

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Bc. Markéta Sojmová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Schopnost vybraných antiseptik vyvolat bakteriální rezistenci

Bc. Markéta Sojmová

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

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

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Sojmová**  
Osobní číslo: **C19590**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Schopnost vybraných antiseptik vyvolat bakteriální rezistenci**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Teoretická část – bude obsahovat:

Přehled vybraných antiseptik, mechanismů jejich působení a současný stav poznání v problematice antiseptiky indukované antiseptické rezistence a zkřížené rezistence na antibiotika vyvolaná antiseptiky.

Experimentální část – bude obsahovat dílčí kroky:

V rámci této práce bude testována schopnost minimálně třech různých antiseptických látek (stříbro, oktenidin, chlorhexidin) indukovat zvýšenou odolnost na daná antiseptika u zástupců běžných patogenů chronických ran, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, kteří zároveň představují zástupce Gram pozitivních, respektive Gram negativních, mikroorganismů. Dojde-li k selekci rezistentních kmenů, bude u nich otestována citlivost na další antiseptika a vybraná antibiotika. Případně bude sledován mechanismus zvýšené rezistence.

Vypracovaná diplomová práce bude odpovídat směrnici 7/2019 Univerzity Pardubice.

Rozsah pracovní zprávy: 35 s.  
Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: Mgr. Vojtěch Pavlík  
Contipro a.s.  
Datum zadání diplomové práce: 18. prosince 2020  
Termín odevzdání diplomové práce: 7. května 2021

LS.

---

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

---

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

## **Prohlašuji:**

Práci s názvem „**Schopnost vybraných antiseptik vyvolat bakteriální rezistenci**“ 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 § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí 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 13. 07. 2021

Bc. Markéta Sojmová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce paní doc. Ing. Marcele Pejchalové Ph.D. za poskytnuté rady při zpracování této práce. Především bych ale chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Vojtěchovi Pavlíkovi, za veškerou ochotu, trpělivost, a hlavně ten čas, který mi poskytl v průběhu celého vypracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala společnosti Contipro a.s, v které jsem svojí diplomovou práci mohla vykonat a umožnili mi přístup do jejich laboratoří i v této době. V neposlední řadě také děkuji své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá schopností antiseptických látek (chlorhexidin, oktenidin, SHCl, octan stříbrný) indukovat rezistenci v zástupcích běžných patogenů chronických ran. Zástupcem z gram pozitivních bakterií je *Staphylococcus aureus* a z gram negativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Teoretická část se pak věnuje chronickým ranám a jejich hojení, zástupcům antiseptických látek a bakteriální rezistenci. V praktické části se zabývám minimální inhibiční koncentrací antiseptik, stanovením lipopolysacharidů a vliv effluxu na rezistenci.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Chronická rána, bakteriální rezistence, antiseptika, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, minimální inhibiční koncentrace, efflux

## **TITLE**

The ability of selected antiseptics to induce bacterial resistance

## **ANNOTATION**

This diploma thesis deals with the ability of antiseptic substances (chlorhexidine, octenidine, SHCl, silver acetate) to induce resistance in the representatives of common pathogens of chronic wounds. The representative observed from gram-positive bacteria is *Staphylococcus aureus* and from gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. The theoretical part then deals with chronic wounds and their healing, representatives of antiseptic substances and bacterial resistance. In the practical part I deal with the minimum inhibitory concentration of antiseptics, determination of lipopolysaccharides and the effect of efflux on resistance.

## **KEYWORDS**

Chronic wound, bacterial resistance, antiseptics, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, minimum inhibitory concentration, efflux

## Obsah

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>12</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>13</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>13</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>14</b>
<b>TERMINOLOGIE.....</b>	<b>16</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>17</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>18</b>
1.1 ANATOMIE KŮŽE.....	18
1.2 RÁNA.....	19
1.3 HOJENÍ RAN .....	19
1.3.1 Historie léčby ran.....	20
1.3.2 Buněčné aspekty hojení ran .....	20
1.3.2.1 Hemostáza.....	22
1.3.2.2 Zánět .....	22
1.3.2.3 Proliferace.....	23
1.3.2.4 Remodelace.....	24
1.3.3 Rozdělení průběhu hojení ran .....	25
1.3.3.1 Primární hojení .....	25
1.3.3.2 Primární odložené hojení .....	25
1.3.3.3 Sekundární hojení .....	25
1.3.3.4 Chronický průběh hojení .....	26
1.4 CHRONICKÉ RÁNY.....	26
1.4.1 Faktory ovlivňující hojení ran.....	27
1.4.1.1 Rod Staphylococcus.....	28
1.4.1.2 Rod Pseudomonas .....	29
1.4.2 Biomarkery chronických ran .....	30
1.4.3 Bakteriální identifikace.....	30
1.4.3.1 Reakce Pseudomonas aeruginosa na antiseptika .....	31
1.4.4 Vhodná terapie.....	31
1.4.4.1 Topická antiseptika .....	32



1.4.4.2	Antiseptické krytí.....	32
1.5	ANTISEPTIKA .....	33
1.5.1	Stříbro .....	34
1.5.1.1	Rezistence vůči stříbru.....	35
1.5.1.2	Antimikrobiální mechanismus působení stříbra .....	36
1.5.1.3	Cytotoxicita.....	36
1.5.2	Nano-stříbro AgNP .....	37
1.5.2.1	Cytotoxicita.....	38
1.5.2.2	Aplikace nano-stříbra.....	39
1.5.3	Chlor .....	40
1.5.3.1	Rezistence vůči antiseptikům obsahující chlor .....	41
1.5.3.2	Antimikrobiální mechanismus působení .....	41
1.5.4	Oktenidin® .....	41
1.5.4.1	Cytotoxicita Oktenidinu.....	42
1.5.4.2	Antimikrobiální mechanismus působení .....	42
1.5.4.3	Rezistence na oktenidin .....	42
1.5.5	Chlorhexidin .....	43
1.5.5.1	Cytotoxicita.....	43
1.5.5.2	Antimikrobiální mechanismus působení .....	43
1.5.5.3	Rezistence na chlorhexidin .....	44
1.6	BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE NA ANTISEPTIKA .....	45
1.6.1	Mechanismus vnitřní bakteriální rezistence .....	46
1.7	BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA .....	46
1.7.1	Vnitřní odolnost .....	47
1.7.2	Získaná odolnost .....	48
1.7.3	Mechanismy rezistence.....	48
1.8	KŘÍŽOVÁ REZISTENCE.....	48
1.8.1	Rozšířená křížová rezistence .....	49
1.9	BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE ANTISEPTIKA VS. ANTIBIOTIKA .....	49
1.10	EFFLUXNÍ PUMPY .....	49
1.11	ZMĚNY VE SLOŽENÍ LPS JAKO OCHRANA PŘED PŮSOBENÍM ANTISEPTIK.....	52
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>53</b>
2.1	MATERIÁL .....	53

2.1.1	Laboratorní pomůcky.....	53
2.1.2	Laboratorní přístroje .....	53
2.1.3	Software .....	53
2.1.4	Bakterie.....	54
2.1.4.1	Příprava bakterií.....	54
2.1.5	Antiseptika.....	55
2.1.5.1	Příprava antiseptik .....	56
2.1.6	Příprava roztoků.....	56
2.1.6.1	Akrylamid (AA) 30% .....	56
2.1.6.2	Tris (1,5 M) + tetramethylethylenediamin (TEMED), pH 8,9 .....	56
2.1.6.3	Tris (0,5 M) + TEMED, pH 6,9.....	56
2.1.6.4	SDS (sodium dodecyl sulfát) 10%.....	56
2.1.6.5	APS (ammonium persulfát) 3%.....	56
2.1.6.6	Pufr pro elektroforézu 10krát (zásobní roztok-SS) .....	56
2.1.6.7	Vzorkový pufr (6x Laemmli pufr) .....	57
2.1.7	Příprava gelů na elektroforézu.....	57
2.1.8	Příprava vzorků pro stanovení LPS .....	58
2.1.9	Příprava bakterií pro extrakci .....	59
2.1.10	Materiál pro barvení lipopolysacharidů Pro-Q® Emerald 300.....	59
2.1.10.1	Příprava roztoků pro barvení LPS .....	60
2.2	METODY .....	61
2.2.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) .....	61
2.2.1.1	Příprava mikrotitrační destičky.....	61
2.2.1.2	Vyhodnocení MIC podle zákalu .....	61
2.2.1.3	Opakovaná inkubace bakterií s antiseptiky .....	62
2.2.2	Elektroforéza.....	62
2.2.2.1	Postup elektroforézy LPS .....	63
2.2.3	Identifikace rezistentních bakterií zprostředkovaných effluxní pumpou metodou ethidium bromid agaru.....	64
2.2.3.1	Postup experimentu.....	64
2.2.4	Stanovení lipopolysacharidů za pomoci soupravy Lipopolysacharid Pro-Q® Emerald 300.....	64
2.2.4.1	Princip.....	65
2.2.4.2	Postup barvení.....	65

2.2.4.3	Excitační a emisní spektra barviv Pro-Q Emerald 300 a SYPRO Ruby.....	66
2.3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	67
2.3.1	Vývoj MIC v čase.....	70
2.3.1.1	Ověření MIC.....	72
2.3.2	Stanovení křížové rezistence antiseptik a antibiotik.....	73
2.3.3	Zobrazení gelů při stanovení LPS.....	75
2.3.4	Vyhodnocení identifikace rezistentních bakterií.....	77
<b>3</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>84</b>
<b>4</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA:.....</b>	<b>86</b>

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Anatomie kůže .....	18
<b>Obrázek 2:</b> Fáze hojení ran .....	21
<b>Obrázek 3:</b> Hojení rány – zánětlivá fáze .....	23
<b>Obrázek 4:</b> Hojení rány – proliferační fáze .....	24
<b>Obrázek 5:</b> Hojení rány–remodelace .....	25
<b>Obrázek 6:</b> Faktory přispívající k chronickému hojení rány .....	28
<b>Obrázek 7:</b> Antimikrobiální účinek Ag .....	34
<b>Obrázek 8:</b> Buňka vystavená účinku Ag iontů .....	38
<b>Obrázek 9:</b> Antimikrobiální mechanismy nanočástic stříbra .....	39
<b>Obrázek 10:</b> Mechanismy rezistence .....	48
<b>Obrázek 11:</b> Typy pump a vylučování substrátů .....	50
<b>Obrázek 12:</b> Effluxní systém RND AcrAB–TolC gramnegativní bakterie .....	51
<b>Obrázek 13:</b> Vyhodnocení MIC a subMIC .....	62
<b>Obrázek 14:</b> Elektroforéza .....	63
<b>Obrázek 15:</b> Excitační a emisní spektra barviv Pro–Q Emerald 300 a SYPRO Ruby .....	66
<b>Obrázek 16:</b> Stanovení lipopolysacharidu pomocí LPS sady, po 90 minutách .....	75
<b>Obrázek 17:</b> Stanovení lipopolysacharidu pomocí LPS sady, po 120 minutách .....	76
<b>Obrázek 18:</b> Plotna bez fluorescenčního barviva .....	77
<b>Obrázek 19:</b> Plotna s koncentrací 0,5 mg/l fluorescenčního barviva .....	78
<b>Obrázek 20:</b> Plotna s koncentrací 1 mg/l fluorescenčního barviva .....	78
<b>Obrázek 21:</b> Plotna s koncentrací 2 mg/l fluorescenčního barviva .....	79
<b>Obrázek 22:</b> Plotna s koncentrací 3 mg/l fluorescenčního barviva .....	79
<b>Obrázek 23:</b> Plotna s koncentrací 4 mg/l fluorescenčního barviva .....	80
<b>Obrázek 24:</b> Plotna s koncentrací 5 mg/l fluorescenčního barviva .....	80
<b>Obrázek 25:</b> Plotny s koncentrací fluorescenčního barviva od 0 do 2 mg/l .....	81
<b>Obrázek 26:</b> Plotny s koncentrací fluorescenčního barviva od 3 do 5 mg/l .....	81

## Seznam grafů

<b>Graf 1:</b> Závislost počtu buněk v akutní ráně na čase .....	19
<b>Graf 2:</b> MIC v čase AgAc .....	70
<b>Graf 3:</b> MIC v čase SH-Cl .....	71
<b>Graf 4:</b> MIC v čase Chlorhexidin .....	71
<b>Graf 5:</b> MIC v čase Oktenidin .....	72

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Typy effluxních pump .....	50
<b>Tabulka 2:</b> Složení jednotlivých agarů .....	54
<b>Tabulka 3:</b> Hmotnost agarů .....	55
<b>Tabulka 4:</b> Složení Müller-Hinton bojón .....	55
<b>Tabulka 5:</b> Testovaná základní antiseptika .....	55
<b>Tabulka 6:</b> Množství separační gel .....	58
<b>Tabulka 7:</b> Množství zaostřovací gel .....	58
<b>Tabulka 8:</b> Množství na 10 ml 2x SDS pufr .....	59
<b>Tabulka 9:</b> Množství fixačního roztoku .....	60
<b>Tabulka 10:</b> Množství promývacího roztoku .....	60
<b>Tabulka 11:</b> subMIC a MIC pro octan stříbrný AgAc .....	68
<b>Tabulka 12:</b> subMIC a MIC pro derivát hyaluronátu SH-Cl .....	68
<b>Tabulka 13:</b> subMIC a MIC pro Chlorhexidin .....	69
<b>Tabulka 14:</b> subMIC a MIC pro Octenidin .....	69
<b>Tabulka 15:</b> Ověření MIC v čase na začátku a na konci pasáží .....	72
<b>Tabulka 16:</b> Přehled další testovaných antibiotik a antiseptik .....	73
<b>Tabulka 17:</b> Výsledky antibiotik a antiseptik .....	73

## Seznam použitých zkratek

AA	akrylamid
Ab	protilátka
ABC	„ATP-binding cassette“
AgNP	nano stříbro
APS	peroxodisíran amonný (ammonium persulfate)
ATP	adenosintrifosfát
BME	$\beta$ -merkaptoethanol
CFU	„Colony Forming Units“ - jednotky tvořící kolonie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGR	elektroretinogram
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay → enzymová imunoanalýza
G <sup>-</sup>	gram negativní
G <sup>+</sup>	gram pozitivní
CHX	chlorhexidin
IEP	transportní protein ve vnitřní membráně
IL-6	interleukin-6
LPS	lipopolysacharid
MATE	„Multidrug and toxic compound extrusion“
MDR	multirezistentní bakterie
MDR	multirezistentních effluxních systémů
MFS	„Major Family Facilitator Superfamily“
MHB	Müller-Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid

OctWIS	antiseptický prostředek oktenilin® wound irrigation solution
OD	optická hustota
OEP	protein vnější membrány
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gel
PBP	penicilin vázající proteiny
PBS	fosfátový pufr
PEP	přídavný protein v periplazmě
PHMB	polyhexamethylen biguanid
PVP-I	polyvinylpyrrolidon
RND	„Resistance–Nodule–cell Division“
ROS	kyslíkové radikály (reaktivní formy kyslíku)
SDS	dodecylsulfát sodný
SMR	„Small Multidrug Resistance“
subMIC	subminimální inhibiční koncentrace
TNF	tumor nekrotický faktor

## Terminologie

Biomarker	objektivně měřitelný a uznávaný indikátor určitého biologického či patologického stavu nebo odpovědí na terapeutický zásah (podmínky)
Blank	slepý vzorek, minimalizuje subjektivní a nepřesné vlivy
Inokulum	suspenze bakterií v médiu, slouží k přenosu na kultivační půdy
Kultivace	rozmnožování a pěstování mikroorganismů
Pelet (precipitát)	sraženina, která se objeví v čirém roztoku po chemické reakci nebo změnou fyzikálních vlastností (stočení na centrifuze)
Resuspendace	buňky v suspenzi stočeny na centrifuze (pelet buněk opětovně rozptýlen)
Supernatant	tekutina nad sedimentem, vzniká po stočení nebo po chemické reakci
Exsudát	zánětlivý výpotek z krevních a mízních cest
Kvorum	mechanismus mezibuněčné komunikace, bakterie vnímají a přizpůsobují se dalším bakteriím
Efluxní pumpy	proteiny zodpovědné za aktivní vyčerpání, vyloučení toxických látek z buňky, odpovídají za zkříženou rezistenci



## Úvod

Tato diplomová práce se zabývá rezistencí antiseptik a problematikou hojení chronických ran. Za ránu se pokládá nějakým způsobem porušené kožní krytí. Naruší se tím bariéra mezi vnitřním a vnějším prostředím. Samotné hojení je velmi složitý proces doprovázený buněčnými poruchami, což ve většině případů vede k tvorbě nehojících se chronických ran. Rozdíl chronické rány od akutní je doba hojení. Chronické rány se pomalu hojí a v prvních 6 až 9 týdnech nevykazují náznak hojení. Jde o zásadní zdravotní problém postihující značnou část populace.

Hojení ran má několik fází. Hned na začátku dochází k migraci leukocytů do místa poranění. Dojde k vytvoření fibrinové matrice a začíná hemostáza. Velkým přílivem neutrofilů se uvolňuje z žírných buněk větší množství prozánětlivého histaminu a vzniká otok a zánět rány. Nadměrný zánět představuje riziko ve tvorbě nekróz a porušení tkáně. Následnou proliferační fází dochází k migraci fibroblastů, keranocytů, vyplnění mezer a celkové remodelaci rány.

Problém špatného hojení ran trápí lidstvo od pradávna. Už za doby starověku používali Egypťané suché obvazy i vlhké krytí. Dále se poprvé podrobněji popsal a klasifikoval zánět. V infikovaných ranách se prokázala přítomnost bakterií. Zásadní rozkvět v léčbě nastal až za objevu antiseptik a antibiotik (20. století). Častějším používáním těchto přípravků však začala vznikat rezistence.

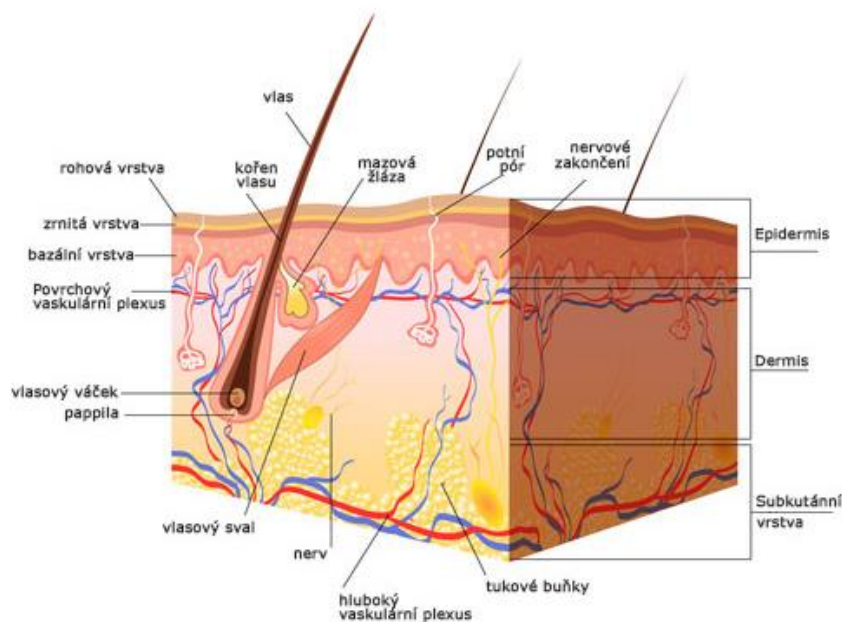
Pro léčbu chronických ran je důležité použití vhodného krytí obsahujícího antimikrobiální látky. Vhodnou léčbou dokážeme snížit biologickou zátěž a zajistit tak dostatečnou kontrolu nad infekcí rány. Pro chronické rány jsou vhodnější antiseptika, protože na rozdíl od antibiotik působí širokospektrálně a neselektivně. Tudiž je mnohem náročnější a těžší vytvořit proti nim bakteriální rezistenci. V této práci jsou popsány možné druhy antiseptik, způsob působení a vznik bakteriální rezistence.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit indukci rezistence patogenů vůči vybraným antiseptikům (chlorhexidin, oktenidin, stříbro a chloramid hyaluronanu) u běžných patogenů chronických ran. Zástupcem gram pozitivních bakterií je *Staphylococcus aureus* a gram negativních *Pseudomonas aeruginosa*.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Anatomie kůže

K největším orgánům lidského těla patří kůže. Povrch kůže dospělého člověka tvoří až 2 m<sup>2</sup>. Mezi hlavní funkce kůže patří: tvořit bariéru mezi vnějším a vnitřním okolím, udržovat stálou tělesnou teplotu, syntéza melaninu a vitaminu D, vylučovat chemické látky z těla potními a mazovými žlázami, regulovat teplo, chlad a bolest. Skládá se z pokožky (epidermis), škály (dermis) a podkoží (hypodermis) viz obrázek 1. Tyto vrstvy se od sebe liší strukturou a funkcí každé vrstvy.



**Obrázek 1:** Anatomie kůže (Pokorná a Mrázková, 2012)

Epidermis tvoří vrchní část kůže. Tvoří jí mnoho vrstev dlaždicových a kmenových buněk, které dokážou regenerovat kůži. Buňky, než se přesunou k povrchu kůže, se množí v bazální vrstvě. Pokožka se regeneruje během 28 dnů. Přejít epidermis na dermis je zvlněný, což ve stáří způsobí snadnější tvorbu puchýřů a ran (Pokorná a Mrázková, 2012).

Dermis je tvořena papilami (výběžky). Směrem dolů dojde k přechodu na tukovou tkáň, která obsahuje kolagenní a elastická vlákna. Tyto vlákna vytvoří svazky a prostorovou síť. Poranění kůže v linii těchto svalů dojde k lepšímu zahojení. V případě, že je rána přímo v těchto vláknech, může dojít k rozevírání a tvorbě jizev (Stryja et al., 2016).

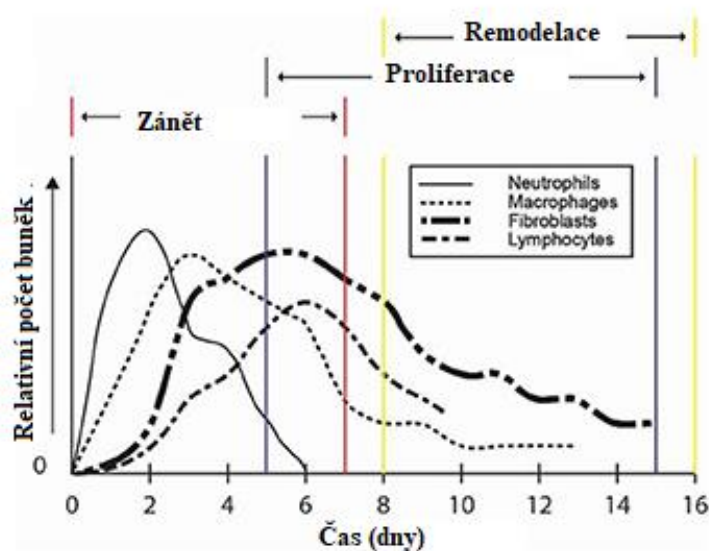
Nejhlubší částí kůže je hypodermis. Tvořena je z tukových buněk, specifických vláken a krevních cév. Podkožní vrstva je v jednotlivých částech těla a mezi pohlavími různá. Nejsilnější bývá na hýždích a břiše. Nejslabší je na očních víčkách (*Pokorná a Mrázková, 2012*).

## 1.2 Rána

Za ránu se pokládá jakékoliv porušení kožního krytu. Naruší se tím bariéra mezi vnitřním a vnějším prostředím. Rána může být různě hluboká. Příčin vzniku ran je mnoho. Mezi externí příčiny řadíme např.: dermatitidy, infekce, patologický tlak, trauma. Do příčin interních řadíme: poruchy krvetvorby, neuropatie, metabolické poruchy, autoimunitní onemocnění. Rány dělíme na povrchové a hluboké, dále lze dělit podle vzniku rány na mechanické (řezné, střelné, tržné, zhmožděné...), chemické (kyseliny a zásady), termické (popáleniny, omrzliny), aktinické (rádiové záření). Další dělení je podle délky léčby na akutní rány a chronické rány (*Valenta, 2007; Han a Ceilley, 2017*).

## 1.3 Hojení ran

Hojení ran je proces složitý a dynamický provázený buněčnými událostmi, které umožňují opravit poškozenou tkáň. V případě poškození daných buněčných procesů spojené s hojením ran, může vést ke tvorbě nehojících chronických ran. Primárními rizikovými faktory vzniku těchto ran je vysoký věk a nekontrolovaný diabetes (*Wilkinson a Hardman, 2020*).



**Graf 1:** Závislost počtu buněk v akutní ráně na čase (*Ashley, 2018*)

Graf číslo 1 znázorňuje množství buněčné migrace imunitních buněk (neutrofil, makrofág, fibroblast, lymfocyty) při různých fázích rány v průběhu času.

### 1.3.1 Historie léčby ran

Problematikou hojení ran se lidstvo zabývá už od pradávna. Ze starověkého Egypta (1650 př. n. l.) jsou na papyru záznamy, že už Egypťané výrazně začali využívat suchých obvazů v péči o čisté rány. U infikovaných ran zase užívali vlhké krytí. Hippokrates (400 př. n. l.) poukazyval na význam infekce při hojení ran. Ve starověkém Římě (5 př. n. l.–50 n. l.) došlo ke klasifikaci zánětu. Zato zkušenosti a myšlenky od řeckého lékaře Galéna (200 n. l.) se využívalo až do 15. století. Čistění otevřených ran válečných poranění a amputací hmyzími larvami byl popsán za vlády Karla IV. (*Koutná, 2010; Porter, 2001*).

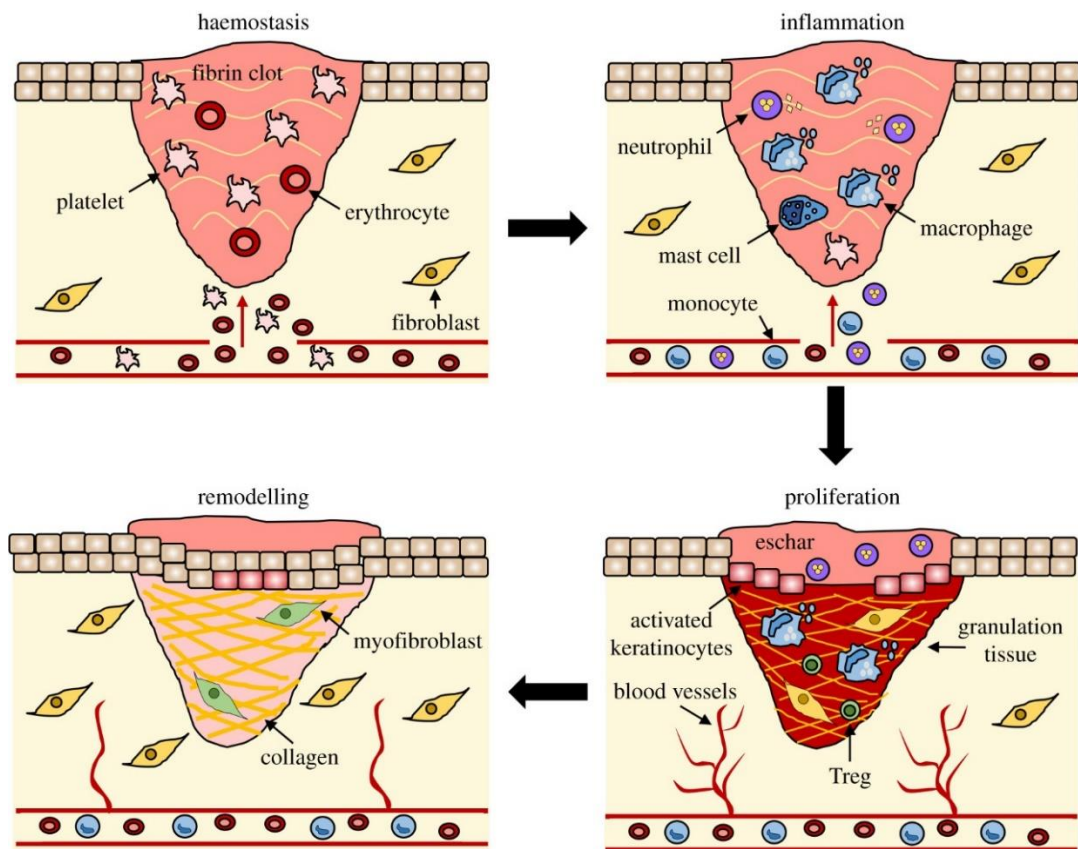
Velký rozkvět v hojení ran nastal při objevu antiseptiky a aseptiky. Robert Koch (1843–1910) zjistil přítomnost stafylokoků v hnisu. Obrovský zlom nastal objevem antibiotik Alexandrem Flemingem (1928). Profesor Winter (1962) popsal význam tzv. mokrého hojení. Zdůraznil, že v případě, že ránu udržujeme ve vlhkém prostředí, dochází z rychlejšímu uzdravení a remodelaci tkáně. Roku 1968 Fox začal používat na hojení ran krém s obsahem sulfadiazinu stříbra. Na antibiotika v 70. letech 20. století začala vznikat rezistence, proto se začalo více využívat stříbro na hojení ran (*Stryja et al., 2016*).

### 1.3.2 Buněčné aspekty hojení ran

Pokožka se denně vystavuje vnějšímu prostředí a poskytuje řadu důležitých funkcí, která ji ochrání. Od udržování teplotní stability po snímání vnějších podnětů a bolesti. Primární funkcí pokožky zůstává obranná bariéra, která zamezuje vysychání, mechanickému, chemickému a tepelnému poškození vnitřních struktur. Obrana pokožky souvisí i s imunitní bariérovou reakcí, která chrání před patogenní infekcí (*Broughton et al., 2006*).

Kůže svými mechanismy rychle uzavírá porušené bariéry a soubor těchto procesů nazýváme právě hojení ran. Zjednodušeně můžeme opravu poškozené pokožky rozdělit do čtyř fází: hemostáza, zánět, proliferace a dermální remodelace. Tyto opravné mechanismy vedou k fyziologické obnově po poškození (*Broughton et al., 2006*).

Na obrázku 2 vidíme fáze hojení. Vše začíná hemostázou. Krevní destičky vytvoří zátku a zabrání tak ztrátě krve a vytvoří předběžnou fibrinovou matici.



**Obrázek 2:** Fáze hojení ran (Wilkinson a Hardman, 2020)

Následuje příliv neutrofilů (podpořeno uvolňováním histaminu z žírných buněk), prevencí infekce a vznikem zánětu. Dochází k otoku, zarudnutí v okolí rány, bolesti a může se objevit i horečka. Vzniklý zánět ovšem představuje riziko vzniku nekrózy a porušení tkáně, proto je důležité zánět redukovat. Později se dostaví monocyty a diferencují se na tkáňové makrofágy, které odstraní zbytky buněk, cizorodých látek a neutrofilů (Wilkinson a Hardman, 2020).

Během proliferativní fáze migrují keratinocyty, vyplňují mezery a pokrývají spodinu rány. Vytvořením této podkladové sítě pro epitelální buňky se granulační rána zacelí. Fibroblasty nahrazují počáteční fibrinovou sraženinu granulační tkání, produkují kolagen i další složky extracelulární matrix. V tomto okamžiku může docházet k infekci nebo hypergranulaci. Ty mohou hojení ran zpomalit až potlačit (Garlick, 2004).

Konečnou fází hojení je dermální remodelace. Nahrazení poškozené tkáně jinou tkání je doprovázeno granulací. Epitelové buňky migrují z okraje rány nebo uvnitř rány po vlhké spodině a vytvářejí novou pojivovou tkáň a raněnou pokožku překrývají (Wilkinson a Hardman, 2020).

Komplikací bývá vznik nekrotických a fibrinových povlaků. Právě u chronických ran se vyskytuje velké množství neutrofilních proteináz, které mohou způsobit chronický zánět a vytvoří se tím nerovnováha mezi proteinázami a jejich inhibitory. Tato nerovnováha v hladinách je však zásadní při dlouhodobém zánětu. Následné hojení a obnova pokrytí epitelem se tím prodlužuje (*Gurtner et al., 2012*).

### **1.3.2.1 Hemostáza**

Poškozené cévy po poranění se okamžitě stahují a tvoří trombus zabraňující vykrvácení z rány. Trombocyty se aktivují, když narazí na vaskulární matrici a přispívají k hemostáze a koagulaci. Receptory krevních destiček např.: glykoprotein VI, vzájemně působí s proteiny extracelulární matrix (jako je fibronectin, kolagen a von Willebrandův faktor) podporují přilnavost ke stěně cév. Trombin spouští aktivaci trombocytů a vyvolají prostorovou změnu tkáně a uvolňují molekuly, které posilují koagulaci. K ucpání a prevencí před krvácením slouží nerozpustná sraženina (eschar, strup) ve formě fibrinu, fibronectinu a trombospondinu (*Velnar et al., 2009*).

Krevní destičky mají zásadní vliv pro lokalizaci imunitních buněk. Buď přímo zachytí imunitní buňky v escharu nebo uvolnění chemokinové látky podmiňující pohyb po degranulaci. Ve skutečnosti je to sled několika faktorů, které povzbuzují rezidentní kožní buňky včetně keratinocytů a fibroblastů (*Koutná, 2010*).

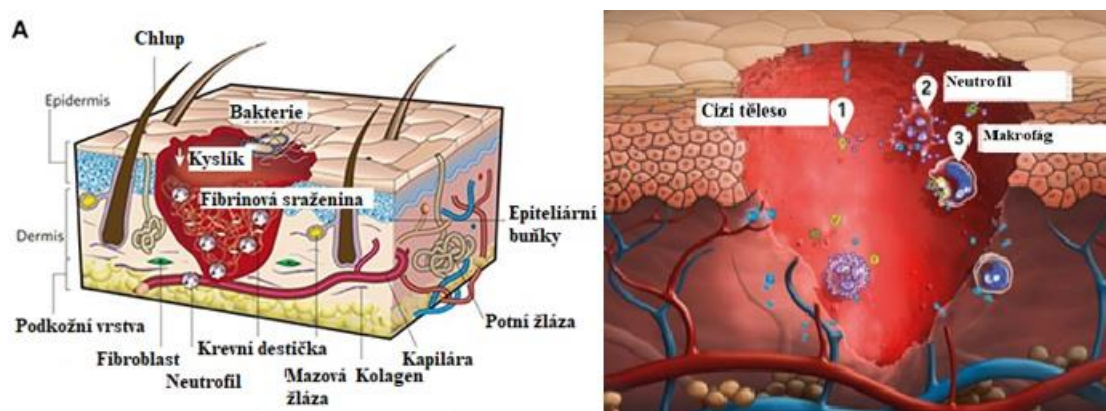
Nejvíce jsou zastoupeny během hojení právě krevní destičky. Inhibují bakteriální infekci, vylučují mnoho receptorů, které regulují produkci antimikrobiálních peptidů. Při vytvoření dostatečného množství sraženiny se koagulační proces vypne. Zabrání se tak nadměrné trombóze. Shlukování trombocytů je inhibováno prostacyklinem. Trombin je inhibován antitrombinem III. Koagulační faktor V a VII je degradován aktivovaným proteinem C. Poškozená stěna cévy je opravována i buňkami hladkého svalstva a endotelovými buňkami (*Delavary et al 2011*).

### **1.3.2.2 Zánět**

Prvotní obrana proti patogenním a infekčním ranám je zánět. Imunitní odpověď způsobená poraněním aktivuje žírné buňky, T buňky, makrofágy vazbou na receptory pro rozpoznání a vyvolání zánětu. Následně se uvolní prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které přitahují leukocyty do místa rány. Dále povzbuzují vazodilataci, která společně s adhezivními endoteliálními buňkami jako jsou např. selektiny stimuluje adhezi a diapedézu neutrofilů (*Snyder et al., 2016*).

Neutrofilly jsou přitahovány chemoatraktanty (včetně interleukinu 1), tumor nekrotickým faktorem alfa (TNF- $\alpha$ ) či bakteriálním endotoxinem a jsou posílány do rány ihned po poranění. Samotné neutrofilly reakcí s prozánětlivými signály a aktivací zánětu uvolňují vlastní cytokiny. Pomocí fagocytózy a uvolněním reaktivních forem kyslíku (ROS) odstraní nekrotickou tkáň a patogeny (Boniakowski *et al.*, 2017).

Samotná zánětlivá reakce je složitá s mnoha vnitřními a vnějšími faktory. Jakmile je zánět nadměrný a nekontrolovaný, tak brání poškozené tkáni a zpomaluje hojení.



**Obrázek 3:** Hojení rány – zánětlivá fáze (Gurtner *et al.*, 2012)

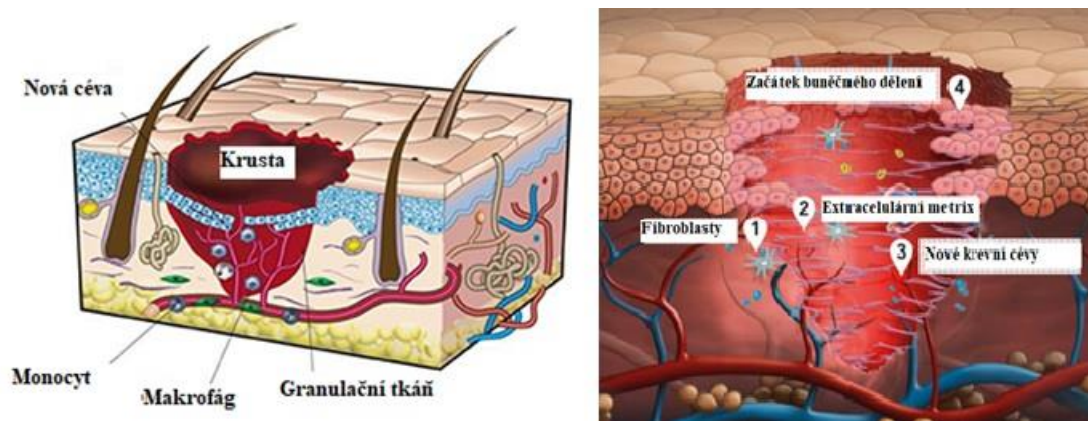
Rána v zánětlivé fázi viz obrázek 3. Zánětlivé buňky vstupují do místa poranění a snaží se eliminovat patogeny. Dochází k aktivaci makrofágů. Rychlost reakce na vznikající zánět závisí na dostupnosti kyslíku. Nedostatkem kyslíku může dojít až k hypoxii, což vede k selhání buněčné ochrany a ke vzniku infekce. Tímto se rána stává špatně hojitelná. Veškeré rány potřebují a spotřebovávají mnohem více kyslíku než zdravá tkáň (Ashley *et al.*, 2018).

### 1.3.2.3 Proliferace

Během proliferace dochází k aktivaci fibroblastů, keratinocytů, makrofágů a endoteliálních buněk, které uzavírají ránu a umožňují novotvorbu cév. Keratinocyty se aktivují během pár hodin po poranění vlivem peroxidu vodíku, patogenů a cytokinů. Touto aktivací mohou migrovat přes ránu a obnovují epidermální vrstvu. Migrace končí, jakmile se keratinocyty z protilehlých okrajů setkají. Vytvoří se epiteliální tenká vrstva a nová přilnavost k podkladové matici (Wilkinson a Hardman, 2020).

Fibroblasty jsou buňky zodpovídající za náhradu provizorní matrice obsahující fibrin na granulační tkáň. Reagují díky signálním molekulám z trombocytů, endoteliálních buněk a makrofágů. Pomocí těchto vlivů se fibroblasty stávají profibrotickými nebo se diferencují na myofibroblasty, které způsobí kontrakci poškozené rány (Shaw a Martin, 2016).





**Obrázek 4:** Hojení rány – proliferační fáze (Gurtner et al., 2012)

Na Obrázku 4 je vidět produkce kolagenu. Fibroblasty formují finální extracelulární matrix. Vytváří se nové cévy a základ pro epitel, které v důsledku migrace rány zacelí. I v této fázi je velmi důležité dostatečné množství kyslíku. Ten je nutný pro konkrétní syntézy proteinů a zrání buněk. Kyslík přispívá k dozrání kolagenu, tak i extracelulární matrix. V případě nedostatku kyslíku se nevytvoří dostatečně pružná a odolná tkáň (Gurtner et al., 2012).

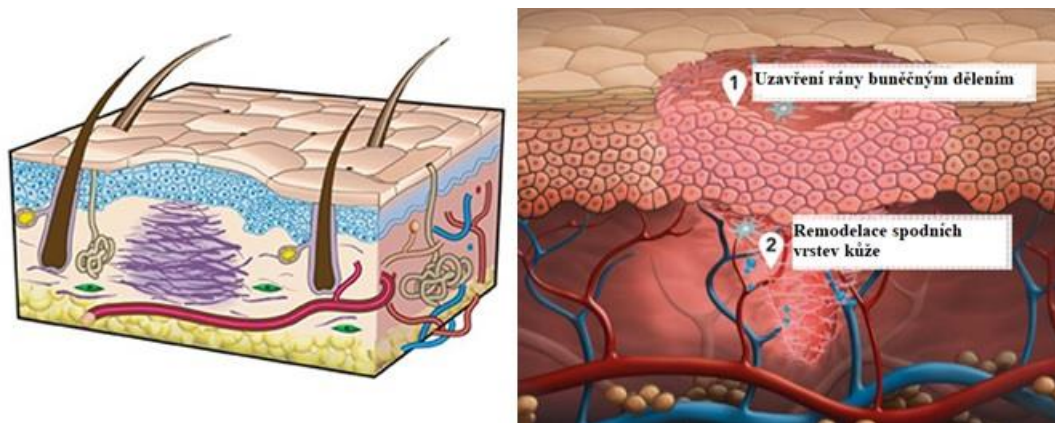
#### 1.3.2.4 Remodelace

Remodelací se rozumí mnoho reakcí od počátečního ukládání fibrinové sraženiny, která končí vytvořením jizvy obsahující kolagen typu I. Hlavními buňkami nahrazující počáteční fibrinovou sraženinu hyaluronanem, fibronectinem a proteoglykany a u pozdější opravy tvořící zralé kolagenové fibrily jsou fibroblasty. Konstrukci zralých, zesílených fibril podporují proteoglykany a působí zároveň jako kanál pro buněčnou migraci (Young a McNaught, 2011).

Pokožka dospělého je složena z 80% kolagenu typu I a 10% kolagenu typu III. Zato granulační tkáň obsahuje přibližně pouze 30 % kolagenu typu III a 10 % kolagenu I. S postupným hojením rány dochází k nahrazení kolagenu III na kolagen typu I. Tím se zvýší pevnost vznikající jizvy. Samotný vzhled a neporušenost jizvy se nikdy už plně nevrátí do stavu před poraněním pokožky. Jizva postupem času vybledne a teprve zhruba po 2 letech dosáhne 80% pevnosti původní tkáně. Proto elastin jako další dermální složka musí obnovit elastinová vlákna, aby si udržela dobrou pružnost pokožky (Wilkinson a Hardman, 2020).

Úspěšnost hojení ran klesá, jakmile se makrofágy, fibroblasty a endotelové buňky vystaví apoptóze. Dalším probléme je to, když zanechají povrchovou jizvu při opuštění místa poranění. Tvorbou nové tkáně je potřeba zvýšená energie. To vyžaduje dostatek kyslíku, jako i jiné fázi hojení (Ashley et al., 2018).





**Obrázek 5:** Hojení rány–remodelace (Gurtner et al., 2012)

V konečné fázi hojení ran dochází k buněčnému dělení a remodelaci tkání. Tuto fázi znázorňuje obrázek 5 (Ashley et al., 2018).

### 1.3.3 Rozdělení průběhu hojení ran

Pro diagnózu a způsob léčby je velmi důležité rozdělení, které vzniklo už za dob řeckého lékaře Galéna. Hojení ran dělíme na primární a sekundární hojení (Pospíšilová, 2010).

#### 1.3.3.1 Primární hojení

Primárním hojením se označuje hojení, při kterém se okraje rány dotýkají a v ráně není žádný cizí podmět, který by mohl bránit zacelení. Úspěch zahojení rány závisí na rozsahu poškození tkáně. Nejlepší prognózu mají řezné rány bez přítomnosti cizího tělesa a bez ztráty tkáně. Další zásadní vliv je ten, kde se daná rána nachází. V případě, že nedojde ke vzniku infekce, dochází k primárnímu hojení. Jsou to rány po chirurgickém zákroku a většinou uzavřeny stehem. Dochází k plné obnově tkáně (Wound Healing, 2020).

#### 1.3.3.2 Primární odložené hojení

U těchto ran se předpokládá, že může vzniknout infekce. Rána se zadrenuje a sleduje se průběh infekce. V případě, že se infekce rozvine a projeví, jedná se už o sekundární hojení. Při nepropuknutí infekce lze ránu uzavřít v průběhu 7 dní (Ashley et al., 2018).

#### 1.3.3.3 Sekundární hojení

Sekundární hojení se týká ran, u kterých se okraje rány nepřilehnou k sobě nebo jsou zasaženy infekcí. U sekundárního hojení je potřeba doplnit ránu o chybějící tkáň, aby se rána mohla uzavřít. Protože vzniklá infekce zamezuje přímému spojení okrajů rány. U sekundárního hojení se musí pro úspěšné zhojení vynaložit větší úsilí a je to proto o to náročnější pro daný organismus. Mohou vznikat defekty, které zanechají po sobě jizvy (Wound Healing, 2020).

### 1.3.3.4 Chronický průběh hojení

V podstatě jde o sekundární hojení. Opět je nutné vytvořit a doplnit ránu novou tkání a až následně lze uzavřít. Liší se pouze v délce tohoto procesu. Rána se hojí déle než 6 týdnů, a proto hovoříme o chronickém průběhu hojení ran. Nejčastěji vznikají v důsledku cévního onemocnění a pokročilé destrukce tkáně (*Pospíšilová, 2010*).

## 1.4 Chronické rány

Rána jako taková je definována jako porušení nedotknutelnosti tělesného krytu. Podle průběhu se dělí na chronickou a akutní. Akutní rána se hojí v krátkém čase a téměř vždy bez komplikací. Chronická rána je taková, která po dobu až 6 týdnů nevykazuje žádný náznak hojení. S nehojícími se ranami se setkáváme u všech věkových kategorií. Mezi chronické neboli nehojící rány řadíme: bércové vředy, tlakové dekubity, diabetické defekty (syndrom diabetické nohy), malignity, kožní vředy vzniklé z operační rány (*Ma et al., 2014*).

Chronické rány jsou sekundárně se hojící rány, které nevykazují žádné hojení po dobu 6–9 týdnů. Představují závažný zdravotní problém postihující až 7 % populace. Od akutních ran se liší dlouhotrvajícím a pomalým hojením. Jsou velmi náchylné na výskyt bakteriální infekce. Vznikají nejčastěji přechodem akutní rány do chronické rány důsledkem prodloužené zánětlivé fáze a rozvojem infekce či prohloubením nekrózy kůže. Typická je nerovnováha mezi inhibitory zánětu, proteinázami a apoptózou či nekrózou buněk. Neustále otevřená špatně hojící rána představuje též riziko možného vstupu patogenů do těla a způsobí tak další rozvoj infekce i mimo ránu (*Velnar et al., 2009*).

Při léčbě chronických nehojících se ran je důležité použít krytí s lokálními antimikrobiálními látkami. Cílem je snížit biologickou zátěž a provést dostatečnou kontrolu infekce rány. Právě infekce způsobuje zpomalení či dokonce nehojení daných ran. Mezi antimikrobiální léčiva se řadí antibiotika a antiseptika. Existující rozdíl mezi těmito dvěma možnými látkami je takový, že antibiotika působí pouze na specifický cíl čili na specifickou buňku. Postupem času může vykazovat vyšší pravděpodobnost rozvoje bakteriální rezistence. Nadměrné užívání i nevhodně zvolený druh antibiotik při léčbě infekce též zvyšuje možnost vzniku rezistence. Zatímco antiseptika mají široké spektrum aktivity a neselektivní. Pro bakterie je tedy mnohem těžší vytvořit si proti nim rezistenci. Proto jsou ideální pro léčbu nehojících se chronických ran (*Stryja et al., 2016*).

Indikační biomarkery, které charakterizují chronické rány zahrnují teplotu, kyslík, krevní tlak, pH, laktát, glukóza, interleukin 6 (IL-6) a stav infekce. Identifikace, klasifikace a monitorování jakýchkoliv ran by pomohlo snížit prodlužování hospitalizací a návštěv více lékařů. Snížily by se i náklady na složitou laboratorní diagnostiku a testování (*Ashley et al., 2018*).

#### **1.4.1 Faktory ovlivňující hojení ran**

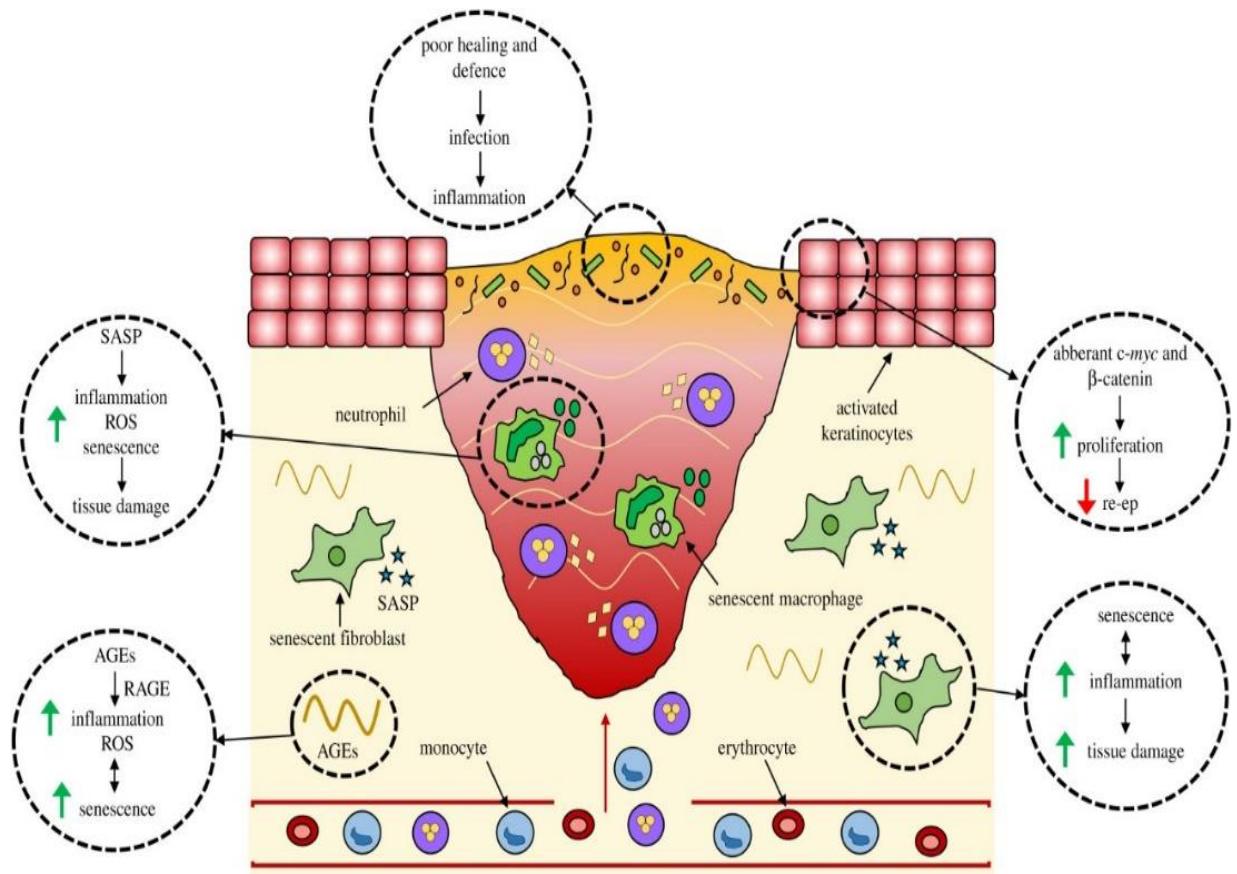
Pro pochopení hojení ran je dobré znát faktory ovlivňující hojení. Hlavní rolí je výživa a hydratace kůže. Dále věk pacienta, porucha imunity, schopnost metabolických změn (porucha funkce některého orgánu, cukrovka, zánětlivý stav organismu atd.), užívání některých léčiv, nádorové onemocnění, kouření, psychika, životospráva, dostupnost krycích materiálů. Z pohledu rány to jsou kontrola infekce, schopnost hojení, dobré prokrvení a transport stavební tkáně. Důležité je i udržovat vlhké prostředí v ráně (*Stryja et al., 2016; Han a Ceilley, 2017*).

Chronické rány jsou rány, které se obvykle nehojí a zůstávají nezahojené více než 6 týdnů. Postihují převážně a ve větší míře seniory a diabetiky. Pokožka diabetiků a stárnoucích je mnohem náchylnější ke zrodu častých poranění a komplikuje následné hojení. Kůže se postupně ztenčuje změnou kožní bariéry a snižuje se hydratace. Vše vede ke zvýšené náchylnosti k poškození pouhým třením (*Larouche et al., 2018*).

Chronické rány napadají bakterie, které zhoršují zánět a hojení. Vyskytují se též patogeny, jako jsou *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto patogeny jsou často zapouzdřené v ochranné matici extracelulárních látek, které poskytují rezistenci vůči běžně používaným antibiotikům, která se nazývá biofilm (*Wilkinson a Hardman, 2020*).

Velká část buněk v chronické ráně jako např. fibroblasty a makrofágy produkují sekreční fenotyp, který souvisí se stárnutím. Uvolňují reaktivní formy kyslíku (ROS) a zvyšují tím zánět. Velké množství produktů glykace (AGE) též vede ke stárnutí v místě rány a rozvoji zánětu. Zhoršení buněčné funkce a nadměrné rozpadání tkání zabraňuje normálnímu hojení rány. Faktory přispívající k hojení znázorňuje obrázek 6 (*Wilkinson a Hardman, 2020*).

Dalším důležitým faktorem pro samotné hojení ran je imunitní systém. Každý proces v imunitním systému je dán svými specifickými buňkami a proteiny. Vyskytují se po celém těle a uvolňují se podle potřeby svého cílového orgánu. Společně však likvidují a chrání před vniknutím cizích organismů, toxinů a virů (*Wilkinson a Hardman, 2020*).



**Obrázek 6:** Faktory přispívající k chronickému hojení rány (Wilkinson a Hardman, 2020)

Imunitní systém je klíčovým procesem v celé fázi hojení ran. Dále se aktivně zapojuje na obnovení homeostázy. Mezi hlavní složky patří fagocyty. Ty způsobují pohlcení mikrobů prostřednictvím procesu fagocytóza. Dále makrofágy, NK buňky, neutrofilů, leukocyty a žírné buňky (Percival et al., 2010).

#### 1.4.1.1 Rod *Staphylococcus*

Grampozitivní sférické bakterie se vyskytují ve shlucích připomínající hrozny. Je popsáno více jak 20 druhů stafylokoků. Významnými patogeny pro lidi jsou *Staphylococcus aureus* (velké žluté kolonie) a *Staphylococcus epidermidis* (relativně malé bílé kolonie) (Oliveira et al., 2018).

V mé práci se zabývám hlavně *S. aureus*, který kolonizuje převážně nozdry, ale lze ho najít i na kůži, dutině ústní a gastrointestinálního traktu. Téměř vždy by měl být považován za potenciální patogen. Způsobuje jak lehčí infekce kůže a měkkých tkání, tak vede i k sepsím. K jeho první izolaci došlo roku 1880, bylo to z chirurgické rány. Na základě pigmentace, která se pozorovala o pár let později došlo i k rozdělení podle barvy kolonií (Tam a Torres, 2019).

Patogeneze je ovlivněna produkcí povrchových proteinů. Ty umožňují adhezi a chemotaxi bakterií v hostiteli. Sekrecí extracelulárních toxinů a enzymů dochází k likvidaci tkání (Kong et al., 2016).

Kolonie rostou při teplotním rozmezí 15–45 °C. *S. aureus* je poměrně náchylný a rezistentní k antibiotikům a antiseptikům. V průběhu let se tato rezistence začala klasifikovat do několik vln. Nozokomiální infekce vzrostly v polovině 40. let minulého století. Došlo tedy k první vlně rezistence, kde byly bakterie rezistentní na penicilin. V průběhu 60. let vznikla rezistence způsobená genem *mecA*, který kolonizuje protein vázající penicilin a tím se tento kmen stával rezistentní na všechny  $\beta$ -laktamové antibiotika. V polovině 90. let došlo k rezistenci na vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus* (Monaco et al., 2017).

#### 1.4.1.2 Rod *Pseudomonas*

Bakterie, které spadají do tohoto rodu jsou rovné až mírně zakřivené gramnegativní tyčinky. Dobře se pohybují, patří i mezi nejrychlejší bakterie. Za rychlost ve většině případů může polární bičík. *P. aeruginosa* má též schopnost tvořit polární fimbrie typu IV a polární bičík. Ty přispívají k adhezivitě a chemotaxi buňky k povrchu. Mezi další virulentní složky, které mohou vyvolat zánět a poškodit epitelové buňky jsou proteázy a toxiny jako je exotoxin (Al-Wrafy et al., 2017).

Buněčnou stěnu tvoří vrstva peptidoglykanu a vnější membrána. Ukotvené poriny umožňují průnik molekul do prostoru mezi cytoplazmatickou membránou a vnější membránou. U *Pseudomonas* jsou poriny složené z monomerních proteinů (Al-Wrafy et al., 2017).

Zástupci *Pseudomonas* patří do čeledi *Pseudomonadaceae* a mohou být izolované z vody, půdy, živočichů, gastrointestinálního traktu aj. Rostou v rozmezí teplot 4–42 °C, v kyselém i zásaditém prostředí (pH okolo 4,5–8). Zvýšená koncentrace solí jim nedělá problém a bývají přirozeně rezistentní k antibiotikům, antiseptikům a dalším toxickým látkám (Azam a Khan, 2019).

*P. aeruginosa* byla poprvé sledována a klasifikována roku 1862. První zmínky popisují částice ve tvaru tyčinek z lidské infekce v modrozeleném hnisu. Toto zbarvení bylo způsobeno pigmentem pyocyaninem, který právě tyto bakterie produkuje. Kromě zmíněných infekcí kůže a chronických ran, *P. aeruginosa* způsobuje mnoho dalších infekcí. Může napadnout i plíce, tím že poškodí plicní epitel a naruší homeostázu dolních a horních cest dýchacích (Wolcott et al., 2016).

### 1.4.2 Biomarkery chronických ran

Pro zajištění přesného monitorování a identifikaci ran se využívá flexibilních biosenzorů s detekcí významných biomarkerů. Kritické biomarkery mohou poskytnout klinické a kontinuální informace pro objev a zjištění stavu ran. Hodnoty teploty a krevního tlaku v místě poranění či hodnoty glukózy, laktátu, pH, interleukinu-6 mohou určit průběh hojení ran a v jakém stádiu zánětu se nachází (*Fu et al., 2015*).

### 1.4.3 Bakteriální identifikace

V diagnostice a posouzení stavu rány je důležitá bakteriální identifikace. Na chronické ráně většinou kolonizují bakterie, které zbavují ránu dostatku kyslíku a živin. Tím pádem několikanásobně prodlužují zánětlivou fázi a špatné hojení ran. Důležitá je tedy včasná diagnostika a identifikace bakteriální kolonizace. Umožní tak lékařům zajistit správný léčebný postup pro specifické antibiotické a antiseptické terapie (*Zhao et al., 2013*).

Rychlost je tu zásadní, proto se začínají i tady využívat rychlého screeningu přenosnými biosenzory. Tradiční identifikace na kulturách je velmi spolehlivá, ale časově náročná což je nežádoucí. Vznikající biosenzory pro určení bakterií se spoléhají na oligonukleotidy nukleových kyselin s maticovou platformou a enzymy. Současné vyvinuté mikrobiologické biosenzory dokážou identifikovat širokou škálu organismů. Mínusem je stále jejich nedostatečná citlivost a selektivita. Zařízení „Point-of-care testing“ (POCT) poskytují na místě okamžité výsledky (*Chen et al., 2016*).

Nejčastěji se vyskytující typy bakterií přítomné v chronických ranách jsou *P. aeruginosa* a *S. aureus*. Konkrétněji je pseudomonáda běžným patogenem u nozokominálních infekcí, což je velmi rizikové právě pro pacienty s chronickými ranami (*Lim et al., 2015*).

Pro detekci se v současné době používá mikrobiologická technika založená na počítání kultivovaných bakterií na destičkách. Siesmaetův tým popsal levný, jednorázový a elektrochemický senzor schopný detekovat pyocyanin. Jde o molekulu snímající redox aktivní kvorum specifickou pro *P. aeruginosa* v exsudátu z rány. Na rozdíl *S. aureus* produkuje silnou vrstvu polysacharidu, který omezuje vývoj a detekci biosenzorů. Způsobuje nedostatečné detekční limity (*Siemaet et al., 2016; Yue et al., 2017*).

### 1.4.3.1 Reakce *Pseudomonas aeruginosa* na antiseptika

Důvod, proč je *P. aeruginosa* odolný vůči některým antiseptikům, antibiotikům a co zapříčiní, že se stávají rezistentní po vystavení těchto látek je způsobena kombinací těchto faktorů:

- Vnitřně odolný vůči antimikrobiálním látkám, kvůli nízké propustnosti jejich buněčné stěny
- Rezistentní k mutacím v chromozomálních genech, které regulují geny rezistence
- Genetická kapacita vyjadřující široký repertoár mechanismů odporu
- Získá geny rezistence od jiných organismů prostřednictvím plazmidů, transpozonů a bakteriofágů

*P. aeruginosa* reaguje multifaktoriálními mechanismy na rezistenci antimikrobiálních látek (Moya *et al.*, 2009).

### 1.4.4 Vhodná terapie

Kůže je schopna zajistit dokonalé hojení rány. Musíme však zajistit optimální prostředí. Před výběrem vhodného přípravku je důležité zjistit charakter a původ vzniklé rány. Můžeme mít nekrotické, mokvající, granulační infekční chronické rány (Mrázková *et al.*, 2012).

Cílem vhodné terapie je vytvoření optimálního prostředí v ráně. Eliminovat všechny nežádoucí vlivy bránící hojení a obnovu vytvořit granulační tkáň. Dalším důležitým krokem je odstranění odumřelé kůže, která zabraňuje hojení a vytváří ideální podmínky pro život mikroorganismů (Pospíšilová, 2010).

Důležité je tedy zvolit vhodnou formu léčebných přípravků (hydrogel, roztok, pěna, obvazy atd.). Volí se to podle umístění rány, vzhledu a rozsahu vzniklé rány. Hlavními prostředky, které se používají ke snížení mikrobiálního osídlení v ráně jsou: topická antiseptika, antibiotika (systémová a lokální), antimikrobiální krytí, larvy a další (Abdelrahman a Newton, 2011).

#### 1.4.4.1 Topická antiseptika

Antiseptika se vyrábějí v mnoho formách od roztoků, gelů a plošných krytí. Jednotlivé přípravky obsahují například chlorhexidin, jod-povidon, betain, oktenidin dihydrochlorid či superokyseličenou vodu. Všechny tyto látky mají rozsáhlé spektrum účinnosti na bakterie, spory viry i houby. K dostatečnému účinku je nutné aplikaci opakovat, jinak přípravek působí krátkodobě. Avšak při opakovaném kontaktu mohou vyvolat alergickou reakci v okolí rány a rozvíjí se častěji dermatitidy (*Pokorná a Mrázková, 2012*).

#### 1.4.4.2 Antiseptické krytí

Mechanismus účinku krytí závisí na specifické aktivní složce a nosiči, která tvoří antiseptické krytí. Existuje mnoho různých účinků a indikací tohoto druhu antiseptik. Na přítomné mikroorganismy ve vytvořené ráně působí antimikrobiální látky, které vykazují tzv. baktericidní (usmrcuje bakterie) nebo bakteriostatický (zastavuje množení bakterií) efekt (*Stryja et al., 2016*).

Antiseptickým krytím je materiál s obsahem stříbra, jódu, chlorhexidinu, oktenidinu a polyhexidinu. Opět všechny tyto látky mají široké spektrum účinnosti na bakterie, spory viry i houby. Účinek antiseptických krytí na bakterie je komplexní. Například ionizované stříbro uvolněné z antiseptického krytí se neváže pouze na jeden receptor, ale reaguje s bakteriální buňkou na několika místech (*Mrázková et al., 2012*).

Dokáže se vázat na stěnu, plazmatickou membránu, nukleové kyseliny, zasahuje do respiračního cyklu v mitochondriích a denaturují bakteriální enzymy. Nejen díky tomu je rezistence mikroorganismů na stříbro ojedinělá a vzácná, ale i tak se čas od času může vyskytnout (*Pospíšilová, 2010*).

Řada výzkumů odhalila, že naprostá většina antiseptik působí cytotoxicky na fibroblasty. Při dlouhodobé aplikaci na otevřených ránách mohou vyvolat reakci pozdní přecitlivělosti a zamezit hojení. Látky obsažené v krytí mohou dokonce ovlivnit činnost dalších orgánů (uložení stříbra v játrech a ledvinách, narušení činnosti štítné žlázy jódem) (*Valenta, 2007*).



## 1.5 Antiseptika

Antiseptika, dezinfekční prostředky, konzervační látky a sterilizační prostředky se dají zařadit mezi biocidy. Používají se v klinické medicíně k prevenci a zastavení šíření nozokomiálních chorob čili chorob vyskytujících se a vznikajících v nemocnicích při hojení různých chirurgických zákroků. Kromě medicíny se biocidy dále používají pro osobní hygienu jako ochrana a prevence proti křížové kontaminaci patogeny, které jsou schopné přenášet se potravinami. Studie *in vitro* poukazují na to, že expozice biocidů vede ke snížení citlivosti na antiseptika i antibiotika. Na expozici biocidů se přizpůsobují i mikroorganismy. Problém však nastává stejně jako u antibiotik. Při nadměrném používání je možný vznik rezistence. Pro některé patogeny jsou méně účinné a stávají se tedy méně náchylné, a tedy odolné na antiseptika (*Han a Ceilley, 2017; Gottrup et al., 2014*).

Je důležité tedy zvážit možné riziko a přínosy používání nadměrného množství antimikrobiálních látek. Jako příklad v dnešní moderní medicíně bych uvedla Semmelweisův mandát. Ten ukazuje na to, aby si lékaři po vyšetření umyli prsty chlorem a předešli tak puerperální horečce. Nastala tak snížená úmrtnost a nemocnost v porodnicích. Tato studie je velmi přínosná a poukazuje na to, že účinek používání lokálních antiseptik vede ke snížení šíření klinických onemocnění. Biocidy jak antiseptika a další látky jsou nedílnou součástí každé lékařské praxe. V dnešní době existuje kampaň Světové zdravotnické organizace na hygienu rukou. Kampaň se zaměřuje právě na tuto problematiku a zvyšuje povědomí nejen zdravotníkům o hygieně rukou při léčbě ran (*Gottrup et al., 2014*).

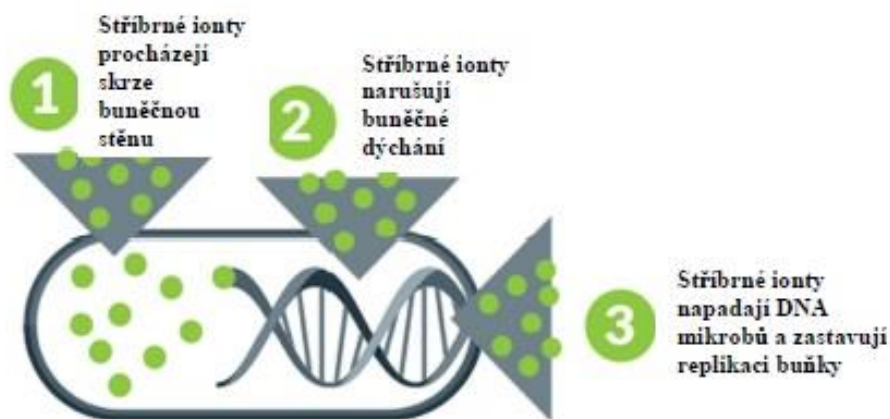
Výběr vhodného antiseptického přípravku se netýká pouze stavu pacienta, ale bohužel mnohdy i finančních možnostech zdravotnického zařízení. V praxi se často využívá toho, že jakmile daný přípravek nevyčistí a nezhojí ránu do 1–2 týdnů, nahradí se léčebný přípravek jiným. Většina antiseptik má široké antimikrobiální spektrum a doznívající antiinfekční aktivitu. Často však bývají toxické pro hostitelskou tkáň. Z tohoto důvodu se tedy používají v lokální aplikaci na rány či neporušenou kůži. (*Stryja, 2017*).

V dnešní době se hojně využívají antiseptické přípravky a krytí se stříbrem, jódem i chlorem. Dále s obsahem chlorhexidinu, betainu a polyhexamethylen biguanid (PHMB). Tyto látky inhibují růst a vývoj mikroorganismů. Používají se především na rány traumatické a chronické, které mohou být kontaminované mikroorganismy a z toho důvodu se špatně hojí (*Lipsky a Hoey, 2009*).

Cílené dodání i s velmi vysokými koncentracemi antiseptik do místa infekce je velkou výhodou používání antiseptik. Díky tomu je méně systémových vedlejších účinků a toxicity. Nevýhodou může být vznik lokálních alergií a dermatitid. Častá a neomezená aplikace může vést až k rezistenci, a to zejména křížová rezistence s antibiotiky (Gottrup *et al.*, 2014).

### 1.5.1 Stříbro

V medicíně je nejznámější a nejrozšířenější použití právě stříbrných přípravků. Stříbrné antimikrobiální látky se aplikují k léčbě závažných popálenin a chronických ran. Stříbro se využívá nejčastěji ve dvou formách (stříbrné soli a elementární stříbro). Stříbrné ionty jsou reaktivní a váží se na buněčné stěny bakterií. Tím dojde k narušení, úniku buněčného obsahu a smrti buňky. Dále inhibuje oxidační enzymy čímž ovlivní buněčné dýchání. V cytoplasmě se váže na ribonukleové kyseliny a proteiny, tím znemožní dělení buněk (Khansa *et al.*, 2019).



**Obrázek 7:** Antimikrobiální účinek Ag (Stryja, 2017)

Topický krém nemísitelný s vodou obsahuje 1% stříbrný sulfadiazin a 0,2% chlorhexidin diglukonát je v medicíně hojně využíván. Známý pod názvem Silvazine v USA a Flamazine v jiných zemích (George *et al.*, 1997).

Účinné látky se aplikují přímo do obvazů používaných na spálené povrchy kůže i otevřené chronické rány již od počátku používání krémů. Dále se zkoumá materiál metakrylátového povlaku potaženého sulfadiazinem, který poskytuje stabilní uvolňování Ag během pár dnů. Na tomto principu vznikly nové produkty s názvem Acticoat (nanokrystalové stříbro) a Silverlon (obsahuje stříbrnou sůl), kde se obsažené stříbro snáze nanáší a odstraňuje z velkých ran. Tyto produkty jsou klinicky účinné a uvolněné stříbro je baktericidní a poskytuje přímý terapeutický účinek (Simon, 2003).

Plastové zaváděcí katétrů potažené sloučeninami Ag zpomalují tvorbu mikrobiálních biofilmů na katétrech a infekci nosokomiálními bakteriemi. Nylonové nitě potažené stříbrem v elektroretinogramech (EGR) umožňují detekci poškození tkáně bez následků a možné infekce (Simon, 2003).

#### 1.5.1.1 Rezistence vůči stříbru

Oxidovaný stav iontů stříbra je v poslední době významný pro výzkum pro jeho využití jako antimikrobiální činidlo na vzniklé rány. Jeho velký vzestup je způsoben jeho širokospektrálním působením.

Rezistence je způsobena produkcí adhezivního proteinu bičíku flagelinu (pouze u bičíkatých bakterií – *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus*, *Escherichia*) a ta je spuštěna shlukováním nanočástic. Vyvíjí se bez genetických změn a je zapotřebí pouze fenotypová změna snižující koloidní stabilitu a eliminují antibakteriální aktivitu (Schacht et al., 2013).

Patogenita a adaptivita bakterií na antimikrobiální látky se dále připisuje jejich schopnosti tvořit biofilm. Což jsou povrchově vázané biologické kolonie tvořené jedním nebo více bakteriálními druhy uzavřené matricí zvané extracelulární polymerní látka (EPS). Biofilmy poskytují ochranu před stresory prostředí a cizími látkami a toxiny. Poškození proteinů indukované Ag<sup>+</sup> a kondenzace DNA vede k buněčné smrti (McNeilly et al., 2021).

Molekulární rezistence na stříbro byla popsána už roku 1999 v plazmidu nazvaném pMG<sub>101</sub>. Další rezistence vůči Ag<sup>+</sup> byla popsána v kombinaci s efflixním proteinem. Rezistence na AgNP byla zjištěna u různých bakteriálních kmenů vyvolaná oxidačně–stresovými mechanismy (McNeilly et al., 2021).

U kmene *S. aureus* byl objeven výskyt genu silE, který pravděpodobně uděluje přechodnou rezistenci po expozici Ag<sup>+</sup> prostřednictvím iontové vazby. Tato expozice však vedla k buněčné smrti (Loh et al., 2009).

Výzkum (Valentina et al., 2020) zase prokázal vývoj rezistence na AgNP a Ag<sup>+</sup> u *S. aureus* při prodloužené expozici. U tohoto kmene se objevila fyziologická genetická mutace. Předpokládá se mutace v *purR*, který kóduje protein regulátoru purinového represoru zaměřenou na DNA. Další mutace byla indukována v *tcyA*, který kóduje protein vázající L–cystein. Ten snižuje příliv extracelulárního cystinu, který napomáhá snížit oxidační stres pomocí ROS.

### 1.5.1.2 Antimikrobiální mechanismus působení stříbra

Stříbro ve všech vyskytujících formách se používá jako účinný antibakteriální přípravek už řadu let. Ionizované stříbro  $\text{Ag}^+$  je vysoce reaktivní a účinné vůči širokému spektru gram pozitivních ( $\text{G}^+$ ) i gram negativních ( $\text{G}^-$ ) bakterií (*Cameron et al., 2018*).

Ionty stříbra mají schopnost vytvořit kovalentní vazbu s thiolovými a disulfidickými vazbami, které se nacházejí na různých místech buňky. Díky tomu stříbro reaguje s bílkovinami a enzymy ve stěně buňky bakterií. Tu poškodí a naruší její ochrannou bariéru, která snižuje citlivost buňky vedoucí k úniku důležitých látek a způsobí nekrózu až apoptózu (*Cameron et al., 2018*).

Stříbro tedy zasahuje a ovlivňuje syntézu nukleových kyselin, denaturaci proteinů a vytváří nefunkční a nerozpustné sloučeniny. Dosud však není objasněno, zda poškození biologických systémů způsobují nanočástice stříbra či  $\text{Ag}^+$ . Je náročné přesně určit jaká část stříbrné složky vede k cytotoxicitě (*Punjataewakupt et al., 2019*).

Stříbrné ionty způsobují pokles peptidoglykanové buněčné stěny a zánik buňky. Tím se zabrání dalšímu rozmnožení bakterií. Následuje proniknutí do vnitřní části buňky a naváže se na báze DNA. Zakoncentrovaná DNA ztrácí naprostou schopnost replikace, čímž se zabrání reprodukci bakterií. Dalším jevem způsobeným stříbrnými ionty může být chromosomální výchylka. Ionty ve vnitřní části buňky naruší funkci mitochondrií a poškodí ribosomy. Snižuje se syntéza proteinů a plazmatická buňka je znehodnocena. Účinek a mechanismus stříbra je tak mnohostranný. Právě to může mít za následek vznik bakteriální rezistenci vůči stříbru (*Punjataewakupt et al., 2019*).

Dlouhodobé uvolňování stříbrných iontů je prospěšnější k účinnému antibakteriálnímu účinku. Proto je nesmírně důležité vyhodnotit koncentraci uvolněných  $\text{Ag}$  iontů v závislosti na čase. Koncentrace těchto iontů musí dosahovat hodnot minimální inhibiční koncentrace (MIC). Rychlost uvolňování závisí hlavně na velikosti a chemické formě stříbra. Dále to může ovlivňovat teplota, funkčnost a povaha povrchu (*McShan et al., 2014*).

### 1.5.1.3 Cytotoxicita

Stříbro je vysoce toxické pro keratinocyty, fibroblasty bez ohledu na typu terapeutik obsahující a též uvolňující stříbro. Při in vitro studiích bylo prokázáno, že u 50 % fibroblastů myši při 0,0018%  $\text{AgNO}_3$  a 0,006% SSD byla pozorována smrt. Jedná se o studii Kramera a Müllera (*Szmyd et al., 2013*).

Zato výzkum Domingueze a Hidalgo prokázal cytotoxicitu  $\text{AgNO}_3$  už při 0,00007 % již na lidských dermálních fibroblastech. V dalších studiích bylo prokázáno toxické působení iontů stříbra při proliferaci fibroblastů, inhibuje syntézu DNA a ATP. Na glioblastomech a plicních fibroblastech se prokázala cytotoxicita nanokrystalického stříbra (AgNP). Poškozuji mitochondrie a zvyšují produkci kyslíkových radikálů ROS (Zhang *et al.*, 2014).

Dále negativně ovlivňují proliferaci buněk. Zvyšuje superoxidaci NK buněk a aktivitu neutrofilů, proto následkem tohoto působení je účinnější bakteriální funkce a poškodí se, tedy i vlastní tkáň (Zhang *et al.*, 2014).

Mohou se lišit některé účinky na buňky a působení jednotlivých prostředků uvolňující AgNP. Jsou prokázány rozdíly mezi antiseptiky. Při testování se rozdělili a označili antiseptika na toxické a netoxické. Do toxické skupiny patří Suprasorb Ag ( $\text{Ag}^+$ ), 1 % polyhexmethylen biguanid (PHMB) a 1% SSD umocněná v kombinaci s 0,2% chlorhexidinem (CHX). V netoxické skupině běžně používaných antibakteriálních antiseptik jsou Acticoat ( $\text{Ag}^0$ ), Aquacel Ag ( $\text{Ag}^+$ ), povidon jod (PVP-I) a oktenidin (OCT) (Hajská *et al.*, 2017; Szmyd *et al.*, 2013).

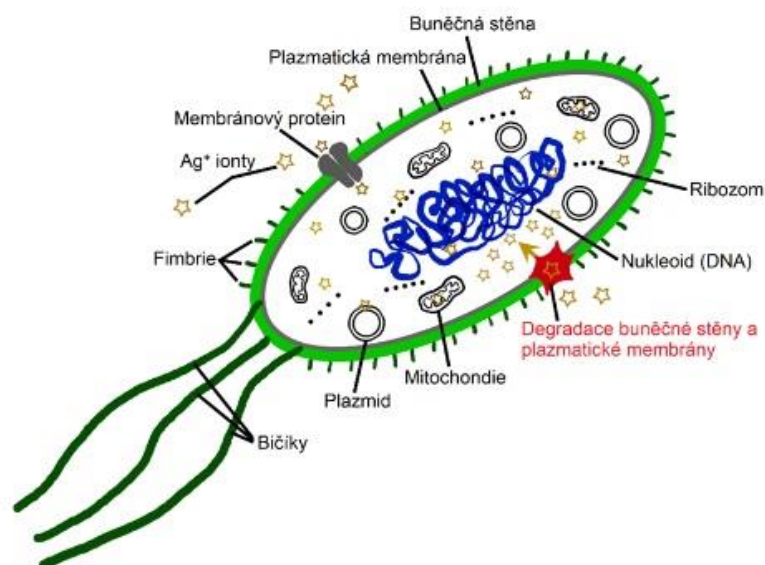
### 1.5.2 Nano-stříbro AgNP

Zcela přesný mechanismus působení nano-stříbra není dodnes zcela objasněn. Předpokládá se, že působí dvěma způsoby. Buď uvolňování stříbrných iontů do okolí média a následná interakce s buňkou. Nebo přímým kontaktem bakteriální buňky s kovovým stříbrem. Hlavní roli u přímého kontaktu hraje morfologie, drsnost a hydrofilní nebo hydrofobní vlastnost povrchu. Bakteriální buňka interaguje se stříbrnými ionty v buněčné stěně, bakteriální DNA, buněčné stěně a s proteiny, které se podílejí buněčných procesech viz. obr. 8 (Schacht, 2013).

AgNP nebo stříbrné ionty prochází do buňky difúzí, endocytózou nebo za pomoci transmembránových proteinů. Uvnitř buňky převážně v plazmatické membráně se AgNP rozpustí a uvolní se aktivní ionizovaný stříbrný iont  $\text{Ag}^+$ . Ten následně způsobí mitochondriální dysfunkci, poškodí DNA, oxidativní stres, inhibici proliferace a vše vede až k apoptóze či nekróze buněk (Ahmed *et al.*, 2017).

Nanočástice se pohybují v rozmezí 1–100 nm a každá částice obsahuje přibližně 10 000–15 000 atomů stříbra, čímž se stává vysoce reaktivní. Velikost a tvar alespoň částečně určuje koncentraci částic potřebnou pro efektivní toxicitu. Vyšší koncentrace AgNP je nutná pro grampozitivní bakterie, v porovnání s gramnegativními bakteriemi. Předpokládá se, že to souvisí s přítomností vnější tvrdší vrstvy buněčné stěny u  $\text{G}^+$  (McNeilly *et al.*, 2021).

Další faktor, který může ovlivnit toxicitu je přítomnost funkčních skupin na povrchu nanočástic, které mohou působit jako stabilizátory. Přitažlivost umožňuje větší adhezenci a akumulaci nanostříbra na bakteriální povrch (*McNeilly et al., 2021*).



**Obrázek 8:** Buňka vystavená účinku Ag iontů (*McShan et al., 2014*)

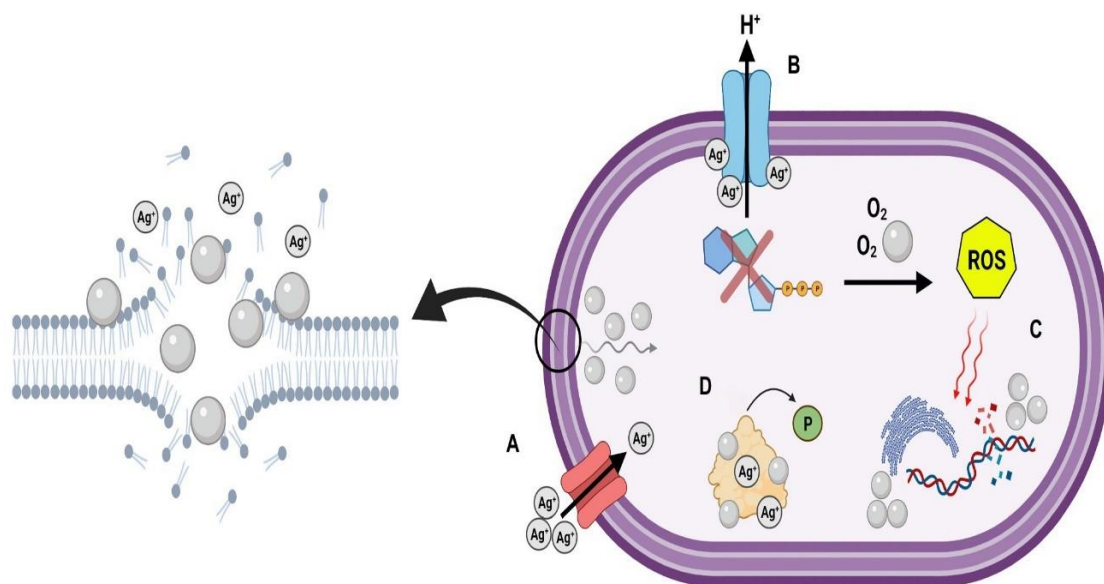
Účinnost nanočástic stříbra je lepší u  $G^-$  než u  $G^+$ . Způsobeno je to tím, že negativní náboj lipopolysacharidů zevní vrstvy gram negativních bakterií je přitahován slabým nábojem na dané částice. Nanočástice o velikosti 100 nm nemohou projít buňkou, ale ovlivňují signální dráhy buňky přes transmembránové receptory (*Simon, 2003*).

Stříbro negativně ovlivňuje transport elektronů, a to vede k produkci a vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a vzájemně působí s enzymy reduktázy. Nadprodukce reaktivních forem kyslíku vede z denuraci antiapoptických proteinů a vytlačení proapoptických proteinů.  $Ag^+$  zvyšuje poškození DNA, to vede k problémům při replikaci a zastaví se buněčný cyklus v G2 fázi (*Chen et al., 2013*).

### 1.5.2.1 Cytotoxicita

Při krátkodobém působení SSD způsobuje mírné podráždění, ovšem po jedné hodině má za následek vážné podráždění cév. Jedna vědecká studie potvrdila vstřebávání stříbra kůží na myších a bylo naměřeno velké množství stříbra ve vnitřních orgánech i krvi z 1% SSD (*Hajská et al., 2017*).

I přesto, že AgNP obsahuje mnohonásobně více stříbra než právě 1% SSD. Ale uvolňování a vstřebávání stříbra závisí na počáteční koncentraci. AgNP způsobí toxicitu tím, že se dostanou do oběhového systému, kde tvoří plazmatickou vazbu s bílkovinou a krevními buňkami. Prochází i hematoencefalickou bariérou, proto je důležité sledovat hladinu stříbra v plazmě a moči (Szmyd *et al.*, 2013).



**Obrázek 9:** Antimikrobiální mechanismy nanočástic stříbra (McNeilly *et al.*, 2021)

Další studie návrhy čtyři hlavní antimikrobiální mechanismy viz obr 9. Bakteriální obálka adheze nanočástic, která poškodí obálku a buněčnou penetraci (A). Dále odpojení dýchacího řetězce (B), poškození buněčných biomolekul a jejich funkcí prostřednictvím ROS (C). A čtvrtým mechanismem je narušení buněčné signalizace prostřednictvím defosforylace proteinů (D) (McNeilly *et al.*, 2021).

### 1.5.2.2 Aplikace nano-stříbra

Nano-stříbro je dnes nejpoužívanějším nanostrukturovým kovem využívaných nejen v biologických aplikacích. Toto stříbro má mnoho výhod, nejvýznamnějšími jsou chemické, fyzikální a biologické vlastnosti. Převážně jeho mnohostranný mechanismus antibakteriálního účinku může zabránit i vzniku bakteriální rezistence. Inhibují mikroorganismy způsobující infekce, které souvisí s léčbou v nemocnicích (nozokomiální infekce) (McShan *et al.*, 2014).

Mnoho studií prokázalo mnohostrannou antimikrobiální účinnost nanočástic stříbra (AgNP), která je jedinečná a pravděpodobně se i proto stala oblíbeným alternativním antibakteriálním činidlem. Nanočástice stříbra se používají úspěšně jak v biomedicínských a antimikrobiálních technologiích (Simon, 2003).

V lékařské aplikaci se používají převážně kvůli vývoji a šíření bakteriální rezistenci na antibiotika, která omezuje účinnost léčby infekčních chorob. AgNP je obsažen i v mnoha výrobcích běžné domácnosti. Jako je textil, kosmetika, obaly a nádoby na potraviny se vyskytuje u biologických aplikací v mnoha podobách a formách (*Simon, 2003*).

Stříbrné nanočástice vykazují vysokou baktericidní aktivitu, které nejsou cytotoxické pro lidské buňky. Silně zvyšují antibakteriální aktivitu běžných antibiotik proti multirezistentním bakteriím (*Kramer et al., 2018*).

Obvaz obsahující AgNP při studiích in vivo měl příznivé účinky na granulaci a výrazně urychlil hojení popálenin a chronických lidských ran. Vykazuje velmi silné antibakteriální i protizánětlivé účinky. AgNP vykazují zvýšenou buněčnou apoptózu a potlačují uvolňování matrixové metaloproteinázy (MMP), tím se snižuje lokální hladina AgNP a minimalizují se (*McShan et al., 2014*).

### 1.5.3 Chlor

Chlor má velmi dobré dezinfekční a antiseptické vlastnosti. V lékařství se díky tomu používá snad už od 18. století. Nejčastěji se používá ve sloučeninách jako chlornan sodný ( $\text{NaClO}$ ), kyselina chlorná ( $\text{HOCl}$ ) a N-chlorové sloučeniny. Chlorová antiseptika jsou nejúčinnější při nejvyšší koncentraci. Tudíž  $\text{HOCl}$  v porovnání s ostatními přípravky je nejlepší. Chlornan se ve vodě ionizuje a uvolní  $\text{Na}^+$  a  $\text{OCl}^-$ , nebo popřípadě vytvoří reaktivní  $\text{HOCl}$ . Tato kyselina se štěpí na  $\text{HCl}$  a superoxidové radikály ROS (*Peck et al., 2011*).

Dakinův roztok neboli roztok chlornanu sodného, dnes známý jako chlorové bělidlo (SAVO) se začal používat už za světové války jako lokální antiseptikum na otevřené rány. Jde o alkalický roztok s dobrým antibakteriálním účinkem. Usmrtí bakterie a rozpustí nekrotickou tkáň (*Nagl et al., 2003*).

Díky své oxidativní aktivitě ničí viry, plísňe, houby, gramnegativní a grampozitivní bakterie. Do této skupiny antiseptik patří chloramid SH-Cl, což je derivát kyseliny hyaluronové, vyráběný ve společnosti Contipro a.s.



### 1.5.3.1 Rezistence vůči antiseptikům obsahující chlor

Antiseptika obsahující chlor obvykle působí na více cílových buněk a působí nespecificky. Chlor reaguje s buněčnou stěnou, membránou a poškodí je, čímž se deaktivuje mikroorganismy. Hlavním zdrojem odolnosti vůči chlóru je bariéra propustnosti a spotřebou chloru. Rezistentní účinky jsou určovány geny a ovlivňovány prostředím. Mnoho studií ukazují na to, že chlor indukuje expresi mnoha funkčních genů, včetně oxidačního stresu, effluxní pumpy, sekrece antioxidantních enzymů, oprava buněčné stěny a DNA. Grampozitivní bakterie jsou považovány za odolnější vůči chloru. Mají silnější buněčnou stěnu než gramnegativní bakterie. Další studie zjistila, že bakterie rezistentní na chlor má značné rozdíly v obsahu mastných kyselin v buněčných stěnách a membránách (Luo et al., 2021).

Nejde však bezpečně určit, zda ochranná funkce těchto intracelulárních molekulárních reakcí je silnější než bariéry propustnosti nebo látky spotřebovávající chlor (Luo et al., 2021).

### 1.5.3.2 Antimikrobiální mechanismus působení

Chlor je fungicidní a baktericidní. Tyto aktivity se zvýší přítomností bílkovin (transchlorace). Část aktivního chloru přenesen na aminokyseliny patogenů, tak i lidského těla a poškodí se aktivita proteinů. Radikály vzniklé z HOCl a chloraminů reagující s nukleotidy a lipidy podporují peroxidaci ve fosfolipidových membránách. Zvýší se tím její permeabilita (Punjataewakupt et al., 2019).

Chlornan sodný zase proniká do buněčné membrány a reaguje s enzymy. Poruší se oxidativní fosforylace a je narušena i funkce biologických membrán. Uvnitř buněk ionizací z chlornanu vzniká kyselina chlorná a způsobí halogenizaci bakteriální buněčné stěny. Tato kyselina produkuje kyslíkové radikály poškozením mitochondrií a dochází k nekróze a apoptóze. Může nastat i situace, že se chlor váže na aminy nukleotidových bází a vytvoří se deriváty chloru, které poškodí DNA (Cardile et al., 2010).

### 1.5.4 Oktenidin®

Oktenidin dihydrochlorid wound irrigation solution se využívá jako antiseptický přípravek v nemocnicích od roku 2013. Jedná se o bezbarvý roztok na čištění a zvlhčování chronických ran. Dále existují i další formy oktenidinu (Sorelex v pevné formě). Vhodné pro efektivní, rychlé a bezbolestné výplachy chronických ran a popálenin. Díky svým vlastnostem a nízkému povrchovému napětí roztoku je vynikající pro zvlhčování a čištění povrchu tkání i na hůře dostupná místa. Vykazuje i výborný účinek na mikroorganismy biofilmu a zamezuje případnému růstu mikrobů v obvazech a krytí zvlhčených roztokem (Schülke, 2021).

Oktenidin dále vyrábějí ve formě mastí, gelů a krycích obvazů. Účinná látka je velmi stabilní a povrchově kationtově aktivní. Obsahuje dvě centra, která jsou od sebe oddělena dlouhými alifatickými uhlovodíkovými řetězci. Díky těmto vazbám se snadno váže i na negativně nabitě povrchy (buněčné stěny, eukaryotické membrány) (*Hübner et al., 2010*).

#### **1.5.4.1 Cytotoxicita Oktenidinu**

OctWIS může tvořit interakci s lipofilními látkami a fosfolipidy jak lidských, tak savčích buněčných membrán. Některé studie prokázaly, že se váže i na povrch myších fibroblastů, lidských epiteliálních buněk a keratinocytů s kterými tvoří stabilní komplexy. Cytotoxický účinek oktenidinu je v těchto komplexech redukován, ale jeho antibakteriální aktivita se nezmění (*Stahl et al., 2010*).

#### **1.5.4.2 Antimikrobiální mechanismus působení**

Váže se na buněčné stěny a membrány bakterií díky pozitivně nabitým centrům a hydrofobním řetězcům OctWIS. Dochází ke ztrátě rovnováhy, která vede ke smrti buněk. Oktenidin působí velmi rychle i při nízkých koncentracích. Udává se, že do 15 minut depolarizuje či dokonce úplně permeabilizuje membrány mikroorganismů. Předpokládá se, že OctWIS vzájemně působí se solemi glycerolových fosfátů mastných kyselin. Tyto kyseliny se objevují v buněčných membránách a snižuje její propustnost. Vytvořená vazba v buněčné stěně mikroorganismů s proteiny a polysacharidy způsobuje uvolňování cytoplazmatických složek. Svou silou a vlastnostmi účinně zabírá proti širokému spektru gram pozitivních  $G^+$  a gram negativních  $G^-$  bakterií a plísní. Oktenidin působí i proti obaleným virům. Žádný pozitivní účinek však nevykazuje na neobalené, hydrofilní viry jako jsou adenoviry. Dobrá snášenlivost byla potvrzena mnoha klinickými zkušenosti v průběhu mnoha let při klinických studiích na chronických ranách (*Obermeier et al., 2018, Hübner et al., 2010*).

#### **1.5.4.3 Rezistence na oktenidin**

Oktenidin se snadno přizpůsobí, ale nevykazuje žádné známky rezistence. Studie ukazují, že i za nejnepríznivějších podmínek zůstává OctWIS jako antimikrobiální antiseptikum bez rezistence a plně účinné. Pouze nesprávné použití a dávkování může způsobit riziko bakteriální rezistence a odolnost na oktenidin (*Shepherd et al., 2018*).

Oktenidin působí převážně narušením buněčné stěny a plazmatické membrány. Oslabí primárně virovou obálku a má tudíž omezenou účinnost proti neobaleným virům. Nové studie ukazují i na to, že účinnost antiseptik může zhoršit a snížit organický materiál (jako je krev), který je přítomen v ranách (*Barreto et al., 2020*).

OctWIS rychle inaktivuje biofilmy stafylokoků na polystyrenové destičce, nerez a močových katetrů v přítomnosti nebo i v nepřítomnosti sérových proteinů (*Barreto et al., 2020*).

### **1.5.5 Chlorhexidin**

Chlorhexidin CHX je dvojmocná kationtová biguanidová molekula, která se používá v antiseptických a dezinfekčních přípravcích od roku 1954. Hojně je využíván zejména při chirurgických zákrocích, v přípravcích na mytí rukou, ve stomatologii jako prevence před infekcí a jako konzervační prostředek. Topická antiseptikum CHX ve formě gelu se pohybuje v koncentracích 1–2 %, ústní vody pouze v rozmezí 0,02–0,2 %. Jedná se o alkalickou látku, která je ve vodě téměř nerozpustná (*Karpiński a Szkaradkiewicz, 2015*).

V přípravcích se využívá jeho acetátové a glukonátové soli, které jsou ve vodě rozpustné. Při léčbě chronických ran je vhodný jako zvlhčovač ran a pro očištění kontaminovaných poranění. CHX se vyskytuje jako kationtové činidlo a tím pádem neslučitelné s aniontovými povrchově aktivními látkami. Účinná koncentrace a toxická aktivita je snížena v přítomnosti neiontových aktivních látek. Organické látky a fosfolipidy též snižují celkovou aktivitu chlorhexidinu (*Punjataewakupt et al., 2019*).

#### **1.5.5.1 Cytotoxicita**

Toxické mechanismy nejsou selektivní jenom na mikroorganismy. Poškozuje různé lidské buňky, které se podílejí na hojení ran (fibroblasty, lymfocyty, makrofágy...) v závislosti na koncentraci a čase. Aplikace CHX zpomaluje tvorbu granulační tkáně a rychlost epitelizace již v koncentracích od 0,1–0,5 %. Lokální aplikace CHX na kůži má i v některých případech nežádoucí účinky. Nejčastěji způsobuje dermatitidy, vzácněji i alergická reakce a anafylaktický šok (*Li et al., 2014*).

#### **1.5.5.2 Antimikrobiální mechanismus působení**

Toxický účinek pro kvasinky, plísně a G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterie. Zabraňuje růstu spor i při vysokých koncentracích. Velmi malou účinnost vykazuje i proti virům. Jeho aktivitou dochází k narušení lipidových obalů, a tudíž neobalené viry nedokáže inaktivovat. Vnější vrstva buněk nese ve většině případů negativní náboj stabilizovaná dvojmocnými kationty (Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>). Je spojená s polysacharidovými složkami gram pozitivních bakterií nebo lipopolysacharidy gram negativních bakterií a samotnou cytoplazmatickou membránou (*Punjataewakupt et al., 2019*).

CHX svým kladným nábojem a hydrofobní oblastí vzájemně působí s buněčným povrchem a cytoplazmatickou membránou. I při nízké koncentraci se vytěsní dvojmocné kationty a nespecificky se váže na negativně nabitě fosfolipidy v buněčné membráně. Tato vazba poruší buněčný růst a membrána ztrácí svoji tekutost a přestává být semipermeabilní pro buněčný materiál. Uvolní se draslík, fosfor a další ionty, které vedou k buněčné smrti (*Cooper a Kirketerp–Møller, 2018*).

Účinnost chlorhexidinu je závislý na koncentraci, pH prostředí a čase. Při nízkých koncentracích do 0,06 % působí bakteriostaticky. Koncentrace vyšší než 0,12 % má baktericidní aktivitu (smrt buněk způsobí cytolýzou). CHX prochází bakteriální stěnou nebo vnější membránou pomocí difúze. Se vzrůstající koncentrací uvnitř buňky dojde k znehodnocení cytoplazmy a vyvolá koagulaci intracelulárního obsahu, který vede ke smrti buněk (*Karpiński a Szkaradkiewicz, 2015*).

Další poškození na mitochondriích a tím může dojít k vyčerpání ATP v buňce a vyšší produkce ROS. Tato vyšší produkce ROS poškozuje DNA a vede ke genotoxicitě. Tímto je potlačena syntéza DNA tvorbou kovalentních vazeb, snižuje se tak buněčná proliferace a negativně působí na syntézu a hromadění proteinů. Zvýšený obsah intracelulárních vápníkových iontů přispívají k oxidačnímu stresu v buňkách vedoucí až k nekrotické buněčné smrti. Cytoskelet buněk je též narušen a mění její konformaci (*Percival et al., 2010*).

### **1.5.5.3 Rezistence na chlorhexidin**

Chlorhexidin působí účinně proti infekcím a nemá vedlejší účinky. Během posledních 60 let se nevyskytly rezistentní organismy, které by vykazovali rezistenci na CHX. Nenapomáhá vzniku mikrobiálních rezistencí a nenavyšuje přítomnost již přítomné rezistentní mikroflóry. Nízké koncentrace ovlivňují integritu cytoplazmatické membrány a vysoké koncentrace naopak způsobují tuhnutí cytoplazmy. Membránově aktivní látky mohou poškodit buněčnou stěnu a vnější membránu. Což vede až ke kolapsu membránového potenciálu a intracelulárního úniku. V důsledku pasivní difúze a další adaptací dochází ke koagulaci cytosolu (*Cooper a Kirketerp–Møller, 2018*).

Chlorhexidin je širokospektrální antiseptikum. Vykazuje dlouhodobou aktivitu ve srovnání s ostatními biocidy. CHX má bakteriální i baktericidní aktivitu v závislosti na použité koncentraci. Je kladně nabitý a jako takový se váže na záporně nabitou bakteriální buněčnou stěnu (*Williamson et al., 2017*).

Při nízkých koncentracích CHX dochází ke ztrátě osmoregulačního účinku. Metabolická kapacita vede ke ztrátě iontů dusíku s následnou inhibicí buněčného dýchání. Vysoké koncentrace vedou k úplné ztrátě integrity membrány s následným únikem obsahu buněk, a nakonec buněčná lýza a smrt (*Williamson et al., 2017*).

Neexistují žádné standardní metody pro testování citlivosti na chlorhexidin. Nejčastějším uváděným mechanismem rezistence jsou effluxní pumpy. Tyto proteinové komplexy jsou schopné aktivně pumpovat chlorhexidin z buněk. Pumpy jsou široce distribuovány mezi grampozitivní a gramnegativní bakterie. Effluxní systém QacA je nejvíce studovaný, a právě byl spojen se zvýšenou rezistencí k chlorhexidinu. Nejčastěji se nachází u stafylokoků a ostatních grampozitivních bakterií (*Williamson et al., 2017*).

## **1.6 Bakteriální rezistence na antiseptika**

Rezistence čili odolnost vůči antimikrobiálním látkám se stala závažným celosvětovým zdravotním problémem. Bakterie, aby zabránili působení antimikrobiálních látek používají mechanismus, kterým změni specifický cíl. Tím značně naruší mikrobiální růst. Úpravou cíle dochází nejčastěji ke snížení afinity k léku (*Tumah, 2009*).

Interakce na povrchu buněk může mít vliv na životaschopnost, ale většina antiseptik je intracelulárně aktivní. Vnější vrstvy mikrobiálních buněk má významný vliv na náchylnost k antiseptikům (*Gottrup et al., 2014*).

K dispozici je několik technik pro studium mechanismů působení antiseptik. Například vyšetření absorpce, lýza a únik intracelulárních složek, porucha buněčné homeostázy, inhibice enzymů, transport elektronů, mikroskopické vyšetření buněk vystaveným antiseptikům (*McDonnell a Russell, 2020*).

V posledních několika letech byl dosažen pokrok v pochopení odpovědí různých typů bakterií na antibakteriální látky. Výsledkem bývá rezistence přirozenou vlastností organismu (vnitřní rezistence), získaná mutací nebo získáním plazmidů (samoreplikující se) nebo transpozomů. Vnitřní rezistenci vykazují gramnegativní bakterie, bakteriální spory a mykobakterie. Získaná rezistence zprostředkovaná plazmidy se pozoruje převážně u stafylokoků (*Lee et al., 2017*).

### 1.6.1 Mechanismus vnitřní bakteriální rezistence

Aby se antiseptikum či dezinfekční molekula dostala do místa svého cíle, musí být překříženy vnější vrstvy buňky. Složení a povaha těchto vrstev je dána typem organismu. Působí jako bariéra propustnosti, kde dochází ke snížené absorpci a méně často k degradaci sloučenin. Vnitřní rezistence je vrozená a tudíž přirozená, chromosomálně řízená, která umožní obejít působení antiseptik. Gramnegativní bakterie mají tendenci být odolnější než grampozitivní organismy (*Tumah, 2009*).

Rezistence bakteriálních spor vůči antiseptikům se vyvíjí během sporulace. Sporulace sama o sobě je proces, při kterém se z vegetativní buňky vyvine spora. Nástup rezistence na konkrétní antiseptikum souvisí s konkrétním stádiem vývoje spor (*Alibert et al., 2017*).

Buněčná stěna grampozitivních bakterií se skládá z peptidoglykanu a kyseliny teichové. Ani jeden z nich však nepůsobí jako účinná bariéra pro vstup antiseptik. Látky s vysokou molekulovou hmotností prochází buněčnou stěnou poměrně snadno. Změnou tloušťky a stupně zesíťování peptidoglykanu se změní buněčná citlivost na antiseptika. Nonmucoidní kmeny jsou usmrceny rychleji než mukoidní kmeny. Sliz má důležitou ochrannou funkci, buď jako fyzická bariéra proti antiseptikům nebo jako volná vrstva integrující s molekulami antiseptik (*McDonnell a Russell, 2020*).

Gramnegativní bakterie jsou odolnější vůči dezinfekčním přípravkům a antiseptikům než nesporulující grampozitivní bakterie. Vnější membrána G<sup>-</sup> bakterií působí jako bariéra, která omezuje vstup mnoha antiseptikům (*Alibert et al., 2017*).

### 1.7 Bakteriální rezistence na antibiotika

Enzymy zapojené do syntézy peptidoglykanů jako je například PBP, se stávají tím daným cílem. Zodpovědnost za rezistenci na antibiotika u *Staphylococcus aureus* je právě hlavně daná změna PBP. Máme několik PBP (1a, 1b, 2a, 2b, 2x a 3) ve kterých může vznikat bodová mutace, která bývá zodpovědná rezistenci. Dalším příkladem může být vysoká odolnost vůči methicilinu. Způsobeno to bývá získáním genu *mecA*, který odpovídá za syntézu nového PBP, PBP2a. Nízkoúrovňový odpor nastává při celkové absenci *mecA* v důsledku nadprodukce PBP4 nebo modifikací PBP2 (*Périchon et al., 2019*).

Mutace v ribozomálních proteinech jsou také zodpovědné za rezistenci. Hlavním mechanismem rezistence u ribozomálních proteinů je změna cílů fluorochinolonů topoizomeráz typu II, DNA gyrázy a topoizomerázy IV. Enzymy podílející se na syntéze bakteriální DNA se skládají z dvou podjednotek (pro DNA gyrázu GyrA a GyrB) a (pro topoizomerázu IV ParC a ParE). Mutace v těchto specifických oblastech zabraňuje fixaci chinolonů na komplex DNA–enzym. Úroveň rezistence závisí na bakteriálních druzích a na chinolonu. U gram negativních bakterií je cíl DNA gyráza, natož u gram pozitivních bakterií je to topoizomerázu IV. Častější mutace bývají u podjednotek GyrA nebo ParC (Périchon *et al.*, 2019).

Gram negativní bakterie mají vnější membránu vně peptidoglykanu. Skládá se z lipopolysacharidu a fosfolipidů. Vnější membrána funguje jako bariéra. LPS u ní zodpovídá za nepropustnost pro mnoho molekul. Některé proteiny jako jsou poriny působí jako vodné kanály, které využívají antimikrobiální látky, aby pronikly do membrány. Odolnost porinů závisí na počtu kopiím, velikosti pórů. Velmi nízkou propustnost pro malé hydrofilní molekuly má vnější membrána u *P. aeruginosa* (Rousselle *et al.*, 2019).

Rezistence na antibiotika, se čím dál více stává celosvětovým problémem. Jejich rozkvět a častější používání měl však velké cíle a naději v léčbě infekčních nemocí. S rostoucím používáním na cokoli přestaly dostatečně působit a začala vznikat multirezistentnost bakteriálních kmenů. Opakované používání antibiotik, je právě hlavní příčinou vzniku bakteriální rezistence (McDonnell a Russell, 2020).

Existují dva hlavní typy rezistence. Vnitřní a získaná rezistence.

### 1.7.1 Vnitřní odolnost

Přirozená či vnitřní rezistence je přítomna ve všech bakteriích daného rodu nebo druhu. Tento typ rezistence často bývá výsledkem fyziologických charakteristik bakteriálního druhu. Často je způsobena nepřístupností daného antibiotika, nízkou afinitou k cíli nebo nepřítomností cíle (Périchon *et al.*, 2019).

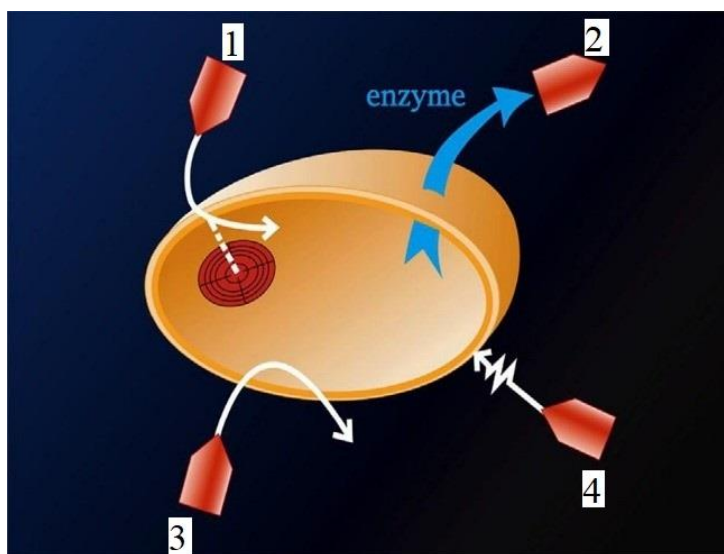
Například přítomnost vnější membrány gramnegativních bakterií (př.: *Escherichia coli*) často vede k odolnosti vůči různým třídám léčiv díky nepropustnosti. U *Pseudomonas aeruginosa* je typický široký rozsah substrátové vnitřní rezistence vyplývající z obzvláště nízké permeability vnější membrány, která je spojena s řadou endogenních multidrug effluxních systémů (MexAB–OprM a MexXY–OprM) a chromosomálně kódovaným  $\beta$ -laktamáza (AmpC) (Siddiqui a Bernstein, 2010).

### 1.7.2 Získaná odolnost

Tato rezistence je přítomna pouze u některých kmenů stejného rodu nebo druhu. V některých případech může i převládat. Jedná se třeba o produkci penicilinázy ve stafylokokách, objevující se až u 90 % kmenů (Périchon et al., 2019).

### 1.7.3 Mechanismy rezistence

Bakterie si z biologického hlediska vyvinula hlavní mechanismy rezistence. Na obrázku 10, lze pozorovat seshora směr proti hodinovým ručičkám znázorňující změnu cíle, ztrátu nebo snížení afinity léčiva (1), dále produkce enzymu inaktivující nebo modifikující dané léčiva (2), nepropustnost mutací v porinovém kanálu nebo zmenšení jeho průměru u gram negativních bakterií (3) a nepropustnost aktivním energeticky závislým odtokem léčiva (4). Společným cílem těchto odlišných mechanismů je zabránit interakci daného léčiva s jeho cílem (Périchon et al., 2019; Schreml et al., 2010).



Obrázek 10: Mechanismy rezistence (Périchon, 2019)

## 1.8 Křížová rezistence

Zkřížená rezistence odpovídá rezistenci vůči všem antimikrobiálním látkám (jak antiseptika, dezinfekce i antibiotika) patřícím do stejné třídy s jedním druhem mechanismu. Do stejných tříd patří chemicky příbuzné látky, které jsou rezistentní na jednoho člena dané třídy (Chandan et al., 2017).

Čím víc se stává lék aktivnější, tím je nižší úroveň rezistence. Platí, že nově vyvinuté látky jsou aktivnější než staré molekuly ze stejné třídy. Úroveň rezistence závisí i na stupni citlivosti hostitelské bakterie (Périchon et al., 2019).



Pro dosažení křížové rezistence jsou nejúčinnější integrony. Ty představují genetický systém pro zachycování a expresi genů rezistence. Integrony bývají umístěny v chromozomech nebo plasmidech. Jsou složeny z genů, které se získají specifickou rekombinací. Bylo popsáno pět tříd integronů zapojených do šíření rezistence. U integronů třídy 1 se nachází většina genů rezistence a byly detekovány u mnoha gram negativních a méně u gram pozitivních bakterií (*Chandan et al., 2017*).

Tyto geny mají aparát, který je nezbytný k zachycování exogenních genů. Je složen z integrázu (intl), která zapříčiní rekombinaci cirkularizované DNA. Dále rekombinační místo (attI) a promotor (pant), který celkově řídí transkripci zachycených genů. Tento integrační proces je reverzibilní. Polohou DNA v integronu je daná míra rezistence. Čím blíže k promotoru, tím vyšší je úroveň exprese genů rezistence (*Wang et al., 2014*).

### **1.8.1 Rozšířená křížová rezistence**

Rozšířená křížová rezistence je způsobena jedním možným mechanismem, tudíž je to totožné s křížovou rezistencí. Rozdílem však je to, že vyvolává rezistenci různým třídám léčiv. Proto to nazýváme rozšířenou křížovou rezistencí. Příkladem tohoto typu rezistence je nadměrná exprese effluxních pump, které mohou mít velmi široký rozsah substrátů (*Périchon et al., 2019*).

## **1.9 Bakteriální rezistence antiseptika vs. antibiotika**

Stejně jako u antibiotik, tak i u antiseptik a dezinfekčních prostředků mohou vznikat rezistence. Na rozdíl od antibiotik nemusí rezistence nebo zvýšení MIC antiseptik nutně souviset se selháním a narušením funkcí. Zvýšení MIC antibiotik může mít vážné významné důsledky, ale cílový organismus není ovlivněn svým antimikrobiálním účinkem (*McDonnell a Russell, 2020*).

### **1.10 Effluxní pumpy**

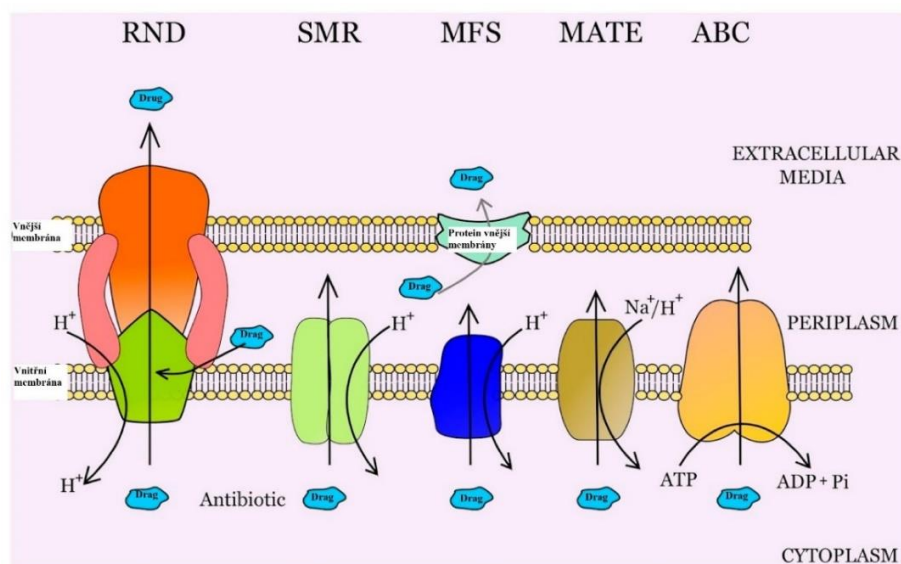
Jedním z hlavních způsobů, jak bakterie přežívají účinek těchto látek je jejich efflux, tedy vylučování. Antiseptikům i antibiotikům je v důsledku snížené koncentrace v buňce zamezen přístup k cílové buňce. Ztrácí tím tak svoji účinnost v místě působení. Vylučování probíhá prostřednictvím proteinových pump obsažených v cytoplazmatické membráně buňky. Ty jsou přítomné jak v gram negativních, tak i gram pozitivních bakteriálních kmenů (*Piddock, 2006*).

Činnost effluxních pump nesouvisí přímo s antiseptickými látkami. Přírozenou a hlavní rolí pump je obrana proti škodlivým látkám. Ve spojení se vznikem bakteriální rezistence však znázorňuje významný faktor zvyšující životnost a patogenitu mikroorganismů. Pumpy rozeznávají jednu či dokonce řadu navzájem nepříbuzných látek. Chromosomálně kódované effluxní pumpy mohou být zodpovědné za vnitřní rezistenci na různé antimikrobiální látky, i pro látky, u kterých se původně počítalo se sníženou propustností vnější membrány (Blanco *et al.*, 2016).

Effluxní pumpy jsou přítomny ve všech organismech. Dodnes bylo popsáno pět rodin multirezistentních effluxních systémů MDR: Major Family Facilitator Superfamily (MFS), ATP-binding cassette (ABC), the Resistance-Nodule-cell Division (RND), the Small Multidrug Resistance (SMR) a Extruze více drog a toxických sloučenin (MATE). Přehled pump v tabulce 1 a obrázku 11 níže (Périchon *et al.*, 2019).

**Tabulka 1:** Typy effluxních pump

Zkratka	Celý název skupiny	Zdroj energie
RND	Resistance nodulation division family	Protonový gradient
MFS	Major facilitator superfamily	Protonový gradient
SMR	Staphylococcal multiresistance family	Protonový gradient
ABC	ATP binding cassette	Hydrolýza ATP
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion	Protonový gradient
		Gradient Na <sup>+</sup> iontů

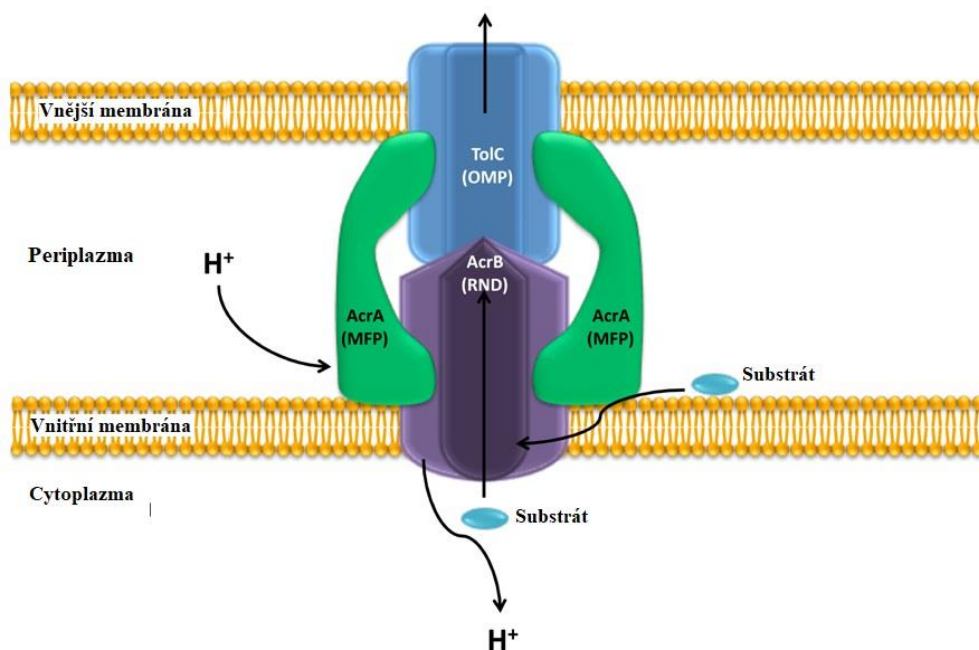


**Obrázek 11:** Typy pump a vylučování substrátů (Blanco *et al.*, 2016)

Jelikož jde o aktivní vylučování, musí se čerpat dostatek energie. Téměř všechny pumpy využívají energii z protonového gradientu na membráně. V případě sekundárního aktivního transportu jde proton do cytoplazmy na úkor vyloučené molekuly antimikrobiální látky.

Vysokou odolnost vůči antiseptickým a antimikrobiálním látkám vykazují gram negativní bakterie. Membrány obsahují proteinové pumpy ze skupiny RND. Vyznačují se širokou substrátovou specifitou. Vylučování těchto pump se skládá ze tří částí, a to z transportního proteinu ve vnitřní membráně (IEP), přídatný protein v periplazmě (PEP) a protein vnější membrány (OEP) (Pidcock, 2006).

Protein IEP uchytí substrát ve fosfolipidové dvojvrstvě vnitřní membrány buňky a předá ho proteinu vnější membrány k finálnímu vyloučení. Spolupráce mezi proteiny umístěnými v periplazmatickém prostoru mezi membránami zajišťuje přídatný protein. Díky schopnosti vylučovat velké množství odlišných látek jsou RND pumpy považovány za hlavní příčinu vzniku multirezistentních bakteriálních kmenů (viz obr. 12). Substráty nejmenších multirezistentních pump jsou detekovány u *S. aureus* (Smr) a *E. coli* (EmrE). A zrovna tyto substráty jsou přítomny u mnoha antiseptik, a i v dezinfekčních prostředcích (Blanco et al., 2016).



**Obrázek 12:** Effluxní systém RND AcrAB–TolC gramnegativní bakterie (Alvarez–Ortega, 2013)

Právě effluxní pumpy u *P. aeruginosa* nebo *S. aureus* mají velký klinický význam, protože tyto bakterie nadprodukují tento druh pump. Metoda, která se používá na detekci činnosti těchto pump jsou založeny na použití fluorescenčního barviva ethidium bromidu EtBr. Používají se připravené misky o různých koncentracích EtBr (*Alvarez–Ortega et al., 2013*).

Nejdůležitější multifunkční effluxní systémy pro klinicky důležité antimikrobiální látky jsou effluxní pumpy z rodiny RND (the Resistance–Nodule–cell Division). Tento systém složený z proteinů vnitřní membrány spojený s faktorem vnější membrány je schopen vytlačit substrát z cytoplazmy do prostředí (*Périchon et al., 2019*).

### **1.11 Změny ve složení LPS jako ochrana před působením antiseptik**

Lipopolysacharidy jsou hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií. Jde o imunodominantní molekulu skládající se z lipidu A (uložena ve vnější membráně), jádra oligosacharidů a opakující se jednotku O–antigenu (směřují ven z povrchu buňky). LPS molekula je důležitá pro patogenezi a virulenci mnoha bakteriálních druhů včetně *Pseudomonas aeruginosa* (*Davis a Goldberg, 2012*).

Gramnegativní bakterie vykazují vysokou úroveň rezistence vůči antiseptikům a dezinfekčním prostředkům. Vnější membrána *P. aeruginosa* je zodpovědná za její odolnost. Ve srovnání s ostatními organismy existují značné rozdíly ve složení LPS a obsahu kationtů ve vnější membráně. Rozdíly ve složení LPS O–antigenu hrají významnou roli pro sérotypizaci kmenů (*McDonnell a Russell, 2020*).

LPS se podílí na připojení k hostitelské buňce již už při počátku vzniku infekce. Poskytuje ochranou funkci před usmrcením zprostředkovaným komplementem. Vysoký obsah  $Mg^{2+}$  napomáhá vytvářet silné vazby LPS–LPS. V důsledku své malé velikosti nemusí poriny umožňovat difúzi skrz ně. Vysoký obsah arabiozy vázané na fosfáty v LPS snižují afinitu vnější membrány k polymyxinovým antimikrobiálním látkám. Je velmi důležité interpretovat přítomnost LPS, protože kmeny, u kterých není obsažena molekula LPS, mohou mít oslabenou virulenci (*Davis a Goldberg, 2012*).

Důsledkem vzniku rezistence může být stres z prostředí na povrchu buňky. Změna mastných kyselin na povrchu buněk zabrání vstup cizích látek (i antiseptik) do cytoplazmy. Modifikace složení lipidů v buněčné stěně, a to převážně lipopolysacharidů a lipidů pomáhá zabránit proniknutí antiseptik do gramnegativních bakterií. Změny u grampozitivních kmenů není doposud známy a dostatečně prostudovány (*To et al., 2020*).

## 2 Experimentální část

### 2.1 Materiál

#### 2.1.1 Laboratorní pomůcky

Automatické pipety

Inokulační kličky

Kádinky

Mikrotitrační destička s víčkem

Mikrozkumavky

Odměrný válec

Petriho misky plastové

Plastové stojany na zkumavky

Plastové špičky

Príslušenství pro elektroforézu (plastová nádoba, sklička, držák...)

Spektrofotometrické plastové kyvety

Zkumavky

#### 2.1.2 Laboratorní přístroje

Analytické váhy (Mettler Toledo, Česká republika)

Autokláv (BMT, Česká republika)

Centrifuga (Unimed, Česká republika)

Hlubokomrazící box -80 °C (Eppendorf, Německo)

Chladnička (Liebherr, Česká republika)

Laminární box (Thermo Fisher Scientific, USA)

Mrazák (Gorenje, Slovinsko)

pH metr (XS Instruments, Itálie)

Spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific, USA)

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

Termostat (Edmund Bühler, Německo)

Vortex (IKA-Werke GmbH, Německo)

Vyhřívaná třepačka (Benchmark Scientific, USA)

#### 2.1.3 Software

Detekční systém Alliance (Tokio)

## 2.1.4 Bakterie

Ve všech experimentech jsem používala kmeny *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1961), které byly získány z České sbírky mikroorganismů CCM.

### 2.1.4.1 Příprava bakterií

Vysušené kmeny jsem oživila v TSB tekutém médiu v 50 ml Erlenmeyerově buňce. Bakterie se nechají kultivovat při teplotě 37 °C přes noc. Následně se z těchto bakteriálních kultur připravila glycerinová konzerva (cca 1 ml kultury + 250 µl sterilního glycerolu), která se připraví do kryozkumavek a uchovávají se v mrazícím boxu při –80 °C.

Bakteriální inokulum se připravilo ze zásobních alikvotů bakterií den před prvním použitím přenesením a zaočkováním na Petriho misku s TS (Tryptone Soya) agarem nebo na Mueller–Hinton agar. Daný bakteriální kmen se nechal růst v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Takto připravené kultury se uchovávaly maximálně týden při teplotě 4 °C a používaly se podle potřeb.

Následující tabulka 2 shrnuje složení jednotlivých agarů, které jsem v průběhu experimentů využívala.

**Tabulka 2:** Složení jednotlivých agarů

Agar	Výrobce	Složení
Mueller–Hinton	Oxoid Limited, Velká Británie	Hovězí masová infúze (300 g/l) Kaseinový hydrolyzát (17,5 g/l) Škrob (1,5 g/l) Agar (17 g/l) pH při 25 °C (7,3 ± 0,1)
Tryptone soya	Oxoid Limited, Velká Británie	Pankreatický trávený kasein (15 g/l) Enzymatický rozklad sojových bobů (5 g/l) Chlorid sodný (5 g/l) Agar (15 g/l) pH při 25 °C (7,3 ± 0,2)

Půdy jsem připravovala podle tabulky 3 viz níže. Příslušné množství se nechá sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C na 15 minut. Následně jsem rozlévala cca 25 ml sterilního agaru do Petriho misek. Misky se skladovaly v letnici o teplotě 4 °C maximálně 3 měsíce.

**Tabulka 3:** Hmotnost agarů

Složka	Množství
Tryptone Soya agar	40 g
Destilovaná voda	1 000 ml
Müller–Hinton agar	21 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Pro další daný experiment probíhala kultivace v tekutém Müller–Hinton bujónu (MHB) (složení viz tabulka 4). Přeočkováním z agaru na Petriho miskách do 4 ml tekutého média se připravila na daný den bakteriální suspenze. Samotná kultivace probíhala na třepačce ve zkumavkách při teplotě 37 °C po dobu minimálně 2 hodin, v případě potřeby až do druhého dne.

**Tabulka 4:** Složení Müller-Hinton bujón

Složka	Množství
Müller–Hinton bujón	21 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Následovalo změření optické denzity (OD) v plastové kyvetě na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Vzniklý zákal se upravil na hodnotu 0,5 McFarlandovy řady. Tento zákal odpovídá požadovanému nárůstu bakterií ( $1-2 \times 10^8$  CFU/ml), což souhlasí s hodnotami cca  $OD_{600} = 0,08 - 0,13$ . Ředila jsem v MH bujónu, který se používá i pro měření pozadí.

### 2.1.5 Antiseptika

Používala jsem tato antiseptika viz tabulka 5.

**Tabulka 5:** Testovaná antiseptika

Testované antiseptikum	Aktivní látka		Číslo šarže	Výrobce
Chlorhexidin diglukonát	chlorhexidin	20% roztok	BcBQ5163V	Sigma, Německo
Oktenidin dihydrochlorid	oktenidin	0,05% roztok	9460218	Schülke, Německo
Octan stříbrný AgAc	aktivní stříbro	0,002 mg/l	730815	Sigma, Německo
Derivát hyaluronátu SHCl	chlor	97% prášek	190722	Contipro, ČR

### **2.1.5.1 Příprava antiseptik**

Všechny antiseptika ve formě roztoků se postupně naředila za pomoci MHB do požadované koncentrace. Pevná či prášková antiseptika se nejprve navážila na analytických vahách, rozpustila ve sterilní vodě a naředila opět na požadovanou koncentraci.

### **2.1.6 Příprava roztoků**

#### **2.1.6.1 Akrylamid (AA) 30%**

Do kádinky s míchadlem bylo naváženo 29,2 g AA a 0,8 g methylenebisakrylamid (MBAA). Následně se doplnilo demineralizovanou vodou na 100 g. Po rozpuštění byl roztok uložen v temnu při teplotě 2–8 °C.

#### **2.1.6.2 Tris (1,5 M) + tetramethylethylenediamin (TEMED), pH 8,9**

Do kádinky s míchadlem bylo naváženo 45,43 g Tris a pomalu se přidalo 575 µl TEMED. Vše doplněno demineralizovanou vodou na 230 g. Pomocí HCl 35% se upravilo pH na hodnotu 8,9 a doplnilo vodou na 250 g. Roztok se ukládá v temnu při teplotě 2–8 °C.

#### **2.1.6.3 Tris (0,5 M) + TEMED, pH 6,9**

Do kádinky s míchadlem se navážilo 3,0 g Tris a pomalu se přidalo 230 µl TEMED. Vše doplněno demineralizovanou vodou na 45 g. Pomocí HCl 35% se upravilo pH na hodnotu 6,9 a doplnilo vodou na 50 g. Roztok se ukládá v temnu při teplotě 2–8 °C.

#### **2.1.6.4 SDS (sodium dodecyl sulfát) 10%**

Do kádinky s míchadlem se navážilo 2,5 g SDS a doplněno demineralizovanou vodou na 25 g, mícháno do úplného rozpuštění.

#### **2.1.6.5 APS (ammonium persulfát) 3%**

Do kádinky naváženo 0,3 g APS a doplněno na 10 g demineralizovanou vodou. Skladovat při teplotě 20 °C.

#### **2.1.6.6 Pufr pro elektroforézu 10krát (zásobní roztok–SS)**

Do 1000 ml plastové kádinky s míchadlem navážit 10,0 g SDS, 30,3 g Tris a 114,0 g Glycinu. Přidá se cca 600 ml demineralizované vody, necháme rozpustit a doplníme na 1000 ml demineralizovanou vodou. Zkontrolujeme pH a případně upravíme na hodnoty v rozmezí 8,0–8,5. Roztok uchováváme ve skleněné lahvi v temnu při pokojové teplotě.



Předtím než použijeme je potřeba roztok zředit v poměru 1 díl SS a 9 dílů demineralizované vody. Zkontrolovat pH a upravit na rozmezí hodnot pH na 8,0–8,5. Skladujeme ve tmě při pokojové teplotě. Lze použít maximálně 3x, pak se musí připravit roztok nový.

#### **2.1.6.7 Vzorkový pufr (6x Laemmli pufr)**

Do 25 ml kádinky s míchadlem bylo naváženo 1,211 mg Tris (0,5 M), přidáno 20 ml demineralizované vody a dokonale rozpuštěno. Pomocí 35 % HCl na upravilo pH na hodnotu 6,8.

Do 15 ml zkumavky se navážilo 1,2 g SDS a rozpustilo v 4,1 ml demineralizované vody. Následně se přidalo 1,2 ml připraveného Tris 0,5 M roztoku, špetku cca 2 mg BPB a 4,7 ml glycerolu. Zkumavka se umístila na válečkové míchadlo a počkalo se na dokonalé rozpuštění všech složek. Takto připravený roztok se uchovává při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Před vlastním experimentem se roztok upraví. Rozmražený pufr se důkladně protřepe a přidá se 2-merkapt ethanol ( $\beta$ -ME) v poměru 9:1. Tento roztok se též uchovává při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.1.7 Příprava gelů na elektroforézu**

Před přípravou gelů se nejprve sestaví aparatura a zkontroluje se čistota skel. Čistá, dokonale umytá skla nakonec opláchneme destilovanou vodou a otřeme ubrouskem navlhčeným izopropylalkoholem (IPA).

Na spodní část nalévacího stojanu se umístí gumová podložka, aby vložená skla (tenké a tlusté sklíčko) nasazená do zeleného držáku mohla dokonale těsnit. Pro kontrolu těsnosti skel nalijeme demineralizovanou vodu a zkoukneme, zda to někde neutíká.

Připravíme si separační gel (viz tabulka 6). APS pipetujeme těsně před nalitím gelu. Vše promícháme a ihned pipetujeme mezi skla. Spodní separační gel nalijeme přibližně 1,5 cm od horního okraje menšího skla. Vrstvu gelu necháme ztuhnout. Jakmile dojde k polymeraci, můžeme připravit a nalít druhý vrchní zaostřovací gel.

**Tabulka 6:** Množství separační gel

	SEPARAČNÍ 15 % gel (1 mm)				
	1 gel	2 gel	3 gely	4 gely	5 gelů
H <sub>2</sub> O [mL]	0,89	1,79	2,68	3,57	4,45
AA [mL]	2,51	5,01	7,52	10,01	12,53
Tris pH 8,9 [μL/mL]	250	500	750	1	1,25
SDS 10 % [μL]	50	100	150	200	250
APS 3 % [μL/mL]	250	500	750	1	1,25

Zaostřovací gel se připraví podle tabulky 7, zamícháme a ihned aplikujeme na separační gel. Pipetujeme až po okraj menšího skla, vložíme aplikační hřebínek a necháme polymerovat.

Takto připravené gely jsem uchovávala (max. 3 dny) v lednici v uzavratelném sáčku s vlhkým prostředím, aby se zamezilo vyschnutí. Po vyjmutí hřebíneků propláchneme demineralizovanou vodou, abychom odstranili případné vzniklé vzduchové bubliny.

**Tabulka 7:** Množství zaostřovací gel

	ZAOŠŤROVACÍ 5 % gel (1 mm)				
	1 gel	2 gel	3 gely	4 gely	5 gelů
H <sub>2</sub> O [mL]	1,25	2,5	3,75	5	6,25
AA [mL]	333	665	998	1,33	1,66
Tris pH 6,9 [μL/mL]	250	500	750	1	1,25
SDS 10 % [μL]	20	40	60	80	100
APS 3 % [μL/mL]	150	300	450	600	750

### 2.1.8 Příprava vzorků pro stanovení LPS

Bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) byly zaočkovány a kultura byla inkubována přes noc. Další den následovalo promytí v čistém fosfátovém pufru (PBS). Nechalo se centrifugovat při 3000 rpm na 3 minuty a resuspendovalo se opět v PBS. Určila jsem si množství bakterií v suspenzi při vlnové délce 600 nm.

Následně jsem si odebrala a připravila od každé bakterie 2 zkumavky odpovídající  $6 \cdot 10^8$  bakterií a centrifugovala. Připravené bakterie se resuspendují ve 100 μl lyzačního Laemmliho pufru a resuspendované vzorky zahřejeme na 10 minut při teplotě 95 °C.

Po vychladnutí na pokojovou teplotu se přidá ke vzorkům po 20 μl proteinázy K o koncentraci 2,5 mg/ml a inkubujeme při teplotě 60 °C minimálně 60 minut (120 minut). Proteolytické štěpení zastavíme inkubací při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Centrifugujeme a pro elektroforézu se odebere čistý supernatant (10 μl), zbytek se uchovává při teplotě -20 °C.

### 2.1.9 Příprava bakterií pro extrakci

Den předem jsem si zaočkovala bakterie (čisté bakterie, bakterie po první aplikaci antiseptik, bakterie po desáté pasáži) na MHB kultivační půdu, kultivovat přes noc při 37 °C. V den analýzy jsem si bakterie převedla z plotny do tekutého MHB média a nechala kultivovat minimálně 2 hodiny v třepacím inkubátoru při 37 °C a cca 180–200 otáček za minutu.

Po nárůstu (min. 2 hodiny) jsem bakterie desetkrát zředila a změřila optickou denzitu při vlnové délce 600 nm a upravila suspenzi na hodnotu 0,5 McFarlandovy řady. 1,5 ml suspenze bakterií se nechala sedimentovat v mikrocentrifuze při 10 600 x g po dobu 10 minut. Dále se supernatant odstraní a používá sediment.

Před extrakcí se připraví potřebné roztoky. Na přípravu zásobního 2x SDS pufru je potřeba BME, SDS, glycerol a Tris. Přesné množství je uvedeno v tabulce 8. Nakonec se k pufru přidá 1 mg bromfenolové modři a roztok se vybarví. V případě, že byla potřeba 1x SDS, tak se zásobní pufr zředil 1:1 ve sterilní destilované vodě. Tyto roztoky se uchovávají v mrazáku o teplotě –20 °C.

**Tabulka 8:** Množství na 10 ml 2x SDS pufr

Složka	Množství
4% p-merkaptoethanol (BME)	0,4 g
4% SDS	0,4 g
20% glycerol	2 g
0,1 M Tris-HCl (pH 6,8)	10 ml

Sedimentované bakterie se resuspendují ve 200 µl 1x SDS pufru. Nevortexovat, ale roztok pouze promíchat pomocí pipety. Resuspendované bakterie se nechají zahřívát 15 minut a následně necháme ochladit na pokojovou teplotu.

K vychladlému roztoku bakterií se přidá 10 µl proteinázy K. Ta se připraví navážením 0,625 mg proteinázy K a rozpustí se v 250 µl DEMI vody. Po přidání proteinázy K se roztok s bakteriemi nechá inkubovat při teplotě 59 °C po dobu 3 hodin.

### 2.1.10 Materiál pro barvení lipopolysacharidů Pro-Q® Emerald 300

Souprava na barvení lipopolysacharidů Pro-Q® Emerald 300 (P20495) je složena z těchto částí:

- Gelové lipopolysacharidové barvivo P30635 Kit (P20495), uchovávané při teplotě –20 °C

- Činidlo Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 (složka A)
- LPS standard od *Escherichia coli* sérotypu 055: B5 (složka B), 25 µl roztoku 2,5 mg/ml ve vodě
- Sada P30636 Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300, uchovávaná při pokojové teplotě
  - Barvicí pufr Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 (složka A), 250 ml
- Oxidační činidlo (složka B), 2,5 g kyseliny jodisté

### 2.1.10.1 Příprava roztoků pro barvení LPS

#### a) Činidlo Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300

K tomuto činidlu se přidá 6 ml DMF a do dalšího použití se uchovává při teplotě -20 °C.

#### b) Fixační roztok

Připraví se přibližně 200 ml směsi s 50% methanolem a 5% kyselinou octovou. Přesné množství v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Množství fixačního roztoku

Složka	Množství
Methanol 50 %	100 ml
Kyselina octová 5%	10 ml 99,8%
DEMI voda	90 ml

#### c) Promývací roztok

Promývacího 3% roztoku kyseliny octové se připraví 1 litr viz tabulka 10.

**Tabulka 10:** Množství promývacího roztoku

Složka	Množství
Kyselina octová 5%	30 ml 99,8%
DEMI voda	970 ml

#### d) Oxidační roztok

Do lahvičky s oxidačním činidlem (složka B) s 2,5 g kyseliny jodisté se přidá 250 ml 3% kyseliny octové. Uchovává se při pokojové teplotě. Tento roztok je připraven pro více stanovení.

## e) LPS standard

Část standardu od *Escherichia coli* sérotypu 055: B5 (složka B) jsem 10krát zředila pomocí vzorkového pufru na konečnou koncentraci 250 µg/ml. K tomuto standardu se dále přidá Laemmliho pufr s β-merkapt ethanolom a zahřeje po dobu 5 minut na 95 °C. Takto připravený standard se dále uchovává v mrazáku při –20 °C.

Do předem připraveného vytemperovaného na pokojovou teplotu 5 µl standardu LPS se přidá 50 µl vzorkového pufru. K tomuto naředěnému standardu se přidalo 50 µl Laemmliho pufr s β-merkapt ethanolom.

## 2.2 Metody

### 2.2.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Jedná se o stanovení nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která již inhibuje viditelný růst mikroorganismů.

#### 2.2.1.1 Příprava mikrotitrační destičky

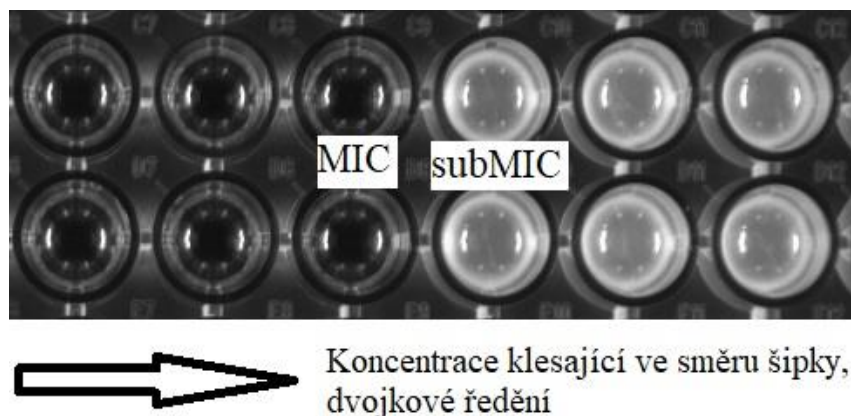
Veškerá manipulace se prováděla sterilně a jako poslední se přidávala bakteriální suspenze. Jednotlivá antiseptika jsem připravovala ve dvojkovém ředění v MHB médiu a nanášela 50 µl do destičky, kde už bylo předem aplikováno 50 µl tekutého 2x MHB média. V případě, že se jednalo o blank (kontrola sterility) a kontrola s nulovým obsahem antiseptik (kontrola růstu) se aplikovalo 50 µl DEMI vody.

Až nakonec se přidá 10 µl bakteriální suspenze. Ta byla připravena předem, upravena na hodnotu 0,5 McFarlandovy řady a přidala se do každé jamky, kromě blanku. Toto množství suspenze odpovídá  $5 \times 10^6$  CFU/ml bakterií v MH médiu. Pracuji s objemem 100 µl na jamku a inokulum 10 µl, tím je zásobní suspenze bakterií 0,5 McFarlandovy řady ředěna 1:20.

Destička se uzavřela víčkem a vložila do sáčku a nechala se kultivovat v třepačce při 150 RPM a teplotě 37 °C do druhého dne. Až následující den se odečítaly výsledky a destička se vyfotila.

#### 2.2.1.2 Vyhodnocení MIC podle zákalu

Vyhodnocení jsem prováděla vizuálně a následně vyfotila pomocí analyzátoru Syngene G-boxu. Poslední políčko v destičce bez zákalu nám naznačuje minimální inhibiční koncentraci. Začínající zákal značí aktivní růst bakterií, tudíž negativní výsledek. Vše je znázorněno na obrázku 13.



**Obrázek 13:** Vyhodnocení MIC a subMIC

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je taková koncentrace antiseptik, která nevede k viditelnému růstu bakterií po inkubaci přes noc při 37 °C. Předpokládá se, že tento model správně identifikuje MIC jako tzv. prahovou hodnotu, kde rezistentní bakterie přetrvávají a náchylnější bakterie odumírají. Citlivé buňky mohou být výrazně poškozeny neletální subminimální inhibiční koncentrací (subMIC) a těmito negativními účinky mohou zvýšit rozsah koncentrací antiseptik či léčiv, kde jsou selektovány rezistentní kmeny. U subMIC je situace taková, že citlivé bakterie nezemřou, ale budou růst velmi pomalu.

### 2.2.1.3 Opakovaná inkubace bakterií s antiseptiky

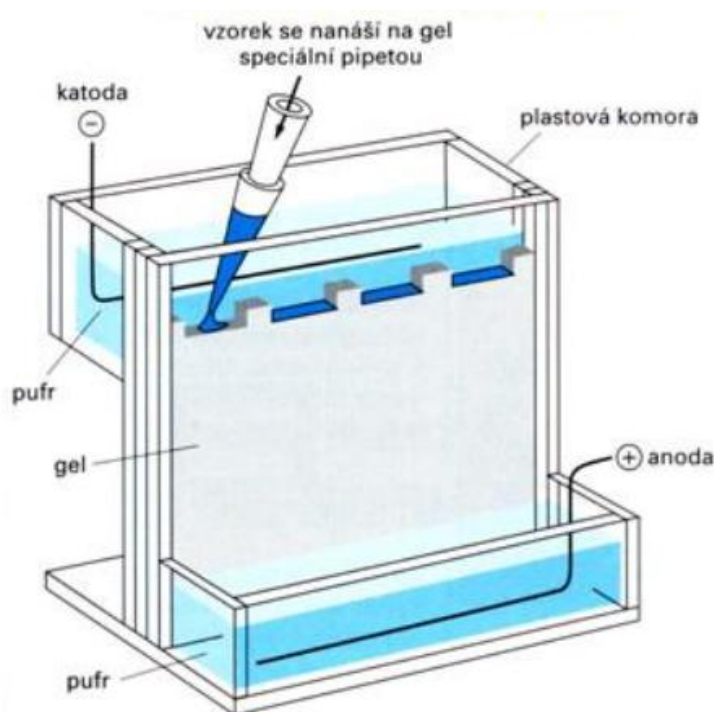
Bakterie narostlé v subMIC jamce byly použity pro inokulaci nového média s antiseptikem o dvou koncentracích – subMIC a MIC. Následující den byly znovu určeny subMIC a případně MIC. Celkem bylo provedeno 12 opakování inkubace v subMIC a MIC pro každé antiseptikum.

V průběhu inkubací byly průběžně připravovány glycerolové konzervy smícháním 0,3 ml glycerolu a 0,1 ml bakteriální kultury. Konzervy byly uloženy na –80 °C.

### 2.2.2 Elektroforéza

Po izolaci proteinů z buněk dochází k rozdělení těchto proteinů pomocí elektroforézy (viz. schéma obr. 14). Patří k nejběžnějším metodám pro separaci proteinů či jiných buněk a částic nesoucí elektrický náboj. Pohyblivost molekul je dána velikostí náboje, tvaru a velikostí molekul, podmínkách prostředí a síle elektrického pole. Pro proteiny je nejběžnější elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS–PAGE).

SDS–PAGE umožňuje charakterizaci a identifikaci proteinů. Dodecylsulfát sodný (SDS) slouží jako aktivní detergent, který je schopný „zastínit“ náboj proteinů. Vytváří výsledný komplex SDS–protein, který má odpovídající povrchový náboj. Záporně nabitě molekuly SDS obklopí molekulu proteinu a dojde k denaturaci proteinu. Samotná separace následně probíhá na základě velikosti molekul separovaných látek. Vzorek prochází separačním a zaostřovacím gelem. Dochází k zahuštění vzorku a následné oddělení jednotlivých proteinů.



**Obrázek 14:** Elektroforéza (*Analýza proteinů SDS PAGE elektroforézou, 2014*)

### 2.2.2.1 Postup elektroforézy LPS

Sestavíme aparaturu, umísíme skla s gelem do stojánku a nalijeme po okraj vany pufr pro elektroforézu. Necháme stát 5 minut a zkontrolujeme, zda někde pufr neprotéká. Během této doby si připravíme vzorky. Rozmrazíme, zvortexujeme a stočíme. Pro lepší nanášení se používá plastový nástavec, který napomáhá pro přesné pipetování do příslušných jamek.

Množství vzorku se nanáší podle počtu jamek (při tloušťce gelu 1 mm o 15 jamkách max 20  $\mu$ l). Nasadíme víko a zapojíme do zdroje. Z počátku nastavíme napětí na hodnotu 90 V přibližně na 10 minut a necháme běžet do té doby, než se začne rozdělovat žebříček. Což by mělo odpovídat tomu, že se vzorky dostanou ze zaostřovacího gelu do separačního. Následně zvýšíme napětí na 130 V a elektroforéza poběží zhruba 1 – 1,5 h, záleží na koncentraci gelu.

Vypínáme zdroj, jakmile se čelo (modrá linie) blíží konci skel, nechceme, aby vyjelo z gelu. Ihned transferujeme gel a začínáme vyvíjet. Nenecháváme stát příliš dlouho v pufru a nechceme, aby gel vyschnul.

### **2.2.3 Identifikace rezistentních bakterií zprostředkovaných effluxní pumpou metodou ethidium bromid agaru**

Effluxem vyvolaná rezistence u pseudomonád je složitá kvůli molekulám v buněčném obalu. Probíhá vylučování široké škály chemicky a strukturně nepodobných škodlivin z bakterie. Efflux se provádí pomocí dostatečného množství energie bez modifikace antiseptik či léčiv. Hodnocení těchto systémů je založeno na retenci fluorescenčního barviva ethidium bromidu EtBr. Toto barvivo se využívá jako substrát pump, který umožní ověřit přítomnost nadměrně vyloučeného effluxního systému ve srovnání s vlastními effluxními aktivitami odpovídajícího bakteriálního kmene (*Martins, 2011*).

#### **2.2.3.1 Postup experimentu**

Připravené agarové plotny obsahovaly různé koncentrace ethidium bromidu (EtBr). Na jednu petriho misku se nanosly očkovací kličkou všechny bakteriální kultury, které obsahovaly antiseptika i tzv. čisté, které antiseptikum neobsahovalo a jednalo se o čistou bakteriální kulturu. Bakteriálním kmenům připravené v tekutém MHB médiu se upravila optická denzita při 600 nm na 0,5 McFarlandova zákalu. Agarové plotny obsahovaly koncentraci EtBr v rozmezí 0 až 5 mg/l. Kultury s upravenou OD se nanášely od středu destičky směrem k okrajům. Agarové destičky se následně inkubovaly při 37 °C do druhého dne a sledovány pod vhodným zdrojem UV světla.

### **2.2.4 Stanovení lipopolysacharidů za pomoci soupravy Lipopolysacharid Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300**

Lipopolysacharidy LPS jsou endotoxiny z rodiny glykolipidových molekul umístěných na povrchu gramnegativních bakterií. Hrají velkou roli v ochraně bakterií před hostitelem a antimikrobiálními látkami.

Samotnou strukturu LPS lze analyzovat SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. Při této metodě dochází k oddělení heterogenních směsí polymerů do charakteristického žebříčkovitého vzoru.



Molekulární sondy poskytují účinnou metodu pro barvení LPS. Barvivo Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 reaguje s jodistanem oxidovanými sacharidovými skupinami a vytváří jasně zelený fluorescenční signál. Díky tomuto typu barviva lze detekovat pouhých 200 pg LPS během několika málo hodin. Citlivost v porovnání s barvením stříbrem je nejméně 50–100krát vyšší. Zelenou fluorescenci snadno zobrazíme pomocí UV transluminátoru.

#### **2.2.4.1 Princip**

Vzorky *Pseudomonas* a LPS od *Escherichia coli* sérotypu 055: B5 jako standard, byly podrobeny elektroforéze v 13% akrylamidové gelu a obarveny pomocí sady Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Stain. Celkový úspěch detekce touto metodou závisí na dostatečné fixaci a důkladném promytí za účelem odstranění zbytkového SDS z gelu. Následně důkladné promytí zbytkového jodistanu po provedené oxidační reakci. Jodistan by mohl zkřížit reakce a narušil by barvení.

#### **2.2.4.2 Postup barvení**

Po provedené standardní elektroforéze, postup viz výš následovalo barvení. Na gel jsem nanesla 10 µl žebříček fragmentů, standardu LPS a všechny vzorky *Pseudomonas* ovlivněné i s antiseptiky.

Barvení začíná fixací gelu. Gel se ponoří do 100 ml fixačního roztoku (příprava roztoku v kapitole výš) a inkubujeme po dobu 45 minut při pokojové teplotě. Tento krok se provede dvakrát, abychom se ujistili, že SDS je z gelu zcela vymyt.

Následuje promývání, které se provede dvakrát. Gel inkubujeme ve 100 ml promývacího roztoku (příprava roztoku viz výš), mírně mícháme a necháme gel reagovat 10–20 minut v tomto roztoku.

Po důkladném promytí následuje oxidace sacharidů za pomoci oxidačního roztoku. Gel ponoříme do 25 ml tohoto roztoku, mírně mícháme a inkubujeme 30 minut.

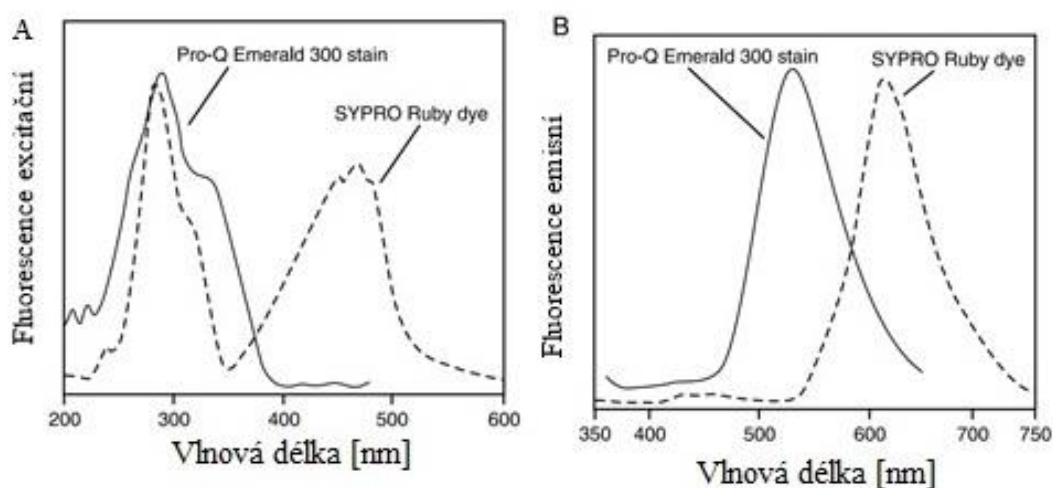
Následuje opět promývání. Provádí se ve 100 ml promývacího roztoku, tedy 3% kyselině octové. Tento krok provedeme 3krát a necháme inkubovat vždy 10–20 minut.

Barvení gelu provedeme v čerstvě připraveném roztoku pro barvení Pro-Q® Emerald 300. Roztok, který uchováváme v -20 °C naředíme 50krát v barvicím pufru Pro-Q® Emerald 300 (složka A). Gel se tedy ponoří do zředěného 25 ml barvicího pufru (500 µl zásobního roztoku Pro-Q® Emerald 300 na 25 ml barvicího pufru). Inkubujeme za mírného míchání po dobu 90–120 minut. Signál jemné zelené fluorescence lze vidět už po 20 minutách, maximální citlivost má však až po 2 hodinách.

Po barvení přichází poslední promývání ve 100 ml promývacího roztoku po dobu 15–20 minut. Provedeme dvakrát, v případě, že je stále při zobrazování nepřijatelně vysoké gelového pozadí, provedeme promytí ještě jednou. Neprovádí se však promývání po dobu delší než 2 hodiny.

### 2.2.4.3 Excitační a emisní spektra barviv Pro-Q Emerald 300 a SYPRO Ruby

Barvivo Pro-Q® Emerald 300 má excitační maximum při vlnové délce 280 nm a emisní maximum při 530 nm. Pro detekci proteinů, jak je vidět i na obrázcích A a B, lze použít kombinaci soupravy Pro-Q® Emerald 300 lipopolysacharid gel stain Kit s fluorescenčními proteinovými barvivy jako je SYPRO® Ruby proteinové gelové barvivo.



**Obrázek 15:** Excitační a emisní spektra barviv Pro-Q Emerald 300 a SYPRO Ruby

Takto nabarvené gely lze prohlížet pomocí 300 nm UV transiluminátoru. Pro docílení nejvyšší citlivosti lze použít fotografické kamery nebo CCD kamery s příslušnými filtry. Díky jejich integrační schopnosti nástroje mohou být vidět pásy, které nelze viditelně detekovat pouhým okem.

## 2.3 Výsledky a diskuse

V následujících tabulkách 11–14 a grafech 2-5 jsou znázorněny hodnoty minimálních inhibičních koncentrací pro jednotlivá antiseptika a bakteriální kmeny v průběhu deseti pasáží. Sledovala jsem MIC pomocí mikrodilučního testu. První vyhodnocenou MIC jsem následující den použila jako subminimální inhibiční koncentraci. S touto koncentrací a danou směsí přeživších bakterií jsem dále pracovala a použila pro následovnou inkubaci nového média s antiseptikem. Toto jsem opakovala desetkrát po sobě a sledovala jsem vývoj možné rezistence

Prvním antiseptikem byl **Chlorhexidin**, u kterého je aktivní látka chlorhexidin diglukonát jako 20% roztok. Často se využívá jako účinná složka v zubních pastách a ústních vodách. Slouží jako prevence či jako léčba zánětu dásní a zamezuje vznik paradentózy. Pro minimální inhibiční koncentrace na počátku pro *S. aureus* byla zjištěna a stanovena na 0,001 % chlorhexidinu a u *P. aeruginosa* na 0,002 % chlorhexidinu. Po jedenácté pasáži MIC výrazně vzrostlo u obou bakterií. U *S. aureus* to vzrostlo na 0,004 % (4krát) a u *P. aeruginosa* 0,032 % (16krát).

Několik studií se pokoušelo fenotypicky posoudit náchylnost a rezistenci k chlorhexidinu mezi běžnými kožními patogeny. Protože není dostatečně podložena skutečná klinická hraniční hodnota, není tedy možné přesně určit citlivosti na chlorhexidin. Kromě fenotypové rezistence často studie hodnotily míru přenosu genů a vliv effluxu (*Williamson et al., 2017*).

Antiseptikum, u kterého je aktivní látka stříbro jsem sledovala **octan stříbrný AgAc** s koncentrací 0,002 mg/l. Počáteční MIC jsem stanovila pro *S. aureus* na 0,02 mg/ml a po adaptaci MIC vzrostla několikanásobně až na 2,56 mg/ml. Pro *P. aeruginosa* jsem stanovila MIC na 0,005 mg/ml a po adaptaci antiseptik na 2,56 mg/ml. Minimální inhibiční koncentrace mezi *S. aureus* a *P. aeruginosa* je tedy téměř stejná a není vidět výrazný rozdíl.

**Derivát hyaluronátu SHCl** v práškové formě je antiseptikum vyvíjené firmou Contipro pro výzkumné účely. Antiseptikum má aktivní látkou chlor. MIC pro *S. aureus* byla stanovena na 2,5 mg/ml a po několikáté adaptaci antiseptik vzrostla MIC na 40 mg/ml, tedy vzrostla 16krát. Pro *P. aeruginosa* byla stanovena minimální inhibiční koncentrace na 20 mg/ml a po adaptaci vzrostla pouze 2krát.

Poslední testované antiseptikum je ve formě roztoku s koncentrací 0,00125% **Oktenidin dihydrochlorid**. U bakteriálního kmene *S. aureus* jsem stanovila MIC na 0,003135% a pro kmen *P. aeruginosa* na 0,00625%. Konečná koncentrace jednotlivých kmenů se výrazně nelišila. Pro *S. aureus* konečná koncentrace vzrostla čtyřikrát (0,0125%) a pro *P. aeruginosa* sotva dvakrát (0,0125%).

**Tabulka 11:** subMIC a MIC pro octan stříbrný AgAc

<b>AgAc <i>P.aeruginosa</i></b>						
<b>Pasáž</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Datum</b>	15.7.	16.7.	20.7.	21.7.	22.7.	23.7.
<b>subMIC [mg/ml]</b>	0,0025	0,005	0,01	0,02	0,04	0,08
<b>MIC [mg/ml]</b>	0,005	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16

<b>AgAc <i>P.aeruginosa</i></b>						
<b>Pasáž</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Datum</b>	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.	5.8.
<b>subMIC [mg/ml]</b>	0,16	0,32	0,32	0,64	0,64	1,28
<b>MIC [mg/ml]</b>	0,32	0,32	0,64	0,64	1,28	2,56

<b>AgAc <i>St.aureus</i></b>						
<b>Pasáž</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Datum</b>	15.7.	16.7.	20.7.	21.7.	22.7.	23.7.
<b>subMIC [mg/ml]</b>	0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,16
<b>MIC [mg/ml]</b>	0,02	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32

<b>AgAc <i>St.aureus</i></b>						
<b>Pasáž</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Datum</b>	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.	5.8.
<b>subMIC [mg/ml]</b>	0,32	0,64	0,64	0,64	0,64	1,28
<b>MIC [mg/ml]</b>	0,64	0,64	0,64	0,64	1,28	2,56

**Tabulka 12:** subMIC a MIC pro derivát hyaluronátu SH-Cl

<b>SH-Cl <i>P.aeruginosa</i></b>						
<b>Pasáž</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Datum</b>	15.7.	16.7.	20.7.	21.7.	22.7.	23.7.
<b>subMIC [mg/ml]</b>	10	20	20	20	20	40
<b>MIC [mg/ml]</b>	20	20	-	20	40	40

<b>SH-Cl <i>P.aeruginosa</i></b>						
<b>Pasáž</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Datum</b>	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.	5.8.
<b>subMIC [mg/ml]</b>	40	40	40	40	40	40
<b>MIC [mg/ml]</b>	40	40	40	40	40	40

**SH-CI *St.aureus***

Pasáž	0	1	2	3	4	5
Datum	15.7.	16.7.	20.7.	21.7.	22.7.	23.7.
subMIC [mg/ml]	1,25	2,5	5	10	20	20
MIC [mg/ml]	2,5	5	10	20	20	20

**SH-CI *St.aureus***

Pasáž	6	7	8	9	10	11
Datum	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.	5.8.
subMIC [mg/ml]	20	20	20	40	40	40
MIC [mg/ml]	20	20	40	40	40	40

**Tabulka 13: subMIC a MIC pro Chlorhexidin**

**Chlorhexidin *P.aeruginosa***

Pasáž	0	1	2	3	4	5
Datum	13.7.	14.7.	15.7.	20.7.	21.7.	22.7.
subMIC [%]	0,001	0,002	-	0,001	0,002	0,004
MIC [%]	0,002	-	0,001	0,002	0,004	0,004

**Chlorhexidin *P.aeruginosa***

Pasáž	6	7	8	9	10	11
Datum	23.7.	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.
subMIC [%]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,008	0,016
MIC [%]	0,004	0,004	0,004	0,008	0,016	0,032

**Chlorhexidin *St.aureus***

Pasáž	0	1	2	3	4	5
Datum	13.7.	15.7.	20.7.	21.7.	22.7.	23.7.
subMIC [%]	0,0005	0,001	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
MIC [%]	0,001	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005

**Chlorhexidin *St.aureus***

Pasáž	6	7	8	9	10	11
Datum	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.	5.8.
subMIC [%]	0,0005	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002
MIC [%]	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,004

**Tabulka 14: subMIC a MIC pro Octenidin**

**Octenidin *P.aeruginosa***

Pasáž	0	1	2	3	4	5
Datum	14.7.	15.7.	20.7.	21.7.	22.7.	23.7.
subMIC [%]	0,003125	0,00625	0,003125	0,003125	0,003125	0,00625
MIC [%]	0,00625	0,003125	0,003125	0,003125	0,00625	0,00625

**Octenidin *P.aeruginosa***

Pasáž	6	7	8	9	10	11
Datum	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.	5.8.
subMIC [%]	0,00625	0,00625	0,00625	0,0125	0,0125	0,0125
MIC [%]	0,00625	0,00625	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125

### Octenidin *St.aureus*

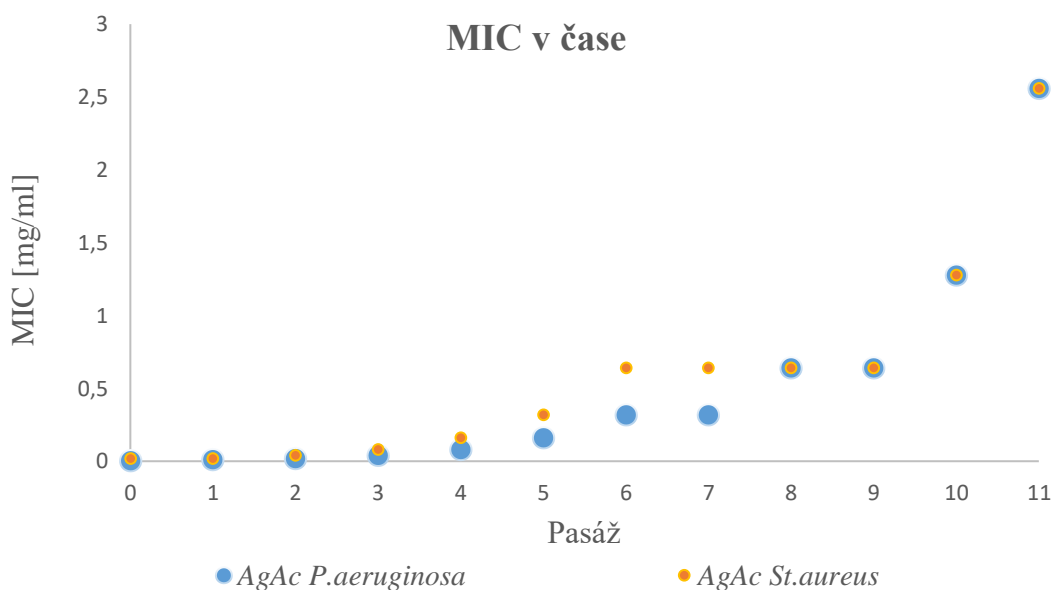
Pasáž	0	1	2	3	4	5
Datum	14.7.	15.7.	20.7.	21.7.	22.7.	23.7.
subMIC [%]	0,001563	0,003125	0,001563	0,003125	0,003125	0,00625
MIC [%]	0,003125	0,001563	0,003125	0,003125	0,00625	0,00625

### Octenidin *St.aureus*

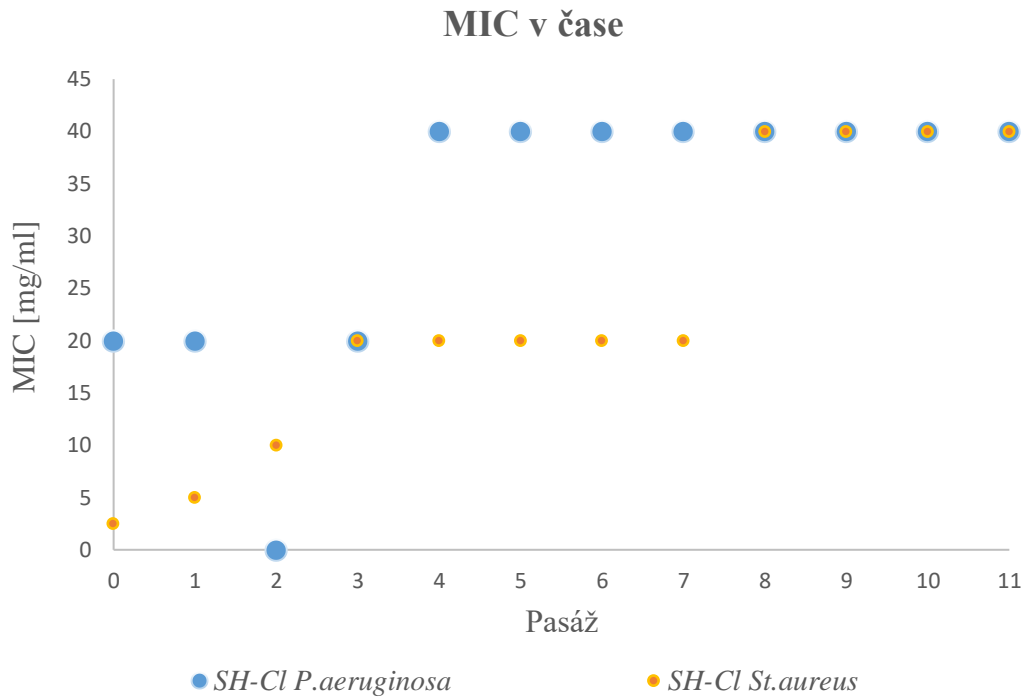
Pasáž	6	7	8	9	10	11
Datum	27.7.	28.7.	29.7.	30.7.	3.8.	5.8.
subMIC [%]	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625
MIC [%]	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625	0,00625	0,0125

### 2.3.1 Vývoj MIC v čase

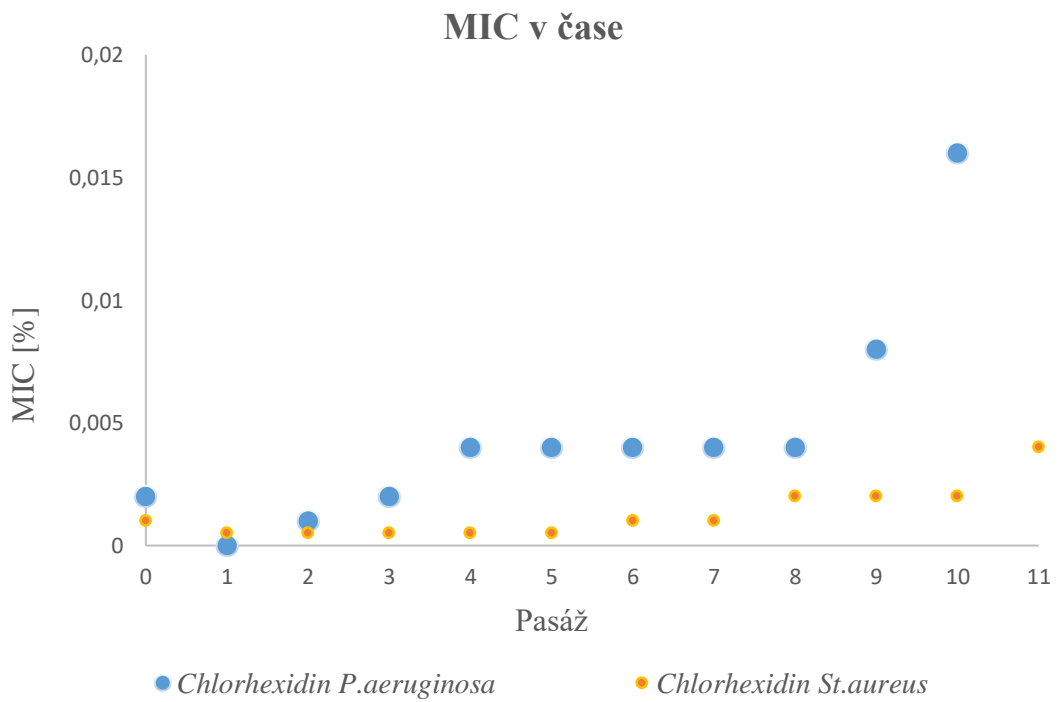
Grafy nám poukazují na to, jak se vyvíjela nejnižší koncentrace MIC v průběhu jedenácti pasáží.



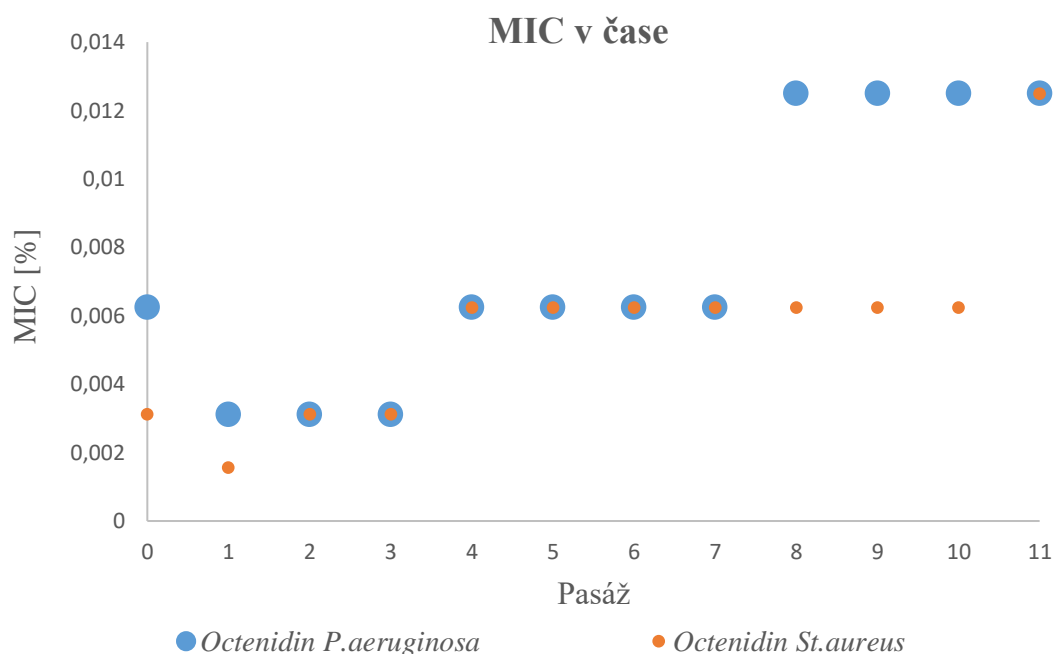
**Graf 2:** MIC v čase AgAc



**Graf 3:** MIC v čase SH-Cl



**Graf 4:** MIC v čase Chlorhexidin



**Graf 5:** MIC v čase Oktenidin

Adaptace patogenů byla sledována během expozice těchto antiseptik po dobu jedenácti po sobě jdoucích pasáží. Pro každou danou pasáž (0.–11. pasáž) se bakterie znovu vypěstovaly s přítomností vždy jednoho druhu antiseptik (CHX, SHCl, OctWIS, AgAc) o dané koncentraci MIC pozorovanou v předchozí pasáži.

### 2.3.1.1 Ověření MIC

**Tabulka 15:** Ověření MIC v čase na začátku a na konci pasáží

		SA	PA
AgAc [µg/ml]	0. řada s antiseptiky	20	5
	11. řada s antiseptiky	2560	2560
	21. pasáž bez antiseptik	2560	2560
SH-Cl [mg/ml]	0. řada s antiseptiky	2,5	20
	11. řada s antiseptiky	20	20
	21. pasáž bez antiseptik	40	40
Chlorhexidin [%]	0. řada s antiseptiky	0,001	0,002
	11. řada s antiseptiky	0,002	0,004
	21. pasáž bez antiseptik	0,004	0,064
Octenidin [x krát]	0. řada s antiseptiky	160	80
	11. řada s antiseptiky	80	80
	21. pasáž bez antiseptik	40	40



Tabulka 15 vyhodnocuje ověření 0.–11. pasáže. Jednotlivá pasáž se prováděla vždy s použitím MIC z předchozí pasáže s přidavkem dalšího množství nových antiseptik. A to vždy do předem připraveného nového média v mikrotitrační destičce. Toto se provádělo až do jedenácté pasáže.

Hodnoty MIC z 21. pasáže bez antiseptik jsem zjistila opakovaným přepasážením n Petriho miskách s MH agarem bez přidaných antiseptik. Tudíž jde o 12.–21. pasáž. Počáteční 12. pasáž byla vytvořena naočkováním na čistou misku bez antiseptik 11. pasáž. Následným pasážením vždy na novou misku s agarem postupně klesala koncentrace antiseptik.

### 2.3.2 Stanovení křížové rezistence antiseptik a antibiotik

Stanovení křížové rezistence jsem stanovovala pomocí konzervovaných bakterií, které jsou z 21. pasáže připravené a přenášené na plotnách. Pro kontrolu a srovnání se použila nulová pasáž, kterou jsem měla zakonzervovanou v mrzáku. Bakterie se připravily naočkováním a převedením kličkou do MHB tekutého média.

Těchto osm antibiotik viz tabulka 16 (Bacitracin, Kanamycin, Polymyxin B, Triclosan, Gentamicin, Neomycin, Rifampicin, PHMB) byly postupně aplikovány na Chlorhexidin, Octenidin, AgAc a SH–Cl. Výsledky mám zaznamenané v tabulce 17.

**Tabulka 16:** Přehled další testovaných antibiotik a antiseptik

<b>Další antiseptika a antibiotika</b>	<b>Aktivní látka</b>	
Bacitracin	bacitracin sulfát	vodný roztok
Kanamycin	kanamycin sulfát	vodný roztok
Polymyxin B	polymyxin B sulfát	zásobní roztok
Triklosan	triclosan	
Gentamicin	gentamicin sulfát	
Neomycin	neomycin sulfát	vodný roztok
Rifampicin	rifampicin sulfát	1 mg/ml
PHMB	polyhexamid	0,10%

**Tabulka 17: Výsledky antibiotik a antiseptik**

<b>Bacitracin</b>				
	<b>PA</b>	<b>PA</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
<b>CHX [%]</b>	256	256	512	256
<b>OctWIS [xkrát]</b>	512	256	256	256
<b>AgAc [µg/ml]</b>	512	256	256	256
<b>SH-Cl [µg/ml]</b>	256	256	256	256
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

<b>Kanamycin</b>				
	<b>PA</b>	<b>PA</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
<b>CHX [%]</b>	312,5	156,25	156	78
<b>OctWIS [xkrát]</b>	156,25	78,125	156	39
<b>AgAc [µg/ml]</b>	156,25	78,125	156	78
<b>SH-Cl [µg/ml]</b>	312,5	156,25	78	78
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

<b>Polymyxin B</b>				
	<b>PA</b>	<b>PA</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
<b>CHX [%]</b>	0,0625	0,03125	0,03125	0,03125
<b>OctWIS [xkrát]</b>	0,0625	0,03125	0,03125	0,03125
<b>AgAc [µg/ml]</b>	0,0156	0,03125	0,03125	0,03125
<b>SH-Cl [µg/ml]</b>	0,03125	0,03125	0,03125	0,03125
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

<b>Gentamycin</b>				
	<b>PA</b>	<b>PA</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
<b>CHX [%]</b>	0,000976	0,000488	0,000488	0,000244
<b>OctWIS [xkrát]</b>	0,000976	0,000488	0,000488	0,000244
<b>AgAc [µg/ml]</b>	0,000488	0,000244	0,000244	0,000244
<b>SH-Cl [µg/ml]</b>	0,000488	0,000488	0,00048	0,000244
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

<b>Neomycin</b>				
	<b>PA</b>	<b>PA</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
<b>CHX [%]</b>	1	1	0,125	0,0625
<b>OctWIS [xkrát]</b>	0,5	0,5	0,0625	0,03125
<b>AgAc [µg/ml]</b>	1	0,5	0,0625	0,03125
<b>SH-Cl [µg/ml]</b>	2	1	0,125	0,0625
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

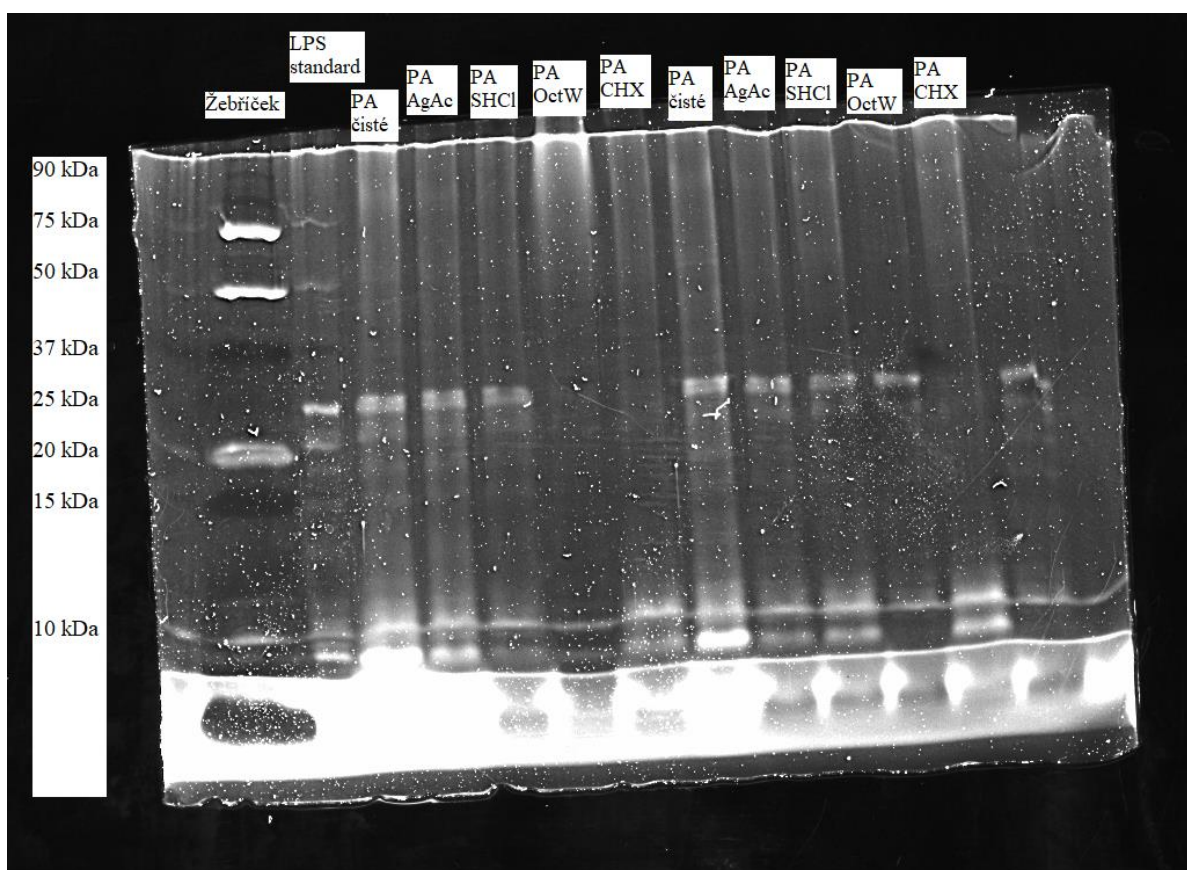
<b>Rifampicin</b>				
	<b>PA</b>	<b>PA</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>
<b>CHX [%]</b>	4	4	4	2
<b>OctWIS [xkrát]</b>	16	32	16	8
<b>AgAc [µg/ml]</b>	8	8	16	16
<b>SH-Cl [µg/ml]</b>	8	8	16	8
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

PHMB				
	PA	PA	SA	SA
CHX [%]	100x	200x	100x	100x
OctWIS [xkrát]	100x	200x	50x	100x
AgAc [ $\mu\text{g/ml}$ ]	100x	200x	50x	200x
SH-Cl [ $\mu\text{g/ml}$ ]	100x	200x	100x	200x
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

Triclokan				
	PA	PA	SA	SA
CHX [%]	0,05	0,025	0,1	0,05
OctWIS [xkrát]	0,05	0,05	0,05	0,05
AgAc [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,025	0,05	0,05	0,025
SH-Cl [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,025	0,0125	0,025	0,0125
	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>	<b>0. pasáž</b>	<b>10. pasáž</b>

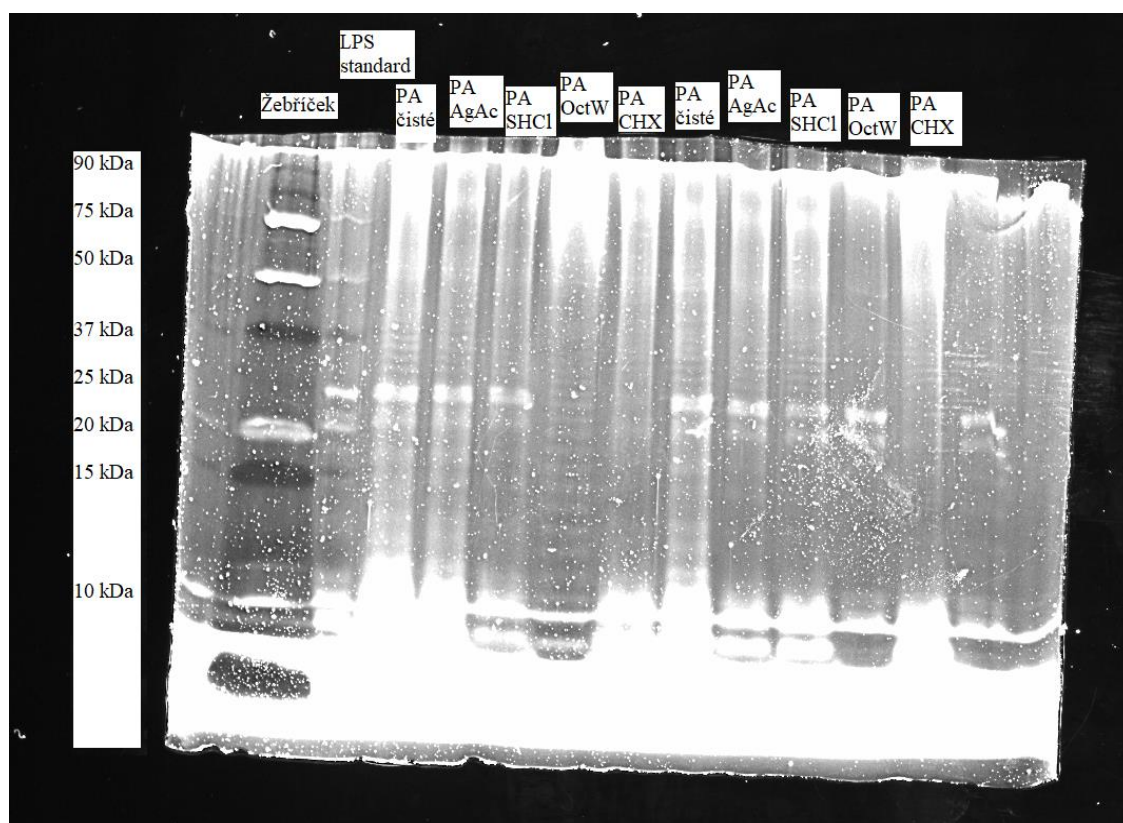
### 2.3.3 Zobrazení gelů při stanovení LPS

Ve zbarvených gelech se převážně na okrajích vyskytují fluorescenční skvrny, ty však neovlivňují citlivost. Obrázky 16 a 17 ukazují proužky stanovení LPS pomocí soupravy Lipopolysacharid Pro-Q® Emerald 300.



**Obrázek 16:** Stanovení lipopolysacharidu pomocí LPS sady, po 90 minutách

Do prvního sloupce byl nanesen standardový proteinový žebříček, který nám pomáhá s identifikací signálů v dalších sloupcích a ukazuje nám, zda elektroforéza vůbec proběhla. Žebříček se pohybuje v rozmezí 10–90 kDa. V druhém sloupci byl aplikován LPS standard od *E.coli*. V dalších sloupcích je *Pseudomonáda* už se svým daným antiseptikum z 21. pasáže. Ve sloupci s označením PA čisté je nanesen *Pseudomonas aeruginosa* a čistá je myšlena, že se jedná o 0. pasáž bez antiseptik. U všech vzorků před aplikací na gel byla ověřena MIC, a to přenesením a zaočkováním na čisté plotny. Následně se upravila suspenze na hodnotu 0,5 McFarlandovy řady a až tehdy se nanášela na gel elektroforézy.



**Obrázek 17:** Stanovení lipopolysacharidu pomocí LPS sady, po 120 minutách

Vzorky jsou nanášeny v dubletu. Vždy PA čisté (tedy nultá pasáž bez antiseptik), PA octan stříbrný, PA derivát hyaluronátu, PA Oktenidinu a PA Chlorhexidinu. Tyto vzorky jsou všechny brány z desáté pasáže.

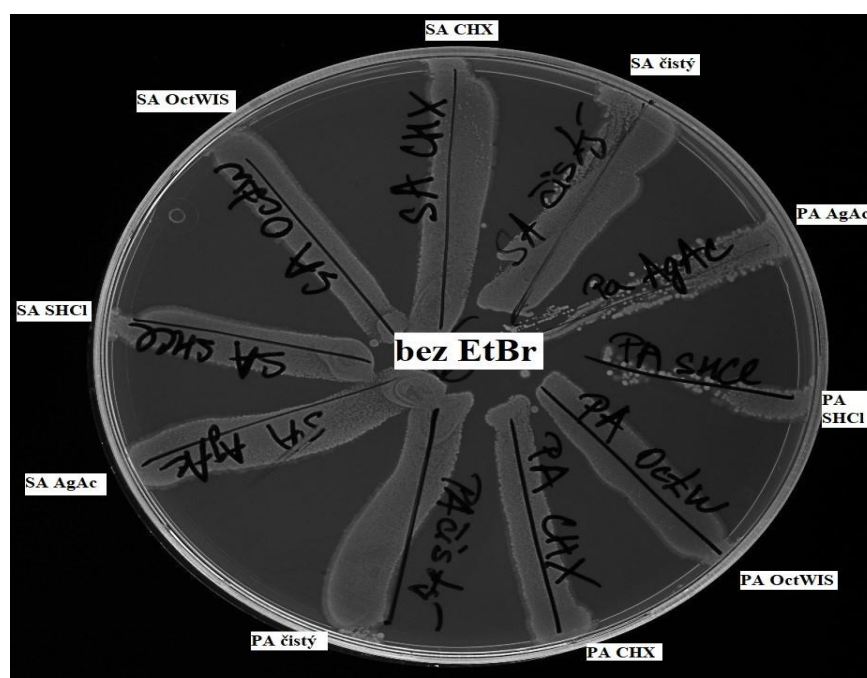
Oba vyfocené gely se ničím výrazným neliší. Rozdílem je pouze doba, po kterou se nechával inkubovat gel v barvicím pufu. Jde vidět, že intenzitu fluorescence lze sledovat už i po kratší době. Citlivost fluorescence a signál je lepší až po těch 120 minutách.

Vnější membránový protein s molekulovou hmotností 37 kDa je pojmenován podle mnoha studií na protein T (*Brözel a Cloete, 1994*). Tento protein by neměl být detekován u rezistentních nebo indukovaných kultur. Existují možné teorie, proč dochází ke zvýšené rezistenci vůči absenci proteinu T. Samotný protein T by mohl být hlavním cílem, a tudíž by byl náchylnější k antiseptikům. Předpokládá se, že tento protein proniká vnější membránou buňky, protože ztrácí tak svojí funkci a odstraní penetrační bariéru LPS. Tento mechanismus by mohl být též podpořen svým obsahem cysteinu i dalších aminokyselin obsahující aminy. Vedlo by to ke konformačním změnám proteinů, a to buď zvýšením absorpce nebo snížením absorpce esenciálního substrátu antiseptik. Další možností by bylo to, že antiseptikum vstupuje normálně vnější membránou právě prostřednictvím proteinu T.

### 2.3.4 Vyhodnocení identifikace rezistentních bakterií

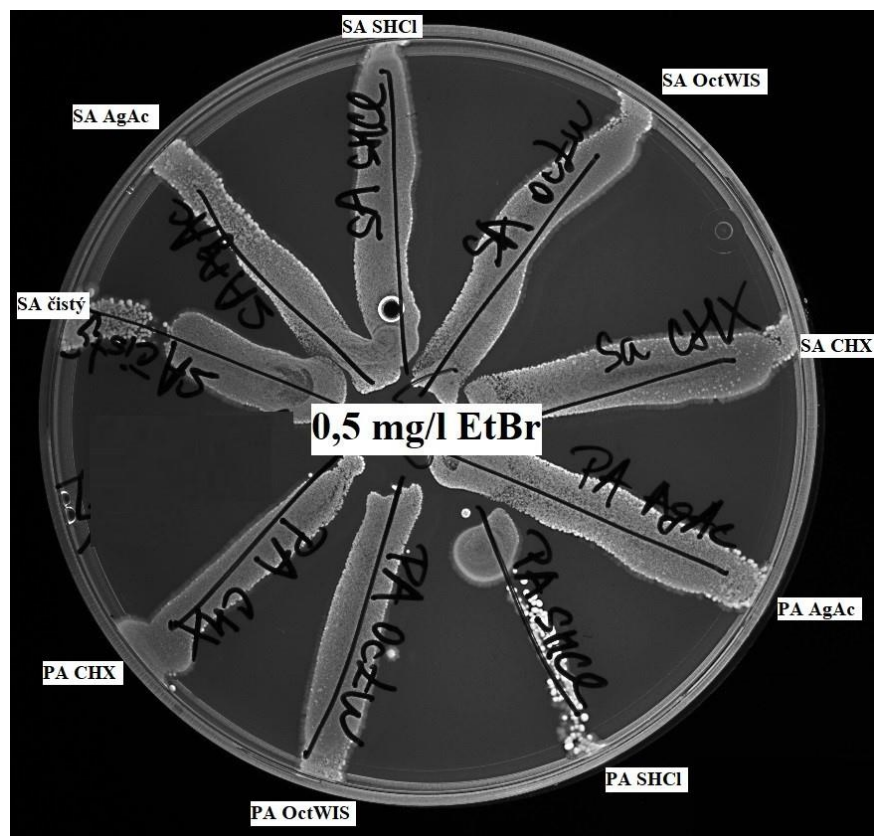
Způsob nanášení kolonií na plotny i vzniklá fluorescence jsou znázorněny na obrázcích a popsáno výše. Po inkubaci byla detekována zvyšující se koncentrace ethidium bromidu způsobovala vyšší aktivitu fluorescence bakteriální hmoty. Tato metoda prokázala detekci effluxní aktivity u gram negativních bakterií.

Na obrázcích 18–24 je jasně vidět, že fluorescence probíhala u kmene *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* i se všemi přidanými antiseptiky a ve všech koncentracích. Intenzita fluorescence byla současně závislá na koncentraci ethidium bromidu. S větším obsahem EtBr byla intenzita výraznější.

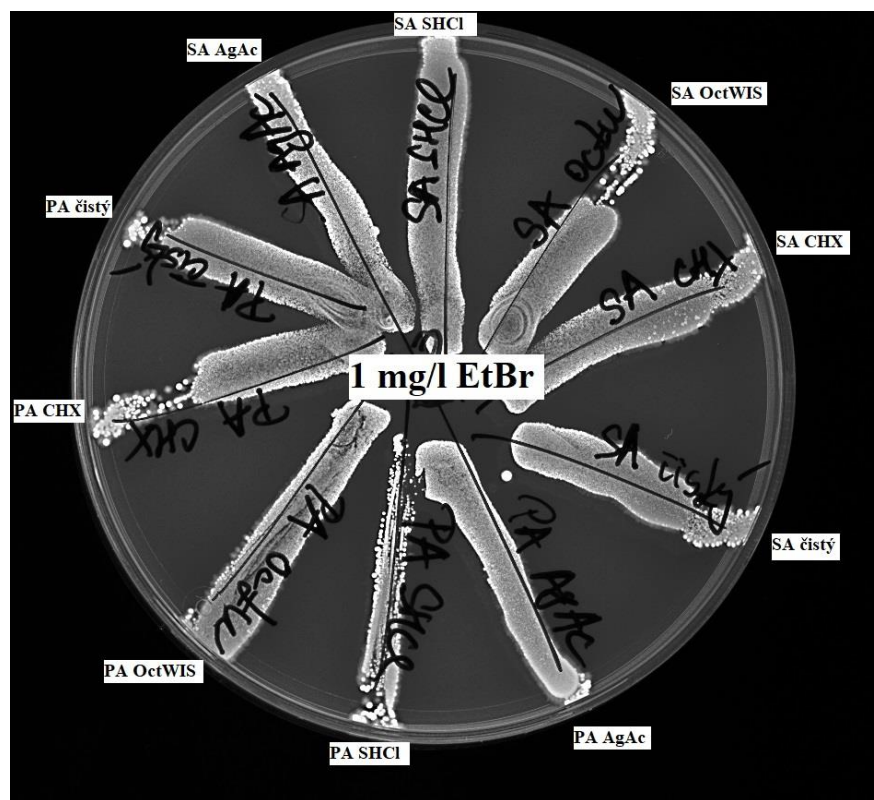


Obrázek 18: Plotna bez fluorescenčního barviva

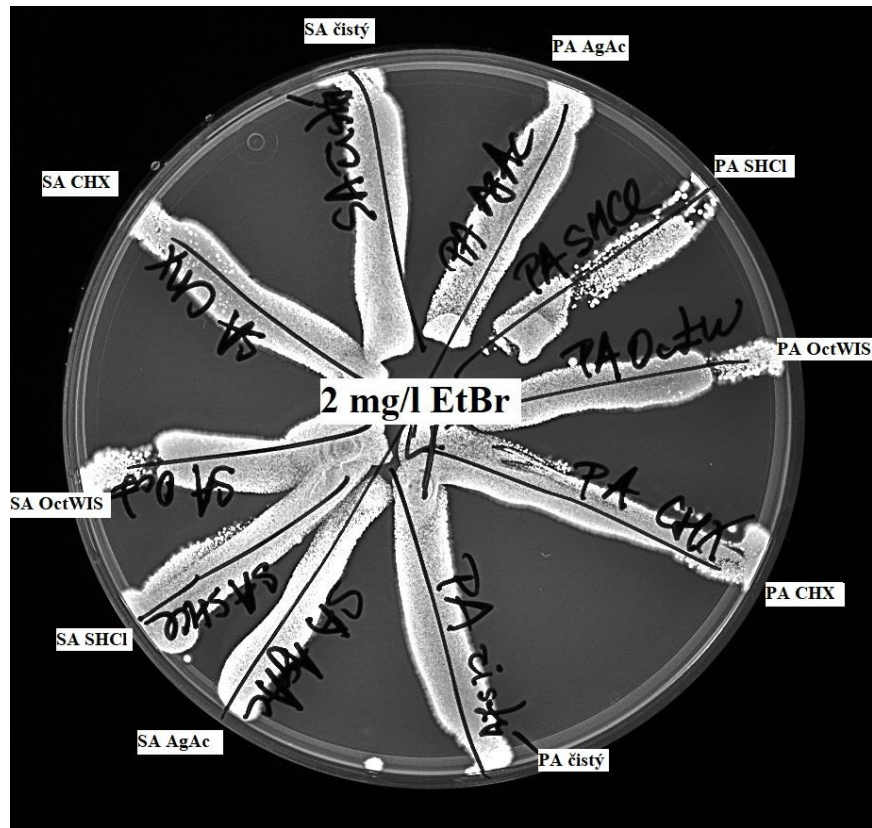




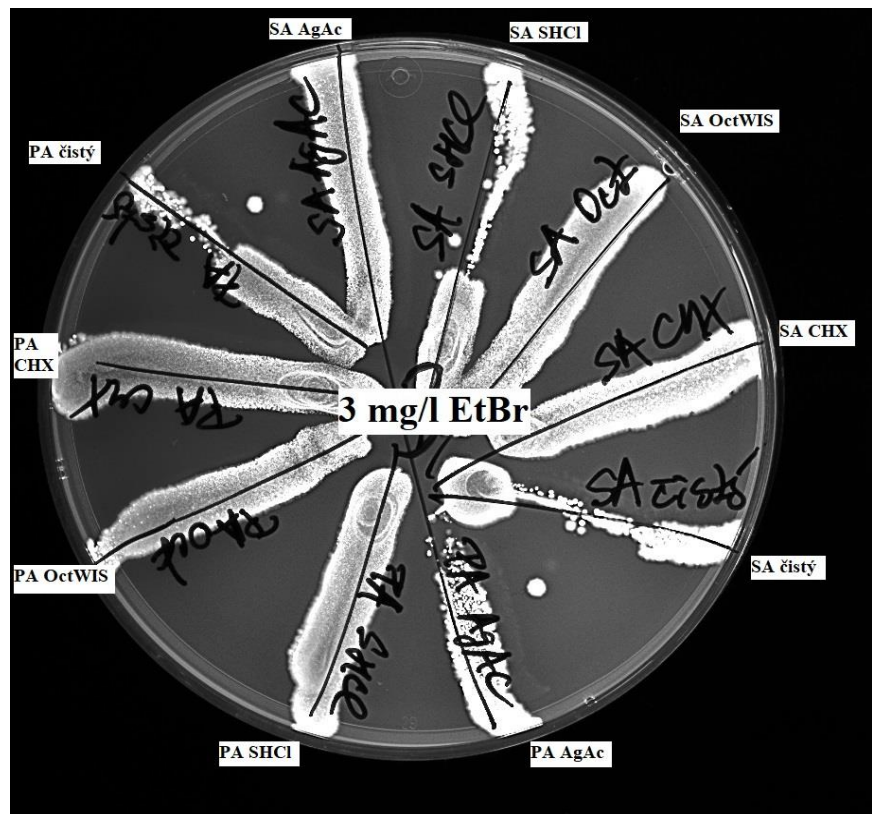
Obrázek 19: Plotna s koncentrací 0,5 mg/l fluorescenčního barviva



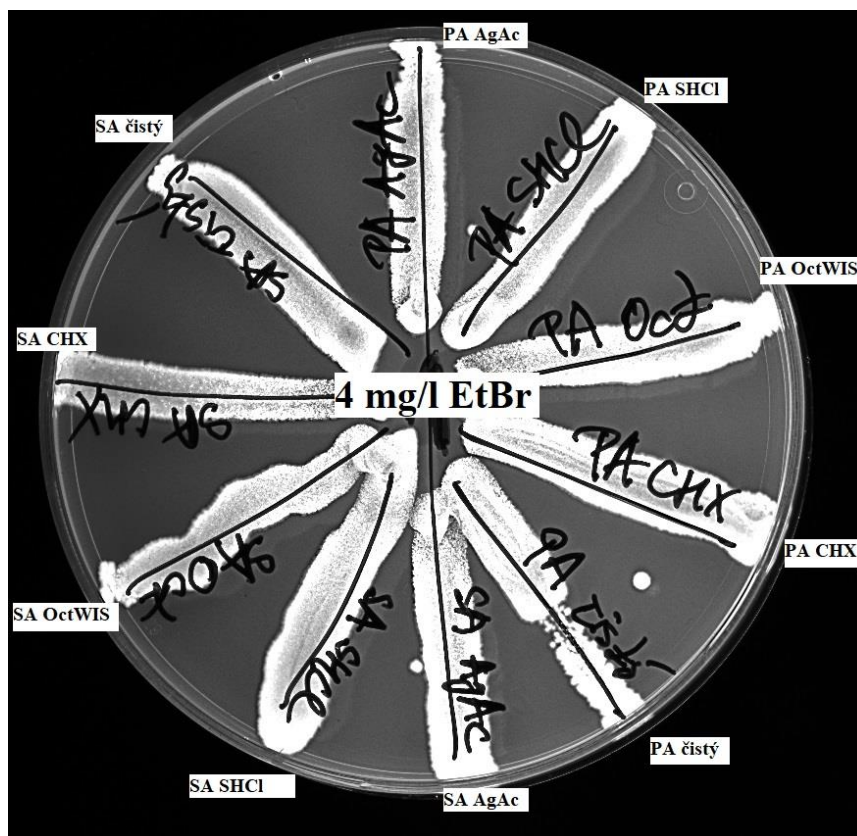
Obrázek 20: Plotna s koncentrací 1 mg/l fluorescenčního barviva



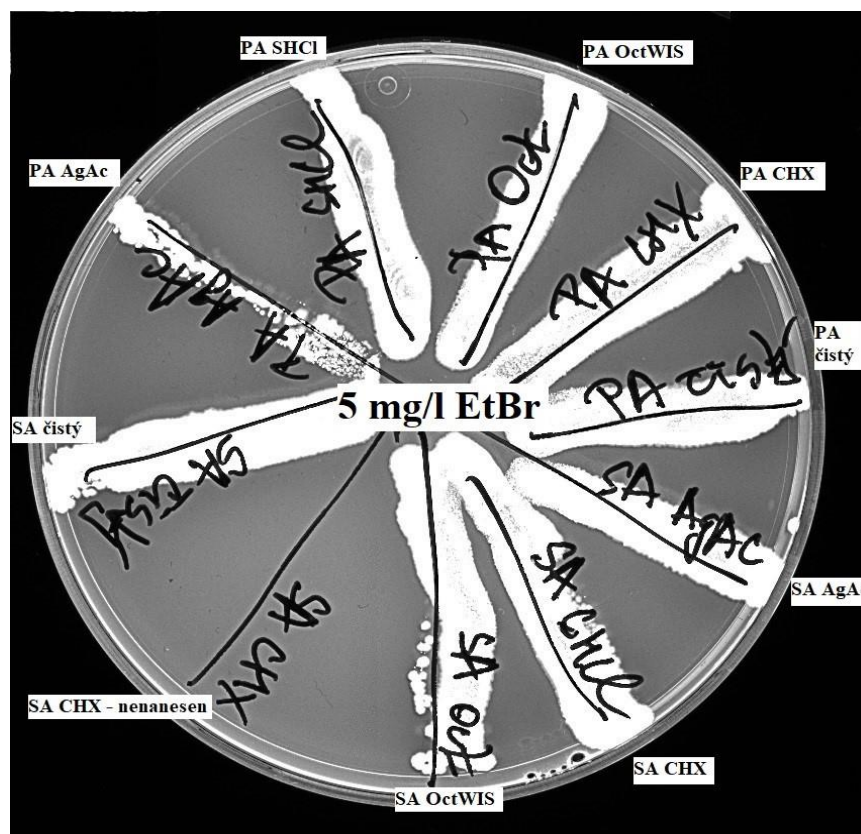
Obrázek 21: Plotna s koncentrací 2 mg/l fluorescenčního barviva



Obrázek 22: Plotna s koncentrací 3 mg/l fluorescenčního barviva

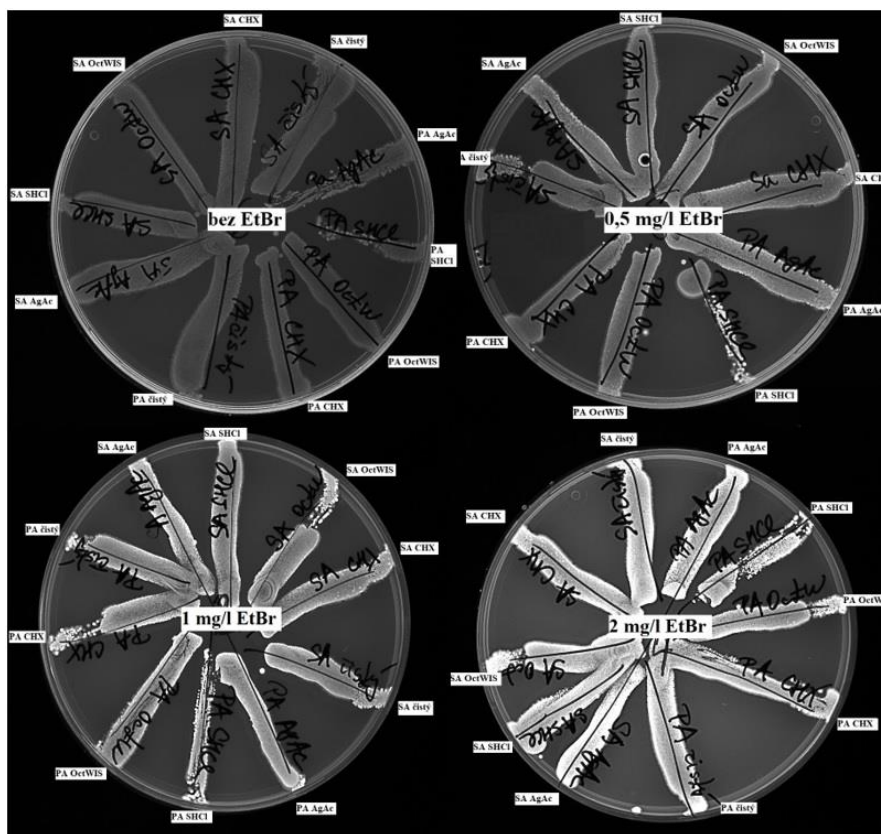


Obrázek 23: Plotna s koncentrací 4 mg/l fluorescenčního barviva

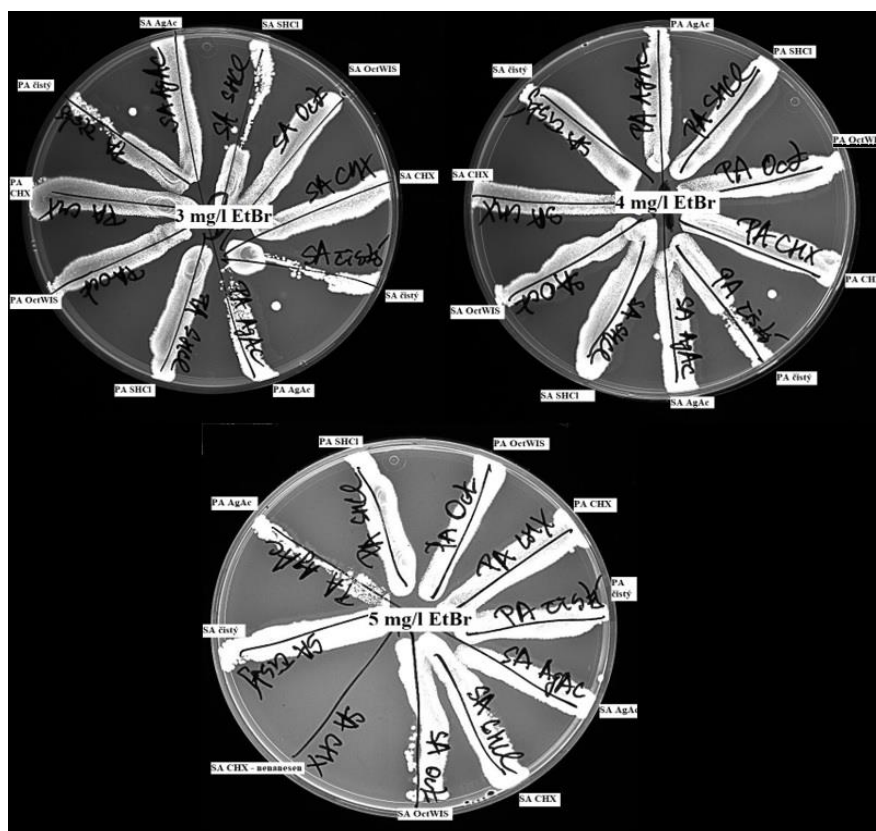


Obrázek 24: Plotna s koncentrací 5 mg/l fluorescenčního barviva





Obrázek 25: Plotny s koncentrací fluorescenčního barviva od 0 do 2 mg/l



Obrázek 26: Plotny s koncentrací fluorescenčního barviva od 3 do 5 mg/l

Na obrázcích 25 a 26 vidíme všechny plotny pohromadě, pro lepší vizualizaci a snadnější rozpoznání intenzity fluorescence.

Antiseptickou rezistenci u stafylokoků a pseudomonád přispíváme pravděpodobně k několika genům. A to těm, které jsou přenášeny plasmidy a propůjčují sníženou náchylnost k antiseptikům, včetně tohoto použitého barviva jako je ethidium bromid EtBr. I effluxním pumpám, které snižují koncentraci antiseptik v buňce (*Shi et al.*, 2015).

Není však známo ani dostatečně klasifikováno, zda při dlouhodobém používání antiseptik pro léčbu chronických ran dojde k odolnosti přítomných patogenům (*S. aureus* a *P. aeruginosa*) vůči dezinfekčním a antiseptickým přípravkům.

Se zvyšující se koncentrací ethidium bromidu, který se váže na DNA po vstupu do buňky dochází k vyšší aktivitě fluorescence bakteriální hmoty. Tato metoda prokázala detekci effluxní aktivity u těchto bakterií. Právě se zvyšující se ethidium bromidem v závislosti na té fluorescenci, tak krásně vidíme, že nedochází k poklesu fluorescence, a tudíž effluxní pumpy dostatečně odčerpávají. Výrazný rozdíl mezi *S. aureus* a *P. aeruginosa* nejde touto metodou dostatečně určit. Vidíme však, že každá takto bakterie i s obsahem antiseptika vykazuje nějaký ten effluxní systém a dá se říct, že u všech druhů antiseptik je účinek konstantní.

Na rozdíl od mého zjištění, že tyto bakterie mají nějaký effluxní systém, tak některé studie (*Babayen a Nikaido*, 2004) ukazují na to, že *P. aeruginosa* postrádá hlavní komplex víceúčelové effluxní pumpy (MexAB–OprM). V této studii docházelo k poklesu fluorescence, pravděpodobně degradací či odtokem nashromážděného ethidium bromidu neznámými pumpama. Očekává se tedy i to, že EtBr je u některých bakterií odčerpán systémem MexAB–OprM a stává se fluorescenčním. Pouze však jenom tehdy, když vstupuje difúzí do cytosolu buněk a váže se na DNA. Interakce EtBr s DNA zvyšuje lokální koncentraci a jinými slovy snižuje mezimolekulární vzdálenost mezi EtBr a vede k samozhášení. Již v roce 1969 bylo pozorováno, že při vysokých poměrech EtBr/DNA se ztrácí schopnost fluorescence.

Minimální koncentrace EtBr, která produkovala fluorescenci bakteriální hmoty byla pro *S. aureus* a *P. aeruginosa* stanovena stejně na 0,5 mg/l EtBr. Plotnu s nižší koncentrací EtBr jsem nepoužila, ale jde vidět, že v případě, že tam žádný EtBr nebyl, tak k fluorescenci opravdu nedocházelo. Oko vidně se však může zdát, že fluorescence probíhala více u *S. aureus*. Může to být právě v důsledku předchozí studie (*Babayen a Nikaido*, 2004), že u *P. aeruginosa* chybí hlavní effluxní systém.

Studie (*Martins et al., 2011*) interpretuje fluorescenci na agarových plotnách i pro jiné rezistentní kmeny MDR. Dále stanovili index effluxní aktivity kmenů, která ukazuje na schopnost vylučovat EtBr každého bakteriálního kmene. To jsem já nestanovovala, já tuto metodu využila spíše jako screening effluxně zprostředkovaných bakterií. V porovnání s mými výsledky, má tato studie pro *S. aureus* stejné výsledky, *P. aeruginosa* nestanovovali. Právě tento screening by mohl usnadnit práci v klinických laboratořích a mohla by se tato metoda stát rutinní. Což by usnadnilo rychlou identifikaci fenotypů MDR a zahájila by se vhodná léčba. Zabránilo by se nárůstu nových rezistencí, způsobené nadměrným využíváním častých antimikrobiálních látek.

Studie (*Costa et al., 2013*) ukazuje na to, že u bakterií může významná rezistence být způsobena effluxem léčiva. Kromě rizika terapeutického selhání mohou tyto rezistence přispět k mnoha dalším problémům. Jako například společná selekce a zkrřížená rezistence mezi effluxem zprostředkovanou rezistencí na antibiotika a antiseptika.

### 3 Závěr

Pozorujeme velmi rychlý nárůst vývoje nových rezistentních antibiotických a antiseptických látek. Tento rapidní vzrůst by v budoucnu mohl vést k velkému problému, mohlo by se stát, že se staneme neozbrojeni proti bakteriálním patogenům. Pozorovala jsem patogeny, které se nejčastěji vyskytují v otevřených a chronických ranách. Jedná se o kmeny *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1961). Právě *P. aeruginosa* je přirozeně rezistentní na některá antibiotika, a proto se pro léčbu ran používají lokální antiseptika.

Odolnost na antiseptika se pozoruje od 50. let 20. století. Na rozdíl od antibiotik se antiseptika liší svým působením a množstvím cílů v bakteriální buňce. Proto mechanismus rezistence u antiseptik není tak jasná jako u antibiotik. Nedochozí pouze k modifikaci cílových míst. Častěji je tato rezistence spojena se snížením nitrobuněčné koncentrace antiseptik. Dochází buď ke snížení propustnosti buněčné stěny nebo odtokem antiseptik.

Mezi testovaná antiseptika, které jsem testovala byly chlorhexidin, oktenidin, octan stříbrný a derivát hyaluronátu. Nejen tyto, ale i ostatní antiseptické přípravky se liší svojí formou a aktivní účinnou látkou. Chlorhexidin a octenidin jsem měla v podobě roztoku naopak octan stříbrný a derivát hyaluronátu jsem měla v práškové formě.

U infekcí způsobené multirezistentními bakteriemi není prokázán žádný mechanismus rezistence. Klíčovou a zásadní roli v tom hrají pravděpodobně effluxní pumpy. Ty mohou být buňkou použity jako ochranný prostředek. Čímž zabrání tomu, aby dané antimikrobiální látky dosáhly smrtících koncentrací. Pro *S. aureus* byla příčina rezistence vůči antiseptikům zapříčiněna effluxním systémem kódovaným plazmidem, QacA/B, Smr, QacG, QacH a QacJ.

Bakterie jsou schopné se po dlouhodobém působení subletálních koncentrací stejného antiseptického prostředku přizpůsobit a vytvořit bakteriální rezistenci. Testovala jsem tento možný jev a vznik rezistencí u celkem čtyř typů antiseptik v kombinaci bakterií *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Postupně jsem v průběhu jedenácti následných kultivací se zvyšující se minimální inhibiční koncentrací povrchově aktivního antiseptika sbírala data a sledovala vývoj.

Citlivé kmeny vykazují několikanásobné zvýšení (minimálně pětkrát) MIC od původních hodnot. Zatímco u rezistentních kmenů po jedenáctém opakování a adaptací na antiseptika se MIC pouze zdvojnásobilo. Velký rozdíl nenaspal v hodnotách MIC ani po 21. pasáži. K této pasáži jsem dospěla postupným přepasážením bakterií na čisté agarové misky bez nových přírůstků antiseptik. V důsledku pravidelného a častého vystavení antiseptik vykazují grampozitivní bakterie *S. aureus* odolnost vůči některým antiseptikům v souvislosti s effluxním mechanismem.

Vyhodnocení rezistentních bakterií za pomoci MIC ethidium bromidu a detekce effluxní aktivity by se měla stát rutinní metodou používanou v klinických laboratořích. Tato metoda nepotřebuje žádné speciální místo pro stanovování ani žádný speciální analyzátor a je i poměrně rychlá. Se zvyšující se koncentrací ethidium bromidu, který se váže na DNA po vstupu do buňky dochází k vyšší aktivitě fluorescence bakteriální hmoty. Právě se zvyšující se koncentrací ethidium bromidu v závislosti na fluorescenci, tak krásně vidíme, že nedochází k poklesu fluorescence, a tudíž effluxní pumpy dostatečně odčerpávají. Výrazný rozdíl mezi *S. aureus* a *P. aeruginosa* nejde touto metodou dostatečně určit. Vidíme však, že každá takto bakterie i s obsahem antiseptik vyazuje nějaký ten effluxní mechanismus a dá se říct, že u všech druhů antiseptik je účinek konstantní.

Závěrem lze říci, že používání antiseptik pro léčbu nejenom chronických ran se zdá jako dobrá volba. Časté rezistence vznikající například u antibiotik jsou u antiseptik pozorovány jen minimálně. Vysvětlit to lze tím, že antiseptika mají mnohem širší rozsah účinnosti než antibiotika a zároveň mají více nescifických buněčných cílů. Tím pádem, tento široký cílový rozsah i při vysokých koncentracích použitého antiseptika zvládne zabránit vzniku rezistence. V případě, že daná rezistence i tak vznikne, může být vrozená čili vnitřní rezistence přirozená, chromozomálně řízená, která tzv. obejde působení antiseptik. Získaná rezistence na antiseptika vzniká mutacemi nebo získáním genetického materiálu (chromosomální a plazmidová integrace). Gramnegativní bakterie (*P. aeruginosa*) podléhají rezistenci mnohem častěji než grampozitivní bakterie (*S. aureus*).

## 4 Použitá literatura:

1. **Abdekrahman T., Newton H.:** *Wound dressings: principles and practice*, Surgery, 29(10), 2011, 491–495.
2. **Ahmed K. B. R., Nagy A. M., Brown R. P., Zhang Q., et al.:** *Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies*, Toxicology in Vitro, 38, 2017, 179–192.
3. **Alfhili A. M., Lee M. H.:** *Triclosan: An update on biochemical and molecular mechanisms*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019, 28.
4. **Alibert S., Diarra J. N., Hernandez J., Stutzmann A., et al.:** *Multidrug efflux pumps and their role in antibiotic and antiseptic resistance: a pharmacodynamic perspective*, Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 13(3), 2017, 301–309.
5. **Alvarez-Ortega C., Olivares J., Martinez J.:** *RND multidrug efflux pumps: what are they good for?*, Frontiers in Microbiology, 4, 2013, 7.
6. **Al-Wrafy F., Brzozowska E., Górska S., Gamian A.:** *Pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy*, Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 71(0), 2017, 78-91.
7. *Analýza proteinů SDS PAGE elektroforézou*, Molekulárně biologická diagnostika, 2014, [cit. 21.04.2021], Dostupné z: <https://www.slideserve.com/lefty/anal-za-protein-sds-page-elektrofor-zou>.
8. **Ashley B., Brown M., Koh A.:** *Wearable Technology for Chronic Wound Monitoring: Current Dressings, Advancements, and Future Prospects*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6, 2018, 47.
9. **Azam M. W., Khan A. U.:** *Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa*, Drug Discovery Today, 24(1), 2019, 350-359.
10. **Babayan A., Nikaido H.:** *In Pseudomonas aeruginosa ethidium bromide does not induce its own degradation or the assembly of pumps involved in its efflux*, Biochemical and biophysical research communications, 324(3), 2004, 1065–1068.
11. **Bagge N., Schuster M., Hentzer M., Ciofu O., et al.:** *Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(4), 2004, 1175–1187.

12. **Barreto R., Barrois B., Lambert J., Mostrey S., et al.:** *Addressing the challenges in antiseptics: focus on povidone iodine*, International journal of antimicrobial agents, 56(3), 2020.
13. **Blanco P., Hernando-Amado S., Reales–Calderon J. A., Corona F., et al.:** *Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants*, Microorganisms, 4(1), 2016, 14.
14. **Boniakowski A.E., Kimball A. S., Jacobs B.N., Kunkel S.L., et al.:** *Macrophage-mediated inflammation in normal and diabetic wound healing*, The American Association of Immunologists, 199(1), 2017, 17–24.
15. **Brandt O., Mildner M., Egger A. E, et al.:** *Nanoscalic silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8(4), 2012, 478–488.
16. **Broughton G. I., Janis J. E., Attinger C.E.:** *Wound healing: an overview*, Plastic and Reconstructive Surgery, 117(7S), 2006.
17. **Brözel V. S., Cloete T. E.:** *Resistance of Pseudomonas aeruginosa to isothiazolone*, Journal of Applied Bacteriology, 76(6), 1994, 576–582.
18. **Cameron S. J., Hosseinian F., Willmore W. G.:** *Molecular Sciences A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver*, International Journal of Molecular Sciences, 19(3), 2018.
19. **Cardiele A. P., Sanchez C. J., Hardy S. K., Wenke J. C., et al.:** *Dakin solution alters macrophage viability and function*, Journal of Surgical Research, 192(2), 2014, 692–699.
20. **Cooper R., Kirketerp–Møller K.:** *Non-antibiotic antimicrobial interventions and antimicrobial stewardship in wound care*, Journal of Wound Care, 27(7), 2018.
21. **Costa S. S., Viveiros M., Rosato A. E., Couto I., et al.:** *Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in Staphylococcus aureus*, BMC Microbiology, 232(15), 2015.
22. **Davis M. R., Goldberg J. B.:** *Purification and visualization of Lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction*, Journal of Visualized experiments, 63, 2012.
23. **Delavary B. M., van der Veer W. M., van Egmond M., Niessen F. B., et al.:** *Macrophages in skin injury and repair*, Immunobiology, 216, 2011, 753–762.

24. Denyer S. P., Gorman S. P., Sussman M.: *Microbial biofilms: formation and control*, Wiley–Blackwell, **30**, 1993.
25. Fernandez L., Gooderham W. J., Bains M., McPhee J. B., et al.: *Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in Pseudomonas aeruginosa is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**(8), 2010, 3372–3382.
26. Fu S., Fan G., Yang L., Li F.: *Non-enzymatic glucose sensor based on Au nanoparticles decorated ternary Ni–Al layered double hydroxide/single walled carbon nanotubes/graphene nanocomposite*, *Electrochimica Acta*, **152**, 2015, 146–154.
27. Garlick J. A.: *Human skin-equivalent models of epidermal wound healing: tissue fabrication and biological implication, tissue engineering part C methods, The epidermis in wound healing*, **16**, 2004, 3–24.
28. George N., Faoagali J., Muller M.: *Silvazine I (silver sulfadiazine and chlorhexidine) activity against 200 clinical isolates*, *Burns*, **23**(6), 1997, 493–495.
29. Gottrup F., Apelqvist J., Bjarnsholt T., Cooper R., Moore Z., et al.: *EWMA Document: Antimicrobials and non-healing wounds: Evidence, controversies and suggestions*, *Journal of Wound Care*, **22**(5), 2014.
30. Gurtner G. C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M. T.: *Wound repair and regeneration*, *European Surgical Research*, **49**(1), 2012, 35–43.
31. Hajská M., Dragúňová J., Koller J.: *Cytotoxicity testing of burn wound dressings: first results*, *Cell and Tissue Banking*, **18**(2), 2017, 143–151.
32. Han G., Ceilley R.: *Chronic wound healing: A review of current management and treatments*, *Advances in Therapy*, **34**, 2017, 599–610.
33. Hübner N. O., Siebert J., Kramer A.: *Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds*, *Skin Pharmacol Physiol*, **23**, 2010, 244–258.
34. Chandan P., Karishma A., Sankalp A., Dov J. S., et al.: *Chapter Seven – Metal resistance and its association with antibiotic resistance*, *Advances in Microbial Physiology*, **70**, 2017, 261–313.
35. Chen C., Xie Q., Yang D., Xiao H., et al.: *Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review*, *RSC advances*, **14**, 2013, 4473–4491.
36. Chen Y., Cheng N., Xu Y., Huang K., et al.: *Point-of-care and visual detection of P. aeruginosa and its toxin genes by multiple lamp and lateral flow nucleic acid biosensor*, *Biosensor and Bioelectronics*, **81**, 2016, 317–323.



37. **Choi M. J., Ko K. S.:** *Mutant prevention concentrations of colistin for Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae clinical isolates*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 2014, 275–277.
38. **Karpiński T. M., Szkaradkiewicz A. K.:** *Chlorhexidine–pharmaco–biological activity and application*, *European review for medical and pharmacological sciences*, 19(7), 2015, 1321–1326.
39. **Khansa I., Schoenbrunner A. R., Kraft C. T., Janis J. E., et al.:** *Silver in wound care–friend or foe?: A comprehensive review*, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 7(8), 2019.
40. **Kong C, Neoh HM, Nathan S.:** *Targeting Staphylococcus aureus Toxins: A potential form of Anti-Virulence Therapy*, *Toxins (Basel)*, 2016, 8(3), 1–21.
41. **Koutná M.:** *Chyby a omyly v hojení chronických ran: Historie hojení ran od doby prehistorické až po arabskou školu*, *Diagnóza v ošetrovatelství*, 10(4), 2010, 8–10.
42. **Koutná M.:** *Chyby a omyly v hojení chronických ran: Od středověku–moderní hojení ran*, *Diagnóza v ošetrovatelství*, 6(5), 2010, 16–17.
43. **Krahn T., Gilmour C., Tilak J., Fraud S., et al.:** *Determinants of intrinsic aminoglycoside resistance in Pseudomona saeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 2012, 5591–5602.
44. **Kramer A., Dissemond J., Kim S., et al.:** *Consensus on wound antisepsis: update 2018*, *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(1), 2018, 28–58.
45. **Larouche J., Sheoran S., Maruyama K., Martino M. M.:** *Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets*, *Advances in Wound Care*, 7(7), 2018, 209–231.
46. **Lee H., Song C., Hong Y. S., Kim M. S., et al.:** *Wearable/Disposable sweat based glucose monitoring device with multistage transdermal drug delivery module*, *Science Advances*, 3, 2017.
47. **Li Y. C., Kuan Y. H., Lee S. S., Huang F. M., et al.:** *Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro*, *Environmental Toxicology*, 29(4), 2014, 452–458.
48. **Lim J. W., Ha D., Lee J., Lee S. K., et al.:** *Review of micro/nanotechnologies for microbial biosensors*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 2015, 61.
49. **Lipsky B. A., Hoey Ch.:** *Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds*, *Clinical Infectious Diseases*, 49(10), 2009, 1541–1549.

- 50. Loh J. V., Pervical S. L., Woods E. J., Williams N. J., et al.:** *Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals*, International Wound Journal, 6(1), 2009, 32–38.
- 51. Luo L. W., Wu Y. H., Yu T., Wang Y. H., et al.:** *Evaluating method and potential risks of chlorine-resistant bacteria (CRB): A review*, Water Research, **188**, 2021.
- 52. Ma H., O'Donnell T. F., Rosen N. A., Iafrati M. D.:** *The real cost of treating venous ulcers in a contemporary vascular practise*, Journal of vascular surgery: Venous and lymphatic disorders, Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders, **2**, 2014, 355–361.
- 53. Martins M., Viveiros M., Couto I., Costa S. S., et al.:** *Identification of Efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method*, In Vivo March, 25(2), 2011, 171–178.
- 54. McDonnell G., Russell A. D.:** *Antiseptics and Disinfectants: activity, action, and resistance*, Clinical Microbiology Reviews, 12(1), 2020.
- 55. McNeilly O., Mann R., Hamidian M., Gunawan C.:** *Emerging concern for silver nanoparticle resistance in Acinetobacter baumannii and other bacteria*, Frontiers in Microbiology, **12**, 2021.
- 56. McShan D., Ray P. C., Yu H.:** *Molecular toxicity mechanism of nanosilver*, Journal of Food and Drug Analysis, 22(1), 2014, 116–127.
- 57. Monaco M., Pimentel A. F., Crusiani M., Coccia E. M., et al.:** *Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus*, Current Topics in Microbiology Immunology, **409**, 2017, 21–56.
- 58. Moya B., Dotsch A., Juan C., Blazquez J., et al.:** *Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein*, PLoS Pathog, 5(3), 2009.
- 59. Mrázková R., Pokorná A., Krejcar M.:** *Možnosti v hojení ran*, Medicína pro praxi, 9(2), 2012, 83-86.
- 60. Nagl M., Nguyen V. A., Gottardi W., Ulmer H., et al.:** *Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in comparison with chloramine T for the treatment of chronic leg ulcers with a purulent coating: a randomized phase II study*, British Journal of Dermatology, 149(3), 2003, 590–597.
- 61. Obermeier A, Schneider J, Harrasser N, Tübel J, et al.:** *Viable adhered Staphylococcus aureus highly reduced on novel antimicrobial sutures using chlorhexidine and octenidine to avoid surgical site infection (SSI)*, Plos One, 2018.

- 62. Oliveira D., Borges A., Simões M.:** *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases, *Toxins*, 10(6), 2018, 1–19.
- 63. Peck B., Workeneh B., Kadikoy H., Patel S. J., et al.:** *Spectrum of sodium hypochloride toxicity in man-aslo a concern for nephrologists*, *NDT Plus*, 4(4), 2011, 231–235.
- 64. Percival S. L., Cooper R. A., Lipsky B. A.:** *Antimicrobial interventions for wounds*, *In microbiology of wounds*, CRC Press, 2010, 187 s., ISBN 978–1–4200–7994–4.
- 65. Périchon B., Courvalin P., Stratton C. W.:** *Antibiotic Resistance*, Thomas M. Schmidt, *Encyclopedia of Microbiology*, 2019 127–139.
- 66. Pervical S., Cutting K.:** *Microbiology of Wounds*, CRC Press, 2019, ISBN 978–0–3673–8420–3.
- 67. Piddock L. J. V.:** *Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria*, *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 2006, 382–402.
- 68. Pokorná A., Mrázová R.:** *Kompendium hojení ran pro sestry*, 1. vydání, Praha: Grada, 2012, 191 s., ISBN 978–80–247–3371–5.
- 69. Poole K.:** Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 2005, 479–487.
- 70. Poole K.:** *Pseudomonasaeruginosa: resistance to the max*, *Frontiers in Microbiology*, 2, 2011, 65.
- 71. Porter R.:** *Největší dobrodiní lidstva: Historie medicíny od starověku po současnost*, Praha: Prostor, 2001, 807 s., ISBN 80–7260–052–4.
- 72. Pospíšilová A.:** *Praktické lékárenství: léčba chronických ran moderními krycími prostředky*, *Dermatovenerologická klinika LF MU a FN Brno*, 6(6), 2010, 276–281.
- 73. Punjataewakupt A., Napavichayanun S., Aramwit P.:** *The downside of antimicrobial agents for wound healing*, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(1), 2019, 39–54.
- 74. Rousselle P., Braye F., Dayan G.:** *Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 2019, 344–365.
- 75. Russell A. D., Day M. J.:** *Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction*, *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 2002, 1–3.
- 76. Rutala, W. A., Cole E. C., Wannamaker N. S., Weber D. J.:** *Inactivation of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis by 14 hospital disinfectants*, *The American Journal of Medicine*, 91(3), 1991, 267–271.

- 77. Shaw T. J., Martin P.:** *Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration*, Current Opinion in Cell Biology, **42**, 2016, 29–37.
- 78. Shepherd M. J., Moore G., Wand M. E., Sutton J. M., et al.:** *Pseudomonas aeruginosa adapts to octenidine in the laboratory and a simulated clinical setting, leading to increased tolerance to chlorhexidine and other biocides*, The Journal of hospital infection, **100(3)**, 2018, 23–29.
- 79. Shi G., Boost M., Cho P.:** *Prevalence of antiseptic-resistance genes in Staphylococci isolated from orthokeratology lens and spectacle wearers in Hong Kong*, Investigative ophthalmology visual science, **56(5)**, 2015, 3069–3074.
- 80. Schacht V. J., Neumann L. V., Sandhi S. K., Chen L., et al.:** *Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics*, Journal of Applied Microbiology, **114(1)**, 2013, 25–35.
- 81. Schreml S., Szeimies R. M., Prantl L., Karrer S., et al.:** *Oxygen in acute and chronic wound healing*, Br. J. Dermatol, **163**, 2010, 257–268.
- 82. Schülke–Octenilin® wound irrigation solution** [online], [cit. 2021–06–20], dostupné z: <https://www.schuelke.com/cz-cs/products/octenilin-wound-irrigation-solution.php>.
- 83. Siddiqui A. R., Bernstein J. M.:** *Chronic wound infection: Facts and controversies*, Clinics in Dermatology, **28(5)**, 2010, 519–26.
- 84. Simon S.:** *Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds*, FEMS Microbiology Reviews, **27(2–3)**, 2003, 341–353.
- 85. Sismaet H. J., Banerjee A., McNish S., Choi Y., et al.:** *Electrochemical detection of pseudomonas in wound exudate samples from patients with chronic wounds*, Wound Repair Regen, **24(2)**, 2016, 366–372.
- 86. Snyder R.J., Lantis J., Kirsner R. S., Shah V., et al.:** *Macrophages: a review of their role in wound healing and their therapeutic use*, Wound Repair Regen, **24**, 2016, 613–629.
- 87. Stahl J., Braun M., Siebert J., Kietzmann M.:** *The effect of a combination of 0,1% octenidine dihydrochloride and 2% 2–phenoxyethanol (octenisept ®) on wound healing in pigs in vivo and its in vitro percutaneous permeation through intact and barrier disrupted porcine*, International wound journal, **7(1)**, 2010, 62–69.
- 88. Stephen P. D., Norman A. H., Sean P. G.:** *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*, Seventh Edition, 2004, ISBN 978–04–70988–32–9.
- 89. Stryja J., Krawczyk P., Hájek M., Jalůvka F.:** *Repetitorium hojení ran 2*, 2. vydání, Semily: Geum, 2016, 380 s., ISBN 978–80–87969–18–2.

- 90. Stryja, J.:** *Zásady racionální antimikrobiální terapie v managementu ran*, Léčba ran 1, 2017, 16–20.
- 91. Szmyd R., Goralczyk, A. G., Skalniak L., et al.:** *Effect of silver nanoparticles on human primary keratinocytes*, Biological Chemistry, 394(1), 2013, 113–123.
- 92. Tam K., Torres V. J.:** *Staphylococcus aureus secreted toxins & extracellular enzymes*, Microbiology Spectrum, 7(2), 2019, 1–59.
- 93. To M. S, Favrin S., Romanova N., Griffiths M. W.:** *Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of Listeria monocytogene*, Applied and Environmental Microbiology, 68(11), 2020.
- 94. Tumah H. N.:** *Bacterial biocide resistance*, Journal of Chemotherapy, 21(1), 2009.
- 95. Valenta J.:** *Základy chirurgie*, 2. vydání, Praha: Galén, 2007, 277 s, ISBN 978–80–7262–403–4.
- 96. Valentin E., Bottomley A. L., Chilambi G. S., Harry E., et al.:** *Toxic environment of war: maternal prenatal heavy metal load predicts infant emotional development*, Infant Behavior and Development, 55, 2019, 1–9.
- 97. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V.:** *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanism*, The journal of international medical research, 35(7), 2009, 1528–1542.
- 98. Wang B., Zhang L., Li B., Li Y., et al.:** *Synthesis, characterization, and oxygen sensing properties of functionalized mesoporous silica Sba–15 and Mcm–41 with a Pt (Ii)–porphyrin complex*, Sensors and Actuators B: Chemical, 190, 2014, 93–100.
- 99. Wilkinson H. N., Hardman M. J.:** *Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes*, Open Biology, Royal Society, 10(9), 2020.
- 100. Williamson D. A., Carter G. P., Howden B. P.:** *Current and emerging topical antibacterials and antiseptics: Agents, action, and resistance patterns*, Clinical microbiology reviews, 30(3), 2017, 827–860.
- 101. Wolcott R. D., Hanson J. D., Rees E. J., Koenig L. D, et al.:** *Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing*, Wound Repair and Regeneration 24(1), 2016, 163–74.
- 102. Wound Healing**, TeachME Surgery, 2020 [cit. 04.07.2021]. Dostupné z: <https://teachmesurgery.com/skills/wounds/wound-healing/>.
- 103. Young A., McNaught C. E.:** *The physiology of wound healing*, Surgery, 29, 2011, 475–479.

104. Yue H., He Y., Fan E., Wang L., et al.: *Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of pseudomonas aeruginosa using phage as highly specific recognition agent*, Biosensor and Bioelectronics, **94**, 2017, 429–432.
105. Zhang T., Wang L., Chen Q.: *Cytotoxic potential of silver nanoparticles*, Yonsei Medical Journal, 55(2), 2014, 283.
106. Zhao G., Usui M. L., Lippman S. I., James G. A., et al.: *Biofilms and inflammation in chronic wounds*, Advances in Wound Care, **2**, 2013, 389–399.