

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologicko-biochemických věd

**Antimikrobiální účinnost vybraných antiseptik používaných v léčbě
infikovaných chronických ran**

Bc. Monika Štěpánová

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Štěpánová**
Osobní číslo: **C18498**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Antimikrobiální účinnost vybraných antiseptik používaných v léčbě infikovaných chronických ran**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Přehled literatury, která uvádí antimikrobiální účinnost a obecné mechanismy působení vybraných antiseptik: stříbro, jód, chlór, oktenidin hydrochlorid, chlorhexidin diglukonát a polyhexamethylen biguanid.

Experimentální část:

1. Srovnání antimikrobiální účinnosti výše uvedených antiseptik v komerčně dostupných prostředcích pro léčbu chronických ran na izolovaných patogenech *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Bude sledována kontaktní inhibice na Petriho misce a inhibice růstu bakterií v suspenzi mikrodifu-
zní metodou.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Vojtěch Pavlík**
Contipro a.s.
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění předpisů a směrnicích Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. 5. 2020

Bc. Monika Štěpánová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce paní MUDr. Vladimíře Novákové-Mužákové Ph.D., ale především bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Vojtěchovi Pavlíkovi za ochotu, přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat společnosti Contipro a.s., která mi umožnila přístup do jejich laboratoří. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině, za podporu při celém studiu.

ANOTACE

Práce se zabývá testováním antimikrobiálního účinku nejčastěji používaných antiseptik. V první části je popsán přirozený způsob hojení ran a faktory komplikující tento proces. Jsou zde popsána a charakterizována jednotlivá antiseptika, která se běžně používají při léčbě chronických ran. V druhé části byla testována účinnost antiseptik pomocí kontaktní inhibice, diluční metodou (M07Ed11E_Methods_Dilution_Antimicrob) a stanovením antiseptické citlivosti bakteriálních biofilmů a následně vyhodnocen jejich efekt.

KLÍČOVÁ SLOVA

Chronická rána, mikroorganismus, biofilm, léčba chronické rány, antiseptika, (kontaktní inhibice, diluční metoda, stanovení antiseptické susceptibility bakteriálních biofilmů)

TITLE

Antimicrobial effectiveness of selected antiseptics used in the treatment of chronic wounds

ANNOTATION

The work deals with testing of antimicrobial effect of the most commonly used antiseptics. The first part describes the natural way of wound healing and the factors that complicate this process. Individual antiseptics that are commonly used in the treatment of chronic wounds are described and characterized. In the second part the effectiveness of antiseptics was tested by contact inhibition, dilution method (M07Ed11E_Methods_Dilution_Antimicrob) and determination of the antiseptic sensitivity of bacterial biofilms and then their effect was evaluated.

KEYWORDS

Chronic wound, microorganism, biofilm, treatment of chronic wound, antiseptics, (contact inhibition, dilution method, determination of antiseptic susceptibility of bacterial biofilms)

OBSAH

ANOTACE	6
OBSAH.....	7
PŘEHLED TABULEK.....	10
PŘEHLED OBRÁZKŮ.....	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
1.1 HOJENÍ RAN.....	14
1.1.1 Fáze hojení ran.....	14
1.1.2 Poruchy hojení.....	15
1.1.3 Chronická rána.....	15
1.1.4 Imunitní systém.....	16
1.2 BAKTERIE JAKO KOMPLIKUJÍCÍ FAKTOR HOJENÍ RAN	17
1.2.1 Aerobní a fakultativně anaerobní bakterie.....	18
1.2.2 Anaerobní bakterie.....	18
1.2.3 Biofilm.....	19
1.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ STRATEGIE V LÉČBĚ CHRONICKÝCH RAN	20
1.3.1 Antibiotika	20
1.3.2 Antiseptika.....	22
1.4 POPIS JEDNOTLIVÝCH ANTISEPTIK A JEJICH MECHANISMUS ÚČINKU	22
1.4.1 Stříbrná antiseptika	22
1.4.2 Jód.....	25
1.4.3 Kyslíkové radikály.....	25
1.4.4 Chlornany (Chlór).....	27
1.4.5 Polyhexamethylen biguanid (PHMB).....	28
1.4.6 Chlorhexidin	29

1.4.7	Oktenidin	30
1.4.8	Fenoly	31
1.5	PROBLÉMY A LIMITACE ANTIMIKROBIÁLNÍ LÉČBY RÁNY	32
1.5.1	Bakteriální rezistence na antibiotika	32
1.5.2	Bakteriální rezistence na antiseptika	33
1.5.3	Cytotoxicita antiseptik	34
2	PRAKTICKÁ ČÁST MATERIÁLY A METODY	35
2.1	LABORATORNÍ POMŮCKY	35
2.2	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	36
2.3	SOFTWARE	36
2.4	KULTIVAČNÍ MÉDIA, ROZPOUŠTĚDLA A FLUORESCENČNÍ BARVIVA	37
2.4.1	Mueller-Hinton Broth (MHB), (Oxoid Limited, Velká Británie)	37
2.4.2	Mueller-Hinton Agar (MHA), (Oxoid Limited, Velká Británie)	37
2.4.3	Tryptone soya agar (TSA), (Oxoid Limited, Velká Británie)	38
2.4.4	Dimethyl Sulfoxide (DMSO), (Hydri Max, Sigma-Aldrich Science, Německo)	38
2.4.5	Zelené fluorescenční barvivo SYTO	38
2.4.6	Červené fluorescenční barvivo propidium jodid (PI)	38
2.5	BAKTERIÁLNÍ KMENY	40
2.6	TESTOVANÁ ANTISEPTIKA	41
2.7	METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍHO ÚČINKU ANTISEPTIK	43
2.7.1	Kontaktní inhibice	43
2.7.2	Diluční metoda (M07Ed11E_Methods_Dilution_Antimicrob)	44
2.7.3	Stanovení antiseptické citlivosti bakteriálních biofilmů	46
3	VÝSLEDKY	50
4	DISKUSE	57
5	ZÁVĚR	64

6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65
6.1	LITERÁRNÍ ZDROJE	65
6.2	INTERNETOVÉ ZDROJE	72

PŘEHLED TABULEK

Tabulka č. 1	Příklad uspořádání mikrotitrační destičky MIC
Tabulka č. 2	Příklad uspořádání mikrotitrační destičky MBEC
Tabulka č. 3	Přehled MIC a MBEC testovaných antiseptik
Tabulka č. 4	Přehled MIC a MBEC testovaných antiseptik - % zastoupení účinné látky
Tabulka č. 5	Velikost inhibičních zón testovaných antiseptik v mm měřené metodou kontaktní inhibice.

PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1	Chemická struktura chloraminu T, Zdroj: Přejato z (Ferreira et al. 2017)
Obrázek č. 2	Strukturní vzorec pro PHMB, Zdroj: Přejato z (Přjeld a Lingaas 2016)
Obrázek č. 3	Strukturní vzorec pro chlorhexidin, Zdroj: Přejato z (Přjeld a Lingaas 2016)
Obrázek č. 4	Strukturní vzorec Triclosanu, Zdroj: Přejato z (Weatherly a Gosse 2017)
Obrázek č. 5	Nákres dvojkového ředení v mikrotitrační destičce, Zdroj: (vlastní)
Obrázek č. 6	Vyhodnocení MIC, Zdroj: (vlastní)
Obrázek č. 7	Velikost inhibiční zóny antiseptik proti <i>S.aureus</i> na půdě MHB, metoda kontaktní inhibice, Zdroj: (vlastní)
Obrázek č. 8	Velikost inhibiční zóny antiseptik proti <i>P. aeruginosa</i> na půdě MHB, metoda kontaktní inhibice, Zdroj: (vlastní)
Obrázek č. 9	Kontrolní biofilm pod fluorescenčním mikroskopem., Zdroj: (vlastní)
Obrázek č. 10	Chlornan sodný 0,03625 % NaOCl pod fluorescenčním mikroskopem., Zdroj: (vlastní)

SEZNAM ZKRATEK

CAT	Chloramin T
CBD	zařízení pro pěstování biofilmu typu Calgary
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	kolonie tvořící jednotky (colony forming units)
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
<i>In vitro</i>	za laboratorních podmínek
MBEC	minimální biofilmová eradikační koncentrace
MGO	methylglyoxal
MHA	Mueller-Hintonův agar
MHB	Mueller-Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PHMB	polyhexamethylen biguanid
PI	propidium jodid
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SYTO	červené fluorescenční barvivo
TCS	Triclosan
TSA	Trypton-sojový agar (Tryptone soya agar)
TSB	Trypton-sojový bujón (Tryptone soya broth)

ÚVOD

Chronické rány patří mezi nejzávažnější poruchy kůže, které postihují miliony lidí po celém světě. Chronické rány mohou vznikat přechodem akutní rány do chronicity v důsledku infekce nebo přidruženého onemocnění, venózní nebo arteriální nedostatečnosti, imobilizací pacienta nebo *diabetes mellitus*. Doba hojení je velice zdlouhavá a náročná, jelikož může být zasaženo kromě kůže i podkoží, šlachy, vazy, nervy a kosti.

Hojení chronických ran je zpomaleno kolonizací celé řady mikroorganismů. Bakterie se do rány dostávají jednak z vnějšího prostředí, okolní kůže i z vnitřního prostředí pacienta. Mezi nejčastější patogeny chronických ran patří *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, které se také podílejí na tvorbě biofilmu. Biofilm bakteriím poskytuje ochranný obal, který je chrání před účinky antimikrobiálních látek.

V současné době je péči o chronické rány věnována velká pozornost. Cílem léčby je vytvořit optimální prostředí v chronické ráně. Dalším důležitým krokem je odstranění nekrotické tkáně z rány a volba vhodných antimikrobiálních látek buď ve formě bandáže, gelu či roztoku. Moderní krycí antibakteriální prostředky mají různé materiálové složení i účinek, proto je důležité je používat s ohledem na charakter rány a hladinu exsudátu. Správný výběr antibakteriálního krytí a správné zhodnocení stavu rány vede k urychlení hojení rány a snížení počtu převazů. K léčbě chronických ran se používají nejen antibiotika, ale vzhledem k rostoucí bakteriální rezistenci, se především k léčbě používají antiseptika.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 HOJENÍ RAN

Hojení ran zahrnuje komplexní interakci mezi povrchovými a dermálními buňkami, mezibuněčnou hmotou, řízenou angiogenezí a proteiny pocházejícími z plazmy - vše koordinováno řadou cytokinů a růstových faktorů. Tento dynamický proces je klasicky, ale poněkud uměle, rozdělen do tří překrývajících se fází - zánět, proliferace a remodelace (Harding, Morris, a Patel 2002).

1.1.1 Fáze hojení ran

1.1.1.1 *Fáze zánětlivá*

Cílem zánětlivé reakce je ránu vyčistit a vytvořit předpoklady pro následující fázi proliferační. Velkou úlohu sehrávají v této fázi trombocyty, které vylučují významné cytokiny včetně růstových faktorů, jako je např. PDGF (destičkový růstový faktor), který se uplatňuje i v dalších fázích hojení, IGF-1 (inzulin-like růstový faktor-1), EGF (epidermální růstový faktor), TGF-beta (transformační růstový faktor), TGF – alfa, VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a další látky podporující zánět – histamin, serotonin, bradykinin, prostaglandiny, tromboxan aj. Dominantními buňkami v iniciální fázi zánětu jsou neutrofilní granulocyty, které uvolňují mediátory zánětu – cytokiny jako je TNF-alfa a IL-1, fagocytují bakterie a vylučují proteázy, které se podílejí na odstranění devitalizované tkáně. Zásadní význam pro hojení rány mají v této fázi také makrofágy, které jsou chemotakticky přitahovány do místa rány. Makrofágy uvolňují proteolytické enzymy, které rozvolňují poškozenou tkáň, pokračují ve fagocytární činnosti, secernují růstové faktory (b-FGF, EGF, TGF-alfa a TGF-beta) a další cytokiny, podporující zánětlivý proces (IL-1a a IL-1b, IL-6 a TNF –alfa) (Pospíšilová 2010).

1.1.1.2 *Fáze proliferační*

Fibroblasty jsou klíčové buňky podílející se na produkci mezibuněčné hmoty. Kromě produkce kolagenu produkují tenascin, fibronectin a proteoglykany, jako je kyselina hyaluronová. Produkce mezibuněčné hmoty je klinicky vnímána jako tvorba granulační tkáně. Zatímco je syntetizována nová matrice, existující matrice v a kolem okraje rány je degradována několika enzymatickými systémy, jako jsou matricové metaloproteinázy a aktivátory plasminogenu. Účinek těchto enzymů je regulován tkáňovými inhibitory, které brání nadměrné degradaci matrice (Harding, Morris, a Patel 2002).

1.1.1.3 Fáze remodelační

V remodelační fázi fibroblasty proliferují uvnitř rány a syntetizují mezibuněčnou hmotu vytvářející granulační tkáň perfundovanou nově vytvořenými krevními cévami. Současně je prozatímní matrice tvořená hlavně kolagenem III, fibrinem, fibronektinem a kyselinou hyaluronovou postupně je nahrazena mezibuněčnou hmotou obsahujícím hlavně kolagen I. Dále dochází ke kontrakci rány a remodelaci matrice. Dochází k reorganizaci mezibuněčné hmoty a zároveň k apoptóze fibroblastických buněk, což vede k tvorbě jizvy, jejíž pevnost v tahu je srovnatelná s nezraněnou kůží (Demidova-Rice, Hamblin, a Herman 2012).

1.1.2 Poruchy hojení

Léčení může narušit mnoho faktorů. Mezi místní faktory patří přítomnost cizích těles, macerace tkání, ischemie a infekce. Mohou být přítomny důležité systémové faktory, jako je pokročilý věk, podvýživa, *diabetes*, onemocnění ledvin, také žilní a cévní nedostatečnost a nádorové onemocnění (Harding, Morris, a Patel 2002).

Kromě lokálních a systémových faktorů, které narušují hojení, tak i snížení růstových faktorů tkáně, nerovnováha mezi proteolytickými enzymy a jejich inhibitory a přítomnost senescentních buněk narušuje proces hojení ran (Harding, Morris, a Patel 2002).

Některé společné rysy chronických ran zahrnují prodlouženou nebo nadměrnou zánětlivou fázi, přetrvávající infekci, tvorbu mikrobiálních biofilmů rezistentních na léčivo a neschopnost dermálních nebo epidermálních buněk reagovat na reparativní podněty. Souhrnně tyto patofyziologické jevy mají za následek selhání hojení chronických ran (Demidova-Rice, Hamblin, a Herman 2012).

1.1.3 Chronická rána

Chronická rána je obecně definována jako porušení kontinuity kožního povrchu a integrity organismu, porušení anatomické struktury a s ní související funkce kůže, způsobené různými příčinami. Chronické rány vznikají například přechodem akutní rány do chronicity v důsledku infekce nebo přidruženého onemocnění, mikrotraumatizací nebo prohloubením nekrózy kůže na podkladě základního onemocnění (Stryja 2011).

Jde o defekty se ztrátou kožní tkáně často zasahující hluboko do podkožních tkání. Poškození je obvykle rozšířeno i na podkožní tkáň, šlachy, svaly, nervy a kosti (Velnar, Bailey, a Smrkoľj 2009). Doba hojení takových ran je obvykle delší nežli 6 týdnů, neboť reparace tkáně v některé z fází hojení stagnuje (Pospíšilová, 2010).

Pacienti s chronickými ranami mají často vysokou hladinu cukru v krvi a obezitu. S rostoucím věkem se snižuje pevnost a elasticita kůže, také se snižuje průtok krve do končetin v důsledku sedavého životního stylu a kouření. Negativní dopad na hojení ran má i psychologický stres (Kanji a Das, 2017).

Nejčastějšími typy chronických ran jsou bércové vředy, syndrom diabetické nohy a proleženiny. Společným rysem těchto ran je prodloužená nebo nadměrná zánětlivá fáze, přetrvávající infekce, tvorba mikrobiálního biofilmu a neschopnost dermálních a epidermálních buněk reagovat na reparativní podněty (Demidova-Rice, Hamblin, a Herman 2012).

1.1.4 Imunitní systém

Imunitní systém se skládá z rozmanité skupiny specializovaných buněk a proteinů, které jsou aktivní v celém těle. Buňky imunitního systému jsou umístěny v určitých orgánech a tkáních, včetně sleziny, lymfatických uzlin, střevní *laminy propria* (tenká vrstva pojivové tkáně) a kůže. Společným účelem všech těchto složek je ochrana jednotlivce před invazí cizích organismů, virů a toxinů (Percival a Cutting 2010).

Mezi hlavní složky imunitního systému patří fagocyty, které pohlcují napadající mikroby prostřednictvím definovaného procesu fagocytózy, dále pak makrofágy, neutrofilní leukocyty, NK buňky, které zabíjejí buňky infikované virem, a žírné buňky (Percival a Cutting 2010).

Imunitní systém je klíčovým hráčem v celém procesu hojení ran a aktivně se podílí na obnovování homeostázy po poškození tkáně pomocí více mechanismů. Například imunitní odpověď na poškození tkáně může mobilizovat tkáňové rezidentní kmenové / progenitorové buňky, podporovat diferenciaci buněk, ukládání extracelulární matrice (ECM) a stimulovat sekreci růstového faktoru pro podporu neoangiogeneze (Larouche et al. 2018).

Zatímco kaskáda hojení ran je dobře koordinována v akutním hojení ran, chronické rány neprogredují za zánětlivou fázi (Larouche et al. 2018).

Většina chronických ran je zastavena v chronickém zánětlivém stavu. Mikroby jsou rozhodující složkou při zesilování a udržování zánětu v prostředí chronických ran. Bakterie a jejich složky mohou přímo stimulovat příliv neutrofilů a makrofágů. Leukocyty mohou být mimořádně škodlivé pro prostředí rány. Životaneschopná tkáň propaguje cyklus bakteriální kolonizace / infekce s následnou infiltrací leukocytů. Protože invazivní neutrofilů a makrofágů jsou silným zdrojem proteáz, je mikroprostředí chronické rány vysoce proteolytické. Oxidační stres zesiluje chronický zánět v nehojících se ranách (Grice a Segre

2012). Leukocyty a přebytek neutrofilů jsou hlavním zdrojem reaktivních druhů kyslíku (ROS; tj. např. superoxidový anion, hydroxylové radikály, peroxid vodíku, singletový kyslík), což činí mikroprostředí rány prooxidačním. ROS mohou přímo poškodit strukturální proteiny extracelulární matrice, změnit signální dráhy a transkripční regulaci prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Také vedou k předčasnému stárnutí buněk (Grice a Segre 2012; Larouche et al. 2018). Zatímco leukocyty jsou v prostředí chronických ran hojné, zdá se, že jejich fagocytóza, chemotaxe a baktericidní aktivita je snížena. Výsledkem je, že rána je ještě citlivější na zvýšenou bakteriální zátěž a infekci (Grice a Segre 2012). Pokud makrofágy nepodléhají vhodné fenotypové přeměně, vede to ke snížení klíčových růstových faktorů, které jsou nezbytné pro postup do fáze proliferace. Kromě sekrece cytokinů a růstových faktorů pro zprostředkování hojení ran hrají makrofágy rozhodující roli ve fagocytování apoptotických buněk a dalších zbytků v ložisku rány. U chronických ran makrofágy vykazují sníženou fagocytární kapacitu, což zhoršuje apoptotické buněčné zatížení. Neúspěšná efferocytóza navíc vede k vyššímu poměru prozánětlivých cytokinů (Larouche et al. 2018).

Myeloidní buňky skryté na kůži přispívají k homeostáze kůže vylučováním růstových faktorů potřebných pro přežití keratinocytů, fibroblastů a endoteliálních buněk. Kromě toho udržují optimální tkáňovou funkci fagocytováním buněčného dendritu a apoptotických buněk, podporují integritu vaskulatury a toleranci k antigenům, jako jsou tkáň organismu.

V zánětlivých podmínkách myeloidní buňky okamžitě reagují a produkují prozánětlivé mediátory, které řídí aktivaci buněk v bezprostřední blízkosti a infiltraci postiženého místa periferními imunitními buňkami. Kožní myeloidní buňky také slouží jako spojení mezi vrozeným a adaptivním imunitním systémem (Nguyen a Soulika 2019).

1.2 BAKTERIE JAKO KOMPLIKUJÍCÍ FAKTOR HOJENÍ RAN

Žijeme v převážně mikrobiálním světě, kdy lidské tělo obsahuje odhadovaných 10^{14} mikrobiálních buněk. Přestože tyto mikroby hrají důležitou roli při udržování zdraví, mají vzhledem k jejich schopnosti přizpůsobit se podmínkám (oportunitě), příležitost způsobit nebo prohloubit onemocnění. Většina kožních ran je kolonizována (některé silně) jak aerobními, tak anaerobními mikroorganismy, které žijí na slizničních površích, jako jsou střeva nebo ústní dutina. Počet mikrobiálních druhů identifikovaných při infekcích kožních a měkkých tkání stále roste, ale nemělo by se ignorovat tvrzení, že bakteriální inokulum může i stimulovat hojení (Percival a Cutting 2010).

Studie naznačují, že většina chronických ran je kolonizována bakteriemi, jako jsou stafylokoky, streptokoky, enterokoky a anaerobní bakterie (Percival a Cutting 2010; Wolcott et al. 2016).

1.2.1 Aerobní a fakultativně anaerobní bakterie

Mikroorganismy se do ran dostávají z vnějšího prostředí, okolní kůže a vnitřního prostředí pacienta. Nejprve dochází ke kolonizaci rány bakteriemi, které při nedostatečné imunitní odpovědi přechází v kritickou kolonizaci, kdy je zvýšená bakteriální zátěž a rána v této fázi může vstoupit do chronického zánětlivého stavu. Známkou kritické kolonizace je atrofie nebo zhoršení granulace tkáně, změna barvy granulační tkáně na tmavě červenou nebo šedou a zvýšená tvorba tkáňového moku (exsudace). Přejít do infekce nastává při proliferaci bakterií, která překonává hostitelskou imunitní odpověď (Siddiqui a Bernstein 2010).

1.2.1.1 *Staphylococcus*

Staphylococcus je nejčastějším bakteriálním rodem přítomným v polymikrobiálních biofilmových komunitách chronické rány. Dominantními rody v chronických ranách jsou *S. aureus* a *S. epidermidis* (Wolcott et al. 2016).

S. aureus je považován za nejproblematičtější bakterii při chirurgických infekcích a u popálenin. Byl také identifikován pomocí selektivních kultivovatelných technik, jako nejvíce převládající bakterie vyskytující se v chronických ranách (Percival a Cutting 2010).

1.2.1.2 *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* patří společně s rodem *Staphylococcus* k nejčastěji se vyskytujícím bakteriím v chronických ranách. Dominantně se vyskytuje druh *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* je nejčastějším organismem produkujícím jednodruhový biofilm. Protože *P. aeruginosa* obvykle kolonizuje chronické rány, je rezistentní vůči mnoha rozšířeným spektrům beta laktamáz a je někdy spojován se špatnými prognózami pro hojení ran (Wolcott et al. 2016).

1.2.2 Anaerobní bakterie

Navzdory skutečnosti, že chronické kožní rány jsou vystaveny relativně vysokým úrovním oxygenace, bylo ve vzorcích ran zjištěno velké množství anaerobních bakterií. Ukazuje se, že anaerobní bakterie tvoří významnou část mikrobiomu chronické rány. Detekce těchto mikroorganismů je velmi obtížná. Detekce je možná pomocí molekulárních metod, jako jsou DNA sekvenční analýzy (Wolcott et al. 2016).

I když bakterie jsou běžnou součástí kožní mikroflóry a tím i ran, bylo prokázáno mnoha studiemi, že přítomnost více než 10^5 CFU kultivovatelných bakterií na gram tkáně v otevřených ranách, je považováno za klinickou infekci. Úspěšné uzdravení akutních ran závisí na udržování planktonické bakteriální zátěže pod hodnotou 10^5 CFU/g tkáně. Tato zásada však vždy nesouvisí s úspěšným hojením ran. V mnoha chronických ranách je přítomnost kultivovatelných bakterií nižší než 10^5 CFU/g tkáně, a přesto se nehojí (Phillips a kol. 2008; Percival a Cutting 2010; Han a Ceilley 2017).

Klíčovými faktory rozhodujícími, zda se chronická rána zhojí nebo ne, je polymikrobiální rozmanitost (diverzita) kultivovatelných mikroorganismů nebo přítomnost vysoce virulentních druhů bakterií, např. β -hemolytických streptokoků a vznik biofilmu (Phillips a kol. 2008).

1.2.3 Biofilm

Biofilm je soudržný shluk bakteriálních buněk vložených do biopolymerní matrice, která je tvořena biopolymery, obsahuje mnoho proteinů, polysacharidů, glykoproteinů, glykolipidů a množství extracelulární DNA (Flemming, Neu, a Wozniak 2007). Ve srovnání s planktonickými buňkami, vykazuje biofilm zvýšenou toleranci k antimikrobiálním látkám a odolává antimikrobiálním vlastnostem hostitelské obrany (Gottrup et al. 2013). Klinické studie prokázaly přítomnost biofilmu u 78 % chronických ran (Malone et al. 2017).

Biofilmy jsou komplexní struktury polysacharidové matrice vylučované bakteriemi ve formě slizké lepidlové látky, která k povrchům materiálu, přilne zejména když je vystavena určitému množství vody. V posledním desetiletí bylo provedeno mnoho studií o biofilmech, které prokázaly jejich souvislost s infekcemi a kontaminací. Běžné metody usmrcování bakterií pomocí antibiotik a dezinfekce jsou u bakterií vytvářejících biofilm často neúspěšné (Hammond, Donkor, a Brown 2014). Společnosti biofilmu vykazují různé vlastnosti, které je činí obtížně léčitelnými, včetně pomalé penetrace antimikrobiálních látek, zvýšení regulace horizontálního přenosu genů v reakci na stres, anoxických jader a tvorby perzistujících buněk (Wolcott et al. 2016). Celosvětově se odhaduje, že biofilmy jsou spojovány s 65 % nozokomiálních infekcí a přispívají k vysoké úmrtnosti a 2-14 % všech komplikací chirurgických ran. Mezi některé bakteriální organismy, o nichž je známo, že některé jejich izoláty tvoří biofilmy, patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Clostridium difficile* (Hammond, Donkor, a Brown 2014).

1.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ STRATEGIE V LÉČBĚ CHRONICKÝCH RAN

Péče o rány nabývá na důležitosti vzhledem k vzestupu chronických ran a nemocnosti s nimi spojené (Han a Ceilley 2017).

Kožní rána může mít různou povahu a liší se od chirurgických až po náhodné tržné rány, popáleniny, tlakové, diabetické nebo venózní vředy. V současné lékařské praxi vyžaduje chronické kožní hojení ran často velkou, dlouhodobou lékařskou péči a vyžaduje značné množství nákladů (Kanji a Das 2017).

Cílem léčby je vytvoření optimálního prostředí v chronické ráně, eliminace všech nežádoucích faktorů bránících hojení a obnovení schopnosti vytvářet vaskularizovanou granulační tkáň pro následnou epitelizaci. Důležitým krokem je odstranění nekrotické tkáně, která brání hojení a vytváří vhodné prostředí pro růst mikroorganismů. K eliminaci nežádoucích bakterií jsou používány moderní antimikrobiální krycí prostředky z různých materiálů, které obsahují látky bránící růstu a množení mikroorganismů (Han a Ceilley 2017; Pospíšilová 2010).

Antimikrobiální látky používané v péči o rány se mohou obecně dělit na antibiotika a antiseptika. Zvláštním typem antimikrobiální látky jsou desinfekční prostředky. Zatímco antibiotika jsou enterálně nebo parenterálně (obvykle nitrožilně) podávané pacientům, a mohou být transportována krví nebo lymfatickým systémem do dalších částí těla, antiseptika jsou omezena na lokální použití (Gottrup et al. 2013). Desinfekční prostředky jsou látky, které mohou vymýtit všechny organismy, včetně spór. Pro jejich toxicitu je nelze aplikovat na živou tkáň, ale pouze na pevné povrchy (Punjataewakupt, Napavichayanun, a Aramwit 2019). V ideálním případě antimikrobiální přípravky určeny k péči o rány by měly mít široké spektrum antimikrobiální aktivity, měly by být rychle působící a stabilní, bez selekce rezistentních kmenů. Dále, tato činidla by neměla být cytotoxická pro hostitelskou tkáň, vyvolat nepříznivé účinky, mít mutagenitu, být karcinogenní nebo prodlužovat dobu hojení ran (Gottrup et al. 2013).

1.3.1 Antibiotika

Antibiotika jsou chemikálie produkované buď přirozeně (mikroorganismem) nebo synteticky, které ve zředěném roztoku inhibují nebo ničí jiné mikroorganismy. Obvykle

působí na jeden konkrétní buněčný cíl, mají užší spektrum aktivity, jsou relativně netoxické a jsou náchylnější ke ztrátě účinnosti vůči bakteriální rezistenci (Lipsky a Hoey 2009).

Již v historii byla antibiotika určená k léčbě chronických ran podávána systematicky či topicky. Antibiotická terapie je důležitou složkou mnohostranné cílené strategie, která se zabývá léčbou ran a mikrobiální patogenitou. Terapeutická účinnost při léčbě infikovaných, chronických ran je závislá na koncentraci antimikrobiální látky v místě infekce, přítomnosti ischemie nebo nekrózy tkání, která poškozuje léčivo, na mikrobiální flóře chronické rány a na vnitřní i vnější antimikrobiální rezistenci (Leaper, Assadian, a Edmiston 2015).

Systémová antibiotika jsou použita při léčbě sepse, osteomyelitidy, lymfangitidy, tvorby abscesu a dalších známkách invazivní tkáňové infekce (Hernandez 2006). Při léčbě chronických ran jsou antibiotika kombinována pro zajištění optimálního léčebného efektu, např. rozšíření antibakteriálního spektra, oddálení vzniku rezistence, dosažení synergického účinku (Lovečková 2012). Mezi systémová antibiotika používaná při léčbě chronických ran patří např. aminoglykosidy, cefalosporiny, karbapenemy, levofloxacin, klindamycin, protipseudomonádové peniciliny a vankomycin (Hernandez 2006).

Lokální antibiotika jsou aplikována přímo na spodinu rány ve formě roztoků, mastí, případně prášku. Jejich účinek na bakterie je druhově specifický a je zacílen na bakteriální stěnu nebo plazmatickou membránu (Stryja 2013), brání reprodukci a opravě genetického materiálu (DNA) („Levaquin (levofloxacin) Antibiotic Side Effects, Uses & Dosage" b.r.). Lokální antibiotika vykazují vysokou koncentraci v místě aplikace, vyhýbají se systémovým alergickým reakcím. Antibiotika používaná lokálně jsou obecně omezena na ty, které jsou toxické, když jsou podávány systémově (Bowler, Duerden, a Armstrong 2001). Nevýhodou lokálních antibiotik je, že mohou vyvolat alergickou reakci či změnu kožní mikroflóry v okolí rány (Lipsky a Hoey 2009). Mohou také nežádoucím způsobem narušit bakteriální rovnováhu a tedy vést ke zmnožení patogenních kmenů (Stryja 2013). Lokální léčba antibiotiky by měla být určena ke snížení mikrobiální zátěže v ráně, nikoliv však k léčbě infekce (Leaper, Assadian, a Edmiston 2015). Mezi lokální antibiotika, která lze využít k léčbě chronických ran, patří např. bacitracin, neomycin, polymyxin B, kdy tato tři antibiotika jsou součástí masti běžně používané na chronické rány, dále pak gentamicin, kyselina fusidová, metronidazol, mupirocin a retapamulin (Lipsky a Hoey 2009).

Rostoucí prevalence bakteriálních infekcí rezistentních na antibiotika, pozorovaná v klinické praxi, vyplývá z použití antibiotik jak v humánní, tak ve veterinární

medicině. V humánní medicíně je hlavním problémem přispívajícím ke vzniku rezistentních bakterií zneužívání a nadužívání antibiotik (Barriere 2015).

1.3.2 Antiseptika

Antiseptika jsou látky, které lze použít na neporušenou kůži a některé otevřené rány k ničení nebo inhibici mikroorganismů, bez ohledu na to, zda jsou ve formě obvazu, roztoku, gelu nebo léku (Gottrup et al. 2013). Často mají mnohočetné mikrobiální cíle, široké antimikrobiální spektrum a reziduální antiinfekční aktivitu, ale často jsou toxické pro hostitelské tkáně (např. fibroblasty, keratinocyty a případně leukocyty) (Lipsky a Hoey 2009). Protože jsou antiseptika toxická pro hostitelské buňky, je jejich použití omezeno na lokální aplikaci na rány a neporušenou kůži. Antiseptika se používají především na rány traumatické nebo chronické povahy, které jsou silně kontaminovány řadou mikroorganismů a nedochází k hojení, s klinickými příznaky infekce nebo bez nich (Bowler, Duerden, a Armstrong 2001).

1.4 POPIS JEDNOTLIVÝCH ANTISEPTIK A JEJICH MECHANISMUS ÚČINKU

Antiseptikum má nespecifický účinek s antimikrobiálními vlastnostmi, které ničí nebo inhibují růst mikroorganismů v živé tkáni nebo na ní. Lze je použít na kůži, rány a sliznice (Gottrup et al. 2013; McDonnell a Russell 1999).

Výhodou antiseptik je cílené dodání vysoké koncentrace antimikrobiálních látek na místo infekce, menší potenciál pro systémové vedlejší účinky a toxicitu. Další výhodou je lokální aplikace látek, které nemohou být systémově použity. Může být prováděna pravidelná kontrola místa infekce a je zde vyšší pravděpodobnost dodržování léčby především u dětí. Nevýhodou těchto látek je možnost lokálních alergií. Dále pak široké a neomezené používání může vést ke vzniku rezistence zejména křížové rezistence s antibiotiky (viz kapitola 1.5.1) (Williamson, Carter, a Howden 2017).

Antiseptika můžeme podle chemické struktury dělit například na alkoholy, aldehydy, kyseliny, halogenidy a fenoly (Tousignant a Giard 1993). Podle mechanismu účinku dělíme antiseptika na oxidační látky, denaturační látky, membránově aktivní látky a kondenzující látky.

1.4.1 Stříbrná antiseptika

Iontové stříbro (Ag^+), což je oxidovaný aktivní stav stříbra, získalo nový zájem a výzkum pro použití jako antimikrobiální činidlo v obvazech na rány díky širokému spektru

antibakteriálního působení. Stříbro je účinné proti aerobním, anaerobním, gramnegativním i grampozitivním bakteriím (Barnea, Weiss, a Gur 2010; Powers, Morton, a Phillips 2013). Ag^+ se váže na DNA, RNA a různé proteiny, což vede k buněčné smrti prostřednictvím mnoha mechanismů, jako je denaturace proteinů a nukleových kyselin, zvýšená propustnost membrány a narušení dýchacího řetězce (Khansa et al. 2019). Již nízké koncentrace stříbra narušují protonovou pumpu na bakteriální membráně, dochází k úniku protonů a následně buněčné smrti (Ousey a McIntosh 2010). Jednou z nevýhod obvazů na bázi stříbra jsou potenciální cytotoxické účinky iontů stříbra na nově rostoucí keratinocyty, které mohou inhibovat epitelizaci rány a tím zpomalit hojení rány (Selvarajah et al. 2019). Přípravky obsahující stříbro se používají jako antiseptika nebo k uchování látek (konzervaci) (McDonnell a Russell 1999).

1.4.1.1 Acticoat

Acticoat je syntetický antimikrobiální nanokrystalický stříbrný obvaz, který je k dispozici posledních 20 let k léčbě popáleninových ran i jiných akutních a chronických ran. Nanokrystalické částice stříbra uvnitř obvazu jsou dodávány do rány po dobu několika dnů, což přináší antimikrobiální efekt, a obvaz může být ponechán po dobu až 7 dnů (Selvarajah et al. 2019).

Nanokrystalické stříbrné obvazy, v našem případě *Acticoat*, které se v současné době používají, obsahují dvě vrstvy. Absorpční vnitřní jádro z polyethylenové sítě o vysoké hustotě, sendvičové vrstvy gázy z hedvábí a polyesteru, vložené mezi vnější vrstvy potažené nanokrystalickou (<20 nm), nenabitou formou stříbra (Ag^0). Vnitřní vrstva pomáhá udržovat vlhké prostředí pro hojení ran. Protože nenabitě stříbro je méně reaktivní s negativně nabitými částicemi v ráně, je deaktivováno mnohem pomaleji a poskytuje počáteční velkou dávku stříbra následovanou trvalým uvolňováním stříbra do rány („ACTICOAT a ACTICOAT 7 Stříbrné obvazy Smith + Nephew - Corporate" b.r.; Murphy a Evans 2012)

1.4.1.2 Aquacel Ag +

Aquacel Ag+ je antimikrobiální krytí obsahující 1-2 % iontového stříbra. Krytí je tvořeno vlákny netkané plsti ze sodných – karboxymethylcelulósových vláken. Využívá technologii *Hydrofiber*, což je měkký absorpční materiál, který se při kontaktu se zánětlivým výpotkem mění na gel. *Aquacel Ag+* absorbuje vlhkost za vzniku gelu, vázáním sodných iontů a uvolňováním stříbrných iontů (Castellano et al. 2007; „Věda za technologií Hydrofiber" b.r.).

1.4.1.3 KerraContact Ag

KerraContact Ag je stříbrné antimikrobiální krytí, využívající technologie *Ag Oxysalts*. *Ag Oxysalts* je pokročilá technologie stříbra, která využívá stříbro ve svém nejreaktivnějším (nejaktivnějším) stavu (Ag^{3+}) a rychle zabíjí bakterie a narušuje biofilmy. Krytí je tvořeno ze tří vrstev dvě nepřilnavé polyethylenové vrstvy a polyesterové jádro, všechny vrstvy obsahují aktivní stříbro. *Ag Oxysalts* se váže a narušuje buněčnou stěnou, což způsobuje její prasknutí. Narušuje mitochondriální funkce a zastavuje replikaci mikrobiálních buněk („Ag Oxysalts Made Easy - Rány UK" b.r.; „KerraContact Ag a silver wound contact dressing | Crawford Healthcare" b.r.).

1.4.1.4 Mepilex Ag

Mepilex Ag je antimikrobiální absorpční měkký silikonový pěnový obvaz, který je navržen tak, aby absorboval výpotky a udržoval optimální prostředí rány. Skládá se z měkkého silikonu Safetac, tj. patentovaná technologie měkkého silikonového lepidla, což je kontaktní vrstva rány; absorpční polyuretanová pěnová vložka obsahující sloučeninu stříbra (síran stříbrný) a aktivní uhlík; a vodotěsný film propustný pro páry. V přítomnosti tekutiny (např. exsudátu rány) jsou stříbrné ionty uvolňovány z *Mepilex Ag* k inaktivaci široké škály patogenů souvisejících s ránou (Barrett 2009).

1.4.1.5 Silvercel

Silvercel je antimikrobiální krytí, které je tvořené netkanou plstí složenou z alginátu vápenatých karboxymethylcelulózových vláken. Karboxymethylcelulózová vlákna jsou smíchána s kovovým stříbrem potaženým nylonovým vláknem (Castellano et al. 2007). Alginátové obvazy vyrobené z mořských řas, absorbují zánětlivý výpotek a pomáhají zastavit krvácení. Absorbují zánětlivý výpotek (exsudát) pryč z rány a současně udržují ideální vlhké prostředí pro hojení ran („Alginates" b.r.).

1.4.1.6 Suprasorb A + Ag

Suprasorb A + Ag je antimikrobiální kalciumalginátové krytí, které snižuje bakteriální zátěž přímo v lůžku rány. Krytí má vysokou absorpční kapacitu exsudátu, což celkově podporuje hojení ran. Při kontaktu s exudátem tvoří *Suprasorb A + Ag* gel. Bakterie a zárodky jsou absorbovány v tomto gelu, který kromě vlhkého klimatu rány také vede k očištění rány („Suprasorb A + Ag" b.r.)

1.4.2 Jód

Přípravky s jódem mají široké spektrum účinku proti bakteriím, bakteriálním sporám, houbám, prvokům a virům (McDonnell a Russell 1999). Jód denaturuje bílkoviny, inaktivuje enzymy, fosfolipidy a membránové struktury bakteriálních buněk (Ousey a McIntosh 2010). Jód způsobuje oxidaci thiolových skupin, váže se na DNA a způsobuje oxidaci mastných kyselin (Cooper a Kirketerp-Møller 2018). Přípravky s jódem jsou používány jako dezinfekce, antiseptika a k čištění (McDonnell a Russell 1999).

1.4.2.1 *Betadine*

Povidon-jod (*Betadine*) je relativně stabilní chemický komplex polyvinylpyrrolidonového polymeru a elementárního jódu. Elementární jod (I_2) je již dlouho znám jako vysoce účinný mikrobicidní prostředek, který *in vitro* rychle zabíjí bakterie, viry, plísňe a také některé prvoky. Volný jod uplatňuje svůj rychlý baktericidní účinek, zatímco polymer působí jako zásobárna jodu. Po kontaktu s kůží nebo sliznicemi je stále více a více jodu vypouštěno z polymeru. Volný jod reaguje s oxidovatelnými -SH a -OH skupinami na aminokyselinách enzymů a strukturních proteinů mikroorganismů, čímž jsou tyto enzymy a proteiny inaktivovány a zničeny. Působením ztrácí jod svou barvu, a proto intenzitu hnědé barvy je možno považovat za indikátor účinnosti. Povidon-jod je účinný proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, houbám a virům (Trott 2012; Ip 2011; „Egis“ b.r.).

1.4.2.2 *Hyiodine*

Hyiodine je antimikrobiální gel určený především na hluboké, rozpadlé a hůře přístupné rány. *Hyiodine* je komplex biotechnologicky vyrobené kyseliny hyaluronové (totožné s lidskou hyaluronovou kyselinou) a jódu. Jako součást lokální terapie má *Hyiodine* unikátní antiadhezivní účinky, současně zabraňuje maceraci okolní kůže a zlepšuje podmínky pro granulaci a epitelizaci rány. Výhodou gelové formy je variabilita použití. *Hyiodine* umožňuje léčit rány postihující kostní struktury, rány s odhalenými šlachami nebo hluboké píštěle. (Sobotka et al. 2006)

1.4.3 Kyslíkové radikály

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou vysoce účinné proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, virům a houbám. Rovněž zabraňují tvorbě biofilmu a rozkládají ho. Způsobují oxidaci thiolových skupin, reagují s lipidy, proteiny a DNA. Zvyšují permeabilitu buněk a způsobují poškození řetězce DNA. Díky těmto funkcím jsou ROS

potenciálně velmi vhodné pro chronické zánětlivé stavy (Dryden 2018; Cooper a Kirketerp-Møller 2018).

1.4.3.1 ActiMaris

Roztok *ActiMaris* je vyráběn ve dvou formách a to *ActiMaris Sensitiv* a *ActiMaris Forte*. Tyto dva roztoky se liší ve svém složení, kdy *ActiMaris Sensitiv* je vyroben z vody s mořskou solí (1,2%), NaOCl (0,04%), aktivního kyslíku ($^1\text{O}_2$) a HOCl (0,0044%). *ActiMaris Forte* je vyroben z vody s mořskou solí (3%), NaOCl (0,2%) a aktivního kyslíku ($^1\text{O}_2$). Aktivní kyslík, chlornan sodný a mořská sůl mají eliminující účinek na typické patogeny, aniž by poškodily tkáň. Oxidační účinek singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) a hypertonický solný roztok neutralizují zápach z rány. Alkalické pH roztoku *ActiMaris Sensitiv* zajišťuje postupné uvolňování kyslíku. Alkalické pH oplachového roztoku *ActiMaris Forte* podporovalo poskytování OH-iontů (jako součást přirozeně vyváženého roztoku) (redoxní systém) a navíc regulovalo uvolňování kyslíku. Mořská sůl obsahuje jako hlavní složku chlorid sodný (98%) a 2% mořské soli. Zvýšená slanost roztoku *ActiMaris Sensitiv* zajišťuje optimální hyperosmotický účinek („ActiMaris forte Wundspüllösung - Einfache und natürliche Wundheilung" b.r.; „ActiMaris sensitiv Wundspüllösung - Einfache und natürliche Wundheilung" b.r.).

1.4.3.2 Manukový med

Použití medu při léčbě chronických ran bylo známo již 2000 let př. n. l. Med má mnoho pozitivních vlastností. Zastavuje dělení buněk u stafylokoků. Narušuje buněčné stěny gramnegativních bakterií. Váže se na DNA a způsobí poškození vlákna (Cooper a Kirketerp-Møller 2018). Dostatečnou osmolaritou inhibuje růst a množení mikroorganismů, usnadňuje odstranění nekrotické tkáně a stimuluje proliferaci buněk potřebných k usnadnění hojení. Zmírňuje virulenci (Ousey a McIntosh 2010).

Manuka med je odrůda medu vyrobeného z nektaru keře balmínu metlatého (*Leptospermum scoparium*) pocházejícího z Nového Zélandu a vykazujícího antibakteriální aktivitu. Antibakteriální účinek Manuka medu je založen hlavně na jeho fyzikálních vlastnostech, aktivní látce, kterou je methylglyoxal (MGO) a peroxidu vodíku (Johnston et al. 2018). Vysoká koncentrace cukru v medu Manuka vytváří osmotický gradient, odvádí vlhkost z okolí a dehydratuje bakterie. Flavonoidy odvozené z květových zdrojů medu odstraňují volné radikály, snižují poškození tkáně. Nízké pH (3,2 a 4,5) medu inhibuje růst mikroorganismů a zároveň zvyšuje aktivitu fibroblastů, makrofágů a pomáhá okysličovat ránu. Methylglyoxal (MGO) je jedním z fytochemických faktorů s antibakteriální aktivitou.

Obyčejný med má omezené množství MGO v koncentraci od 1,6 do 135 mg / kg ve srovnání s 38–725 mg / kg v Manuka medu. Vysoké koncentrace medu Manuka mohou mít škodlivý cytotoxický účinek (Minden-Birkenmaier et al. 2019; Tsang et al. 2015).

1.4.4 Chlornany (Chlór)

Chlor se pro své dezinfekční vlastnosti používá v lékařských a komerčních prostředcích od 18. století, včetně lokálního použití v medicíně jako antiseptikum a dezinfekce. Nejdůležitější látky obsahující aktivní chlor jsou chlornan sodný (NaOCl), oxid chloričitý, kyselina chlorná (HOCl) a N-chlorové sloučeniny (chloraminy, chloramidy a chlorimidy) jako je například dichlorisokyanurát sodný, N-chlorotaurin (NCT) a chloramin-T (CAT) (McDonnell a Russell 1999; Peck et al. 2011).

Chlor díky své oxidativní aktivitě ničí grampozitivní i gramnegativní bakterie, viry, plísně a patogenní houby (Cardile et al. 2014; Hidalgo, Bartolome, a Dominguez 2002). Mikrobicidní aktivita je zvýšená v přítomnosti bílkovin v důsledku transhalogenace a transchlorace, kdy je část aktivního chloru přenesena na nízkomolekulární aminosloučeniny nebo aminokyseliny, vedoucí k tvorbě monochloraminu a poškození buněčné aktivity proteinů (Gottardi a Nagl 2010; Percival a Cutting 2010). HOCl a chloraminy také reagují s nukleotidy a lipidy. Vzniklé radikály podporují peroxidaci volných lipidů ve fosfolipidových membránách, tím zvyšují její permeabilitu (Panasencko 1997).

Ačkoliv antiseptikum *ActiMaris* má hlavní účinnou složku aktivní kyslík, tak i chlornan sodný zvyšuje jeho účinnost („ActiMaris forte Wundspüllösung - Einfache und natürliche Wundheilung“ b.r.).

1.4.4.1 Chloramid SH-Cl

Chloramid hyaluronanu je chlorovaný derivát kyseliny hyaluronové. Tato sloučenina je vyrobená ve společnosti Contipro a.s.

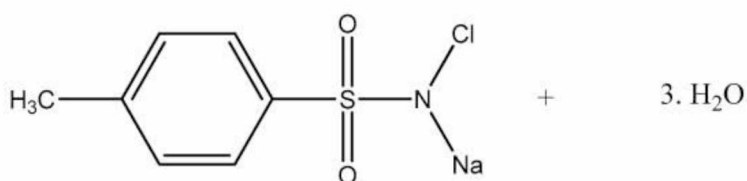
1.4.4.2 Hyalecasan

Hyalecasan je antimikrobiální a regenerační krytí, které je založeno na kombinaci superoxidového roztoku kyseliny chlorné, chlornanu sodného 0,03 %, chloridu sodného a kyseliny hyaluronové 0,015 %. *Hyalecasan* velmi příznivě působí na okraje defektu, které zůstávají zcela vitální, bez poškození, zabraňuje maceraci okolní tkáně a svým složením má sekundární terapeutický účinek, který výrazně urychluje hojení, pozitivně napomáhá aplikované terapii při novotvorbě cév a obnově krycí tkáně kůže a sliznic, čímž urychluje

hojení a znatelně zmenšuje rozsah poškození. Současně obnovuje krycí tkáň na nově vytvořených vazivově cévních tkáních. Má unikátní regenerativní účinky. Brání ukládání kolagenu a tím podporuje bezjizevnaté hojení tkáně. („HyalEcaSan 50ml gelové krytí, vysoký obsah kys.hyaluronové" b.r.)

1.4.4.3 Chloramin T

Chloramin T (CAT), je aktivní sloučenina chloru. Tato sloučenina prokázala antimikrobiální aktivitu v důsledku své chlorační / oxidační síly. CAT se používá jako baktericidní a dezinfekční prostředek. CAT působí na buněčnou stěnu, což vede k tvorbě porů v membráně a k narušení iontové propustnosti (Ferreira et al. 2017).



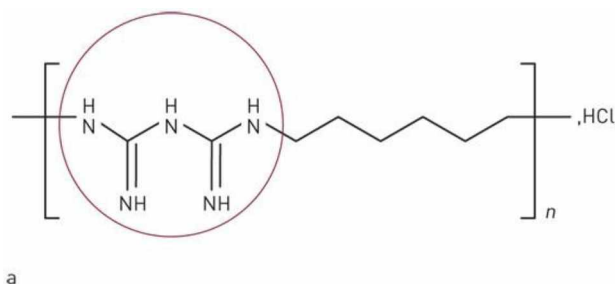
Obr. 1 Chemická struktura chloramin T (Ferreira et al. 2017)

1.4.4.4 Lavanox

Lavanox je antimikrobiální roztok účinný proti bakteriím, virům a plísním. Roztok se používá k čištění ran a profylaxi infekce. Používá se na akutní i chronické rány zejména kontaminované rány. Účinná složka *Lavanoxu* je chlornan sodný. Chlornan sodný (NaOCl) je oxidační činidlo, které se štěpí a uvolňuje kyslík ($^1\text{O}_2$). Tento volný kyslík poškozuje bakteriální, virové a houbové buněčné membrány a zvyšuje jejich propustnost. Membrána již nemůže vydržet osmotický tlak a mikroorganismus je inaktivován („LAVANOX® wound irrigation solution and wound spray" b.r.).

1.4.5 Polyhexamethylen biguanid (PHMB)

PHMB je syntetickým analogem přirozeně se vyskytujících antibakteriálních peptidů. Je jim strukturálně podobný a tím je mu umožněno vložit se do bakteriální buněčné membrány a působit baktericidně. PHMB látka při fyziologickém pH je vysoce kladně nabitá. Kondenzuje bakteriální DNA a zastavuje dělení buněk. (Fjeld a Lingaas 2016).



Obr. 2 Strukturní vzorec pro PHMB (Fjeld a Lingaas 2016)

1.4.5.1 *Lavanid*

Lavanid je antimikrobiální hydrogel, používaný na akutní chronické rány. Hydrogel jsou 3D polymerní sítě. *Lavanid* je sterilní konzervační gel založený na bázi Ringerova roztoku a polyhexanidu 0,04 %. Ringerův roztok je fyziologický, izotonický elektrolytický roztok s velmi dobrou tkáňovou snášenlivostí. Použitím izotonického roztoku se zabrání bobtnání pokožky a dráždění rány, neboť nedochází k žádným přesunům tekutin popř. elektrolytů v těle vlastními sekrety. Pro ošetření ran je běžná koncentrace polyhexanidu od 0,02 % do 0,04 %. Koncentrace polyhexanidu v antiseptiku *Lavanid* je 0,04 %. Koncentrace nad 0,04 % byly vyhodnoceny jako toxické. („Gely na rány LAVANID®" b.r.).

1.4.5.2 *Prontosan*

Prontosan je antimikrobiální roztok určený k promytí, zvlhčování a dekontaminaci rány. Zvlhčování *Prontosanem* je vhodné pro přípravu rány, k odstranění biofilmu před dalším zpracováním a pro absorpci zápachů z rány. *Prontosan* obsahuje polyhexanid, který působí jako konzervační prostředek proti bakteriím a undecylenamidopropylbetain což je povrchově aktivní látka (Horrocks 2006; „*Prontosan® Wound Irrigation Solution*" b.r.).

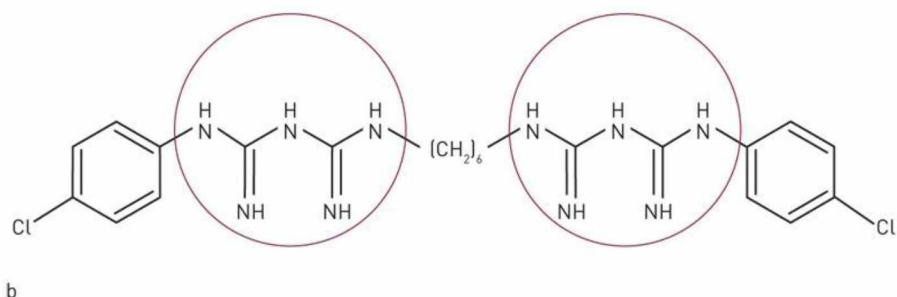
1.4.5.3 *Suprasorb X + PHMB*

Suprasorb X + PHMB je antimikrobiální krytí na rány *HydroBalance* s 0,3 % polyhexanidem. *Suprasorb X + PHMB* podle stavu rány předává ráně vlhkost nebo zachycuje nadbytečný exsudát. Tím se vytváří vlhké prostředí rány, které pacienti vnímají jako příjemné a zmírňující bolest („*Suprasorb X + PHMB*" b.r.).

1.4.6 Chlorhexidin

Chlorhexidin je antimikrobiální látka. Jde o kationický bisbiguanid se širokou antimikrobiální aktivitou, nízkou toxicitou a silnou afinitou k vazbě na kůži a sliznici. Chlorhexidin je účinný proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, kvasinkám a některým lipofilním virům. Denaturuje enzymy, způsobuje ztrátu membránového potenciálu a

vede k úniku buněčných komponent a koagulaci cytosolu (Cooper a Kirketerp-Møller 2018; Jones 1997).



Obr. 3 Strukturní vzorec chlorhexidinu (Fjeld a Lingaas 2016)

1.4.6.1 *Bactigras*

Bactigras je antiseptický parafinový obvaz, který uklidňuje a chrání ránu a zároveň pomáhá snižovat infekci a zánět. *Bactigras* obsahuje 0,5 % chlorhexidinacetátu (Aramwit et al. 2010).

1.4.7 Oktenidin

Oktenidin je antimikrobiální látka. Je účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Pozitivně nabitě molekuly léčiva se vážou k negativním nábojům na bakteriálních buněčných stěnách, což vede k narušení struktury membrány a nakonec ke smrti buněk (Cooper a Kirketerp-Møller 2018; Obermeier et al. 2018).

1.4.7.1 *Octenilin Wound Gel*

Octenilin Wound Gel je antimikrobiální hydrogel, obsahující oktenidin dihydrochlorid 0,05 %, který působí konzervačně a napomáhá gelu vytvářet na ráně ochrannou bariéru zabraňující průniku mikrobů z vnějšího prostředí do rány („schülke - octenilin® wound gel" b.r.).

1.4.7.2 *Octenilin Wound Irrigation Solution*

Octenilin Wound Irrigation Solution je antimikrobiální roztok určený k promytí, zvlhčování a dekontaminaci rány. Obsahuje oktenidin dihydrochlorid 0,05 %, který zamezuje růstu mikrobů v ráně a krytí. Podporuje granulaci a epitalizaci tkáně („schülke - octenilin® wound irrigation solution" b.r.).

1.4.7.3 *Sorelex*

Sorelex je antimikrobiální bandáž určená především na povrchové rány. *Sorelex* je komplex biotechnologicky vyrobené kyseliny hyaluronové (totožné s lidskou hyaluronovou

kyselinou) a oktenidinu dihydrochlorid. Je účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. *Sorelex* je vhodný na infikované, povleklé rány, dlouhodobě se nehojící rány a rány s rizikem rozvoje infekce („Sorelex na povrchové rány" b.r.)

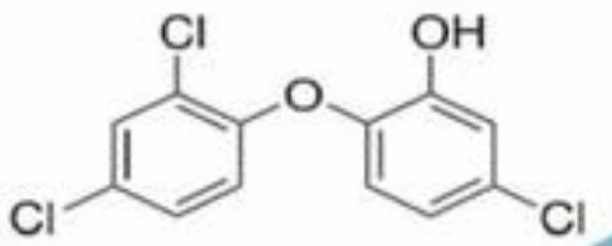
1.4.8 Fenoly

Antimikrobiální látky fenolového typu se již dlouho používají pro jejich antiseptické, dezinfekční nebo konzervační vlastnosti. Díky membránově aktivním vlastnostem přispívají k jejich celkové činnosti. Fenol indukuje progresivní únik intracelulárních složek (McDonnell a Russell 1999).

Bisfenoly jsou hydroxy-halogenované deriváty dvou fenolových skupin spojené různými můstky. Triclosan a hexachlorofan jsou nejrozšířenější biocidy v této skupině, zejména v antiseptických mýdlech (McDonnell a Russell 1999).

1.4.8.1 Triclosan

Triclosan (TCS) nebo 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy) fenol je syntetický širokospektrální antimikrobiální přípravek. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech včetně ethanolu, dimethylsulfoxidu (DMSO) a methanolu. Triclosan má antibakteriální, antivirové a antimykotické vlastnosti (Alfhili a Lee 2019). Ve vysokých koncentracích se nachází ve výrobcích pro osobní péči, jako jsou zubní pasty, ústní vody, dezinfekční prostředky pro ruce a chirurgická mýdla. Triclosan se snadno vstřebává do lidské kůže a ústní sliznice a nachází se v různých lidských tkáních a tekutinách (Weatherly a Gosse 2017). Bylo zjištěno, že TCS ovlivňuje mitochondriální funkci, narušuje správnou signalizaci vápníkem, mění homeostázu zinku a ovlivňuje imunologické parametry. TCS je také spojen s vývojem rakoviny. TCS je chemikálií narušující endokrinní systém u více druhů. TCS může také ovlivnit imunitní odpovědi, produkci ROS a kardiovaskulární funkce (Weatherly a Gosse 2017).



Obr. 4 Strukturální vzorec Triclosanu (Weatherly a Gosse 2017)

1.5 PROBLÉMY A LIMITACE ANTIMIKROBIÁLNÍ LÉČBY RÁNY

Rizika spojená s používáním lokálních antimikrobiálních látek zahrnují zvyšování míry bakteriální rezistence, lokální reakce přecitlivělosti a obavy z nerozváženého používání antiseptik, která mohou potenciálně selektovat na rezistenci na antibiotika. Rozšířené používání běžně používaných topických antibiotik (zejména mupirocinu a kyseliny fusidové) vedlo v některých prostředích ke zvýšení bakteriální rezistence, což omezovalo potenciální účinnost těchto látek. Navíc se objevují obavy z možného škodlivého ekologického dopadu (tzv. „Kolaterální poškození“) stále častějšího používání topických antiseptik, jako je chlorhexidin a triclosan (Williamson, Carter, a Howden 2017).

Nepříznivé účinky antimikrobiálních látek lze rozdělit na lokální a systémové. Mezi místní účinky patří bolest, vyrážka, a cytotoxické účinky na buňky. K těmto účinkům dochází pouze v místě aplikace. Systémové účinky se objevují vstřebáváním těchto látek do systémového oběhu, což má za následek toxicitu pro ledviny, játra a další orgány (Punjataewakupt, Napavichayanun, a Aramwit 2019).

1.5.1 Bakteriální rezistence na antibiotika

Antibiotická rezistence je celosvětový problém (Perry, Waglechner, a Wright 2016). Léky zachraňující život, které během čtyřicátých let minulého století obsahovaly velké naděje o eliminaci (eradikaci) všech infekčních nemocí ohrožujících život na světě, přestaly fungovat, a to kvůli rostoucímu výskytu mikrobiálních kmenů, které jsou vůči nim odolné. Mnoho, dříve účinných antibiotik, již není použitelných z důvodu rozšířeného výskytu multirezistentních mikrobiálních kmenů (Chattopadhyay et al. 2015). Rozsáhlé užívání antibiotik je hlavním faktorem vzniku bakteriální rezistence (Knöppel, Näsval, a Andersson 2017).

Bakterie mají pozoruhodnou genetickou plasticitu, která jim umožňuje reagovat na širokou škálu environmentálních hrozeb, včetně přítomnosti molekul antibiotik, která mohou ohrozit jejich existenci. Z evolučního hlediska bakterie používají dvě hlavní genetické strategie k adaptaci na antibiotický „útok“. Mutace v genu (genech) často spojené s mechanismem působení sloučeniny a získávání cizí DNA kódující determinanty rezistence horizontálním genovým přenosem (HGT) (Munita a Arias 2016).

Genetické změny se pohybují v měřítku od bodových mutací přes získávání dříve existujících prvků až po horizontální přenos genů. Bodové mutace mohou ovlivnit expresi

genu nebo změnit RNA či změnit proteinové struktury lékových cílů nebo genů poskytujících rezistenci (Yelin a Kishony 2018). Jakmile se objeví rezistentní mutant, antibiotikum odstraní citlivou populaci a převažují rezistentní bakterie. Obecně mutace vedoucí k mikrobiální rezistenci mění antibiotický účinek prostřednictvím modifikace antimikrobiálního cíle (snížení afinity k léčivu), snížením absorpce léčiva, aktivací efluxních mechanismů k vytlačování škodlivé molekuly, nebo globálními změnami důležitých metabolických drah prostřednictvím modulace regulačních sítí (Munita a Arias 2016).

HGT je v přirozeném prostředí všudypřítomný a je často viníkem získání rezistence (Yelin a Kishony 2018). Bakterie klasicky získávají externí genetický materiál pomocí tří hlavních strategií, a to transformací (inkorporace „nahé“ DNA bez proteinů), transdukci (zprostředkovaná fágem) a konjugací (spájení, bakteriální „sex“) (Munita a Arias 2016).

1.5.2 Bakteriální rezistence na antiseptika

Antiseptika mají obecně mnohem širší spektrum účinnosti než antibiotika a obvykle mají více nescifických buněčných cílů. Tento širší cílový účinek může vysvětlit, proč rezistence na antiseptika je mnohem méně převládající než rezistence na antibiotika, zejména při vysokých koncentracích používaných ve zdravotnických zařízeních (Williamson, Carter, a Howden 2017).

Rezistence může být buď přirozená vlastnost organismu (vnitřní rezistence) nebo získaná pomocí mutace, získáním plazmidů (samoreplikující se, extrachromozomální DNA) nebo získáním transpozónů (chromosomální nebo plazmidová integrace, přenosné DNA kazety) (McDonnell a Russell 1999).

Vnitřní (vrozená) rezistence je tedy přirozená, chromozomálně řízená vlastnost bakteriální buňky, která jí umožňuje obejít působení antiseptického nebo dezinfekčního prostředku. Gramnegativní bakterie mají tendenci být odolnější než grampozitivní organismy (McDonnell a Russell 1999).

Stejně jako u antibiotik a jiných chemoterapeutických léčiv může získaná rezistence na antiseptika a dezinfekční prostředky vzniknout mutací nebo získáním genetického materiálu ve formě plazmidů nebo transpozónů (McDonnell a Russell 1999).

TCS produkuje bakteriální rezistenci prostřednictvím modifikace cílového místa, což snižuje inhibiční účinek této chemikálie. Expozice TCS může také vést k bakteriální odolnosti vůči jiným antimikrobiálním látkám (Weatherly a Gosse 2017).

1.5.3 Cytotoxicita antiseptik

Antiseptika vykazují široké antimikrobiální spektrum a zbytkovou antiinfekční aktivitu na rány; nicméně mohou být toxická pro hostitelské buňky nebo tkáně (např. fibroblasty, keratinocyty, a leukocyty) (Punjataewakupt, Napavichayanun, a Aramwit 2019).

Cytotoxicita antiseptik se nejčastěji projevuje inhibicí syntézy DNA, oxidačním stresem prostřednictvím produkce ROS a poškozením buněčných součástí jako jsou enzymy, proteiny, buněčné membrány, dále pak progresivní mitochondriální dehydrogenázovou dysfunkcí a následnou buněčnou smrtí. Antiseptika vykazují cytotoxicitu pro fibroblasty (AshaRani et al. 2009; Poon a Burd 2004), keratinocyty (Poon a Burd 2004; Szmyd et al. 2013) a endoteliální buňky (Punjataewakupt, Napavichayanun, a Aramwit 2019).

Toxicita lokálních antiseptických látek včetně jejich poškození granulační tkáně je dobře prozkoumána. Destruktivní účinek na cévy hustého kapilárního plexu nově vytvořené granulační tkáně je považován za jedno z nejvážnějších potenciálních poškození způsobených těmito přípravky. Proto by měla být indikace lokálních antiseptik pečlivě posouzena (Marquardt et al. 2010).

2 PRAKTICKÁ ČÁST

MATERIÁLY A METODY

2.1 LABORATORNÍ POMŮCKY

96-jamkové mikrotitrační destičky

Automatické pipety

Inokulační kličky

Jednorázové latexové rukavice

Krycí sklíčka

Laboratorní hořák

Nůžky

Parafilm

Pinzety

Plastové Petriho misky

Plastové špičky

Plastové zkumavky

Podložní sklíčka

Sterilní filtry

Sterilní injekční stříkačky

Sterilní špejle s vatičkou

Zařízení Calgary Biofilm

2.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Analytické váhy XP 205 DR (METTLER TOLEDO, Česká republika)

Analytické váhy XS 204 M (METTLER TOLEDO, Česká republika)

Analyzátor Syngene G-box (Chemi 16 Bio Imagingsystem, Velká Británie)

Chladnička Mediline (Liebherr, Česká republika)

Mikroskop fluorescenční NIKON TI-E (Nikon Corporation, Japonsko)

Spektrofotometr Helios Epsilon, Vis (Thermo Fisher Scientific, USA)

Termostat INNOVENS 55 EB 1 (Jouan Industries, Francie)

Termostat s integrovanou třepačkou KS-15 (Edmund Bühler, Německo)

Vortex IKA Lab Dancer (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo)

2.3 SOFTWARE

GeneSnap (Syngene, Bio Imagingsystem, Velká Británie)

ImageJ (Schneider, CA; Rasband, WS & Eliceiri, KW (2012), „ NIH Image to ImageJ: 25 let analýzy obrazu “, *Nature Methods* 9 (7) : 671-675, PMID 22930834)

Kaleido (EnSight, HH34000000, Waltham, Massachusetts, USA)

NIS (NIS Elements AR, Laboratory Imaging, s. r. o., Praha, Česká republika)

2.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA, ROZPOUŠTĚDLA A FLUORESCENČNÍ BARVIVA

2.4.1 Mueller-HintonBroth (MHB), (Oxoid Limited, Velká Británie)

Složení:

Hovězí, dehydrovaná infúze	300 g/l
Kaseinový hydrolyzát	17,5 g/l
Škrob	1,5 g/l
pH (při 25 °C)	7,3 ±0,1

Příprava:

21 g se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Roztok se nechá vysterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Připravené médium se skladuje při teplotě 2-8 °C.

Použití:

MHB byl použit jako kultivační médium pro bakteriální buňky.

2.4.2 Mueller-Hinton Agar (MHA), (Oxoid Limited, Velká Británie)

Složení:

Hovězí, dehydrovaná infúze	300 g/l
Kaseinový hydrolyzát	17,5 g/l
Škrob	1,5 g/l
Agar	16 g/l
pH (při 25 °C)	7,3 ±0,1

Příprava:

21 g MHB a 16 g agaru se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Roztok se nechá vysterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Připravený agar se nalije na Petriho misky a nechá se ztuhnout.

Použití:

MHA agar byl použit jako kultivační a uchovávací médium pro bakteriální buňky.

2.4.3 Tryptone soya agar (TSA), (Oxoid Limited, Velká Británie)

Složení:

Pankreaticky trávený kasein	15 g/l
Enzymatický rozklad sojových bobů -Soytone	5 g/l
Chlorid sodný	5 g/l
Agar	15 g/l
pH (při 25 °C)	7,3 ±0,2

Příprava:

40 g TSA se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Roztok se nechá vysterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Připravený agar se nalije na Petriho misky a nechá se zatuhnout.

Použití:

TSA agar byl použit jako kultivační a uchovávací médium pro bakteriální buňky.

2.4.4 Dimethyl Sulfoxide (DMSO), (Hydri Max, Sigma-Aldrich Science, Německo)

Použití:

DMSO bylo použito na rozpuštění práškového Triclosanu na roztok.

2.4.5 Zelené fluorescenční barvivo SYTO

SYTO je zelené fluorescenční barvivo barvící nukleovou kyselinu živých a mrtvých grampozitivních a gramnegativních bakterií. Koncentrace zásobního roztoku je 5 mM

Použití:

SYTO bylo použito na barvení biofilmového preparátu.

2.4.6 Červené fluorescenční barvivo propidium jodid (PI)

PI je červené fluorescenční barvivo barvící jádra a chromozómy. Protože PI není propustný pro živé buňky, používá se k detekci mrtvých buněk v populaci.

Použití:

PI bylo použito na barvení biofilmového preparátu.

2.5 BAKTERIÁLNÍ KMENY

Vysušené bakteriální kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů CCM. Následně byly bakteriální kmeny oživeny do tekutého média. Bylo použito 20 ml TSB (Tryptic Soy Broth) média v 50 ml Erlenmeyerově baňce. Takto připravené bakteriální kultury byly kultivovány přes noc při 37 °C / 150 rpm. Noční kultura byla vyndána a byla připravena glycerínová konzerva. 1 ml noční kultury + 250 µl 80% ster. glycerolu. Glycerínová konzerva byla připravována do kryozkumavky (Cryo Tube Vials) ta byla řádně popsána názvem kmenu a datum přípravy. Glycerínové konzervy byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při -80 °C.

Pro přípravu čerstvé bakteriální suspenze byla bakteriální konzerva rozmražena a naočkována na TSA a kultivována 24 h při 37 °C

Bakterie byly po celou dobu testování inkubovány aerobně na TSA 37 °C/24 h. Následně byly bakterie uchovávány na TSA agaru v chladničce po dobu 1 týdne.

Bakterie:

Staphylococcus aureus

CCM 4223

Pseudomonas aeruginosa

CCM 1961

2.6 TESTOVANÁ ANTISEPTIKA

Acticoat – (č.š. 1337, aktiv. látka stříbro, 0.69 -1.64 mg podle cm^2 Smith&NephewMedical Limited, Velká Británie)

Actimaris Sensitiv – (ActiMaris Sensitiv - roztok na hojení, č.š. 065/4018S1, aktiv. látka singletový kyslík (1O_2), ActiMaris AG, Švýcarsko)

Actimaris Forte – (ActiMaris Forte - roztok na hojení, aktiv. látka singletový kyslík (1O_2), ActiMaris AG, Švýcarsko)

Aquacel – (Hydrofiber, č.š. 4A01682, aktiv. látka stříbro, ConvaTec Group, Velká Británie)

Bactigras – (č.š. 201824, aktiv. látka chlorhexidin acetát 0,5 %, Smith&NephewMedical Limited, Velká Británie)

Betadine – (Povidonum iodinum, č.š. 6791N0518, aktiv. látka jód 100 mg/ml, Egis Pharmaceuticals PLC, Maďarsko)

Hyalecasan – (č.š. 811J, aktiv. látka chlornan sodný 0,03 %, New Water Meaning s.r.o., Česká republika)

Hyiodine – (č.š. 240718, aktiv. látka jód 0,25 %, Contipro a.s., Česká republika)

Chloramin T – (sodná sůl, č.š. #MKBP1690V, aktiv. látka chlornan, Sigma-Aldrich Chemistry, Německo)

Chlornan sodný – (NaOCl, 818 mM, aktivní chlor, Ph Eur N 1081600, dodavatel VWR International s.r.o., Česká republika)

Chlorhexidin diglukonát 20% vodný roztok – (č.š. BCBQ5163V, aktiv. látka chlorhexidin, Sigma-Aldrich Chemistry, Německo)

KerraContact Ag – (Advanced silver wound contact dressing, č.š. (10)1804111, aktiv. látka stříbro, Excition Technologies, Kanada)

Lavanid – (č.š. 273, aktiv. látka polyhexanid 0,04 %, Serag-Wiessner GmbH et Co. KG, Německo)

Lavanox – (Wound irrigation Solution, č.š. D102912, aktiv. látka chlornan sodný 0,08 %, Serag-Wiessner GmbH et Co. KG, Německo)

Manukový med – (UMF 16+, č.š. 1027, aktiv. látka vysoký obsah enzymů, methylglyoxal 0,055 % peroxid vodíku 16 %, Cambridge Bee Products Ltd, Nový Zéland)

Mepilex Ag – (č.š. 18420430, aktiv. látka stříbro 1,2 mg / cm², Mölulycke Health Care AB, Švédsko)

Octenilin Wound Gel – (č.š. 9460219, aktiv. látka Octenidin dihydrochlorid 0,05 %, Schülke&Mayr GmbH, Německo)

Octenilin Wound Irrigation Solution – (č.š. 9460212, aktiv. látka Octenidin hydrochlorid 0,05 %, Schülke&Mayr GmbH, Německo)

Prontosan – (Roztok na výplach ran, č.š. 18373M03, aktiv. látka polyhexanid 0,1 %, B. Braun AG, Švýcarsko)

SHCl – (derivát hyaluronátu, č.š. 190520, 190521, aktiv. látka chlornan, Contipro a.s., Česká republika)

Silvercel – (Hydro-alginate antimicrobial dressing with silver, č.š. 01700, aktiv. látka stříbro 0,98 mg / cm², Systagenix, San Antonio, USA)

Sorelex – (Hyaluronát sodný, č.š. 160916, aktiv. látka Octenidin dihydrochlorid, Contipro a.s., Česká republika)

Suprasorb A + Ag – (Antimikrobiální kalcinmalginátorová komprese, č.š. 183953311, aktiv. látka stříbro, Lohman&Rauschner International GmbH& Co. KG, Austrálie)

Suprasorb X + PHMB – (Antimikrobiální HydroBalance obvaz na rány, č.š. 1842211905, aktiv. látka polyhexanid 0,3 %, Lohman&Raschner International GmbH& Co. KG, Německo)

Triclosan – (Irgasan, č.š. #058M4789V, aktiv. látka triclosan, Sigma-Aldrich Chemistry, Německo)

Gáza – (č.š. 227361, Steriwund s.r.o., Česká republika)

Testovaná antiseptika jsou ve formě roztoků (*Actimaris*, *Betadine*, chlorhexidin 20 % vodný roztok, *Lavanox*, *Octenilin Wound Irrigation Solution*, *Prontosan*), dále pak ve formě gelu (*Hyalecasan*, *Hyiodine*, *Lavanid*, *Manukový med*, *Octenilin Wound Gel*), v podobě prášku (chloramin T, SHCl, triclosan) a nakonec ve formě bandáží (*Acticoat*, *Aquacel*, *Bactigras*, *KerraContact*, *Mepilex*, *Silvercel*, *Sorelex*, *Suprasorb A + Ag*, *Suprasorb X*).

2.7 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍHO ÚČINKU ANTISEPTIK

2.7.1 Kontaktní inhibice

Kvalitativní metoda, která nás informuje o účinnosti daných antiseptik. Hodnotí velikost inhibiční zóny okolo testované látky.

2.7.1.1 Příprava gáz a bandáží

Nejprve byly nastříhány gázy a bandáže o velikosti 1x1 cm. Nastříhané gázy byly dány do prázdných 1,5 ml zkumavek, které byly zváženy. Do dalších 1,5 ml zkumavek byla připravena testovaná antiseptika. Nastříhané gázy se namočily do antiseptik tak, aby gáza byla celá nasátá látkou. Poté byla vrácena do odpovídající předvážené 1,5 ml zkumavky. Po namočení všech gáz ve všech testovaných látkách byly opět 1,5 ml zkumavky zváženy. Tím se zjistilo množství účinné látky na gáze.

2.7.1.2 Příprava agaru

Tato metoda byla prováděna na Petriho miskách s agarem MHA. Misky byly připraveny den předem.

2.7.1.3 Příprava bakteriální suspenze

Do plastové 20 ml zkumavky bylo přeneseno 5 ml MHB a poté byl přidán stěr bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* rostoucí na TSA agaru. Byla připravena bakteriální suspenze o zákalu 0,5 McFarlanda. Zákal bakteriální suspenze byl měřen na spektrofotometru při vlnové délce 625 nm a absorbance byla v rozmezí 0,08-0,13. Tato suspenze byla rozetřena, pomocí sterilní špičky s vatičkou, na Petriho miskách s připraveným MHA agarem ve všech směrech vícekrát. Před uschnutím bakteriální suspenze byly aplikovány gázy a bandáže. Pevné bandáže byly vlhčeny MHB tak, aby z nich medium nevytékalo.

Petriho misky byly inkubovány 24 h v termostatu o teplotě 37 °C. Po inkubaci byly Petriho misky vyfotografovány pomocí analyzátoru Syngene G-box. Pro získání měřítka, abychom mohli vyhodnocovat velikosti zón, byla vyfotografována prázdná Petriho miska s pravítkem. Následně byly změřeny inhibiční zóny okolo gáz a bandáží. Ke změření velikosti zón byl použit program ImageJ. Pomocí „přímky“ v hlavním menu si označíme vložené

měřítka. Délku měřítka si zadáme pomocí ikonky „Set Scale“, v hlavním menu pod „Analyze“. Následně je pak měřena inhibiční zóna. Zóna byla změřena na pěti různých místech a z těchto hodnot byl spočítán průměr.

2.7.2 Diluční metoda (M07Ed11E_Methods_Dilution_Antimicrob)

Kvantitativní metoda používaná pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tj. minimální koncentrace antiseptik, která je schopna zastavit růst bakterií.

Tato metoda byla provedena v 96 jamkové mikrotitrační destičce, která se skládá z 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H). Mikrotitrační destička byla rozdělena na dvě poloviny, kdy v jedné polovině (sloupce 1-6) byla testována účinnost antiseptik proti *Staphylococcus aureus* a ve druhé polovině (sloupce 7-12) byla testována účinnost proti *Pseudomonas aeruginosa* (Tab. 1).

Tab. 1: Příklad uspořádání mikrotitrační destičky. Destička je rozdělena na dvě poloviny, kdy na jedné polovině jsou testované látky na účinnost proti bakterii *S. aureus* a na druhé polovině proti bakterii *P. aeruginosa*. Jednotlivé látky byly testovány vždy v dubletech. Antiseptika byla řaděna dvojkovou řadou. V tabulce je zaznamenáno, jak klesala koncentrace antiseptik ve formě gelu (řádek A,B,E-H) v mg/ml. U roztoků je zaznamenána rostoucí ředící řada (řádek C,D). Do pozitivní kontroly bylo pouze přeneseno 100 µl MHB bez antiseptik, zde nebyl patrný žádný nárůst bakterií. Negativní kontrola obsahovala 100 µl MHB a 10 µl bakteriální suspenze. V této kontrole byl zřetelný nárůst bakterií.

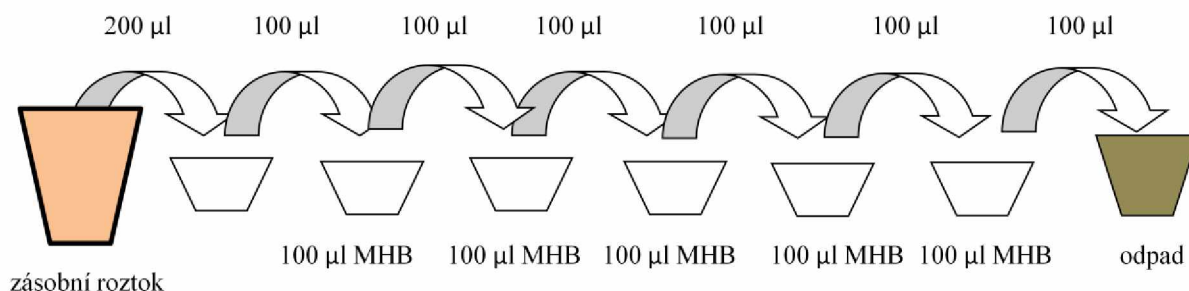
	<i>Staphylococcus aureus</i>						<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
	Látka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156
B		5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156
C		1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32
D		1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32
E		100	50	25	12,5	6,25	neg.k.	100	50	25	12,5	6,25	neg.k.
F		100	50	25	12,5	6,25	neg.k.	100	50	25	12,5	6,25	neg.k.
G		100	50	25	12,5	6,25	poz.k.	100	50	25	12,5	6,25	poz.k.
H		100	50	25	12,5	6,25	poz.k.	100	50	25	12,5	6,25	poz.k.

2.7.2.1 Příprava roztoků antiseptik

Antiseptika, která jsou ve formě roztoků, byla naředěna na požadovanou koncentraci pomocí MHB. Gely byly zváženy na analytických váhách a zředěny na požadovanou koncentraci pomocí MHB. Látky ve formě prášku byly zváženy na analytických váhách a rozpuštěny v MHB. Výjimkou byla antiseptika chloramid hyaluronanu (SHCl), chloramin T, chlorhexidin a chlornan sodný, která byla rozpouštěna ve sterilní vodě a triclosan, který byl rozpuštěn v DMSO. Bandáže byly nastříhány 1x1 cm a 4 dny louhovány v MHB. Pro aplikaci byly přefiltrovány přes filtr a následně aplikovány.

2.7.2.2 Ředění dvojkovou řadou

Do prvního a sedmého sloupce bylo přeneseno 200 μ l testovaného antiseptika o dané koncentraci. Testované látky byly vždy přeneseny v dubletech. Do ostatních (2-6, 8-12) sloupců bylo přeneseno 100 μ l MHB. Pro postupné snižování koncentrace antiseptik bylo provedeno ředění dvojkovou řadou přímo v mikrotitrační destičce (viz obr. 5). Z první jamky bylo odebráno 100 μ l a přeneseno do druhé jamky, dále pak do třetí, čtvrté, páté a šesté. Z poslední (šesté a dvanácté) jamky bylo odebráno 100 μ l a vyhozeno do odpadu.



Obr. 5: Náskres dvojkového ředění v mikrotitrační destičce

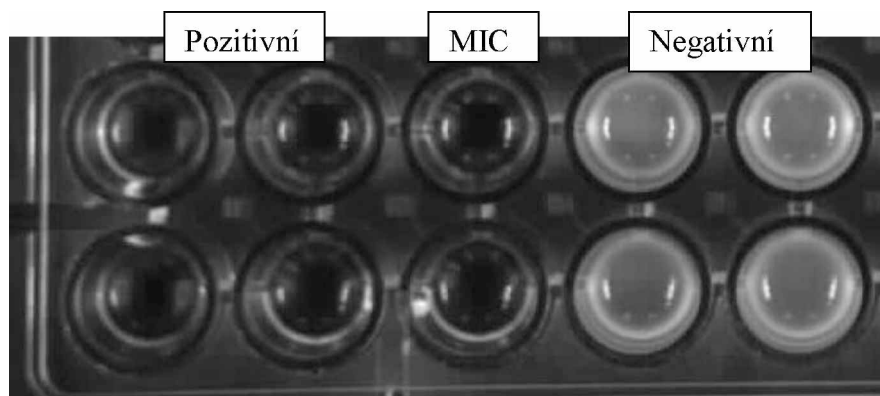
Pro kontrolu byly použity pozitivní a negativní kontroly. Do pozitivní kontroly bylo pouze přeneseno 100 μ l MHB bez antiseptik, zde nebyl patrný žádný nárůst bakterií. Negativní kontrola obsahovala 100 μ l MHB a 10 μ l bakteriální suspenze. V této kontrole byl zřetelný nárůst bakterií. Kontroly byly použity pro obě testované bakterie.

2.7.2.3 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byla připravena v plastové 20 ml zkumavce. Do 5 ml MHB byl přidán stěr bakterií *S. aureus* a *P. aeruginosa* kultivovaných na TSA agaru při 37 °C; dále pak byly bakterie uchovávány v chladničce po dobu jednoho týdne. Byla připravena bakteriální suspenze o absorbanci 0,1 měřena na spektrofotometru při vlnové délce 625 nm. Tato suspenze byla dále ředěna 20 \times , což odpovídá množství buněk 5 \cdot 10⁶. Do sloupců 1-6 bylo

přeneseno 10 μ l bakteriální suspenze pro *S. aureus*. Do sloupců 7-12 bylo přeneseno 10 μ l bakteriální suspenze pro *P. aeruginosa*. Destičky byly kultivovány po dobu 24 h v termostatu s integrovanou třepačkou při teplotě 37 °C ve vlhkém prostředí.

Po inkubaci byly destičky vyfotografovány pomocí analyzátoru Syngene G-box a byla vyhodnocena minimální inhibiční koncentrace (viz obr. 6).



Obr. 6: Vyhodnocení MIC – Zákal značí aktivní růst bakterií tedy negativní výsledek.

2.7.3 Stanovení antiseptické citlivosti bakteriálních biofilmů

Jedná se o kvantitativní metodu používanou pro stanovení minimální biofilmové eradikační koncentrace (MBEC), tj. minimální koncentrace antiseptik, která je schopna zastavit růst bakterií a biofilmu.

Zařízení Calgary Biofilm (CBD) je popsáno jako nová technologie pro rychlé a reprodukovatelné stanovení citlivosti biofilmu na antibiotika a antiseptika. CBD produkuje 96 ekvivalentních biofilmů pro stanovení citlivosti na antibiotika/antiseptika standardní 96-jamkovou technologií.

Tato metoda probíhá v průběhu 4 dnů. První den byl nasazen biofilm. Druhý den došlo k ovlivnění biofilmu antiseptiky. Třetí den byl biofilm vložen do růstového média MHB bez antiseptik a poslední, čtvrtý den, byl růst bakterií vyhodnocen.

2.7.3.1 Zařízení Calgary Biofilm (CBD)

CBD se skládá ze dvou částí reakční nádoby. Vrchní komponenta tvoří víko, které má 96 hrotů, a které je utěsněno na vrchu, takže hroty nemohou být odstraněny a nedojde tak ke kontaminaci. Hroty jsou navrženy tak, aby seděly v kanálech spodní komponenty – reakční nádoby – a zapadly do jamek speciální 96-jamkové destičky s postranními jamkami. Spodní část nádoby slouží k nasměrování toku média přes kolíky k vytvoření konzistentní střížné síly

přes všechny hroty, což má za následek vytvoření ekvivalentních biofilmů v každém místě hrotu. CBD je komerčně dostupný jako MBEC Assay System, jak se zařízením, tak metodou použití, a je k dispozici prostřednictvím MBEC Biofilms Technology Ltd., Calgary Alberta, Kanada.

2.7.3.2 Tvorba biofilmu

Nejprve byla připravena bakteriální suspenze. Ta byla připravena v plastové 20 ml zkumavce. Do 5 ml MHB byl přidán sěr bakterie *Staphylococcus aureus* kultivované na TSA agaru při 37 °C; dále pak byla bakterie uchovávána v chladničce po dobu maximálně jednoho týdne. Byla připravena bakteriální suspenze o absorbanci 0,1 měřena na spektrofotometru při vlnové délce 625 nm. Tato suspenze byla dále použita pro přípravu biofilmového inokula.

Do plastové 50 ml zkumavky bylo napipetováno 14 ml MHB dále pak 1 ml bakteriální suspenze a 100 µl plazmy, která byla prasečího původu a sterilizovaná přes filtr. Do každé jamky bylo pipetováno 150 µl biofilmového inokula. Destičky byly kultivovány po dobu 24 h v termostatu s integrovanou třepačkou při 110 rpm a při teplotě 37 °C ve vlhkém prostředí.

2.7.3.3 Příprava roztoků antiseptik

Antiseptika, která jsou ve formě roztoků, byla naředěna na požadovanou koncentraci pomocí MHB. Gely byly zváženy na analytických váhách a zředěny na požadovanou koncentraci pomocí MHB. Látky ve formě prášku byly zváženy na analytických váhách a rozpuštěny v MHB. Výjimkou byla antiseptika chloramid hyaluronanu (SHCl), chloramin T, chlorhexidin a chlornan sodný, která byla rozpouštěna ve sterilní vodě a triclosan, který byl rozpuštěn v DMSO. Bandáže byly nastříhány 1x1 cm a 4 dny louhovány v MHB. Pro aplikaci byly přefiltrovány přes filtr a následně aplikovány.

2.7.3.4 Ovlivnění

Do nové 96-jamkové destičky byla připravena ředící řada antiseptik. Do prvního řádku bylo napipetováno 300 µl antiseptik o dané koncentraci. Testované látky byly vždy přeneseny v dubletech. Do ostatních jamek bylo napipetováno 150 µl MHB. Pro postupné snižování koncentrace antiseptik bylo provedeno ředění dvojkovou řadou přímo v mikrotitrační destičce. Z první jamky bylo odebráno 150 µl a přeneseno do druhé jamky, dále pak do třetí, čtvrté, páté, šesté a sedmé. Z poslední (sedmé) jamky bylo odebráno 150 µl a vyhozeno do odpadu.

Biofilmy byly vytvořeny na hrotech víka CBD. Před vložením hrotů s biofilmem do připravené destičky s antiseptiky, byly hroty 3× promyty destilovanou vodou (170 µl, 1 min). Po promytí byly hroty vloženy do antiseptik a kultivovány po dobu 24 h v termostatu při teplotě 37 °C ve vlhkém prostředí.

Jako kontrola bylo použito antiseptikum Prontosan 4× ředěný, dále pak biofilm bez ovlivnění antiseptiky a dvě jamky, kde biofilm vůbec nevyrostl (Tab 2).

Tab. 2: Příklad uspořádání mikrotitrační destičky. Jednotlivé látky byly testovány vždy v dubletech. Antiseptika byla ředěna dvojkovou řadou. V tabulce je zaznamenáno, jak klesala koncentrace antiseptik ve formě gelu (sloupec 3,4,7,8,11,12) v mg/ml. U roztoků je zaznamenána rostoucí ředící řada (řádek 1,2,5,6,9,10). Jako kontrola bylo použito antiseptikum Prontosan 4× ředěný, zde nebyl patrný opakovaný nárůst biofilmu. Další forma kontroly byl biofilm bez ovlivnění antiseptiky, zde byl značný nárůst biofilmu. Poslední formou kontroly byly dvě jamky bez biofilmu.

	Látka											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	250	250	1	1	250	250	10	10	25	25
B	2	2	125	125	2	2	125	125	20	20	12,5	12,5
C	4	4	62,5	62,5	4	4	62,5	62,5	40	40	6,25	6,25
D	8	8	31,25	31,25	8	8	31,25	31,25	80	80	3,125	3,125
E	16	16	15,63	15,63	16	16	15,63	15,63	160	160	1,563	1,563
F	32	32	7,81	7,81	32	32	7,81	7,81	320	320	0,781	0,781
G	64	64	3,91	3,91	64	64	3,91	3,91	640	640	0,391	0,391
H	kont. biofilm bez ovlivnění						kont. Prontosan				kont. bez biofilmu	

2.7.3.5 Vložení do MHB

Třetí den, po ovlivnění biofilmu antiseptiky, byly hroty opět promyty destilovanou vodou (2×,170 µl, 1 min). Promyté hroty byly vloženy do destičky, kde bylo napipetováno 150 µl MHB a opět kultivovány po dobu 24 h v termostatu při teplotě 37 °C ve vlhkém prostředí.

Po inkubaci byla měřena absorbance zákalu při vlnové délce 390 nm pomocí programu Kaleido.

2.7.3.6 Barvení biofilmu

V průběhu této metody bylo provedeno barvení biofilmu a následné mikroskopování pomocí fluorescenčního mikroskopu NIKON TI-E. Biofilm byl opatrně odebrán z hrotu a přenesen na podložní sklíčko. Aby se zabránilo vyschnutí biofilmu, byl pokapán barvicím roztokem, 1 ml fyziologického roztoku, 2 μ l (1,5 mM) PI a 10 μ l (0,5 μ M) SYTO, a přikryt krycím sklíčkem. Preparát byl pozorován a vyfotografován při zvětšení 600 \times . Propidium jodid (PI) je červené fluorescenční barvivo barvicí mrtvé buňky. SYTO je zelené fluorescenční barvivo barvicí nukleovou kyselinu živých buněk.

3 VÝSLEDKY

Abychom zjistili minimální inhibiční koncentraci u 25 nejčastěji používaných a dostupných antiseptik, které se používají při léčbě chronických ran, byl proveden test diluční metodou viz Tab. 3.

Nejprve byla antiseptika rozdělena na finální produkty, které jsou běžně dostupné v lékárnách a na antiseptika u kterých lze měnit koncentraci účinné látky tzv. „koncentrovaná antiseptika“. Mezi tato „koncentrovaná antiseptika“ patří chlorhexidin, triclosan, chloramid hyaluronanu (SHCl), chloramin T, chlornan sodný.

Z antiseptik, jejichž účinná látka je jód, je nejúčinnější *Betadine*. Z antiseptik založených na účinku aktivního kyslíku je neúčinnější *Actimaris Forte*. Jako nejúčinnější antiseptikum z chlornanů se projevil *Hyalecasan*. Ze skupiny antiseptických látek s aktivní látkou PHMB byly stejně účinné prostředky *Prontosan* a *Lavanid*. *Octenilin Wound Gel* byl neúčinnější antiseptikum ze skupiny oktenidinu. Ze skupiny antiseptik, jejichž účinnou látkou je stříbro, nebylo možné určit, jaká látka je nejúčinnější, jelikož se jedná o bandáže, u kterých je důležitý faktor rozpouštění v médiu.

Koncentrace účinné látky u *S. aureus* a *P. aeruginosa* se u většiny antiseptik liší dvojnásobně. U bakterie *P. aeruginosa* byla potřeba vyšší koncentrace antiseptik.

Z tabulky 3 je také zřejmé, že na účinnost antiseptik nemá výrazný vliv koncentrace růstového média. Většina antiseptik vykazovala stejnou účinnost jako u původní koncentrace MHB. Rozdíl v účinnosti byl vidět pouze u antiseptik *KerraContact*, *Suprasorb X*, *Octenilin Wound Gel* a triclosan

Abychom zjistili minimální biofilmovou eradikační koncentraci, byl proveden test stanovení antibakteriální citlivosti na biofilm vypěstovaný metodou Calgary Biofilm. Tento test byl proveden pouze pro bakterii *S. aureus*. Biofilm vytvořený bakterií *P. aeruginosa* nebyl testován z důvodu zhoršeného růstu biofilmu, a tedy i horší reprodukce výsledků. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Přehled minimální inhibiční (MIC) a minimální biofilmové (MBEC) eradikační koncentrace testovaných antiseptik. MIC byla měřena mikrodiluční metodou. Minimální biofilmová eradikační koncentrace byla měřena pomocí metody biofilmu na hrotech (Calgary Biofilm Device). Hodnoty odpovídají hmotnosti pevné látky nebo gelu, případně ředění zásobního roztoku nebo výluhu bandáže. Každá hodnota reprezentuje tři shodná opakování (modus).

Látka/produkt	Minimální inhibiční koncentrace (MIC)				MBEC <i>S. aureus</i>
	1× MHB		2× MHB		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Jód					
Hyiodine	>4×	>4×	-	-	>4×
Betadine	80×	20×	80×	20×	16×
Stříbro					
Kerracontact Ag	2×	2×	>1×	1×	>1×
Suprasorb A + Ag	1×	1×	>1×	1×	>1×
Mepilex Ag	1×	1×	1×	1×	>1×
Aquacel Ag+	>1×	>1×	-	-	>1×
Acticoat	1×	1×	>1×	1×	>1×
Silvercel	>1×	1×	-	-	>1×
Kyslíkové radikály					
Actimaris Sensitive	>4×	>4×	-	-	1×
Actimaris Forte	4×				4×
Manukový med	8×	4×	8×	4×	>4×
Chlornany					
SHCl	2,5 mg/ml	5 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	6,25 mg/ml
Hyalecasan	>4×	>4×	-	-	>4×
Chloramin T	2,5 mg/ml	2,5 mg/ml	2,5 mg/ml	2,5 mg/ml	2,5 mg/ml
Lavanox	>4×	>4×	-	-	1×
Chlornan sodný	80×				40×
PHMB					
Lavanid	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	6,5 mg/ml	50 mg/ml	>4×
Prontosan	400×	200×	400×	100×	16×
Suprasorb X	32×	8×	16×	1×	>1×
Chlorhexidin					
Vodný roztok	0,000244%				0,004167%
Bactigras	1×	>1×	1×	>1×	>1×
Oktenidin					
Sorelex	>1×	>1×	-	-	>1×
Octenilin Wound Gel	6,25 mg/ml	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
Octenilin Wound Irrigation Solution	160×	80×	160×	40×	16×
Fenoly					
Triclosan	<0,015259 µg/ml	7,81 µg/ml	<0,975 µg/ml	3,91 µg/ml	0,488 µg/ml

Při porovnání účinnosti antiseptik na planktonické buňky a biofilm je zřejmé, že biofilm je odolnější vůči jejich účinku. Mnoho antiseptik nevykazovalo žádnou účinnost. Značný pokles účinnosti antiseptik oproti diluční metodě byl vidět u prostředků *Betadine*, *Lavanid*, *Prontosan*, vodného roztoku chlorhexidinu, *Octenilin Wound Irrigation Solution* a triclosanu. Největší pokles účinnosti mělo antiseptikum *Lavanid*, jehož účinnost se snížila až 40×. Mezi nejúčinnější „koncentrovaná antiseptika“ patřil triclosan a vodný roztok chlorhexidinu. Mezi neúčinnější finální antiseptika patřil *Prontosan* a *Octenilin Irrigation Solution*. Naopak nejméně účinná antiseptika proti biofilmu byly všechny testované bandáže, tedy *Acticoat*, *Aquacel*, *Bactigras*, *KerraContact*, *Mepilex Ag*, *Silvercel*, *Sorelex*, *Suprasorb Ag*, *Suprasorb X*, jak je vidět z Tab. 4.

Tab. 4: Přehled minimální inhibiční (MIC) a minimální biofilmové (MBEC) eradikační koncentrace testovaných antiseptik. MIC byla měřena mikrodiluční metodou. Minimální biofilmová eradikační koncentrace byla měřena pomocí metody biofilmu na hrotech (Calgary Biofilm Device). Hodnoty odpovídají procentuálnímu zastoupení účinné látky ve finálních prostředcích ve formě gelu a roztoku. Každá hodnota reprezentuje tři shodná opakování (modus).

Látka/produkt	Minimální inhibiční koncentrace (MIC)				MBEC <i>S. aureus</i>
	1× MHB		2× MHB		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Jód					
Hyiodine	>0,025 %	>0,025 %	-	-	>0,025 %
Betadine	0,0125 %	0,05 %	0,0125 %	0,05 %	0,0625 %
Kyslíkové radikály					
Actimaris Sensitiv	>0,3 %	>0,3 %	-	-	1,2 %
Actimaris Forte	0,75 %				0,75 %
Manukový med	2 %	4 %	2 %	4 %	>4 %
Chlornany					
Hyalecasan	$>7,5 \times 10^{-3}$ %	$>7,5 \times 10^{-3}$ %	-	-	$>7,5 \times 10^{-3}$ %
Lavanox	>0,02 %	>0,02 %	-	-	0,08 %
PHMB					
Lavanid	$2,5 \times 10^{-4}$ %	5×10^{-4} %	$2,5 \times 10^{-4}$ %	2×10^{-3} %	>0,01 %
Prontosan	$2,5 \times 10^{-4}$ %	5×10^{-4} %	$2,5 \times 10^{-4}$ %	1×10^{-3} %	$6,25 \times 10^{-3}$ %
Oktenidin					
Octenilin Wound Gel	$3,125 \times 10^{-4}$ %	$3,125 \times 10^{-4}$ %	$6,25 \times 10^{-4}$ %	$1,25 \times 10^{-3}$ %	$2,5 \times 10^{-3}$ %
Octenilin Wound Irrigation Solution	$3,125 \times 10^{-4}$ %	$6,25 \times 10^{-4}$ %	$3,124 \times 10^{-4}$ %	$1,25 \times 10^{-3}$ %	$3,125 \times 10^{-3}$ %

Test kontaktní inhibice je kvalitativní metoda pro stanovení citlivosti bakteriálního kmene k antiseptikům. Antiseptikum se postupně uvolňuje z gázy nebo bandáže a proniká do půdy. Naočkované bakterie se množí na půdě, ale v okolí gázy nebo bandáže se podle citlivosti množit přestávají. V určité vzdálenosti od gázy nebo bandáže přestává být antiseptikum účinné a není schopné zabránit množení bakterií. Okolo gázy nebo bandáže se vytvoří okruh značící inhibiční zónu.

Pro zjištění velikosti inhibiční zóny byl proveden test kontaktní inhibice. Velikost inhibiční zóny byla měřena celkem u 24 antiseptik, a to těch, která se nejčastěji používají při léčbě chronických ran. Stejně jako u diluční metody a stanovení citlivosti biofilmu, bylo neúčinnější „koncentrované antiseptikum“ triclosan. Z finálních antiseptik bylo neúčinnější Betadine. Velmi malá inhibiční zóna byla změřena u prostředků *Hyalecasan*, *Actimaris Sensitive*, *Lavanid* a *Bactigras*. Opět byl viditelný rozdíl mezi velikostí zóny u *S. aureus* a *P. aeruginosa*, kdy u *P. aeruginosa* byla inhibiční zóna menší než u *S. aureus*. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 5.

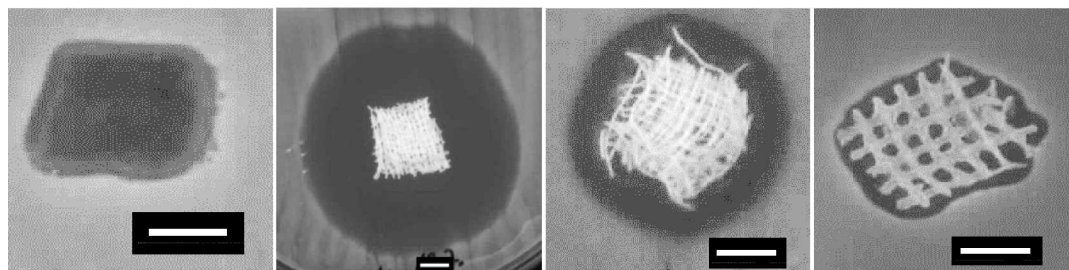
Z antiseptik, jejichž účinná látka je jód, má největší inhibiční zónu *Betadine*. Z antiseptik s účinnou látkou stříbro má největší inhibiční zónu *Suprasorb A + Ag*. Z antiseptik založených na účinku aktivního kyslíku byl neúčinnější *Mamukový med*. Antiseptika s největší inhibiční zónou z chlornanů jsou chloramid hyaluronanu (SH-Cl) a chlornan sodný. Ze skupiny antiseptických látek s aktivní látkou PHMB má největší inhibiční zónu *Suprasorb X*. *Octenilin Wound Irrigation Solution* má největší inhibiční zónu ze skupiny antiseptik s účinnou složkou oktenidin.

Tab. 5: Velikost inhibičních zón testovaných antiseptik v mm měřené metodou kontaktní inhibice.

Látka/produkt	Inhibiční zóna [mm]	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Jód		
Hyiodine	10±6	4±1
Betadine	59±27	18±5
Betadine 10× ředěné	20±5	3±1
Stříbro		
Kerracontact Ag	6±3	9±3
Suprasorb A + Ag	13±2	16±1
Mepilex Ag	4±2	3±1
Aquacel Ag+	9±1	12±1
Acticoat	8±1	12±2
Silvercel	5±1	6±2
Kyslíkové radikály		
Actimaris Sensitiv	5±3	0±0
Manukový med	35±7	8±1
Chlornany		
SHCl 25 mg/ml	16±9	3±1
Hyalecasan	2±0,4	3±1
Chloramin T 10 mg/ml	9±2	3±5
Lavanox	6±2	1±2
PHMB		
Lavanid	6±1	0±0
Prontosan	12±2	2±3
Suprasorb X	21±2	4±1
Chlorhexidin		
0,1% vodný roztok	34±5	11±2
Bactigras	4±2	2±0,3
Oktenidin		
Sorelex	3±0,5	1±1
Octenilin Wound Gel	7±1	5±1
Octenilin Wound Irrigation Solution	15±7	4±1
Fenoly		
Triclosan 25 µg/ml	115±35	5±1

Na obrázku č. 7 jsou znázorněné příklady inhibičních zón vybraných antiseptik proti bakterii *S. aureus*. Z obrázku je viditelné, jak velkou inhibiční zónu způsobilo antiseptikum triclosan.

Na obrázku č. 8 jsou znázorněné příklady inhibičních zón vybraných antiseptik proti bakterii *P. aeruginosa*.



A

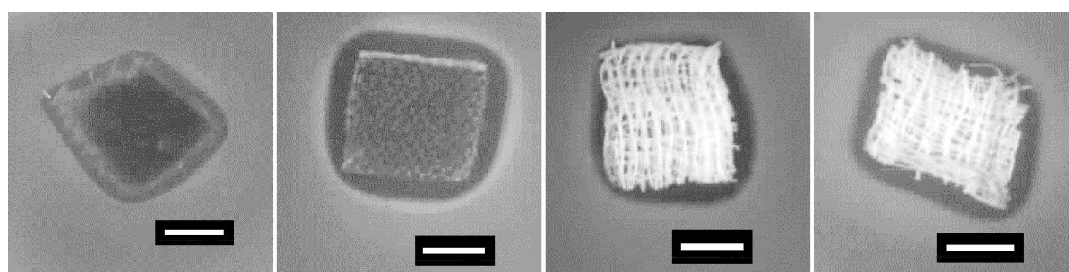
B

C

D

Obr. 7: Velikost inhibiční zóny antiseptik proti *S.aureus* na půdě MHB, metoda kontaktní inhibice

A: Suprasorb A+ Ag, B: triclosan 25 µg/ml, C: Manukový med, D: Bactigras



A

B

C

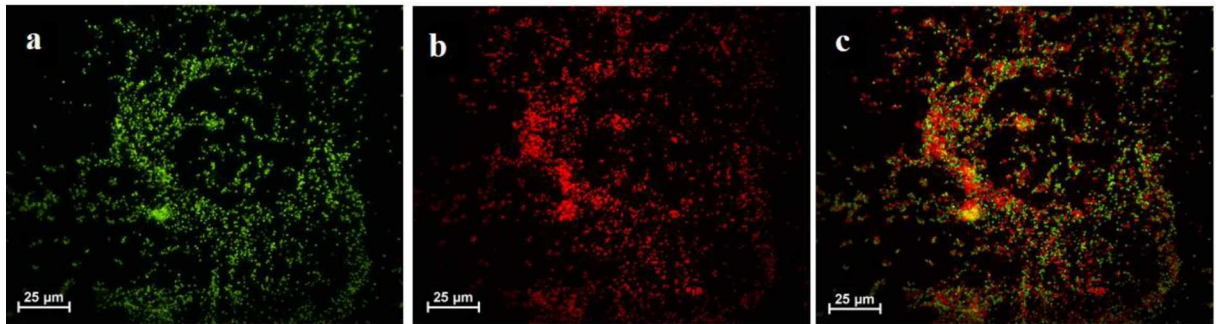
D

Obr. 8: Velikost inhibiční zóny antiseptik proti *P. aeruginosa* na půdě MHB, metoda kontaktní inhibice

A: Suprasorb A + Ag, B: Acticoat, C: chloramin T 10 mg/ml, D: chlorhexidin 0,1 % vodný roztok

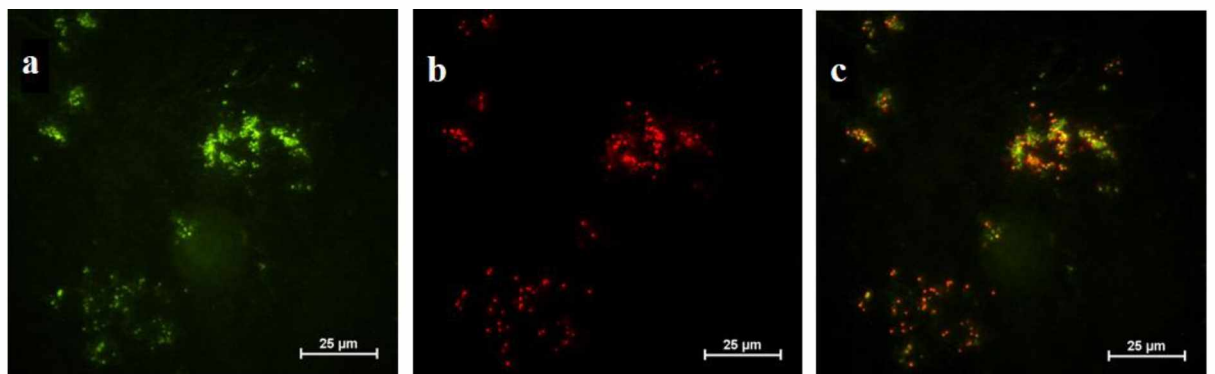
V průběhu testování citlivosti biofilmu na antiseptika bylo provedeno barvení biofilmu a následné mikroskopování pod fluorescenčním mikroskopem. Biofilm byl barven fluorescenčními barvami propidium jodid (PI) a SYTO. PI je červené fluorescenční barvivo barvicí jádra a chromozómy. Protože živé buňky nejsou propustné pro PI, používá se PI k detekci mrtvých buněk v populaci. SYTO je zelené fluorescenční barvivo barvicí nukleovou kyselinu živých a mrtvých grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Na obrázku č. 9 je znázorněné barvení kontrolního biofilmu, který nebyl ovlivněn antiseptiky. Je vidět značný nárůst biofilmu. Buňky jsou barveny zeleně ale i červeně, to značí, že v průběhu tvorby biofilmu dochází k tvorbě nových buněk ale i zániku starých buněk.



Obr. 9: Kontrolní biofilm pod fluorescenčním mikroskopem. a) zeleně jsou barveny živé buňky b) červeně jsou barveny mrtvé buňky c) překryv snímků a, b. Barvení bylo provedeno pomocí SYTO (zelená) a propidium jodid (červená)

Na obrázcích č. 10 je znázorněné barvení biofilmu po ovlivnění chlornanem sodným, který byl 80× ředěný, tedy o koncentraci 0,03625 % NaOCl. Tato koncentrace odpovídá již koncentraci, kdy nejsou bakterie v biofilmu zcela usmrceny. Z obrázků je zřejmé, že počet červeně a zeleně zbarvených buněk je přibližně stejný. Lze tedy konstatovat, že vyšší koncentrace chlornanu sodného již plně usmrcuje buňky v biofilmu. Výsledky barvení biofilmu odpovídají výsledkům měření minimální eradikační biofilmové koncentrace.



Obr. 10: Chlornan sodný 0,03625 % NaOCl pod fluorescenčním mikroskopem. a) zeleně jsou barveny živé buňky b) červeně jsou barveny mrtvé buňky c) překryv snímků a, b. Barvení bylo provedeno pomocí SYTO (zelená) a propidium jodid (červená)

4 DISKUSE

V důsledku rostoucí bakteriální rezistence na antibiotika jsou v dnešní době při léčbě chronických ran mnohem více používána lokální antiseptika. Na trhu je dostupná celá řada antiseptik s různými účinnými látkami. Bylo testováno celkem 25 dostupných antiseptických látek s aktivními složkami jako je stříbro, jód, kyslíkové radikály, chlór, PHMB, chlorhexidin, octenidin a triclosan.

Mezi antiseptika jejichž aktivní látka je jód, patří Betadine a Hyiodine. Když porovnáme naměřené hodnoty těchto dvou látek, je zřejmé, že účinnější je Betadine. Obě antiseptika se liší množstvím účinné látky ve finálním produktu. Betadine obsahuje 1 % aktivního jódu, zatím co Hyiodine je tvořen 0,1 % jódu, což má velkou roli v jejich účinnosti. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla měřena diluční metodou podle CLSI normy M07 (M07Ed11E_Methods_Dilution_Antimicrob) (Weinstein 2018). MIC antiseptika Betadine, vyjádřena v procentuálním zastoupení účinné látky, činila 0,0125 % pro bakterii *S. aureus* a pro bakterii *P. aeruginosa* byla MIC 0,05 %. U antiseptika Hyiodine nebyla stanovena MIC, jelikož množství účinné látky v produktu je nižší. MIC u produktu Hyiodine je vyšší než 0,025 % jak pro *S. aureus*, tak i pro *P. aeruginosa*. U obou těchto produktů byla také testována citlivost biofilmu, tedy minimální biofilmová eradikační koncentrace (MBEC). Tento pokus byl proveden pomocí zařízení Calgary Biofilm (CBD). MBEC byla stanovena pouze pro *S. aureus*. MBEC antiseptika Betadine činila 0,0625 %. Antiseptikum Hyiodine má MBEC vyšší než 0,025 %. Hu et al. (2018) ve své studii uvádí, že MIC antiseptika Betadine je 3,13 % pro *S. aureus* a MBEC je 12,5 %. Autor ve své studii uvádí procentuální ředění produktu Betadine. Jestliže tyto hodnoty přepočítáme na procentuální zastoupení aktivního jódu, jedná se o hodnoty 0,0313 % pro MIC a 0,125 % pro MBEC. Rozdílné koncentrace mohou být způsobeny jiným poměrem bakteriální suspenze a růstového média. Je nezbytné zmínit, že ve studii Hu et al. (2018) byl použit jiný bakteriální kmen a to ATCC 25923. Bylo také použito jiné růstové médium, a to TSB. Stejně jako v naší studii, i ve studii Hu et al. (2018) je čtyřnásobný nárůst v koncentraci potřebné pro usmrcení planktonických a biofilmových bakterií. Pro antiseptika bylo provedeno i vyšetření kontaktní inhibice, která se používá pro stanovení citlivosti bakteriálního kmene k antiseptikům. Pro prostředek Betadine byla kontaktní inhibice měřena pro dvě koncentrace. Pro neředěný roztok Betadine (1 % jód) byla změřena inhibiční zóna 59 ± 27 mm pro *S. aureus*. Pro *P. aeruginosa* byla změřena inhibiční zóna o velikosti 18 ± 5 mm. Betadine 10× ředěná (0,1 % jód) vytvořila inhibiční zónu o velikosti 20 ± 5 mm pro *S. aureus* a pro *P. aeruginosa* 3 ± 1 mm. Pro antiseptikum

Hyiodine (0,1 %) byla změřena inhibiční zóna o velikosti 10 ± 6 mm pro *S. aureus* a pro *P. aeruginosa* 4 ± 1 mm. Opět byl viditelný rozdíl účinnosti antiseptik proti *S. aureus* a *P. aeruginosa*.

Antiseptika obsahující stříbro jako aktivní složku jsou v našem případě pouze finální bandáže. V mnoha případech je velice obtížné zjistit množství účinné látky. Bandáže obsahují stříbro ve formě nanokrystalického stříbra nebo ve formě iontového stříbra. Stanovení MIC a MBEC u antiseptik ve formě bandáží je ovlivněno mnoha faktory. Jeden z hlavních faktorů by mohl být faktor rozpouštění do média. Yin, Langford, a Burrell (1999) ve své studii porovnávají antimikrobiální účinnost stříbrné bandáže *Acticoat*, dusičnanu stříbrného a sulfadiazinu stříbrného. Ze studie vyplývá, že tyto testované prostředky jsou téměř stejně účinné. Pro antiseptikum *Acticoat* byla stanovena MIC pro *S. aureus* $12,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ a pro *P. aeruginosa* $7,5 \mu\text{g} / \text{ml}$. Pro antiseptika ve formě bandáží byl také proveden test kontaktní inhibice pro určení inhibiční zóny antiseptik. Jako nejúčinnější z těchto bandáží se projevila bandáž *Suprasorb A + Ag*, jejíž inhibiční zóna měřila 13 ± 2 mm pro *S. aureus* a 16 ± 1 mm pro *P. aeruginosa*. Nejméně účinná bandáž byla *Mepilex Ag*, jejíž inhibiční zóna byla 4 ± 2 mm pro *S. aureus* a 3 ± 1 mm pro *P. aeruginosa*. Antiseptika s aktivní látkou stříbro, vykazovala téměř totožnou účinnost. Porovnáme-li námi naměřené hodnoty s hodnotami ve studii Castellana et al. (2007), liší se pouze v řádech milimetrů. Příkladem je námi naměřená inhibiční zóna antiseptika *Aquacel* pro *S. aureus*, která byla 9 ± 1 mm, a pro *P. aeruginosa* 12 ± 1 mm. Castellano et al. (2007) ve své studii uvádí pro stejný prostředek inhibiční zónu o velikosti 10 ± 1 mm pro *S. aureus* a 14 ± 1 mm pro *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* vykazuje největší inhibiční zónu z důvodu vyšší citlivosti tohoto druhu na toxicitu iontů stříbra (Mulley, Jenkins, a Waterfield 2014).

Do skupiny antiseptik založených na účinku aktivního kyslíku řadíme *Actimaris Sensitiv*, *Actimaris Forte* a *Manuka med*. U všech těchto látek se opět liší množství účinné látky. *Actimaris Sensitiv* obsahuje 1,2 % mořské soli. *Actimaris Forte* obsahuje 3 % mořské soli. Přírodní *Manukový med* obsahuje 16 % peroxidu vodíku. Tato antiseptika se od sebe liší i obsahem dalších antimikrobiálních složek. *Actimaris Sensitiv* a *Actimaris Forte* kromě mořské soli obsahují také chlorid sodný o koncentracích 0,04 % pro *Actimaris Sensitiv* a 0,2 % pro *Actimaris Forte*. Stagos et al. (2018) ve své studii prokázal, že po ošetření medu katalázou vykazuje vyšší hodnotu MIC proti *S. aureus* než neošetřený typ medu, což ukazuje, že peroxid vodíku vykazuje významnou antibakteriální aktivitu. V Manukovém medu kromě peroxidu vodíku také antimikrobiálně působí methylglyoxal 0,055 %. U těchto tří finálních

antiseptických produktů byl proveden diluční test za účelem určení MIC. MIC u antiseptika *Actimaris Sensitiv* nebyla stanovena. MIC u produktu *Actimaris Sensitiv* je vyšší než 0,3 % jak pro *S. aureus*, tak i pro *P. aeruginosa*. U antiseptika *Actimaris Forte* byla MIC testována pouze pro *S. aureus*. *Actimaris Forte* vykazuje vyšší účinnost než *Actimaris Sensitiv*. MIC prostředku *Actimaris Forte* činí 0,75 % pro *S. aureus*. Jako poslední testovaný produkt této skupiny byl *Manukový med*. *Manukový med* je přírodní produkt z Nového Zélandu a množství účinné látky se hodnotí podle parametru UMF (Unique Manuka Factor). Hodnocení UMF je otestováním antibakteriální účinnosti medu a porovnávání její hodnoty k fenolu, což je dezinfekčním prostředkem. MIC *Manukového medu* u bakterie *S. aureus* je 2 % účinné látky, což odpovídá 12,5 % množství medu. Pro bakterii *P. aeruginosa* je MIC *Manukového medu* 2× větší, tedy 4 % účinné látky, čili 25 % *Manuka medu*. Ve studiích Anand et al. (2019) a Stagos et al. (2018) byla určena MIC 6,25 % množství *Manuka medu*. Studie Safii, Tompkins, a Duncan (2017) uvádí, že množství medu inhibující růst bakterie *S. aureus* se pohybuje v rozmezí 6,3 % - 25 %. Stagos et al. (2018) ve své studii uvádí, že MIC *Manukového medu* pro *P. aeruginosa* odpovídá 12,5 % obsahu *Manuka medu* v roztoku, zatím co Anand et al. (2019) ve své studii uvádí, že MIC *Manukového medu* odpovídá 25 % množství medu v roztoku. Porovnáme-li tato tři antiseptika, je zřejmé, že nejúčinnější antiseptikum je *Actimaris Forte*. MBEC u antiseptika *Actimaris Sensitiv* činí 1,2 % účinné látky. MBEC u antiseptika *Actimaris Forte* vyšlo stejně jako MIC tedy 0,75 % účinné látky. MBEC u *Manukového medu* nebyla stanovena. MBEC *Manukového medu* činila více jak 4 %. Porovnáme-li tato tři antiseptika, je zřejmé, že nejúčinnější antiseptikum je *Actimaris Forte*. Velikost inhibiční zóny byla měřena pouze pro antiseptické produkty *Actimaris Sensitiv* a *Manukový med*. Produkt *Actimaris Sensitiv*, stejně jako při stanovení MIC, neprokázal velkou účinnost. Velikost inhibiční zóny pro *S. aureus* byla 5±3 mm. Proti bakterii *P. aeruginosa* nevykázalo antiseptikum žádnou účinnost. Naopak *Manukový med* byl při této metodě značně účinnější. Velikost inhibiční zóny pro *S. aureus* byla 35±7 mm, pro *P. aeruginosa* 8±1 mm. Porovnáme-li námi naměřené hodnoty inhibičních zón *Manukového medu* s hodnotami ze studie Stagos et al. (2018) byla určena velikost zóny pro *P. aeruginosa* přibližně stejná. Co se týče bakterie *S. aureus*, byla námi měřená velikost zóny větší o 20 mm. Tato skutečnost naznačuje, že *P. aeruginosa* je méně citlivá na antibakteriální účinky medu (Stagos et al. 2018).

Antiseptika mající aktivní složku chlór je třeba rozdělit na „koncentrovaná antiseptika“ a finální prostředky. Mezi „koncentrovaná antiseptika“ řadíme látky, které nejsou

volně prodejné a byly testovány pro další výzkumné účely. Těmito antiseptiky jsou chloramid hyaluronanu (SH-Cl), chloramin T a chlornan sodný. Mezi finální antiseptika řadíme *Hyalecasan* a *Lavanox*. Tato dvě finální antiseptika se již liší obsahem chloru. *Hyalecasan* obsahuje 0,03 % chlóru, *Lavanox* obsahuje 0,08 % chlóru. Jako u předchozích produktů tak i u *Hyalecasanu* a *Lavanoxu* byla stanovena MIC a MBEC. U obou *Hyalecasanu* i *Lavanoxu*, nebyla stanovena minimální inhibiční koncentrace. U těchto finálních antiseptik nelze říct, které antiseptikum je více účinné a které naopak méně. Pro tato antiseptika byla také stanovena minimální biofilmová eradikační koncentrace. MBEC byla stanovena pouze u antiseptika *Lavanox*, která činila 0,08 % chlóru. Pro antiseptikum *Hyalecasan* nebyla stanovena MBEC. MBEC je vyšší než $7,5 \times 10^{-3}$ % chlóru. Porovnáme-li tato dvě antiseptika diluční metodou, nelze určit, které z nich je účinnější. Ale jestliže porovnáme tyto dva finální produkty technikou kontaktní inhibice je zřejmé, že účinnějším produktem se jeví *Lavanox*. Severing et al. (2019) ve své studii porovnává účinnost finálních produktů *Lavanox* a *Actimaris Forte* pomocí metody kvantitativní suspenze. Ze zkoumaných roztoků byl *Actimaris Forte* nejúčinnějším mikrobicidním činidlem. S výjimkou nejnižší koncentrace (10 %) dosáhly všechny testované koncentrace roztoku *Actimaris Forte* silného antimikrobiálního účinku proti testovaným mikrobům *S. aureus* a *P. aeruginosa* během 15 minut. Dvě nejvyšší koncentrace (100 %, 75 %) dosáhly silného antimikrobiálního účinku již během 1 minuty. *Lavanox* měl také silné mikrobicidní účinky, ale pro dosažení požadované redukce $> 5 \log_{10}$ potřeboval minimálně 5 minut. MIC a MBEC jsme také stanovili u „koncentrovaných antiseptik“, jejichž množství účinné látky odpovídá množství látky. MIC pro antiseptikum chloramid hyaluronanu byla stanovena 2,5 mg/ml pro *S. aureus*, a 5 mg/ml pro *P. aeruginosa*. MIC pro antiseptikum chloramin T byla stanovena 2,5 mg/ml pro *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Fursted (1997) ve své studii testoval MIC pro 9 patogenů, mezi kterými byly i *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Pro antiseptikum chloramin T Fursted (1997) stanovil průměrnou minimální inhibiční koncentraci 0,857 mg/ml. Tyto odlišné hodnoty mohou být způsobené jiným typem bakterií, kdy Fursted (1997) ve své studii použil *S. aureus* (ATCC 25913), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) a 7 dalších bakterií. Další možná příčina zjištěné nižší MIC může být jiný poměr bakteriální suspenze a růstového média. Výsledky mohou být zkreslené, jelikož se jedná o průměrnou hodnotu MIC 9 patogenů. Pro antiseptikum chlornan sodný byla námi stanovena MIC 0,03625 % chlóru. Locker, Fitzgerald, a Sharp (2014) ve své studii stanovil MIC chlornanu sodného 0,0250 %. Minimální biofilmová eradikační koncentrace těchto „koncentrovaných antiseptik“ byla provedena stejně jako u finálních antiseptik. MBEC chloramidu hyaluronanu je $2,5 \times$ vyšší než MIC. Chloramin

T projevil stejnou účinnost jak proti planktonickým buňkám, tak proti biofilmu. Potřebná koncentrace chlornanu sodného pro usmrcení biofilmu je 2× vyšší než potřebná koncentrace pro usmrcení planktonických buněk. Metodou kontaktní inhibice byly testovány pouze chloramid hyaluronanu o koncentraci 25 mg / ml a chloramin T o koncentraci 10 mg / ml. V případě bakterie *P. aeruginosa* je jejich účinnost velice podobná. Pro bakterii *S. aureus* byl účinnější chloramid hyaluronanu.

Antiseptika s účinnou složkou PHMB jsou *Lavanid*, *Prontosan* a *Suprasorb X*. Všechna tato antiseptika řadíme do skupiny finálních prostředků, jejichž množství účinné látky je pro *Lavanid* 0,04 %, pro *Prontosan* 0,1 % a pro *Suprasorb X* 0,3 %. U těchto tří finálních produktů byl proveden diluční test pro stanovení MIC. Antiseptika *Lavanid* a *Prontosan* byla při testování MIC stejně účinná jak proti bakterii *S. aureus*, kdy MIC těchto finálních produktů činila $2,5 \times 10^{-4}$ %, tak i proti bakterii *P. aeruginosa*, kdy jejich MIC odpovídala 5×10^{-4} % účinné látky. Účinnost těchto dvou finálních prostředků se pouze liší v účinnosti proti biofilmu. MBEC byla stanovována pouze pro bakterii *S. aureus*. MBEC pro antiseptikum *Lavanid* nebyla stanovena. Pro antiseptikum *Prontosan* byla stanovena MBEC v hodnotě $6,25 \times 10^{-3}$ %. *Prontosan* vykazuje lepší účinnost proti biofilmu. Jelikož antiseptikum *Suprasorb X* je bandáž, tak stanovení MIC a MBEC bylo ovlivněno mnoha faktory. Jeden z nejvýznamějších faktorů by mohl být faktor rozpouštění do média. Metodou kontaktní inhibice byla zjištěna velikost inhibiční zóny proti bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Jako nejúčinnější z těchto finálních produktů byla bandáž *Suprasorb X*. Nejnižší účinnost prokázal prostředek *Lavanid*, který proti bakterii *P. aeruginosa* nebyl vůbec účinný. Jestliže porovnáme účinnost finálních prostředků proti bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa*, je vidět značný pokles účinnosti proti *P. aeruginosa*.

Antiseptika, jejichž účinná látka je chlorhexidin, dělíme na „koncentrovaná antiseptika“ a finální produkty. Jako „koncentrované antiseptikum“ byl testován vodný roztok chlorhexidinu. Jako finální produkt byla testována bandáž *Bactigras*, jejíž obsah účinné látky činí 0,5 %. Stejně jako v předchozích případech, tak i u bandáže *Bactigras* mohlo být stanovení MIC a MBEC ovlivněno mnoha faktory, především faktorem rozpustnosti do média. Vodný roztok chlorhexidinu, byl testován diluční metodou pro zjištění MIC. MIC vodného roztoku chlorhexidinu činila 0,000244 % pro *S. aureus*. MBEC bylo stanovováno pouze pro *S. aureus*. MBEC vodného roztoku chlorhexidinu pro *S. aureus* je 17× vyšší než MIC. Mazzola et al. (2009) ve své studii uvádí, že minimální inhibiční koncentrace chlorhexidinu pro *S. aureus* je 0,01 %. Takto odlišné hodnoty mohou být způsobeny odlišným

poměrem bakteriální suspenze a růstového média. Je nezbytné zmínit, že v této studii byl použit jiný bakteriální kmen, a to ATCC 25923. Bylo také použito jiné růstové médium, a to TSB. Pro stanovení citlivosti bakteriálního kmene k antiseptikům byla provedena kontaktní inhibice. U obou testovaných vzorků je zóna pro *S. aureus* větší než pro *P. aeruginosa*. Příkladem je zmenšení inhibiční zóny u vodného roztoku chlorhexidinu o koncentraci 0,1 %, kdy pro *P. aeruginosa* byla zóna o 22 mm menší než pro *S. aureus*.

Mezi testované antiseptické prostředky s účinnou složkou oktenidin řadíme finální prostředky, kterými jsou bandáž *Sorelex*, *Octenilin Wound Gel* a *Octenilin Irrigation Solution*. V prostředcích *Octenilin Wound Gel* a *Octenilin Irrigation Solution* je koncentrace oktenidinu 0,05 %. Porovnáme-li tyto produkty, *Octenilin Wound Gel* a *Octenilin Irrigation Solution*, je zřejmé, že jejich účinnost je podobná. Je to zřejmě zapříčiněno tím, že oba tyto produkty obsahují stejné množství účinné látky. Nepatrný rozdíl v jejich účinnosti může způsobovat jejich finální forma, kdy *Octenilin* ve formě gelu je nepatrně účinnější. V účinnosti proti biofilmu je jejich účinnost téměř stejná. U antiseptika *Octenilin Irrigation Solution* se účinná koncentrace látky snížila 10 \times , zatím co u antiseptika *Octenilin Wound Gel* se účinná koncentrace látky snížila 8 \times . Stanovení MIC a MBEC u antiseptik ve formě bandáží bylo opět ovlivněno mnoha faktory. Jedním z hlavních faktorů může být faktor rozpouštění do média. Proto i u bandáže *Sorelex* nelze přesně určit MIC a MBEC. Jestliže porovnáme tyto finální prostředky na základě testu kontaktní inhibice, je zjevné, že nejúčinnější byl prostředek *Octenilin Irrigation Solution*. Naopak nejméně účinný prostředek byl *Sorelex*.

Do skupiny fenolů řadíme antiseptikum triclosan zvané také jako Irgasan. Z tabulky č. 3 je zřejmé, že z testovaných antiseptik je triclosan nejúčinnější. Triclosan patří mezi „koncentrovaná antiseptika“, jejichž koncentrace se mohla v průběhu testování upravovat. U antiseptika triclosan byla naměřena minimální inhibiční koncentrace nižší než 0,015 $\mu\text{g/ml}$ pro *S. aureus*. Fan et al. (2002) ve své studii uvádí, že minimální inhibiční koncentrace triclosanu pro 31 náhodných klinických izolátů *S. aureus* bylo 0,016 $\mu\text{g/ml}$ (24 kmenů). Podle studie Assadian et al. (2011) je minimální inhibiční koncentrace triclosanu 0,125 $\mu\text{g/ml}$. Pro *P. aeruginosa* byla námi naměřena MIC triclosanu 7,81 $\mu\text{g/ml}$. Účinnost triclosanu proti biofilmu se až 32,5 \times snížila v porovnání s účinností proti planktonickým buňkám. Inhibiční zóna antiseptika triclosan při koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ pro *S. aureus* měřila 115 \pm 35 mm a pro *P. aeruginosa* byla velikost inhibiční zóny 5 \pm 1 mm. Takto odlišné velikosti inhibičních zón

korelují s velkým rozdílem koncentrací při stanovení MIC. Zde je opět vidět větší odolnost bakterie *P. aeruginosa* proti účinkům antiseptik.

Podmínky testu ovlivňují antibakteriální a cytotoxické vlastnosti stříbra, včetně typu růstového média a růstových doplňků, jako je např. fetální telecí sérum. V našem případě, kdy jsme zvýšili koncentraci růstového média MHB dvojnásobně, nedošlo téměř k žádnému ovlivnění antimikrobiální účinnosti. Mulley, Jenkins, a Waterfield (2014) ve své studii zkoumá, do jaké míry biologicky relevantní sloučeniny, jako jsou glutathion, cystein a složky lidské krve, ovlivňují toxicitu iontů stříbra vůči klinicky relevantním patogenním bakteriím ve srovnání s lidskými dermálními fibroblasty (kožními buňkami). Výsledky ukazují, že antimikrobiální účinnost je výrazně snížena přítomností extracelulárních thiolů a lidského séra.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo srovnat antimikrobiální účinnost vybraných antiseptik používaných v léčbě chronických infikovaných ran na ránové patogeny. Antiseptika byla rozdělena do osmi skupin podle účinné látky.

Antiseptické prostředky byly také rozděleny na finální prostředky a „koncentrovaná antiseptika“. Jako nejúčinnější finální prostředek se projevil *Octenilin Wound Gel* a nejúčinnějším „koncentrovaným antiseptikem“ byl stanoven triclosan. Účinnost jednotlivých antiseptických prostředků se liší podle typu účinné látky a jejího množství. Mezi nejúčinnější aktivní látky patří oktenidin, chlorhexidin a PHMB.

Antiseptické produkty se také liší svojí formou. Antiseptické produkty ve formě bandáží se před testováním jejich účinnosti musely louhovat v bakteriálním růstovém médiu MHB, a to nejméně čtyři dny. Tyto výluhy byly následně použity pro stanovení MIC a MBEC. Konečná koncentrace účinné látky ve výluhu nebyla stanovena, což mohlo způsobit nepřesnost stanovení MIC a MBEC. Další testovanou formou byly gelové antiseptické produkty. Některé gelové prostředky se značně lišily svojí rozpustností. Některá antiseptika se rozpouštěla bez komplikací, jiná pro své rozpuštění potřebovala více času. Nejlépe se pracovalo s antiseptickými prostředky ve formě roztoku. Výjimkou byl vodný roztok chlorhexidinu, který se v růstovém médiu MHB srážel. Proto bylo dvojkové ředění provedeno mimo mikrotitrační destičku ve sterilní vodě a následně přeneseno do média MHB. Těkáva antiseptika jako chlornan sodný a chloramin T byla rozpouštěna ve sterilní vodě, stejně tak chloramid hyaluronanu. Antiseptikum triclosan bylo špatně rozpustné ve vodě i MHB, a proto bylo toto antiseptikum rozpouštěno v DMSO.

Za nejrelevantnější antimikrobiální test antiseptických prostředků na rány můžeme považovat test kontaktní inhibice. Při stanovení citlivosti touto metodou nejsou výsledky ovlivněny uvolňováním účinné látky do média. Pomocí kontaktní inhibice byla prokázána účinnost jednotlivých antiseptik v jejich nejkonzentrovějším stavu.

Závěrem lze říci, že každá testovaná antiseptika i finální prostředky byly účinné. Významným faktorem působení je však množství účinné látky ve finálním produktu. Kromě účinnosti je při výběru antiseptické léčby třeba zohlednit i cytotoxicitu antiseptika, možnou alergickou reakci pacienta a možnost vzniku bakteriální rezistence při dlouhodobém užívání.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

6.1 LITERÁRNÍ ZDROJE

- ALFHILI, MOHAMMAD A., A MYON-HEE LEE. 2019. „Triclosan: An Update on Biochemical and Molecular Mechanisms". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019: 1607304. <https://doi.org/10.1155/2019/1607304>.
- ARAMWIT, PORNANONG, PORNAPROM MUANGMAN, NANTAPORN NAMVIRIYACHOTE, A TEERAPOL SRICHANA. 2010. „In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Effectiveness and Moisture Binding Properties of Wound Dressings". *International Journal of Molecular Sciences* 11 (8): 2864–74. <https://doi.org/10.3390/ijms11082864>.
- ASSADIAN, OJAN, KATRIN WEHSE, NILS-OLAF HÜBNER, TORSTEN KOBURGER, SIMONE BAGEL, FRANK JETHON, A AXEL KRAMER. 2011. „Minimum Inhibitory (MIC) and Minimum Microbicidal Concentration (MMC) of Polihexanide and Triclosan against Antibiotic Sensitive and Resistant Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli Strains". *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 6 (1): Doc06. <https://doi.org/10.3205/dgkh000163>.
- 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 (únor): 21–27.
- BARRETT, SIMON. 2009. „Mepilex Ag: An Antimicrobial, Absorbent Foam Dressing with Safetac Technology". *British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)* 18 (20): S28, S30-36. <https://doi.org/10.12968/bjon.2009.18.Sup7.45133>.
- BARRIERE, STEVEN L. 2015. „Clinical, Economic and Societal Impact of Antibiotic Resistance". *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16 (2): 151–53. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.983077>.
- BOWLER, P. G., B. I. DUERDEN, A D. G. ARMSTRONG. 2001. „Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management". *Clinical Microbiology Reviews* 14 (2): 244–69. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>.
- CARDILE, ANTHONY P., CARLOS J. SANCHEZ, SHARANDA K. HARDY, DESIREE R. ROMANO, BRADY J. HURTGEM, JOSEPH C. WENKE, CLINTON K. MURRAY, A KEVIN S. AKERS. 2014. „Dakin Solution Alters Macrophage Viability and Function". *Journal of Surgical Research* 192 (2): 692–99. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.07.019>.

- CASTELLANO, JOSEPH J., SUSAN M. SHAFII, FRANCIS KO, GUILLERMO DONATE, TERRY E. WRIGHT, RUDOLPH J. MANNARI, WYATT G. PAYNE, DAVID J. SMITH, A MARTIN C. ROBSON. 2007. „Comparative Evaluation of Silver-Containing Antimicrobial Dressings and Drugs". *International Wound Journal* 4 (2): 114–22. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x>.
- COOPER, ROSE, A KLAUS KIRKETERP-MØLLER. 2018. „Non-Antibiotic Antimicrobial Interventions and Antimicrobial Stewardship in Wound Care". *Journal of Wound Care* 27 (6): 355–77. <https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.6.355>.
- DEMIDOVA-RICE, TATIANA N., MICHAEL R. HAMBLIN, A IRA M. HERMAN. 2012. „Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care". *Advances in Skin & Wound Care* 25 (7): 304–14. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0>.
- FAN, FRANK, KANG YAN, NICOLA G. WALLIS, SHANNON REED, TERRANCE D. MOORE, STEPHEN F. RITTENHOUSE, WALTER E. DEWOLF, et al. 2002. „Defining and Combating the Mechanisms of Triclosan Resistance in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11): 3343–47. <https://doi.org/10.1128/aac.46.11.3343-3347.2002>.
- FERREIRA, GABRIELA LACET SILVA, PEDRO LUIZ ROSALEN, LARISSA RANGEL PEIXOTO, ANA LUIZA ALVES DE LIMA PÉREZ, FABÍOLA GALBIATTI DE CARVALHO CARLO, LÚCIO ROBERTO CANÇADO CASTELLANO, JEFFERSON MUNIZ DE LIMA, IRLAN ALMEIDA FREIRES, EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA, A RICARDO DIAS DE CASTRO. 2017. „Antibiofilm Activity and Mechanism of Action of the Disinfectant Chloramine T on Candida Spp., and Its Toxicity against Human Cells". *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091527>.
- FJELD, HILDE, A EGIL LINGAAS. 2016. „Polyhexanide - Safety and Efficacy as an Antiseptic". *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Raekke* 136 (8): 707–11. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.14.1041>.
- FLEMMING, HANS-CURT, THOMAS R. NEU, A DANIEL J. WOZNIAK. 2007. „The EPS Matrix: The ‚House of Biofilm Cells‘". *Journal of Bacteriology* 189 (22): 7945–47. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>.

- FUURSTED, K. 1997. „Evaluation of bactericidal activity and lag of regrowth (postantibiotic effect) of five antiseptics on nine bacterial pathogens". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40 (2): 221–26. <https://doi.org/10.1093/jac/40.2.221>.
- GOTTRUP, F., J. APELQVIST, T. BJARNSHOLT, T. BJANSHOLT, R. COOPER, Z. MOORE, E. J. G. PETERS, A S. PROBST. 2013. „EWMA Document: Antimicrobials and Non-Healing Wounds. Evidence, Controversies and Suggestions". *Journal of Wound Care* 22 (5 Suppl): S1-89. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.Sup5.S1>.
- GRICE, ELIZABETH A., A JULIA A. SEGRE. 2012. „Interaction of the Microbiome with the Innate Immune Response in Chronic Wounds". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 946: 55–68. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_4.
- HAMMOND, ERIC N., ERIC S. DONKOR, A CHARLES A. BROWN. 2014. „Biofilm Formation of Clostridium Difficile and Susceptibility to Manuka Honey". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14 (září): 329. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-329>.
- HAN, GEORGE, A ROGER CEILLEY. 2017. „Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments". *Advances in Therapy* 34 (3): 599–610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.
- HARDING, K. G., H. L. MORRIS, A G. K. PATEL. 2002. „Science, Medicine and the Future: Healing Chronic Wounds". *BMJ (Clinical Research Ed.)* 324 (7330): 160–63. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7330.160>.
- HERNANDEZ, ROBERT. 2006. „The Use of Systemic Antibiotics in the Treatment of Chronic Wounds". *Dermatologic Therapy* 19 (6): 326–37. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2006.00091.x>.
- HORROCKS, ANN. 2006. „Prontosan Wound Irrigation and Gel: Management of Chronic Wounds". *British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)* 15 (22): 1222, 1224–28. <https://doi.org/10.12968/bjon.2006.15.22.22559>.
- HU, HONGHUA, JANINE SLEIMAN, KHALID JOHANI, A KAREN VICKERY. 2018. „Hypochlorous Acid Versus Povidone-Iodine Containing Irrigants: Which Antiseptic Is More Effective for Breast Implant Pocket Irrigation?" *Aesthetic Surgery Journal* 38 (7): 723–27. <https://doi.org/10.1093/asj/sjx213>.
- CHATTOPADHYAY, MADHAB K., RANADHIR CHAKRABORTY, HANS-PETER GROSSART, GUNDLAPALLY S. REDDY, A MEDICHARLA V.

- JAGANNADHAM. 2015. „Antibiotic Resistance of Bacteria". *BioMed Research International* 2015: 501658. <https://doi.org/10.1155/2015/501658>.
- JOHNSTON, MATTHEW, MICHAEL MCBRIDE, DIVAKAR DAHIYA, RICHARD OWUSU-APENTEN, A POONAM SINGH NIGAM. 2018. „Antibacterial Activity of Manuka Honey and Its Components: An Overview". *AIMS Microbiology* 4 (4): 655–664. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655>.
- KANJI, SUMAN, A HIRANMOY DAS. 2017. „Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration". *Mediators of Inflammation* 2017: 5217967. <https://doi.org/10.1155/2017/5217967>.
- KHANSA, IBRAHIM, ANNA R. SCHOENBRUNNER, CASEY T. KRAFT, A JEFFREY E. JANIS. 2019. „Silver in Wound Care-Friend or Foe?: A Comprehensive Review". *Plastic and Reconstructive Surgery. Global Open* 7 (8): e2390. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000002390>.
- KNÖPPEL, ANNA, JOAKIM NÄSVALL, A DAN I. ANDERSSON. 2017. „Evolution of Antibiotic Resistance without Antibiotic Exposure". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01495-17>.
- LAROUCHE, JACQUELINE, SUMIT SHEORAN, KENTA MARUYAMA, A MIKAËL M. MARTINO. 2018. „Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets". *Advances in Wound Care* 7 (7): 209–31. <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0761>.
- LEAPER, D., O. ASSADIAN, A C.E. EDMISTON. 2015. „Approach to Chronic Wound Infections". *British Journal of Dermatology* 173 (2): 351–58. <https://doi.org/10.1111/bjd.13677>.
- LIPSKY, BENJAMIN A., A CHRISTOPHER HOEY. 2009. „Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds". *Clinical Infectious Diseases* 49 (10): 1541–49. <https://doi.org/10.1086/644732>.
- LOCKER, J., P. FITZGERALD, A D. SHARP. 2014. „Antibacterial Validation of Electrogenerated Hypochlorite Using Carbon-Based Electrodes". *Letters in Applied Microbiology* 59 (6): 636–41. <https://doi.org/10.1111/lam.12324>.
- LOVEČKOVÁ, YVONA. 2012. „Antibiotika v Dermatologii z Pohledu Mikrobiologa". *Dermatologie pro Praxi* 6 (2): 74–76.
- MALONE, M., T. BJARNSHOLT, A. J. MCBAIN, G. A. JAMES, P. STOODLEY, D. LEAPER, M. TACHI, G. SCHULTZ, T. SWANSON, A R. D. WOLCOTT. 2017. „The Prevalence of Biofilms in Chronic Wounds: A Systematic Review and Meta-

- Analysis of Published Data". *Journal of Wound Care* 26 (1): 20–25.
<https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.1.20>.
- MARQUARDT, C., E. MATUSCHEK, E. BÖLKE, P. A. GERBER, M. PEIPER, J. V. SEYDLITZ-KURZBACH, B. A. BUHREN, et al. 2010. „Evaluation of the Tissue Toxicity of Antiseptics by the Hen’s Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HETCAM)". *European Journal of Medical Research* 15 (5): 204–9.
<https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-5-204>.
- MAZZOLA, PRISCILA GAVA, ANGELA FAUSTINO JOZALA, LETÍCIA CÉLIA DE LENCASTRE NOVAES, PATRICIA MORIEL, A THEREZA CHRISTINA VESSONI PENNA. 2009. „Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 (2): 241–48. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200008>.
- McDONNELL, G., A. A. D. RUSSELL. 1999. „Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance". *Clinical Microbiology Reviews* 12 (1): 147–79.
- MINDEN-BIRKENMAIER, BENJAMIN A., MEGHAN B. MEADOWS, KASYAP CHERUKURI, MATTHEW P. SMELTZER, RICHARD A. SMITH, MARKO Z. RADIC, A GARY L. BOWLIN. 2019. „The Effect of Manuka Honey on DHL-60 Cytokine, Chemokine, and Matrix-Degrading Enzyme Release under Inflammatory Conditions". *Med One* 4 (2). <https://doi.org/10.20900/mo.20190005>.
- 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* 9 (4): e94409.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094409>.
- MUNITA, JOSE M., A CESAR A. ARIAS. 2016. „Mechanisms of Antibiotic Resistance". *Microbiology Spectrum* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- MURPHY, PATRICK S., A GREGORY R. D. EVANS. 2012. „Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products". *Plastic Surgery International* 2012: 190436. <https://doi.org/10.1155/2012/190436>.
- NGUYEN, ALAN V., A ATHENA M. SOULIKA. 2019. „The Dynamics of the Skin’s Immune System". *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8).
<https://doi.org/10.3390/ijms20081811>.
- OBERMEIER, ANDREAS, JOCHEN SCHNEIDER, NORBERT HARRASSER, JUTTA TÜBEL, HEINRICH MÜHLHOFER, DOMINIK PFÖRRINGER, CONSTANTIN

- VON DEIMLING, et al. 2018. „Viable Adhered Staphylococcus Aureus Highly Reduced on Novel Antimicrobial Sutures Using Chlorhexidine and Octenidine to Avoid Surgical Site Infection (SSI)". *PloS One* 13 (1): e0190912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190912>.
- OUSEY, KAREN, A CAROLINE MCINTOSH. 2010. „Understanding Wound Bed Preparation and Wound Debridement". *British Journal of Community Nursing* 15 (Sup1): S22–28. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2010.15.Sup1.46908>.
- PANASENKO, OLEG M. 1997. „The Mechanism of the Hypochlorite-Induced Lipid Peroxidation". *BioFactors* 6 (2): 181–90. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060212>.
- PECK, B., B. WORKENEH, H. KADIKOY, S. J. PATEL, A A. ABDELLATIF. 2011. „Spectrum of Sodium Hypochlorite Toxicity in Man--Also a Concern for Nephrologists". *Clinical Kidney Journal* 4 (4): 231–35. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfr053>.
- PERCIVAL, STEVEN L., A KEITH F. CUTTING, ed. 2010. *Microbiology of wounds*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- PERRY, JULIE, NICHOLAS WAGLECHNER, A GERARD WRIGHT. 2016. „The Prehistory of Antibiotic Resistance". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197>.
- PHILLIPS, P.; SAMPSON, E.; YANG, Q.; ANTONELLI, P.; PROGULSKE-FOX, A.; SCHULTZ, G. 2008. „Bacterial biofilms in wounds chronic wounds." *Wound Healing Southern Africa* 1 (2): 10–12.
- POON, VINCENT K. M., A ANDREW BURD. 2004. „In Vitro Cytotoxicity of Silver: Implication for Clinical Wound Care". *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* 30 (2): 140–47. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2003.09.030>.
- POSPÍŠILOVÁ, ALENA. 2010. „Přístupy k Léčbě Chronických Ran". *Medicina pro Praxi*, červen. <http://solen.cz/doi/10.mnmn/med.2010.066.html>.
- PUNJATAEWAKUPT, APIRUJEE, SUPAMAS NAPAVIDHAYANUN, 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* 38 (1): 39–54. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3393-5>.
- SELVARAJAH, DHARSHINI, BAPESH K. BOLLU, JOHN HARVEY, MADELEINE JACQUES, SUSAN JEHANGIR, EMILY S. FULLER, ERIK LA HEI, MONIQUE BERTINETTI, TOREY LAWRENCE, A ANDREW JA HOLLAND. 2019. „Acticoat

- versus Biobrane: A Retrospective Review on the Treatment of Paediatric Mid-Dermal Torso Burns". *International Journal of Burns and Trauma* 9 (4): 82–87.
- SEVERING, ANNA-LENA, JULIAN-DARIO REMBE, VERENA KOESTER, A EWA K STUERMER. 2019. „Safety and Efficacy Profiles of Different Commercial Sodium Hypochlorite/Hypochlorous Acid Solutions (NaClO/HClO): Antimicrobial Efficacy, Cytotoxic Impact and Physicochemical Parameters *in Vitro*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74 (2): 365–72. <https://doi.org/10.1093/jac/dky432>.
- SIDDIQUI, ABDUL R., A JACK M. BERNSTEIN. 2010. „Chronic Wound Infection: Facts and Controversies". *Clinics in Dermatology* 28 (5): 519–26. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.009>.
- SOBOTKA, L., V. VELEBNÝ, A. SMAHELOVÁ, A M. KUSALOVÁ. 2006. „[Sodium hyaluronate and an iodine complex--Hyiodine--new method of diabetic defects treatment]". *Vnitřní Lekarství* 52 (5): 417–22.
- STAGOS, DIMITRIOS, NIKOLAOS SOULITSIOTIS, CHRISTINA TSADILA, STAMATINA PAPAECONOMOU, CHARALAMPOS ARVANITIS, ALEXANDROS NTONTOS, FANI KARKANTA, et al. 2018. „Antibacterial and Antioxidant Activity of Different Types of Honey Derived from Mount Olympus in Greece". *International Journal of Molecular Medicine* 42 (2): 726–34. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3656>.
- STRYJA, JAN. 2011. *Repetitorium hojení ran 2*. Semily: Geum., ISBN 978- 80-86256-79-5.
- STRYJA, JAN. 2013. „Nové Trendy v Antimikrobiální Terapii Ran". *Interní Medicína pro Praxi* 15 (3–4): 139–41.
- TOUSIGNANT, J., A F. GIARD. 1993. „[Topical antiseptics]". *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien* 39 (únor): 381–85.
- TROTT, ALEXANDER T. 2012. „Chapter 7 - Wound Cleansing and Irrigation". In *Wounds and Lacerations (Fourth Edition)*, editoval Alexander T. Trott, 73–81. Philadelphia: W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07418-6.00007-1>.
- VELNAR, TOMAZ, T. BAILEY, A V. SMRKOLJ. 2009. „The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms". *The Journal of International Medical Research* 37 (5): 1528–42. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>.
- WEATHERLY, LISA M., A JULIE A. GOSSE. 2017. „Triclosan Exposure, Transformation, and Human Health Effects". *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 20 (8): 447–69. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1399306>.

- WEINSTEIN, MELVIN P. 2018. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.
- WILLIAMSON, DEBORAH A., GLEN P. CARTER, A BENJAMIN P. HOWDEN. 2017. „Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns". *Clinical Microbiology Reviews* 30 (3): 827–60. <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-16>.
- 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: Analysis of Wound Microbiota in 2,963 Patients". *Wound Repair and Regeneration* 24 (1): 163–74. <https://doi.org/10.1111/wrr.12370>.
- YELIN, IDAN, A ROY KISHONY. 2018. „Antibiotic Resistance". *Cell* 172 (5): 1136-1136.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.018>.
- YIN, H. Q., R. LANGFORD, A R. E. BURRELL. 1999. „Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of ACTICOAT Antimicrobial Barrier Dressing". *The Journal of Burn Care & Rehabilitation* 20 (3): 195–200. <https://doi.org/10.1097/00004630-199905000-00006>.

6.2 INTERNETOVÉ ZDROJE

- „ActiMaris forte Wundspüllösung - Einfache und natürliche Wundheilung". b.r. *ActiMaris* (blog) [online]. [cit. 2020-02-20] Dostupné z: <https://www.actimaris.com/portfolio/actimaris-wundspuelloesung-forte/>.
- „ActiMaris sensitiv Wundspüllösung - Einfache und natürliche Wundheilung". b.r. *ActiMaris* (blog) [online]. [cit. 2020-02-18] Dostupné z: <https://www.actimaris.com/portfolio/actimaris-wundspuelloesung-sensitiv/>.
- „Alginates". b.r. Advanced Medical Solutions Group plc. [online]. [cit. 2020-02-29] Dostupné z: <https://www.admedsol.com/our-divisions/woundcare/fibres/>.
- „Gely na rány LAVANID®". b.r. SERAG-WIESSNER. [online]. [cit. 2020-02-25] Dostupné z: <https://www.serag-wiessner.de/cs/vyrobky/roztoky/gely-na-rany-lavanidr/>.
- „HyalEcaSan 50ml gelové krytí, vysoký obsah kys.hyaluronové". b.r. Lékárna Scarabeus. [online]. [cit. 2020-02-29] Dostupné z: <https://www.lekarnasporilov.cz/zobrazit->

vsechny-produkty/zobrazit-produkty/hyalecasan-50ml-gelove-kryti-vysoky-obsah-kys-hyaluronove.html.

- „KerraContact Ag a silver wound contact dressing | Crawford Healthcare". b.r. [online]. [cit. 2020-03-01] Dostupné z: <https://www.crawfordhealthcare.com/woundcare/kerracontact-ag>.
- „LAVANOX® wound irrigation solution and wound spray". b.r. SERAG-WIESSNER. [online]. [cit. 2020-02-25] dostupné z: <https://www.serag-wiessner.de/en/products/solutions/lavanox-wound-irrigation-solution-wound-spray/>.
- „Levaquin (levofloxacin) Antibiotic Side Effects, Uses & Dosage". b.r. MedicineNet. [online]. [cit. 2020-03-21] Dostupné z: <https://www.medicinenet.com/levofloxacin/article.htm>.
- „schülke - octenilin® wound gel". b.r. [online]. [cit. 2020-03-03] dostupné z: <https://www.schuelke.com/cz-cs/products/octenilin-wound-gel.php>.
- „schülke - octenilin® wound irrigation solution". b.r. [online]. [cit. 2020-03-03] dostupné z: <https://www.schuelke.com/cz-cs/products/octenilin-wound-irrigation-solution.php>.
- „Sorelex na povrchové rány". b.r. aktivnihojeni.cz. [online]. [cit. 2020-02-24] Dostupné z: <https://www.aktivnihojeni.cz/sorelex>.
- „Suprasorb A + Ag". b.r. L&R Česká republika. [online]. [cit. 2020-03-01] Dostupné z: <https://www.lohmann-rauscher.com/cz-cs/produkty/osetreni-rany/moderni-osetreni-rany/suprasorb-a-ag/>.
- „Suprasorb X + PHMB". b.r. L&R Česká republika. [online]. [cit. 2020-03-02] Dostupné z: <https://www.lohmann-rauscher.com/cz-cs/produkty/osetreni-rany/moderni-osetreni-rany/suprasorb-x-phmb/>.