční koncentrace (MIC) stříbra vyluhovaného z krytů. Kryty byly inkubovány tři dny v DMEM médiu s 10% FBS. MIC byla stanovena dilučním testem. Tabulka ukazuje ředění extraktu, které bylo účinné v prevenci růstu bakterií. V závorkách jsou uvedena množství stříbra odpovídající MIC určená dle ICP-OES.

Kryt	MIC ředění eluátu (odpovídající koncentraci Ag v µg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Aq	- (>18,1 ± 5,6)	1× (18,1 ± 5,6)
Ac	1× (21,8 ± 4,4)	2× (10,9 ± 2,2)
Sc	- (>3,5 ± 0,4)	1× (3,5 ± 0,4)
Ia	1× (45,9 ± 23,0)	2× (22,95 ± 11,5)

### 2.2. Srovnání cytotoxicity různých stříbrných krytů in vitro

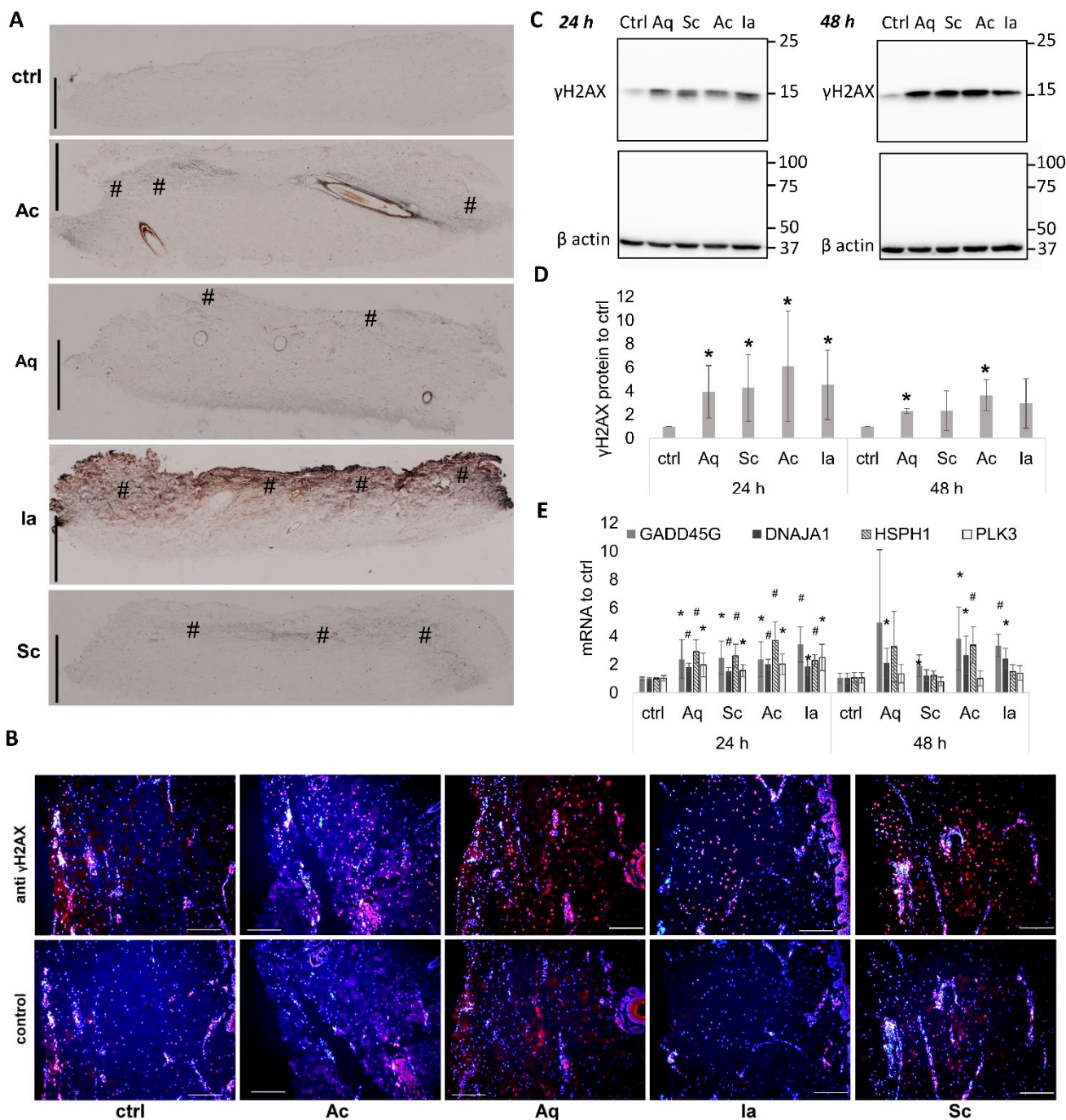
Dále jsme určili cytotoxicitu stříbra z krytů vůči primárním lidským dermálním fibroblastům (NHDF) a lidské linii keratinocytů HaCaT. Nejprve byla stanovena cytotoxicita stříbra eluovaného do média s FBS pomocí MTT testu, Obrázek 1. Všechny testované extrakty krytů byly statisticky významně ( $p < 0,05$ ) toxické vůči HaCaT keratinocytům v pořadí od nejtoxičtějšího: Aq ≈ Ac > Ia > Sc. Toxicita se u fibroblastů projevila statisticky významně pro extrakty z Aq, Ac a Ia, zatímco Sc byl toxický v menší míře po 24hodinové inkubaci. Pořadí toxicity pro fibroblasty bylo: Ia > Ac > Aq > Sc.



**Obrázek 1.** Cytotoxicita a kontaktní inhibice vyvolaná stříbrnými kryty. Změna viability HaCaT keratinocytů (A) nebo NHDF fibroblastů (B) po 24, 48 a 72 hodinách ovlivnění buněk výluhy bandáží pomocí MTT testu. Výluhy byly používány neředěné (1×) až 10× ředěné. Sloupce ukazují průměry ze třech nezávislých opakování  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . (C) Kontaktní inhibice buněk linie HaCaT po šestihodinové inkubaci s 1 cm<sup>2</sup> bandáže. Bílá místa jsou v místě mrtvých buněk. Obrázky ilustrují výsledek ze třech nezávislých opakování.

### 2.3. DNA poškození vlivem stříbrných krytů

Dále bylo sledováno, jestli stříbro proniká do dermis a může zde vyvolat DNA poškození a stresovou odpověď. Kožní explantáty prasečí kůže se zachovalou epidermis (její odstranění by samo o sobě mohlo vyvolat buněčný stres) byly kultivovány dermální stranou nahoru s přiloženou testovanou bandáží po 24 nebo 48 h. Poté byla část kůže zpracována na histologické hodnocení. Jak ukazuje detekce stříbra pomocí stříbrné autometalografie, stříbro bylo přítomno převážně v dermálních částech explantátů, které byly v kontaktu s bandáží (horní část histologických snímků), viz Obrázek 2. Avšak intenzita barvení stříbra se značně lišila mezi jednotlivými kryty. Nejvyšší míra stříbrného signálu byla patrná u Ia, dále pak u Ac. Aq a Sc vykazovaly podobnou hladinu, která byla vyšší než u kontroly. Toto pořadí intenzity signálu stříbra zhruba odpovídalo i množství stříbra detekovaného pomocí ICP-OES u kůží inkubovaných s kryty ve Franzových celách. Autometalografie může ale zvýraznit signál u stříbrných solí (např. SSD v Ia) než u stříbrných nanočástic, protože při stejném množství stříbra může být stříbrná sůl rozprostřena rovnoměrněji.



**Obrázek 2.** DNA poškození v prasečí kůži *ex vivo* vlivem inkubace s bandážemi obsahujícími stříbro. Kůže byla inkubována se stříbrnými bandážemi nebo gázou (kontrola) po 24 nebo 48 h. (A) Průřez vzorky ukazující pronikání stříbra detekovaného stříbrnou autometalografií. Kryty byly umístěny na dermální stranu kůže (horní okraj snímků kůží) a inkubovány 24 h. Hnědočerné zabarvení ukazuje stříbro proniklé do kůže. Lokálně zvýšené barvení stříbra je označeno (#). Měřítka odpovídá 1 mm. (B) První řada snímků ukazuje  $\gamma$ H2AX (červeně) barvení v kůži ovlivněné 24 h stříbrnými kryty. Spodní řada ukazuje odpovídající části kůže bez primární protilátky. Na všech snímcích jsou vidět jádra barvená DAPI (modrá). Měřítka odpovídají 200  $\mu$ m. (C) Reprezentativní Western blot  $\gamma$ H2AX a  $\beta$  aktinu. (D) Graf znázorňující průměrné množství ( $\pm$  SD)  $\gamma$ H2AX ze šesti nezávislých opakování. \* $p < 0,05$ , Studentův t-test vzhledem ke kontrole v příslušném čase. (E) Relativní exprese genů GADD45G, DNAJA1, HSPH1 a PLK3 v kůžích ovlivněných 24 nebo 48 h stříbrnými kryty. Graf ukazuje průměr  $\pm$  SD ze šesti nezávislých opakování, přičemž \* $p < 0,05$ , # $p < 0,001$ , Studentův t-test ke kontrole v příslušném čase.

$\gamma$ H2AX, což je marker DNA zlomu v obou řetězcích, bylo detekováno v řezech imunofluorescencí (Obrázek 2B). Jak je vidět na snímcích explantátů inkubovaných se stříbrnými kryty, jaderný signál  $\gamma$ H2AX vzrostl. Tento signál DNA poškození se zvýšil i u buněk, které nebyly v přímém kontaktu s bandážemi, ale byly „ukryté“ v mezibuněčné hmotě. Množství  $\gamma$ H2AX bylo zjištěno v jiné části každého vzorku kůže stanovením proteinů metodou Western blot (Obrázek 2C-D). Výsledky z Western blotu odpovídaly mikroskopickému pozorování a ukázaly, že DNA poškození bylo statisticky významně ( $p < 0,05$ ) zvýšeno u všech krytů se stříbrem po jednom dni inkubace a po dvou dnech inkubace pro Ac a Aq.

#### 2.4. Genová exprese stresových genů vyvolaná stříbrnými kryty

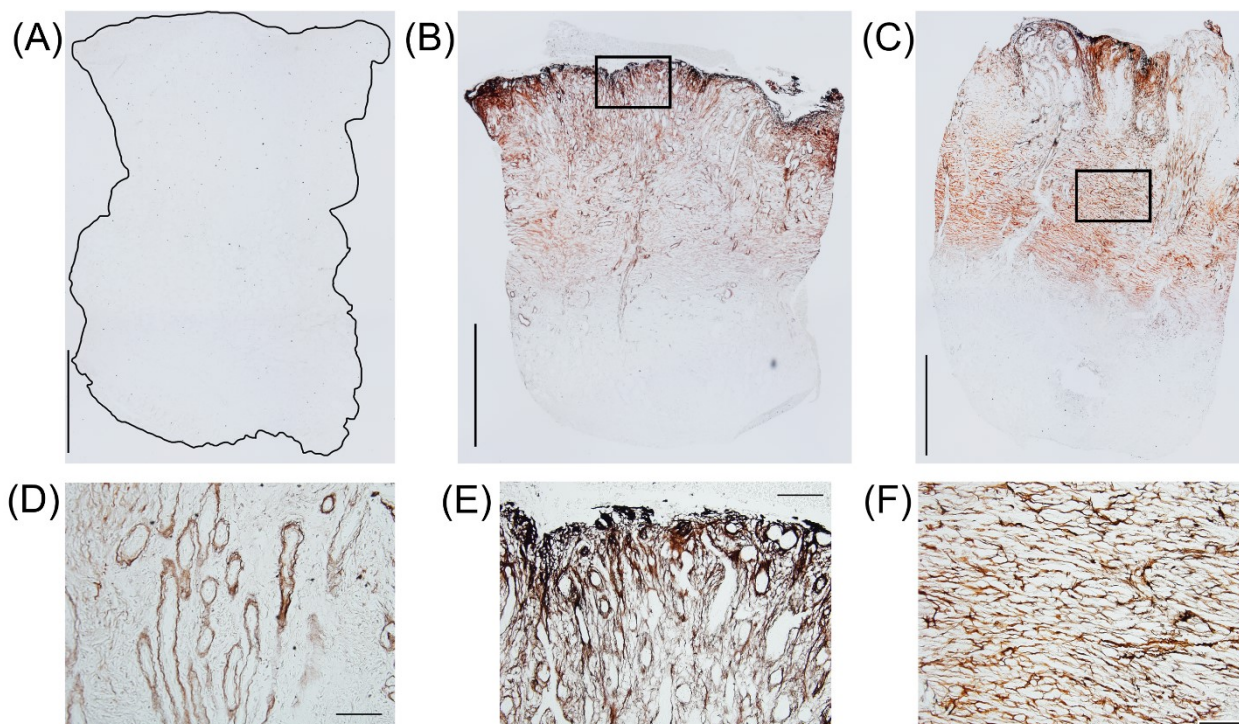
Pro detailnější zjištění rozsahu změn způsobených stříbrnými kryty bylo provedeno sledování genové exprese (Obrázek 2E). Geny, které byly sledovány, bývají zvýšené za podmínek buněčného stresu (PLK3, GADD45G) nebo hrají roli v odpovědi na tepelný šok (DNAJA1, HSPH1). Významný nárůst ( $p < 0,05$ ) exprese těchto genů byl zjištěn po 24 h inkubaci u všech bandáží se stříbrem. Po 48 h inkubaci byl u každé bandáže zvýšený významně ( $p < 0,05$ ) alespoň jeden z výše uvedené skupiny genů vzhledem ke kontrole.

#### 2.5. Distribuce stříbra v chronických ranách

Na *ex vivo* úrovni bylo zřejmé, že stříbro proniká do dermis, čímž bylo do určité míry simulováno vstřebávání stříbra do chronické rány. Následujícím krokem bylo potvrzení pozorování *in vivo*.

Pacienti s poměrně rozsáhlými bércovými vředy byli na polovině rány léčeni běžně dostupným krytem z karboxymetyl celulózy obsahujícím stříbro (Aquacel Ag+ Extra, zkracováno dále jako Ag-CMC) a na části rány krytem obsahujícím lyofilizát oktenidinu a hyaluronanu na polyesterové matrici (Sorelex, dále OCT-HA). Z ran byly odebírány biopsie před začátkem léčby, po dvou a po šesti týdnech léčby. Distribuce stříbra byla sledována pomocí stříbrné autometalografie (Obrázek 3). Ačkoliv nebyl signál stříbra patrný před léčbou (Obrázek 3A), stříbro bylo po dvou a šesti týdnech detekováno relativně hluboko (více jak 2 mm) v granulační tkáni (Obrázek 3B-C). Distribuce stříbra byla heterogenní. S postupem novotvorby cév dominovala pozitivita stříbra okolo adventiciální a periadventiciální tkáně (Obrázek 3D). S postupnou maturací tkáně byla stále více patrná vazba stříbra na filamentární složky ECM, zatímco pozitivita okolo cév byla patrná méně než v časnějších stádiích (Obrázek 3E-F).





**Obrázek 3.** Distribuce stříbra v chronické ráně. Biopsie z části rány léčené Ag-CMC (žena, 83 let). Horní řada obrázků ukazuje biopsie orientované spodinou rány vzhůru. (A) Tkáň před léčbou Ag-CMC. Vzorek je ohraničen černou čarou nakreslenou po nasnímání obrazu, aby byla tkáň odlišena od pozadí. (B) Biopsie z rány stejné pacientky léčené po dva týdny a (C) po šest týdnů léčby Ag-CMC. Měřítka v obrázcích A až C odpovídají 1 mm. (D) Signál stříbra byl patrný okolo cév v periadventiciálním prostoru (vzorek muž, 68 let). (E) Jak se rána hojila, pozitivita okolo cév byla méně patrná a následně (F) dominovala vazba stříbra na ECM. Obrázky (E) a (F) jsou zvětšené části vzorků (B) a (C) z částí znázorněných obdélníky. Měřítka v D až F odpovídají 50  $\mu$ m.

Stříbro bylo též detekováno ve fagocytech (Obrázek 4A) v oblasti se zvýšeným výskytem makrofágů pozitivních na CD68 (Obrázek 4B-C). Fagocyty nebyly duálně značeny na přítomnost stříbra a CD68 kvůli nekompatibilitě obou histologických postupů. Množství fluorescenčního CD68 signálu bylo určeno pomocí analýzy IHF. Signál CD68 byl zvýšený v 5 ze sedmi vzorků po dvou týdnech léčby Ag-CMC a ve 4 ze 7 vzorků po šesti týdnech léčby v porovnání s částí léčenou OCT-HA. Nicméně rozdíly nebyly ani v jednom časovém intervalu statisticky významné v porovnání s hodnotami před začátkem léčby.

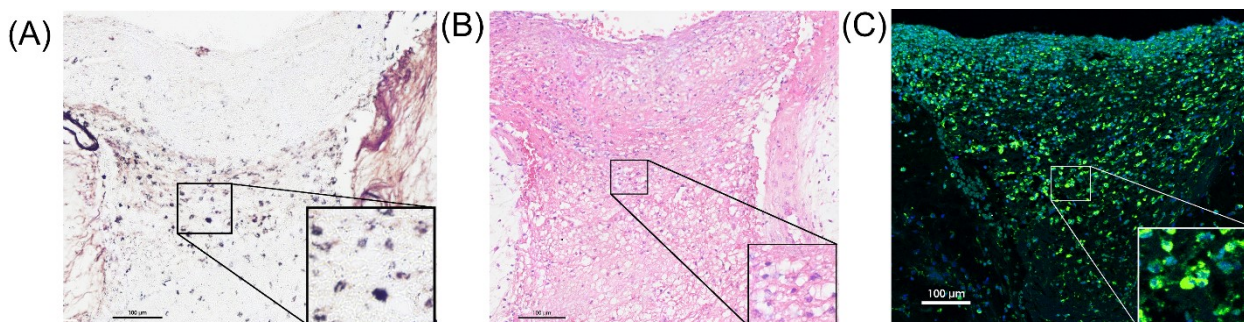
## 2.6. Srovnání hojení v částech léčených OCT-HA a Ag-CMC

Byl pozorován statisticky významně nižší signál CD68 v částech rány léčených OCT-HA oproti Ag-CMC (Nešporová et al. 2020). Části léčené Ag-CMC vykazaly také vyšším množství granulocytů (detekce aktivity naftol AS-D chloroacetát esterázy). Významný pokles množství granulocytů oproti začátku léčby nastal v částech rány léčených OCT-HA již po dvou týdnech léčby, kdežto u Ag-CMC byl pokles detekován až šestý týden léčby. V části každé biopsie z rány byla provedena analýza genové exprese zánětlivých buněčných markerů (Nešporová et al. 2020). *CD14*, který je exprimován hlavně monocyty a makrofágy, byl významně zvýšen v částech léčených Ag-CMC po dvou a šesti týdnech léčby oproti částem rány léčeným OCT-HA. Genová exprese markeru T lymfocytů, *CD4*, byla významně nižší v částech léčených OCT-HA po dvou



týdnech, a snižovala se výrazněji než v částech léčených Ag-CMC. Genová exprese *CD8A* byla zvýšena (statisticky ne významně) v částech léčených Ag-CMC. *CD3E*, který je exprimován oběma populacemi T lymfocytů (CD4 i CD8 pozitivní) byl exprimován méně u OCT-HA částí ran, ale také statisticky nevýznamně. Sledovali jsme rovněž expresi klasických prozánětlivých mediátorů *IL1B* a *TNF*. Genová exprese obou těchto markerů klesala, s tím jak se rány hojily. Statisticky významný rozdíl mezi oběma kryty byl jen u *TNF* po šesti týdnech léčby.

Obrázek 4. Stříbro ve fagocytech. Fagocyty obsahující stříbro byly detekovány pomocí stříbrné autometalografie (A). Odpovídající oblast obarvená hematoxylinem a eozinem (B) a protilátkou proti CD68 a jádry značenými DAPI (C), (žena, 74 let). Měřítka odpovídají 100  $\mu\text{m}$ .

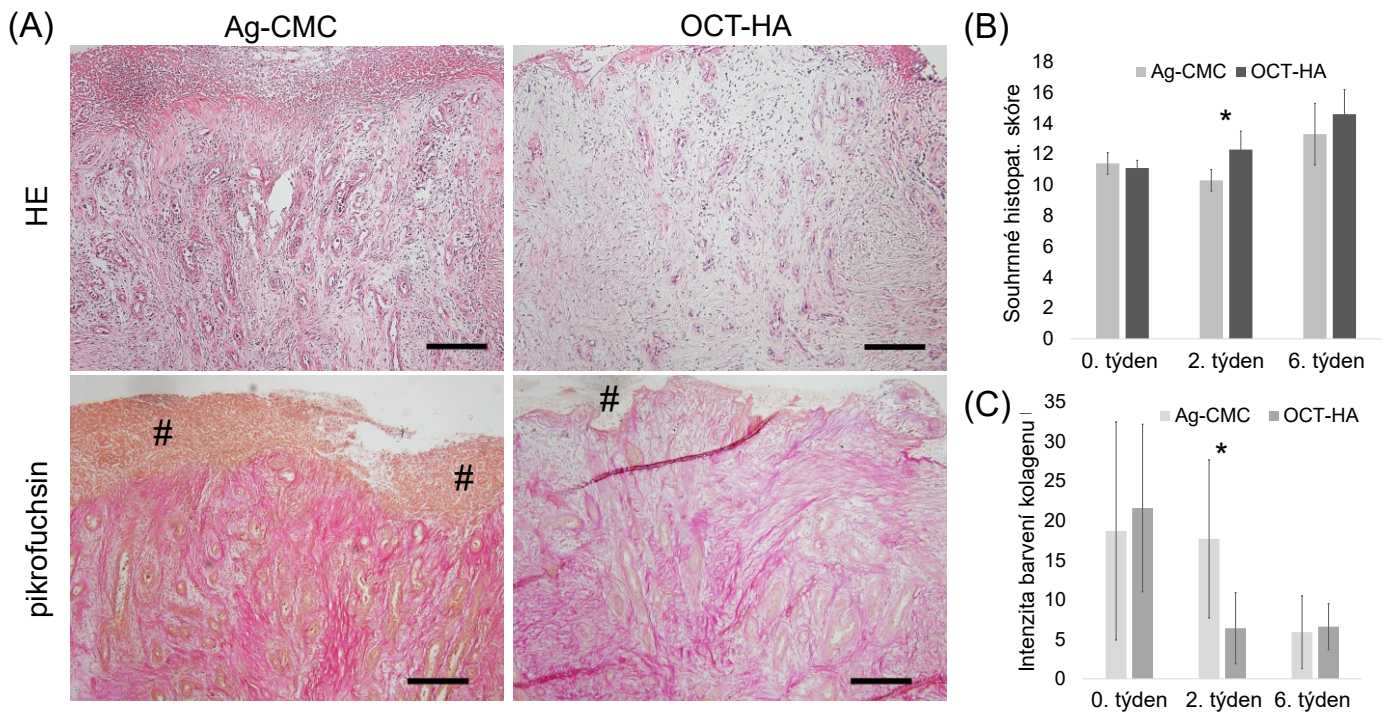


**Obrázek 4.** Stříbro ve fagocytech. Fagocyty obsahující stříbro byly detekovány pomocí stříbrné autometalografie (A). Odpovídající oblast obarvená hematoxylinem a eozinem (B) a protilátkou proti CD68 a jádry značenými DAPI (C), (žena, 74 let). Měřítka odpovídají 100  $\mu\text{m}$ .

Kromě zánětlivých buněk jsme sledovali v obou částech rány také několik parametrů hojení pomocí histologie. Parametry byly vybrány podle Sultany et al. (Sultana et al. 2009) Sledované parametry (množství časného a pozdního kolagenu, orientace kolagenových vláken, množství granulační tkáně, přítomnosti imunitního infiltrátu v řezech barvených pomocí HE) byly vyjádřeny na semikvantitativní škále a poté sečteny a vyjádřeny jako skóre hojení rány. Z průběhu tohoto skóre je zjevné, že hojení probíhalo po dvou týdnech léčby rychleji v částech ošetřovaných OCT-HA (Obrázek 5). Histologické skóre se zlepšilo v částech léčených Ag-CMC později, jak je vidět z analýzy po šesti týdnech léčby.

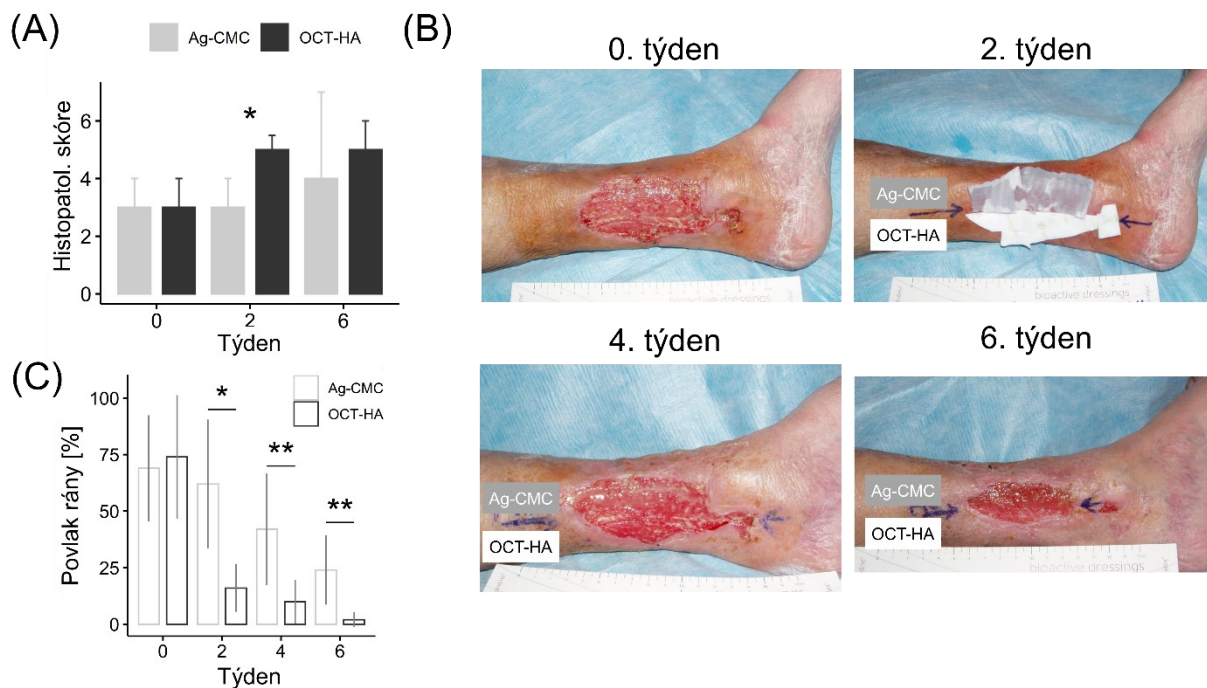
Dále jsme zjistili procento kolagenu u spodiny rány v histologických řezech pomocí obrazové analýzy (Obrázek 5). Intenzita barvení kolagenu se snižovala s maturací granulační tkáně. Po dvou týdnech léčby OCT-HA bylo vidět statisticky významné zlepšení v tomto parametru. Statisticky významný pokles barvení kolagenu nastal v částech léčených Ag-CMC až po šesti týdnech léčby.

Hojení rány doprovází snížení povlaku spodiny rány. Spodina rány léčená Ag-CMC byla po dvou týdnech významně více povleklá než odpovídající část rány léčená OCT-HA, což ukazují obrázky histologických řezů barvených pikrofuchsinem (Obrázek 5A, Obrázek 6A). Makroskopické pozorování to potvrzuje a ukázalo, že části léčené Ag-CMC jsou v průměru po dvou, čtyřech a šesti týdnech pokryté povlakem více než části léčené OCT-HA (Obrázek 6B-C).



**Obrázek 5.** Histopatologie hojení. (A) Reprezentativní řezy ránou (muž, 68 let) po dvou týdnech léčby: Ag-CMC (obrázky vlevo); barvení hematoxylinem & eozinem a pikrofuchsinem. Střední množství granulační tkáně a zánětlivého infiltrátu je přítomno pod silnou vrstvou povlaku na spodině rány (#). Kolagen (růžová) je orientován převážně vertikálně. Shrnující histopatologické skóre části této rány je podle parametrů definovaných Sultanou (Sultana et al. 2009) hodnoceno 10. Pravý pár obrázků ukazuje biopsii ze stejné rány z části léčené OCT-HA. Vrstva povlaku rány je tenká (#) a je provázena jen ojedinělou přítomností granulační tkáně a středním množstvím zánětlivého infiltrátu. Orientace kolagenu je smíšená. Souhrnné histopatologické skóre části léčené OCT-HA bylo 12. (B) Souhrnné skóre histologických parametrů. Vyšší skóre značí pokročilejší hojení. \* $p \leq 0,05$ ,  $n = 7$ , Wilcoxonův párový test. (C) Počítačová analýza obrazu intenzity kolagenu barveného Van Giesonovým pikrofuchsinem. Intenzita barvení kolagenu se snižuje s hojením rány. Obrázek z rány léčené OCT-HA a barvené pikrofuchsinem ukazuje čtyři intenzivněji zbarvené linie, které vznikly jako artefakt při přípravě vzorku. Sloupce ukazují průměr  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$ ,  $n = 7$ , Wilcoxonův párový test. Měřítko odpovídají 500  $\mu$ m.

Stříbro (a jiné kovy) indukuje zvýšení genové exprese metalothioneinů, čímž buňky snižují toxicitu tohoto kovu. Proto jsme sledovali genovou expresi *MTIG* a *MTIH*. Zjistili jsme, že jejich exprese byla značně zvýšená v ranách léčených krytem se stříbrem. Toto zvýšení bylo statisticky významné u *MTIH* po dvou týdnech léčby ve srovnání s léčbou OCT-HA (Nešporová et al. 2020).



**Obrázek 6.** Povlak spodiny rány. (A) Povlak byl hodnocen v IHC řezech na semikvantitativní škále (vysoký 1 – nepřítomný 5) a vyjádřen jako medián  $\pm$  IQR. \* $p \leq 0,05$  Wilcoxonův párový test. (B) Makroskopický přehled hojení pod kryty Ag-CMC a OCT-HA a kvantifikace povlaku rány (žena, 83). Polovina rány byla léčena krytem Ag-CMC a polovina krytem OCT-HA. Fotografie ukazují ránu před začátkem léčby, při první aplikaci krytů, po dvou a šesti týdnech po léčbě. (C) Hodnocení makroskopie povlaku spodiny rány. Průměr  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$ ,  $n = 7$ , Wilcoxonův párový test.

## 2.7. Vliv stříbra na aktivitu proteináz *in vitro*

V předchozích částech byly sledovány známé antimikrobiální účinky a méně známá aktivita stříbra v kůži. Pro léčbu ran je relevantní i aktivita stříbra a jiných antiseptik vůči proteinázám, které jsou v chronických ranách zvýšené.

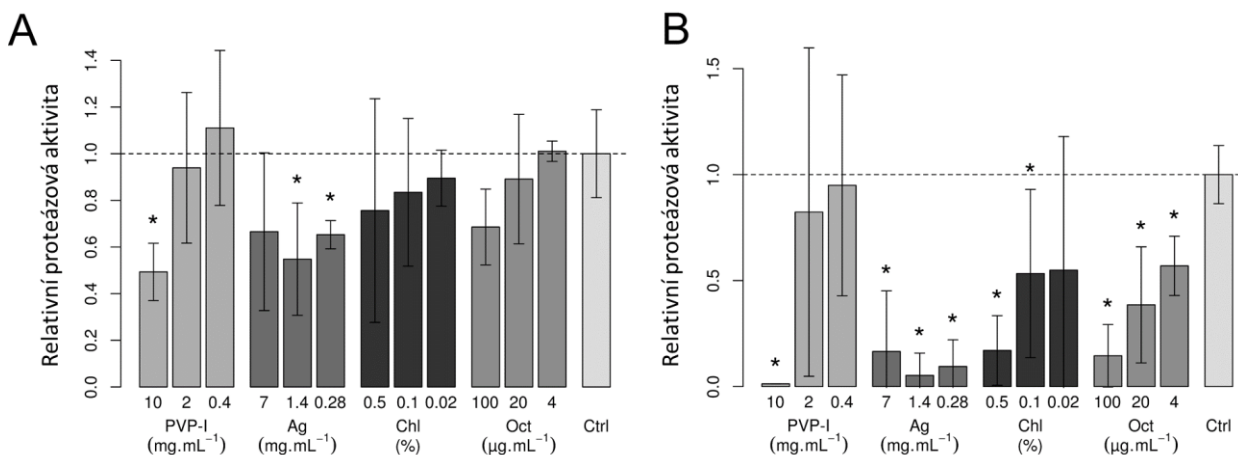
Sledovali jsme, jestli ředící řada povidon jódu (PVP-I), laktátu stříbrného (Ag), chlorhexidinu (Chl) a oktenididinu dihydrochloridu (Oct) může snižovat nebo inhibovat aktivitu savčích a bakteriálních proteináz. Tyto testované antimikrobiální látky měly inhibiční efekt na eukaryotické i bakteriální proteinázy (Obrázek 7). PVP-I a Oct dosáhly statisticky významného ( $p < 0,05$ ) snížení proteinázové aktivity v nejvyšších testovaných koncentracích. Inkubace s Ag vedla k statisticky významnému ( $p < 0,05$ ) poklesu aktivity bakteriálních proteináz ve dvou nižších koncentracích. U nejvyšší koncentrace (7 mg/ml) byla pozorována vysoká variabilita. Aktivita bakteriálních proteináz korelovala nepřímo úměrně s množstvím chlorhexidinu a oktenidinu. Neředěný PVP-I inhiboval bakteriální proteinázy ze všech testovaných antimikrobiálních látek nejvíce (49 % aktivity vůči kontrole). Nicméně ředění PVP-I dramaticky snížilo jeho antiproteinázovou aktivitu.

Z výsledků bylo zřejmé, že antimikrobiální látky inhibovaly eukaryotické proteinázy více než bakteriální proteinázy. Aktivita lidských proteináz byla inhibována v závislosti na dávce, obdobně jako bakteriální proteinázy. Oct i Ag statisticky významně ( $p < 0,05$ ) inhibovaly eukaryotické proteinázy ve všech sledovaných koncentracích. PVP-I stejně jako u bakteriálních proteináz vykázal i u lidských proteináz nejvyšší inhibiční



aktivitu, když snížil želatinolytickou schopnost proteináz na 1 % aktivity kontroly. Nicméně ředění PVP-I opět jím způsobenou inhibicí velmi potlačilo.

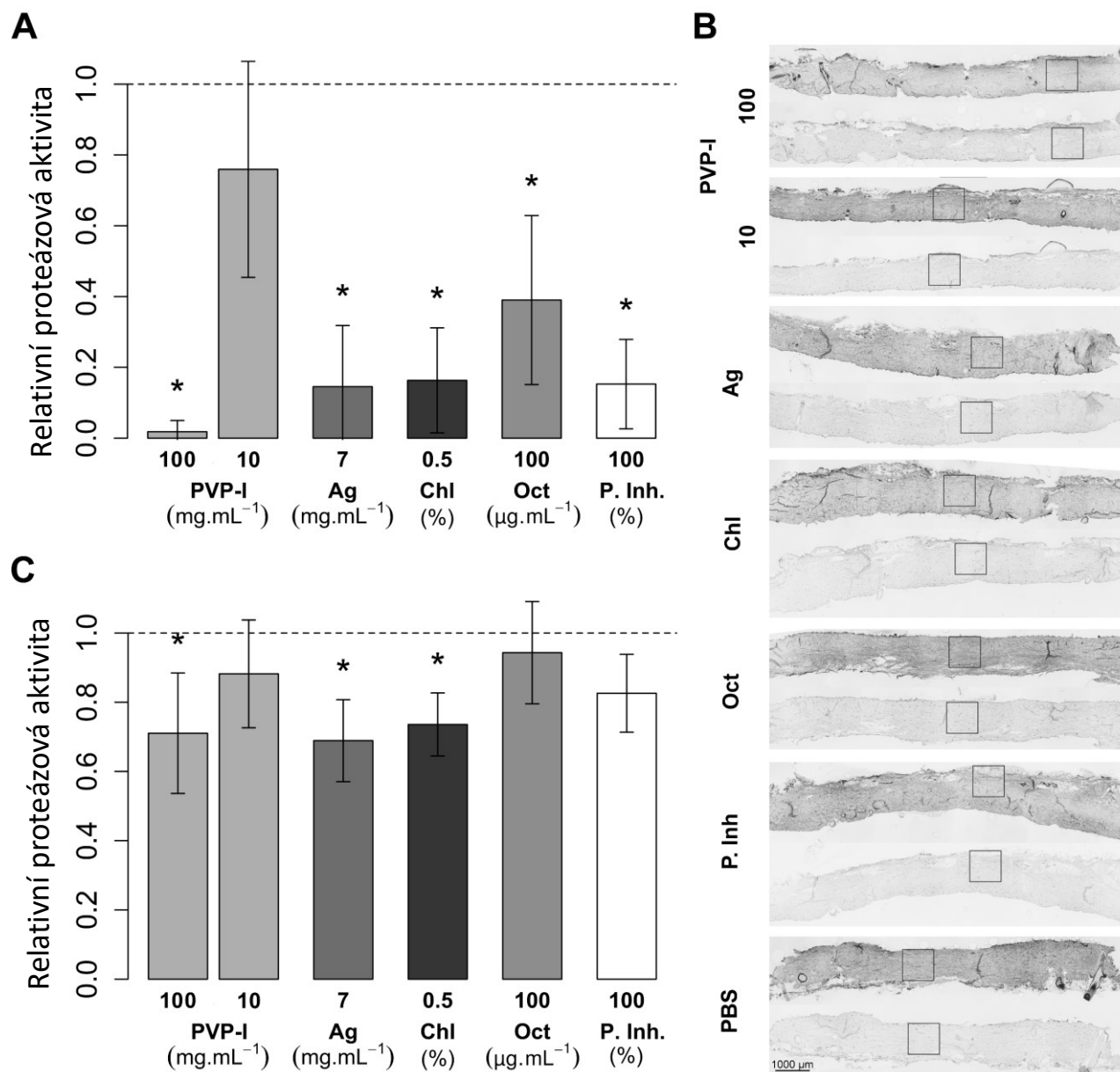
Pro detailnější vzhled do inhibice jsme testovali jednotlivé zdroje proteináz ve fluorogenním testu. Ten má vyšší citlivost než želatinová zymografie a umožňuje průběžné sledování aktivity protein (Nešporová et al. 2020). Chlorhexidin a oktenidin snížily aktivitu proteináz v závislosti na dávce, obdobně jako v testu želatinové zymografie. Laktát stříbrný také snížil aktivitu proteináz v koncentračně-závislém módu, nicméně odchylky v aktivitě při stejné koncentraci byly o dost větší než u chlorhexidinu a oktenidinu. Sledování jódu bohužel nebylo možné, protože zhaší fluorescenci použitého substrátu. Vypočtená IC50 byla pro chlorhexidin v rozmezí 0,02 – 0,07 %, pro oktenidin 2,87 – 3,95 µg/ml a 0,04-0,30 mg/ml u laktátu stříbrného.



**Obrázek 7.** Aktivita bakteriálních a eukaryotických proteináz inkubovaných s antimikrobiálními látkami v průběhu želatinové SDS-PAGE zymografie. (A) Směs bakteriálních proteináz byla rozdělena na polyakrylamidových gelech obsahujících želatinu a inkubována přes noc ve vyvíjecím pufru s antimikrobiálními látkami o různé koncentraci. Hodnoty jsou vztaženy ke kontrole bez antimikrobiálních látek. (B) Aktivita eukaryotických proteináz inkubovaná obdobně jako u (A). Sloupce ukazují průměr ± SD ze čtyřech nezávislých opakování. \* $p < 0,05$  (Studentův jednovýběrový t-test vůči kontrole).

## 2.8. Vliv stříbra na aktivitu proteináz *ex vivo*

Abychom rozšířili pozorování inhibice proteináz antimikrobiálními látkami v polyakrylamidovém gelu a v roztoku, zavedli jsme nový model inhibice proteináz antimikrobiálními látkami. Prasečí kůže byla inkubována s testovanými látkami ve zkumavce a homogenizována. Proteinázová aktivita v homogenátu byla určena pomocí želatinové zymografie (Obrázek 8). Zjistili jsme, že také v tomto modelu inhibují Oct, Ag a Chl endogenní proteinázy prasečí kůže. Podobně inhiboval proteinázy v kůži i komerční roztok pozitivní kontroly s inhibitory proteináz. Koncentrace PVP-I vedoucí k inhibici proteináz v gelu (10%) nebyla účinná v kůži. Tam byla účinný 100% PVP-I. Dále byly prasečí kůže inkubovány s antiseptiky ve Franzově difuzní cele, kde antiseptika působila jen z jedné (dermální) strany. Toto uspořádání je bližší situaci, kdy antiseptika v bandáži působí na ránu také jen v jedné ploše. Řezy takto inkubovanými kůžemi byly inkubována s fluorescenční želatinou, která umožnila pozorování želatinolytické aktivity *in situ*. Všechny testované antimikrobiální látky snížily proteinázovou aktivitu. Nicméně tento pokles byl statisticky významný jen pro 100% PVP-I, Ag a chlorhexidin. Komerční inhibitor proteináz aktivitu snížil, ovšem ne statisticky významně.



**Obrázek 8.** Aktivita endogenních proteináz prasečí kůže po inkubaci s antimikrobiálními látkami. (A) Celá kůže byla ponořena do roztoku antiseptik, inkubována, homogenizována a proteinázová aktivita homogenátu byla určena pomocí želatinové zymografie. Sloupce odpovídají průměru ± SD z pěti opakování. (B) Kůže byly inkubovány ve Franzových difuzních celách (dermální stranou nahoru) a analyzovány pomocí *in situ* zymografie. Tmavší intenzita řezu odpovídá vyšší aktivitě proteináz. Každý vzorek byl vyvíjen s fluorogenním substrátem při 37 °C (horní z dvojice řezů u každé látky) nebo při -20 °C (spodní z dvojice řezů, kontrola). Čtverce ukazují oblasti, v nichž byla měřena intenzita fluorescence pomocí obrazové analýzy (n = 5). (C) Kvantifikace *in situ* fluorescence pomocí obrazové analýzy vzhledem k PBS. \*p < 0,05 (Studentův jednovýběrový t-test k PBS). Pozitivní kontrola byla směs proteinázových inhibitorů (P. Inh.).

## 4. DISKUZE

### 2.9. *In vitro* a *ex vivo* antimikrobiální a cytotoxické efekty stříbra

Abychom korelovali cytotoxické efekty sledovaných krytů s jejich účinností, měřili jsme antimikrobiální aktivitu pomocí mikrodiluční metody. Získaná data ukazují, že různé kryty obsahující iontové stříbro (Sc a Aq) byly obdobně účinné, i když se lišily v toxicitě. To naznačuje, že antimikrobiální účinnost a cytotoxicita jsou v komplexnějším vztahu. Grampozitivní *S. aureus* byl odolnější vůči stříbrným extraktům než gramnegativní *P. aeruginosa*. To potvrzuje předchozí publikované výsledky (Dakal et al. 2016; Vi et al. 2018).

Toxicita stříbrných krytů byla závislá na obsahu stříbra jen částečně. Spíše toxicita odpovídala míře uvolnění stříbra do média. Burd a kol. dospěli k obdobnému závěru (Burd et al. 2007). Méně cytotoxický kryt Sc byl v antimikrobiálních testech relativně účinný, což také ukazuje, že antimikrobiální aktivita neodpovídá přímo cytotoxicitě.

Schopnost stříbra pronikat do a skrz dermální mezibuněčnou hmotu byla sledována na prasečí kůži. Ta má podobnou strukturu jako lidská dermis. Nicméně granulační tkáň rány se přesto podstatně liší od neporušené dermis. Množství stříbra detekovaného v kůži nebo akceptorovém roztoku nekorelovalo s koncentrací stříbra k bandážích, ale relativně odpovídalo spíše množství stříbra extrahovaného do média s proteiny. Míra extrakce stříbra do média s FBS také korelovala s cytotoxicitou a množstvím DNA poškození vyjádřeného zvýšeným signálem  $\gamma$ H2AX. SSD proniká skrz neporušenou kůži minimálně, a proto jsou v kombinaci se SSD používány látky podporující penetraci skrz kůži tam, kde je to výhodné (Moghimi et al. 2009). Vysoký obsah glycerolu (85%) v prostředku Ia mohl zapříčinit zvýšené pronikání SSD do dermis, které jsme pozorovali. Několik studií již ukázalo, že stříbro ( $\text{Ag}^0$  nebo  $\text{Ag}^+$ ) může pronikat skrz poškozenou kůži a dostat se do krevního oběhu (Brouillard et al. 2018; Lariviere et al. 2011; Kuwagata et al. 2017) nebo do kůže *ex vivo* (Holmes et al. 2016). Larese a kol dokonce pozorovali průnik stříbra ve formě nanočástic na neporušenou lidskou kůži v *ex vivo* podmínkách (Larese et al. 2009).

Detekovali jsme stříbro v kožních explantátech pomocí autometalografie histologických řezů. Stříbro bylo akumulováno hlavně na okraji tkáně po aplikaci Sc, ale bylo detekovatelné i v hlubších vrstvách, okolo krevních kapilár. To byl jev pozorovaný i v případě aplikace ostatních krytů. Fredriksson a kol. pozorovali stříbro v obdobných částech kůže, na kterou *ex vivo* aplikovali Aq, Ac, SSD, nebo  $\text{AgNO}_3$  (Fredriksson et al. 2009). Ve zmiňované studii byla pozorována také zpomalená reepitelizace. V našich experimentech se ukázala korelace míry průniku stříbra do kůže se zvýšeným množstvím fosforylace histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) i hlouběji v dermis. Indukce tohoto markeru oxidativního stresu a DNA poškození stříbrem bylo pozorováno *in vivo* (Choi et al. 2010; Mao et al. 2018) a *in vitro* (Ahamed et al. 2008). Zhao a kol. pozorovali v *in vitro* systému, že množství  $\gamma$ H2AX bylo přímo závislé na dávce stříbra (Zhao et al. 2014). V našem *ex vivo* experimentu způsobily bandáže se stříbrem kromě akumulace stříbra také nárůst  $\gamma$ H2AX. Stresová odpověď tkáně byla též spojena s nárůstem transkripce genů spojených s odpovědí na poškození DNA a proteinů. Nárůst exprese genů GADD45G, DNAJA1 a HSPH1 byl pozorován u rakovinných buněk, na něž byly aplikovány stříbrné

nanočástice (Gurunathan et al. 2018; Dwivedi et al. 2015; Kawata et al. 2009). PLK3 je aktivována genotoxickými i jinými stresovými stimuly. Hyperosmotický stres vedl k aktivaci PLK3 u epitelálních buněk rohovky, což vedlo k fosforylaci H2AX (Wang et al. 2014). Negativní role PLK3 v hojení rohovky byla rovněž publikována (Lu et al. 2010).

## 2.10. Stříbro v chronických ranách

Stříbro bylo detekováno pomocí stříbrné autometalografie v granulační tkáni chronických ran do hloubky přibližně 2 mm. Rigo a kol. detekovali až 4 mm hluboko stříbrné nanočástice uvolněné z krytu Acticoat Flex 3 aplikovaného na popáleninu. V této studii byla použita jiná technika – transmisní elektronová mikroskopie (Rigo et al. 2013). V naší studii jsme aplikovali kryt obsahující chlorid stříbrný, který může penetrovat jinou měrou oproti stříbrným nanočásticím. Bylo ukázáno, že tvar nanočástic ovlivňuje penetraci skrz kůži. Nanočástice ve tvaru tyčinek penetrovaly efektivněji skrz myší kůži do krevního řečiště oproti kuličkám nebo jehlanům (Tak et al. 2015). Roman a kol. detekovali většinu stříbrných nanočástic v chronické ráně do hloubky 1,5 mm (Roman et al. 2020).

Pozorovali jsme silnější barvení stříbra na elastických a kolagenních vláknech a lokalizaci podél kapilár v granulační tkáni chronických ran. Obdobná distribuce stříbra byla pozorována také v jiných studiích zabývajících se argyrií v oku způsobené aplikací kapkami obsahujícími stříbro, případně argyrií způsobené v důsledku akupunktury stříbrných jehel (Hadrup et al. 2018b). Je však potřeba mít na paměti, že argyrie, při níž jsou vytvářeny nerozpustné stříbrné útvary, je poněkud extrémní (ale přesto dokumentovaný i v hojení chronických ran (Trop et al. 2006)) případ dlouhodobé expozice stříbru.

Zvýšená přítomnost stříbra okolo kapilár pozorovaná v této studii a citovaných studiích naznačuje pasivní eliminaci stříbra z ran do krve. V jiné studii bylo ukázáno, že stříbro se váže na sérové proteiny, např. albumin, a také na glutathion (Mulley et al. 2014). Zvýšená hladina sérového albuminu u pacientů s chronickými ranami slouží jako ochrana proti zvýšené hladině stříbra v krvi (Brouillard et al. 2018). Speciační analýza stříbra ukázaná v práci Romana a kol. naznačuje, že se stříbro váže na chlorid v nejvyšší vrstvě rány (do 45  $\mu\text{m}$ ) a na glutathion v hlubších částech rány. (Roman et al. 2020) Komplexy stříbra s proteiny proto mohou pomáhat odstranění stříbra z ran.

Další způsob, jak je stříbro odstraňováno z ran, představuje fagocytóza. Pozorovali jsme v ranách buňky (pravděpodobně makrofágy) silně pozitivní na stříbro. Makrofágy jsou schopny pohlcovat stříbrné nanočástice (Dalzon et al. 2020). *In vitro* studie ukázaly, že fagocytóza stříbrných nanočástic zvýšila zánětlivou odpověď a poškodila makrofágy (Brzicova et al. 2019; Paul et al. 2015). Je tudíž možné, že makrofágy v chronických ranách fagocytované stříbro poškozuje. Důsledkem by pak bylo, že rány ošetřené stříbrem potřebují více makrofágů, aby byly zajištěny i jiné funkce, např. odstranění debris a účast v jiných procesech hojení ran. Souza a kol. ukázali zvýšení počtu makrofágů během granulační fáze hojení popálenin krys po aplikaci SSD (sulfadiazinu stříbrného) (Souza et al. 2017).

Detekovali jsme rozdíly mezi oběma kryty hlavně po dvou týdnech léčby. Po šesti týdnech léčby nebyl nalezen výrazný rozdíl mezi Ag-CMC a OCT-HA v intenzitě barvení kolagenu a počtu neutrofilů. Co se týče intenzity barvení kolagenu, minimum tohoto parametru (čím nižší, tím lepší) bylo dosaženo v částech ran léčených OCT-HA již po dvou týdnech, po další čtyři týdny se nezměnilo. To naznačuje, že tento parametr dále v průběhu hojení neklesá. Části léčené Ag-CMC dosáhly minima barvení kolagenu významně později.

Snížení počtu neutrofilů v částech rány OCT-HA nastalo druhý týden a pokračovalo i do šestého týdne léčby. V částech rány léčených Ag-CMC byl pozorován nárůst v počtu neutrofilů po dvou týdnech a poté pokles na hodnoty srovnatelné s OCT-HA částmi rány. Je možné, že rychlejší ústup zánětu v jedné části rány mohl urychlit snížení zánětu v druhé části. A tak by hojení ran díky parakrinní signalizaci konvergovalo. Byla publikována studie transplantace granulační tkáně za účelem urychlení hojení problematických částí rány (např. na obnaženou kost) (Winter a Haas 2000). Chen a kol. izolovali buňky z hojící se granulační tkáně kontrolních myší a injikovali je do okraje rány myší ozářených gamma zářením (Chen et al. 2015).

### 2.11. Vliv stříbra a jiných antiseptik na proteinázy

Ukázali jsme, že PVP-I, laktát stříbrný, chlorhexidin diglukonát a oktenidin hydrochlorid vykazují antiproteinázové aktivity v *in vitro* a *ex vivo* experimentálních systémech. Inhibiční efekty byl závislý na dávce antiseptika a projevil se výrazněji u eukaryotických proteináz.

U jódu bylo dříve ukázáno, že může inhibovat lidskou neutrofilovou elastázu, plasmin, matrix metaloproteinázy a proteinázy v exsudátech z lidských chronických ran (Eming et al. 2006). Tento efekt byl rovněž pozorován v závislosti na dávce PVP-I. Jiná studie ukázala, že kryty, z nichž se uvolňoval jód, byly účinné v inhibici kolagenázy nebo papainu (Shi et al. 2010). Naše výsledky tato pozorování potvrzují a rozšiřují paletu enzymů inhibovaných jódem o bakteriální proteinázy z chronických ran. Obvyklá koncentrace jódu používaná v roztoku povidonu jódu je 5 – 10 %. Naše výsledky ukazují, že i 1% koncentrace PVP-I je dostatečná pro inhibici bakteriálních a eukaryotických proteináz. Nicméně podstatně vyšší koncentrace (10%) byla potřeba pro inhibici endogenních proteináz v prasečí kůži. Jód oxiduje řadu aminokyselin skrz kovalentní modifikaci, čímž narušuje aktivitu enzymů a dokonce je může vysrážet (Ramachandran 1956). Stabilita jódu a jeho těkavost je problematická. Naše výsledky to potvrzují – koncentrovanější PVP-I lépe inhiboval proteinázy. S vyšším ředěním ale přišel rapidní (nelineární) pokles antiproteinázové aktivity. Těkavost jódu a její důsledek pro antiproteinázovou aktivitu (ale zřejmě i antimikrobiální aktivitu) by mohla být předmětem optimalizace vyvíjených pokročilých krytů ran, které uvolňují jód.

Jak již bylo uvedeno dříve, stříbro je používáno v krytech ran v různé formě (soli, oxysoli, nanočástice). Nicméně klíčová pro antimikrobiální působení je koncentrace stříbrných iontů (Tseng a Liao 2011). Různé bandáže uvolňují stříbro různým způsobem, což má za následek i rozdíl v jeho dostupnosti pro inhibici proteináz. V předchozí studii bylo ukázáno, že nitrát stříbrný (ve vyšších koncentracích než laktát stříbrný v našich experimentech) inhiboval MMP-2, MMP-8 a MMP-9 o více než 90 % (Mei et al. 2012). Studie srovnávající inhibici enzymů používaných pro debridement (papain a kolagenáza) vyvolaná kryty



s antiseptiky ukázala, že kryt s nanokrystalickým stříbrem inhiboval aktivitu kolagenázy o 52 % a papainu o 12% (Shi et al. 2010). Míra inhibice nanokrystalickým stříbrem byla podstatně menší než u dvou prostředků uvolňujících jód. Stříbro inhibovalo trypsin a chymotrypsin vratným způsobem a tento efekt byl potlačen, když byly přítomny chloridové ionty a došlo k precipitaci AgCl (Ballinger et al. 1982). Proto jsme nahradili Tris-HCl ve vyvíjecím pufru HEPES puftrem a inkubovali prasečí kůži ve vodném roztoku laktátu stříbrného. Rovněž jsme odsolili substrát DQ želatinu a roztoky proteináz. Také jsme použili pufrы bez chloridových solí nebo demineralizovanou vodu.

O chlorhexidinu bylo zjištěno, že má schopnost inhibovat matrix metaloproteinázy v dutině ústní a bakteriální proteinázy v dentálním plaku (Beighton et al. 1991; Gendron et al. 1999). Efektivní inhibiční koncentrace chlorhexidinu *in vitro* se pohybuje od 0,0001% pro MMP-2 až více jak 0,02 % pro aktivovanou MMP-8 a u bakteriálních proteináz závisí na konkrétním bakteriálním kmenu (Beighton et al. 1991; Gendron et al. 1999).

Navzdory tomu, že jsme ukázali inhibiční efekt vybraných antimikrobiálních látek a hovoří o něm i literatura, zůstává otázkou, jak se tyto vlastnosti projeví v komplexním prostředí chronické rány. Zprvэ není jasné, do jaké hloubky by měly být proteinázy inhibované. Pouze několik studií sledovalo proteolytickou aktivitu hlouběji v chronické ráně, kde jsou proteinázy v jistém smyslu chráněny před přímým kontaktem s antiseptiky z rány. Většina studií sledující modulaci proteinázové aktivity se zaměřuje na proteinázy v exsudátu (McCarty a Percival 2013; Mirastschijski et al. 2002). V naší studii jsme se na tento nedostatek informací zaměřili a ukázali jsme, že chlorhexidin diglukonát a laktát stříbrný mohou pronikat do kůže a inhibovat zde přítomné proteinázy. K tomuto jevu dochází, když je kůže ponořena do roztoků těchto antimikrobiálních látek, nebo i v případě částečného kontaktu s kůží ve Franzově cele. Byla publikována studie, která ukázala rychlejší hojení rány, když byly proteinázy absorbovány do krytu z regenerované celulózy (Kloeters et al. 2016). K pozitivnímu efektu došlo, i když absorpce proteináz zjevně nastala jen na povrchu rány. Můžeme tedy být optimističtí, že redukce proteinázové aktivity i pomocí sledovaných antiseptických látek povede ke zlepšení hojení ran.

## 5. ZÁVĚRY

Ve studii (Nešporová et al. 2020) jsme sledovali efekt čtyř krytů chronických ran. Pomocí ICP-OES jsme určili koncentraci stříbra v krytech, u nichž výrobce tuto hodnotu neuváděl. Cytotoxicita byla zjištěna pomocí metody MTT na linii lidských keratinocytů a myších fibroblastů a dalšími metodami na erytrocytech a imunitních buňkách. Antimikrobiální účinnost byla sledována ve výluzích krytů pomocí mikrodiluční metody a pomocí přímého kontaktu bandáže s bakteriemi. Korelovali jsme fyzikálně-chemické vlastnosti stříbra obsaženého v bandážích a jeho toxické a antimikrobiální působení v *in vitro* a *ex vivo* systémech. Detekovali jsme pronikání stříbra z krytů do prasečí dermis pomocí stříbrné autometalografie. Míra DNA poškození byla určena množstvím  $\gamma$ H2AX v kůži metodami IHF a WB.

1. **H1-C1** Cytotoxicita se u sledovaných čtyřech krytů ran projevila u keratinocytů, fibroblastů i erytrocytů, ale nebyla přímo úměrná antimikrobiální účinnosti. Pořadí od nejcytotoxičtějšího krytu bylo: Ialugen>Acticoat>Aquacel>Silvercel. Od nejúčinnějšího proti bakteriím je seřazeno v tomto pořadí: Ialugen ~ Acticoat > Aquacel ~ Silvercel. U neutrofilů jsme pozorovali sníženou prozánětlivou aktivitu po ovlivnění roztoky se stříbrem vyluhovaným z krytů, nicméně to bylo zřejmě způsobeno cytotoxicitou stříbrných krytů.
2. **H1-C2** Ukázali jsme, že stříbro difundovalo do prasečí dermis, kde indukovalo DNA poškození a stresovou odpověď. Byl rozdíl v míře pronikání stříbra do kůže mezi testovanými bandážemi, nicméně stříbro pronikalo do dermis ze všech čtyř zkoumaných krytů.

Výsledky ukázané v této práci zřejmě poprvé představují takto metodicky rozsáhlé sledování vlastností komerčních krytů se stříbrem. Rozšířili jsme tím již publikovaná pozorování cytotoxicity stříbra v *in vitro* podmínkách o cytotoxické efekty v *ex vivo*. Proklamovaný protizánětlivý efekt stříbra na rány může být způsoben jeho cytotoxicitou vůči zánětlivým buňkám. Za nejcennější pozorování považujeme, že stříbro proniká do dermis, kde způsobuje DNA poškození.

Na výsledky získané na *ex vivo* kůžích navazuje výzkum publikovaný v dalším článku Pavlík et al. (2021). Zde jsme sledovali distribuci stříbra a hojení ran makroskopicky, na úrovni histologie (zánět a granulace) a genové exprese vybraných markerů (zánět a granulace).

3. **H2-C1** Stříbro z krytu Aquacel Ag+ proniklo i do lidských chronických ran. Jeho distribuce byla spjatá zejména s vlákny mezibuněčné hmoty a s periadventiciálním prostorem. Stříbro bylo detekováno i v makrofázích. O reakci rány na přítomnost stříbra svědčí i zvýšená genová exprese metalothioneinů.
4. **H2-C2** Byly pozorovány rozdíly v rychlosti hojení částí ran léčených různými kryty. Krytí s oktenidinem (Sorelex) podporovalo rychlejší maturaci mezibuněčné hmoty a ústup zánětu oproti krytu se stříbrem. K posunu v hojení došlo i v částech rány léčených krytem se stříbrem, ale až mezi druhým a šestým týdnem léčby. I na makroskopické úrovni vypadaly rány léčené krytem s oktenidinem lépe (byly méně povleklé a granulační tkáň byla živě červená).

To, že stříbro proniká i do lidské chronické rány odpovídá publikovaným pozorováním zvýšené hladiny stříbra v krvi a orgánech pacientů nebo experimentálních zvířat léčených kryty se stříbrem. Naše studie ukázala hloubku průniku stříbra do rány a naznačuje dva mechanismy jeho odstraňování z rány – nasáváním do cévního systému a skrz fagocytózu realizovanou makrofágy. Rychlejší ústup zánětu v částech léčených krytem s oktenidinem zde zřejmě koreluje i s lepší maturací tkáně a menším pokrytím rány fibrinem.

V poslední studii, která je podkladem této disertační práce (Pavlík et al. 2019), jsme se věnovali vlivu stříbra, oktenidinu, jódu a chlorhexidinu na aktivitu proteináz. Tyto proteinázy pocházely z eukaryotických zdrojů i z bakterií izolovaných z chronické rány. Byla sledována aktivita proteináz inkubovaných s antiseptiky v *in vitro* podmínkách na želatinové zymografii a pomocí fluorogenní metody. Dále pak byly sledovány proteinázy v *ex vivo* kůži inkubované s antiseptiky pomocí fluorescenční mikroskopie.

5. **H3-C1** Stříbro inhibovalo řadu eukaryotických i prokaryotických proteináz v *in vitro* podmínkách. Tato inhibice byla závislá na koncentraci. U jódu byla pozorována výrazná inhibice proteináz, ale inhibice se snížila s ředěním výrazněji než u jiných antiseptik.

6. **H3-C2** Inhibice endogenních proteináz stříbrem se projevila i na prasečí kůži *ex vivo*.

Kromě stříbra jsme ve studii ukázali, že také povidon jód, chlorhexidin diglukonát a také oktenidin hydrochlorid inhibují bakteriální a eukaryotické proteinázy, které jsou relevantní pro léčbu ran. Bylo vidět, že tato antiseptika mají různou schopnost pronikat do dermis a inhibovat tamní proteinázy. Přestože je nutné tato pozorování ověřit *in vivo*, jsou zde důvody, proč by určitými antiseptiky mohla být kromě redukce bakterií také snížena nadměrná aktivita proteináz. Vyvíjené pokročilé kryty ran mohou být tak optimalizovány, aby zajistily dostatečný antimikrobiální i antiproteinázový efekt antiseptik.

Ačkoliv je těžké modelovat hojení chronických ran *in vitro* a *ex vivo*, věříme, že námi získané výsledky přinášejí významné a nové poznatky o mechanismech aktivity stříbra a mohou být extrapolovány do léčby ran, což ukazuje především druhá část této práce – *in vivo* studie. Dále naše výsledky ukazují, že je nezbytné používat komplexní metodologii pro určení účinnosti a bezpečnosti krytů ran, protože tyto veličiny spolu souvisejí ale ne přímo úměrně. Stříbrné kryty zároveň působí na viabilitu bakterií, zánětlivých, stromálních i epidermálních buněk. Naše data potvrzují doporučení, že by kryty ran se stříbrem měly být aplikovány na infikované rány, a ne na hojící se rány, jimž by toxicita stříbra mohla uškodit. Alternativou je použití jiného antiseptika, například oktenidinu.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

- AHAMED, M., M. KARNIS, M. GOODSON, J. ROWE, S. M. HUSSAIN, J. J. SCHLAGER a Y. HONG, 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* [online]. **233**(3), 404–10. ISSN 1096-0333 (Electronic) 0041-008X (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2008.09.015
- BALLINGER, P. M., M. M. GRIFFIN, S. ITZHAKI a F. S. STEVENS, 1982. Evidence for the carriage of silver by sulphadimidine: inhibition of proteolytic enzymes. *British Journal of Pharmacology*. **77**(1), 147–151. ISSN 0007-1188.
- BARNEA, Yoav, Jerry WEISS a Eyal GUR, 2010. A review of the applications of the hydrofiber dressing with silver (Aquacel Ag) in wound care. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. **6**, 21–27. ISSN 1178-203X.
- BEIGHTON, D., J. DECKER a K. A. HOMER, 1991. Effects of chlorhexidine on proteolytic and glycosidic enzyme activities of dental plaque bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*. **18**(2), 85–89. ISSN 0303-6979.
- BROUILLARD, C., A. C. BURSZTEJN, C. LATARCHE, J. F. CUNY, F. TRUCHETET, J. P. GOULLE a J. L. SCHMUTZ, 2018. Silver absorption and toxicity evaluation of silver wound dressings in 40 patients with chronic wounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [online]. ISSN 1468-3083 (Electronic) 0926-9959 (Linking). Dostupné z: doi:10.1111/jdv.15055
- BRZICOVA, Tana, Eliska JAVORKOVA, Kristyna VRBOVA, Alena ZAJICOVA, Vladimir HOLAN, Dominik PINKAS, Vlada PHILIMONENKO, Jitka SIKOROVA, Jiri KLEMA, Jan TOPINKA, Pavel ROSSNER a JR., 2019. Molecular Responses in THP-1 Macrophage-Like Cells Exposed to Diverse Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* [online]. **9**(5). ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano9050687
- BÜHRER, C., S. BAHR, J. SIEBERT, R. WETTSTEIN, C. GEFFERS a M. OBLADEN, 2002. Use of 2% 2-phenoxyethanol and 0.1% octenidine as antiseptic in premature newborn infants of 23-26 weeks gestation. *The Journal of Hospital Infection* [online]. **51**(4), 305–307. ISSN 0195-6701. Dostupné z: doi:10.1053/jhin.2002.1249
- BURD, A., C. H. KWOK, S. C. HUNG, H. S. CHAN, H. GU, W. K. LAM a L. HUANG, 2007. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen* [online]. **15**(1), 94–104. ISSN 1067-1927 (Print) 1067-1927 (Linking). Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2006.00190.x
- COOMBS, C.J., A.T. WAN, J.P. MASTERTON, R.A.J. CONYERS, J. PEDERSEN a Y.T. CHIA, 1992. Do burn patients have a silver lining? *Burns* [online]. **18**(3), 179–184. ISSN 03054179. Dostupné z: doi:10.1016/0305-4179(92)90067-5
- DAKAL, Tikam Chand, Anu KUMAR, Rita S. MAJUMDAR a Vinod YADAV, 2016. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7**, 1831. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01831
- DALZON, Bastien, Catherine AUDE-GARCIA, Hélène DIEMER, Joanna BONS, Caroline MARIE-DESVERGNE, Julien PÉRARD, Muriel DUBOSSON, Véronique COLLIN-FAURE, Christine CARAPITO, Sarah CIANFÉRANI, Marie CARRIÈRE a Thierry RABILLOUD, 2020. The longer the worse: a combined proteomic and targeted study of the long-term versus short-term effects of silver nanoparticles on macrophages. *Environmental Science: Nano* [online]. **7**(7), 2032–2046. Dostupné z: doi:10.1039/C9EN01329F
- DANSCHER, G., M. STOLTENBERG a S. JUHL, 1994. How to detect gold, silver and mercury in human brain and other tissues by autometallographic silver amplification. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. **20**(5), 454–467. ISSN 0305-1846.
- DWIVEDI, S., Q. SAQUIB, A. A. AL-KHEDHAIRY, J. AHMAD, M. A. SIDDIQUI a J. MUSARRAT, 2015. Rhamnolipids functionalized AgNPs-induced oxidative stress and modulation of toxicity pathway genes in cultured MCF-7 cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* [online]. **132**, 290–8. ISSN 1873-4367 (Electronic) 0927-7765 (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.034
- EMING, Sabine A, Sigrun SMOLA-HESS, Peter KURSCHAT, Doris HIRCHE, Thomas KRIEG a Hans SMOLA, 2006. A novel property of povidon-iodine: inhibition of excessive protease levels in chronic non-healing wounds. *The Journal of investigative dermatology* [online]. **126**(12), 2731–2733. ISSN 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jid.5700474
- FREDRIKSSON, Camilla, Gunnar KRATZ a Fredrik HUSS, 2009. Accumulation of Silver and Delayed Re-epithelialization in Normal Human Skin: An ex-vivo Study of Different Silver Dressings. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*. **21**(5), 116–123. ISSN 1044-7946.

- GENDRON, R., D. GRENIER, T. SORSA a D. MAYRAND, 1999. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **6**(3), 437–439. ISSN 1071-412X.
- GÜNTHER, F., B. BLESSING, U. DAPUNT, A. MISCHNIK a N.T. MUTTERS, 2021. Ability of chlorhexidine, octenidine, polyhexanide and chloroxylenol to inhibit metabolism of biofilm-forming clinical multidrug-resistant organisms. *Journal of Infection Prevention* [online]. **22**(1), 12–18. Dostupné z: doi:10.1177/1757177420963829
- GURUNATHAN, S., M. QASIM, C. PARK, H. YOO, J. H. KIM a K. HONG, 2018. Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116. *Int J Mol Sci* [online]. **19**(8). ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Dostupné z: doi:10.3390/ijms19082269
- HADLER-OLSEN, Elin, Premasany KANAPATHIPPILLAI, Eli BERG, Gunbjørg SVINENG, Jan-Olof WINBERG a Lars UHLIN-HANSEN, 2010. Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* [online]. **58**(1), 29–39. ISSN 1551-5044. Dostupné z: doi:10.1369/jhc.2009.954354
- HADRUP, Niels, Anoop K. SHARMA a Katrin LOESCHNER, 2018a. Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* [online]. **98**, 257–267. ISSN 1096-0295. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2018.08.007
- HADRUP, Niels, Anoop K. SHARMA a Katrin LOESCHNER, 2018b. Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* [online]. **98**, 257–267. ISSN 1096-0295. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2018.08.007
- HOLMES, Amy M., Julian LIM, Hauke STUDIER a Michael S. ROBERTS, 2016. Varying the morphology of silver nanoparticles results in differential toxicity against micro-organisms, HaCaT keratinocytes and affects skin deposition. *Nanotoxicology* [online]. **10**(10), 1503–1514. ISSN 1743-5404. Dostupné z: doi:10.1080/17435390.2016.1236993
- HÜBNER, N.-O., J. SIEBERT a A. KRAMER, 2010. Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. **23**(5), 244–258. ISSN 1660-5535. Dostupné z: doi:10.1159/000314699
- CHEN, Zelin, Tingyu DAI, Xia CHEN, Li TAN a Chunmeng SHI, 2015. Activation and regulation of the granulation tissue derived cells with stemness-related properties. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. **6**(1) [vid. 2021-02-25]. ISSN 1757-6512. Dostupné z: doi:10.1186/s13287-015-0070-9
- CHOI, J. E., S. KIM, J. H. AHN, P. YOUN, J. S. KANG, K. PARK, J. YI a D. Y. RYU, 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol* [online]. **100**(2), 151–9. ISSN 1879-1514 (Electronic) 0166-445X (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.012
- KAWATA, Koji, Masato OSAWA a Satoshi OKABE, 2009. In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells. *Environmental Science & Technology* [online]. **43**(15), 6046–6051. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es900754q
- KLOETERS, Oliver, Frank UNGLAUB, Erik DE LAAT, Marjolijn VAN ABEELLEN a Dietmar ULRICH, 2016. Prospective and randomised evaluation of the protease-modulating effect of oxidised regenerated cellulose/collagen matrix treatment in pressure sore ulcers. *International Wound Journal* [online]. **13**(6), 1231–1236. ISSN 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12449
- KODEDOVÁ, Marie, Karel SIGLER, Bernard D. LEMIRE a Dana GÁŠKOVÁ, 2011. Fluorescence method for determining the mechanism and speed of action of surface-active drugs on yeast cells. *BioTechniques* [online]. **50**(1), 58–63. ISSN 1940-9818. Dostupné z: doi:10.2144/000113568
- KRAMER, Axel, Joachim DISSEMOND, Simon KIM, Christian WILLY, Dieter MAYER, Roald PAPKE, Felix TUCHMANN a Ojan ASSADIAN, 2018. Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. **31**(1), 28–58. ISSN 1660-5535. Dostupné z: doi:10.1159/000481545
- KUCERA, J., M. SOJKA, V. PAVLIK, K. SZUSZKIEWICZ, V. VELEBNY a P. KLEIN, 2014. Multispecies biofilm in an artificial wound bed--A novel model for in vitro assessment of solid antimicrobial dressings. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **103**, 18–24. ISSN 1872-8359. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2014.05.008
- KUWAGATA, Makiko, Fumiaki KUMAGAI, Yoshiaki SAITO, Kazuma HIGASHISAKA, Yasuo YOSHIOKA a Yasuo TSUTSUMI, 2017. Permeability of skin to silver nanoparticles after epidermal skin barrier disruption in rats. *Fundamental Toxicological Sciences* [online]. **4**(3), 109–119. Dostupné z: doi:10.2131/fts.4.109
- LACHAPELLE, Jean-Marie, 2014. A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *European journal of dermatology: EJD* [online]. **24**(1), 3–9. ISSN 1952-4013. Dostupné z: doi:10.1684/ejd.2013.2198

- LACHAPELLE, J.-M., O. CASTEL, A. F. CASADO, B. LEROY, G. MICALI, D. TENNSTEDT a J. LAMBERT, 2013. Antiseptics in the era of bacterial resistance: a focus on povidone iodine. *Clinical Practice*. **10**(5), 579. ISSN 2044-9038 (Print) 2044-9046 (Electronic).
- LARESE, Francesca Filon, Flavia D'AGOSTIN, Matteo CROSERI, Gianpiero ADAMI, Nadia RENZI, Massimo BOVENZI a Giovanni MAINA, 2009. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* [online]. **255**(1–2), 33–37. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2008.09.025
- LARIVIERE, C. A., A. B. GOLDIN a J. AVANSINO, 2011. Silver toxicity with the use of silver-impregnated dressing and wound vacuum-assisted closure in an immunocompromised patient. *J Am Col Certif Wound Spec* [online]. **3**(1), 8–12. ISSN 1876-4983 (Print) 1876-4983 (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.jcws.2011.05.002
- LU, J., L. WANG, W. DAI a L. LU, 2010. Effect of hypoxic stress-activated Polo-like kinase 3 on corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [online]. **51**(10), 5034–40. ISSN 1552-5783 (Electronic) 0146-0404 (Linking). Dostupné z: doi:10.1167/iovs.10-5501
- MALANOVIĆ, Nermina, Ayse ÖN, Georg PABST, Alfred ZELLNER a Karl LOHNER, 2020. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **56**(5), 106146. ISSN 1872-7913. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106146
- MAO, Bin-Hsu, Zi-Yu CHEN, Ying-Jang WANG a Shian-Jang YAN, 2018. Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 2445. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-20728-z
- MCCARTY, Sara M. a Steven L. PERCIVAL, 2013. Proteases and Delayed Wound Healing. *Advances in Wound Care* [online]. **2**(8), 438–447. ISSN 2162-1918. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2012.0370
- MCCARTY, Sara M., Steven L. PERCIVAL, Peter D. CLEGG a Christine A. COCHRANE, 2015. The role of polyphosphates in the sequestration of matrix metalloproteinases. *International Wound Journal* [online]. **12**(1), 89–99. ISSN 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12058
- MCDONNELL, G. a A. D. RUSSELL, 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**(1), 147–179. ISSN 0893-8512.
- MCSHAN, Danielle, Paresh C. RAY a Hongtao YU, 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. **22**(1), Nanomaterials - Toxicology and Medical Applications, 116–127. ISSN 1021-9498. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2014.01.010
- MEI, May L., Q. L. LI, C. H. CHU, Cynthia K. Y. YIU a Edward C. M. LO, 2012. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials* [online]. **28**(8), 903–908. ISSN 1879-0097. Dostupné z: doi:10.1016/j.dental.2012.04.011
- MIRASTSCHIJSKI, Ursula, Ulla IMPOLA, Tiina JAHKOLA, Tonny KARLSMARK, Magnus S. ÅGREN a Ulpu SAARIALHO-KERE, 2002. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Human Pathology* [online]. **33**(3), 355–364. ISSN 0046-8177. Dostupné z: doi:10.1053/hupa.2002.32221
- MOGHIMI, H. R., B. S. MAKHMALZADEH a A. MANAFI, 2009. Enhancement effect of terpenes on silver sulphadiazine permeation through third-degree burn eschar. *Burns* [online]. **35**(8), 1165–70. ISSN 1879-1409 (Electronic) 0305-4179 (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.burns.2009.02.006
- MULLEY, Geraldine, A. Tobias A. JENKINS a Nicholas R. WATERFIELD, 2014. Inactivation of the antibacterial and cytotoxic properties of silver ions by biologically relevant compounds. *PloS One* [online]. **9**(4), e94409. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0094409
- NEŠPOROVÁ, Kristina, Vojtěch PAVLÍK, Barbora ŠAFRÁNKOVÁ, Hana VÁGNEROVÁ, Pavel ODRÁŠKA, Ondřej ŽÍDEK, Natálie CÍSAŘOVÁ, Svitlana SKOROPLYAS, Lukáš KUBALA a Vladimír VELEBNÝ, 2020. Effects of wound dressings containing silver on skin and immune cells. *Scientific Reports* [online]. **10**(1), 15216. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-72249-3
- PANUNCIALMAN, Jaymie, Scott HAMMERMAN, Polly CARSON a Vincent FALANGA, 2010. Wound edge biopsy sites in chronic wounds heal rapidly and do not result in delayed overall healing of the wound. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **18**(1), 21–25. ISSN 1067-1927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00559.x

- PAUL, Avijit, Hee JU, Sabarinathan RANGASAMY, Yumi SHIM a Joon Myong SONG, 2015. Nanosized silver (II) pyridoxine complex to cause greater inflammatory response and less cytotoxicity to RAW264.7 macrophage cells. *Nanoscale Research Letters* [online]. **10**, 140. ISSN 1931-7573. Dostupné z: doi:10.1186/s11671-015-0848-9
- PAVLÍK, Vojtěch, Luboš SOBOTKA, Jaroslav PEJCHAL, Martin ČEPA, Kristina NEŠPOROVÁ, Monika ARENBERGEROVÁ, Adéla MRÓZKOVÁ a Vladimír VELEBNÝ, 2021. Silver distribution in chronic wounds and the healing dynamics of chronic wounds treated with dressings containing silver and octenidine. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. **35**(5), e21580. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.202100065R
- PAVLÍK, Vojtěch, Martin SOJKA, Mária MAZÚROVÁ a Vladimír VELEBNÝ, 2019. Dual role of iodine, silver, chlorhexidine and octenidine as antimicrobial and antiprotease agents. *PLoS One* [online]. **14**(1), e0211055. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0211055
- POKORNÁ, Romana a Andrea MRÁZOVÁ, 2012. *Kompéndium hojení ran pro sestry*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-3371-5.
- POSPÍŠILOVÁ, Alena, nedatováno. *Programy kvality a standardy léčebných postupů* [online]. B.m.: ČSLR. Dostupné z: <https://www.cslr.cz/download/hojeni-ran-standard.pdf>
- PUNJATAEWAKUPT, Apirujee, Supamas NAPAVIDICHAYANUN a Pornanong ARAMWIT, 2019. The downside of antimicrobial agents for wound healing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* [online]. **38**(1), 39–54. ISSN 1435-4373. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-018-3393-5
- RAMACHANDRAN, L. K., 1956. Protein-Iodine Interaction. *Chemical Reviews* [online]. **56**(2), 199–218. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr50008a001
- RAYMENT, E. A., Z. UPTON a G. K. SHOOTER, 2008. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *The British Journal of Dermatology* [online]. **158**(5), 951–961. ISSN 0007-0963. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08462.x
- RIGO, Chiara, Letizia FERRONI, Ilaria TOCCO, Marco ROMAN, Ivan MUNIVRANA, Chiara GARDIN, Warren R. L. CAIRNS, Vincenzo VINDIGNI, Bruno AZZENA, Carlo BARBANTE a Barbara ZAVAN, 2013. Active silver nanoparticles for wound healing. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **14**(3), 4817–4840. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms14034817
- ROMAN, Marco, Chiara RIGO, Hiram CASTILLO-MICHEL, Dagmar S. URGAST, Jörg FELDMANN, Ivan MUNIVRANA, Vincenzo VINDIGNI, Ivan MIČETIĆ, Federico BENETTI, Carlo BARBANTE a Warren R. L. CAIRNS, 2020. Spatiotemporal distribution and speciation of silver nanoparticles in the healing wound. *Analyst* [online]. [vid. 2020-09-16]. ISSN 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/D0AN00607F
- SHI, Lei, Ryan ERMIS, Brett KIEDAISCH a Dennis CARSON, 2010. The effect of various wound dressings on the activity of debriding enzymes. *Advances in Skin & Wound Care* [online]. **23**(10), 456–462. ISSN 1538-8654. Dostupné z: doi:10.1097/01.ASW.0000383224.64524.ae
- SOUZA, Helena Ribeiro, Lucas Ribeiro de AZEVEDO, Lucas POSSEBON, Sara de Souza COSTA, Melina Mizusaki IYOMASA-PILON, Sonia Maria OLIANI a Ana Paula GIROL, 2017. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. *PLOS ONE* [online]. **12**(3), e0173417. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0173417
- STAHL, Jessica, Michael BRAUN, Joerg SIEBERT a Manfred KIETZMANN, 2011. The percutaneous permeation of a combination of 0.1% octenidine dihydrochloride and 2% 2-phenoxyethanol (octenisept®) through skin of different species in vitro. *BMC Veterinary Research* [online]. **7**, 44. ISSN 1746-6148. Dostupné z: doi:10.1186/1746-6148-7-44
- SULTANA, Jachmen, Motiur Rahman MOLLA, Mohammed KAMAL, M. SHAHIDULLAH, Ferdousy BEGUM a Md Abul BASHAR, 2009. Histological differences in wound healing in Maxillofacial region in patients with or without risk factors. *Bangladesh Journal of Pathology* [online]. **24**(1), 3–8. ISSN 2408-8420. Dostupné z: doi:10.3329/bjpath.v24i1.2874
- TAK, Yu Kyung, Sukdeb PAL, Pravin K. NAOGHARE, Sabarinathan RANGASAMY a Joon Myong SONG, 2015. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Scientific Reports* [online]. **5**, 16908. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep16908
- TROP, Marija, Michael NOVAK, Siegfried RODL, Bengt HELLBOM, Wolfgang KROELL a Walter GOESSLER, 2006. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *The Journal of Trauma* [online]. **60**(3), 648–652. ISSN 0022-5282. Dostupné z: doi:10.1097/01.ta.0000208126.22089.b6

- TRUFELLO, A. Mustakis, B. Urzúa ORELLANA, C. Lozano MORAGA, C. Lefimil PUENTE a I. MORALES-BOZO, 2014. Subclinical concentrations of chlorhexidine inhibit gelatinase activity of carious dentine in vitro. *Australian Dental Journal* [online]. **59**(1), 81–86. ISSN 1834-7819. Dostupné z: doi:10.1111/adj.12147
- TSENG, Kuo-Hsiung a Chih-Yu LIAO, 2011. Production of silver ions from colloidal silver by nanoparticle iontophoresis system. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **11**(3), 1991–1995. ISSN 1533-4880.
- VANSCHIEDT, Wolfgang, Keith HARDING, Luc TÉOT a Jörg SIEBERT, 2012. Effectiveness and tissue compatibility of a 12-week treatment of chronic venous leg ulcers with an octenidine based antiseptic--a randomized, double-blind controlled study. *International Wound Journal* [online]. **9**(3), 316–323. ISSN 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-481X.2011.00886.x
- VI, T. T. T., S. RAJESH KUMAR, B. ROUT, C. H. LIU, C. B. WONG, C. W. CHANG, C. H. CHEN, D. W. CHEN a S. J. LUE, 2018. The Preparation of Graphene Oxide-Silver Nanocomposites: the Effect of Silver Loads on Gram-Positive and Gram-Negative Antibacterial Activities. *Nanomaterials (Basel)* [online]. **8**(3). ISSN 2079-4991 (Print) 2079-4991 (Linking). Dostupné z: doi:10.3390/nano8030163
- WANG, L., W. DAI a L. LU, 2014. Osmotic stress-induced phosphorylation of H2AX by polo-like kinase 3 affects cell cycle progression in human corneal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **289**(43), 29827–29835. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.597161
- WESTBY, M.J., G. NORMAN, R.E.B. WATSON, N.A. CULLUM a J.C. DUMVILLE, 2020. Protease activity as a prognostic factor for wound healing in complex wounds. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **28**(5), 631–644. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12835
- WINTER, H. a N. HAAS, 2000. Granulation tissue flap technique in extensive wounds for covering exposed bone after tumor excision. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]* [online]. **26**(9), 829–834. ISSN 1076-0512. Dostupné z: doi:10.1046/j.1524-4725.2000.99291.x
- ZHAO, Xiaoxu, Tatsushi TOYOOKA a Yuko IBUKI, 2014. Silver ions enhance UVB-induced phosphorylation of histone H2AX. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. **55**(7), 556–565. Dostupné z: doi:10.1002/em.21875



## 7. SEZNAM PUBLIKACÍ

<https://orcid.org/0000-0002-6575-9726>,

### 2.12. *Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace*

**Pavlík, V.**, Sobotka, L., Pejchal, J., Čepa, M., Nešporová, K., Arenbergerová, M., Mrózková, A., Velebný, V. Silver distribution in chronic wounds and the healing dynamics of chronic wounds treated with dressings containing silver and octenidine. *FASEB J.* 2021 May;35(5):e21580. doi: 10.1096/fj.202100065R. PMID: 33908652. (IF 4,966)

Nešporová, K.\*, **Pavlík, V.\***, Šafránková, B., Vágnerová, H., Odráška, P., Žídek, O., Císařová N., Skoroplyas, S., Kubala, L., Velebný V. Effects of wound dressings containing silver on skin and immune cells. *Sci Rep.* 2020 Sep 16;10(1):15216. doi: 10.1038/s41598-020-72249-3. (IF 3,998)

\* sdílené prvoautorství.

**Pavlík, V.**, Sojka, M., Mazúrová, M., Velebný, V. Dual role of iodine, silver, chlorhexidine and octenidine as antimicrobial and antiprotease agents. *PLoS One.* 2019 Jan 31;14(1):e0211055. doi: 10.1371/journal.pone.0211055. (IF 2,766)

### 2.13. *Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace*

Koudelková L, Pataki AC, Tolde O, **Pavlík V**, Nobis M, Gemperle J, Anderson K, Brábek J, Rosel D. Novel FRET-Based Src Biosensor Reveals Mechanisms of Src Activation and Its Dynamics in Focal Adhesions. *Cell Chem Biol.* 2019 Feb 21;26(2):255-268.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.10.024. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30554912. (IF 7,739)

Tlapák J, Chmátal P, Oniscenko B, **Pavlík V**, Dosel P, Páral J, Lochman P. The effect of hyperbaric oxygen therapy on gene expression: microarray analysis on wound healing. *Undersea Hyperb Med.* 2020 First-Quarter;47(1):31-37. PMID: 32176944. (IF 0,748)

Huerta-Ángeles G, Brandejsová M, Štěpán P, **Pavlík V**, Starigazdová J, Orzol P, Kopecká K, Halamková P, Kulhánek J, Velebný V. Retinoic acid grafted to hyaluronan for skin delivery: Synthesis, stability studies, and biological evaluation. *Carbohydr Polym.* 2020 Mar 1;231:115733. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115733. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31888823. (IF 7,182)

Cechakova L, Ondrej M, **Pavlík V**, Jost P, Cizkova D, Bezrouk A, Pejchal J, Amaravadi RK, Winkler JD, Tichy A. A Potent Autophagy Inhibitor (Lys05) Enhances the Impact of Ionizing Radiation on Human Lung Cancer Cells H1299. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 23;20(23):5881. doi: 10.3390/ijms20235881. PMID: 31771188; PMCID: PMC6928878. (IF 4,183)

Klein P, Sojka M, Kucera J, Matonohova J, **Pavlík V**, Nemeč J, Kubickova G, Slavkovsky R, Szuszkiewicz K, Danek P, Rozkot M, Velebný V. A porcine model of skin wound infected with a polybacterial biofilm. *Biofouling.* 2018 Feb;34(2):226-236. doi: 10.1080/08927014.2018.1425684. PMID: 29405092. (IF 3,08)

Smirnou D, Knotek P, Nesporova K, Smejkalova D, **Pavlik, V**, Franke L, Velebny V. Ultrasound-assisted production of highly-purified  $\beta$ -glucan schizophyllan and characterization of its immune properties. *Process Biochemistry*. 2017 July;58:313-319. doi: 10.1016/j.procbio.2017.04.016 (IF 3,067)

Huerta-Angeles G, Brandejsová M, Kulhánek J, **Pavlík, V**, Šmejkalová D, Vágnerová H, Velebný V. Linolenic acid grafted hyaluronan: Process development, structural characterization, biological assessing, and stability studies. *Carbohydr Polym*. 2016 Nov 5;152:815-824. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.030. Epub 2016 Jul 9. PMID: 27516333. (IF 4,074)

Zámostná, K., Nevoral, J., Kott, T., Procházka, R., Orsák, M., Šulc, M., Pajkošová, V., **Pavlík, V.**, Žalmanová T., Hošková K., Jílek F., Klein P. A simple method for assessing hyaluronic acid production by cumulus-oocyte complexes. *Czech J. Anim. Sci*. 2016;61:251-261. doi: 10.17221/51/2015-cjas. (IF 0,809)

Kucera, J., Sojka, M., **Pavlik, V.**, Szuszkiewicz, K., Velebny, V., Klein, P. Multispecies biofilm in an artificial wound bed--A novel model for in vitro assessment of solid antimicrobial dressings. *J Microbiol Methods*. 2014 Aug;103:18-24. doi: 10.1016/j.mimet.2014.05.008. Epub 2014 May 28. PMID: 24880129. (IF 2,161)