

Univerzita Karlova  
3. lékařská fakulta



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

Disertační práce

Mgr. Vojtěch Pavlík

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

Praha 2021



**Identifikační záznam:**

PAVLÍK, Vojtěch. *Antimikrobiální, cytotoxické a antiproteinázové vlastnosti stříbra používaného pro léčbu chronických infikovaných ran. [Antimicrobial, cytotoxic, and antiprotease effects of silver used for treatment of infected wounds]*. Praha, 2021. 115 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Dermatovenerologická klinika FNKV. Školitel: doc. MUDr. Monika Arenbergerová, PhD.

**Klíčová slova:** antiseptika, stříbro, oktenidin, cytotoxicita, chronická rána, inhibice proteináz

**Keywords:** *antiseptics, silver, octenidine, cytotoxicity, chronic wound, protease inhibition*

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Ústí nad Orlicí, 28. 9. 2021

Mgr. Vojtěch Pavlík

## **Poděkování**

Děkuji všem kolegům a mentorům (bylo jich mnoho), od kterých jsem se mohl učit a posouvat se dál ve vědecké práci. Také díky všem, kteří mi vyšli vstříc a umožnili doktorské studium jak na straně zaměstnavatele (Contipro a.s., Mgr. Kristina Nešporová, Ph.D., doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.), tak na straně fakulty (doc. MUDr. Monika Arenbergerová, Ph.D.). Díky mé rodině za podporu a trpělivost. Díky přátelům, že se neptali příliš často, jestli už jsem skončil.



## Seznam zkratek

Ag-CMC	zkratka krytu se stříbrem s karboxymethyl celulórou, Aquacel Ag+
Ac	Acticoat
Ag	Aquacel Ag+
ATP	adenosin trifosfát
AU	arbitrary unit, relativní jednotka
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	bovinní sérum albumin
CEAP	klasifikační standard žilní nedostatečnosti
CI	konfidenční interval
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol, fluorescenční barvivo
DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
DFU	diabetický vřed
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	mezibuněčná hmota
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EDX	Energy-Dispersive X-ray spektroskopie
FBS	fetální bovinní sérum
H2AX	histon H2AX
HA	kyselina hyaluronová
HRP	křenová peroxidáza
IC50	50% inhibiční koncentrace
ICP-OES	emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IHC	imunohistochemická detekce
IHF	imunohistofluorescence
LDH	laktát dehydrogenáza
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
LPS	bakteriální lipopolysacharid
MAT	monocyty aktivující test
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MMP	matrix metaloproteináza

MRSA	methicilin-rezistentní zlatý stafylokok
MTT	methyl-thiazolyl-tetrazolium
MWCO	velikost molekul procházející filtrem
NHDF	normální lidské fibroblasty
OCT-HA	kryt s oktenidinem a kyselinou hyaluronovou, Sorelex
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFA	paraformaldehyd
PHMB	polyhexanid, polyhexamethylen biguanid
PMA	forbol 12-myristát 13-acetát
PVP	polyvinyl pyrolidon
RLU	relativní jednotka luminescence
ROS	reaktivní kyslíkové intermediáty
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute medium
RT	pokožová teplota
SASP	sekretom typický pro senescentní buňky
Sc	Silvercel
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecyl sulfát sodný
SEM	střední chyba průměru
SSD	sulfadiazin stříbrný
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteinázy
TMB	tetramethyl benzidin
VAS	vizuální analogová škála
VLU	bércový vřed
VRE	enterokok rezistentní na vankomycin



## 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. Ta podporuje prozánětlivou odpověď organismu, která mimo jiné brání postupu rány do dalších fází hojení. V důsledku bakteriální infekce jsou také zvýšené hladiny proteináz, které degradují mezibuněčnou hmotu. Navíc řada bakterií produkuje vlastní proteinázy, aby si zajistily živiny a zvýšily svou virulenci.

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. Jeho efekt byl v této indikaci prokázán řadou klinických studií.

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 na planktonické bakterie v roztoku a v kultuře na Petriho misce. 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, nejméně cytotoxický byl kryt Silvercel. Tento prostředek ale také patřil mezi nejméně antimikrobiálně účinné. Abychom zjistili, jak jsou *in vitro* výsledky na buňkách relevantní k cytotoxicitě v tkáních, aplikovali jsme stříbrné kryty na dermis prasečí kůže *ex vivo*. V dermis jsme detekovali průnik stříbra pomocí ICP-OES i histologicky autometalografickou metodou. S průnikem stříbra do kůže byl spjat i nárůst DNA poškození a genové exprese charakteristické pro stresovou odpověď. To, že stříbro obsažené v krytech je schopné vyvolat oxidační poškození a DNA zlomy, jsme potvrdili na buňkách, ke kterým byly přidány výluhy z krytů. 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 byla sledována u stříbra ve formě soli – laktátu stříbrného. Laktát stříbrný inhiboval lidské neutrofilové proteinázy, MMP-2 proteinázu, fibroblastové a keratinocytární proteinázy a bakteriální proteinázy. Efekt byl pozorován v závislosti na dávce stříbra. Nebyl pozorován specifický inhibiční efekt stříbra na sledované proteinázy. Zjistili jsme, že stříbro také inhibovalo endogenní proteinázy v prasečí kůži *ex vivo*. Obdobně jako u komerčních krytů bylo tedy ukázáno, že stříbro ve formě soli laktátu stříbrného může pronikat do prasečí kůže a působit v ní.

Stříbro se hojně používá v krytech chronických ran pro své dobré antimikrobiální vlastnosti. Naše výsledky cytotoxicity, distribuce stříbra v ráně a antiproteinázové aktivity však ukazují, že působení stříbra má mnoho dalších aspektů kromě zamýšleného antimikrobiálního. Inhibice nadměrné aktivity proteináz je v případě chronických ran vnímána jako pozitivní, cytotoxicita vůči stromálním nebo imunitním buňkám jako negativní. Ukázali jsme, že stříbro proniká do dermis, čímž jsme simulovali v laboratorních podmínkách expozici ran stříbrným krytům. Tato pozorování byla potvrzena i na ranách pacientů. Naše výsledky doplňují informace získané z klinických prací ukazujících zvýšenou hladinu stříbra v krvi a orgánech u pacientů, jejichž rány byly léčeny kryty se stříbrem. Je tedy na místě zvážit v dané situaci použití krytu se stříbrem po nezbytně krátkou dobu, nebo zvolit jiné antiseptikum, které je lépe tolerováno (např. oktenidin dihydrochlorid či polyhexanid).

## 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. Bacteria provoke a proinflammatory response, which disrupts the proper sequence of wound healing phases. Also, inflammation raises the production and activity of proteases. These enzymes digest the extracellular matrix, resulting in deceleration or hindrance of granulation tissue maturation. In addition to the inflammation-induced proteases, some bacterial species produce proteases that contribute to tissue degradation and increase bacterial virulence.

Antiseptics are used to lower the bacterial burden in chronic wounds. Antiseptics act non-specifically, which may be their asset as well as drawback. They act as a double-edged sword. Antiseptics act on bacterial cells. However, host cells are caught in the crossfire as antiseptics may damage eukaryotic cells as well. The damage of eukaryotic cells complicates wound closure. Silver is probably the most used antiseptic to treat chronic wounds. Silver is also suspected of inducing nonspecific damage to eukaryotic as well as prokaryotic cells.

This doctoral thesis is aimed at investigating the multitude of effects that silver may exhibit. We chose *in vitro* settings mimicking specific aspects of chronic wounds. Four commercially available wound healing dressings impregnated with silver were compared side-by-side. The antimicrobial properties of the dressings were compared in planktonic bacteria in liquid culture as well as seeded on a Petri dish. 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. The least cytotoxic and also one of the least antimicrobial efficient was Silvercel. We applied the silver dressings onto porcine dermis to evaluate the relevance of our *in vitro* cytotoxicity observations. We detected silver with ICP-OES and with a histological method – silver autometallography. Silver penetrated into the skin and caused DNA damage and the upregulation of stress-response genes. We further confirmed that silver from the dressing extracts induced oxidative stress and DNA breaks using cultured skin cells. We showed that silver may decrease proinflammatory response of neutrophils (in contrast to monocytes) while concomitantly increasing their 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 in the parts treated with the dressing with hyaluronan and octenidine more prominently. The gene expression of metallothioneins was increased in the parts of the wounds treated with the silver dressing.

The antiprotease activity was observed using the salt of silver – silver lactate. Silver lactate inhibited proteases produced by human neutrophils, fibroblasts, and keratinocytes, as well as recombinant MMP-2 and trypsin. Also, silver lactate inhibited bacterial proteases produced by species isolated from chronic wounds. The inhibitory effect was dose-dependent. However, we did not observe any specificity towards any of the tested proteases; the proteases were inhibited within a similar concentration range. As a next step, we observed inhibition of endogenous proteases in porcine skin by silver lactate. Again, we showed that silver may penetrate the dermis.

Silver is widely used in wound dressings due to its well-documented antimicrobial properties. The inhibition of excessive protease activity in chronic wounds is considered beneficial. Cytotoxicity towards stromal or immune cells is negative. We showed that silver penetrated into the dermis, which we compared in laboratory settings to the exposition of chronic wounds to silver dressings. Silver penetration through extracellular matrix tissue was subsequently confirmed in chronic human wounds.

We revealed some of the silver (side) effects, but there may be indeed more (effect on inflammatory mediators, growth factors etc.) that may play a role in chronic wound healing. However, the respective side effects are hard to observe or dissect from other events (i.e. ongoing inflammation) due to the complex nature of the chronic wound and its underlying causes.

Our results complement published clinical observations, which showed silver in the blood and organs of patients treated with silver dressings. One should consider applying a silver-impregnated dressing for a minimum period or choosing another antiseptic with a better cytotoxicity profile (i.e. octenidine dihydrochloride or polyhexanide).

# Obsah

1.	LITERÁRNÍ ÚVOD .....	17
1.1.	Akutní rána a její hojení .....	17
1.2.	Chronická kožní rána .....	19
1.2.1.	Diabetické vředy .....	20
1.2.2.	Bércové vředy žilního původu .....	21
1.2.3.	Patologické změny v hojení bércových vředů .....	21
1.2.4.	Zvýšená proteolytická aktivita v chronických ranách .....	23
1.2.5.	Bakterie jako komplikující faktor hojení .....	24
1.3.	Antiseptika .....	27
1.4.	Stříbro v léčbě chronických ran .....	27
1.4.1.	Formy stříbra užívané v prostředcích pro léčbu ran .....	27
1.4.2.	Interakce stříbra s biomolekulami.....	28
1.4.3.	Antimikrobiální vlastnosti stříbra .....	28
1.4.4.	Cytotoxické efekty stříbra.....	30
1.4.5.	DNA poškození vyvolané stříbrem.....	31
1.4.6.	Pronikání stříbra do rány.....	31
1.4.7.	Vliv stříbra na hojení ran .....	32
1.4.8.	Antiproteinázové vlastnosti stříbra .....	34
1.5.	Oktenidin – antiseptikum používané v léčbě chronických ran .....	34
1.6.	Hyaluronan v hojení a léčbě ran.....	35
2.	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	36
3.	METODY .....	37
3.1.	Testované bandáže .....	37
3.2.	Příprava výluhů bandáží.....	37
3.3.	Určení koncentrace stříbra ve výluzích.....	37
3.4.	Skenovací elektronová mikroskopie .....	38

3.5.	Zkouška přímé oxidační aktivity bandáží.....	38
3.6.	Test pronikání stříbra skrz prasečí kůži <i>ex vivo</i> .....	38
3.7.	Kultivace kůže <i>ex vivo</i> .....	39
3.8.	Imunohistologické a histologické barvení.....	39
3.9.	Analýza genová exprese pomocí real-time PCR.....	39
3.10.	Western blot.....	40
3.11.	Antibakteriální aktivita výluhů bandáží.....	40
3.12.	Kultivace eukaryotických buněk.....	40
3.13.	Měření viability.....	41
3.14.	Cytotoxicita po přímém kontaktu bandáží s buňkami.....	41
3.15.	Imunofluorescenční barvení.....	41
3.16.	Měření vnitrobuněčného oxidačního stresu.....	42
3.17.	Oxidační vzplanutí fagocytů v plné krvi.....	42
3.18.	Monocyty aktivující test.....	43
3.19.	Test hemolýzy.....	43
3.20.	Toxicita stanovená z uvolněné LDH.....	43
3.21.	Etické schválení.....	43
3.22.	Vstupní a vylučující kritéria účasti pacientů ve studii.....	44
3.23.	Demografie účastníků studie.....	44
3.24.	Protokol studie.....	44
3.25.	Zpracování histologických vzorků.....	45
3.26.	Histologické hodnocení.....	46
3.27.	Fluorescenční mikroskopie.....	47
3.28.	Genová exprese.....	47
3.29.	Zdroje proteináz.....	48
3.30.	Testované antimikrobiální látky.....	48
3.31.	Želatinová zymografie.....	49
3.32.	Fluorogenní zymografie.....	49

3.33.	<i>Ex vivo</i> prasečí kůže .....	50
3.34.	Zymografie <i>in situ</i> .....	50
3.35.	Statistické zpracování dat .....	51
4.	VÝSLEDKY .....	52
4.1.	Charakterizace sledovaných bandáží .....	52
4.2.	Množství stříbra uvolněného z bandáží do kultivačního média .....	54
4.3.	Antimikrobiální účinnost studovaných bandáží .....	54
4.4.	Přímá tvorba reaktivních kyslíkových intermediátů .....	55
4.5.	Srovnání cytotoxicity různých stříbrných krytů <i>in vitro</i> .....	56
4.5.1.	MTT test.....	56
4.5.2.	Test inhibice růstu po přímém kontaktu buněk.....	57
4.5.3.	Hemolýza vyvolaná stříbrnými bandážemi .....	57
4.5.4.	Cytotoxicita stříbra a aktivace imunitních buněk .....	58
4.6.	Oxidační poškození buněk <i>in vitro</i> .....	60
4.7.	DNA poškození vlivem stříbrných krytů .....	61
4.7.1.	<i>In vitro</i> .....	61
4.7.2.	<i>Ex vivo</i> .....	61
4.8.	Genová exprese stresových genů vyvolaná stříbrnými kryty.....	64
4.9.	Pronikání stříbra do prasečí kůže <i>ex vivo</i> .....	64
4.10.	Distribuce stříbra v chronických ranách .....	65
4.11.	Srovnání hojení v částech léčených OCT-HA a Ag-CMC.....	66
4.11.1.	Imunitní infiltrát .....	66
4.11.2.	Histologické parametry hojení .....	67
4.11.3.	Expresa metalothioneinů .....	70
4.12.	Vliv stříbra na aktivitu proteináz <i>in vitro</i> .....	72
4.13.	Vliv stříbra na aktivitu proteináz <i>ex vivo</i> .....	74
5.	DISKUZE .....	76
5.1.	<i>In vitro</i> a <i>ex vivo</i> antimikrobiální a cytotoxické efekty stříbra .....	76

5.2.	Stříbro v chronických ranách.....	79
5.3.	Vliv stříbra a jiných antiseptik na proteinázy .....	82
6.	ZÁVĚR.....	86
7.	SEZNAM LITERATURY .....	89
8.	PUBLIKACE A PREZENTACE AUTORA .....	112
8.1.	Publikace přímo se týkající tématu doktorátu .....	112
8.2.	Konferenční příspěvky týkající se tématu doktorátu .....	112
8.3.	Ostatní impaktované publikace.....	113
8.4.	Ostatní příspěvky na konferencích .....	114



# 1. LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1. Akutní rána a její hojení

Rána je charakterizována jako porušení integrity kožního krytu. Narušení kožního povrchu je spojeno se ztrátou kožní integrity, která může zasáhnout různě hluboko do podkoží (Pospíšilová nedatováno). Akutní rány vznikají v důsledku mechanického, termického nebo chemického poškození.

Hojení akutní rány se odehrává v několika překrývajících se fázích. Nejprve nastává zástava krvácení následovaná zánětlivou fází. Ta se projevuje klasickými Celsovými znaky a je odpovědí tkáně na její narušení. Během zánětu by mělo dojít k odstranění buněčného debris a zabránění infekce rány (Wilkinson a Hardman 2020). Narušené keratinocyty uvolní z cytoplazmy prozánětlivý IL-1 $\beta$  a krevní destičky jsou při agregaci zdrojem růstových faktorů (např. TGF- $\beta$ ) (Eming et al. 2007). U nezasazených okolních endoteliálních buněk vyvolají parakrinně se šířící cytokiny expresi povrchových adhezivních molekul, které přispívají k diapedéze neutrofilů a ostatních leukocytů do postižené oblasti (Tonnesen 1989; Wright et al. 2010). Neutrofilů jsou hlavní součástí prvotní odpovědi organismu na hrozící bakteriální infekci. Neutrofilů jsou chemotakticky vlákány do místa působení faktory produkovanými samotným organismem nebo látkami bakteriálního původu. Z cytoplazmatických granulí neutrofilů se uvolňuje myeloperoxidáza, matrix metaloproteinázy (MMP), fosfolipázy a prozánětlivé cytokiny (Eming et al. 2007). Neutrofilní granulocyty rovněž spolupracují s T-lymfocyty prezentací antigenů v MHC komplexech II. třídy na svém povrchu. Neutrofilů se tak přímo i nepřímo podílejí na destrukci případných mikroorganismů a odstraňují buněčnou debris. Zároveň ale mohou poškozovat okolní zdravé buňky.

V průběhu dvou dnů do rány migrují pod vlivem prozánětlivých molekul (např. MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, CCL5) ve větším množství monocyty, které diferencují v makrofágy a doplní tak počty již přítomných tkáňových makrofágů (Henderson et al. 2003). Makrofágy dále produkují pro zánětlivé cytokiny (např. IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, MIP-1 $\alpha$  a interferony), jejichž exprese se v průběhu hojení rány mění. Makrofágy fagocytují buněčné zbytky a mikroby a na svém povrchu vystavují komponenty bakterií, hub a virů, čímž přispívají k adaptivní odpovědi imunitního systému prezentací antigenů lymfocytům (Plüddemann et al. 2011). Makrofágy se podílejí na potlačení zánětu; prozánětlivé makrofágy I. typu jsou nahrazovány protizánětlivými makrofágy II. typu (Sindrilaru a Scharffetter-Kochanek 2013).

V zánětlivé imunitní odpovědi proti patogenům se uplatňují kyslíkové radikály (ROS), které zahrnují superoxidové anionty (O $_2^-$ ), hydroxylové radikály (OH $^-$ ), kyselinu chlornou (HClO), peroxid vodíku (H $_2$ O $_2$ ) a peroxynitril (ONOO $^-$ ). Tyto molekuly jsou produkovány řadou

enzymů: xanthin oxidázou, lipoxygenázou, cyklooxygenázou, myeloperoxidázou, NO syntázou a NADPH oxidázou. Původcem ROS v ráně jsou hlavně leukocyty, v nichž probíhá oxidativní vzplanutí (Schäfer a Werner 2008). Kyslíkové radikály slouží jako nespecifické antimikrobiální látky, jejichž nedostatečná produkce vede k vyšší náchylnosti k bakteriálním infekcím (Bryan et al. 2012). Za normálních okolností slouží ROS k debridementu – odstranění poškozených molekul mezibuněčné hmoty a nekrotických buněk. ROS také ovlivňují buněčnou signalizaci a průběh zánětu. Kyslíkové radikály potencují aktivitu některých proteináz a inaktivují proteinázové inhibitory (Anderson et al. 1991).

Ranový defekt je vyplňován granulační tkání, která se skládá z kolagenových vláken, fibronektinu, glykopolysacharidů a polysacharidů (např. kyseliny hyaluronové) (Singer a Clark 1999). V ráně se mění složení mezibuněčné hmoty, které má jinou poddajnost a signální vlastnosti pro stromální buňky. Kolagen I a decorin s lumikanem (SLRP, glykoproteiny bohaté na leucin) omezují buněčnou migraci (Smith et al. 2006; Rodríguez et al. 2010). Tyto proteiny jsou nahrazeny nejprve poddajným fibrinem v průběhu hemostáze a následně fibronektinem, kolagenem III a tenascinem C, které především tvoří nezralou granulační tkáň (Wells et al. 2016).

Mezibuněčná hmota váže a chrání růstové faktory před proteinázami. Zároveň jsou tyto signální molekuly sekvestrovány a proteinázy je rozštěpením stávající mezibuněčné hmoty mohou zpřístupnit pro vazbu na buněčné receptory. Mezibuněčná hmota je produkována fibroblasty, které do spodiny rány migrují z okolní tukové a vazivové tkáně, případně se *in situ* přeměňují epiteliálně-mezenchymálním přechodem z epiteliálních buněk nebo z tkáňových mezenchymálních buněk (Spyrou et al. 1998). Infiltrace spodiny rány fibroblasty je výrazně ovlivněna i přítomností makrofágů produkujících cytokiny – experimentální rány morčat ošetřené antimakrofágovým sérem vykazovaly sníženou chemoatrakci fibroblastů a sníženou fibrózu (Leibovich a Ross 1975).

Fibroblasty jsou stimulovány přítomnými růstovými faktory (např. FGF, PDGF) k proliferaci a produkci mezibuněčné hmoty (Barrientos et al. 2008). Produkce mezibuněčné hmoty fibroblasty je také stimulována jejich kontaktem s fibronektinem a fibrinem pomocí integrinových receptorů. Složení okolní mezibuněčné hmoty ovlivňuje expresi specifických integrinových receptorů v membráně fibroblastů (Xu a Clark 1996). V časně fázi produkují fibroblasty a myofibroblasty provizorní matrix sestávající z tenascinů, fibronektinu a zvýšeného množství kolagenu III (Loots et al. 1998; Xue a Jackson 2015). Později se zvýrazní poměr produkce kolagenu I vůči kolagenu III. Část fibroblastů je stimulována faktorem TGF- $\beta$  k přeměně na myofibroblasty. Ty poté kontrahují okraje rány a zmenšují tak prostor, který je potřeba vyplnit granulační tkání a produkují mezibuněčnou hmotu (Gabbiani 2003).

Hypoxické podmínky a růstové faktory (HIF, VEGF, angiopoietin aj.) stimulují neovaskularizaci, která má zajistit dostatečnou zásobu živin ve vznikající granulační tkáni. Endoteliální buňky jsou těmito růstovými faktory stimulovány k proliferaci, migraci a tvorbě nových kapilár. Po tvorbě fibrinové zátky endoteliální buňky migrují do perivaskulárního prostoru. To je stimulováno absencí okolních endoteliálních buněk a organizované mezibuněčné hmoty (Arnold et al. 1987). Endoteliální buňky produkují matrix metaloproteinázy, kterými si připravují cestu v provizorní matrix a bazální membráně (Kähäri a Saarialho-Kere 1997). Destičkový růstový faktor PDGF atrahuje pericyty a buňky hladkého svalstva, čímž se zvyšuje soudržnost kapilární sítě (Barrientos et al. 2008). Postupem hojení granulační tkáň maturuje, získává na pevnosti, přeměňuje se na jizvu a redukuje se i kapilární síť. To je pravděpodobně řízeno produkcí cytokinů angiostatinu, endostatinu a angiopoietinu (Singer a Clark 1999). Nadbytečný počet fibroblastů, myofibroblastů a cévních buněk je snížen apoptózou (Desmoulière et al. 1995). S rezolucí zánětu klesá v ráně počet zánětlivých buněk, které jsou hlavním zdrojem mitogenních cytokinů a růstových faktorů. Navíc nadbytečné růstové faktory mohou být štěpeny matrix metaloproteinázami, které remodelují jizevnatou tkáň. Zbylé fibroblasty reformují kolagenní vlákna do provázaných svazků, čímž získává jizva mechanickou odolnost (Toriseva a Kähäri 2009). Kromě výplně defektu dochází i k reepitelizaci rány. Prozánětlivé cytokiny a růstové faktory (nejčastěji tyto – IL-1, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , EGF, HG-EGF, IL-8, IFN $\gamma$ ) aktivují keratinocyty na okrajích rány. Ty začnou proliferovat, změni expresi integrinů a začnou produkovat matrix metaloproteinázy, jimiž štěpí laminin a narušují tak hemidesmosomy a kontakt s bazální laminou. Keratinocyty z okrajů tak migrují do středu rány, přičemž oddělí strup od granulační tkáně (Tsuruta et al. 2011). Po potažení rány základem nové epidermis se keratinocyty přestávají dělit a migrovat, pravděpodobně zvýšenou koncentrací TGF- $\beta$  produkovaného fibroblasty, a stratifikují (Freedberg et al. 2001).

## 1.2. 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.

### 1.2.1. Diabetické vředy

Nedávná studie diabetických vředů uvedla prevalenci celosvětového průměru 6,3 % (Evropa 5,1%, Severní Amerika 13 %) (Sen 2019). Diabetické vředy se objevují častěji u pacientů s diabetes mellitus typu 2 než u diabetu typu 1 (Sen 2019). V nemalé části případů (4,7 – 43%, v ČR 23,1 %) dochází k amputaci (Costa et al. 2017; Jirkovská et al. 2016). Existuje několik škál klasifikace diabetických vředů. Nejrozšířenější je Wagnerovo skóre, kde 0 odpovídá povrchové ulceraci, 1 – hlubší ulcerace (penetrující do subkutánní tkáně), bez závažnější infekce, 2 – hluboká ulcerace (pod plantární fascií, penetrující do kostí a kloubů) a/nebo povrchová ulcerace povrchovější, ale se závažnou infekcí, 4 – lokalizovaná gangréna, 5 – gangréna celé nohy (Jirkovská et al. 2016). Oproti žilním bérčovým vředům diabetické rány postihují často části nohy, kde dochází k tlaku a mikrotraumatům – například na chodidlech. Problematická je i nadváha a s ní spojené nadměrný tlak na končetiny. Důležitou součástí léčby je spolupráce pacienta s lékařem a ochrana rány a jejího okolí vhodnou obuví nebo jinými pomůckami (off-loading). Významnými přítěžujícími faktory v léčbě diabetické nohy vedoucím k větší pravděpodobnosti amputace jsou chudokrevnost, ischemická choroba dolní končetiny, arteriální hypertenze a vyšší věk (Costa et al. 2017). Prokrvení neblaze ovlivňuje kouření, což je další z přítěžujících faktorů hojení diabetického vředu. Patofyziologie diabetických vředů zahrnuje neuropatii, makro- i mikroangiopatii. Neuropatie, neboli ztráta citlivosti, vede k tomu, že postižený si neuvědomí, že je zraněn, nebo nevěnuje zranění dostatečnou pozornost a nedojde k včasnému ošetření rány. Neuropatie hraje roli i v Charcotově noze, kdy dochází k mikrotraumatům a deformaci chodidla. Neléčená rána se zvětší a infikuje se. V důsledku zvýšené hladiny glukózy vznikají v tkáních produkty pokročilé neenzymatické glykace (AGE) vznikající z produktů Amadoriho reakce. Imunitní systém má do určité míry schopnost tyto látky odstranit, ale v případě dekompenzovaného diabetu je rychlost jejich vzniku výrazně vyšší. Neenzymatické glykaci podléhají i LDL a sérové proteiny, které aktivují endoteliální buňky a vedou k tvorbě mezibuněčné hmoty, což vede ke snížení pružnosti cév (Kennedy a Lyons 1989; Schalkwijk et al. 2002). Ke snížení pružnosti nejen mezibuněčné hmoty okolo cév může vést provázání kolagenních vláken, ke kterému dochází také v důsledku neenzymatické glykace (Kennedy a Lyons 1989). Větší rigidita kolagenu může být také příčinou nižší pohyblivosti kloubů diabetiků. Příčina diabetické neuropatie není přesně objasněna, ale AGE produkty vedou k demyelinizaci periferních nervů a narušují regeneraci nervů (Sugimoto et al. 2008). Dalšími faktory, které přispívají k neuropatii senzoričkových a motorických nervů jsou aktivace protein kinázy C, narušení metabolismu mastných kyselin, aktivace polyolové dráhy a hexosaminové dráhy aj. (Noor et al. 2015).

### 1.2.2. Bércové vředy žilního původu

Prevalence bércových vředů se pohybuje okolo 2% a stoupá nad 5% s věkem překračujícím 65 let (Raffetto et al. 2021). Chronické rány se často objevují u starších pacientů, kteří mají narušený imunitní systém, sníženou pohyblivost a poruchu žilního řečiště v oblasti bérce. Poslední jmenovaný faktor je pro tvorbu žilních bércových vředů kritický. Podle CEAP klasifikace, která se rozděluje klinická stádia chronické žilní nedostatečnosti do sedmi kategorií C0 až C6, spadá tvorba a hojení bércových vředů do dvou nejzávažnějších kategorií C5 a C6 (Eklöf et al. 2004). Příčiny vzniku chronické žilní insuficience jsou multifaktoriální a kombinují vrozené dispozice s vnějšími vlivy. Jsou to dědičnost, obezita, dlouhé stání nebo sezení na židli, nedostatek dietní vlákniny/zácpa, nedostatek pohybu, kouření a u žen počet těhotenství, perorální antikoncepce, nošení vysokých podpatků, podvazků nebo korzetu (Musil 2005; Raffetto et al. 2021). Při chronické žilní nedostatečnosti je narušen návrat venózní krve a dochází k žilní hypertenzi a refluxu a obstrukci žil. Postižen bývá jak povrchový (v. *saphena magna* a v. *saphena parva*) tak hluboký systém žil bérce (žíly bérce, popliteální žíla) a perforátory. Reflux krve v důsledku chlopenní insuficience nebo obstrukce (posttrombotické změny zužující žilní průsvit) nebo kombinace refluxu a obstrukce vedou k hromadění krve a vzestupu žilního tlaku (Musil 2005). To se projevuje nízkým indexem kotník – paže. Za normálních podmínek žilnímu návratu přispívá stah svalů v lýtku, který pomáhá vypuzení krve z hlubokých žil bérce. Inkompetence hlubokých žil je zpočátku kompenzována stahem lýtkového svalu, ale postupně dochází k sekundární inkompetenci chlopenní perforátorů a přenosu tlaku z hlubokého do povrchového žilního systému (Raffetto et al. 2021).

### 1.2.3. Patologické změny v hojení bércových vředů

U žil pacientů s bércovými vředy a chronickou žilní nedostatečností dochází k tvorbě fibrinové manžety. Podle původní teorie měla tato manžeta vznikat v důsledku zvýšené permeability žil a (neorganizovanému) ukládání fibrinu. Nicméně fibrinová manžeta je organizovaná struktura z fibrinu, kolagenu a lamininu, v níž jsou přítomné leukocyty, což spíše nasvědčuje, že vzniká aktivně ve fibrotickém procesu (Herrick et al. 1992). Žíly pacientů s chronickou žilní nedostatečností mohou být poškozovány střídáním ischemické a reperfuční fáze. Během ischemické fáze dochází u buněk bez kyslíku k acidóze, sníženému obsahu ATP a zvýšení hypoxanthinu a adhezivních molekul pro leukocyty (Mustoe 2004). Po obnově krevního toku dojde k záhytu leukocytů a uvolnění prozánětlivých mediátorů. Při přeměně hypoxanthinu na xanthin jsou uvolněny kyslíkové radikály (Eltzschig a Collard 2004).

Z histopatologického hlediska je v okrajích nehojících se bérčových vředů snižená celková buněčnost a vaskulární proliferace. Je také snižená produkce kolagenu, avšak chronické nehojící se rány se vyznačují zvýšeným množstvím denzních fibrilárních vláken.

Rovněž přítomnost zánětlivého imunitního infiltrátu (neutrofilů, makrofágy a B lymfocyty) je v chronických ranách větší (Loots et al. 1998). Leukocyty jsou zachycovány a aktivovány ve fibrinové manžetě (Smith et al. 1988). Dochází k jejich aktivaci a uvolnění prozánětlivých cytokinů a mediátorů a matrix metaloproteináz, které narušují žilní stěnu a indukují další záchyt imunitních buněk, takže dochází k nárůstu zánětu (Raffetto et al. 2021).

Samotné imunitní buňky jsou v ranách zdrojem proteináz – v exsudátech z chronických ran byla nalezena zvýšená hladina neutrofilové elastázy (Grinnell a Zhu 1996). Imunitní buňky navíc indukují expresi proteináz u fibroblastů (Distler et al. 2005). Nejspíš proto je v chronických ranách pozorována zvýšená exprese matrix metaloproteináz (Herrick et al. 1992; Toriseva a Kähäri 2009). Ač jsou matrix metaloproteinázy přítomny v akutních i v chronických ranách, ve stromální části chronické rány byly MMP-1 a MMP-3 zvýšené oproti akutním ranám a v epidermální části chyběla exprese inhibitoru matrix metaloproteináz TIMP-1 (Saarialho-Kere 1998). Kromě matrix metaloproteináz bylo v chronických ranách ukázáno i zvýšení aktivity proteinázy urokinázového plasminového aktivátoru (uPA) v bázi žilních bérčových vředů oproti okolní kůži (Rogers et al. 1999).

Kromě zvýšené aktivity proteináz je v chronických ranách (bérčových vředech) i narušená produkce mezibuněčné hmoty. Jak bylo výše zmíněno, jako jeden ze znaků chronických ran na histologické úrovni byla ukázána přítomnost fibrinových manžet (fibrin cuff) okolo kapilár. Tyto struktury jsou charakteristické přítomností silného ohraničení kapilár tvořeného fibrinem, lamininem, tenascinem a kolageny I a III. Postupem hojení fibrinové manžety mizí. Narušení produkce mezibuněčné hmoty bylo také zjištěno v případě proteoglykanů glypikanu a syndekanu 1 a 4; ty jsou v normální kůži produkovány do okolí keratinocytů, kdežto v chronických ranách byly tyto molekuly pozorovány jako intracelulární granula keratinocytů (Lundqvist a Schmidtchen 2001). Ve srovnání s akutním hojením ran chronické rány bérčových a diabetických vředů vykazovaly abnormálně vysokou produkci fibronektinu, chondroitin sulfátu a tenascinu, což spíš odpovídalo rané fázi hojení akutních ran (Loots et al. 1998).

Během fyziologického zánětu i při dlouhotrvajícím chronickém zánětu v bérčových vředech jsou enzymaticky produkovány kyslíkové radikály. Rovněž bylo ukázáno, že v chronických nehojících se ranách je zvýšená hladina železo vázajícího proteinu ferritinu (Yeoh-Ellerton a Stacey 2003). Hojení chronických ran bylo doprovázeno snížením hemosiderinových depotů v ranách (Herrick et al. 1992) a snížením koncentrace ferritinu

v exsudátu z rány (Yeoh-Ellerton a Stacey 2003). Z hlediska tvorby kyslíkových radikálů to může hrát významnou roli, protože volné železo prochází cykly oxidace a redukce a dochází ke vzniku kyslíkových radikálů. Experimentálně bylo na myších ukázáno, že při blokaci antioxidantních enzymů dojde k poruše hojení a zástavě v zánětlivé fázi, což velmi připomíná situaci v lidských chronických ranách (Dhall et al. 2014).

O zvýšeném kyslíkovém stresu v bércových vředech svědčí i nadměrné hodnoty 8-isoprostanu, který vzniká *in vivo* peroxidací z arachidonové kyseliny (Yeoh-Ellerton a Stacey 2003). Rozdílné výsledky ukázala jiná studie – ani produkt lipidové oxidace malondialdehyd ani karbonyl vznikající v důsledku proteinové oxidace nebyly rozdílné mezi exsudáty z akutních a chronických ran (Moseley et al. 2004). Vzhledem k nejednoznačné roli ROS v chronických ranách jsou tedy potřeba další studie.

Obě výše uvedené práce zkoumaly markery oxidačního stresu v exsudátu z rány. Je pravděpodobné, že hladina kyslíkových radikálů bude vyšší v lůžku rány a bude ovlivňovat rezidentní fibroblasty. Ty poté vstupují do senescentního stavu, kdy se samy stávají zdrojem prozánětlivých molekul (Shelton et al. 1999; Coppé et al. 2008); uvolňují soubor takzvaných SASP proteinů (senescence associated secretory phenotype). Patří mezi ně řada prozánětlivých intermediátů (IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8), růstových faktorů (FGF, VEGF, KGF) a proteináz (MMP-1, -3, -10, uPA). Jistě není náhodné, že exprese těchto proteinů byla zvýšená v chronických ranách a zdrojem mohou být z velké části právě senescentní fibroblasty. Přítomnost fibroblastů vykazujících senescentní znaky (omezená schopnost proliferace *in vitro*, zvýšená aktivita  $\beta$ -galaktosidázy a prozánětlivý profil) byly ukázány na biopsiích z chronických ran (Berg et al. 1998) i na *ex vivo* kultivovaných fibroblastech (Wall et al. 2008). Rovněž bylo ukázáno, že senescentní fibroblasty mají narušenou tvorbu mezibuněčné hmoty – nadměrně produkují fibronectin (Mendez et al. 1998). Toto narušení produkce granulační tkáně fibroblasty může být spojeno se sníženou odpovědí na růstový faktor TGF- $\beta$  (Cowin et al. 2001).

#### 1.2.4. Zvýšená proteolytická aktivita v chronických ranách

Dalším faktorem komplikujícím hojení chronických ran je zvýšená proteolytická aktivita proteináz (především matrix metaloproteináz, MMPs). Aby mohlo hojení zdárně pokračovat, nadměrná proteolytická aktivita musí klesnout (Rayment et al. 2008). 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).

Je proto důležité regulovat nadměrnou proteolýzu v ranách. Kvůli závažnosti důsledků zvýšené proteinázové aktivity byly vyvinuty kryty zaměřené právě na snížení aktivity hostitelských metaloproteináz a serinových proteináz. Toho je možné dosáhnout nespecifickou vazbou na bandáž (McCarty et al. 2015) nebo zakomponování alternativní “návnady” ve formě kolagenového substrátu (Kloeters et al. 2016).

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 spojováno se zlepšeným hojením chronických ran.

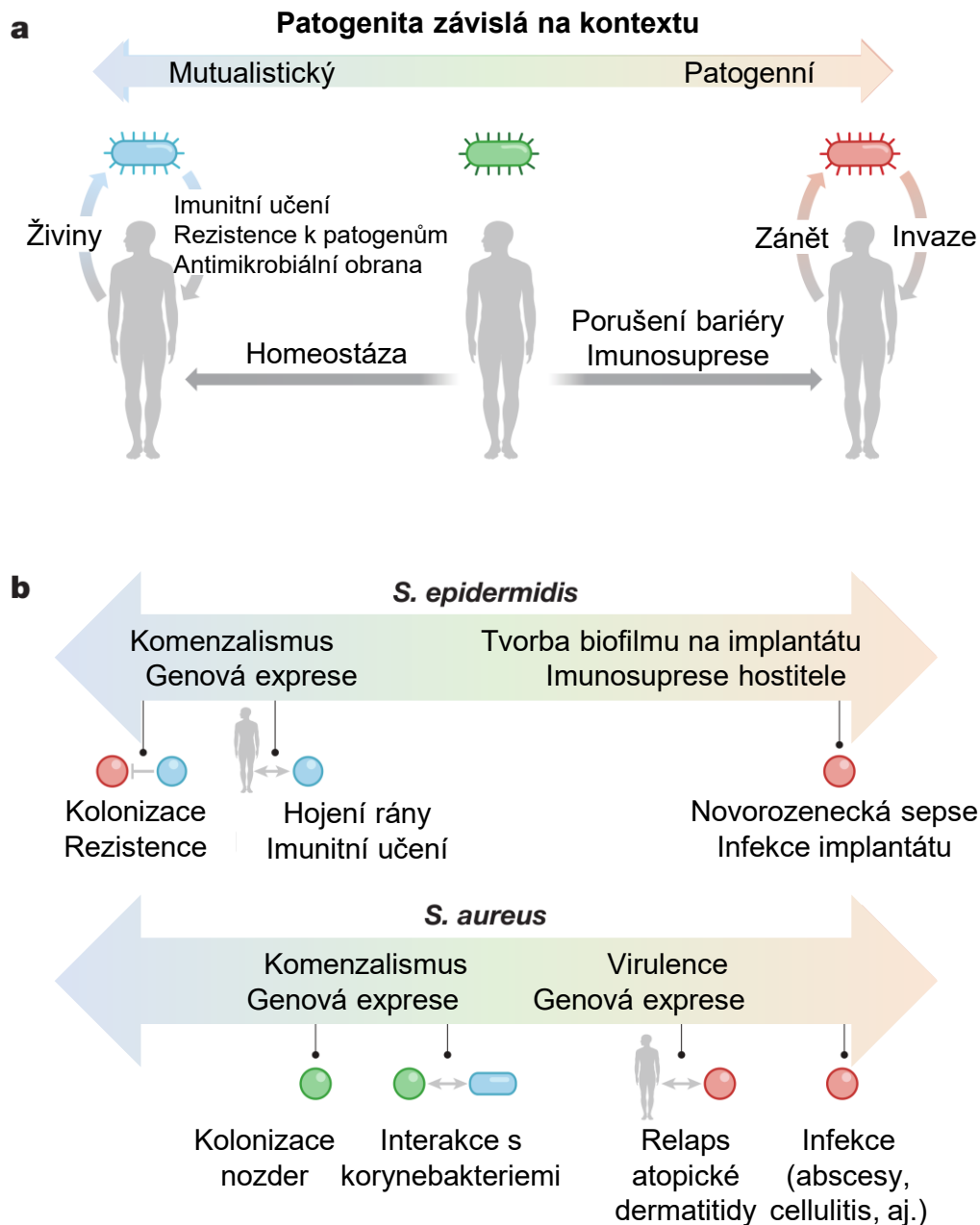
### 1.2.5. Bakterie jako komplikující faktor hojení

V chronických ranách se vyskytují komenzální rody bakterií, které relativně běžně osidlují kůži a slizniční povrchy (např. *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Cutibacterium*), (Wolcott et al. 2016). Vedle toho se do rány dostávají na kůži poměrně často vyskytující se nepatogenní nebo potenciálně patogenní bakterie jako například *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* (Bessa et al. 2015). Většina infekcí akutních a chronických ran obsahuje konsorcia aerobních a anaerobních bakterií. U akutních ran ovšem mikrobiální složení v ráně konverguje k mikrobiomu na okolní kůži, což je rozdílné oproti chronické ráně (Bartow-McKenney et al. 2018). V jiných studiích byly v chronických ranách dále nalezeny bakterie rodů *Peptoniphilus*, *Serratia*, *Fingoldia*, *Enterobacter* a *Stenotrophomonas* a druhy *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterococcus faecalis* (Dowd et al. 2008). Další studie ukázala, že složení bakteriálního společenství rány nebylo podmíněno druhem rány (VLU, DFU, PU) ani demografií pacientů (Wolcott et al. 2016). Většina studií se shodne na tom, že převažujícími druhy v chronických ranách jsou *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Rahim et al. 2017).

Patogenní i nepatogenní bakterie kolonizují hostitele a ve většině případů nezpůsobují patologii, a naopak mohou kladně působit na stimulaci imunity hostitele. Přerod komenzálního fenotypu těchto bakterií v patogenní může být závislý na kontextu, jak ukazuje Obrázek 1 (Chen et al. 2018).

Bylo ukázáno, že vztah mezi bakteriálními druhy je v chronických ranách komplexní. Ve studii Verbanice a kol. byla přítomnost fakultativních anaerobů (rody *Enterobacter* a *Proteus*) a aerobů (rody *Pseudomonas* a *Staphylococcus*) signifikantně asociovaná se zhoršeným hojením chronických ran (Verbanic et al. 2020). Naopak z této studie vyplývá, že rody *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Corynebacterium* a *Serratia* jsou přítomny ve zvýšené míře u chronických ran, které se hojí lépe.





**Obrázek 1.** Patogenita bakterií závislá na kontextu. (A), Mikrobi vykazují spektrum patogenity v závislosti na kontextu. Například porušení bariéry kůže nebo sliznice, případně imunosuprese může vést mikroorganismy k patogennímu chování, zatímco za homeostázy se chovají mutualisticky. Mikroorganismy se mohou ovlivňovat navzájem a stimulovat se k mutualismu nebo patogenitě. Za symbiotických podmínek hostitele s mikroorganismem poskytuje hostitel živiny, zatímco mikroorganismus přispívá k epiteliální a imunitní homeostáze a zvýšení odolnosti vůči patogenům skrz produkci mikrobiálních produktů a obsazení metabolických nik. V patogenním vztahu proniká mikroorganismus skrz epitel, způsobuje zánět, a občas tuto zánětlivou odpověď využívá i ve svůj prospěch. (B), *S. epidermidis* a *S. aureus* jsou příkladem kontextuální patogenity; *S. epidermidis* v základu vykazuje mutualistické chování, kdežto *S. aureus* je spíše patogenní. Upraveno podle Chen et al. (Chen et al. 2018)

Jiná studie podtrhuje, že vývoj chronických ran (DFU) je dynamický. A čím častěji docházelo ke změnám složení bakteriálního společenství v čase, tím lépe se rány hojily (Loesche et al. 2017).

Z výše uvedeného je jasné, že pohled na bakterie v ráně není černobílý. Přesto je snaha na chronickou ránu vykazující znaky infekce aplikovat antimikrobiální látky.

Jak bylo uvedeno výše, chronická rána je multifaktoriální onemocnění, jehož významnou komplikací je bakteriální infekce (Bjarnsholt 2013; Davis et al. 2008; Harrison-Balestra et al. 2003). Prostředí otevřené rány představuje pro bakterie ideální prostředí, jelikož zde mají optimální teplotu, vlhkost a dostupné živiny. Přesto jsou v ráně nalézány bakterie ne v planktonickém fenotypu, jak jsou známy především z laboratorních podmínek, ale v jim vlastním fenotypu – biofilmu. Bylo ukázáno, že biofilm byl přítomen v 60 % chronických ran a jen u 5 % akutních ran (James et al. 2008). Bakterie v biofilmovém fenotypu mají oproti planktonickým bakteriím změněný metabolismus, jsou odolnější vůči antibiotikům a i před imunitním systémem hostitele je ochraňuje extracelulární polymerní substance, kterou si bakterie produkují a v níž se množí. Bakterie většinou tvoří vícedruhový biofilm, který ovlivňuje hojení ran nepříznivěji než jednodruhový biofilm (Metcalf a Bowler 2013). Bakterie v biofilmu podněcují v chronických ranách zánět a tvorbu prozánětlivých cytokinů ať už aktivně produkcí virulentních faktorů, tak i pasivně, např. LPS z bakteriální buněčné stěny indukuje prozánětlivou odpověď (Ciornei et al. 2010). Proteinázy jsou produkovány jednak leukocyty přítomnými v důsledku zvýšeného zánětu ale také některými bakteriálními druhy v ráně. Výsledkem je pak nadměrné štěpení provizorní matrix. Její fragmenty potom stimulují stromální buňky k produkci matricelulárních proteinů a lákají další prozánětlivé leukocyty, čímž se celý proces akceleruje. Není jasné, zda je spouštěčem degradace ECM počáteční bakteriální infekce, nadměrný bakteriální infiltrát nebo narušený obrat mezibuněčné hmoty (Wells et al. 2016).

Bakteriím jako komplikujícím (nebo prognostickému) faktoru hojení chronických ran byla a je věnována velká pozornost. Nicméně nedávno bylo ukázáno, že významnou roli v chronických ranách mohou hrát plísňe, které v nich tvoří mykobiom (Kalan et al. 2016). Dále byl asociován poměr zastoupení druhů z rodu *Ascomycota* ku *Basidiomycota* k výsledku hojení ran. Tento poměr byl statisticky významně vyšší u ran, které se hojily déle než osm týdnů a nižší u ran, které se hojily do čtyř týdnů. V této studii bylo ukázáno, že izoláty některých bakterií a hub spoluvytváří polymikrobiální biofilmy. Nicméně v navazující studii sledující poměrné zastoupení mikrobiálních druhů pomocí sekvenování DNA bylo ukázáno, že co do množství přečtených sekvencí je bakteriální DNA stokrát víc než DNA pocházející z hub, prvoků nebo virů (Kalan et al. 2019). Také s rychlostí hojení byl nejsilněji asociován druh *S. aureus*, který ránu osidloval. Důraz na hlavní roli bakterií nad ostatními mikroorganismy v hojení chronických

ran bude tedy nejspíše správný. Nicméně i zde se ukazuje a v budoucnu nejspíš ještě ukáže komplexita vztahů mezi mikrobiálními říšemi a viry v ovlivnění prostředí chronické rány.

Vztah mezi množstvím bakteriální nálože a hojením chronické rány není jasný. Stejně tak ne vždy odpovídá množství bakterií v ráně a klinická manifestaci infekce (Gottrup et al. 2014). Obecně se doporučuje snížit antimikrobiální zátěž rány k podpoře hojení, když je infekce v ráně zjevná (Gottrup et al. 2014). Ve snížení antimikrobiální zátěže byla a jsou používána topicky aplikovaná antibiotika. To se však vzhledem ke snížené účinnosti antibiotik na bakterie přítomné v biofilmu a rostoucímu rozšíření odolnosti bakterií na antibiotika nedoporučuje u ran, kde se infekce klinicky neprojevuje (Lipsky et al. 2016). Jako účinný ve snížení mikrobiální zátěže se ukazuje debridement, který poskytuje “léčebné okno” pro aplikaci antimikrobiálních látek, včetně antibiotik (Wolcott et al. 2010; Kalan et al. 2019).

### **1.3. Antiseptika**

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 antiseptika mohou vyvolat podráždění kůže. Nicméně některá antiseptika (chlorhexidin, PHMB) ukázala zvýšený výskyt kontaktní alergické dermatitidy (Lachapelle 2014). Některá antiseptika vyvolávají bakteriální rezistenci (stříbro, triklosan, chlorhexidin, kvarterní amoniové soli), kdežto u jiných to nebylo pozorováno (PVP-I) (Lachapelle et al. 2013).

### **1.4. Stříbro v léčbě chronických ran**

#### **1.4.1. Formy stříbra užívané v prostředcích pro léčbu ran**

Stříbro bylo empiricky používáno jako antimikrobiální látka po tisíciletí. Dnes je jím ošetřen povrch řady materiálů, které mají plnit také antimikrobiální funkci. Jednou takovou skupinou materiálů jsou kryty ran. Stříbro se používá ve formě solí, které obsahují iontové

stříbro ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{3+}$ ), ale také ve formě stříbrných nanočástic (AgNP) obsahujících hlavně neiontové stříbro ( $\text{Ag}^0$ ). Aby se projevila hlavní biologická aktivita,  $\text{Ag}^0$  se oxiduje na  $\text{Ag}^+$ . Nicméně i AgNP za anaerobních podmínek vykazují antimikrobiální aktivitu (Xiu et al. 2011). Oxidace stříbra je silně ovlivněna chemickým složením biologického média, ve kterém se stříbro nachází, a také osvětlením (McShan et al. 2014). Množství uvolněného stříbra z nanočástic se liší v závislosti na velikosti částice (z menších se uvolňuje poměrně větší množství než z větších nanočástic), vytvoření proteinové korony, pH a případných dalších modifikací nanočástic (Cameron et al. 2018).

#### 1.4.2. Interakce stříbra s biomolekulami

Stříbrné nanočástice, které se dostanou do buňky, se nejprve mění z elementárního stříbra ( $\text{Ag}^0$ ) na stříbrné ionty ( $\text{Ag}^+$ ), které se potom oxidují na  $\text{Ag-O-}$  a nakonec na sulfidy  $\text{Ag-S-}$  reakcí například s cysteiny (Wang et al. 2015).

Stříbro interaguje se sulfhydrylovými skupinami protonovaného i deprotonovaného cysteinu a také s jinými aminokyselinami (Buglak et al. 2019). Touto vazbou narušuje strukturu a funkci řady proteinů.

$\text{Ag}^+$  se také váže na nukleosidy a na DNA, čímž narušuje replikaci a může dojít k zástavě buněčného cyklu, když je porušení DNA rozsáhlé (Russell a Hugo 1994).

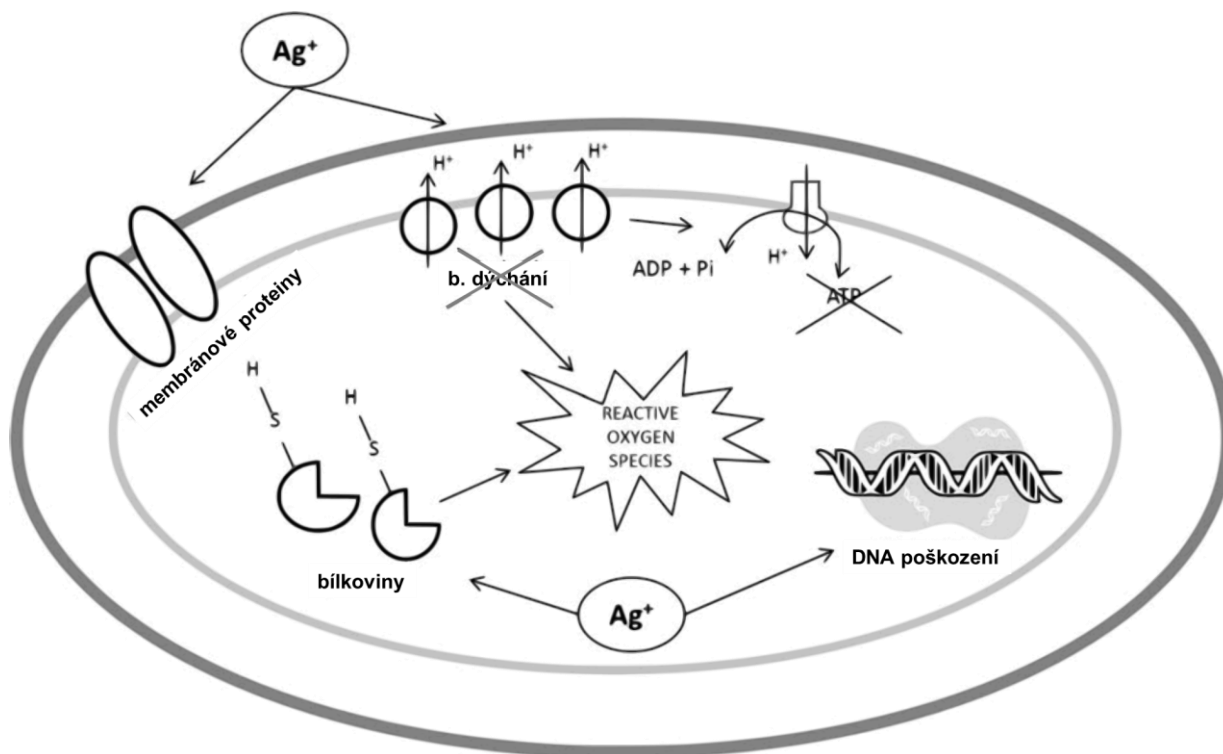
#### 1.4.3. Antimikrobiální vlastnosti stříbra

Stříbro je účinné proti širokému spektru aerobních, anaerobních, gramnegativních i grampozitivních bakterií (Barnea et al. 2010; McShan et al. 2014). Účinnost stříbra je vyšší proti G- ve srovnání s G+ bakteriemi (Kędziora et al. 2018).

Antimikrobiální aktivita stříbra závisí na chemickém složení krytů ran, které ho obsahují (přidavné sorbenty, biologicky aktivní látky, biomolekuly nebo (bio)polymery) a chemickém složení okolí, do kterého se stříbro uvolňuje. Antimikrobiální působení stříbra na bakterie není stále úplně pochopeno. Mechanismus se liší také podle formy stříbra. Stříbrné nanočástice buď pronikají do buněk a tam působí hlavně uvolněním  $\text{Ag}^+$  nebo (v menší míře) působí jinými mechanismy (Wang et al. 2015; Mijndonckx et al. 2013), jak je uvedeno na Obrázek 2.

Jak již bylo zmíněno výše, stříbrné ionty interagují s biomolekulami a narušují strukturu a funkci DNA, ribozomů, proteinových receptorů a pump, enzymů aj. Buněčné membrány jsou propustné a dochází k narušení prostředí uvnitř buněk. Když dojde k porušení enzymů dýchacího řetězce, buňky produkují zvýšené množství reaktivních kyslíkových intermediátů (ROS), a tím dále dochází k oxidativnímu poškození proteinů, DNA, RNA a lipidů (Zhu et al. 2014; McShan

et al. 2014). Může docházet i k narušení glykolýzy a Krebsova cyklu tím, že stříbro interaguje s enzymy zapojenými do těchto procesů (Wang et al. 2019). A také stříbrné ionty reagují s glutationem, čímž je snížena buněčná vnitřní antioxidační ochrana.



**Obrázek 2.** Mechanismy antimikrobiálního působení stříbra. Na buněčné membráně interaguje stříbro s proteiny a narušuje její strukturu a funkce. Uvnitř buňky dochází po interakci s proteiny ke zvýšenému oxidačnímu stresu a k přímému i nepřímému poškození DNA (upraveno podle Mijndonckx et al. 2013).

Při testování a interpretaci výsledků *in vitro* účinnosti a toxicity je potřeba mít na paměti, že stříbro interaguje s celou řadou molekul, takže zjištění jeho antimikrobiálního nebo cytotoxického účinku v *in vitro* podmínkách může být ovlivněno například složením média. Bylo ukázáno, že glutation, cystein a krevní sérum několikanásobně snižuje antimikrobiální aktivitu a cytotoxické působení  $\text{AgNO}_3$  i krytů ran obsahujících stříbro (Mulley et al. 2014; Hidalgo a Domínguez 1998).

#### 1.4.4. Cytotoxické efekty stříbra

Stříbro je těžký kov, který se v organismu vyskytuje ve stopovém množství. Na rozdíl od některých jiných těžkých kovů (měď, zinek, kobalt či chrom) nepatří stříbro mezi biogenní prvky. Není však ani tak toxické jako jiné těžké kovy (rtuť či arsen). Přesto je stříbro látka, u které jsou známy případy akutní otravy a také nežádoucích reakcí organismu při jeho dlouhodobém užívání. Asi nejznámější, avšak z hlediska četnosti výskytu v léčbě ran nejméně podstatná, je tzv. argyrie, tedy tmavé zbarvení kůže a vlasů následkem ukládání dlouhodobě přijímaného stříbra do kůže a jiných tkání. U topicky aplikovaného stříbra nebyl rozvoj argyrie pozorován s výjimkou dlouhodobého topického použití SSD (Fisher et al., 2003, Isak et al., 2019), nebo při krátkodobě léčbě krytem Acticoat u pacienta popáleného na 30 % plochy těla (Trop et al. 2006).

Antiseptika mohou být toxická pro hostitelské buňky nebo tkáň (např. fibroblasty, keratinocyty, a leukocyty) a stříbro není výjimkou (Punjataewakupt et al. 2019). Cytotoxicita stříbra se odvíjí od délky inkubace, jeho koncentraci, pH prostředí, typu a složení prostředí, teplotě a je rozdílná u jiných typů buněk (AshaRani et al. 2009; Punjataewakupt et al. 2019; Zhang et al. 2014). Bylo ukázáno, že toxicita stříbra se v podstatě neliší u buněk bakterií, prvoků, hub, živočichů a pohybuje se řádově okolo 10 µg/ml (Vazquez-Muñoz et al. 2017). Toxické koncentrace stříbra AgNO<sub>3</sub> u lidských dermálních fibroblastů se pohybují okolo 1,4 – 60 µg/ml (Hidalgo a Domínguez 1998; Müller a Kramer 2008). U nanočástic stříbra to je v rozmezí 15 – 25 µg/ml (Shin et al. 2007; Szmyd et al. 2012). Antimikrobiální a cytotoxické působení stříbrných nanočástic bylo nedávno publikováno ve velmi rozsáhlém přehledném článku (Liao et al. 2019).

Jak vyplývá z mechanismu působení stříbra, hlavní efekty (interakce s proteiny, produkce ROS, interakce s DNA) jsou nespecifické a nezávislé na organismu (Dakal et al. 2016; Manke et al. 2013; Rinna et al. 2015; Vimbela et al. 2017; Zhang et al. 2016). Na základě literatury lze konstatovat, že stříbro je cytotoxické, a mechanismy toxicity stříbra lze shrnout do těchto bodů:

- a) vyvolání oxidativního stresu podporou vzniku reaktivních kyslíkových radikálů,
- b) narušení aktivity mitochondrií,
- c) poškození buněčné membrány
- d) narušení správné novotvorby buněčných proteinů
- e) buněčná smrt apoptózou a autofagií,
- f) spuštění prozánětlivé buněčné signalizace,

g) poškození DNA,

h) stimulace prozánětlivé a profibrotické odpovědi fibroblastů a

i) v důsledku vazby a odstranění těžkého kovu je zvýšená exprese metalothioneinů a hem oxidázy 1.

#### 1.4.5. DNA poškození vyvolané stříbrem

Stříbrné ionty interagují s guaninem a adeninem v DNA (Arakawa et al. 2001). Stejně tak nanočástice stříbra interagují s DNA a vmezeřují se mezi interagující patra (Pramanik et al. 2016). Stříbrné nanočástice poškozují DNA zřejmě hlavně skrze zvýšenou koncentraci ROS. Příklad N-acetyl-cysteinu k buňkám, který působí jako antioxidant a zároveň se na něj můžou vázat  $\text{Ag}^+$  ionty, výrazně omezil míru apoptózy (Foldbjerg et al. 2011). Oxidativní poškození DNA v důsledku zvýšené hladiny ROS může být podpořeno také vyčerpáním redukováného glutationu a narušením mitochondrií (Piao et al. 2011). V jiné studii bylo ukázáno, že přídavek AgNP způsobuje mutagenitu, která se projevuje tvorbou mikrojader (Kawata et al. 2009). Nanomateriál ze stříbra způsobil dvouřetězcové zlomy v DNA (Yamani et al. 2017). DNA poškození vyvolané AgNP vedlo k dvouřetězcovým zlomům projevujícím se nárůstem fosforylace histonu H2AX a přítomnosti RAD51 (Karlsson et al. 2014).

#### 1.4.6. Pronikání stříbra do rány

V případě topického použití stříbra je pravděpodobnost systémové toxicity či vzniku argyrie zanedbatelná. Ovšem lokální poškození tkáně je možné díky schopnosti stříbra penetrovat i skrz neporušenou kůži. George et al. prokázal na zdravých dobrovolnících s nepoškozenou bariérovou funkcí kůže, že nanokrystalické stříbro z bandáží určených na hojení chronických ran je schopno během 5 dnů penetrovat skrz epidermis do hlubších vrstev dermis. V séru nebyla zvýšená hladina stříbra zaznamenána (George et al. 2014). V případě kůže poškozené, s výrazně zhoršenou bariérovou funkcí, lze předpokládat, že absorpce a penetrace stříbra bude zvýšená. Toto bylo ukázáno *in vitro* (Larese et al. 2009). Jiní autoři detekovali a kvantifikovali množství topicky aplikovaného stříbra ve zvířecích ranách a orgánech (Constable et al. 1967; Barillo et al. 2020; Pfurtscheller et al. 2014). Pfurtscheller a kol. použili model popáleninové rány u potkana. Popáleniny byly léčeny každý týden převazem krytem s nanostříbrem Acticoat nebo pěnou se síranem stříbrným od výrobce Mepilex (Pfurtscheller et al. 2014). Po třech týdnech vzrostla hladina sérového stříbra na 80 mg/kg a byla detekovatelná (10-50 mg/kg) až do šestého týdne, kdy byla zvířata utracena. 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).

Stříbro se váže na sérový protein albumin a tripeptid glutation a může být tak přenášeno krví k ledvinám, játrům a slezině (Mulley et al. 2014). U pacientů léčených stříbrnými kryty byla pozorována zvýšená hladina krevního albuminu (Brouillard et al. 2018). To mělo protektivní efekt proti zvýšenému kolování stříbra v krvi. Dalším z předpokládaných faktorů zvyšujících absorpci stříbra je vaskularizace rány, protože vyšší absorpce byla pozorována u granulujících ran (Brouillard et al., 2018). Eliminace stříbra z krevního oběhu trvala u některých pacientů více jak dva měsíce po skončení léčby stříbrnými kryty.

Studii ukazujících distribuci stříbra v lidské chronické ráně je velmi málo. Tyto informace jsou však zásadní k pochopení mechanismu a kinetiky prostupu stříbra z krytu až do oběhu a potažmo i orgánů pacientů. Jedna práce ukázala distribuci stříbra v biopsii z pacientovy popáleniny (Rigo et al. 2013). Stříbro z krytu Acticoat bylo nalezeno 4 mm hluboko v pacientově ráně. V nedávné studii ukázal Roman a kol., kde je distribuováno stříbro a s čím kolokalizuje (na co se pravděpodobně váže) v chronických ranách čtyř pacientů (Roman et al. 2020). Stříbro proniklo přibližně 1,5 mm hluboko. Výsledky speciální analýzy<sup>1</sup> stříbra, které tato studie přinesla, ukazují, že v nejvrchnější vrstvě rány (do 45 µm) je stříbro vázáno na chloridy. Hluběji je stříbro vázáno na glutation.

#### 1.4.7. Vliv stříbra na hojení ran

Nadworny a kol. indukovali u prasat dermatitidu aplikací dinitrochlorbenzenu (Nadworny et al. 2010b). Poté sledovali vliv nanokrystalického stříbra v roztoku o různém pH na znaky zánětu. Zvířata léčená roztoky o pH 7 a 9 měla statisticky významně nižší zánět. Jako kontrolu však v této studii používali destilovanou vodu bez upraveného pH. Thomason a kol. pozorovali u myších ran, které léčili oxysolem stříbra, snížení zánětu (Thomason et al. 2018a). Také Lansdown a kol. zjistili snížený zánět v potkaních ranách léčených SSD. V jiné studii stříbrné nanočástice v gelu z chitosanu a kolagenu podporovaly hojení a vedly u potkaních ran ke snížení počtu buněk pozitivních na CD68 (především makrofágy) a hladin prozánětlivých cytokinů (You et al. 2017a). V chronických lidských ranách vedla aplikace SSD ke snížení počtu neutrofilů a makrofágů s tím, jak se rány hojily (Fumal et al. 2002a). Nicméně skupiny ran léčených PVP jódem nebo chlorhexidin diglukonátem vykazovaly v této studii ještě rychlejší snížení počtu

---

<sup>1</sup> Speciální analýza je metoda identifikace a stanovení různých chemických forem určitého prvku v roztocích a pevných vzorcích nebo určení jeho prostorového rozložení v pevných látkách. *PrF: C7950 Speciální analýza – Informace o předmětu* [online] [vid. 2021b-09-06]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/predmet/sci/podzim2012/C7950>



prozánětlivých buněk než SSD. Při léčbě vředů podtlakovou terapií vedlo použití houbiček se stříbrem ke snížení antimikrobiální zátěže rány ve srovnání s kontrolní skupinou používající houbičky bez stříbra (Hahn et al. 2019).

U výše uvedených studií, které ukázaly protizánětlivé působení stříbra, nebyl navržen nebo experimentálně ukázán mechanismus, kterým by stříbro mohlo snížit zánět a přispět tak k hojení ran. Nadworny a kol. se v navazující studii snažila protizánětlivý mechanismus stříbrných nanočástic stříbra vysvětlit. Opět na modelu kontaktní dermatitidy prasete léčené několika formami stříbra Nadworny sledovala zánětlivé markery (Nadworny et al. 2010a). Nicméně nanokrystalické tvořilo jen vrstvu v epidermis a nepronikalo do dermis. Autoři tak výsledky uzavírají s otázkou, jestli stříbro může působit protizánětlivě na dálku.

Na druhou stranu byly publikovány studie, kde stříbro mělo negativní efekty na hojení ran. Sulfadiazin stříbrný zpomalil hojení u modelu popáleniny u potkana oproti kontrole ošetřené pouze fyziologickým roztokem (Maghsoudi et al. 2011). V jiné studii bylo zjištěno, že SSD zpomaluje hojení u myších popálenin tím, že zvyšuje množství neutrofilů a snižuje počet makrofágů v ráně (Rosen et al. 2015a). Qian a kol. ukázali, že SSD snižuje rychlost epitelizace a zvyšuje tvorbu hypertrofické jizvy u plnoprofilové králičí rány (Qian et al. 2017). U plnoprofilové excizní myší rány došlo po aplikaci některých krytů obsahujících stříbro ke snížení rychlosti epitelizace. Metaanalýza sledující popáleniny u dětí ukázala, že aplikace SSD neměla pozitivní vliv na snížení infekce rány a naopak vedla k pomalejšímu hojení a delšímu pobytu v nemocnici s více převazy (Rashaan et al. 2014). Chaby a kol. prezentovali případovou studii, kde u pacientky s pyoderma gangrenosum léčenou sulfadiazinem stříbrným nastalo ledvinné selhání, jehož projevy začaly odeznívat po vysazení SSD (Chaby et al. 2005).

Klinické studie porovnávající efektivitu krytů se stříbrem s kryty s jinými antiseptiky dávají nejednoznačné výsledky. Ve srovnání krytu s polyhexanidem a biocelulózou (Suprasorb P) vykazovaly horší výsledky různé kryty se stříbrem (Acticoat, Biatain Ag, Aquacel Ag, Silvercel, Urgotul Ag) (Eberlein et al. 2012). U krytu s PHMB došlo rychleji ke snížení bakteriální zátěže a tím i k bolestivosti rány (VAS skóre). V jiné klinické studii srovnávající antiseptický roztok s oktenidinem a stříbrný kryt (Aquacel Ag) bylo pozorováno rychlejší hojení u oktenidinové skupiny (Krasowski et al. 2015a). V této studii bylo pozorováno i statisticky nevýznamné (část vzorků byla znehodnocena při zpracování) snížení bakteriální zátěže u oktenidinu vs. stříbro. V jiné randomizované kontrolované studii vykazovala lepší efekt na hojení kyselina boritá oproti dusičnanu stříbrnému (Kapukaya a Ciloglu 2020).

Výsledky z těchto studií souhlasí s Cochrane metaanalýzou, která vidí používání topických antiseptických produktů jako pozitivní pro rychlejší uzavírání rány (Dumville et al. 2017). Zároveň byly malé rozdíly mezi antimikrobiálními látkami, takže nevyznívá jednoznačně,

že by stříbro či jiné antiseptikum bylo účinnější. Autoři Cochrane přehledu uvádějí, že studie hojení ran jsou často špatně navrženy a nesou s sebou riziko podjatosti (bias).

#### 1.4.8. Antiproteinázové vlastnosti stříbra

Stříbro má publikované antiproteinázové vlastnosti, i když publikací je velmi poskrovnu. V roce 1971 byla ukázána inhibice trypsinu stříbrem (Berezin et al. 1971). Krystalografická studie ukázala místo, kam se váže stříbrný iont a trypsin tím inhibuje (Chambers et al. 1974). Zároveň ve studii Chambers implikuje, že stříbro může být inhibítoem i jiných serinových proteináz. Nedávná studie ukázala inhibici aspartylové proteinázy viru HIV nanočásticemi stříbra (Shing et al. 2014). Kolagenáza I z klostridia (směs metaloproteináz) byla inhibována stříbrem, které obsahuje kryt Acticoat (Shi et al. 2010). Nicméně Acticoat ve stejné studii inhiboval papain pouze o maximálně 15 %. V léčbě stomatologických obtíží bývá cílem i redukce zvýšené aktivity MMP. Proto se také věnuje pozornost schopnosti antiseptik proteinázy inhibovat. Bylo ukázáno, že i stříbro může inhibovat MMP (Mei et al. 2012).

#### 1.5. 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. 2012a). Oktenidin navíc vykazuje nižší penetraci skrz kůži v *ex vivo* podmínkách (Stahl et al. 2011a). Nedávná studie ukázala obdobné protizánětlivé efekty oktenidinu jako má stříbro. Tyto efekty zahrnovaly snížení prozánětlivé odpovědi Langerhansových buněk na poranění kůže (Nikolić et al. 2019). Oktenidin navíc přispívá hojení chronických ran skrze inhibici produkce a aktivity MMP a dalších eukaryotických proteináz (Seiser et al. 2021; Pavlík et al. 2019). Některé bakterie produkují proteinázy sloužící jako virulenní faktory přispívající k degradaci granulační tkáně rány. Oktenidin inhiboval proteinázy produkované bakteriemi izolovanými z chronických ran (Pavlík et al. 2019). Souhrnně lze říci, že oktenidin pozitivně ovlivňuje hojení lidských chronických ran (Hämmerle a Strohal 2016; Vanscheidt et al. 2012b).

## 1.6. Hyaluronan v hojení a léčbě ran

Hyaluronan (kyselina hyaluronová, HA) je nevětvený polysacharid a přirozená součást kůže, která zajišťuje její viskoelasticitu. Kromě strukturální role hraje hyaluronan roli v hojení ran a ovlivňuje zánět, epitelizaci, granulaci a produkci ECM zprostředkovanou fibroblasty (Ghatak et al. 2015). Síťovaný HA může regulovat počet zánětlivých buněk v místě zánětu (Petrey a de la Motte 2019). Hyaluronan se štěpí (enzymaticky nebo neenzymaticky) během zánětu na nižší molekulové hmotnosti. Výsledný nízkomolekulární HA vykazuje jiné signalizační vlastnosti a může zvýšit zánět a angiogenezi (Cyphert et al. 2015). Syntéza hyaluronanu je spuštěna v časně fázi hojení rány. Jeho zvýšená syntéza je udržována déle v bezjizevném hojení fetálních ran v porovnání s hojením u dospělých jedinců (Longaker et al. 1991). Navíc topická aplikace hyaluronanu do lidských ran zlepšuje vzhled jizev (Mahedia et al. 2016; Monavarian et al. 2019). Keratinocyty migrují více, když je k nim přidána HA v in vitro podmínkách. Přídavek HA do akutních ran vedl k rychlejší epitelizaci myších akutních ran (Catanzano et al. 2015). Když keratinocyty nemohly vázat HA (podmíněný knockout receptoru pro hyaluronan CD44), reepitelizace probíhala pomaleji (Shatirishvili et al. 2016). Léčba hyaluronanem významně zlepšuje hojení lidských chronických ran, popálenin a akutních ran (Voigt a Driver 2012).

## 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 nesespecifické 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. METODY

Všechny metody byly provedeny podle odpovídajících směrnic a regulací. V případě práce s lidským materiálem (krev, kůže) byl získán od dobrovolníků informovaný souhlas.

#### 3.1. 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.

#### 3.2. 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.

#### 3.3. Určení koncentrace stříbra ve výluzích

Koncentrace stříbra v krytech a jejich extraktech byla změřena pomocí ICP-OES. Koncentrace stříbra byla také určena v prasečí kůži *ex vivo*. Vzorek o hmotnosti 10–70 mg byl přenesen do zkumavky z PTFE (polytetrafluorethylenu). Poté byl přidán 1 ml koncentrované kyseliny dusičné (Analytika s.r.o, Česká republika), 0,8 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (Analytika s.r.o, Česká republika) a 0,2 ml peroxidu vodíku (p.a. 30 %, Penta s.r.o, Česká republika). Vzorek byl degradován při 150 °C po dobu pěti minut a následně při 200 °C po 10 minut pomocí mikrovln. Po degradaci byl vzorek kvantitativně přenesen za použití 0,2 ml peroxidu vodíku a demineralizované vody.

ICP-OES analýza byla provedena pomocí přístroje vybaveného pneumatickým zmlžovačem a cyklonickou mlžnou komorou (Radial 725, Agilent Technologies, Austrálie). Kvantifikace byla provedena pomocí externí kalibrace. Spolehlivost a přesnost metody byly určeny pomocí standardního přídatku referenčního roztoku Ag (Analytika s.r.o, Česká republika).

### 3.4. Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie byla provedena pomocí přístroje Zeiss Ultra Plus (Zeiss, Německo). Vzorčky byly pokoveny tenkou vrstvou Au/Pd v naprašovacím zařízení Quorum SC7620. Snímky byly získány pomocí dvou sekundárních elektronových detektorů InLens a SE2 pro získání vyššího, respektive nižšího zvětšení. Skenovací parametry byly nastaveny takto: urychlovací napětí 3,5 kV; proud sondy 36 pA a tlak v komoře  $\sim 7 \times 10^{-5}$  Pa.

EDX snímky byly získány pomocí přístroje Zeiss Ultra Plus. Rentgenové mapy a spektra byly získány detektorem X-Max<sup>N</sup> 80 (Oxford Instruments, Velká Británie). Byly použity tyto parametry snímkování EDX: urychlovací napětí 10 kV; proud sondy 300 pA; pracovní vzdálenost 8,5 mm; čas zpracování 4 [AU].

### 3.5. Zkouška přímé oxidační aktivity bandáží

Tvorba ROS v bezbuněčných podmínkách byla testována za použití 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB), který je substrátem křenové peroxidázy (HRP). Z testovaných krytů byla vyražena kolečka o průměru 6 mm. Pracovní roztok vznikl smícháním 0,1 mg/ml TMB (zásobní roztok  $c = 1$  mg/ml v DMSO) v poměru 1:9 s 0,05 M citrát fosfátovým pufrem (pH = 5) a HRP (výsledná koncentrace 0,16 IU/mL). Každý kousek krytu byl ponořen do 0,5 ml pracovního roztoku a alikvoty po 25  $\mu$ l byly odebírány v časech 0, 5, 7,5 a 10 min. Ihned po odebrání byly alikvoty smíchány v poměru 1:1 s 0,16M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a byla změřena absorbance při 450 nm s referenční vlnovou délkou 540 nm v přístroji NanoDrop OneC (ThermoFisher Scientific, USA). Jako pozitivní kontrola byl použit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Signál pozadí byl odečten v slepém vzorku.

### 3.6. Test pronikání stříbra skrz prasečí kůži *ex vivo*

K výzkumu pronikání stříbra do prasečí kůže zbavené epidermis jsme použili statickou Franzovu celu. Prasečí uši s nespárenou kůží byly získány z nedalekých jatek (Bocus, Letohrad, Česká republika) a z vnitřku boltce byla vyříznuta kůže. Chlupy byly oholeny a kůže byla inkubována v horkém fosfátovém pufru (PBS, 60 °C, 90 s) a pokožka byla následně sloupnuta. Průměrná tloušťka kůže zbavené epidermis byla 2 mm. Kousky kůže byly vloženy do Franzových cel a překryty sledovanými kryty nebo gázou, která sloužila jako kontrola. Do donorové komory cely bylo přidáno 0,3 ml kultivačního média NHDF (normal human dermal fibroblast) s 10% FBS. Akceptorová komora byla naplněna 0,7 ml kultivačního média. Franzovy cely s kůžemi byly inkubovány při 37 °C po 24 nebo 48 hodin. Po této době byly kůže opláchnuty v PBS. V kůži a akceptorovém roztoku bylo stanoveno stříbro pomocí ICP-OES. Pro každý vzorek byla provedena tři opakování.

### 3.7. 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 atmosférického 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 kůže 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 rozřezána. 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.

### 3.8. Imunohistologické a histologické barvení

Pro barvení stříbra byla použita stříbrná autometalografie (Danscher et al. 1994a). Obrázky byly vyfoceny pomocí mikroskopu Eclipse 50i s DS-Fi1 kamerou (Nikon, Yokohama-Shi, Japonsko). Marker DNA poškození  $\gamma$ H2AX byl detekován imunofluorescencí. Histologické řezy byly odparafinovány na sklech Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a inkubovány přes noc v primární protilátce (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). Obarvené řezy byly montovány na sklíčka pomocí ProLong Diamond Antifade Mountant obsahující DAPI (ThermoFisher Scientific). Snímky byly získány pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse Ti (Nikon, Yokohama-Shi, Japonsko).

### 3.9. Analýza genové exprese pomocí real-time PCR

Z prasečí kůže byla po inkubaci s kryty obsahujícími stříbro izolována RNA, následně přepsána cDNA a provedena qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) obdobně, jak bylo popsáno v jiné práci (Klein et al. 2018a). Pro qPCR byly použity tyto TaqMan sondy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA): DNAJA1, Ss04326380\_g1; PLK3, Ss03375596\_u1; HSPH1, Ss03388958\_m1; GADD45G, Ss04246840\_g1. RPL13A, Ss03376908\_u1. Hodnoty prahového cyklu byly normalizovány vůči genu RPL13A a vztaženy

k normalizovaným hodnotám u kontrolních vzorků inkubovaných s gázou (24 nebo 48 h) pomocí  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metody (Livak a Schmittgen 2001a). Průměrné genové exprese byly získány změřením šesti nezávisle inkubovaných vzorků. Statistická významnost rozdílů v genové expresi v daný čas vůči příslušné kontrole byla určena Studentovým t testem.

### 3.10. Western blot

Nejprve byly připraveny homogenáty tkání prasečího ucha. Zmrazené vzorky byly nakrájeny v kapce lyzačního pufru (50mM Tris pH 8; 150mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% deoxycholát sodný; 1% dodecyl sulfát sodný; 4% urea) a následně homogenizovány v 350  $\mu$ l lyzačního pufru pomocí 5 mm ocelové kuličky v tkáňovém homogenizátoru (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Německo) po 10 min při 25 Hz. Vzorky byly dvakrát centrifugovány (10 000 g; 10 min) a vždy byl přenesen do dalšího kroku jen supernatant. Koncentrace proteinů byla změřena pomocí BCA metody (Thermo Fisher Scientific).

Proteiny byly rozděleny na 4-15% gradientovém gelu pomocí SDS-PAGE a přeneseny na membrány z polyvinyliden difluoridu. Membrány byly inkubovány přes noc v blokovacím pufru (20 mM Tris; 137mM NaCl; 0,05% Tween 20; 5% prášek sušeného nízkotučného mléka) s protilátkou proti fosforylovanému histonu H2A.X (20E3) (1:1000; Cell Signaling, USA). Na odstrižené části membrány byl detekován  $\beta$ -aktin, který byl použit jako kalibrace nanášky vzorků (1:2000; Santa Cruz, USA). Primární protilátky byly detekovány pomocí sekundárních protilátek s HRP proti králičím nebo myším imunoglobulinům pomocí chemiluminiscence (Clarity Western ECL substrate; Bio-Rad, USA). Signál byly detekován a vyhodnocen přístrojem Alliance 9.7 Chroma Chemiluminescence Imaging System (UVItec Limited, Velká Británie).

### 3.11. Antibakteriální aktivita výluhů bandáží

Přímé antimikrobiální efekty sledovaných krytů byly porovnány pomocí metody difúze v agaru. Vzorek (1  $\text{cm}^2$ ) každého krytu byl inkubován na čerstvě zaočkované Petriho misce inokulované bakteriemi *Staphylococcus aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa*; tyto kmeny byly izolovány z lidských chronických ran, charakterizovány a kultivovány (Kucera et al. 2014). Dále byla antimikrobiální účinnost extraktů bandáží do RPMI média s 10% FBS (viz výše) pomocí mikrodiluční metody (Clinical and Laboratory Standards Institute 2015). Optická denzita zákalu byla změřena destičkovým přístrojem Ensign Multimode Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) při 600 nm po 24 h (třepání, 37 °C).

### 3.12. Kultivace eukaryotických buněk

Lidské normální fibroblasty (NHDF) z kůže dospělého byly zakoupeny od firmy Lonza (Basilej, Švýcarsko). NHDF byly kultivovány v Dulbecco's modified Eagles low glucose médiu



(DMEM) s přísávkem FBS do 10 %, glutaminu (0,3 mg/ml), glukózy (4 mg/ml), penicilinu (100 jednotek/ml) a streptomycinu (0,1 mg/mL) na 75 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvičkách za 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C do páte pasáže. HaCaT keratinocyty byly zakoupeny ze společnosti Hölzel Diagnostika (Kolín, Německo) a byly kultivovány stejným způsobem ale bez přísávku glukózy.

### 3.13. Měření viability

Den před ovlivněním bylo nasazeno pět tisíc buněk na jamku 96 jamkového panelu resuspendovaných v 200 µl kultivačního média a inkubováno přes noc (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Následující den byly buňky ovlivněny 200 µl různě zředěných extraktů kryptů (3.2 Příprava výluhů bandáží) odpovídajících 100%, 50%, 20%, nebo 10% koncentraci původního extraktu. Kultivace probíhala po 24, 48 a 72 h. Kontrolní buňky byly ovlivněny pouze kultivačním médiem. Viabilita byla změřena pomocí 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromidu (MTT) (Buffa et al. 2019). Zásobní roztok MTT (20 µl; c = 5 mg/ml) byl přidán do každé jamky obsahující kultivační médium. Destičky byly inkubovány po 2,5 h při 37 °C. Poté byl roztok MTT odebrán a nahrazen 220 µl lyzačního roztoku (1:1 propan-2-ol a DMSO, 10% (w/v) Triton X-100 a 0.37% (w/v) HCl). Buněčná lyze probíhala po 30 min za pokojové teploty na třepačce (150 rpm). Absorbance byla změřena v 570 a 690 nm pomocí EnSight Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA). Data byla zpracována v software Kaleido (PerkinElmer, USA). Absorbance byla určena dle  $A = A_{570} - A_{690}$ . Rozdíl ve viabilitě ovlivněných buněk vůči kontrolním buňkám byla vyjádřena jako změna [%] =  $(A_{\text{vzorek}}/A_{\text{kontrola}} - 1) \times 100$ .

### 3.14. Cytotoxicita po přímém kontaktu bandáží s buňkami

Buňky byly nasazeny v hustotě 300 000 na jamku šestijamkového panelu. Kultivace probíhala v kultivačním médiu s 10% FBS při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> až do dosažení konfluence. Kryty byly nastříhány na čtverce veliké 1 cm<sup>2</sup>, umístěny na vrstvě buněk a inkubovány v kultivačním médiu po šest hodin. Kontrolní buňky byly ovlivněny pouze médiem. Následně byly buňky opláchnuty PBS a fixovány 4% paraformaldehydem (PFA) po 15 min. Buňky byly barveny roztokem 0,1 % (w/v) krystalové violeti rozpuštěné v 10% ethanolu po dobu jedné hodiny a následně opláchnuty vodou. Jamky byly vyfoceny fotoaparátem Canon EOS 80D EF-S 18-55 mm f (Canon).

### 3.15. Imunofluorescenční barvení

Poškození DNA bylo analyzováno u NHDF buněk. Tyto buňky byly nasazeny na mikroskopická sklíčka v šestijamkovém panelu v hustotě 2×10<sup>5</sup> buněk na jamku a ponechány v inkubátoru přes noc. Následující den byly buňky ovlivněny pětkrát zředěnými extrakty bandáží do kultivačního média a inkubovány po 24 h. Poté byly buňky fixovány 4% PFA po dobu 15

min. Následovala permeabilizace (0,2% Triton X 100, 15 min) a blokování (20% FBS, 0,3 M glycin, 0,05% Tween 20 v PBS; 30 min). Následovala inkubace s králičí primární protilátkou anti- $\gamma$ H2AX (Cell Signaling, USA; 1:500; přes noc při 4 °C) rozpuštěnou v blokovacím pufru. Detekce byla provedena sekundární protilátkou konjugovanou s fluoroforem Alexa Fluor 555 (Abcam, Velká Británie; 1:500 v blokovacím pufru; 1 h, RT). Sklíčka byla zamontována médiem ProLong Diamond Antifade Mountant s DAPI (ThermoFisher Scientific). Po polymeraci montovacího média byly vyfoceny buňky za použití fluorescenčního mikroskopu Eclipse Ti (Nikon). Fluorescence byla kvantifikována pomocí software Fiji (Čepa 2018).

### **3.16. Měření vnitrobuněčného oxidačního stresu**

Vnitrobuněčný oxidační stres byl detekován pomocí DCF-DA próby, která je citlivá na celkovou koncentraci ROS v buňkách. Buňky byly nasazeny a inkubovány přes noc v 24 jamkové destičce a poté barveny DCF-DA (1  $\mu$ g/ml) po dobu 15 min a následně inkubovány s pětkrát zředěnými extrakty při 37 °C za 5% CO<sub>2</sub>. Ovlivnění 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sloužilo jako pozitivní kontrola. Fluorescence DCF byla snímána každých 15 min během 90 min celkové inkubační doby za použití zeleného filtru v přístroji Incucyte S3 (Essen Bioscience, USA).

### **3.17. Oxidační vzplanutí fagocytů v plné krvi**

Nezávislá etická komise schválila odběr vzorků krve pro pokusy určující oxidativní vzplanutí neutrofilů a MAT (Etická komise pro výzkum při Masarykově Univerzitě, Brno, Česká republika, číslo schválení EKV-2018-083). Všichni dárce s odběrem písemně souhlasili.

Oxidativní vzplanutí (produkce ROS) krevními fagocyty byla určena ve zředěné plné krvi pomocí chemiluminiscence luminolu. Detekce signálu probíhala v LM-01T destičkovém luminometru (Immunotech, Česká republika). Reakční směs obsahovala 6  $\mu$ l plné krve v 54  $\mu$ l RPMI-1640 kultivačního média smíchaného s 60  $\mu$ l extraktu z krytu do fyziologického roztoku nebo do kultivačního média obsahujícího FBS. Reakce byla inkubována při 37 °C po 20 min. Těsně před začátkem měření byl přidán luminol na výslednou koncentraci 1 mM (zásobní roztok 10 mM luminol v 0,2 M borátového pufru) (Molecular Probes, USA). Byla určena spontánní produkce ROS a produkce ROS za současné indukce opsonizovanými zymosanovými částicemi (OZP – 0,1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA) nebo phorbol 12-myristát 13-acetátem (PMA – 0,8  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, USA). U kontrol byl místo extraktu z bandáže použit fyziologický roztok nebo kultivační médium. Každý vzorek byl měřen současně v duplikátu. Chemiluminiscence byla zaznamenávána po 90 min při 37 °C a byla vyjádřena v relativních jednotkách (RLU). Celkové množství ROS bylo určeno integrací plochy pod křivkou signálu chemiluminiscence.

### **3.18. Monocyty aktivující test**

MAT byl proveden s plnou lidskou krví, která byla 10× zředěna fyziologickým roztokem. Krev byla odebrána pěti zdravým dobrovolníkům, sloučena do jednoho vzorku a zředěna fyziologickým roztokem. Zředěné vzorky krve byly inkubovány s 6 mm velkými kolečky vyraženými z bandáží ve sterilních zkumavkách po 24 h při 37 °C. V druhé sérii byly vzorky paralelně inkubovány navíc s bakteriálním lipopolysacharidem (LPS, konečná c = 0,25 IU/ml; Endotoxin Standard E-Toxate; Sigma, USA), aby tak byla stimulována odpověď proti bakteriím. Krvinky během inkubace sedimentovaly, čímž zbyla v horní fázi plazma zředěná fyz. roztokem. Po inkubaci bylo 200 µl z každého vzorku odebráno a testováno na množství IL-6 pomocí soupravy IL-6 Human Uncoated ELISA Kit dle instrukcí výrobce (ThermoFisher Scientific, USA). Absorbance byla změřena pomocí destičkové čtečky EnSight Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA). Koncentrace IL-6 byla spočtena pomocí programu Kaleido z kalibrační křivky (PerkinElmer, USA). Ve zbytku plazmy a sedimentovaných buněk byla určena hemolýza a množství uvolněné laktát dehydrogenázy (LDH).

### **3.19. Test hemolýzy**

Hemolýza byla zjištěna ve zbytku plazmy po sedimentaci krvinek v MAT testu. Po centrifugaci bylo 100 µl každého vzorku přeneseno do 96jamkové destičky a byla změřena absorbance při 550 nm. 1% Triton X-100 byl použit jako pozitivní kontrola hemolýzy.

### **3.20. Toxicita stanovená z uvolněné LDH**

K určení toxicity krytů se stříbrem vůči krevním buňkám byla použita laktát dehydrogenázová metoda (LDH, Cytotoxicity Detection KitPLUS, Roche, Švýcarsko) podle návodu výrobce. Toxicita byla sledována vůči buňkám v plné lidské krvi, která byla s kryty inkubována obdobně jako v MAT testu, a vůči izolovaným neutrofilům. Pro korekci pozadí byly změřeny slepé vzorky bez LDH substrátu. Výsledky jsou uvedeny jako absolutní hodnoty optické denzity a statistická významnost rozdílu byla určena u ovlivněného vzorku a kontroly.

### **3.21. Etické schválení**

Studie byla provedena v souladu se současnou verzí Helsinské deklaráce. Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty Nemocnice v Hradci Králové (201405 S10ZP). Experimenty byly provedeny v souladu s příslušnými doporučeními a nařízeními. Všichni pacienti dali ke studii písemný informovaný souhlas.

### **3.22. Vstupní a vylučující kritéria účasti pacientů ve studii**

Účastníci studie byli vybráni na základě následujících vstupních kritérií: věk mezi 60 a 90 lety, rána na noze nehojící se nejméně šest týdnů, velikost rány 100 až 400 cm<sup>2</sup>, ochota k účasti ve studii.

Vylučující kritéria byla: autoimunitní onemocnění, probíhající onkologická léčba, léčba antibiotiky (systémově nebo lokálně) v době kratší než jeden týden před zahájením studie, těhotenství nebo kojení, přecitlivělost na látky obsažené v sledovaných krytech, závislost na drogách nebo alkoholu, poškozené ledviny nebo selhání jater, operace hluboké žilní trombózy nebo křečových žil méně než tři měsíce před začátkem studie, účast v jiné studii, která by mohla ovlivnit výsledek této studie.

### **3.23. Demografie účastníků studie**

Devět pacientů bylo přijato do této studie, jejíž trvání bylo stanoveno na šest týdnů. Sedm pacientů studii dokončilo. Jeden pacient se zhojil dříve a jeden pacient nedokončil studii kvůli důvodům nesouvisejícím s touto studií. Tři pacienti trpěli diabetem druhého typu. Pět pacientů byly ženy ( $72,2 \pm 7,6$  let), čtyři byli muži ( $74,5 \pm 11,2$  let). Vředy byly způsobeny žilní ( $n = 5$ ), nebo smíšenou s převažující žilní ( $n=4$ ) nedostatečností. Pacienti byli hospitalizováni na dermatologických klinikách FNKV a FN HK.

### **3.24. Protokol 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 Dobrouč, Česká republika) 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. Stříbrná 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.

### **3.25. Zpracování histologických vzorků**

Vzorky byly fixovány ve 4% formaldehydu a následně odvodněny vzrůstající alkoholovou řadou a xylenem (Penta, Praha, Česká Republika) a zality do parafínu pomocí tkáňového procesoru Leica TP1020 (Leica, Wetzlar, Německo). Následně byly vzorky ochlazeny pomocí EG1150H (Leica) parafinovací stanice a ze vzorků byly nakrájeny řezy o tloušťce 5  $\mu\text{m}$  na rotačním mikrotomu RM 2250 (Leica). Řezy byly rehydratovány pomocí xylenů a snižující se alkoholové řady a deionizované vody v automatickém robotu (Aqual 29; Aqual, Brno, Česká republika), po čemž následovalo barvení.

Hydratované vzorky byly barveny hematoxylinem a eozinem (obojí Merck, Kenilworth, NJ, USA) podle návodu výrobce, dehydratovány a zamontovány do bezvodého montovacího média Pertex (Histolab, Västra Frölunda, Švédsko).

Pro barvení Massonovým trichromem byly vzorky hydratovány Weigertovým hematoxylinem (50 min; Bamed, České Budějovice, Česká republika) a diferenciovány. Diferenciované vzorky byly poté ponořeny do roztoku Ponceau (1% xylidin Ponceau, 1% fosfowolframová kyselina [obojí Bamed] a 1% ledovou kyselinou octovou [Sigma-Aldrich, St. Louis, USA]) s kyselým fuchsinem (1% kyselý fuchsin [Bamed] a 1% ledová kyselina octová) po dobu 5 min, opláchnuty v demineralizované vodě a obarveny 1% kyseliny fosfowolframové (5 min). Vzorky byly ponořeny do roztoku anilinové modři (2,5% anilinové modři [Bamed] a 2,5% ledové kyseliny octové). Následná diference byla provedena pomocí 1% octové kyseliny. Vzorky byly montovány do vodného média ImmunoHistoMount (Sigma-Aldrich).

Rehydratované vzorky byly barveny pomocí Van Giesonova pikrofuchsinu (kat. č. C0602; DiaPath, Martinengo, Itálie) podle návodu výrobce. Vzorky byly dehydratovány a montovány do bezvodého média DPX (Sigma-Aldrich).

Rehydratované vzorky byly barveny pomocí naftol AS-D chloroacetát esterázové soupravy (kat. č. 91C-1KT; Sigma-Aldrich) podle návodu výrobce. Vzorky byly zamontovány do montovacího média ImmunoHistoMount (Sigma-Aldrich).

Stříbrná autometalografie byla provedena podle Danschera a kol. (Danscher et al. 1994b) Zavodněné vzorky byly ponořeny do 0,5% želatiny (Sigma-Aldrich) a usušeny při 20°C po dobu 20 min. Skla byla poté převrstvena vyvíjecím činidlem (30% guma guar, 2,55% kyselina citronová, 2,35% citrát sodný, 0,85% hydrochinon a 0,11% laktátu stříbrného [vše ze Sigma-Aldrich]) v temnu při 20°C po 90 min. Vzorky byly oplachovány teplou vodou z vodovodu a po 20 min byly ponořeny do 0,9% thiosíranu sodného (Sigma-Aldrich) a 0,1% ferokyanatanu

sodného (Merck) na 19 s, opláchnuty demineralizovanou vodou, odvodněny a montovány do roztoku Pertex.

### 3.26. 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 tkáň	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 hodnocena 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.

Průměrný počet naftol AS-D chloracetát esteráza pozitivních buněk v jednom mikroskopickém poli byl určen ze snímků získaných kamerou Olympus DP73 a programem určeným pro obrazovou analýzu ImagePro 5.1. Buňky byly označeny a spočítány ručně v šesti náhodně vybraných polích na vzorek při 400násobném zvětšení. Sledována byla oblast nově vznikající pojivové tkáň v těsné blízkosti spodiny rány.

Procentuální množství kolagenových vláken v mikroskopickém poli řezů barvených Van Giesonovým pikrofuchsinem bylo hodnoceno pomocí počítačové obrazové analýzy. Pozitivita byla detekována v kanálech červené, zelené a modré barvy v rozsahu: červená 180–218, zelená 62–128 a modrá 121–185 a vyjádřena v procentech. Šest mikroskopických polí bylo náhodně vybráno z oblasti nově vznikající pojivové tkáně blízko spodiny rány.

Distribuce stříbrných iontů byla hodnocena v celém rozsahu biopsie ve vzorcích barvených stříbrnou autometalografií.

Statistická významnost rozdílů histologických parametrů byla určena Wilcoxonovým párovým testem (IBM SPSS Statistics 24, IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Test byl proveden pro parametry vzorků Ag-CMC a OCT-HA v odpovídajících časech odběru. Rozdíly byly považovány za významné při hladině  $p \leq 0,05$ .

### **3.27. Fluorescenční mikroskopie**

Histologické řezy na sklech Superfrost Plus<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) byly deparafinovány a inkubovány přes noc v roztoku primární protilátky přes noc (1:100, CD68 (KP1), MA5-13324, Thermo Fisher Scientific) a následné inkubaci po 90 min v roztoku sekundární protilátky s konjugovaným fluoroforem Alexa Fluor 555 (ab150114, Abcam, Cambridge, Velká Británie; ředění 1:10 000) a montovány roztokem ProLong Diamond Antifade Mountant obsahující DAPI (ThermoFisher Scientific). Řezy byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 X s objektivem Leica HC PL APO CS2 (20×, 0,75 NA, vodní) při excitaci 405 nm pro DAPI a 550 nm bílého laseru pro excitaci Alexa 555. Snímky byly získány složením několika obrazů nasnímaných v rovině z po 1,8  $\mu\text{m}$  krocích v kvantitativním módu. Ve fluorescenčních kanálech byla provedena maximální projekce intenzity. Kvantifikace fluorescence ve všech obrazech byla provedena pomocí programu Fiji (Schindelin et al. 2012). Intenzita fluorescence byla sledována ve třech až pěti polích při spodině rány. Výsledky byly vyjádřeny jako počet pixelů nad prahem intenzity (30 ve všech snímcích). Tento práh intenzity byl určen na vzorku inkubovaného pouze v sekundární protilátce. Statistická významnost rozdílů mezi Ag-CMC a OCT-HA v daných časech byla určena pomocí Wilcoxonova párového testu v programu R (R Development Core Team 2018a).

### **3.28. Genová exprese**

Izolace RNA, cDNA syntéza a qPCR analýza genové exprese byla provedena dříve popsáním způsobem (Klein et al. 2018b). TaqMan Real-Time PCR sondy (ThermoFisher Scientific) použité pro qPCR byly: IL1B - Hs01555410\_m1; TNF - Hs01113634\_g1; CD3E - Hs01062241\_m1, CD4 - Hs01058407\_m1; CD8A - Hs00233520\_m1; CD14 - Hs02621496\_s1;

MT1G - Hs01584215\_g1; MT1H - Hs00823168\_g1; GADD45G - Hs00198672\_m1; RPL13A - Hs04194366\_g1. Hodnoty prahového cyklu sledovaných genů byly normalizovány ke genu RPL13A a tyto normalizované hodnoty byly vztaženy k průměru biopsií daného pacienta před zahájením léčby pomocí  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metody (Livak a Schmittgen 2001b). Statistická významnost rozdílů byla určena Wilcoxonovým párovým testem v programu R.

### 3.29. 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 rozmražení. Lyzát byl centrifugován (2000 g, 10 min) a byl použit supernatant.

Primární keratinocyty a fibroblasty byly izolovány z kůže odebrané po plastické operaci očních víček (Galen, Ústí nad Orlicí, Česká republika). Fibroblasty a keratinocyty byly kultivovány za podmínek popsanych v sekci 3.12. v šestijamkovém kultivačním panelu. Indukce tvorby MMP buňkami byla provedena ozářením UV-B 60 mJ/cm<sup>2</sup> pomocí UV lampy (Oriol Instruments, Newport, NY, USA). Kondicionované bezsérové médium bylo odebráno po 24 h od ozáření. Trypsin použitý ve fluorogenní metodě byl zředěn ze zásobního roztoku (Trypsin-EDTA Solution 10×, Merck Life Science, Německo). Lidská rekombinantní MMP-2 exprimovaná v *Escherichia coli* byla zakoupena (Merck Life Science, Německo).

Kultivační média, případně lyzáty, eukaryotických buněk a bakterií byly testovány na přítomnost želatinolytické aktivity pomocí želatinové zymografie. Vzorke obsahující proteinázy z fibroblastů, keratinocytů a neutrofilů byly smíchány v takovém poměru, že želatinolytická aktivita jednotlivých složek byla obdobná. Stejně to bylo provedeno pro bakteriální proteinázy. Celková želatinolytická aktivita směsi proteináz odpovídala aktivitě 15 pg lidské rekombinantní proteinázy MMP-2.

### 3.30. Testované antimikrobiální látky

Zásobní roztok povidon jódu (PVP-I, Betadine, EGIS Pharmaceuticals PLC, Maďarsko) obsahoval 100 mg/ml PVP-I, z nějž bylo 10 mg/ml aktivního jódu. Laktát stříbrný (Merck Life Science, Německo) byl před použitím rozpuštěn v demineralizované vodě na koncentraci 70



mg/ml a chráněn před světlem a kontaktem s kovy. Chlorhexidin diglukonát byl ředěn přímo do pufru ze zásobního roztoku (20% vodný roztok, Merck Life Science, Německo). Oktenidin hydrochlorid (Dishman Pharma & Chem.Ltd, Indie) byl rozpuštěn na 3% roztok v 96% ethanolu.

### 3.31. Želatinová zymografie

Byla provedena standardní SDS-PAGE v gelu obsahujícím 10% akrylamid a 0,2% želatinu (Toth et al. 2012). Vymývací krok v 2,5% Tritonu X-100 (Merck Life Science, Německo) byl prodloužen na 45 min, během kterých byly provedeny tři výměny roztoku. Inkubace ve vyvíjecím pufru (50 mM HEPES s 5mM dusičnanem vápenatým, pH 7,8) trvala 17 hod při 37 °C. Nepoužili jsme obvyklý Tris-HCl vyvíjecí pufr, protože chloridové ionty sráží chlorhexidin i stříbro. Prokaryotická i eukaryotická směs proteináz byla nanášena dvakrát na každý 1 mm gel a podrobena elektroforéze při 120 V po 90 min (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad, CA, USA). Gely byly rozříznuty na poloviny a umístěny do oddělených Petriho misek. Následovala inkubace v roztocích obsahujících antimikrobiální látky nebo kontrolní vyvíjecí roztok.

PVP-I byl ředěn přímo ze zásobního roztoku pro dosažení koncentrací 10, 2 a 0,4 mg/ml. Laktát stříbrný byl testován v koncentrační řadě 7, 1,4 a 0,28 mg/ml. Chlorhexidin diglukonát byl použit v koncentracích 0,5 a 0,1 mg/ml. Koncentrace oktenidinu hydrochloridu ve vyvíjecím roztoku byla 100, 20, nebo 4 µg/ml. Každá koncentrace byla testována ve čtyřech nezávislých replikátech.

Gely po vyvíjecím kroku byly barveny roztokem Coomassie Brilliant Blue a vyfotografovány. Intenzita zymografických pruhů byla sledována pomocí denzitometrie v software Fiji (Anon. nedatováno). Vypočtené denzity pruhů pro každé ovlivnění ( $n = 4$ ) byly vztaženy k neovlivněným kontrolám ( $n = 4$ ). Normalita rozdělení byla testována Shapiro-Wilkovým testem v programu R (R Development Core Team 2018b). Tam, kde nebyla normalita zamítnuta, byla významnost změny v aktivitě proteináz testována Studentovým jednovýběrovým t-testem (Excel, Microsoft Office).

### 3.32. Fluorogenní zymografie

DQ želatina (ThermoFisher Scientific, USA) byla rozpuštěna na koncentraci 1 mg/ml v demineralizované vodě, odsolena ultracentrifugací přes kolonku (3 500 kDa MWCO, Amicon, ThermoFisher Scientific, Německo), protože soli přítomné v roztoku DQ želatiny precipitují stříbro. Přefiltrovaný roztok byl uložen při 4 °C. Koncentrace DQ želatiny byla stálá ve všech měřeních (40 µg/reakce). Aby nedocházelo k precipitaci testovaných antimikrobiálních látek, tak byly používány optimalizované pufrы. Chlorhexidin byl rozpuštěn v pufru (50 mM HEPES,

10 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 μM ZnSO<sub>4</sub>, pH 6,9) ve dvojkové ředící řadě počínající 1 % finální koncentrace látky v reakci. Laktát stříbrný byl rozpuštěn v pufru (50 mM HEPES, 10 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 μM ZnSO<sub>4</sub>, pH 6,0) ve dvojkové ředící řadě o nejvyšší koncentraci 10 mg/ml. Oktenidin hydrochlorid byl rozpuštěn v pufru (50 mM HEPES, 1 μM ZnSO<sub>4</sub>,

pH 6,9) v dvojkové ředící řadě počínající 30 μg/ml. Jód zháší fluorescenci DQ želatiny, a proto nebyl ve fluorogenní zymografii použit. Všechny roztoky proteináz (čisté nebo ve směsi) byly také odsoleny ultracentrifugací (3 500 kDa MWCO). Byla zachována koncentrace substrátu DQ želatiny napříč reakcemi. Proto byly uzpůsobeny koncentrace proteináz na konstantní aktivitu, aby nedocházelo k limitace reakce příliš nízkou koncentrací substrátu.

Celková koncentrace proteinu ve všech reakcích byla upravena na 0,3 mg/ml přidavkem BSA. Každá reakce obsahovala 40 μL antimikrobiální látky o příslušné koncentraci a pufru, 10 μl roztoku proteináz a 50 μl DQ želatiny rozpuštěné v příslušném pufru. Proteinázová aktivita byla měřena průběžně po dobu 150 min (Ex 485 nm, Em 520 nm, EnSight, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Nárůst fluorescence mezi 10. a 30. minutou byl lineární; proteinázy nebyly limitovány substrátem. Změřili jsme sedm koncentrací každé antimikrobiální látky a reakce bez antimikrobiální látky. Měření byla pro každé opakování provedena dva až třikrát. Rozdíly ve fluorescenci byly vyjádřeny jako procenta aktivity neovlivněné kontroly. Tyto hodnoty byly proloženy čtyřparametrovou log-lineární křivkou v programu R pomocí funkcí z drc balíčku (Ritz et al. 2015). V tomto prostředí byla také vypočtena IC<sub>50</sub> a 95% interval spolehlivosti.

### 3.33. *Ex vivo* prasečí kůže

Prasečí kůže byla připravena podobně jak je popsáno v sekci 3.6. Dermis byla buď inkubována s antiseptiky přímo ve zkumavce, nebo nepřímo ve Franzových difuzních celách po dobu 24 hod. Komerčně dostupný inhibitor proteináz (Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets, ThermoFisher Scientific, USA) byl také použit jako možná pozitivní kontrola. Dermis byla po inkubaci důkladně omyta v PBS a homogenizována v přístroji TissueLyser II (Qiagen, Německo) pomocí kuliček (20 min, 30 Hz). Homogenát byl centrifugován (10 min, 10 000 g) a koncentrace celkového proteinu byla stanovena kolorimetricky (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, USA). Vzorky zředěné na stejnou koncentraci proteinů byly podrobeny želatinové zymografii.

### 3.34. *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). Kryorezy 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). Normalita distribuce hodnot byla ověřena Shapiro-Wilkovým testem v programu R (R Development Core Team 2018b). Tam, kde nebyla normalita zamítnuta, statistická významnost změny ve fluorescenci byla určena Studentovým jednovýběrovým t testem (Excel, Microsoft Office), kde nulová hypotéza předpokládala, že průměr fluorescence ve vzorku byl roven 100 % (hodnota kontroly).

### **3.35. Statistické zpracování dat**

Pokud není uvedeno jinak, byl použit Studentův dvouvýběrový t test pro určení statistické významnosti změny mezi ovlivněnými vzorky a kontrolami.

## 4. VÝSLEDKY

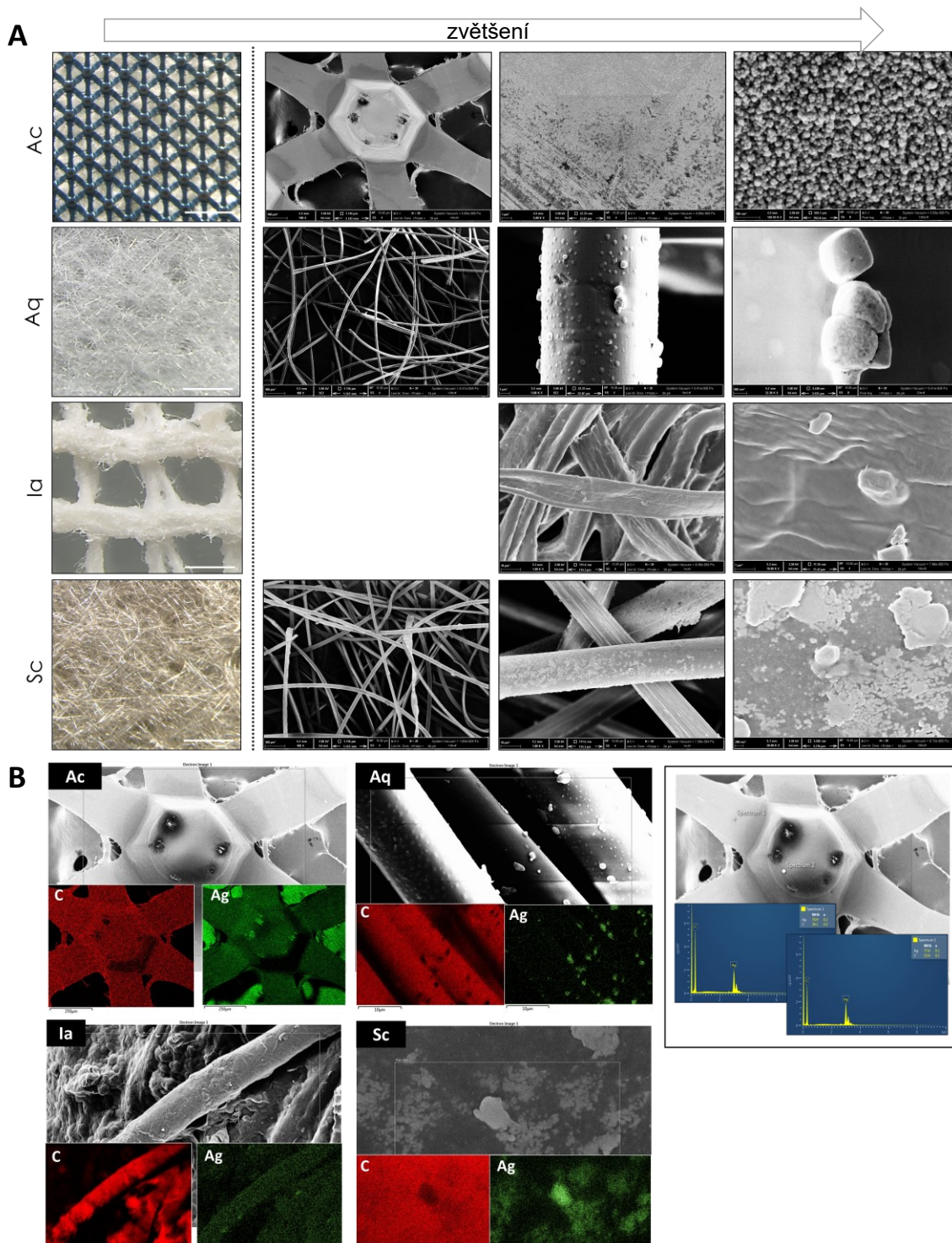
### 4.1. Charakterizace sledovaných bandáží

Kryty ran vybrané pro experimenty v této studii se lišily v konstrukci a chemickém složení své aktivní vrstvy. Aquacel Ag Hydrofiber (Aq), Acticoat (Ac) a Silvercel Hydroalginate (Sc) jsou částečně nebo úplně tvořeny netkanou textilií, která v ráně slouží jako absorbent exsudátu. Ialugen Plus (Ia) je bandáž v podobě bavlněné síťky s nanoseným krémem se sulfadiazinem stříbrným (Tabulka 2).

**Tabulka 2.** Přehled testovaných bandáží.

<b>Obchodní jméno (výrobce)</b>	<b>Složení</b>	<b>Forma Ag a jeho výrobcem uváděný obsah Ag (mg/cm<sup>2</sup>)</b>
Acticoat <sup>TM</sup> (Smith&Nephew, Velká Británie)	Savá vrstva z viskózy a polyesteru v sendviči tvořící prostřední vrstvu mezi dvěma vnějšími polyethylenovými síťkami pokrytými nanokrystalickým stříbrem	Nanokrystalické stříbro, Ag <sup>0</sup>  Množství neuvedeno
Aquacel <sup>®</sup> Ag Hydrofiber <sup>®</sup> (Convatec, Velká Británie)	Netkaná textilie složená z karboxymethyl celulózy a iontového stříbra	Iontové stříbro (AgCl)  1,2% Ag <sup>+</sup> (0,12 mg Ag <sup>+</sup> /cm <sup>2</sup> )
Ialugen Plus <sup>®</sup> (IBI, Česká republika)	Kryt impregnovaný krémem s hyaluronanem sodným, sulfadiazinem stříbrným, makrogolem 4000, 85% glycerolem a vodou	Sulfadiazin stříbrný (SSD)  0,4 mg SSD / cm <sup>2</sup> (0,12 mg Ag <sup>+</sup> /cm <sup>2</sup> )
Silvercel <sup>®</sup> Hydro- Alginate (Systagenix, Velká Británie)	Netkaná textilie z alginátu guluronové kyseliny, CMC a vláken pokrytých stříbrem	Iontové stříbro  Množství neuvedeno

Kryty se lišily ve formě stříbra, které obsahují. Iontové stříbro bylo rozprostřeno rovnoměrněji u krytu Sc než u krytu Aq (Obrázek 3). Ac obsahoval těsně uspořádané stříbrné nanočástice (průměrně 10 nm velké). Krém sulfadiazinu stříbrného (SSD) v Ia byl rovnoměrně rozprostřen přes bavlněnou síťku této bandáže.



**Obrázek 3.** (A) Makroskopický pohled a SEM snímkování testovaných bandáží a (B) analýza distribuce uhlíku a stříbra pomocí EDX. (A) Levý sloupec ukazuje makroskopické snímky pořízené pomocí stereomikroskopu (Leica), měřítko 1 mm. Zbytek obrázků byl vyfocen pomocí elektronového mikroskopu, přičemž zvětšení narůstalo od obrázků v levém sloupci směrem k pravému sloupci. (B) EDX analýza bandáží – černobílé obrázky v pozadí ukazují bandáž při menším zvětšení, ze kterého byla vybrána pole, v nichž bylo provedeno snímkování uhlíku (C; červeně) a stříbra (Ag; zeleně). Pravý obrázek v černém rámečku ukazuje EDX měření uhlíku a stříbra v Ac.

## 4.2. Množství stříbra uvolněného z bandáží do kultivačního média

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 (Tabulka 2). Také jsme změřili množství stříbra extrahovaného do fyziologického roztoku nebo kultivačního média s FBS. Bandáže se lišily množstvím stříbra, které obsahují, nicméně tyto rozdíly neodpovídaly množství eluovaného stříbra (Tabulka 3). Zatímco množství stříbra extrahovaného do fyziologického roztoku bylo velmi malé a velmi podobné mezi bandážemi, více stříbra se uvolnilo do kultivačního média s FBS.

**Tabulka 3.** Kvantifikace množství stříbra v bandážích po extrakci do fyziologického roztoku nebo kultivačního média s FBS. Měřeno pomocí ICP-OES.

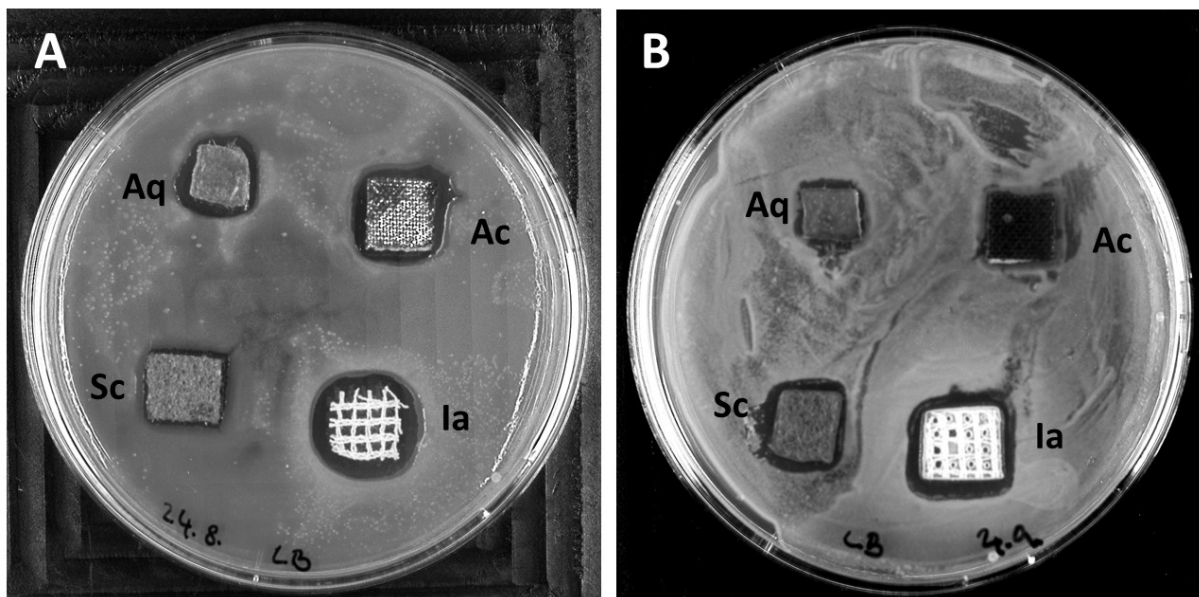
Kryt	Obsah stříbra v krytu (µg/cm <sup>2</sup> )	Obsah stříbra v extraktu do fyz. roztoku (µg/mL)	Obsah stříbra v extraktu do média (µg/mL)
Aq	120 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,32	18,1 ± 5,6
Ac	919,1 ± 141,4	0,28 ± 0,10	21,8 ± 4,4
Sc	863,8 ± 26,8	0,43 ± 0,21	3,5 ± 0,4
Ia	120*	0,45 ± 0,19	45,9 ± 23,0

<sup>a</sup> uvedeno výrobcem

## 4.3. 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 (Obrázek 4). Ia vytvořil největší inhibiční zónu. Žádné větší rozdíly mezi efektivitou vůči Grampozitivnímu *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. V Tabulka 4 je ukázáno, 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.



**Obrázek 4.** Modifikovaný diskový difuzní test krytů se stříbrem proti (A) *S. aureus* a (B) *P. aeruginosa*, v němž bylo použito po 1 cm<sup>2</sup> (v suchém stavu) kusech krytů zvlhčených růstovým médiem s 10% FBS. Misky byly inkubovány 24 h. Obrázky reprezentují výsledek třech nezávislých opakování.

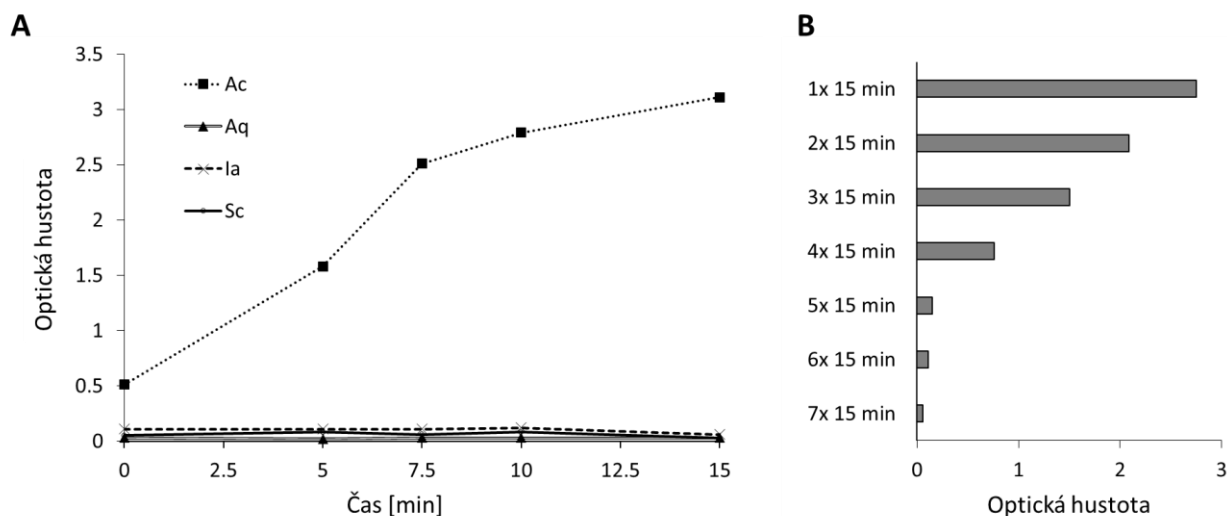
**Tabulka 4.** Minimální inhibiční koncentrace (MIC) stříbra vyluhovaného z krytů. Kryty byly inkubovány tři dny v DMEM médiu s 10% FBS. MIC byla stanovena dilučním testem. Tabulka ukazuje ředění extraktu, které bylo účinné v prevenci růstu bakterií. V závorkách jsou uvedena množství stříbra odpovídající MIC určená dle ICP-OES.

Kryt	MIC ředění eluátu (odpovídající koncentrace 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)

#### 4.4. Přímá tvorba reaktivních kyslíkových intermediátů

Jedním z uváděných mechanismů působení produktů se stříbrem je produkce reaktivních kyslíkových intermediátů (ROS). Proto jsme testovali schopnost vybraných krytů přímo produkovat ROS (v bezbuněčných podmínkách) pomocí přeměny tetrametylbendizinu (TMB) v barevný produkt. TMB je oxidováno za katalýzy křenovou peroxidázou (HRP) na barevný produkt hydroxylovými radikály produkovanými HRP z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tato reakce tedy může detekovat buď hydroxylové radikály nebo peroxid vodíku generované bandáží v médiu. Za těchto podmínek byly vytvořeny ROS jen bandáží Ac (Obrázek 5). Kryt Ac byl opakovaně inkubován v

čerstvém roztoku (vždy 15 min), aby bylo určeno, kdy se vyčerpá tvorba ROS. Množství ROS se snižovalo postupně s každým přenesením do čerstvého roztoku a v sedmém roztoku (105 min celkové inkubace) nebyla skoro detekována oxidační aktivita (Obrázek 5).



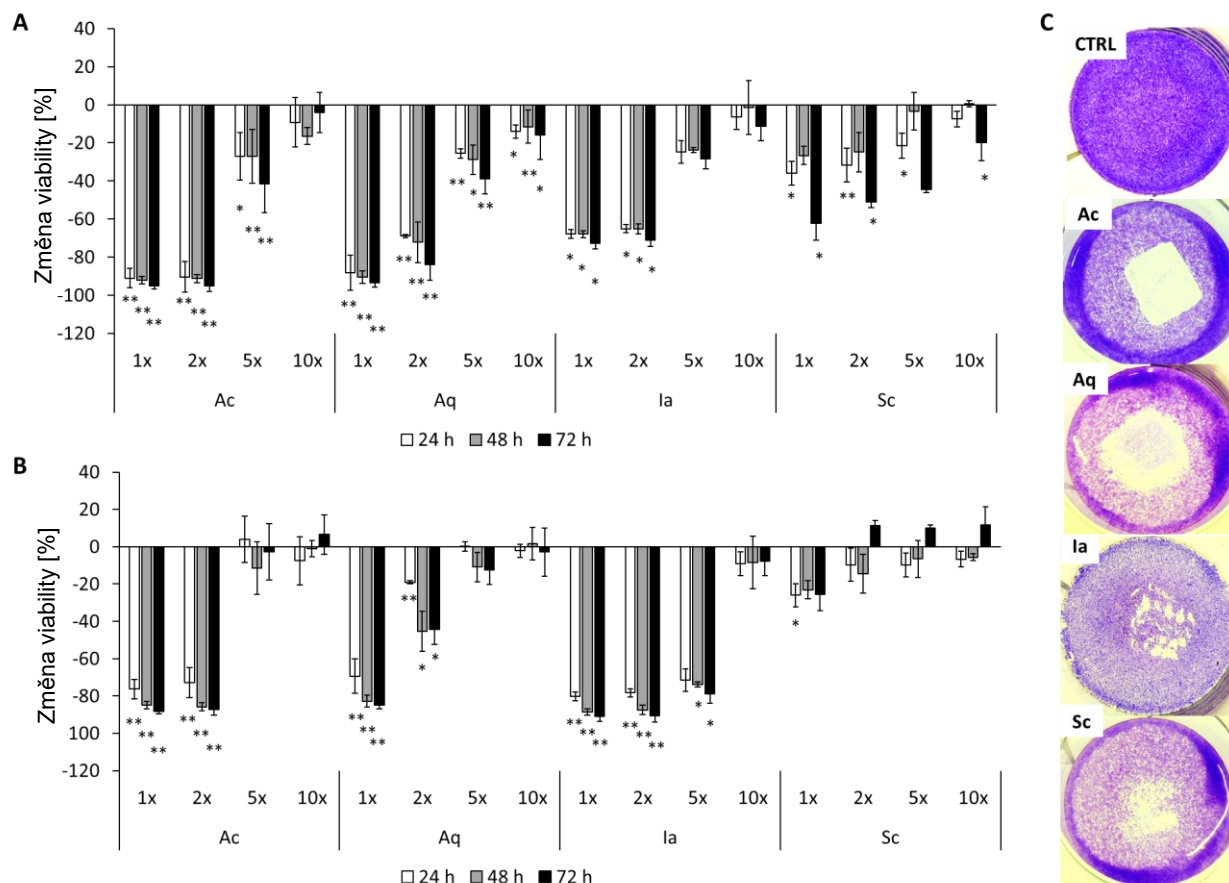
**Obrázek 5.** Tvorba kyslíkových radikálů a peroxidu vodíku indukovaná bandážemi. (A) Srovnání schopnosti Ac, Aq, Sc a Ia tvořit kyslíkové radikály, jež byly detekovány pomocí oxidace TMB. (B) Tvorba kyslíkových radikálů indukovaná Ac a detekovaná systémem TMB/HRP. Ac bandáž byla inkubována 15 min v roztoku a pak přenesena do nového roztoku. Extrakce toho samého vzorku bandáže byla provedena celkem sedmkrát.

## 4.5. Srovnání cytotoxicity různých stříbrných krytů *in vitro*

### 4.5.1. MTT test

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 6. Všechny testované extrakty krytů byly statisticky významně ( $p < 0,05$ ) toxické vůči HaCaT keratinocytům v pořadí od nejtoxičtějšího:  $Aq \approx Ac > Ia > Sc$ . 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 6.** 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 používané 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.

#### 4.5.2. Test inhibice růstu po přímém kontaktu buněk

U HaCaT keratinocytů se projevila toxický efekt bandáží i po přímém kontaktu krytu s buňkami (Obrázek 6C). Bílé zóny jsou v místě, kde byly mrtvé buňky odmyty. Tato místa byla přímo pod krytem nebo v jeho blízkosti. Nižší intenzita barvení (nejvýraznější pro Ia kryt) je znakem celkového snížení viability buněk. Test kontaktní inhibice byl proveden také pro NHDF fibroblasty. Nicméně tyto buňky se barvily velmi slabě i u neovlivněných kontrol. Proto nejsou prezentovány výsledky tohoto testu.

#### 4.5.3. Hemolýza vyvolaná stříbrnými bandážemi

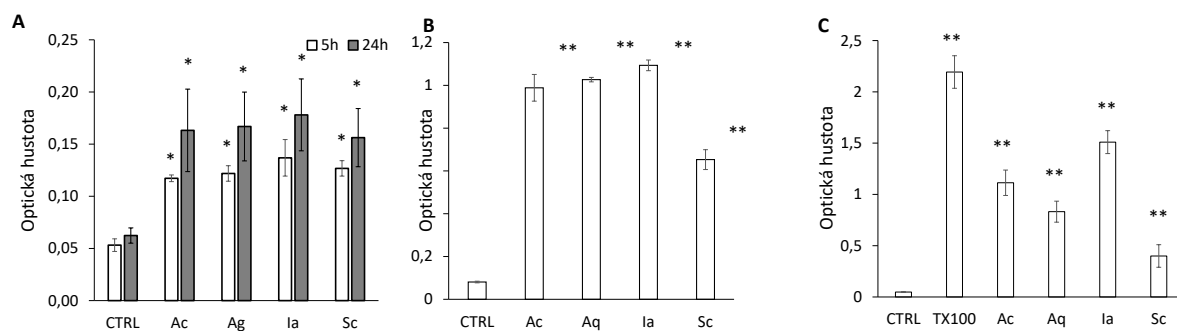
V plné periferní krvi byla sledována hemolýza, kterou by mohly způsobit sledované kryty se stříbrem. Detergent Triton X-100 sloužil jako pozitivní kontrola. Významný nárůst absorbance odpovídající uvolněnému hemoglobinu byl zaznamenán pro všechny kryty (Obrázek 7C). Přibližně polovina červených krvinek byla hemolyzovaná po 16 h inkubace s kryty.

Největší hemolýzu vyvolal Ia, zatímco Sc indukoval nejmenší hemolýzu. Ve vzorcích byla kromě hemolýzy také pozorována zvýšená aktivita LDH (Obrázek 7B). To značí poškození krevních buněk sledovanými kryty. Obdobně jako u hemolýzy, všechny kryty způsobily významný ( $p < 0,05$ ) nárůst hladiny LDH. Sc způsobil nejméně poškození.

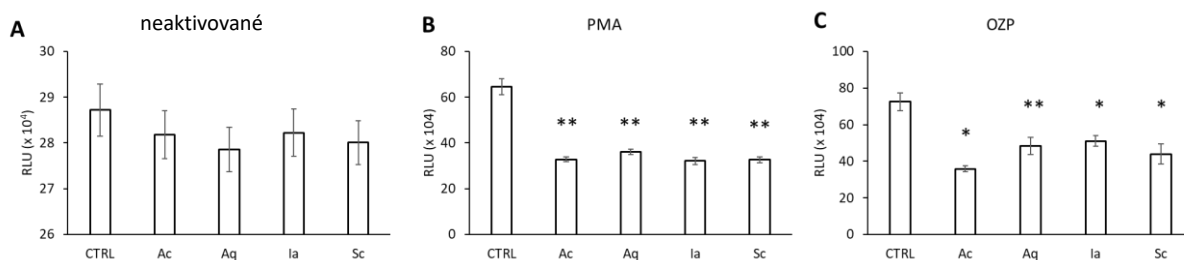
#### 4.5.4. Cytotoxicita stříbra a aktivace imunitních buněk

O krytech se stříbrem se uvádí, že inhibují leukocytární (neutrofilovou) aktivaci a reaktivitu. Toto je považováno za přínosné, protože může docházet ke snižování nadměrného zánětu chronických ran. Aktivaci neutrofilů, jinak též produkci ROS nebo oxidativní vzplanutí neutrofilů, jsme detekovali v lidské periferní krvi. Všechny testované výluhy krytů inhibovaly indukované oxidační vzplanutí neutrofilů a také nezpůsobily spontánní oxidativní vzplanutí neaktivovaných buněk (Obrázek 8). Inhibice aktivovaných neutrofilů může být způsobena nespecifickou toxicitou testovaných látek. Proto byla sledována aktivita LDH u izolovaných neutrofilů inkubovanými s extrakty bandáží. Obrázek 7 ukazuje zvýšenou hladinu LDH ve všech ovlivněných vzorcích.

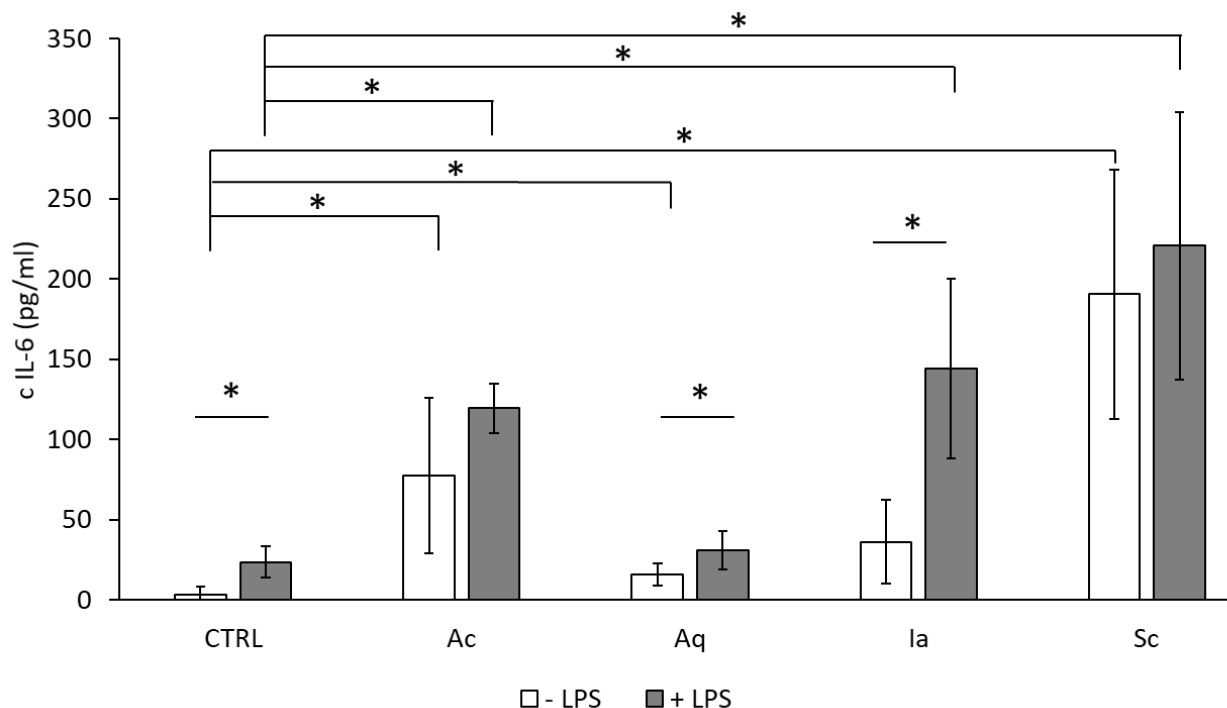
Nicméně, jiné leukocyty jsou v chronických ranách zastoupen hojněji než neutrofilů (Rosner et al. 1995; Loots et al. 1998); monocyty a makrofágy jsou nejvíce zastoupenými leukocyty v chronických ranách. Monocyty jsou aktivovány cizorodým materiálem. Proto jsme sledovali odpověď monocytů inkubovaných s testovanými stříbrnými kryty v monocytů aktivujícím testu (MAT). Standardně se měří produkce prozánětlivého IL-6 u monocytů bez předchozí aktivace nebo po předchozí aktivaci bakteriálním LPS. Obrázek 9 ukazuje hladiny IL-6 u neaktivovaných a LPS aktivovaných monocytů plné krve po 16 h inkubaci se stříbrnými bandážemi. I ve vzorcích bez LPS byl zaznamenán statistický významný ( $p < 0,05$ ) nárůst hladiny IL-6 u Ac, Aq a Sc. U LPS aktivovaných monocytů IL-6 hladina vzrostla statisticky významně ( $p < 0,05$ ) pro Ac, Ia a Sc. Po přidavku LPS došlo k nárůstu IL-6 u všech krytů. Tento nárůst byl statisticky významný jen pro Aq a Ia.



**Obrázek 7.** Uvolnění LDH z buněk a hemolýza vyvolaná inkubací buněk se stříbrnými kryty. (A) Aktivita LDH byla změřena ve vzorcích izolovaných neutrofilů po pěti a 24 h inkubaci s kryty. (B) Hladina LDH v plné krvi po 16 h inkubaci s bandážemi. Výška sloupců odpovídá průměru ze tří nezávislých opakování  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  daného vzorku vůči neovlivněné kontrole. (C) Hemolýza v plné krvi jako nárůst v absorbanci hemoglobinu. Pozitivní kontrola byl Triton X-100.



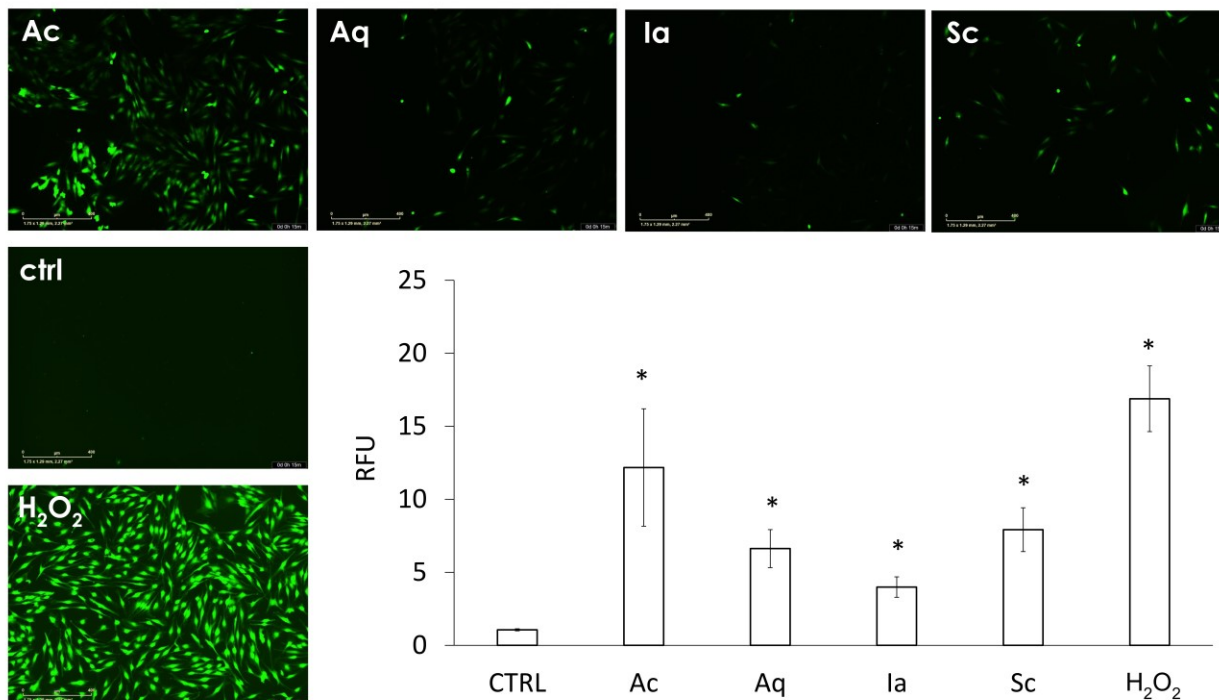
**Obrázek 8.** Vliv stříbrných krytů na aktivaci neutrofilů. (A) Samovolná aktivace buněk stříbrnými kryty bez předchozí stimulace nebo (B) předchozí stimulace pomocí PMA či (C) OZP a následné ovlivnění výluhy z bandáží do 10% media s FBS. Hodnoty odpovídají relativní fluorescenci zvýšené oxidativním vzplanutím neutrofilů. Výsledky ukazují průměr ze čtyřech nezávislých opakování  $\pm$  SD, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .



**Obrázek 9.** Monocyty aktivující test krytů obsahujících stříbro. Uvolnění IL-6 z monocytů plné krve po 16 h trvající inkubaci s bandážemi. Bílé sloupce ukazují vzorky bez přidaného LPS, šedé sloupce znázorňují hodnotu IL-6 u vzorků s přidaným LPS (0,25 IU/ml). Výška sloupců odpovídá průměru  $\pm$  SD ze třech nezávislých opakování, \* $p < 0,05$ .

#### 4.6. Oxidační poškození buněk *in vitro*

Pozorovaná toxicita stříbrných krytů může být zapříčiněna oxidačním stresem. Proto byla sledována buněčná oxidační aktivita pomocí DCF-DA sondy u fibroblastů inkubovaných s extrakty z bandáží. DCF barvení ukázalo po 15 min inkubaci zvýšený oxidační stres u fibroblastů inkubovaných s Ac; Aq, Sc a Ia zvýšily oxidační stres méně (Obrázek 10). Tyto výsledky odpovídají tomu, že Ac kryt generoval ROS samovolně i bezbuněčném systému.



**Obrázek 10.** Vnitrobuněčný oxidativní stres. Fibroblasty byly nejprve inkubovány s DCF-DA a poté byly ovlivněny po dobu 15 min výluhy z bandáží nebo 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jakožto pozitivní kontrolou. Měřítka 400 μm. Reprezentativní obrázky byly vybrány ze třech nezávislých experimentů. Graf ukazuje množství intracelulární DCF fluorescence ze třech nezávislých opakování ± SD. \*p < 0,05.

## 4.7. DNA poškození vlivem stříbrných krytů

### 4.7.1. In vitro

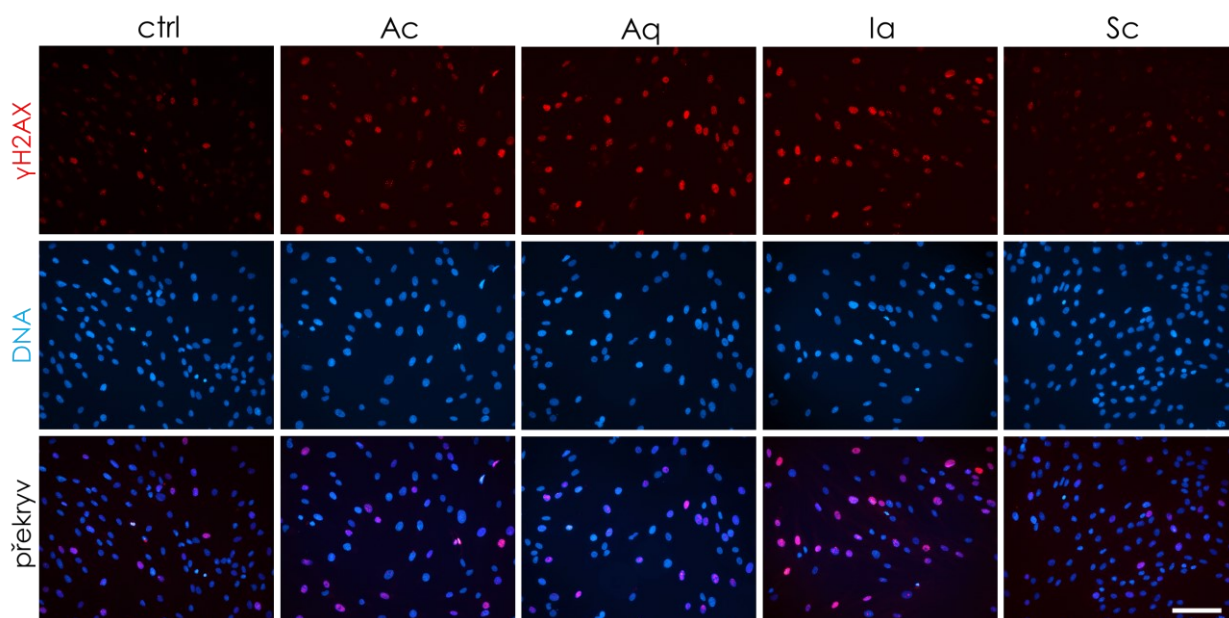
DNA poškození bylo sledováno po 24 h inkubaci s výluhy z bandáží. Poté byl imunofluorescenčně detekován marker DNA poškození –  $\gamma$ H2AX. Obrázek 11 ukazuje zvýšený signál  $\gamma$ H2AX hlavně u fibroblastů ovlivněných kryty Ac, Aq a Ia. Vzhledem ke kontrole kryt Sc nezvyšoval hladinu  $\gamma$ H2AX. Bylo také patrné, že jádra buněk inkubovaných s Ac, Aq a Ia výluhy byla zvětšená v porovnání s Sc a kontrolou.

### 4.7.2. Ex vivo

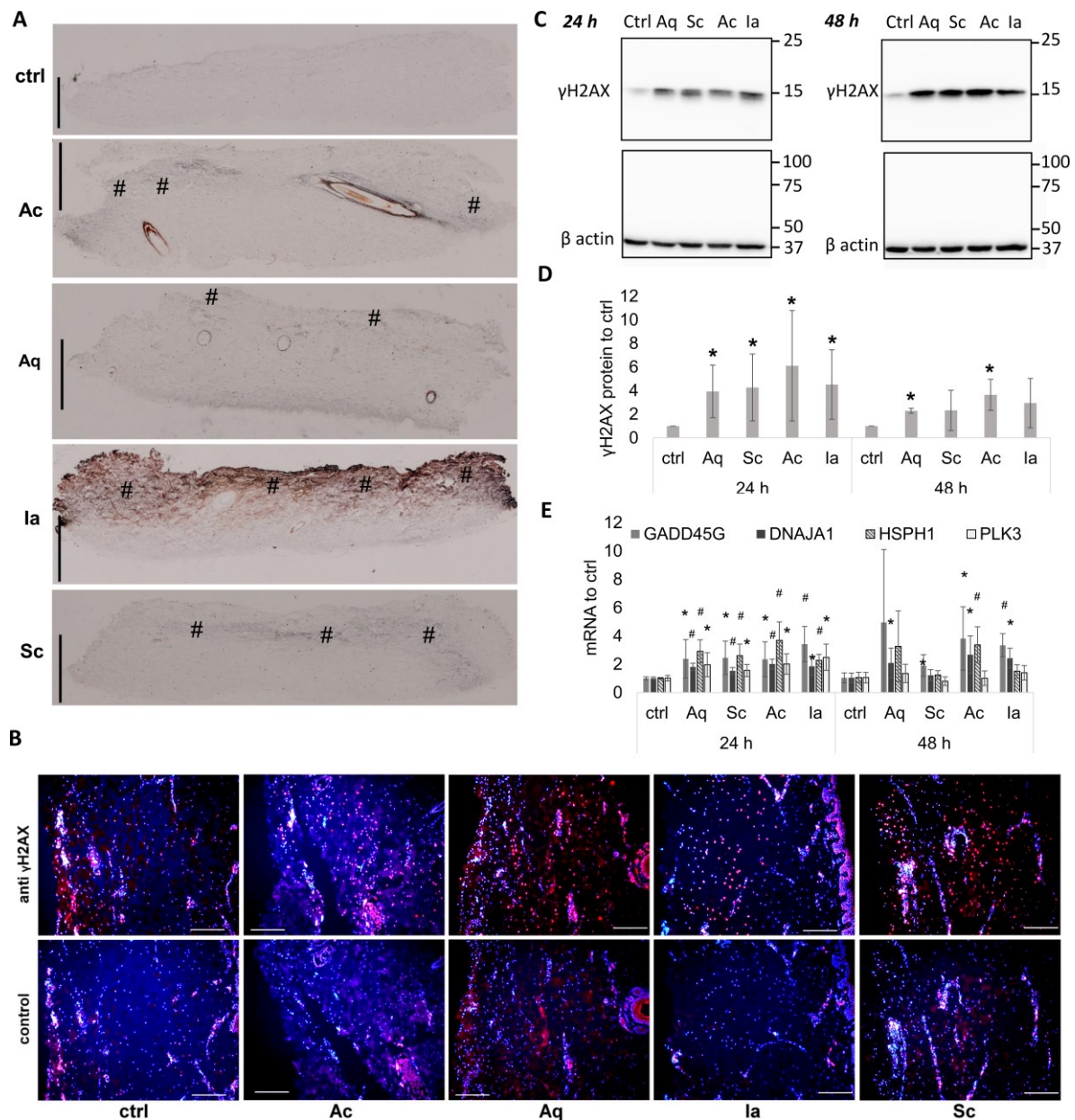
Dále bylo sledováno, jestli stříbro proniká do dermis a může zde vyvolat DNA poškození a stresovou odpověď. Kožní explantáty prasečí kůže se zachovalou epidermis (její odstranění by samo o sobě mohlo vyvolat buněčný stres) byly kultivovány dermální stranou nahoru s přiloženou testovanou bandáží po 24 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 12. 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 více zvýraznit signál u stříbrných solí (např. SSD v Ia) než u stříbrných nanočástic, protože při stejném množství stříbra může být stříbrná sůl rozprostřena rovnoměrněji.

$\gamma$ H2AX, což je marker DNA zlomu v obou řetězcích, bylo detekováno v řezech imunofluorescencí (Obrázek 12B). 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 12C-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.



**Obrázek 11.** Imunocytochemická detekce DNA poškození NHDF buněk po ovlivnění extrakty ze stříbrných bandáží. Marker poškození DNA  $\gamma$ H2AX (červený kanál), DNA barvena DAPI (modrý kanál) a překryv obou kanálů. Měřítko odpovídá 100  $\mu$ m. Obrázky reprezentují výsledky třech nezávislých opakování.



**Obrázek 12.** 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 kůže) a inkubovány 24 h. Hnědočerné zabarvení ukazuje stříbro proniklé do kůže. Lokálně zvýšené barvení stříbra je označeno (#). Měřítko 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 kalibračního proteinu  $\beta$  aktinu z kůže inkubované se stříbrnými kryty 24 nebo 48 h. Obrázek je složen ze čtyřech snímků membrán, jak označují dělicí čáry. (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.

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

Pro detailnější zjištění rozsahu změn způsobených stříbrnými kryty bylo provedeno sledování genové exprese (Obrázek 12E). 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.

#### 4.9. Pronikání stříbra do prasečí kůže ex vivo

Ze stříbrné autometalografie je zřejmé, že stříbro do kůže přes prasečí dermis pronikalo. Stanovili jsme proto množství stříbra proniklého do kůže pomocí ICP-OES. Epidermis byla odstraněna teplotním šokem. Stříbrné kryty byly položeny na kůži a uzavřeny do Franzovy difuzní cely. Stříbro bylo detekováno v kůži i v akceptorovém roztoku (Tabulka 5). Množství stříbra proniklého do kůže po 24 h inkubace bylo obdobné u Aq, Ac i Sc. Kůže s Ia akumulovala stříbra nejvíce. Hodnoty jednotlivých opakování pro Ia byly variabilní zřejmě kvůli nehomogenitě rozprostření SSD na krytu. Po celkové inkubaci 48 h se množství stříbra v kůži u Aq a Ac ještě zvýšilo. U Ia ke zvýšení už nedošlo. Nejméně stříbra bylo detekováno v kůži i v akceptorovém roztoku u Sc, což je překvapující vzhledem k vysokému obsahu stříbra v Sc krytu.

**Tabulka 5.** Pronikání stříbra do kožních explantátů. Prasečí kůže byla inkubována s bandážemi ve Franzových difuzních celách 24 a 48 h. Stříbro bylo stanoveno pomocí ICP-OES. Hodnoty ukazují průměr  $\pm$  SD ze třech opakování.

Bandáž	Obsah stříbra v kůži [ $\mu\text{g/g}$ ]		Obsah stříbra v akceptoru [ $\mu\text{g/mL}$ ]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Aq	106,8 $\pm$ 49,9	125,3 $\pm$ 87,4	6,6 $\pm$ 8,7	24,3 $\pm$ 17,9
Ac	143,5 $\pm$ 43,4	293,7 $\pm$ 110,3	5,1 $\pm$ 3,2	3,6 $\pm$ 1,0
Sc	111,7 $\pm$ 62,3	86,6 $\pm$ 65,9	2,0 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 3,9
Ia	188,3 $\pm$ 161,8	197,6 $\pm$ 165,1	11,8 $\pm$ 13,2	11,0 $\pm$ 9,7

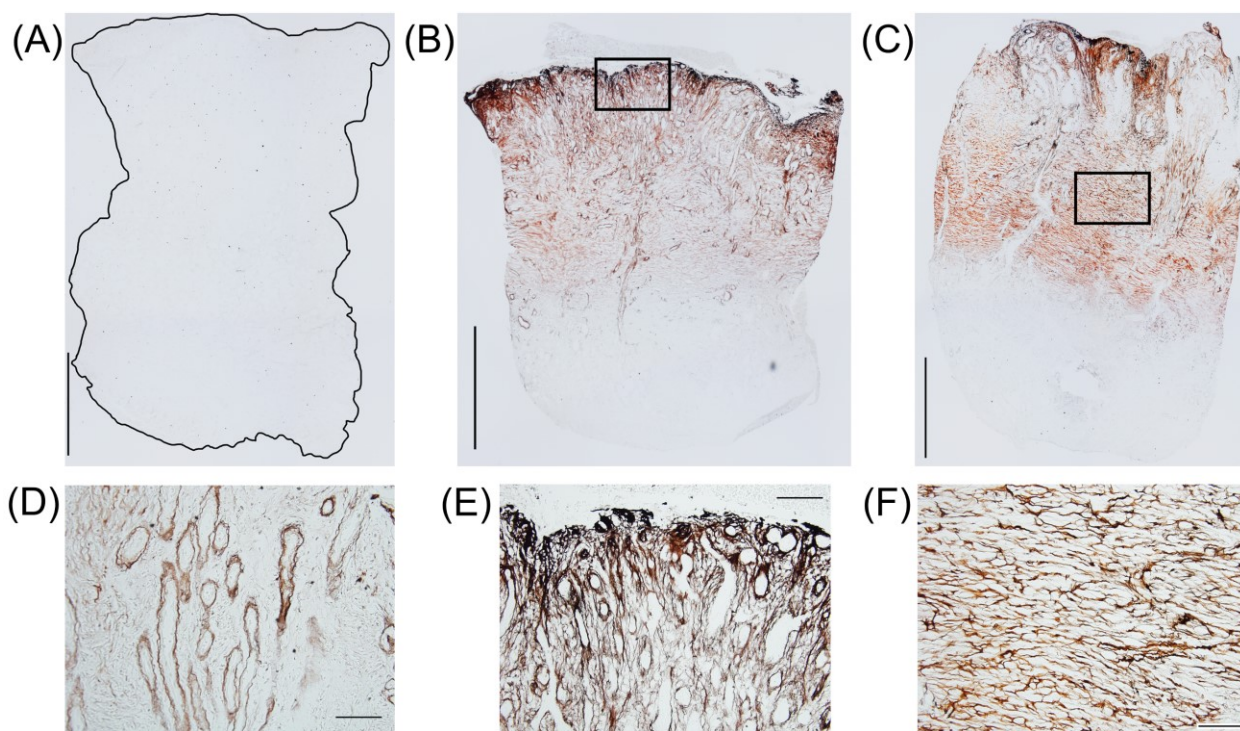
<sup>a</sup> obsah stříbra byl ve dvou ze třech opakování pod limitem detekce.



#### 4.10. 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. Logickým následujícím krokem bylo potvrzení laboratorních pozorování *in vivo*.

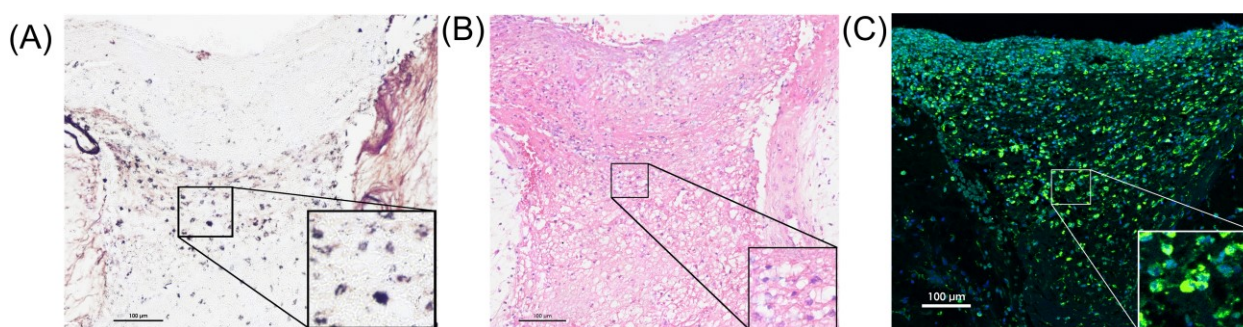
Pacienti s poměrně rozsáhlými bércovými vředy byli léčeni na polovině rány běžně dostupným krytem z karboxymetyl celulózy obsahujícím stříbro (Aquacel Ag<sup>+</sup> Extra, zkracováno dále jako Ag-CMC) a na části rány krytem obsahujícím lyofilizát oktenidinu a hyaluronanu na polyesterové matrici (Sorelex, 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 13). Ačkoliv nebyl signál stříbra patrný před léčbou (Obrázek 13A), stříbro bylo po dvou a šesti týdnech detekováno relativně hluboko (více jak 2 mm) v granulační tkáni (Obrázek 13B-C). Distribuce stříbra byla heterogenní. S postupem



**Obrázek 13.** 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 vytvořenou 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.

novotvorby cév dominovala pozitivita stříbra okolo adventiciální a periadventiciální tkáně (Obrázek 13D). 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 hojení (Obrázek 13E-F).

Stříbro bylo též detekováno ve fagocytech (Obrázek 14A) v oblasti se zvýšeným výskytem makrofágů pozitivních na CD68 (Obrázek 14B-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 7 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.



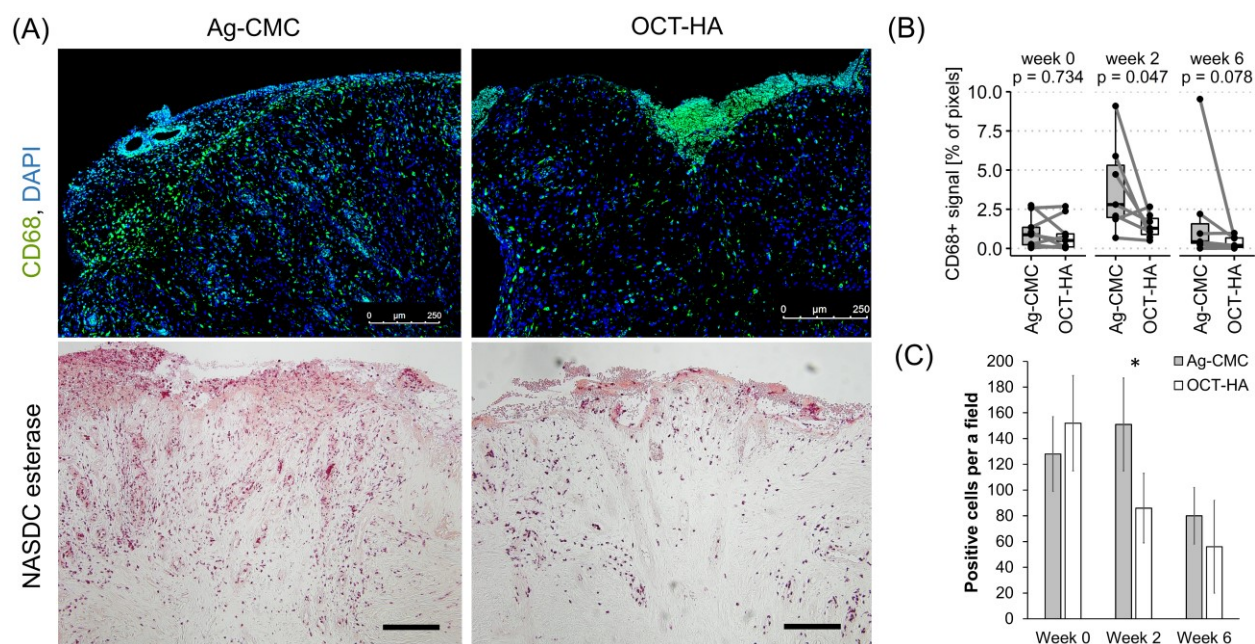
**Obrázek 14.** Stříbro ve fagocytech. Fagocyty obsahující stříbro byly detekovány pomocí stříbrné autometalografie (A). Odpovídající oblast obarvená hematoxylinem a eozinem (B) a protilátkou proti CD68 a jádry značenými DAPI (C), (žena, 74 let). Měřítko odpovídají 100 μm.

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

### 4.11.1. Imunitní infiltrát

Byl pozorován statisticky významně nižší signál CD68 v částech rány léčených OCT-HA oproti Ag-CMC (Obrázek 15A-B). Části léčené Ag-CMC vykazaly také vyšším množstvím granulocytů (detekce aktivity naftol AS-D chloroacetát esterázy), (Obrázek 15A,C). 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 (Obrázek 16A). *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 nebo CD8 pozitivní) byl exprimován méně u OCT-HA částí ran, ale také statisticky nevýznamně. Sledovali jsme také expresi klasických prozánětlivých mediátorů *IL1B* a *TNF* (Obrázek 16B). Genová exprese obou těchto markerů klesala, jak se rány hojily, ale statisticky významný rozdíl mezi oběma kryty byl jen u *TNF* po šesti týdnech léčby.



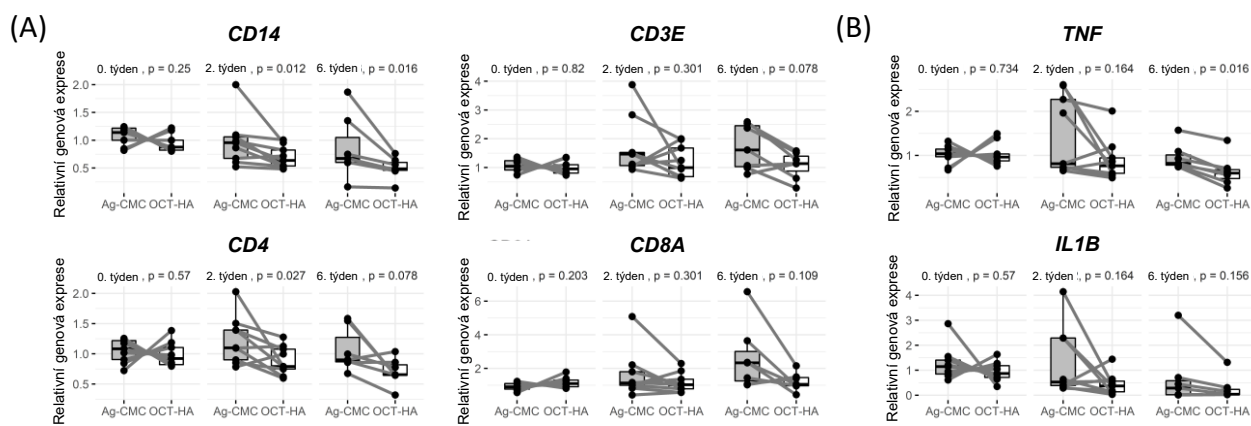
**Obrázek 15.** Granulocyty a makrofágy v biopsiích ran. (A) Reprezentativní snímky biopsií z ran léčených Ag-CMC a OCT-HA po dvou týdnech, v nichž byl detekován marker makrofágů CD68, (žena, 74 let). Snímky řezů ve spodní řadě ukazují granulocyty pomocí detekce aktivity naftol AS-D chloracetát esterázy (muž, 68 let). (B) CD68 signál v odpovídajících částech ran léčených Ag-CMC a OCT-HA. Krabicové grafy ukazují mediány a mezikvartýlové odchylky. Šedé čáry spojují odpovídající dvojice vzorků ze stejných ran v daný čas. Wilcoxonův test ( $n=9$  pro týdny 0 a 2,  $n=7$  v týdnu 6). (C) Počet naftol AS-D chloracetát esteráza pozitivních buněk zjištěný pomocí obrazové analýzy. Sloupce ukazují průměr  $\pm$  SD z  $n=7$  vzorků v každém čase. Hodnoty pro jednotlivé vzorky byly určeny v šesti nepřekrývajících se mikroskopických polích při zvětšení  $400\times$ .  $*p \leq 0,05$  Wilcoxonův párový test. Měřítka v obrázcích odpovídají  $250 \mu\text{m}$ .

#### 4.11.2. Histologické parametry hojení

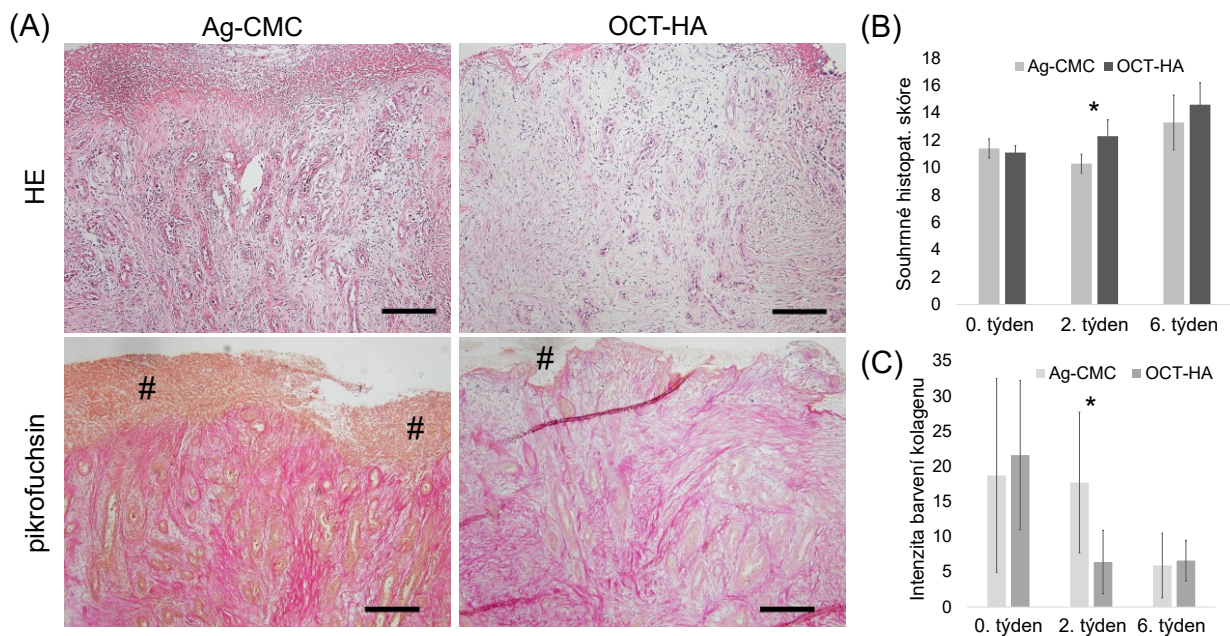
Kromě zánětlivých buněk jsme sledovali v obou částech rány také několik parametrů hojení pomocí histologie. Parametry byly vybrány podle Sultany et al. (Sultana et al. 2009) Sledované parametry (množství časného a pozdního kolagenu, orientace kolagenových vláken, množství granulační tkáně, přítomnosti 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 17, Tabulka 6). Histologické skóre se zlepšilo v částech léčených Ag-CMC později, jak je vidět z analýzy po šesti týdnech léčby.

Následně jsme zjistili procento kolagenu blízko spodiny rány v histologických řezech pomocí obrazové analýzy (Obrázek 17). Intenzita barvení kolagenu se snižovala s maturací granulační tkáně. Po dvou týdnech léčby OCT-HA bylo zaznamenáno 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 obsahovala po dvou týdnech významně víc povlaku než odpovídající část rány léčená OCT-HA, což ukazují obrázky histologických řezů barvených pikrofuchsinem (Obrázek 17A, Obrázek 18A). 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 18B-C).



**Obrázek 16.** Genová exprese zánětlivých markerů a mediátorů. (A) Genová exprese markeru monocytů a makrofágů – *CD14* a genů typicky exprimovaných T lymfocyty – *CD3E*, *CD4*, *CD8A*. (B) Genová exprese prozánětlivých markerů v biopsiích odebraných v týdnech 0, 2 a 6 z částí ran léčených Ag-CMC a OCT-HA. Krabicové grafy zobrazují medián a mezikvartýlové odchytky. Šedé linky spojují hodnoty genové exprese stejné rány v daném čase. Hodnoty významnosti p nad grafy ukazují statistickou významnost rozdílů mezi dvěma typy léčby v daný čas a byly vypočteny Wilcoxonovým párovým testem ( $n = 9$  v týdnech 0 a 2,  $n = 7$  pro 6. týden).



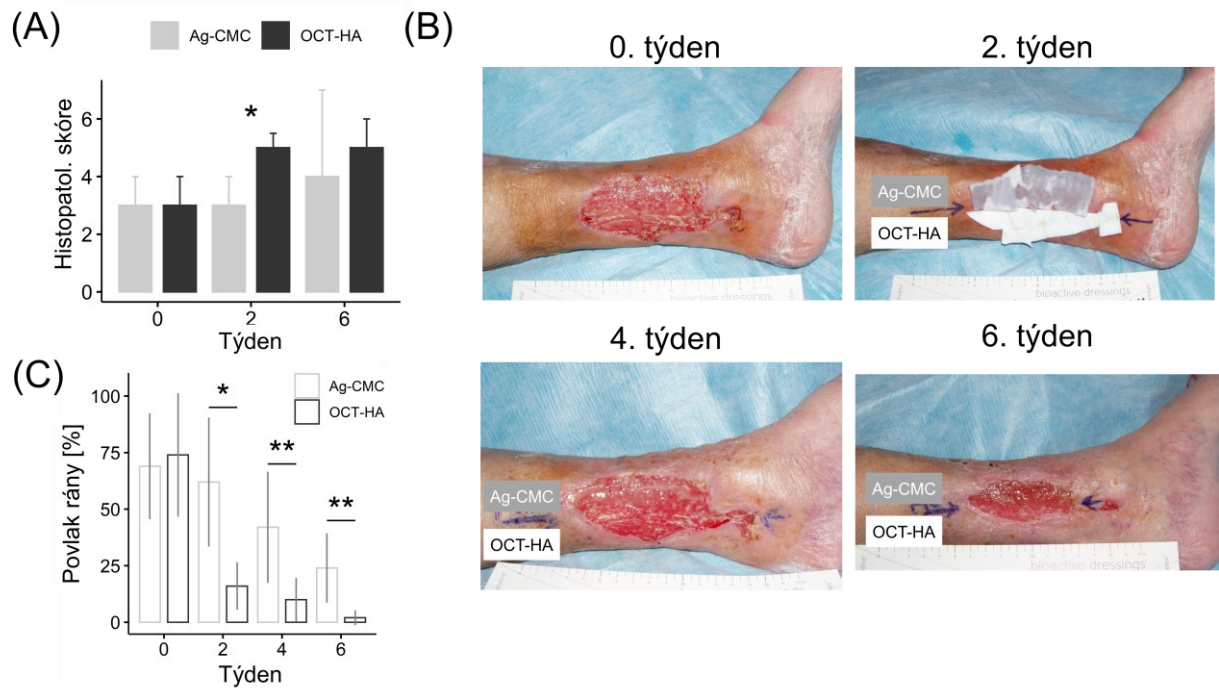
**Obrázek 17.** Histopatologie hojení. (A) Reprezentativní řezy ránou (muž, 68 let) po dvou týdnech léčby: Ag-CMC (obrázky vlevo); barvení hematoxylinem & eozinem a pikrofuchsinem. Střední množství granulační tkáně a zánětlivého infiltrátu je přítomno pod silnou vrstvou povlaku na spodině rány (#). Kolagen (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. Měřítka odpovídají 500  $\mu\text{m}$ .

Tabulka 6. Histopatologické skóre ran léčených v různých částech Ag-CMC a OCT-HA. Pořadí parametrů, jejichž skóre je zobrazeno v závorkách, odpovídá parametrům 1 až 6 uvedeným v Tabulka 1.

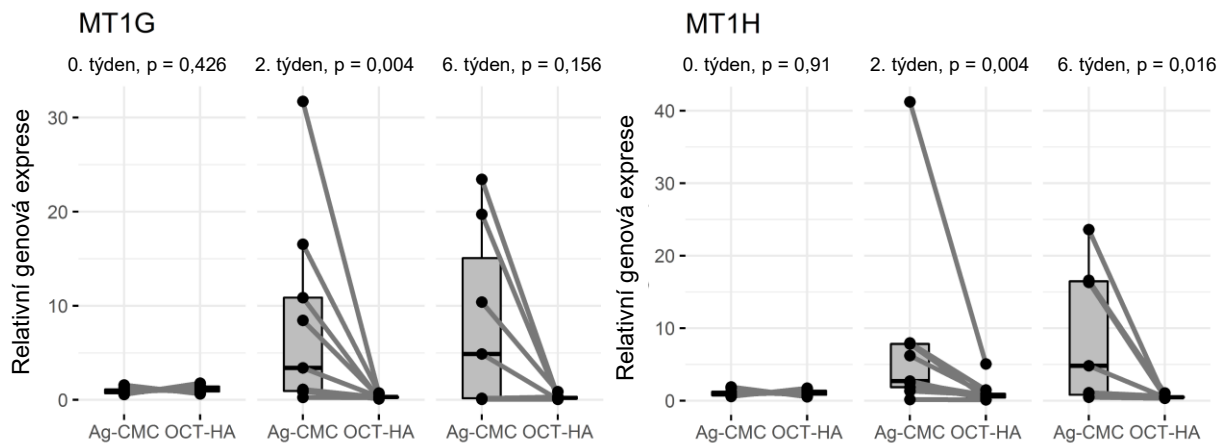
Pacient	Léčba	0. týden	2. týden	6. týden
1	Ag-CMC	10 (1/1/1/2/3/2)	9 (1/1/1/1/3/2)	12 (1/2/2/2/3/2)
	OCT-HA	11 (1/1/1/2/3/3)	11 (2/1/1/1/3/3)	17 (3/3/3/3/2/3)
2	Ag-CMC	13 (2/2/2/3/3/1)	10 (1/2/1/2/2/2)	14 (2/2/2/3/3/2)
	OCT-HA	11 (2/3/2/1/2/1)	13 (3/2/1/3/2/2)	13 (3/2/2/3/2/1)
3	Ag-CMC	12 (2/2/2/3/2/1)	10 (2/2/1/2/2/1)	11 (2/2/1/3/2/1)
	OCT-HA	10 (2/2/1/2/2/1)	12 (3/2/1/3/2/1)	16 (3/2/2/3/3/3)
4	Ag-CMC	11 (1/2/2/1/3/2)	10 (2/2/1/1/2/2)	15 (3/3/2/3/3/1)
	OCT-HA	11 (1/2/1/1/3/3)	12 (2/2/2/2/2/2)	14 (4/3/2/1/3/1)
5	Ag-CMC	11 (1/2/1/2/3/2)	12 (3/2/1/2/2/2)	10 (2/2/1/2/1/2)
	OCT-HA	12 (2/3/1/1/3/2)	15 (4/2/1/4/2/2)	13 (2/3/2/3/2/1)
6	Ag-CMC	11 (2/2/1/2/2/2)	11 (2/2/2/2/2/1)	13 (2/2/2/2/3/2)
	OCT-HA	11 (2/1/1/2/3/2)	13 (2/2/2/1/3/3)	12 (2/2/2/2/3/1)

#### 4.11.3. Exprese metalothioneinů

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 (Obrázek 19).



**Obrázek 18.** 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.



**Obrázek 19.** Genová exprese metalothioneinů *MT1G* a *MT1H* v biopsiích ran po 0, 2 a 6 týdnech léčby Ag-CMC a OCT-HA. Krabicové grafy ukazují medián a mezikvartýlové odchylky. Šedé přímky spojují hodnoty genové exprese jedné rány v různě léčených částech. P hodnoty ukazují významnost rozdílů mezi dvěma kryty, Wilcoxonův párový test ( $n = 9$  pro týdny 0, 2 a  $n = 7$  pro týden 6).

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

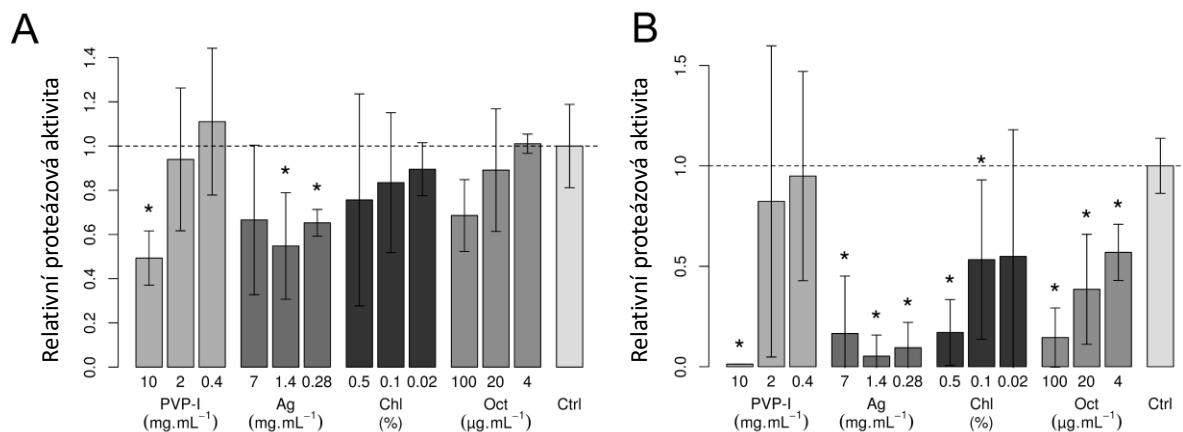
V předchozích částech byly sledovány známé antimikrobiální účinky a méně známá aktivita stříbra v kůži. Pro léčbu ran je relevantní i aktivita stříbra a jiných antiseptik vůči proteinázám, které jsou v chronických ranách zvýšené.

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 20). 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.

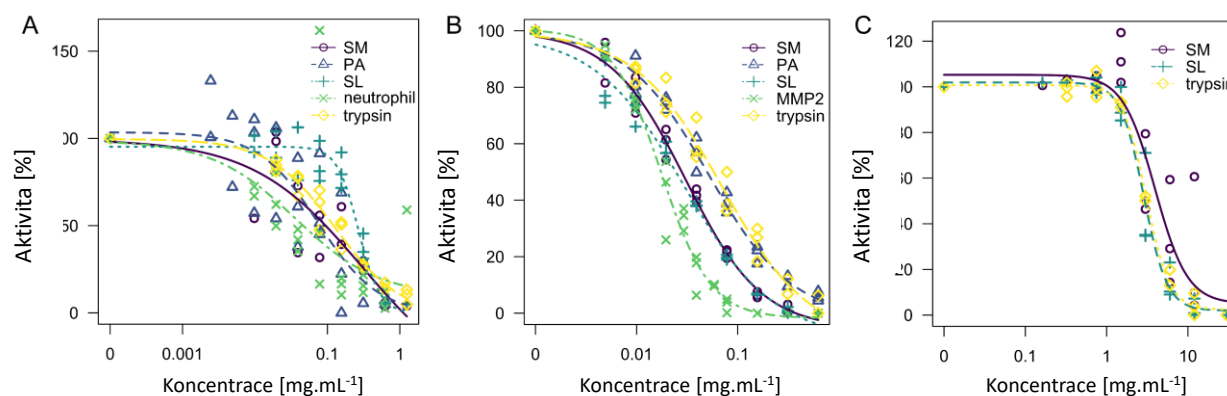
Z výsledků bylo zřejmé, že antimikrobiální látky inhibovaly eukaryotické proteinázy více než bakteriální proteinázy. Aktivita lidských proteináz byla inhibována v závislosti na dávce, obdobně jako bakteriální proteinázy. Oct i Ag statisticky významně ( $p < 0,05$ ) inhibovaly eukaryotické proteinázy 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 vhled do inhibice jsme testovali jednotlivé zdroje proteináz ve fluorogenním testu. Ten má vyšší citlivost než želatinová zymografie a umožňuje průběžné sledování aktivity proteináz (Obrázek 21). Do těchto experimentů jsme zařadili také trypsin, což je standardní proteináza s robustní aktivitou. Nicméně některé z proteináz aktivních v želatinové zymografii nebylo aktivních za podmínek (pufru, v němž je dané antiseptikum rozpustné) fluorogenního testu, takže tyto proteinázy hodnoceny nebyly. Navíc fluorogenní metoda není vhodná pro měření obsahující jód, který zhaší fluorescenci. I přes zmíněná negativa tato metoda ukázala, že chlorhexidin a oktenidin snížily aktivitu proteináz v závislosti na dávce, obdobně jako v testu želatinové zymografie. Laktát stříbrný také snížil aktivitu proteináz koncentracně-závisle, nicméně odchylky v aktivitě při stejné koncentraci byly větší než u chlorhexidinu a oktenidinu. Vypočtená IC<sub>50</sub> byla pro chlorhexidin 0,02 – 0,07 %, pro oktenidin 2,87–3,95 µg/ml a 0,04-0,30 mg/ml u laktátu stříbrného (Tabulka 7).





**Obrázek 20.** Aktivita bakteriálních a eukaryotických proteináz inkubovaných s antimikrobiálními látkami v průběhu želatiny 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  $\pm$  SD ze čtyřech nezávislých opakování. \* $p < 0,05$  (Studentův jednovýběrový t-test vůči kontrole).



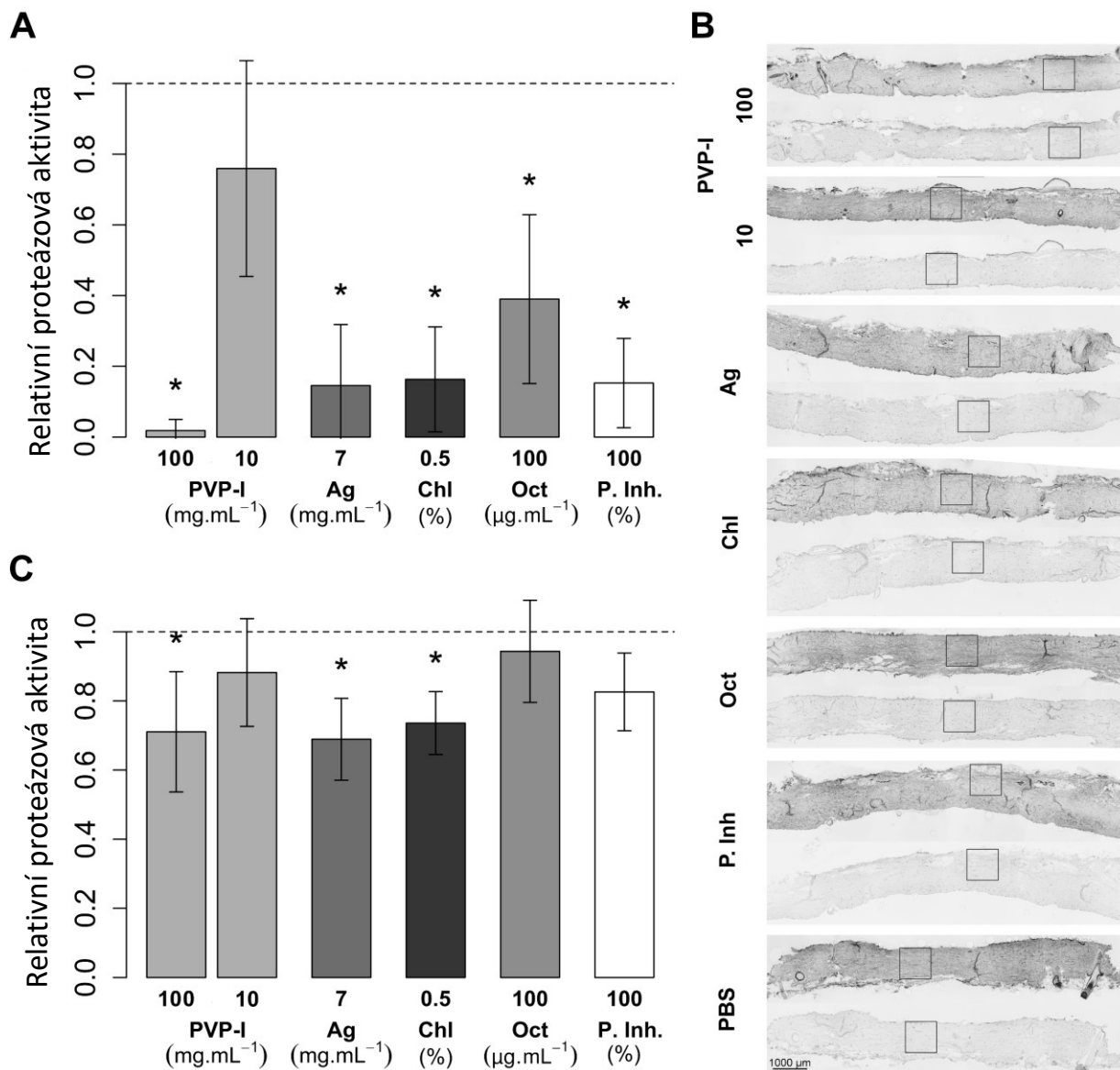
**Obrázek 21.** Aktivita bakteriálních a eukaryotických proteináz inkubovaných s antimikrobiálními látkami určena pomocí fluorogenní metody. Aktivita čistých proteináz (MMP-2 nebo trypsin) nebo proteináz v bakteriálním médiu vybraných bakterií byla změřena fluorogenní metodou se zhasenou želatinou jakožto substrátem. Reakce byly provedeny za různých koncentrací (A) laktátu stříbrného, (B) chlorhexidin digluconátu, (C) oktenidin hydrochloridu. Rozdíly v nárůstu fluorescence byly vztaženy ke kontrole bez antiseptik. Každý bod byl změřen dvakrát nebo třikrát. Osa x je v dekadickém logaritmu. PA – *P. aeruginosa*, SL – *S. liquefaciens*, SM – *S. marcescens*.

**Tabulka 7.** Inhibiční koncentrace (IC50) vypočtené z koncentračně závislé aktivity proteináz získané pomocí fluorogenní metody.

Látka	Proteinázy	IC50	SEM	Spodní 95 %	Horní 95 %
		[mg/mL]		CI	CI
Laktát stříbrný	neutrofilny	0,04	0,03	-0,02	0,09
	PA	0,08	0,05	-0,02	0,17
	SL	0,27	0,06	0,16	0,38
	SM	0,30	1,18	-2,04	2,64
	trypsin	0,13	0,09	-0,05	0,31
chlorhexidin diglukonát		IC50 [%]	SEM	Spodní 95 %	Horní 95 %
				CI	CI
	MMP-2	0,02	0,00	0,02	0,02
	PA	0,05	0,01	0,04	0,06
	SK	0,03	0,00	0,02	0,04
	SM	0,03	0,00	0,02	0,04
trypsin	0,07	0,01	0,05	0,09	
oktenidin dihydrochlorid		IC50 [µg/mL]	SEM	Spodní 95 %	Horní 95 %
				CI	CI
	SL	2,87	0,27	2,33	3,41
	SM	3,95	0,65	2,64	5,26
trypsin	3,07	0,35	2,37	3,77	

#### 4.13. 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 21). 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 22.** 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.).

## 5. DISKUZE

### 5.1. In vitro a ex vivo antimikrobiální a cytotoxické efekty stříbra

Všechny testované bandáže jsou používány v léčbě infikovaných ran a obsahují různé množství a formy stříbra. Výrobci uvedli množství stříbra jen u Aq a Ia (Tabulka 2, Tabulka 3). Nami změřená hodnota pro Ac odpovídá hodnotám koncentrace stříbra (0,8–1,3 mg/cm<sup>2</sup>) publikovaným dříve jiným výzkumným týmem (Boonkaew et al. 2014). Testované kryty se lišily nejen obsahem stříbra ale i svou konstrukcí (Tabulka 2), což může ovlivnit míru uvolnění stříbra, a tudíž i antimikrobiální efektivitu a toxicitu. Jak potvrzují naše výsledky, složení média, v němž probíhá extrakce bandáže, také velmi ovlivňuje množství uvolněného stříbra. Množství stříbra uvolněného do fyziologického roztoku bylo řádově nižší než do buněčného kultivačního média s přidaným FBS. Množství stříbra uvolněného do fyziologického roztoku bylo velmi podobné napříč spektrem testovaných krytů. Extrakce stříbra byla tedy efektivnější do média bohatého na proteiny. Jednou z příčin může být to, že rozpustnost stříbra je zvýšena tvorbou komplexů s proteiny, jak bylo ukázáno dříve (Loza et al. 2014). Je překvapující, že množství stříbra uvolněného do média nekorelovalo s obsahem stříbra v krytech.

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 (Tabulka 5) 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 tkáňe 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 (Obrázek 12B). 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 tedy 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 (Obrázek 12). 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).

Toxicitní data z našich *ex vivo* experimentů byla porovnána s *in vitro* cytotoxicitou vůči buněčným typům relevantní pro hojení kožních ran – linii keratinocytů HaCaT a primárním lidským dermálním fibroblastům. Pomocí MTT jsme ukázali, že nezředitelné extrakty z bandáží vykazovaly ve velké míře toxické chování jak u keratinocytů tak u fibroblastů (Obrázek 6). Extrakt z bandáže Sc byl nejméně toxický, což odpovídá tomu, že obsahoval nejméně stříbra. Vesměs byly keratinocyty více zasaženy toxicitou výluhů (kromě Ia extraktu u fibroblastů), což mohlo být způsobeno vyšší proliferací tohoto buněčného typu. Obdobný efekt byl pozorován v jiné studii, kde AgNP byly toxičtější také vůči keratinocytům než fibroblastům (Frankova et al. 2016). Toxicita extraktů korelovala s mírou přímé kontaktní inhibice krytů v buněčné vrstvě na Petriho misce. Způsob, jakým se buňky po inkubaci s kryty barvily, naznačuje, že Ac zabil buňky přímo pod krytem, kdežto Aq indukoval halo zónu mrtvých buněk okolo bandáže (Obrázek 6C). Tento rozdíl mohl být způsoben různou rychlostí uvolňování stříbra z bandáží obsahujících  $\text{Ag}^0$  u Acticoatu nebo  $\text{Ag}^+$  z Aquacelu.

Stříbro zvyšuje oxidační vnitrobuněčný stres, což vede také k DNA poškození. Proto jsme sledovali jak DNA poškození tak oxidační stres u kožních fibroblastů ovlivněných výluhy z bandáží. Dle inhibice růstu buněk sledované pomocí MTT testu se dalo očekávat, že nižší DNA poškození bude u buněk ovlivněných Sc výluhem. To se potvrdilo; jediný Sc nezpůsobil statisticky významný nárůst DNA poškození *in vitro*. U ostatních experimentálních skupin byl pozorován nárůst ve velikosti jader (Obrázek 11). To naznačuje, že subtoxické koncentrace výluhů mohou vést ke změně organizace jádra. Při apoptóze dochází ale ke kondenzaci jader. V jiné studii keratinocyty inkubované 24 h s AgNP vykazovaly apoptózu, ale nebyly pozorovány změny morfologie jader (Zanette et al. 2011). Zvětšená jádra a buněčná morfologie je jedním

z průvodních znaků buněčné senescence (Funayama a Ishikawa 2007). Senescentní buňky mají prozánětlivý fenotyp, což není pro chronickou ránu příznivé (Harding et al. 2005). Dříve bylo pozorováno, že keratinocyty i fibroblasty byly pozitivní na marker senescence  $\beta$ -galaktosidázu po 24 h od ozáření subletální dávkou UV (Moon et al. 2019), takže je zřejmě možné, že by za daných podmínek našich experimentů stříbro eluované z bandáží indukovalo senescenci. Nicméně žádný výzkum fenotypu ovlivněných buněk jsme neprovedli. DNA poškození je pravděpodobně způsobeno oxidativním stresem, který jsme sledovali pomocí sondy DCF-DA (Obrázek 10). Obdobně jako Harvanová a kol. (Harvanova et al. 2017) jsme pozorovali rychlý nárůst hladiny vnitrobuněčných ROS u Ac obsahujícího  $Ag^0$ . Zbytek bandáží obsahujících  $Ag^+$  ukázal jen malý nárůst. To odpovídá i bezbuněčnému detekčnímu systému, kde jsme viděli produkci ROS pouze u Ac (Obrázek 5).

O stříbrných krytech bylo publikováno v několika studiích, že snižují aktivitu imunitních buněk a jsou tudíž považovány za protizánětlivé (Mani 2015; Nadworny et al. 2010b; Thomason et al. 2018a). Informace o poškozujících efektech stříbra u prozánětlivých buněk jsou ojedinělé (Shin et al. 2007). Naše výsledky ukazují jak inhibici aktivity neutrofilů, tak aktivaci monocytů. Žádný efekt stříbra nebyl pozorován na neaktivované neutrofilů, což naznačuje, že inhibice probíhá jen v aktivovaném prozánětlivém stavu. Prozánětlivé efekty stříbra mohou být alespoň zčásti vysvětleny toxicitou stříbra. Detekovali jsme statisticky významný nárůst hladiny LDH uvolněných z neutrofilů, který provázel snížení prozánětlivého oxidativního vzplanutí. To naznačuje, že stříbro imunitní buňky poškozuje a tím snižuje prozánětlivé oxidativní vzplanutí. V jiné studii bylo ukázáno, že polyesterové cévní náhrady se stříbrem narušily funkci neutrofilů a regeneraci tkáně (Tautenhahn et al. 2010). Vzhledem k rozsahu použití stříbra v regenerativní medicíně by měly být provedeny studie podrobně zkoumající vliv tohoto kovu na regeneraci. V porovnání s protizánětlivým efektem na neutrofilů, v plné krvi inkubované se stříbrnými kryty byla vidět zvýšená produkce prozánětlivého IL-6. Obdobný efekt byl pozorován i u monocytů aktivovaných LPS (Obrázek 9). Tyto výsledky odpovídají předchozím pozorováním prozánětlivé aktivace monocytů inkubovaných se stříbrnými nanočásticemi (Murphy et al. 2016). Stejně jako u neutrofilů byla v plné krvi inkubované s kryty zaznamenána zvýšená hladina LDH, která může být alespoň zčásti zapříčiněna hemolýzou (Kato et al. 2006).

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. Pomocí mikrodiluční metody bylo zjevné, že 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 tedy 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. Nízká cytotoxicita u Sc může být způsobena alginátem, jenž má antioxidační vlastnosti (Sen 2011). Nicméně stejný efekt nebyl pozorován u jiných krytů (Aq a Ia), které obsahují polysacharidy karboxymethylcelulózu, respektive kyselinu hyaluronovou. Budoucí výzkum by se mohl věnovat vzájemnému ovlivňování stříbra nebo i jiných antiseptik s biomolekulami, které by měly podpořit hojení. Naše výsledky taky ukazují, že je důležité měřit jiné parametry antiseptik než jen cytotoxicitu. Subtoxické hladiny stříbra stále vedly k indukci produkce ROS a tvorbě zlomů v DNA. Tyto efekty mohou být poškozující zvláště u rychle se dělících buněk během granulace a reepitelizace. Na rozdíl od řady publikovaných studií jsme nepozorovali protizánětlivý efekt stříbra v plné krvi. Oxidativní vzplanutí aktivovaných neutrofilů bylo utlumeno nejspíše cytotoxicitou stříbra. Naopak v plné krvi inkubované stříbrné kryty způsobily nárůst hladiny IL-6 a došlo k hemolýze. Ukázali jsme, že stříbro z bandáží může pronikat skrz ECM v kůži a poškodil tamní buňky. Naše výsledky ukazují efekty stříbra po jednom až dvou dnech. V klinické praxi jsou kryty používány často po několik týdnů, takže stříbro do rány proniká pravděpodobně dlouhodoběji (Hadrup et al. 2018a).

## 5.2. 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 trojúhelníkům (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. Fredriksson a kol. detekovali obdobnou lokalizaci stříbra v lidských kůžích *ex vivo*, na něž byly aplikován stejný kryt se stříbrem (Aquacel Ag+) jako v této studii (Fredriksson et al. 2009). 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 glutation (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 glutation 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 poškozují. 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. Naše výsledky ukazují významně vyšší množství makrofágů v částech léčených Ag-CMC než v částech léčených OCT-HA krytem. Souza a kol. ukázali zvýšení počtu makrofágů během granulační fáze hojení popálenin krys po aplikaci SSD (sulfadiazinu stříbrného) (Souza et al. 2017).

Spolu s přítomností stříbra ukázanou pomocí autometalografie, jsme našli v ranách zvýšenou genovou expresi metallothioneinů. Bylo určeno, že genová exprese metalothioneinů se zvýšila po stimulaci makrofágů  $\text{Ag}^+$  *in vitro* (Shim et al. 2017) a *in vivo* v plicích vystavených stříbrným nanočásticím (Kaewamatawong et al. 2014). Lansdown a kol. Pozorovali zvýšenou produkci metalothioneinů ve sterilních potkaních ranách léčených sulfadiazinem stříbrným (Lansdown et al. 1997). Kromě kovů zvyšuje expresi metalothioneinů také buněčný stres; metalothioneiny tedy hrají také protizánětlivou a cytoprotektivní roli (Inoue et al. 2009). Genová exprese metalothioneinů byla v našich vzorcích detekována v týdnu 0 (před začátkem léčby Ag-CMC a OCT-HA), což nejpravděpodobněji odpovídalo přirozené cytoprotektivní roli metalothioneinů v (chronických) ranách. Následně ale Ag-CMC léčba dále zvýšila genovou



expresi metalothioneinů, pravděpodobně aby došlo ke snížení oxidativního stresu vyvolaného stříbrem.

Sledovali jsme Ag-CMC kryt s OCT-HA vedle sebe na lidských chronických ranách. Ačkoliv se obě části ran hojily, pozorovali jsme rozdíly v rezoluci zánětu a maturaci mezibuněčné hmoty. Lépe se rána hojila pod OCT-HA. Rovněž rány byly méně povleklé a vzhled spodiny byl lepší u OCT-HA. Snížení počtu neutrofilů a makrofágů, které nutně musí nastat k utlumení zánětu, bylo pozorováno v částech ran léčených OCT-HA během dvou týdnů, zatímco pokles neutrofilů a makrofágů byl u Ag-CMC zjištěn později (mezi 2. a 6. týdnem). S tím souvisí i výraznější pokles genové exprese prozánětlivých markerů *TNF*, *IL1B* a *CD4* v částech ran léčených OCT-HA. Naše výsledky souhlasí s poznatky studie Krasowského a kol., který ukázal v randomizované klinické studii, že léčba oktenidinem podpořila hojení chronických ran výrazněji než kryt se stříbrem (Krasowski et al. 2015b).

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 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 gama zářením (Chen et al. 2015).

Naše výsledky neukazují protizánětlivé efekty v lidských chronických ranách. V jiných studiích na zvířatech byly ukázány prozánětlivé efekty stříbra. Sulfadiazin stříbrný zpomalil hojení popálenin u myší a zvýšil počet neutrofilů a snížil počet makrofágů (Rosen et al. 2015b). Také kryt s nanokrystalickým stříbrem (Acticoat) více než zdvojnásobil počet prozánětlivých buněk v akutních prasečích ranách; nicméně hojení ran v této studii nebylo testovaným krytem zpomaleno (Hartmann et al. 2016).

Oproti tomu Nadworny a kol. aplikovali roztoky nanokrystalického stříbra na dermatitidu vyvolanou dinitrochlorbenzenem u prasat a následně pozorovali snížený zánět (Nadworny et al.

2010c). Thomason a kol. publikovali snížení zánětu myších ran po aplikaci oxysolí stříbra (Thomason et al. 2018b).

Lansdown a kol. ukázali snížený zánět v potkaních ranách po aplikaci SSD (Lansdown et al. 1997). Stříbrné nanočástice v gelu z kolagenu a chitosanu zlepšily hojení a snížily počet CD68+ buněk a hladinu prozánětlivých cytokinů v ranách potkanů (You et al. 2017b). SSD snížil počet neutrofilů a makrofágů v lidských chronických ranách. Nicméně PVP-I a chlorhexidin diglukonát snížily množství prozánětlivých buněk více než SSD (Fumal et al. 2002b). Žádná z výše uvedených studií nicméně nevedla přímý protizánětlivých mechanismus stříbra.

Aplikovali jsme komerčně dostupné kryty ran se dvěma rozdílnými antiseptiky. Kryty se ale lišily také svou konstrukcí. Použití komerčně dostupných krytů umožňuje zjistit jejich skutečný efekt na hojení rány, nemůžeme vyloučit, že některé aspekty hojení rány byly zapříčiněny jinými rozdíly mezi kryty (např. kapacita absorbovat exsudát, přítomnost hyaluronanu). Protože se množství stříbra mezi různými produkty liší a stejně tak se liší míra, s jakou stříbro z nich penetruje do kůže (Nešporová et al. 2020), rozsah efektů pozorovaných v této studii může být různý mezi produkty se stříbrem. Uznáváme, že velikost testované populace byla malá v porovnání s většinou jiných studií, které sledují hojení chronických ran. Zaměřili jsme se více na detailní popis dějů hojení v menší skupině pacientů. Naše výsledky přesto mohou sloužit pro navržení sledovaných parametrů ve větší kohortě pacientů.

Stříbro je celosvětově používáno pro léčbu milionů komplikovaných ran a je často vnímáno jako antiseptikum aktivní na povrchu, které je odstraněno s povlakem rány nebo exsudátem. Ukázali jsme detailní histologickou analýzu asociace stříbra v chronických ranách a s tím spojené parametry hojení na histologické a genově-expresní úrovni. Tato pozorování mohou zvýšit povědomí kliniků, kteří používají stříbro, o tom, jak se v ráně chová. Také jsme přímo ukázali, že kryt s oktenidinem podpořil hojení výrazněji více než kryt se stříbrem.

### **5.3. 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 pufrům a inkubovali prasečí kůži ve vodném roztoku laktátu stříbrného. Rovněž jsme odsolili substrát DQ želatinu a roztoky proteináz. Také jsme použili pufrů 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).

V naší studii, která byla provedena v obdobném uspořádání jako výše jmenovaná (zymografie spojená s SDS-PAGE), chlorhexidin diglukonát rovněž plně neinhiboval eukaryotické proteinázy, a to ani ve vyšších koncentracích než v dříve publikované studii. Ovšem Beightonem a kol. bylo pozorováno pomocí fluorogenní metody, že chlorhexidin inhiboval MMP-2 v nižší koncentraci (IC<sub>50</sub> 0,02 %) než v SDS-PAGE zymografii. Co se týče

inhibice proteináz z *P. aeruginosa*, *S. marcescens* nebo *S. liquefaciens*, nebyly nalezeny publikované studie, s nimiž by bylo možné naše výsledky srovnat. Je to tedy známkou, že naše výsledky rozšiřují seznam proteináz inhibovaných chlorhexidinem i bakteriální proteinázy relevantní pro hojení ran. Obvyklá koncentrace chlorhexidinu pro oplach ran je 0,1 %. Za této koncentrace jsme pozorovali inhibici jen eukaryotických, a ne prokaryotických proteináz v SDS-PAGE zymografii. Plná inhibice buď eukaryotických, nebo prokaryotických proteináz nebyla pozorována ani ve fluorogenní metodě. Je možné, že chlorhexidin může působit alespoň zčásti nescifickými antiproteinázovými mechanismy, které mohou buď dočasně, nebo trvale inhibovat proteinázy. Dočasná inhibice by mohla být způsobena tím, že chlorhexidin chelatuje vápenaté ionty (Gendron et al. 1999); ty byly ale v zymografických pufrách použitých v naší studii v nadbytku. Je pravděpodobnější, že krátkodobá inkubace s chlorhexidinem vedla k precipitaci proteinů, včetně proteináz, což vedlo ke snížení proteolytické aktivity vzorků (Hjeljord et al. 1973).

Výsledky zveřejněné v naší studii jsou podle našeho mínění prvními důkazy, že oktenidin má také antiproteinázovou aktivitu. Byla pozorována inhibiční aktivita závislá na koncentraci jak u bakteriálních, tak u lidských proteináz v testovaných koncentracích (100, 20, 4  $\mu\text{g/ml}$ ) na SDS-PAGE zymografii a ve fluorogenní metodě byla zjištěna hodnota IC<sub>50</sub> pro trypsin 3,07  $\mu\text{g/ml}$ . Komerčně dostupné roztoky pro léčbu ran obsahují 1 000  $\mu\text{g/ml}$  oktenidinu dihydrochloridu, což je koncentrace pravděpodobně způsobující inhibici proteináz *in situ* v chronických ranách. Oktenidin působí antimikrobiálně skrze nabitá centra a hydrofobní řetězce, čímž narušuje bakteriální buněčnou stěnu (Kodedová et al. 2011).

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. Zprvce 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. Ačkoliv PVP-I značně inhiboval proteinázy, jeho schopnost efektivně působit v kůži byla značně snížena v ředěných roztocích. Také oktenidin hydrochlorid inhiboval proteinázy v kůži, když byla kůže ponořena do jeho roztoku. Nicméně tento efekt nebyl statisticky signifikantní ve Franzově cele. To odpovídá již publikovaným výsledkům, že oktenidin dihydrochlorid do kůže proniká málo

(Stahl et al. 2011b). Míra, s jakou antiseptikum proniká do tkáně, může být ovlivněna kinetikou jeho uvolnění z matrice (kryt rány, gel). To může ovlivnit průnik jódu, který se vypařuje poměrně rychle. Nebo může být ovlivněno množstvím “aktivního”  $\text{Ag}^+$  přítomností  $\text{Cl}^-$ . Za druhé jsou zde negativní efekty nebo omezení, které provází použití antimikrobiálních látek. Kvůli nesespecifickému efektu na proteiny mohou antiseptika také modifikovat růstové faktory a cytokiny, což může narušit jejich biologickou aktivitu v akutních nebo také v chronických ranách. Je tedy otázkou, jestli schopnost sledovaných antiseptik modulovat proteinázovou aktivitu vyváží jejich potenciální nedostatky. 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.

## 6. ZÁVĚR

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

Zjistili jsme, že cytotoxicita se u sledovaných čtyřech krytů ran projevila u keratinocytů, fibroblastů i erytrocytů, ale nebyla přímo úměrná antimikrobiální účinnosti. Pořadí od nejvíce cytotoxického 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<sup>+</sup> 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.



## 7. SEZNAM LITERATURY

AHAMED, M., M. KARNS, 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

ANDERSON, Benjamin O., James M. BROWN a Alden H. HARKEN, 1991. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *Journal of Surgical Research* [online]. **51**(2), 170–179. ISSN 0022-4804. Dostupné z: doi:10.1016/0022-4804(91)90090-9

Anon., nedatováno. *lukemiller.org» Blog Archive » Analyzing gels and western blots with ImageJ* [online]. [vid. 2018-12-14]. Dostupné z: <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>

ARAKAWA, H., J. F. NEAULT a H. A. TAJMIR-RIahi, 2001. Silver(I) Complexes with DNA and RNA Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. *Biophysical Journal* [online]. **81**(3), 1580–1587. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(01)75812-2

ARNOLD, F., D. WEST a S. KUMAR, 1987. Wound healing: the effect of macrophage and tumor derived angiogenesis factors on skin graft vascularization. *British Journal of Experimental Pathology*. **68**(4), 569–574.

ASHARANI, P. V., Grace LOW KAH MUN, Manoor Prakash HANDE a Suresh VALIYAVEETIL, 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano* [online]. **3**(2), 279–290. ISSN 1936-086X. Dostupné z: doi:10.1021/nn800596w

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.

BARILLO, D.J., C.R. CROUTCH, A.R. BARILLO, F. REID a A. SINGER, 2020. Safety evaluation of silver-ion dressings in a porcine model of deep dermal wounds: A GLP study. *Toxicology Letters* [online]. **319**, 111–118. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2019.10.023

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.

BARRIENTOS, Stephan, Olivera STOJADINOVIC, Michael S. GOLINKO, Harold BREM a Marjana TOMIC-CANIC, 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **16**(5), 585–601. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x

BARTOW-MCKENNEY, Casey, Geoffrey D. HANNIGAN, Joseph HORWINSKI, Patrick HESKETH, Annamarie D. HORAN, Samir MEHTA a Elizabeth A. GRICE, 2018. The microbiota of traumatic, open fracture wounds is associated with mechanism of injury. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **26**(2), 127–135. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12642

- 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.
- BEREZIN, I. V., Y. V. SAVIN a K. MARTINEK, 1971. Two-component inhibition as a method for studying of enzyme active centre flexibility. Co-inhibition of tryptic activity by Ag(+) and Pb(2+) ions. *FEBS letters*. **14**(3), 178–180. ISSN 1873-3468.
- BERG, Jerry S. Vande, Ross RUDOLPH, Carol HOLLAN a Patricia L. HAYWOOD-REID, 1998. Fibroblast senescence in pressure ulcers. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **6**(1), 38–49. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1998.60107.x>
- BESSA, Lucinda J., Paolo FAZII, Mara DI GIULIO a Luigina CELLINI, 2015. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International Wound Journal* [online]. **12**(1), 47–52. ISSN 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12049
- BJARNSHOLT, Thomas, 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Supplementum* [online]. (136), 1–51. ISSN 1600-5503. Dostupné z: doi:10.1111/apm.12099
- BOONKAEW, B., M. KEMPF, R. KIMBLE, P. SUPAPHOL a L. CUTTLE, 2014. Antimicrobial efficacy of a novel silver hydrogel dressing compared to two common silver burn wound dressings: Acticoat and PolyMem Silver(R). *Burns* [online]. **40**(1), 89–96. ISSN 1879-1409 (Electronic) 0305-4179 (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.burns.2013.05.011
- 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
- BRYAN, N, H AHSWIN, N SMART, Y BAYON, S WOHLERT a JA HUNT, 2012. Reactive oxygen species (ROS) – a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *ECMJ*. (24), 249–265.
- 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
- BUFFA, Radovan, Kristina NEŠPOROVÁ, Ivana BASARABOVÁ, Pavlina HALAMKOVÁ, Vít SVOZIL a Vladimír VELEBNÝ, 2019. Synthesis and study of branched hyaluronic acid with potential anticancer activity. *Carbohydrate Polymers* [online]. **223**, 115047. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115047
- BUGLAK, Andrey A., Ruslan R. RAMAZANOV a Alexei I. KONONOV, 2019. Silver cluster–amino acid interactions: a quantum-chemical study. *Amino Acids* [online]. **51**(5), 855–864. ISSN 0939-4451, 1438-2199. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-019-02728-z
- 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
- CAMERON, Shana J., Farah HOSSEINIAN a William G. WILLMORE, 2018. A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(7). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19072030
- CATANZANO, O., V. D'ESPOSITO, S. ACIERNO, M.R. AMBROSIO, C. DE CARO, C. AVAGLIANO, P. RUSSO, R. RUSSO, A. MIRO, F. UNGARO, A. CALIGNANO, P. FORMISANO a F. QUAGLIA, 2015. Alginate-hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process. *Carbohydrate Polymers* [online]. **131**, 407–414. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.081
- CIORNEI, Cristina D., Alexey NOVIKOV, Christophe BELOIN, Catherine FITTING, Martine CAROFF, Jean-Marc GHIGO, Jean-Marc CAVAILLON a Minou ADIB-CONQUY, 2010. Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immunity* [online]. **16**(5), 288–301. ISSN 1753-4267. Dostupné z: doi:10.1177/1753425909341807
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, ed., 2015. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: M07-A10 ; approved standard*. 10. ed. Wayne, PA: Committee for Clinical Laboratory Standards. Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute, 35,2. ISBN 978-1-56238-987-1.
- CONSTABLE, John D., Peter J. MORRIS, John F. BURKE a John D. CONSTABLE, 1967. Absorption Pattern of Silver Nitrate from Open Wounds: *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. **39**(4), 342–348. ISSN 0032-1052. Dostupné z: doi:10.1097/00006534-196704000-00002
- 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
- COPPÉ, J.P., C.K. PATIL, F. RODIER, Y. SUN, D.P. MUÑOZ, J. GOLDSTEIN, P.S. NELSON, P.Y. DESPREZ a J. CAMPISI, 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* [online]. **6**(12). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0060301
- COSTA, Rafael Henrique Rodrigues, Natália Anício CARDOSO, Ricardo Jayme PROCÓPIO, Túlio Pinho NAVARRO, Alan DARDIK a Ligia DE LOIOLA CISNEROS, 2017. Diabetic foot ulcer carries high amputation and mortality rates, particularly in the presence of advanced age, peripheral artery disease and anemia. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* [online]. **11**, SI: Online Supplement - 2, S583–S587. ISSN 1871-4021. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsx.2017.04.008
- COWIN, A. J., N. HATZIRODOS, C. A. HOLDING, V. DUNAISKI, R. H. HARRIES, T. E. RAYNER, R. FITRIDGE, R. D. COOTER, G. S. SCHULTZ a D. A. BELFORD, 2001. Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. **117**(5), 1282–1289. ISSN 0022-202X. Dostupné z: doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01501.x

CYPHERT, Jaime M., Carol S. TREMPUS a Stavros GARANTZIOTIS, 2015. Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *International Journal of Cell Biology* [online] [vid. 2021-02-23]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1155/2015/563818>

ČEPA, Martin, 2018. Segmentation of Total Cell Area in Brightfield Microscopy Images. *Methods and Protocols* [online]. **1**(4), 43. Dostupné z: doi:[10.3390/mps1040043](https://doi.org/10.3390/mps1040043)

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](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831)

DALZON, Bastien, Catherine AUDE-GARCIA, H el ene DIEMER, Joanna BONS, Caroline MARIE-DESVERGNE, Julien P ERARD, Muriel DUBOSSON, V eronique COLLIN-FAURE, Christine CARAPITO, Sarah CIANF ERANI, Marie CARRI ERE 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](https://doi.org/10.1039/C9EN01329F)

DANSCHER, G., M. STOLTENBERG a S. JUHL, 1994a. 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.

DANSCHER, G., M. STOLTENBERG a S. JUHL, 1994b. 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.

DAVIS, Stephen C., Carlos RICOTTI, Alex CAZZANIGA, Esperanza WELSH, William H. EAGLSTEIN a Patricia M. MERTZ, 2008. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **16**(1), 23–29. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:[10.1111/j.1524-475X.2007.00303.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00303.x)

DESMOULI ERE, A., M. REDARD, I. DARBY a G. GABBIANI, 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology*. **146**(1), 56–66.

DHALL, Sandeep, Danh C. DO, Monika GARCIA, Jane KIM, Seyed H. MIREBRAHIM, Julia LYUBOVITSKY, Stefano LONARDI, Eugene A. NOTHNAGEL, Neal SCHILLER a Manuela MARTINS-GREEN, 2014. Generating and Reversing Chronic Wounds in Diabetic Mice by Manipulating Wound Redox Parameters. *Journal of Diabetes Research* [online] [vid. 2021-02-10]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1155/2014/562625>

DISTLER, J org H. W., Astrid J UNGEL, Lars C. HUBER, Christian A. SEEMAYER, Charles F. REICH, Renate E. GAY, Beat A. MICHEL, Adriano FONTANA, Steffen GAY, David S. PISETSKY a Oliver DISTLER, 2005. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **102**(8), 2892–2897. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.0409781102](https://doi.org/10.1073/pnas.0409781102)

DOWD, Scot E., Yan SUN, Patrick R. SECOR, Daniel D. RHOADS, Benjamin M. WOLCOTT, Garth A. JAMES a Randall D. WOLCOTT, 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiology* [online]. **8**(1), 43. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:[10.1186/1471-2180-8-43](https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-43)

DUMVILLE, Jo C., Benjamin A. LIPSKY, Christopher HOEY, Mario CRUCIANI, Marta FISCON a Jun XIA, 2017. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. **6**, CD011038. ISSN 1469-493X. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD011038.pub2

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

EBERLEIN, T., G. HAEMMERLE, M. SIGNER, U. GRUBER MOESENBACHER, J. TRABER, M. MITTLBOECK, M. ABEL a R. STROHAL, 2012. Comparison of PHMB-containing dressing and silver dressings in patients with critically colonised or locally infected wounds. *Journal of Wound Care* [online]. **21**(1), 12, 14–16, 18–20. ISSN 0969-0700. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2012.21.1.12

EKLÖF, Bo, Robert B. RUTHERFORD, John J. BERGAN, Patrick H. CARPENTIER, Peter GLOVICZKI, Robert L. KISTNER, Mark H. MEISSNER, Gregory L. MONETA, Kenneth MYERS, Frank T. PADBERG, Michel PERRIN, C. Vaughan RUCKLEY, Philip Coleridge SMITH, Thomas W. WAKEFIELD a AMERICAN VENOUS FORUM INTERNATIONAL AD HOC COMMITTEE FOR REVISION OF THE CEAP CLASSIFICATION, 2004. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *Journal of Vascular Surgery* [online]. **40**(6), 1248–1252. ISSN 0741-5214. Dostupné z: doi:10.1016/j.jvs.2004.09.027

ELTZSCHIG, Holger K. a Charles D. COLLARD, 2004. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin* [online]. **70**(1), 71–86. ISSN 0007-1420, 1471-8391. Dostupné z: doi:10.1093/bmb/ldh025

EMING, Sabine A., Thomas KRIEG a Jeffrey M. DAVIDSON, 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. **127**(3), 514–525. ISSN 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jid.5700701

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

FOLDBJERG, R., D.A. DANG a H. AUTRUP, 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology* [online]. **85**(7), 743–750. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-010-0545-5

FRANKOVA, J., V. PIVODOVA, H. VAGNEROVA, J. JURANOVA a J. ULRICHOVA, 2016. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J Appl Biomater Funct Mater* [online]. **14**(2), e137-42. ISSN 2280-8000 (Electronic) 2280-8000 (Linking). Dostupné z: doi:10.5301/jabfm.5000268

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.

- FREEDBERG, I. M., M. TOMIC-CANIC, M. KOMINE a M. BLUMENBERG, 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol.* **116**(5), 633–640.
- FUMAL, I., C. BRAHAM, P. PAQUET, C. PIÉRARD-FRANCHIMONT a G. E. PIÉRARD, 2002a. The beneficial toxicity paradox of antimicrobials in leg ulcer healing impaired by a polymicrobial flora: a proof-of-concept study. *Dermatology (Basel, Switzerland)* [online]. **204 Suppl 1**, 70–74. ISSN 1018-8665. Dostupné z: doi:10.1159/000057729
- FUMAL, I., C. BRAHAM, P. PAQUET, C. PIÉRARD-FRANCHIMONT a G. E. PIÉRARD, 2002b. The beneficial toxicity paradox of antimicrobials in leg ulcer healing impaired by a polymicrobial flora: a proof-of-concept study. *Dermatology (Basel, Switzerland)* [online]. **204 Suppl 1**, 70–74. ISSN 1018-8665. Dostupné z: doi:10.1159/000057729
- FUNAYAMA, R. a F. ISHIKAWA, 2007. Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* [online]. **116**(5), 431–40. ISSN 0009-5915 (Print) 0009-5915 (Linking). Dostupné z: doi:10.1007/s00412-007-0115-7
- GABBIANI, G, 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology* [online]. **200**(4), 500–503. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:10.1002/path.1427
- 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.
- GEORGE, Robert, Steve MERTEN, Tim T. WANG, Peter KENNEDY a Peter MAITZ, 2014. In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin. *The Australasian Journal of Dermatology* [online]. **55**(3), 185–190. ISSN 1440-0960. Dostupné z: doi:10.1111/ajd.12101
- GHATAK, Shibnath, Edward V. MAYTIN, Judith A. MACK, Vincent C. HASCALL, Ilia ATANELISHVILI, Ricardo MORENO RODRIGUEZ, Roger R. MARKWALD a Suniti MISRA, 2015. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *International Journal of Cell Biology* [online] [vid. 2021-02-23]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1155/2015/834893
- GOTTRUP, Finn, Jan APELQVIST, Thomas BJARNSHOLT, Rose COOPER, Zena MOORE, Edgar J. G. PETERS a Sebastian PROBST, 2014. Antimicrobials and Non-Healing Wounds. Evidence, controversies and suggestions-key messages. *Journal of Wound Care* [online]. **23**(10), 477–478, 480, 482. ISSN 0969-0700. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2014.23.10.477
- GRINNELL, F a M ZHU, 1996. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase,  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor, and  $\alpha$ 2-macroglobulin. *J Invest Dermatol.* **106**, 335–341.
- GÜNTHER, F., B. BLESSING, U. DAPUNT, A. MISCHNIK a N.T. MUTTERS, 2021. Ability of chlorhexidine, octenidine, polyhexanide and chloroxynol 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

HAHN, Hyung Min, Il Jae LEE, Kyong-Je WOO a Bo Young PARK, 2019. Silver-Impregnated Negative-Pressure Wound Therapy for the Treatment of Lower-Extremity Open Wounds: A Prospective Randomized Clinical Study. *Advances in Skin & Wound Care* [online]. **32**(8), 370–377. ISSN 1538-8654. Dostupné z: doi:10.1097/01.ASW.0000569116.59534.a6

HÄMMERLE, Gilbert a Robert STROHAL, 2016. Efficacy and cost-effectiveness of octenidine wound gel in the treatment of chronic venous leg ulcers in comparison to modern wound dressings. *International Wound Journal* [online]. **13**(2), 182–188. ISSN 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12250

HARDING, K. G., K. MOORE a T. J. PHILLIPS, 2005. Wound chronicity and fibroblast senescence--implications for treatment. *Int Wound J* [online]. **2**(4), 364–8. ISSN 1742-4801 (Print) 1742-4801 (Linking). Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4801.2005.00149.x

HARRISON-BALESTRA, Catherine, Alejandro L. CAZZANIGA, Stephen C. DAVIS a Patricia M. MERTZ, 2003. A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm *in vitro* within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]* [online]. **29**(6), 631–635. ISSN 1076-0512. Dostupné z: doi:10.1046/j.1524-4725.2003.29146.x

HARTMANN, Carol A., Heinz RODE a Beverley KRAMER, 2016. Acticoat™ stimulates inflammation, but does not delay healing, in acute full-thickness excisional wounds. *International Wound Journal* [online]. **13**(6), 1344–1348. ISSN 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12525

HARVANOVA, M. P., J. JIRAVOVA, J. MALOHLAVA, K. B. TOMANKOVA, D. JIROVA a H. KOLAROVA, 2017. Raman imaging of cellular uptake and studies of silver nanoparticles effect in BJ human fibroblasts cell lines. *Int J Pharm* [online]. **528**(1–2), 280–286. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.076

HENDERSON, Robert B., Josie A. R. HOBBS, Meg MATHIES a Nancy HOGG, 2003. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* [online]. **102**(1), 328–335. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-10-3228

- HERRICK, SE, P SLOAN, M MCGURK, L FREAK, CN MCCOLLUM a M.W. FERGUSON, 1992. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol.* **141**, 1085–1095.
- HIDALGO, E. a C. DOMÍNGUEZ, 1998. Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicology Letters* [online]. **98**(3), 169–179. ISSN 0378-4274. Dostupné z: doi:10.1016/s0378-4274(98)00114-3
- HJELJORD, L. G., G. ROLLA a P. BONESVOLL, 1973. Chlorhexidine-protein interactions. *Journal of Periodontal Research. Supplement.* **12**, 11–16. ISSN 0075-4331.
- 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
- CHABY, G., V. VISEUX, J. F. POULAIN, B. DE CAGNY, J. P. DENOEUUX a C. LOK, 2005. [Topical silver sulfadiazine-induced acute renal failure]. *Ann Dermatol Venereol.* **132**(11 Pt 1), 891–3. ISSN 0151-9638 (Print) 0151-9638 (Linking).
- CHAMBERS, J.L., G.G. CHRISTOPH, M. KRIEGER, L. KAY a R.M. STROUD, 1974. Silver ion inhibition of serine proteases: Crystallographic study of silver-trypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **59**(1), 70–74. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-291X(74)80175-0
- CHEN, Y. Erin, Michael A. FISCHBACH a Yasmine BELKAID, 2018. Skin microbiota–host interactions. *Nature* [online]. **553**(7689), 427–436. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature25177
- 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
- INOUE, Ken-ichiro, Hirohisa TAKANO, Akinori SHIMADA a Masahiko SATOH, 2009. Metallothionein as an Anti-Inflammatory Mediator. *Mediators of Inflammation* [online]. **2009** [vid. 2019-08-26]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2009/101659
- JAMES, G. A., E. SWIGGER, R. WOLCOTT, E. PULCINI, P. SECOR, J. SESTRICH, J. W. COSTERTON a P. S. STEWART, 2008. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* **16**(1), 37–44.



JIRKOVSKÁ, Alexandra, Silvie LACIGOVÁ, Zdeněk RUŠAVÝ a Robert BÉM, 2016. *Doporučený postup pro prevenci diagnostiku a terapie syndromu diabetické nohy*. 2016. B.m.: Česká diabetologická společnost ČLS JEP.

KAEWAMATAWONG, Theerayuth, Wijit BANLUNARA, Pattwat MANEEWATTANAPINYO, Chuchaat THAMMACHAREON a Sanong EKGASIT, 2014. Acute and subacute pulmonary toxicity caused by a single intratracheal instillation of colloidal silver nanoparticles in mice: pathobiological changes and metallothionein responses. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. **33**(1), 59–68. ISSN 2162-6537.

KÄHÄRI, Veli-Matti a Ulpu SAARIALHO-KERE, 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology* [online]. **6**(5), 199–213. ISSN 1600-0625. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0625.1997.tb00164.x

KALAN, L., Jacquelyn S. MEISEL, Michael A. LOESCHE, Joseph HORWINSKI, Ioana SOAITA, Xiaoxuan CHEN, Aayushi UBEROI, Sue E. GARDNER a Elizabeth A. GRICE, 2019. Strain- and Species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds Is Associated with Clinical Outcomes and Therapeutic Efficacy. *Cell Host & Microbe* [online]. **25**(5), 641-655.e5. ISSN 1934-6069. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2019.03.006

KALAN, Lindsay, Michael LOESCHE, Brendan P. HODKINSON, Kristopher HEILMANN, Gordon RUTHEL, Sue E. GARDNER a Elizabeth A. GRICE, 2016. Redefining the Chronic-Wound Microbiome: Fungal Communities Are Prevalent, Dynamic, and Associated with Delayed Healing. *mBio* [online]. **7**(5) [vid. 2020-10-31]. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01058-16

KAPUKAYA, Rana a Osman CILOGLU, 2020. Treatment of chronic wounds with polyurethane sponges impregnated with boric acid particles: A randomised controlled trial. *International Wound Journal* [online]. **17**(5), 1159–1165. ISSN 1742-481X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/iwj.13463

KARLSSON, Hanna L, Anda R GLIGA, Fabienne MGR CALLÉJA, Cátia SAG GONÇALVES, Inger Odnevall WALLINDER, Harry VRIELING, Bengt FADEEL a Giel HENDRIKS, 2014. Mechanism-based genotoxicity screening of metal oxide nanoparticles using the ToxTracker panel of reporter cell lines. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. **11**, 41. ISSN 1743-8977. Dostupné z: doi:10.1186/s12989-014-0041-9

KATO, G. J., V. MCGOWAN, R. F. MACHADO, J. A. LITTLE, J. th TAYLOR, C. R. MORRIS, J. S. NICHOLS, X. WANG, M. POLJAKOVIC, S. M. MORRIS Jr. a M. T. GLADWIN, 2006. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood* [online]. **107**(6), 2279–85. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-06-2373

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

KĘDZIORA, Anna, Mateusz SPERUDA, Eva KRZYŻEWSKA, Jacek RYBKA, Anna ŁUKOWIAK a Gabriela BUGLA-PŁOSKOŃSKA, 2018. Similarities and Differences between

Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(2). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19020444

KENNEDY, L a T J LYONS, 1989. Non-enzymatic glycosylation. *British Medical Bulletin* [online]. **45**(1), 174–190. ISSN 1471-8391, 0007-1420. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072310

KLEIN, Pavel, Martin SOJKA, Jan KUCERA, Jana MATONHOVA, Vojtech PAVLIK, Jan NEMEC, Gabriela KUBICKOVA, Rastislav SLAVKOVSKY, Katarzyna SZUSZKIEWICZ, Petr DANEK, Miroslav ROZKOT a Vladimír VELEBNÝ, 2018a. A porcine model of skin wound infected with a polybacterial biofilm. *Biofouling* [online]. **34**(2), 226–236. ISSN 1029-2454. Dostupné z: doi:10.1080/08927014.2018.1425684

KLEIN, Pavel, Martin SOJKA, Jan KUCERA, Jana MATONHOVA, Vojtech PAVLIK, Jan NEMEC, Gabriela KUBICKOVA, Rastislav SLAVKOVSKY, Katarzyna SZUSZKIEWICZ, Petr DANEK, Miroslav ROZKOT a Vladimír VELEBNÝ, 2018b. A porcine model of skin wound infected with a polybacterial biofilm. *Biofouling* [online]. **34**(2), 226–236. ISSN 1029-2454. Dostupné z: doi:10.1080/08927014.2018.1425684

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

KRASOWSKI, Grzegorz, Arkadiusz JAWIEŃ, Andrzej TUKIENDORF, Zbigniew RYBAK, Adam JUNKA, Małgorzata OLEJNICZAK-NOWAKOWSKA, Marzenna BARTOSZEWICZ a Danuta SMUTNICKA, 2015a. A comparison of an antibacterial sandwich dressing vs dressing containing silver. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **23**(4), 525–530. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12301

KRASOWSKI, Grzegorz, Arkadiusz JAWIEŃ, Andrzej TUKIENDORF, Zbigniew RYBAK, Adam JUNKA, Małgorzata OLEJNICZAK-NOWAKOWSKA, Marzenna BARTOSZEWICZ a Danuta SMUTNICKA, 2015b. A comparison of an antibacterial sandwich dressing vs dressing containing silver. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **23**(4), 525–530. ISSN 1524475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12301

KUCERA, J., M. SOJKA, V. PAVLIK, K. SZUSZKIEWICZ, V. VELEBNÝ 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).
- LANSDOWN, A. B., B. SAMPSON, P. LAUPATTARAKASEM a A. VUTTIVIROJANA, 1997. Silver aids healing in the sterile skin wound: experimental studies in the laboratory rat. *The British Journal of Dermatology*. **137**(5), 728–735. ISSN 0007-0963.
- LARESE, Francesca Filon, Flavia D'AGOSTIN, Matteo CROSER, 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
- LEIBOVICH, S. J. a R. ROSS, 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American Journal of Pathology*. **78**(1), 71–100. ISSN 0002-9440.
- LIAO, Chengzhu, Yuchao LI a Sie Chin TJONG, 2019. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(2) [vid. 2020-12-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20020449
- LIPSKY, Benjamin A., Matthew DRYDEN, Finn GOTTRUP, Dilip NATHWANI, Ronald Andrew SEATON a Jan STRYJA, 2016. Antimicrobial stewardship in wound care: a Position Paper from the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and European Wound Management Association. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **71**(11), 3026–3035. ISSN 1460-2091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkw287
- LIVAK, Kenneth J. a Thomas D. SCHMITTGEN, 2001a. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* [online]. **25**(4), 402–408. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1006/meth.2001.1262
- LIVAK, Kenneth J. a Thomas D. SCHMITTGEN, 2001b. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* [online]. **25**(4), 402–408. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1006/meth.2001.1262
- LOESCHE, Michael, Sue E. GARDNER, Lindsay KALAN, Joseph HORWINSKI, Qi ZHENG, Brendan P. HODKINSON, Amanda S. TYLDSLEY, Carrie L. FRANCISCUS, Stephen L. HILLIS, Samir MEHTA, David J. MARGOLIS a Elizabeth A. GRICE, 2017. Temporal Stability in Chronic Wound Microbiota Is Associated With Poor Healing. *Journal of Investigative*

*Dermatology* [online]. **137**(1), 237–244. ISSN 0022-202X, 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1016/j.jid.2016.08.009

LONGAKER, M. T., E. S. CHIU, N. S. ADZICK, M. STERN, M. R. HARRISON a R. STERN, 1991. Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Annals of Surgery* [online]. **213**(4), 292–296. ISSN 0003-4932. Dostupné z: doi:10.1097/00000658-199104000-00003

LOOTS, M. A., E. N. LAMME, J. ZEEGELAAR, J. R. MEKKES, J. D. BOS a E. MIDDELKOOP, 1998. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. **111**(5), 850–857. ISSN 0022-202X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x

LOZA, K., C. SENGSTOCK, S. CHERNOUSOVA, M. KÖLLER a M. EPPLE, 2014. The predominant species of ionic silver in biological media is colloiddally dispersed nanoparticulate silver chloride. *RSC Advances* [online]. **4**(67), 35290–35297. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA04764H

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

LUNDQVIST, K. a A. SCHMIDTCHEN, 2001. Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers. *The British Journal of Dermatology* [online]. **144**(2), 254–259. ISSN 0007-0963. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04009.x

MAGHSOUDI, H., S. MONSHIZADEH a M. MESGARI, 2011. A comparative study of the burn wound healing properties of saline-soaked dressing and silver sulfadiazine in rats. *Indian J Surg* [online]. **73**(1), 24–7. ISSN 0972-2068 (Print) 0973-9793 (Linking). Dostupné z: doi:10.1007/s12262-010-0169-2

MAHEDIA, Monali, Nilay SHAH a Bardia AMIRLAK, 2016. Clinical Evaluation of Hyaluronic Acid Sponge with Zinc versus Placebo for Scar Reduction after Breast Surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery. Global Open* [online]. **4**(7), e791. ISSN 2169-7574. Dostupné z: doi:10.1097/GOX.0000000000000747

MALANOVIC, 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

MANI, Aparna, 2015. *Evaluation of In-vitro Anti-Inflammatory Activity of Silver Nanoparticles Synthesised using Piper Nigrum Extract* [online]. Dostupné z: doi:10.4172/2157-7439.1000268

MANKE, Amruta, Liying WANG a Yon ROJANASAKUL, 2013. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International* [online] [vid. 2018-04-03]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/942916/>

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
- MENDEZ, Manuel V., Andrew STANLEY, Hee-Young PARK, Karen SHON, Tania PHILLIPS a James O. MENZOIAN, 1998. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *Journal of Vascular Surgery*. **28**(5), 876–883. ISSN 0741-5214.
- METCALF, Daniel G. a Philip G. BOWLER, 2013. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns & Trauma* [online]. **1**(1), 5–12. ISSN 2321-3868. Dostupné z: doi:10.4103/2321-3868.113329
- MIJNENDONCKX, K., N. LEYS, J. MAHILLON, S. SILVER a R. VAN HOUDE, 2013. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals* [online]. **26**(4), 609–21. ISSN 1572-8773 (Electronic) 0966-0844 (Linking). Dostupné z: doi:10.1007/s10534-013-9645-z
- MIRASTSCHISKI, 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
- MONAVARIAN, M., S. KADER, S. MOEINZADEH a E. JABBARI, 2019. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* [online]. **25**(4), 294–311. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2018.0350
- MOON, Kyung Chul, Jong Phil YANG, Jae Sun LEE, Seong-Ho JEONG, Eun-Sang DHONG a Seung-Kyu HAN, 2019. Effects of Ultraviolet Irradiation on Cellular Senescence in Keratinocytes Versus Fibroblasts. *The Journal of craniofacial surgery* [online]. **30**(1), 270–275. ISSN 1049-2275. Dostupné z: doi:10.1097/SCS.0000000000004904

- MOSELEY, Ryan, Joanna R. HILTON, Rachel J. WADDINGTON, Keith G. HARDING, Phil STEPHENS a David W. THOMAS, 2004. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **12**(4), 419–429. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12406.x
- MÜLLER, Gerald a Axel KRAMER, 2008. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **61**(6), 1281–1287. ISSN 1460-2091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkn125
- 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
- MURPHY, A., A. CASEY, G. BYRNE, G. CHAMBERS a O. HOWE, 2016. Silver nanoparticles induce pro-inflammatory gene expression and inflammasome activation in human monocytes. *J Appl Toxicol* [online]. **36**(10), 1311–20. ISSN 1099-1263 (Electronic) 0260-437X (Linking). Dostupné z: doi:10.1002/jat.3315
- MUSIL, Dalibor, 2005. Chronická žilní insuficience - současný stav poznání. *Interní medicína pro praxi*. **5**(6), 270–276. ISSN 12127299, 18035256.
- MUSTOE, Thomas, 2004. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *The American Journal of Surgery* [online]. **187**(5, Supplement 1), S65–S70. ISSN 0002-9610. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9610(03)00306-4
- NADWORNY, Patricia L., Breanne K. LANDRY, JianFei WANG, Edward E. TREDGET a Robert E. BURRELL, 2010a. Does nanocrystalline silver have a transferable effect? *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **18**(2), 254–265. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00579.x
- NADWORNY, Patricia L., Jianfei WANG, Edward E. TREDGET a Robert E. BURRELL, 2010b. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis. *Journal of Inflammation (London, England)* [online]. **7**, 13. ISSN 1476-9255. Dostupné z: doi:10.1186/1476-9255-7-13
- NADWORNY, Patricia L., Jianfei WANG, Edward E. TREDGET a Robert E. BURRELL, 2010c. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis. *Journal of Inflammation (London, England)* [online]. **7**, 13. ISSN 1476-9255. Dostupné z: doi:10.1186/1476-9255-7-13
- 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
- NIKOLIĆ, Nenad, Philip KIENZL, Pooja TAJPARA, Martin VIERHAPPER, Johannes MATIASEK a Adelheid ELBE-BÜRGER, 2019. The Antiseptic Octenidine Inhibits Langerhans Cell Activation and Modulates Cytokine Expression upon Superficial Wounding with Tape

Stripping. *Journal of Immunology Research* [online] [vid. 2020-01-14]. Dostupné z: doi:10.1155/2019/5143635

NOOR, Saba, Mohammad ZUBAIR a Jamal AHMAD, 2015. Diabetic foot ulcer—A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* [online]. **9**(3), 192–199. ISSN 1871-4021. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsx.2015.04.007

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, 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

PETREY, Aaron C. a Carol A. DE LA MOTTE, 2019. Hyaluronan in inflammatory bowel disease: cross-linking inflammation and coagulation. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* [online]. **78–79**, 314–323. ISSN 0945-053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2018.03.011

PFURTSCHHELLER, Klaus, Thomas PETNEHAZY, Walter GOESSLER, Vladimír BUBALO, Lars-Peter KAMOLZ a Marija TROP, 2014. Transdermal uptake and organ distribution of silver from two different wound dressings in rats after a burn trauma. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **22**(5), 654–659. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12209

PIAO, Mei Jing, Kyoung Ah KANG, In Kyung LEE, Hye Sun KIM, Suhkmann KIM, Jeong Yun CHOI, Jinhee CHOI a Jin Won HYUN, 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* [online]. **201**(1), 92–100. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2010.12.010

PLÜDDEMANN, Annette, Subhankar MUKHOPADHYAY a Siamon GORDON, 2011. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunological Reviews* [online]. **240**(1), 11–24. ISSN 1600-065X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00989.x

POKORNÁ, Romana a Andrea MRÁZOVÁ, 2012. *Kompendium 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>

PRAMANIK, Srikrishna, Sabyasachi CHATTERJEE, Arindam SAHA, Parukuttyamma Sujatha DEVI a Gopinatha SURESH KUMAR, 2016. Unraveling the Interaction of Silver Nanoparticles

with Mammalian and Bacterial DNA. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. **120**(24), 5313–5324. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.6b01586

PUNJATAEWAKUPT, Apirujee, Supamas NAPAVICHAYANUN 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

QIAN, L. W., A. B. FOURCAUDOT a K. P. LEUNG, 2017. Silver Sulfadiazine Retards Wound Healing and Increases Hypertrophic Scarring in a Rabbit Ear Excisional Wound Model. *J Burn Care Res* [online]. **38**(1), e418–e422. ISSN 1559-0488 (Electronic) 1559-047X (Linking). Dostupné z: doi:10.1097/BCR.0000000000000406

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018a. *R: A language and environment for statistical computing*. [online]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. Dostupné z: <https://www.R-project.org/>

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018b. *R: A language and environment for statistical computing*. [online]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. Dostupné z: <https://www.R-project.org/>

RAFFETTO, Joseph D., Daniela LIGI, Rosanna MANISCALCO, Raouf A. KHALIL a Ferdinando MANNELLO, 2021. Why Venous Leg Ulcers Have Difficulty Healing: Overview on Pathophysiology, Clinical Consequences, and Treatment. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **10**(1), 29. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10010029

RAHIM, Kashif, Shamim SALEHA, Xudong ZHU, Liang HUO, Abdul BASIT a Octavio Luiz FRANCO, 2017. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microbial Ecology* [online]. **73**(3), 710–721. ISSN 1432-184X. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-016-0867-9

RAMACHANDRAN, L. K., 1956. Protein-Iodine Interaction. *Chemical Reviews* [online]. **56**(2), 199–218. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr50008a001

RASHAAN, Z. M., P. KRIJNEN, R. R. KLAMER, I. B. SCHIPPER, O. M. DEKKERS a R. S. BREEDERVELD, 2014. Nonsilver treatment vs. silver sulfadiazine in treatment of partial-thickness burn wounds in children: a systematic review and meta-analysis. *Wound Repair Regen* [online]. **22**(4), 473–82. ISSN 1524-475X (Electronic) 1067-1927 (Linking). Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12196

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

RINNA, Alessandra, Zuzana MAGDOLENOVA, Alexandra HUDECOVA, Marcin KRUSZEWSKI, Magne REFSNES a Maria DUSINSKA, 2015. Effect of silver nanoparticles on



mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage. *Mutagenesis* [online]. **30**(1), 59–66. ISSN 1464-3804. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/geu057

RITZ, Christian, Florent BATY, Jens C. STREIBIG a Daniel GERHARD, 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* [online]. **10**(12) [vid. 2018-12-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0146021

RODRÍGUEZ, David, Charlotte J. MORRISON a Christopher M. OVERALL, 2010. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. **1803**(1), 39–54. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.015

ROGERS, B. Sc. A. A. ROGERS, BURNETT, S. BURNETT, LINDHOLM, C. LINDHOLM, BJELLERUP, M. BJELLERUP, CHRISTENSEN, O. B. CHRISTENSEN, ZEDERFELDT, B. ZEDERFELDT, PESCHEN, M. PESCHEN, CHEN a W. Y. J. CHEN, 1999. Expression of tissue-type and urokinase-type plasminogen activator activities in chronic venous leg ulcers. *Vasa* [online]. **28**(2), 101–105. Dostupné z: doi:10.1024/0301-1526.28.2.101

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

ROSEN, J., A. LANDRISCINA, A. KUTNER, B. L. ADLER, A. E. KRAUSZ, J. D. NOSANCHUK a A. J. FRIEDMAN, 2015a. Silver sulfadiazine retards wound healing in mice via alterations in cytokine expression. *J Invest Dermatol* [online]. **135**(5), 1459–1462. ISSN 1523-1747 (Electronic) 0022-202X (Linking). Dostupné z: doi:10.1038/jid.2015.21

ROSEN, Jamie, Angelo LANDRISCINA, Allison KUTNER, Brandon L. ADLER, Aimee E. KRAUSZ, Joshua D. NOSANCHUK a Adam J. FRIEDMAN, 2015b. Silver sulfadiazine retards wound healing in mice via alterations in cytokine expression. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. **135**(5), 1459–1462. ISSN 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2015.21

ROSNER, K., C. ROSS, T. KARLSMARK, A. A. PETERSEN, F. GOTTRUP a G. L. VEJLSGAARD, 1995. Immunohistochemical characterization of the cutaneous cellular infiltrate in different areas of chronic leg ulcers. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* [online]. **103**(4), 293–299. ISSN 0903-4641. Dostupné z: doi:10.1111/j.1699-0463.1995.tb01109.x

RUSSELL, A. D. a W. B. HUGO, 1994. Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry* [online]. **31**, 351–370. ISSN 0079-6468. Dostupné z: doi:10.1016/s0079-6468(08)70024-9

SAARIALHO-KERE, U. K., 1998. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Archives of Dermatological Research* [online]. **290**(1), S47–S54. ISSN 0340-3696, 1432-069X. Dostupné z: doi:10.1007/PL00007453

SEISER, Saskia, Lukas JANKER, Nina ZILA, Michael MILDNER, Ana RAKITA, Johannes MATIASEK, Andrea BILECK, Christopher GERNER, Verena PAULITSCHKE a Adelheid ELBE-BÜRGER, 2021. Octenidine-based hydrogel shows anti-inflammatory and protease-

inhibitory capacities in wounded human skin. *Scientific Reports* [online]. **11**(1), 32. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-79378-9

SEN, Chandan K., 2019. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in Wound Care* [online]. **8**(2), 39–48. ISSN 2162-1918. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2019.0946

SEN, M., 2011. Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation. *Appl Radiat Isot* [online]. **69**(1), 126–9. ISSN 1872-9800 (Electronic) 0969-8043 (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.apradiso.2010.08.017

SHATIRISHVILI, M., A.S. BURK, C.M. FRANZ, G. PACE, T. KASTILAN, K. BREUHAHN, E. HINTERSEER, A. DIERICH, L. BAKIRI, E.F. WAGNER, H. PONTA, T.N. HARTMANN, M. TANAKA a V. ORIAN-ROUSSEAU, 2016. Epidermal-specific deletion of CD44 reveals a function in keratinocytes in response to mechanical stress. *Cell Death and Disease* [online]. **7**(11). Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2016.342

SHELTON, D. N., E. CHANG, P. S. WHITTIER, D. CHOI a W. D. FUNK, 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Current biology: CB* [online]. **9**(17), 939–945. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/s0960-9822(99)80420-5

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

SHIM, Ilseob, Kyunghee CHOI a Seishiro HIRANO, 2017. Oxidative stress and cytotoxic effects of silver ion in mouse lung macrophages J774.1 cells. *Journal of applied toxicology: JAT* [online]. **37**(4), 471–478. ISSN 1099-1263. Dostupné z: doi:10.1002/jat.3382

SHIN, Seung-Heon, Mi-Kyung YE, Hae-Sic KIM a Hyung-Suk KANG, 2007. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology* [online]. **7**(13), 1813–1818. ISSN 1567-5769. Dostupné z: doi:10.1016/j.intimp.2007.08.025

SHING, C.-Y., C.G. WHITELEY a D.-J. LEE, 2014. HIV protease: Multiple fold inhibition by silver nanoparticles-Spectrofluorimetric, thermodynamic and kinetic analysis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. **45**(4), 1140–1148. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2014.01.008

SCHÄFER, Matthias a Sabine WERNER, 2008. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research* [online]. **58**(2), 165–171. ISSN 1043-6618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2008.06.004

SCHALKWIJK, Casper G., Mariska LIEUW-A-FA, Victor W.M. VAN HINSBERGH a Coen D.A. STEHOUWER, 2002. Pathophysiological Role of Amadori-Glycated Proteins in Diabetic Microangiopathy. *Seminars in Vascular Medicine* [online]. **2**(2), 191–198. ISSN 15289648, 15293505. Dostupné z: doi:10.1055/s-2002-32042

SCHINDELIN, Johannes, Ignacio ARGANDA-CARRERAS, Erwin FRISE, Verena KAYNIG, Mark LONGAIR, Tobias PIETZSCH, Stephan PREIBISCH, Curtis RUEDEN, Stephan SAALFELD, Benjamin SCHMID, Jean-Yves TINEVEZ, Daniel James WHITE, Volker HARTENSTEIN, Kevin ELICEIRI, Pavel TOMANCAK a Albert CARDONA, 2012. Fiji: an

open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* [online]. **9**(7), 676–682. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.2019

SINDRILARU, Anca a Karin SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2013. Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing. *Advances in Wound Care* [online]. **2**(7), 357–368. ISSN 2162-1918. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2012.0407

SINGER, Adam J. a Richard A.F. CLARK, 1999. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med* [online]. **341**(10), 738–746. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199909023411006

SMITH, Kirsty D., Alan WELLS a Douglas A. LAUFFENBURGER, 2006. Multiple signaling pathways mediate compaction of collagen matrices by EGF-stimulated fibroblasts. *Experimental Cell Research* [online]. **312**(11), 1970–1982. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2006.02.022

SMITH, P D Coleridge, P THOMAS, J H SCURR a J A DORMANDY, 1988. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*. **296**(6638), 1726–1727. ISSN 0267-0623.

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

SPYROU, George E., David A.L. WATT a Ian L. NAYLOR, 1998. The origin and mode of fibroblast migration and proliferation in granulation tissue. *British Journal of Plastic Surgery* [online]. **51**(6), 455–461. ISSN 0007-1226. Dostupné z: doi:10.1054/bjps.1997.0277

STAHL, Jessica, Michael BRAUN, Joerg SIEBERT a Manfred KIETZMANN, 2011a. 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

STAHL, Jessica, Michael BRAUN, Joerg SIEBERT a Manfred KIETZMANN, 2011b. 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

SUGIMOTO, Kazuhiro, Minoru YASUJIMA a Soroku YAGIHASHI, 2008. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Current Pharmaceutical Design* [online]. **14**(10), 953–961. ISSN 1873-4286. Dostupné z: doi:10.2174/138161208784139774

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

SZMYD, Radoslaw, Anna GORALCYK, Lukasz SKALNIAK, Agnieszka CIERNIAK, Barbara LIPERT, Francesca FILON, Matteo CROSERI, Julia BOROWCZYK, Eliza ZIMOLAĞ, Justyna DRUKALA, Andrzej KLEIN a Jolanta JURA, 2012. Effect of silver nanoparticles on human primary keratinocytes. *Biological chemistry* [online]. **394**. Dostupné z: doi:10.1515/hsz-2012-0202

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

TAUTENHAHN, J., F. MEYER, T. BUERGER, U. SCHMIDT, H. LIPPERT, W. KOENIG a B. KOENIG, 2010. Interactions of neutrophils with silver-coated vascular polyester grafts. *Langenbecks Arch Surg* [online]. **395**(2), 143–9. ISSN 1435-2451 (Electronic) 1435-2443 (Linking). Dostupné z: doi:10.1007/s00423-008-0439-7

THOMASON, Helen A., Jodie M. LOVETT, Carla J. SPINA, Christian STEPHENSON, Andrew J. MCBAIN a Matthew J. HARDMAN, 2018a. Silver Oxysalts Promote Cutaneous Wound Healing Independent of Infection. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12627

THOMASON, Helen A., Jodie M. LOVETT, Carla J. SPINA, Christian STEPHENSON, Andrew J. MCBAIN a Matthew J. HARDMAN, 2018b. Silver Oxysalts Promote Cutaneous Wound Healing Independent of Infection. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12627

TONNESEN, Marcia G, 1989. Neutrophil-Endothelial Cell Interactions: Mechanisms of Neutrophil Adherence to Vascular Endothelium. *J Investig Dermatol.* **93**(2s), 53S-58S. ISSN 0022-202X.

TORISEVA, M. a V.-M. KÄHÄRI, 2009. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **66**(2), 203–224. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-008-8388-4

TOTH, Marta, Anjum SOHAIL a Rafael FRIDMAN, 2012. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **878**, 121–135. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-854-2\_8

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

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.

TSURUTA, Daisuke, Takashi HASHIMOTO, Kevin J. HAMILL a Jonathan C.R. JONES, 2011. Hemidesmosomes and focal contact proteins: Functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *Journal of Dermatological Science* [online]. **62**(1), 1–7. ISSN 0923-1811. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdermsci.2011.01.005

VANSCHIEDT, Wolfgang, Keith HARDING, Luc TÉOT a Jörg SIEBERT, 2012a. 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

- VANSCHIEDT, Wolfgang, Keith HARDING, Luc TÉOT a Jörg SIEBERT, 2012b. 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
- VAZQUEZ-MUÑOZ, Roberto, Belen BORREGO, Karla JUÁREZ-MORENO, Maritza GARCÍA-GARCÍA, Josué D. MOTA MORALES, Nina BOGDANCHIKOVA a Alejandro HUERTA-SAQUERO, 2017. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? *Toxicology Letters* [online]. **276**, 11–20. ISSN 1879-3169. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2017.05.007
- VERBANIC, S., Y. SHEN, J. LEE, J.M. DEACON a I.A. CHEN, 2020. Microbial predictors of healing and short-term effect of debridement on the microbiome of chronic wounds. *npj Biofilms and Microbiomes* [online]. **6**(1). Dostupné z: doi:10.1038/s41522-020-0130-5
- 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
- VIMBELA, Gina V., Sang M. NGO, Carolyn FRAZE, Lei YANG a David A. STOUT, 2017. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine* [online]. **12**, 3941–3965. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S134526
- VOIGT, J. a V.R. DRIVER, 2012. Hyaluronic acid and wound healing. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **20**(3), 317–331. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00777.x
- WALL, Ivan B., Ryan MOSELEY, Duncan M. BAIRD, David KIPLING, Peter GILES, Iraj LAFFAFIAN, Patricia E. PRICE, David W. THOMAS a Phil STEPHENS, 2008. Fibroblast Dysfunction Is a Key Factor in the Non-Healing of Chronic Venous Leg Ulcers. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **128**(10), 2526–2540. ISSN 0022-202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2008.114
- WANG, Haibo, Aixin YAN, Zhigang LIU, Xinming YANG, Zeling XU, Yuchuan WANG, Runming WANG, Mohamad KOOHI-MOGHADAM, Ligang HU, Wei XIA, Huiru TANG, Yulan WANG, Hongyan LI a Hongzhe SUN, 2019. Deciphering molecular mechanism of silver by integrated omic approaches enables enhancing its antimicrobial efficacy in *E. coli*. *PLOS Biology* [online]. **17**(6), e3000292. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.3000292
- 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
- WANG, Liming, Tianlu ZHANG, Panyun LI, Wanxia HUANG, Jinglong TANG, Pengyang WANG, Jing LIU, Qingxi YUAN, Ru BAI, Bai LI, Kai ZHANG, Yuliang ZHAO a Chunying CHEN, 2015. Use of Synchrotron Radiation-Analytical Techniques To Reveal Chemical Origin of Silver-Nanoparticle Cytotoxicity. *ACS nano* [online]. **9**(6), 6532–6547. ISSN 1936-086X. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.5b02483

- WELLS, Alan, Austin NUSCHKE a Cecelia C. YATES, 2016. Skin tissue repair: Matrix microenvironmental influences. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* [online]. **49**, 25–36. ISSN 1569-1802. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2015.08.001
- 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
- WILKINSON, Holly N. a Matthew J. HARDMAN, 2020. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology* [online]. **10**(9), 200223. ISSN 2046-2441. Dostupné z: doi:10.1098/rsob.200223
- 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
- WOLCOTT, R. D., K. P. RUMBAUGH, G. JAMES, G. SCHULTZ, P. PHILLIPS, Q. YANG, C. WATTERS, P. S. STEWART a S. E. DOWD, 2010. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time- dependent therapeutic window. *Journal of Wound Care* [online]. **19**(8), 320–328. ISSN 0969-0700. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2010.19.8.77709
- WOLCOTT, Randall D., John D. HANSON, Eric J. REES, Lawrence D. KOENIG, Caleb D. PHILLIPS, Richard A. WOLCOTT, Stephen B. COX a Jennifer S. WHITE, 2016. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **24**(1), 163–174. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12370
- WRIGHT, Helen L., Robert J. MOOTS, Roger C. BUCKNALL a Steven W. EDWARDS, 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* [online]. **49**(9), 1618–1631. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/keq045
- XIU, Zong-Ming, Jie MA a Pedro J. J. ALVAREZ, 2011. Differential Effect of Common Ligands and Molecular Oxygen on Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles versus Silver Ions. *Environmental Science & Technology* [online]. **45**(20), 9003–9008. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es201918f
- XU, J a R A CLARK, 1996. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *The Journal of Cell Biology* [online]. **132**(1), 239–249. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.132.1.239
- XUE, Meilang a Christopher J. JACKSON, 2015. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care* [online]. **4**(3), 119–136. ISSN 2162-1918. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2013.0485
- YAMANI, N.E., A.R. COLLINS, E. RUNDÉN-PRAN, L.M. FJELLSBØ, S. SHAPOSHNIKOV, S. ZIENOLDDINY a M. DUSINSKA, 2017. In vitro genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: Towards reliable hazard assessment. *Mutagenesis* [online]. **32**(1), 117–126. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gew060
- YEOH-ELLERTON, Sim a Michael C. STACEY, 2003. Iron and 8-Isoprostane Levels in Acute and Chronic Wounds. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **121**(4), 918–925. ISSN 0022-202X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12471.x

YOU, Chuangang, Qiong LI, Xingang WANG, Pan WU, Jon Kee HO, Ronghua JIN, Liping ZHANG, Huawei SHAO a Chunmao HAN, 2017a. Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. *Scientific Reports* [online]. 7(1), 10489. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-10481-0

YOU, Chuangang, Qiong LI, Xingang WANG, Pan WU, Jon Kee HO, Ronghua JIN, Liping ZHANG, Huawei SHAO a Chunmao HAN, 2017b. Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. *Scientific Reports* [online]. 7(1), 10489. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-10481-0

ZANETTE, Caterina, Marco PELIN, Matteo CROSERI, Gianpiero ADAMI, Massimo BOVENZI, Francesca Filon LARESE a Chiara FLORIO, 2011. Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicology in Vitro* [online]. 25(5), 1053–1060. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2011.04.005

ZHANG, Tianlu, Liming WANG, Qiang CHEN a Chunying CHEN, 2014. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Medical Journal* [online]. 55(2), 283–291. ISSN 1976-2437. Dostupné z: doi:10.3349/ymj.2014.55.2.283

ZHANG, Xi-Feng, Wei SHEN a Sangiliyandi GURUNATHAN, 2016. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 17(10). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17101603

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

ZHU, X., A. F. RADOVIC-MORENO, J. WU, R. LANGER a J. SHI, 2014. Nanomedicine in the Management of Microbial Infection - Overview and Perspectives. *Nano Today* [online]. 9(4), 478–498. ISSN 1748-0132 (Print) 1748-0132 (Linking). Dostupné z: doi:10.1016/j.nantod.2014.06.003

## 8. PUBLIKACE A PREZENTACE AUTORA

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

### 8.1. Publikace přímo se týkající tématu doktorátu

**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., Židek, 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)

### 8.2. Konferenční příspěvky týkající se tématu doktorátu

**Pavlík, V.**, Sojka, M., Mazúrová, M., Velebný, V. Iodine, chlorhexidine, silver, and octenidine inhibit bacterial and eukaryotic proteases. *Tissue Repair and Regeneration*, New London, NH, USA, 9-14. 6. 2019.

Nešporová, K., **Pavlík, V.**, Císařová, N., Odráška, P., Velebný, V. Immunomodulatory and Cytotoxic Effects of Silver Antiseptics on Human Cells. 5th TERMIS World Congress, Kyoto, Japan, 4.–7. 9. 2018

**Pavlík, V.**, Nešporová, K., Sobotka, L., Pejchal, J., Vágnerová, H., Šafránková, B., Císařová, N., Brůnová, Z., Velebný, V. Silver Bandage Toxicity to Human Skin Cells and Leg Ulcers. *Wound Healing Society Meeting 2018*, Charlotte, NC, USA, 25. – 29. 4. 2018

**Pavlík, V.**, Nešporová, K., Vágnerová, H., Šafránková, B., Brůnová, Z., Velebný, V. Silver released from wound dressings damage skin fibroblasts and keratinocytes and *ex vivo* skin. 47<sup>th</sup> Annual ESDR Meeting, Salzburg, Austria, 27. - 30. 9. 2017.

Nešporová, K., **Pavlík, V.**, Machalová, V., Šafránková, B., Velebný, V. Evaluation of the antiseptics toxicity in porcine skin explants. *EWMA 2017*, 3. - 5. 5. 2017, Amsterdam, Nizozemsko.

**Pavlík, V.**, Sojka, M., Krátká, L., Velebný, V. Inhibitory properties of iodine and octenidine on bacterial proteinases and MMPs. *EWMA 2016*, Brémy, 11. – 13. 5. 2016.



**Pavlík, V.**, Nešporová, K. Toxicita antimikrobiálních látek v léčbě ran. ČSLR XIV. celostátní kongres s mezinárodní účastí, 21.1.2016 - 22.1.2016, Pardubice

Nešporová, K., **Pavlík, V.**, Velebný, V. Toxicita antimikrobiálních krytů ran aneb na co může odpovědět in vitro testování. Rány a defekty 2015. Konference s mezinárodní účastí o hojení chronických ran, kožních defektů a reparaci tkání. 11. a 12. 6. 2015, Třinec.

### 8.3. Ostatní impaktované publikace

Koudelková L, Pataki AC, Tolde O, **Pavlik 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, **Pavlik 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, **Pavlik V**, Nemeč J, Kubickova G, Slavkovsky R, Szuszkiewicz K, Danek P, Rozkot M, Velebny 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., **Pavlík, V.**, Szuszkiewicz, K., Velebný, 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)

#### 8.4. Ostatní příspěvky na konferencích

**Pavlík, V.**, Němec, J., Matonohová, J., Zápalková, Z., Pejchal, J., Kučera, J., Klein, P., Velebný, V. Iodine generator reduces burden in biofilm-infected porcine wounds. ETRS Annual Scientific Meeting 2019 11-13. 9. , 2019, Mnichov, Německo

**Pavlík, V.**, Pejchal, J., Sobotka, L., Velebný, V. Faster wound desloughing, resolution of inflammation and collagen maturation with a novel bandage with octenidine and hyaluronan. EWMA 2019, Göteborg, Švédsko, 5. - 7. 6. 2019.

Nešporová, K., Čechová, M., **Pavlík, V.**, Marešová, M., Velebný, V. Biological effects of oleic acid covalently bound to hyaluronan topically applied to skin. ISSFAL 2018 ,28.-31.5.2018, Las Vegas USA

**Pavlík, V.**, Klein, P., Kučera, J., Sojka, M., Matonohová, J., Bezvodová, A., Arenbergerová, M., Velebný, V. Similarities between experimental biofilm-infected porcine wound and infected human venous leg ulcers. EWMA 2018, 9-11 May, 2018, Krakow, Poland

Čechová, M., **Pavlík, V.**, Machalová, V., Čepa, M., Janoušek, J., Žádníková, P., Nešporová K., Velebný V. Effect of L-carnitine uptake on human skin cells. 47th Annual ESDR Meeting 2017, 27-30. 9. 2017, Salzburg Austria

Svoboda, M., Hlobilová, M., **Pavlík, V.**, Dolečková, I. Expression of tight junction proteins claudin-1,occludin and ZO-2 in the aged skin. 46th ESDR Meeting, 7th-10th 9. 2016, Munich, Germany.

**Pavlík, V.**, Brůnová, Z., Kratká, L., Machalová, V., Nešporová, K., Velebný, V. In vitro removal of senescent fibroblasts by activated monocytes. International Cell Senescence Association Conference, Rehovot, Izrael, 3. – 6. 7. 2016

Machalová, V., **Pavlík, V.**, Arenbergerová, M., Nešporová, K., Velebný, V. NOX4 in senescence and chronic wound healing. International Cell Senescence Association Conference 2016, 3-6. 7. 2016, Rehovot, Israel

Hlobilová, M., **Pavlík, V.**, Nešporová, K. Microarray Analysis of Skin Ageing. Anti-ageing Skin Care Conference, London, June 7–8, 2016.

Huerta-Angeles, G., Brandejsová, M., Kulhánek, J., Vagnerová, H., Šmejkalová, D., **Pavlík, V.**, Nešporová, K., Velebný, V. Preparation, characterization and cytotoxicity studies of a novel bioconjugate hyaluronan and alpha linolenic acid (HA-g-ALA). 10th World Biomaterials Congress, May 17-22, 2016, Montréal Canada

Hlobilová, M., **Pavlík, V.**, Velebný, V. Skin ageing analyzed by gene microarray. 23. IFSCC Conference 2015 in Zürich from 21.–23. September.

Svoboda, M., **Pavlík, V.**, Hlobilová, M., Muthný, T. Analysis of tight junction proteins in human epidermis by confocal microscope. CeCe 2015, Brno, CZ; 21-23.9.2015

Nešporová, K., **Pavlík, V.**, Šmejkalová, D., Velebný, V.. Effects of SPION loaded hyaluronan polymeric micelles on gene expression in normal and cancer cells. ESB 2015, Krakow, Polsko, 30.8.-3.9.2015