

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Leona Kejzlarová**

Cytotoxické efekty antiseptik používaných v prostředích pro léčbu chronických ran  
Cytotoxic effects of antiseptics in devices for chronic wound healing

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Vojtěch Pavlík

Praha, 2019

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Mgr. Vojtěchu Pavlíkovi za odborné vedení, neskonalou trpělivost, věnovaný čas, užitečné rady a připomínky při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Šafránkové za cenné rady a pomoc. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za velkou podporou po celou dobu psaní i během celého studia.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.08.2019

Leona Kejzlarová

## Abstrakt

Chronické rány jsou často kolonizovány patogenními bakteriemi. Výskyt infekce na povrchu rány má za následek zhoršený a opožděný proces hojení. Proto je nutné mikrobiologickou zátěž odstranit použitím antimikrobiálních činidel, která navíc působí jako prevence proti infekci. Mezi antimikrobiální látky patří antibiotika, proti kterým si však patogeny umí vytvořit resistenci. Pro léčbu chronických rán se tedy používají antiseptické přípravky působící neselektivně. Antiseptika však mohou být cytotoxická i pro buňky lidské tkáně a způsobit tak zpoždění hojení ran. Je třeba dosáhnout určité rovnováhy mezi antimikrobiální účinností a cytotoxicitou. Nejčastěji používané aktivní látky s mikrobicidními schopnostmi v antiseptických přípravcích jsou: stříbro, jod, chlor, oktenidin, polyhexamethylen a chlorhexidin. Tato práce popisuje mechanismy působení těchto činidel a porovnává dosavadní klinické a laboratorní poznatky o jejich efektivitě na hojení chronických ran a cytotoxicitě proti buňkám podílejících se na tomto procesu.

**Klíčová slova:** Chronické rány, antiseptika, cytotoxicita, oktenidin, chlorhexidin, polyhexamethylen, PHMB, jod, stříbro, chlor

## Abstract

Chronic wounds are often colonized by pathogens bacteria. The occurrence of infection on the surface results in an injured and delayed healing process. Therefore, the use of antimicrobial agents that eliminate microbiological stress and prevent infection is required for the treatment of chronic wounds. Microbial agents include antibiotics, but pathogens are able to develop resistance to them. Antiseptic agents are therefore used, which act non-selectively. Antiseptics may be cytotoxic to human tissue cells and cause a delay in wound healing. A certain balance needs to be struck between antimicrobial activity and cytotoxicity. The most commonly used active substances with microbicidal properties in antiseptic preparations are: silver, iodine, chlorine, octenidine, polyhexanide, and chlorhexidine. This work describes the mechanisms of action of these agents and compares the clinical and laboratory knowledge of their effectiveness in chronic wound healing and cytotoxicity against cells involved in this process.

**Keywords:** Chronic wounds, antiseptic, cytotoxicity, octenidine, chlorhexidine, polyhexamethylen, PHMB, iodine, silver chlor

## Seznam použitých zkratek

AgNO <sub>3</sub>	Dusičnan stříbrný, silver nitrate
AgNP	Nanokrystalické stříbro, silver nanoparticle
BD	Betasidona
BR	Braunol
BT	Betadin
CAM	Choriollantoidní membrány, choriollantoic membrane
CAT	Chloramin T
CHX	Chlorhexidin, chlorhexidine
CI	Kadexomer jod, cadexomer iodine
ER	Endoplasmatické retikulum, endoplasmatic reticulum
FBS	Fetální bovinní sérum, fetal bovine serum
G <sup>+</sup> bakterie	Gram pozitivní bakterie, gram positive bacteria
G <sup>-</sup> bakterie	Gram negativní bakterie, gram negative bacteria
Grp78	Glukózou regulovaný protein 78 kDa, glucose-regulated protein 78 kDa
HaCaT	Lidské nesmrtelné keratinocyty, human keratinocyte immortalized cell line
HEK	Lidské epidermální keratinocyty, human epidermal keratinocytes
HDF	Lidské dermální fibroblasty, human dermal fibroblast
HOCl	Kyselina chlorná, hypochlorous acid
IC50	Polovina maximální inhibiční koncentrace, half maximal inhibitory concentration
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleukin
LS	Lavasept
LH	Liposomální hydrogel, liposomal hydrogel
NaOCl	Chlornan sodný, sodium hypochlorite
NCT	N-chlorotaurin, taurine chloramine
NK buňky	Buněční přirození zabíječi, natural killer cells
MMP	Matrixová metaloproteináza, matrix metalloproteinase
MSC	Mezenchymální stomatální buňky, mesenchymal stomatal cell
OCT	Oktenidin, octenidine
PHMB	Polyhexamethylen biguanin, polyhexamethylene biguanine, polyhexanide
PS	Prontosan
PVP-I	Povidon jod, povidon iodine
ROS	Kyslíkové radikály, reactive oxygen species
PE	Fenoxyethanol, phenoxyethanol
SSD	Sulfadiazin stříbrný, silver sulfadiazine
TNF- $\alpha/\beta$	Faktor nádorové nekrózy alfa/beta, tumor necrosis faktor
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor, vascular endothelial growth factor

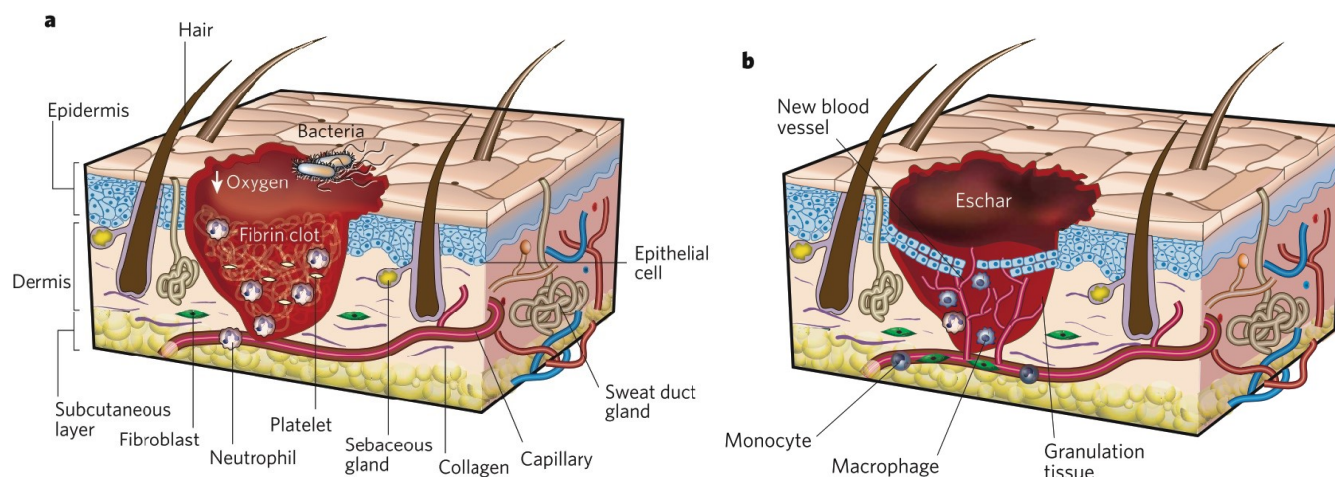
# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Hojení rány.....	2
3	Stříbro .....	2
3.1	Antimikrobiální mechanismus působení stříbra.....	3
3.2	Cytotoxicita stříbra.....	4
4	Jod.....	6
4.1	Antimikrobiální mechanismus působení jodu.....	6
4.2	Cytotoxicita jodu.....	7
5	Chlor .....	10
5.1	Antimikrobiální mechanismus působení chloru.....	10
5.2	Cytotoxicita chloru.....	11
6	Oktenidin.....	14
6.1	Antimikrobiální mechanismus působení OCT.....	14
6.2	Cytotoxicita OCT.....	14
7	Polyhexamethylen biguanid.....	16
7.1	Antimikrobiální mechanismus působení PHMB .....	16
7.2	Cytotoxicita PHMB.....	17
8	Chlorhexidin .....	18
8.1	Antimikrobiální mechanismus působení CHX .....	19
8.2	Cytotoxicita CHX .....	20
9	Tabulky .....	23
10	Závěr .....	33
11	Reference .....	34

# 1 Úvod

Chronické rány představují závažný zdravotní a sociologický problém, který postihuje asi 7 % populace. Jsou definovány jako sekundárně se hojící rány, které nevykazují tendenci hojení po dobu 6 - 9 týdnů. Od akutní rány se liší pomalým a dlouhotrvajícím procesem hojení, zahrnující prodlouženou zánětlivou fázi a výskytem bakteriální kontaminace (bio-burden). Pro chronické rány je také typická nerovnováha mezi proteinázami a inhibitory zánětu a apoptóza či nekróza buněk. Vznikají nejčastěji přechodem akutní rány do chronicity v důsledku infekce či přidružených nemocí, nebo prohloubením nekrózy kůže. Přetrvávající otevřená rána je místem možného vstupu patogenů do těla a může způsobit další rozvoj infekčních komplikací.

Pro léčbu nehojících se ran je nezbytné použití krytů s lokálními antimikrobiálními látkami. Jejich úkolem je snížení biologické zátěže a kontrola infekce rány, která je hlavní příčinou opožděného hojení. Mezi lokální antimikrobiální látky se dnes řadí antibiotika a antiseptika. Mechanismy působení většiny antibiotik jsou specifické pro jeden nebo několik cílů (Punjataewakupt et al., 2019) a vykazují tím i vyšší pravděpodobnost rozvoje bakteriální rezistence, která je navíc umocněná nevhodným a nadměrným používáním při léčbě infekce (Karinja & Spector, 2018). Antiseptika mají širší spektrum antimikrobiální aktivity díky své neselektivitě, pro bakterie je těžší vytvořit si proti nim rezistenci, a proto jsou vhodnější pro léčbu nehojících se ran. Ideální antiseptika by měla být účinná proti širokému spektru patogenů, podporovat reepitelizaci, minimalizovat bolest, zabránit nadměrnému zánětu a měla by být dobře lokálně i systémově tolerována. Neselektivní aktivita má však za následek interferenci s buňkami v ráně a mohou tak vyvolat tkáňovou cytotoxicitu a zpoždění hojení ran. Tato práce přináší přehled nejpoužívanějších aktivních látek v antiseptických přípravcích, mechanismus působení na bakteriální i hostitelské buňky a publikované cytotoxické koncentrace a efekty *in vitro* a *in vivo*.



Obrázek 1. Průběh hojení ran. A) fáze zánětu, ve které se zánětlivé buňky dostávají do místa poranění a eliminují patogenní organismy. B) v další fázi granulace se vytváří nové cévy a podklad pro epitel, které následně migrují po granulované tkáni a ránu zacelí (Gurtner et al., 2012).

## 2 Hojení rány

Proces hojení ran probíhá ve třech fázích: zánětlivá, granulační a epitelizační fáze viz obr.1. V první fázi dochází k migraci leukocytů, fibroblastů do místa poranění a odstranění mikrobů a cizorodých látek. Vytváří se tedy zánět charakterizovaný otokem, zarudnutím kůže, bolestí a zvýšenou teplotou postiženého místa. Zánětlivé buňky (např. neutrofilů) mohou však přispívat k patogenitě, porušení tkáně či vzniku nekrózy, proto je nutné hladiny zánětu regulovat. V další fázi granulace je zacelena rána a je také vytvořena podkladová síť pro epitelizaci buňky. Vytváří se nové cévy procesem neovaskulizace (neoangiogeneze) (Garlick, 2004; Tomic-Canic et al., 2004). Fibroblasty produkují kolagen a jiné složky extracelulární matrix. TGF je růstový faktor produkovaný nejen přítomnými makrofágy, který podporuje tvorbu kolagenových vláken. V této fázi se však může objevit infekce nebo hypergranulace, které mohou zahojení ran významně zpomalit nebo dokonce potlačit. Epitelizace je končným procesem reparace ran a doprovází granulaci. Epitelové buňky se dělí a migrují z periferie rány nebo epitelizačních ostrůvků uvnitř rány po vlhké spodině a vytváří novou pojivovou tkáň a pokožku překrývající tkáň granulační (Garlick, 2004; Gurtner et al., 2012). Rychlost reepitelizace rány je určena zejména kooperací proliferace a migrace keratinocytů a novotvorby pojivové tkáně. Mechanickou a funkční překážkou reparace tkáně může být nekróza a fibrinový povlak. V chronických ranách je velké množství neutrofilních proteináz vyvolávajících chronickou zánětlivou odpověď a vytváří se tak nerovnováha mezi hladinami proteináz a jejich inhibitorů. Rovnováha je však zásadní pro rozklad dlouhodobého zánětu a následné reepitelizace rány (Tomic-Canic et al., 2004).

## 3 Stříbro

Antibakteriální účinnost stříbra je známá již po staletí. Od roku 1800 se začal lokálně používat roztok dusičnanu stříbrného ( $\text{AgNO}_3$ ), jehož užívání pokleslo během 2. světové války s příchodem antibiotik a pasterizace (Politano et al., 2013). Do 60. let minulého století byly také používány produkty obsahující stříbro v komplexu s malými bílkoviny, pro lepší stabilitu roztoku. Pro menší baktericidní účinky byly však nahrazeny stříbrnými solemi, kde jsou stříbrné ionty komplexovány s negativně nabitými ionty, které také zvyšují stabilitu ( $\text{AgCl}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{AgSO}_4$ ). V 60. letech Moyer zavedl kontinuální zvlhčování 0,5% roztokem dusičnanu stříbrného ( $\text{AgNO}_3$ ) při léčbě popálenin (Castellano et al., 2007). Po použití  $\text{AgNO}_3$  je do rány uvolňováno velké množství iontů, které však okamžitě vytváří chemický komplex s chloridy, které jsou složkami exsudátů rány a tím jsou ionty spotřebovány a inaktivovány. Proto se musí aplikace roztoku  $\text{AgNO}_3$  opakovat až 12krát denně (Atiyeh et al., 2007; Leaper, 2006). Fox v roce 1968 zkombinoval  $\text{AgNO}_3$  se sulfadiazinem a vytvořil topický krém 1% sulfadiazin stříbrný (SSD), kombinující inhibiční účinky stříbra a antimikrobiální účinky (Percival et al., 2010). SSD do rány uvolňuje až 3200 ppm stříbra stejně jako  $\text{AgNO}_3$ , ale uvolňování je mnohem pomalejší, tudíž není potřebná tak častá aplikace (Atiyeh et al., 2007).

Dnes počet antiseptik obsahujících stříbro narůstá, jsou k dispozici v mnoha formách jako například krémy, roztoky, hydrogely, pěny, hydrokoloidy, polymerní filmy a výrobky na bázi nanokrystalického stříbra. Každý přípravek uplatňuje různé výhody, přičemž antibakteriální účinky vykazují všechny. Avšak nejasnosti ohledně měření jejich toxicity stále přetrvávají (Leaper, 2006).

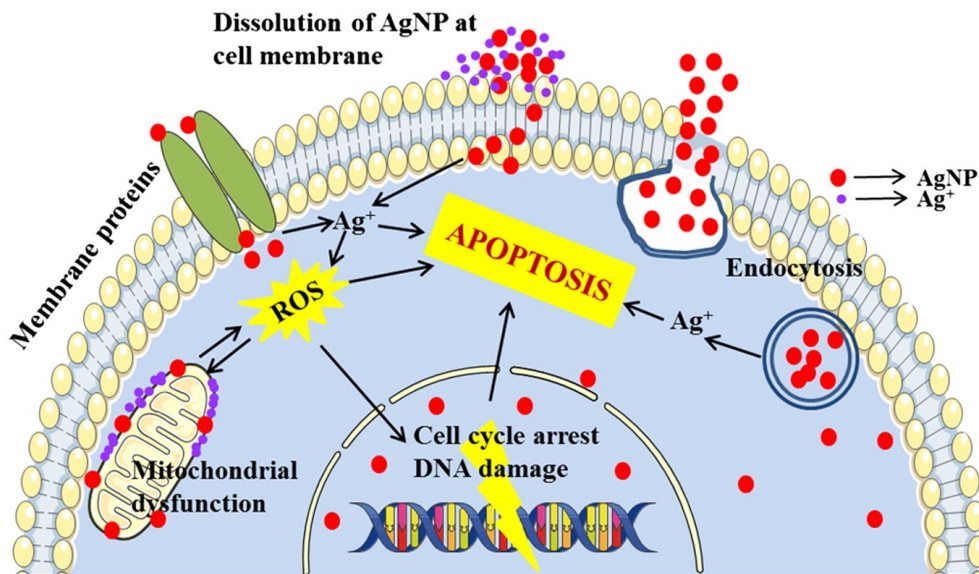
Nanočástice stříbra ( $\text{AgNP}$ ) mají výjimečné fyzikálně-chemické vlastnosti odlišné od mikro- a nano- krystalů nebo stříbrných solí a díky své antibakteriální účinnosti jsou v dnešní době nejpoužívanějším nanomateriálem ve spotřebních výrobcích (Kramer et al., 2018). Poskytují větší plochu povrchu pro kontakt s vlhkostí, čímž se zvyšuje

účinek stříbra, ale i penetrační potenciál. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 1 nm do 100 nm a obsahují 20 - 15000 atomů stříbra (Chen & Schluesener, 2008). Liší se svým tvarem, velikostí a povrchovou vrstvou a tyto rozdíly mají vliv na jejich biologickou aktivitu (McShan et al., 2014). Čím je AgNP menší, tím má větší poměr plochy povrchu k objemu a uvolňuje větší množství toxického  $\text{Ag}^+$  (Punjataewakupt et al., 2019). Ve srovnání s normálním stříbrem je vysoce rozpustné ve vodě a uvolňuje přibližně 70ppm  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Ag}^0$  (Le Ouay & Stellacci, 2015).  $\text{Ag}^0$  je mnohem pomaleji deaktivována chloridovými anionty, než kationt stříbra (Potgieter & Meidany, 2018).

### 3.1 Antimikrobiální mechanismus působení stříbra

Aktivním činidlem je ionizované stříbro ( $\text{Ag}^+$ ), které je vysoce reaktivní a účinné vůči širokému spektru  $\text{G}^+$  i  $\text{G}^-$  bakteriálních kmenů (Percival et al., 2010). Aktivní ionty stříbra mají schopnost tvořit kovalentní vazbu s disulfidickými a thiolovými skupinami nacházejícími se na mnoha místech buňky. Díky této schopnosti stříbro interaguje s bílkovinami a enzymy v buněčné stěně bakterií, poškodí ji a naruší tak ochrannou bariéru. Způsobí důležité strukturální a funkční změny vedoucí k inhibici transportu živin přes buněčnou stěnu (Lo et al., 2009; McDonnell & Russell, 1999; Percival et al., 2010; Stryja, 2008) a naruší celistvost buňky následované únikem životně důležitých látek a buněčnou smrtí (Stryja, 2008). Jsou účinnější proti  $\text{G}^-$  než  $\text{G}^+$  bakteriím, protože negativní náboje lipopolysacharidů vnější vrstvy  $\text{G}^-$  bakterií jsou přitahovány k slabým nábojům na nanočásticích stříbra. Částice o velikosti 100 nm sice nemohou procházet buňkou, ale působí na signální dráhy buňky nepřímo přes transmembránové receptory (Cameron et al., 2018; McShan et al., 2014). AgNP v buňkách postupují transformaci od elementárního stříbra  $\text{Ag}^0$  ke kationtům  $\text{Ag}^+$ , k formám oxidů stříbra ( $\text{Ag-O-}$ ) a následně k sulfidům stříbra ( $\text{Ag-S-}$ ) po interakci s thiolovými skupinami. Stříbro nejčastěji tvoří  $\text{Ag}_2\text{S}$ , což naznačuje potencionální toxicitu a jen velmi malé množství zůstává ve formě volných iontů  $\text{Ag}^+$  (Cameron et al., 2018). Stříbro také negativně ovlivňuje elektronový transport (Toy & Macera, 2011), což vede k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a navíc interaguje s enzymy reduktázy ROS (viz obr. 2.) (Cameron et al., 2018; McShan et al., 2014) nebo vychytává intracelulární kofaktor glutation. Nadprodukce ROS způsobuje denaturaci antiapoptotických proteinů a iniciuje expresi proapoptotických proteinů, které pak iniciují apoptotickou signální dráhu (Akter et al., 2018; Le Ouay & Stellacci, 2015). Poškození DNA je umocněno interakcí  $\text{Ag}^+$  (McDonnell & Russell, 1999; Morones et al., 2005), která vede k problémům při replikaci a zástavě buněčného cyklu v G2fázi/M (AshaRani et al., 2009).  $\text{Ag}^+$  tak zasahuje i do syntézy nukleových kyselin, denaturuje bílkoviny a tvoří nerozpustné a nefunkční sloučeniny (Stryja, 2008). Cytotoxicita AgNP je závislá hlavně na čase, koncentraci, pH prostředí, teplotě a typu buněk (Punjataewakupt et al., 2019; Zhang et al., 2014, AshaRani et al, 2009). V současnosti stále není jasné, jestli poškození v biologických systémech indukují AgNP nebo  $\text{Ag}^+$ , je náročné rozlišit, která část AgNP vede k cytotoxicitě (Akter et al., 2018).





Obrázek 2. Působení AgNP a  $Ag^+$  na buňku. Stříbro do buňky prochází difúzí, endocytózou nebo transmembránovými proteiny. Uvnitř buňky se v plazmatické membráně AgNP rozpouští a uvolňuje aktivní ionizované  $Ag^+$ , které následně způsobují mitochondriální dysfunkci, oxidační stres, poškození DNA a inhibici proliferace buňky vedoucí k apoptóze či nekróze (Ahmed et al., 2017).

### 3.2 Cytotoxicita stříbra

#### *In vitro:*

Bylo prokázáno, že stříbro je vysoce toxické hlavně pro keratinocyty a o něco více pro fibroblasty bez ohledu na typ terapeutik uvolňujících stříbro (Poon & Burd, 2004). Müller a Kramer *in vitro* pozorovali smrt 50 % myších fibroblastů při 0,0018%  $AgNO_3$  a 0,006% SSD (Müller & Kramer, 2008). To je v souladu se studií Hidalgo a Domingueze, kteří na lidských dermálních fibroblastech dokázali cytotoxicitu  $AgNO_3$  již při 0,00007 % (závislou na koncentraci a čase) (Hidalgo & Dominguez, 1998). Ve svém dalším experimentu prokázali mechanismus toxického působení iontů stříbra, které inhibovalo syntézu DNA a proliferaci fibroblastů, indukovalo inhibici buněčného ATP a celkového proteinu (Hidalgo et al., 1998). Poon a Burd označili jako bezpečnou koncentraci  $AgNO_3$  0,00037 %, která je mnohonásobně nižší než klinicky používaná (Poon & Burd, 2004).

Další laboratorní studie dokazují, že cytotoxicita stříbra je přímo úměrná koncentraci (Hidalgo & Dominguez, 1998, AshaRani et al., 2009; Hajska et al., 2017). AshaRani a kol. na plicních fibroblastech a glioblastomech prokázali genotoxicitu a cytotoxicitu AgNP, které jsou koncentračně i časově závislé. Nanokrystaly stříbra snížily buněčný obsah ATP, poškodily mitochondrie a zvýšily produkci ROS, navíc negativně ovlivnily proliferaci buněk (AshaRani et al., 2009). Szmyd a kol. prokázali genotoxicitu a cytotoxicitu AgNP již od 0,000625 % proti epidermálním keratinocytům doprovázenou inhibicí metabolické aktivity, proliferace a migračního potenciálu (Szmyd et al., 2013). Po 24 h byla aktivována kaspáza 3/7 a chromozomové zlomy byly zaznamenány v koncentraci 0,01 % AgNP.

Prostředky uvolňující AgNP se mohou svým působením na buňky lišit. Hajska a kol. testovali cytotoxicitu běžně topicky používaných antibakteriálních bandáží a ostatních přípravků obsahujících stříbro na lidských a myších dermálních fibroblastech a po 24 h výsledky vykazovaly značné rozdíly mezi antiseptiky. Autoři označili Acticoat ( $Ag^0$ ) jako netoxický, jako semitoxický Aquacel Ag ( $Ag^+$ ), povidon jod (PVP-I, Betadin) a oktenidin (OCT, Octenisept) a do toxické skupiny zařadili Suprasorb Ag ( $Ag^+$ ), 1% polyhexamethylen (PHMB) a 1% SSD. (Hajska et al., 2017). Cytotoxicita 1% SSD byla pro fibroblasty a keratinocyty potvrzena i dalšími studiemi (Boonkaew et al., 2014) a umocněna kombinací s 0,2% chlorhexidinem (CHX) (Fraser et al., 2004). Další studie *in vivo* Boonkaewa a kol. také

označila krytí Acticoat a jiné přípravky obsahující AgNP (hydrogel Ag a PolyMem Silver) jako netoxické pro fibroblasty a pro keratinocyty toxické až po 48 h (Boonkaew et al., 2014). A v testu Frasiera a kol. obvaz Acticoat usmrtil 25% buněk, ale ve srovnání s kontrolou toxický nebyl (Fraser et al., 2004). V kontrastu s tím jsou však další studie, ve kterých byl obvaz Acticoat toxický pro lidské fibroblasty i keratinocyty ve všech testovaných časech (Poon & Burd, 2004, Lam et al., 2004).

Kromě testování na fibroblastech a keratinocytech byl sledován vliv na imunitní buňky. Studie *in vitro* Shina a kol. prokázala, že AgNP v koncentraci 0,0015 %, která se uvádí jako bezpečná, je cytotoxická pro periferní mononukleární krevní buňky a od 0,0003 % inhibuje jejich produkci a expresi cytokinů, zejména IFN $\gamma$ , IL-5 a TNF- $\alpha$  (Shin et al., 2007). Mazurak a kol. uvádí, že AgNP zvyšuje superoxidaci NK buněk a aktivitu neutrofilů již po 5 min, což má za následek účinnější baktericidní funkci, současně ale i poškození vlastní tkáně (Mazurak, et al., 2007).

### ***In vivo:***

Marquardt a kol. pomocí HETCAM testu zjistili, že SSD způsobuje mírné podráždění po krátkodobém působení, ale po jedné hodině má za následek vážné podráždění cév (Marquardt et al., 2010). Larese a kol. na lidské epidermis dokázali propustnost AgNP (70  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) porušenou i intaktní kůží (Larese et al., 2009). Brandt a kol. potvrdili perkutánní absorpci stříbra na myším modelu *in vivo* a navíc naměřili větší množství Ag v krvi a vnitřních orgánů z 1% SSD než z 1% AgNP i přesto, že AgNP obsahuje 3,4krát více stříbra než SSD (Brandt et al., 2012). Protože jsou AgNP schopné transcytózy kapilárními endotely, dostanou se tak do oběhového systému, kde mohou tvořit vazbu s bílkovinami v plazmě a krevními buňkami. Tímto způsobem jsou dále distribuovány po celém těle a ukládány v orgánech, kde mohou působit toxicky (Prabhu & Poulose, 2012), dokonce prohází i přes hematoencefalickou bariéru (Akter et al., 2018), a proto je důležité monitorovat hladiny stříbra v plazmě nebo v moči (Poon & Burd, 2004).

Obvaz Acticoat obsahující AgNP v mnoha studiích *in vivo* měl příznivé účinky na neovaskularizaci, granulaci a epitelizaci tkáně a výrazně tak urychlil hojení chronických lidských ran či popálenin (Wright et al., 2002, Vlachou et al., 2007, Demling et al., 2002). Ve studii Mazuraka a kol. Acticoat vykazoval velmi silné antibakteriální účinky i protizánětlivou aktivitu (Mazurak et al., 2007). AgNP indukovaly zvýšenou buněčnou apoptózu a potlačovaly uvolňování matrixové metaloproteinázy (MMP), které bylo potvrzeno i publikací Wrighta a kol. Tím se výrazně snížila lokální hladina AgNP a minimalizovaly se potenciálně škodlivé účinky zánětu, které vedly k časnému hojení rány (Mazurak et al., 2007, Wright et al., 2002). Mazurak a kol. zaznamenali navíc zvýšenou cytotoxicitu proti splenocytům, které jsou schopné aktivovat vrozené a adaptivní imunitní reakce. Vlachou a kol. navíc měřili hladiny stříbra v krvi absorbovaného z Acticoatu, které nezpůsobily hematologickou ani biochemickou toxicitu (Vlachou et al., 2007). Tyto výsledky jsou ojedinělé, jelikož Ag v krvi nebo moči se obecně v klinických studiích měří velmi málo.

Byla prokázána lepší účinnost Acticoatu na reepitelizaci ran a dřívější odstranění infekce ve srovnání s léčbou SSD (1% a 0,5%) (Huang et al., 2007, Argirova & Hadjiiski, 2011) bez lokálních nebo systémových negativních reakcí. SSD v klinické studii Fumala a kol. neměl negativní vliv na epitelizaci chronických ran v koncentraci 1 % a v porovnání s kontrolou bylo pozorováno dokonce mírné zlepšení v hojení ran se snížením množství bakterií a zánětlivých buněk (Fumal et al., 2002). V této studii se rány zhojily v průměru za 15 týdnů (v porovnání s kontrolou o 1 týden rychleji). Tredget a kol. porovnali účinnost Acticoatu a AgNO $_3$  *in vivo* na popáleniny a zjistili, že mají stejný vliv na rychlost reepitelizace (Tredget et al., 1998). Negativní vliv na hojení ukázaly výsledky Daescheina a kol., kteří pozorovali hlubokou tkáňovou nekrózu, otok, fibrinový film v ráně a porušení endotelových buněk s velkou permeabilitou leukocytů vlivem 1% AgNO $_3$  po 10 dnech (Daeschlein et al., 2007).

AgNP obvazy ve studii Krasowského a kol. snížily však velikost chronických ran po 56 dnech jen o 14 % a odstranění mikrobiologického množství bylo pozorováno u 43,8 % pacientů (Krasowski et al., 2015). Výsledky byly navíc signifikantně horší ve srovnání s OCT. Negativní vliv AgNP na hojení ran byl prokázán *in vivo* studií Burda a kol. Autoři zaznamenali největší inhibici epitelizace myších ran obvazy Contreet Ag a Acticoat (inhibice 73,1 % a 71,4 %), o něco méně byl cytotoxický Aquacel Ag a PolyMem Ag, který byl v *in vitro* testech netoxický pro lidské fibroblasty (Burd et al., 2007) i keratinocyty (Boonkaew et al., 2014).

V klinické studii Eberleina a kol. obvazy obsahující AgNP byly dobře tolerovány tkání bez nežádoucích vedlejších efektů a alergických reakcí (Eberlein et al., 2012). Snížení množství mikroorganismů v ráně bylo však pomalejší ve srovnání s PHMB obvazem a léčba způsobila vyšší míru bolesti. V jiném experimentu byla zaznamenána hepatotoxicita a zabarvení kůže s vysokými hladinami stříbra v moči (28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), plazmě (107  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a v jaterních enzymech u pacienta s 30 % popáleninami po 1 týdnu léčby Acticoatem (Trop et al., 2006). Tyto hodnoty se vrátily k normálu po přerušení topické aplikace stříbrných krytí.

Bylo provedeno několik klinických studií zkoumajících vliv stříbra na hojení u infikovaných ran i přesto, že všechny vykazovaly výrazné snížení velikosti poranění, neprokázaly úplné zahojení (Karinja & Spector, 2018). AgNP má vyšší antimikrobiální účinky a je lépe tolerováno tkáněmi (Tredget et al., 1998, Argirova & Hadjiiski, 2011).

## 4 Jod

Jod byl objeven v roce 1811 Bernardem Courtoisem (Percival et al., 2010) a na léčbu ran byl poprvé použit Daevisem J. roku 1839 ve formě vodného jodového roztoku a roztoku jodidu draselného v ethanolu (Hugo, 1991; Percival et al., 2010). Při vysoké koncentraci byly tyto roztoky nestabilní a pro tkáň velmi toxické, způsobovaly velké bolesti, podráždění kůže a skvrny. Tento problém vyřešily jodofory, komplexy jodu a solubilizačního činidla nebo nosiče uvolňující aktivní jod. Mezi nejpoužívanější jodofory v antiseptikách a dezinfekcích patří povidon-jod a kadexomer-jod (McDonnell & Russell, 1999; Percival et al., 2010).

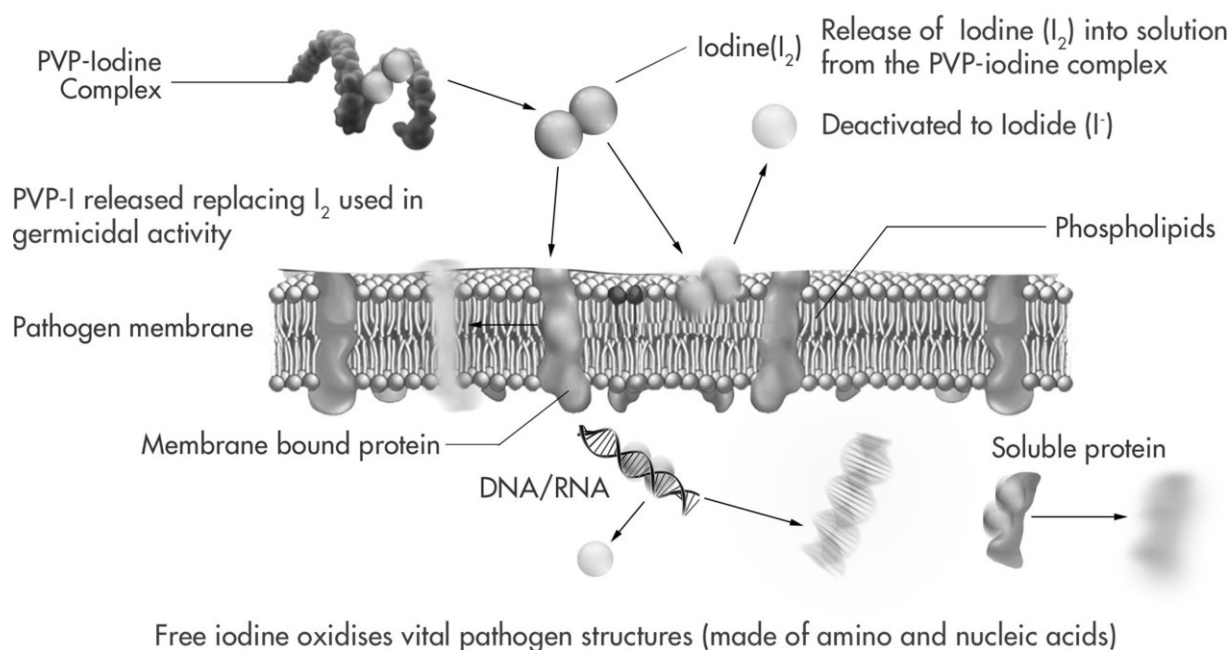
Povidon jod (PVP-I) je syntetický polymer polyvinylpyrrolidon, který tvoří komplex s elementárním jodem. Jod se uvolňuje ve vlhkém prostředí, snižuje zánět, aktivitu bakterií a proteázovou aktivitu. Je dostupný ve formě vodných a alkoholových roztoků (10% PVP-I), krémů (10% PVP-I) a suchých práškových sprejů (2,5 %PVP-I) (Durani & Leaper, 2008; Punjataewakupt et al., 2019).

Kadexomer jod (CI) se skládá z mikrokuliček hydrofilně modifikovaného škrobu, který vytváří vazby s etherovými můstky a jodem. Kadexomerové kuličky absorbují exsudát z rány a pomalu uvolňují nízkou koncentraci jodu (0,9 %w/w) za účelem kontroly infekce (Noda et al., 2009; Ohtani et al., 2007; Punjataewakupt et al., 2019; Zhou et al., 2002). Tato aktivita CI byla potvrzena studií, ve které detekovali mikroorganismy uvnitř perliček kadexomeru (Zhou et al., 2002).

### 4.1 Antimikrobiální mechanismus působení jodu

Jod je pro mikroorganismy toxický zejména tím, že se ireversibilně váže na tyrosinové skupiny proteinů a narušuje vodíkové vazby u některých aminokyselin a nukleových kyselin (Balin & Pratt, 2002; Leaper & Durani, 2008; Noda et al., 2009; Percival et al., 2010; Woo, 2014). Vazbou na sulfadiolové nebo thiolové skupiny oxiduje a denaturuje proteiny a inaktivuje enzymy viz obr. 3. (Bigliardi et al., 2017; Percival et al., 2010; Woo, 2014). Strukturální změny proteinů a

enzymů mají negativní vliv nejen na cytoplasmatické složky, ale i na mikrobiální buněčnou stěnu a membránu (Percival et al., 2010). Je také schopný reagovat s nenasycenými uhlíkovými vazbami a destabilizovat tak mastné kyseliny nacházejícími se v cytoplasmě i cytoplasmatické membráně (Leaper & Durani, 2008; McDonnell & Russell, 1999; Percival et al., 2010). Tyto oxidační reakce mají negativní efekt na mitózu a buněčný metabolismus a nakonec vedou k buněčné smrti (Woo, 2014). Jod je jak baktericidní, tak bakteriostatický a působí proti G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriím, plísním, kvasinkám, virům i některým sporám (Durani & Leaper, 2008; McDonnell & Russell, 1999; Percival et al., 2010; Punjataewakupt et al., 2019). Mechanismus působení jodu na viry není přesně znám, ale předpokládá se, že lipidy obalené viry jsou citlivější než neobalené a parvoviry (Durani & Leaper, 2008; McDonnell & Russell, 1999). Rodeheaver a kol. zaznamenali signifikantní redukci bakterií v ráně během 10 minut po aplikaci PVP-I, jod tedy působí toxicky na bakterie velmi rychle (Rodeheaver et al., 1982). Jod hraje přirozenou roli v imunitním systému těla a jako halogenid je nezbytný pro činnost neutrofilů a je výhodným substrátem myeloperoxidázy. Peroxidový systém ve fagozómech v azurofilních granulích leukocytů způsobuje denaturaci bakteriální buněčné membrány (Thomas et al., 1983). Tato antimikrobiální vlastnost by mohla zlepšovat hojení ran zprostředkované jodovými přípravky (Zhou et al., 2002). Dle König a kol. PVP-I inhibuje také tvorbu a uvolňování bakteriálních exotoxinů ( $\alpha$ -hemoysin, fosfolipázu – C a lipázu produkující během růstu bakterií) a inaktivuje bakteriální enzymy elastáza a  $\beta$ -glukuronidáza (König et al., 1997).



Obrázek 3. Působení PVP-I a volného jodu na buňku. Jod ( $I_2$ ) se uvolňuje z komplexu PVP-I. Reaguje s fosfolipidy na membráně a transmembránovými proteiny. Oxidací mastných kyselin a nukleotidů deaktivují DNA/RNA a proteiny (Bigliardi et al., 2017).

## 4.2 Cytotoxicita jodu

### ***In vitro* PVP-I:**

Bylo provedeno mnoho *in vitro* studií dokazujících vážnou cytotoxicitu PVP-I i ve vysoce naředěných roztocích vůči buněčným kulturám fibroblastů lidské kůže. Například Balin a Pratt popsali cytotoxicitu PVP-I na fibroblastech a keratinocytech, kdy po 24 hodinách inkubace buněk s PVP-I v koncentraci 0,01 a 0,025 % jod způsobil zpomalení růstu fibroblastů a v koncentraci > 0,1 % zcela eliminoval fibroblastovou mitotickou aktivitu a proliferaci buněk (Balin & Pratt, 2002). Na konci sedmého dne nebyl žádný fibroblast životaschopný v přítomnosti 1% PVP-I. Oproti

tomu Rabenberg a kol. však uvádí, že 1% koncentrace PVP-I je pro fibroblasty bezpečná a zároveň si zachovává antimikrobiální účinky. Jako cytotoxickou koncentraci PVP-I značil až koncentraci roztoku PVP-I 2 % (Rabenberg et al., 2002). Van Meurs a kol. v *in vitro* studii potvrdili cytotoxicitu 0,01% PVP-I po dvou hodinách proti fibroblastům a navíc i mezenchymálním stromálním buňkám (van Meurs et al., 2014). Autoři také uvádí, že při koncentraci < 0,1 % byl PVP-I baktericidní a určitá životaschopnost buněk byla zachována. Autoři této studie se domnívají, že PVP-I je optimálním antiseptikem pro další zkoumání, jelikož ředění od koncentrace 0,13 % zaručeně vede k nižší konečné cytotoxicitě. Jejich testy životaschopnosti buněk ukázaly, že PVP-I má velmi nízkou cytotoxicitu ve srovnání s jinými antiseptiky (PHMB, OCT, CHX) při testování na kůži (van Meurs et al., 2014). V této analýze použili mnohem vyšší počáteční bakteriální koncentraci, než je očekávané v běžně vyskytujících se kontaminovaných ranách, to mohlo způsobit nadhodnocení minimální baktericidní koncentrace, které by bylo přítomno v klinickém kontextu. Další *in vitro* experiment provedený Hirschem a kol. prokázal, že 0,3 – 0,5 % PVP-I ovlivnil životaschopnost lidských fibroblastů a keratinocytů po pěti minutách a v tomto testu naopak spolu s OCT přípravkem byl signifikantně více toxické ve srovnání s PHMB přípravky (Hirsch et al., 2010). Výsledky Sato a kol. dokazují, že PVP-I je toxický pro epitelové buňky při nižší koncentraci než jsou koncentrace používané klinicky (Sato et al., 2014). V této studii bylo také zjištěno, že vystavení tkáně vysoké koncentraci PVP-I způsobuje nekrózu, ale vystavení nízké koncentraci (0,00002 %) PVP-I způsobuje apoptózu.

Van den Broek a kol. zjistili, že roztok PVP-I v klinicky používaných koncentracích (0,1 % - 20%) jsou toxické pro granulocyty (> 0,05%) a monocyty (1%) v závislosti na dávce již po 15 min (Van den Broek et al., 1982). V testu provedeném Wagnerem a kol. 0,05% PVP-I při inkubaci 30 minut nepoškozoval krevní buňky. Metabolismus buněk byl ovlivněn 1% a 10% PVP-I, což bylo charakterizováno snížením aktivity glutationu a superoxidodismutázy. Pro erythrocyty a granulocyty byla toxická koncentrace 10 % PVP-I po dvou hodinách a 1 % po jedné hodině pro lymfocyty (Wagner et al., 2004). Účinky topických antimikrobiálních látek na lidské neutrofile porovnávali Hansbrough a kol., PVP-I v koncentraci 5 % nebo nižší inhiboval neutrofilní oxidativní vzplanutí, které hraje důležitou roli při usmrcování mikroorganismů (Hansbrough et al., 1991). Köning a kol. zjistili, že PVP-I napomáhá hojení rány inaktivací tkáňově destruktivních enzymů a cytokinů produkovaných granulocyty. Působí protizánětlivě inhibičním účinkem na lidské zánětlivé efektorové buňky a mediátory zánětu, jako je TNF- $\alpha$  a  $\beta$ -galaktosidáza (König et al., 1997). Protizánětlivou schopnost PVP-I potvrdili i Beukelman a kol., kteří prokázali, že PVP-I inhibuje produkci ROS polymorfonukleárními neutrofilemi, aktivitu mastocytů a také snižuje superoxidové anionty (Beukelman et al., 2008). Z důkazů *in vitro* vyplývá, že také působí multifaktoriálně proti zánětu vyvolanému reakcí hostitele (Beukelman et al., 2008; Bigliardi et al., 2017; König et al., 1997; Leaper & Durani, 2008).

### ***In vivo* PVP-I:**

Několik klinických studií prokázalo, že dlouhodobé působení roztoků jodu na lidské kůži způsobuje podráždění kůže nebo vzácně i závažné kožní reakce (Lamme et al., 1998; Müller & Kramer, 2008; Viljanto, 1980; Woo, 2014). To je v souladu s výzkumem Marquardta a kol., kteří v HETCAM testu ukázali, že PVP-I i CI způsobuje významné vaskulární podráždění (Marquardt et al., 2010). Bylo hlášeno několik případů, kdy se v klinické praxi vyskytla jodem indukovaná nefrotoxicita u pacientů s rozsáhlými popáleninami, která může vést k akutnímu poškození ledvin, často ve formě tubulární nekrózy (Aiba et al., 1999; Perrin et al., 2012). Selhání ledvin způsobené systémovou toxicitou po používání topického PVP-I je však vzácné. Některé studie nežádoucí účinky jodu na kůži však neukázaly (Daróczy, 2002; Fumal et al., 2002; Lamme et al., 1998; Vogt et al., 2001). Kapur a kol. také při léčbě PVP-I u pacientů



nezaznamenali alergické příznaky, nefrototoxicitu ani hepatotoxicitu, ale pozorovali mírné podráždění a bolest zejména u pacientů s popáleninami (Kapur & Marwaha, 2011) a Pandey a kol. pozorovali alergickou reakci u 4 % pacientů (Pandey et al., 2011) .

V *in vivo* výzkumu provedeném Vogtem a kol. PVP-I v kombinaci s liposomálním hydrogelem prokazatelně zvyšoval rychlost epitelizace (Vogt et al., 2001). Podpora hojení rány PVP-I byla také pozorováno ve srovnávací studii obvazů Fumala a kol. (Fumal et al., 2002). PVP-I navíc zapříčinil snížení množství bakterií a zánětlivých buněk. V porovnání s SSD a CHX se PVP-I jevil jako nejúčinnější antiseptická sloučenina. Většina *in vivo* studií na chronických ranách prokázala, že koncentrace do 10 % obecně neinhibují procesy granulace a epitelizace (Bigliardi et al., 2017; Kanno et al., 2016; van Meurs et al., 2014; Vermeulen et al., 2010; Woo, 2014). Topická aplikace jodového roztoku a masti s PVP-I způsobila snížení bakteriální infekce a otoku; ve srovnání s kontrolou však hloubka a velikosti ran nebyly sníženy (Daróczy, 2002). V průběhu léčby navíc nebyla pozorována podráždění. V pozdější studii *in vivo* Daróczy porovnávala vliv PVP-I a PVP-I v kombinaci s kompresními obvazy a se systémovými antibiotiky a není překvapením, že komprese zvýšila rychlost hojení chronických ran. Snížení bakteriální zátěže ran bylo po pěti měsících vyšší u pacientů léčených samotným PVP-I než systémovými antibiotiky (Daróczy, 2006). Naproti tomu v jiné klinické studii PVP-I způsobil po 10 dnech nekrózu a otok tkáně i endotelů cév následované migrací leukocytů stěnou cév (Daeschlein et al., 2007). Woo pozoroval u pacientů s pravidelnou aplikací 10% PVP-I na chronické rány po šesti měsících plné zhojení jen u 29 % ran a u dalších 45 % ran jen částečnou epitelizaci (Woo, 2014). Navíc se u pacientů objevilo přechodné pálení a podráždění kůže nebo alergická dermatitida. Wang a kol. testovali 0,5% PVP-I *in vivo* na akutních ranách krys, které se zhojily do 14 dnů. Byla pozorována signifikantně rychlejší reepitelizace a granulace vlivem PVP-I a zvýšená neovaskularizace (nárůst hematopoetických progenitorových buněk CD34+). PVP-I také zvýšil expresi markeru diferenciacie epitelových buněk (filaggrinu) a TGF- $\beta$  (Wang et al., 2017).

### ***In vitro* CI:**

Zhou a kol. v *in vitro* studii prokázali, že je CI cytotoxický vůči lidským dermálním fibroblastům, koncentrace nad 0,45 % způsoboval inhibici růstu a ztrátu pseudopodií. Zkoumali také vliv CI na schopnost fibroblastů produkovat kolagen a zjistili, že v koncentracích 0,45 a 0,7 % změnu nezpůsobuje (Zhou et al., 2002). Ohtani a kol. však zjistili přínosy CI pro hojení ran. Studovali efekt kadexomer jodu i kadexomeru samotného na lidské makrofágy. Jejich výsledky dokazují, že CI zvyšuje expresi IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  a VEGF mRNA v koncentraci do 0,45 %, zatímco neovlivňoval mRNA IL-6, IL-10, IL-12p40 nebo fibroblastový růstový faktor. Na myši kožní ráně prokázali zvýšenou produkci VEGF makrofágy. Tato studie tedy naznačuje, že jod uvolňovaný z kadexomeru může hrát důležitou roli při hojení ran zvýšením zánětu a angiogeneze prostřednictvím přímo stimulujících tkáňových makrofágů (Ohtani et al., 2007). Toto tvrzení částečně potvrzuje i Moore a kol., kteří pozorovali lokalizovanou produkci prozánětlivých cytokinů (zejména TNF- $\alpha$ ) v lidských makrofázích (stimulovaných bakteriálními lipopolysacharidy) indukovanou elementárním jodem uvolňovaným do prostředí. V této studii rovněž autoři uvádí, že toxicita vůči buňkám nastává v přítomnosti více než 0,0045 % jodu, jelikož jejich testu samotný kadexomer prokázal jen mírnou toxicitu ve 2 % (Moore et al., 1997).

### ***In vivo* CI:**

Lamme a kol. v *in vivo* studii na zvířecích ranách poukazují na pozitivní vliv CI na epitelizaci kůže bez negativních účinků na tvorbu granulační tkáně, neovaskularizaci nebo kontrakci ran (Lamme et al., 1998). V klinické studii Zhou a kol. CI po dvou týdnech nezpůsobil nekrózu buněk a tkáň vykazovala výrazné zlepšení zvýšenou reepitelizací, tvorbou granulační tkáně a se sníženým exsudátem. Rány se plně zhojily po třech měsících (Zhou et al., 2002).

Účinnost jodu může být snížena exsudátem rány (Durani & Leaper, 2008; Zamora, 1986), výsledky cytotoxicity a antimikrobiálních účinků se tak mohou výrazně lišit mezi *in vitro* a *in vivo* testy. Noda a kol. zkoumali reaktivitu mastí PVP-I a CI s biologickými složkami a výsledkem bylo, že reakce jodu s exsudáty rány je dvojnásobně vyšší u PVP-I než u CI, antimikrobiální účinek CI trvá tedy déle. Vzhledem k delší reaktivitě jodu s lipidovými složkami, může být CI mast více cytotoxická pro tkáň. CI během 24 hodin vykazoval 2,9krát vyšší absorpční kapacitu vody. (Noda et al., 2009). Z toho vyplývá, že PVP-I a CI působí na hojení a cytotoxicitu rozdílným způsobem.

Příkladem terapeutik obsahující jod je Betadine s 10% PVP-I a z toho je 1 % elementární jod nebo Jodosorb s 0,9% jodu. Z antiseptických látek jsou v současné době účinky jodu nejlépe zdokumentovány, ale je potřeba dalších kontrolovaných klinických studií, protože dosavadní výsledky *in vivo* se neshodují se škodlivými účinky jodu na hojení dokázané testy *in vitro*. Cytotoxické koncentrace *in vitro* jsou v rozsahu 0,001 – 10 %, většina *in vivo* testů prokázala příznivé účinky do koncentrace 10 %, jiné však v této koncentraci neprokázaly vliv žádný.

## 5 Chlor

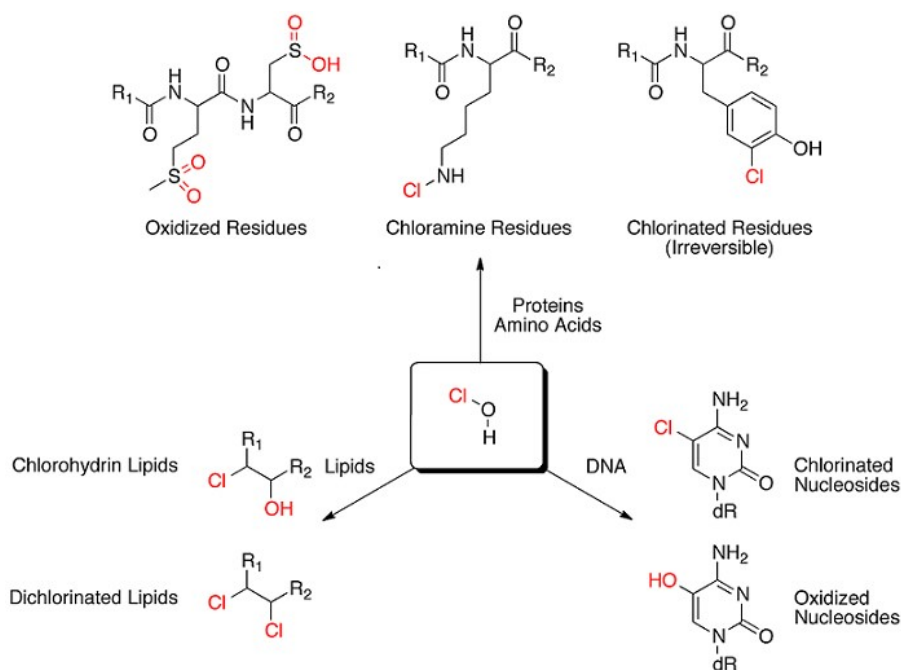
Chlor se pro své dezinfekční vlastnosti používá v lékařských a komerčních prostředcích od 18. století, včetně lokálního použití v medicíně jako antiseptikum (Peck et al., 2011). Nejdůležitější látky obsahující aktivní chlor jsou chlornan sodný (NaOCl), oxid chloričitý, kyselina chlorná (HOCl) a N-chlorové sloučeniny (chloraminy, chloramidy a chlorimidy) jako je například dichlorisokyanurát sodný, N-chlorotaurin (NCT) a chloramin-T (CAT). Dichlorisokyanurát sodný poskytuje vyšší koncentraci dostupného chloru a je méně náchylný k inaktivaci organickými látkami než NaOCl (McDonnell & Russell, 1999). NaOCl se ve vodě ionizuje a uvolňuje  $\text{Na}^+$  a chlornanový iont ( $\text{OCl}^-$ ) (McDonnell & Russell, 1999), nebo vytváří vysoce reaktivní HOCl, která se dále dělí na kyselinu chlorovodíkovou a superoxidové radikály ( $\text{HOCl} \rightarrow \text{HCl} + \text{O}^*$ ) (Peck et al., 2011; Ponzano, 2007).  $\text{OCl}^-$  má nižší antimikrobiální aktivitu ve srovnání s HOCl, chlorová antiseptika jsou tudíž nejúčinnější při nejvyšší koncentraci HOCl (McDonnell & Russell, 1999).

Roztok chlornanu sodného NaOCl (známý taky jako Dakinův roztok) zavedl v roce 1915 Henry Dakin do lokálních antiseptik na rány v koncentracích 0,5 % a v první světové válce byl nejpoužívanější antibakteriální činidlo (Kozol et al., 1988; Punjataewakupt et al., 2019). Je to alkalický roztok, který je schopný v koncentraci mezi 0,5 % až 5,25 % usmrtit bakterie a rozpustit nekrotickou tkáň (Ponzano, 2007). N-chlorotaurin je derivát aminokyseliny taurinu produkovaný aktivovanými lidskými granulocyty a monocyty. HOCl vzniká enzymaticky katalyzovanou kaskádou ( $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HOCl}$ ) oxidativního vzplanutí aktivovaných neutrofilů a je dále detoxifikována reakcí s taurinem za vzniku NCT ( $\text{HOCl} + \text{taurine} \rightarrow \text{NCT} + \text{H}_2\text{O}$ ) (Gottardi & Nagl, 2010; Nagl & Gottardi, 1998; Test et al., 1984). NCT přispívá k zánětlivé odpovědi snížením produkce prozánětlivých cytokinů a IL. (Nagl et al. 2018). Bylo zjištěno, že NCT má antikoagulační aktivitu, protože oxiduje fibrinogen, faktor V, VIII a X (Stief et al., 2000). Vzhledem k tomu, že taurin i chlor se běžně vyskytují v savcích organismech, výskyt alergické reakce je nepravděpodobný (Gottardi & Nagl, 2010).

### 5.1 Antimikrobiální mechanismus působení chloru

Chlor je díky oxidativní aktivitě baktericidní, fungicidní, sporucidní i virucidní (Cardile et al., 2014; Hidalgo et al., 2002; McDonnell & Russell, 1999; Punjataewakupt et al., 2019). Mikrobicidní aktivita je zvýšená v přítomnosti bílkovin v důsledku transhalogenace a transchlorace, kdy je část aktivního chloru přenesena na nízkomolekulární

aminosloučeniny nebo aminokyseliny jak patogenů, tak lidského těla, vedoucí k tvorbě monochloraminu viz obr. 4. (Gottardi & Nagl, 2010; Nagl & Gottardi, 1998) a poškození buněčné aktivity proteinů (Percival et al., 2010). HOCl a chloraminy také reagují s nukleotidy a lipidy. Vzniklé radikály podporují peroxidaci volných lipidů ve fosfolipidových membránách, tím zvyšují její permeabilitu (Panasencko, 1997). NaOCl proniká do buněčné membrány, reaguje s enzymy a narušuje oxidativní fosforylaci a další aktivitu spojenou s funkcí biologických membrán (McDonnell & Russell, 1999). Uvnitř buněk ionizací NaOCl vzniká HOCl, který pak následně způsobuje halogenaci bakteriální buněčné stěny (Djordjević, 2004). HOCl také indukuje produkci ROS poškozením mitochondrií, po které následuje buněčná smrt (Hidalgo et al., 2002) a také se váže na primární i sekundární aminy nukleotidových bází a vytváří chlorované deriváty, které poškozují DNA (McDonnell & Russell, 1999). Chlor vytváří interakce s primárními thiolovými, aminovými i sulfhydrylovými skupinami (Percival et al., 2010) a je nejvíce aktivní při nízkém pH, kdy má velký potenciál oxidace.



Obrázek 4. Chlorace a oxidace biomolekul zprostředkovaná HOCl. HOCl reaguje s lipidy za vzniku chlorhydrinu nebo dichlorinátů, Vazbou HOCl s nukleosidy nebo aminokyselinami vznikají chloraminy, chlorinátové nebo oxidové zbytky (“Nebraska redox biology center educational portal,” n.d.)

## 5.2 Cytotoxicita chloru

### HOCl a její sůl NaOCl *in vitro*:

V biologických systémech *in vivo* může být HOCl generován oxidací chloridových iontů peroxidem vodíku a v reakci katalyzované MMP, která je uvolňována, stejně jako H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aktivními fagocyty (neutrofilů a monocytů) v místě zánětu. HOCl jako nukleofilní radikálový oxidant působí proti patogenům (Djordjević, 2004; Hidalgo et al., 2002; Hidalgo & Dominguez, 2000; Pullar et al., 2000), ale nadměrné množství může způsobit rozsáhlé poškození biologických systémů v důsledku schopnosti HOCl proniknout buněčnou membránou a reagovat s intracelulárními složkami (Pullar et al., 2000), zároveň savčí buňky nemohou působit proti jeho toxickému účinku, protože postrádají enzymy potřebné pro katalytickou detoxifikaci (Hidalgo et al., 2002; Lapenna & Cucurullo, 1996). Toxicita NaOCl je koncentračně i časově závislá (Hidalgo et al., 2002). Indukuje mimo jiné hemolýzu modifikací membránových proteinů (Peck et al., 2011).



Cytotoxický efekt NaOCl na fibroblasty byl prokázán mnoha studii, ale ve stanovení cytotoxické koncentrace se značně liší. Lineaweaver a kol. za bezpečnou koncentraci pro debridementní, topicky aplikovanou antiseptickou látku označili 0,005 %, která v této studii nevykazovala cytotoxicitu vůči lidským fibroblastům a stále si zachovala antibakteriální aktivitu (Lineaweaver et al., 1985). Životaschopnost fibroblastů ovlivnila koncentrace 0,025 %. Překvapivě nízká bezpečná koncentrace kontrastuje až se stonásobně vyšší koncentrací NaOCl používanou v Dakinově roztoku za první světové války. Hegggers a kol., kteří studovali *in vivo* i *in vitro* vliv NaOCl na myších fibroblastech, jako necytotoxickou koncentraci pro fibroblasty a baktericidní i pro G<sup>-</sup> bakterie stanovili koncentraci 0,025 %, která je v rozporu s Lineaweaverem a kol. (Hegggers et al., 1991). V dalším *in vitro* výzkumu Kozol a kol. pozorovali značné poškození králičích fibroblastů při 0,00025% NaOCl a endotelových buněk při 0,0025 % již po 30 minutách charakterizované mitochondriálním otokem, cytoplazmatickou vakuolizací, spletenými jádry a dilatovaným ER (Kozol et al., 1988). Výsledky studie Vicka a kol. dokazují, že roztok NaOCl má vliv na degradaci kolagenu a migraci fibroblastů. Bezpečná koncentrace zde byla 0,0125 %. Cytotoxické účinky závisely na době expozice, teplotě a nepřítomnosti nebo přítomnosti séra v experimentu. Časová závislost cytotoxicity byla zaznamenána v koncentracích 0,0125 % a 0,025 % (Vick et al., 2009).

Hidalgo a Dominguez ve své publikaci ukázali, že nižší koncentrace roztoků chlornanu mezi 0,005% a 0,00025% nemají žádný inhibiční účinek a jsou pro fibroblasty mitogenní (Hidalgo & Dominguez, 2000). Rovněž zjistili, že koncentrace  $\geq 0,01$  % vyvolala ztrátu buněčné adherence k povrchu a způsobila mitochondriální dysfunkci fibroblastů. Schopnost NaOCl poškozovat mitochondrie potvrdili ve své pozdější studii *in vitro* a prokázali, že NaOCl má vliv na depleci intracelulárního ATP ve fibroblastech závislé na dávce a čase (Hidalgo et al., 2002). Významné snížení mitochondriální funkce fibroblastů a ztráta buněčného obsahu ATP nastalo při 0,0075 % po osmi hodinách, ale smrt všech buněk však nastala až při 0,05 %. Hidalgo a Dominguez také tvrdí, že 2 - 10% FBS nemá vliv na adherenci fibroblastů nebo ztrátu obsahu celkového buněčného proteinu po expozici chlorového roztoku, ale při měření mitochondriální aktivity fibroblastů přidání 10% FBS způsobilo výrazné snížení cytotoxického účinku chlornanu sodného. FBS také zesiluje mitogenní účinek, který se dosahuje při velmi nízkých koncentracích NaOCl (Hidalgo et al., 2002; Hidalgo & Dominguez, 2000). V jiné studii fibroblasty tolerovaly až 0,01% NaOCl za přítomnosti séra a kolagenu (Vick et al., 2009).

Kozol a kol. ve své *in vitro* studii prokázali, že při velmi nízké koncentraci (0,00025 %) NaOCl dokáže inhibovat leukocytární chemotaxi, ale nevede k buněčné smrti. Chlor inaktivuje chemotaktický faktor oxidací skupiny síry na methioninu, leukocyty tak nejsou schopny migrovat a nemohou být aktivovány k uvolňování lyzozomálních enzymů a metabolitů kyslíku v místě rány (Kozol et al., 1988). Další studie dokázaly negativní vliv NaOCl na makrofágy, například snížením jejich schopnosti adherence k substrátu (IC<sub>50</sub> po 15 min byla 0,22 %) (Segura et al., 1999). Výsledky Cardile a kol. dokázaly, že koncentrace 0,025 - 0,25% roztoku NaOCl poškodila funkci myších makrofágů následovaná buněčnou smrtí. To může mít za následek zhoršení obrany proti patogenům a opoždění hojení ran. Naopak nižší koncentrace NaOCl ( $>0,0025$  %) způsobila významné změny v morfologii a genové expresi makrofágů a zvýšila se jejich schopnost adherence (Cardile et al., 2014). Chlornan sodný je cytotoxický také proti neutrofilním buňkám již v koncentraci 0,25 % (Hansbrough et al., 1991).

### **N-chlorné deriváty *in vitro***

Nagl a kol. porovnávali CAT a NCT *in vivo* a *in vitro* a testy cytotoxicity pro epidermální lidské keratinocyty prokázaly toxicitu při 0,01% NCT a 0,1% CAT (Nagl et al., 2003). Navíc koncentrace CAT tolerované buňkami byly

10 - 100násobně nižší (0,001 - 0,0001 %) než u NCT (0,01 %). Kontny a kol. zjistili, že NCT (0,00005 %) inhibuje spontánní proliferaci fibroblastových synoviálních buněk i proliferaci spouštěnou rekombinantním fibroblastovým růstovým faktorem způsobem závislým na dávce. NCT, ale nikoli taurin, také inhiboval produkci protizánětlivých cytokinů (interleukin-6 (IL-6), TNF  $\alpha$ ). Taurin ani NCT do 500uM neovlivnily životaschopnost buněk (Kontny et al., 1999). Inhibice produkce cytokinů indukovanou NCT byla prokázána i dalšími studiemi na myších dendritických buňkách (v koncentraci  $0,1 \times 10^{-4}$  a  $0,44 \times 10^{-5}$  %) či lidských lymfocytech (0,057 %) v závislosti na dávce (Marcinkiewicz et al., 1999; E. Park et al., 2002). NCT při  $0,1 \times 10^{-4}$  % v testu Parka a kol. signifikantně inhiboval také proliferaci lymfocytů, ale životaschopnost buněk v tomto experimentu ovlivněna nebyla (E. Park et al., 2002).

Tatsumi a Fliss na bovinních aortálních endotelech zjistili, že HOCl nebo chloramin, ale nikoli NCT, způsobily reverzibilní zkrácení cytoskeletálních aktinových mikrovláken, retrakci buněk a zvýšenou permeabilitu během dvou minut. Tyto účinky byly doprovázeny zvýšením intracelulární koncentrace zinku, oxidací intracelulárního glutationu a proteinových sulfhydrylů. HOCl i chloraminů, ale nikoliv NCT, také zvýšily mikrovaskulární permeabilitu v izolovaných perfundovaných krysích plicích (Tatsumi & Fliss, 1994).

#### **HOCl a její sůl NaOCl *in vivo*:**

Podle některých studií *in vitro* cytotoxicity mají nízké koncentrace NaOCl (0,0025 %) v klinické praxi minimální cytotoxický vliv na tkáň (Hegggers et al., 1991; Peck et al., 2011). Ve studiích *in vivo* Heggerse a kol. a Lineaweavera a kol. NaOCl v koncentracích do 0,25 % neovlivnil životaschopnost epitelálních buněk, pevnost v tahu a reepitelizaci myších či krysích infikovaných ran (Hegggers et al., 1991; Lineaweaver et al., 1985). V klinickém výzkumu NaOCl/HOCl v koncentraci 0,006% a kombinaci s oxidovanou vodou urychlil hojení chronických ran a popálenin zvýšenou tvorbou granulace a fibrinu a také výrazně zlepšil reepitelizaci (Kapur & Marwaha, 2011). Autoři uvádí, že léčba NaOCl/HOCl poskytla lepší účinnost proti bakteriím a dřívější odstranění příznaků zánětu, jako je otok a začervenání okolí rány ve srovnání s PVP-I. Nebyly zde pozorovány žádné systémové ani lokální alergické reakce. I v dalších *in vivo* experimentech bylo prokázáno dřívější zhojení chronických ran vlivem 0,004 – 0,008% HOCl ve srovnání s PVP-I doprovázené redukcí zápachu i bolesti (Niezgoda et al., 2010; Pandey et al., 2011; Piaggese et al., 2010). V těchto koncentracích HOCl vykazoval signifikantně lepší výsledky i v porovnání s kontrolou (Hadi et al., 2007; Selkon et al., 2006). Pandey a kol. pozorovali alergické reakce u 2 % testovaných pacientů s chronickými ranami (Pandey et al., 2011).

#### **N-chlorné deriváty *in vivo*:**

Nagl a kol. ve svém klinickém testu prokázali, že pro léčbu chronických ran je lepší 1% NCT než 1% CAT, protože signifikantně snížil intenzitu bolesti a také granulace tkáně i reepitelizace ran se objevila významně dříve (Nagl et al., 2003).

Výsledné cytotoxické koncentrace testů *in vitro* jsou velmi rozdílné a pohybují se v rozmezí 0,0025 – 0,5 %, v klinických testech však 0,25% NaOCl neprojevila negativní účinek na hojení ran. Hegggers a kol. uvádí, že testy *in vitro* jsou nedostatečné pro poskytnutí úplného obrazu procesu hojení ran a mohou být tedy zavádějící (Hegggers et al., 1991). Rozdíly mezi *in vitro* a *in vivo* výzkumy jsou s největší pravděpodobností zapříčiněny tím, že prostředí rány je složeno z mnoha typů buněk přispívajících k procesu hojení a plazmatických složek, které poskytují ochranné látky nebo mechanismy neutralizující toxické účinky NaOCl. Proto je pro účinnost *in vivo* potřeba vyšší koncentrace antimikrobiálního činidla (Cardile et al., 2014).

## 6 Oktenidin

Jako antiseptický přípravek se oktenidin dihydrochlorid začal používat teprve před 20 lety. Na rány se používá ve formě gelů, mastí a krycích obvazů. Je to kationtová povrchově aktivní látka, která je stabilní v prostředí pH od 1,6 do 12,2 i při expozici světla (Hübner et al., 2010; Stahl et al., 2010). Obsahuje dvě neinteragující kation-aktivní centra oddělená dlouhými alifatickými uhlovodíkovými řetězci, kterými se snadno váže na negativně nabitě povrchy, jako jsou například mikrobiální buněčné stěny nebo eukaryotické membrány. Pro antisepsi na rány a sliznici se používá kombinace OCT s fenoxoethanolem (PE) jako vodný roztok nebo kombinace obou forem s alifatickými alkoholy nebo glycerolem a detergenty bez PE. (Hübner et al., 2010).

### 6.1 Antimikrobiální mechanismus působení OCT

Díky pozitivně nabitým centrům a hydrofobním řetězcům se OCT snadno váže na buněčné stěny a membrány bakterií, které se tak destabilizují a vedou k smrti buněk (Gilbert & Moore, 2005; Hübner et al., 2010; Kodedová et al., 2011). OCT působí velmi rychle, depolarizuje nebo úplně permeabilizuje membrány mikroorganismů do 15 minut a je účinný i při nízkých koncentracích (0,005 %) (Kodedová et al., 2011). Předpokládá se, že OCT interaguje se solemi glycerolových fosfátů mastných kyselin, které se nacházejí v buněčných membránách (Gilbert & Moore, 2005) a snižuje její permeabilitu. Vytváří vazby s proteiny a polysacharidy v buněčné stěně mikroorganismů a tím se indukuje únik cytoplazmatických složek (Ghannoum' et al., 1990; Hübner et al., 2010). Díky těmto vlastnostem a svou silnou nespecifickou absorpcí je OCT účinné proti širokému spektru  $G^+$  i  $G^-$  bakteriím a plísním. OCT také působí proti obaleným virům, ale nemá žádnou účinnost proti hydrofilním, neobaleným virům, jako jsou adenoviry (Tandjung et al., 2007) nebo sporům (Hübner et al., 2010).

### 6.2 Cytotoxicita OCT

OCT může také tvořit interakce s lipofilními látkami a fosfolipidy lidských a savčích buněčných membrán. Studie prokázaly, že se OCT snadno váže na povrch myších fibroblastů, lidských epitelálních buněk a primárních keratinocytů a vytváří s nimi velmi stabilní komplexy. Cytotoxický účinek OCT je v těchto komplexech značně redukován, ale antibakteriální aktivita je nezměněna a není ani ovlivněna 10% FBS (Müller & Kramer, 2008).

#### ***In vitro:***

Van Meurs a kol. ve svém experimentu zjistili, že OCT po dvou hodinách snižuje životaschopnost mezenchymálních stomatálních buněk již v koncentraci 0,0001 % a fibroblastů při 0,001 % OCT (van Meurs et al., 2014). Autoři také uvádí, že OCT je účinný proti bakteriím při 0,0033 %. Müller a Kramer zaznamenali 50 % usmrcených myších fibroblastů po 30 min inkubaci v 0,002 – 0,0038% OCT a minimální účinná antimikrobiální koncentrace byla stanovena 0,0022 % (Müller & Kramer, 2006, 2008). Cytotoxicita vůči keratinocytům byla prokázána Müllerem a kol. po 24 h vlivem 0,1% OCT (Müller et al., 2014). Schmidt a kol. použili stejnou koncentraci a prokázali její okamžitou toxicitu již po jedné minutě pro gingivální fibroblasty a nosní epitely (Schmidt et al., 2015). V této studii vykazoval OCT menší negativní vliv na buňku ve srovnání s CHX a stejný vliv jako PVP-I. Výsledky Wagnera a kol. ukazují, že koncentrace do 0,05 % po dobu 30 minut jsou bezpečné pro krevní buňky. Hemolýza byla pozorována až při 10 % OCT. Vedle cytotoxicity autoři zaznamenali vedlejší metabolické poruchy leukocytů, granulocytů a erytrocytů při 10% OCT po 60 min, jako je snížení aktivity glutationu a superoxiddismutázy (Wagner et al., 2004).

### ***In vivo:***

Na prasečí kůži *ex vivo* bylo prokázáno Stahlem a kol., že intaktní kůži se 0,1% OCT nevstřebává a propustnost OCT porušenou kůží je jen velmi nízká (Stahl et al., 2010). Po 28 hodinách detekovali v akceptorové komoře OCT v množství 6,28  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (0,6 %) z použitých 2000  $\mu\text{g}$  OCT. PE proniká intaktní prasečí kůží v množství 11,3 % a bariérově narušenou kůží v množství 43,9 %. Na základě těchto výsledků se neočekává žádná toxicita OCT indukovaná systémovou absorpcí. Naproti tomu Marquardt a kol. poukázali na to, že OCT je v klinicky používané koncentraci 0,1 % toxický pro tkáň zejména podrážděním cév (Marquardt et al., 2010). V jejich HETCAM testu bylo bezpečné zředění až 1:1000. Kramer a kol. zkoumali vliv OCT na prasečí aseptické rány a výsledkem bylo zjištění, že OCT výrazně zpomaluje proces reepitelizace v rané fázi hojení a průměrná doba 100% zahojení ran byla 22,9 dní. V porovnání s kontrolou byla doba hojení jen o jeden den delší, zároveň ale o sedm dní delší v porovnání s PHMB (Kramer et al., 2004). Zajímavé je, že v této studii nezjistili žádné histopatologické změny, které by vysvětlovaly zpoždění hojení ran. Histologie prokázala jen zhoršenou neovaskularizaci. Tyto výsledky nejsou v souladu s dalším experimentem *in vivo* provedeném Stahlem a kol. na prasečí kůži, ve kterém epitelizace rány po léčbě 0,1% OCT kombinované s PE nebyla narušena a rychlost hojení rány nebyla signifikantně odlišná ve srovnání s PVP-I a kontrolou (Stahl et al., 2010). V této studii se také zjistilo, že zakrytí rány okluzivními obaly urychluje reepitelizaci ran, ale při použití samotného OCT bez krytí bylo zaznamenáno rychlejší odstranění zánětu. V klinické studii Vanscheidta a kol. na chronických ranách pozorovali, že OCT v kombinaci s PE významně zlepšil granulaci tkáně během 4 týdnů ve srovnání s kontrolou, ale nezaznamenali rozdíl v čase zhojení ran (Vanscheidt, et al., 2012). Topická aplikace antiseptika OCT byla tolerována tkání i po období třech měsíců s několika aplikacemi týdně, která byla potvrzena pozitivním hodnocením pacienty. Eisenbeiß a kol. v *in vivo* testu zaznamenali dobrou tkáňovou toleranci 0,05% OCT spolu s významnou antimikrobiální účinností (Eisenbeiß et al., 2012). V této studii nezjistili žádné rozdíly epitelizace v místě poranění kůže u pacientů léčených OCT ve srovnání s placebem. Hämmerle a Strohal porovnávali účinek OCT případně v kombinaci s moderními kryty ran *in vivo*. Na infekci měly obě antimikrobiální látky stejný vliv. Rány vlivem samotného 0,05% OCT vykazovaly nejvyšší snížení znaků infekce a povlaku rány a po 42 dnech došlo k úplné reepitelizaci téměř u 100 % pacientů (o 20% víc než ostatní moderní kryty) a výrazně vyšší rychlost hojení po celou dobu studie a rychlejší granulaci tkáně (Hämmerle & Strohal, 2016). Ve studii Krasowského a kol. 0,1% OCT na chronických ranách vykazovalo 6,8krát rychlejší reepitelizaci u malých ran a 19,16krát rychlejší hojení u ran větších 10  $\text{cm}^2$  ve srovnání s obvazy obsahující stříbro nižší míru bolesti a dřívější redukci mikroorganické populace v ráně (Krasowski et al., 2015). Významné snížení bolesti pacientů s popáleninami 2. stupně po vlivu OCT v porovnání s přípravkem obsahujícím SSD bylo zaznamenáno ve studii Radu a kol. (Radu et al., 2011). Sopata a kol. na neoplastických chronických ranách pozorovali redukci  $G^+$  a  $G^-$  bakterií, nekrotické tkáně, hladiny exsudátu, zarudnutí kůže, otok, snížení bolesti i zápachu vlivem 0,1% OCT po třech týdnech bez nežádoucích účinků (Sopata et al. 2008; 2013). Negativním vedlejším účinkem OCT může být kontaktní dermatitida, která se vyskytla u 11 z 251 pacientů s chronickými ranami (Calow et al., 2009).

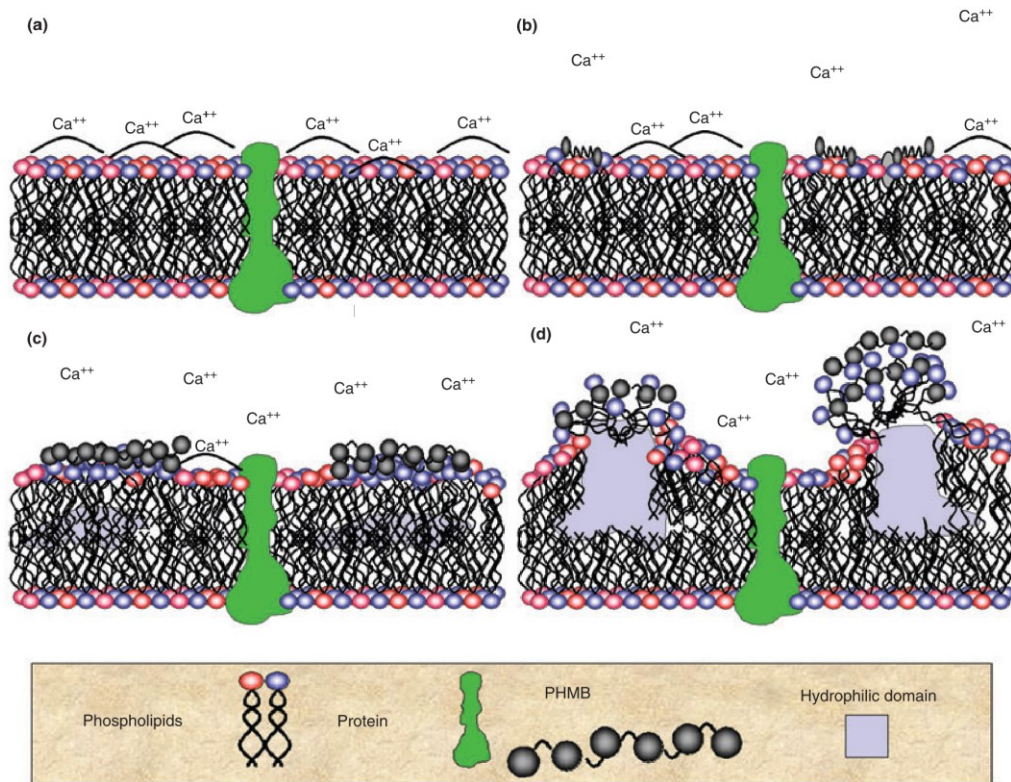
Přípravky s aktivní látkou OCT jsou například Octenilin s 0,05% OCT nebo Octisept obsahující 0,1% OCT a 2% PE. Rozdíly ve vysoké cytotoxicitě, nalezené *in vitro* (0,0001 – 0,1 %) a příznivým výsledkům klinických studií *in vivo*, by mohla vysvětlit tvorba stabilních komplexů s buňkami tkáně, která může mít příznivý vliv na snášenlivost, protože účinná látka je vystavena pouze horní vrstvě buněk a působí jako bariéra hlubší regenerační tkáně proti mikrobům. Trvalé uvolňování OCT z těchto komplexů udržuje nízké necytotoxické ale antimikrobiální koncentrace v ráně (Hübner et al., 2010).

## 7 Polyhexamethylen biguanid

Jako topické antiseptikum jej zavedl chirurg Willenegger na počátku devadesátých let (Percival et al., 2010; Roth & Brill, 2010). Kromě klinické léčby se PHMB používá v dezinfekčních prostředcích bazénů, kosmetice, konzervačních látkách na kůži, v čistících prostředcích pro kontaktní čočky, zemědělství i potravinářském průmyslu a jiných (De Paula et al., 2011; McDonnell & Russell, 1999). PHMB je kationtový a chemicky stabilní polymer, obsahuje bazické biguanidové skupiny navázané na hexamethylenové skupině (De Paula et al., 2011; Kaehn, 2010; Roth & Brill, 2010). Biguanidové zbytky jsou hydrofilní a na hydrofobních hexamethylových skupinách se nacházejí hydrofilní polární nebo iontové koncové zbytky, v důsledku toho je PHMB dobře rozpustný ve vodě i alifatických alkoholech, ale špatně rozpustný v lipidech (De Paula et al., 2011; Kaehn, 2010). V závislosti na výrobci se používají roztoky uvolňující 0,02 %, 0,04 % nebo 0,1 % PHMB, gely a obvazy s 0,1% PHMB.

### 7.1 Antimikrobiální mechanismus působení PHMB

PHMB je účinný proti G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup> bakteriím, kvasinkám, plísním a virům (Hübner & Kramer, 2010; McDonnell & Russell, 1999). Váže se na lipopolysacharidy a peptidoglykan na bakteriální buněčné stěně a negativně nabitý povrch vnější membrány poruší jejich integritu a prochází k vnitřní membráně (Percival et al., 2010). Na cytoplazmatické membráně tvoří interakce s kyselými fosfolipidy a také s membránovými proteiny, tím ovlivní transportní, biosyntetické a katabolické schopnosti (Gilbert & Moore, 2005; Ikeda et al., 1984). PHMB v membráně způsobí sekvestraci fosfolipidů do jednotlivých fosfolipidových hydrofilních domén (viz. obr. 5.) s rozdílnými vlastnostmi fázových přechodů (Broxton et al. 1983; Gilbert & Moore, 2005; McDonnell & Russell, 1999). Dezorganizací cytoplazmatické membrány zvýší její permeabilitu nejprve pro kationty (zejména K<sup>+</sup>), následně pro intracelulární bazální materiál a buňka ztratí svou integritu vedoucí k buněčné smrti (AshaRani et al., 2009; Gilbert & Moore, 2005; Hübner et al., 2010; McDonnell & Russell, 1999; Percival et al., 2010). PHMB také může tvořit interakce s nukleovými kyselinami, narušit transkripci DNA nebo ji nenávratně poškodit (Allen et al., 2006; Percival et al., 2010).



Obrázek 5. Působení PHMB na membránu. A) membrána je stabilizována dvojmocnými kationtovými ionty, b) PHMB se váže na kyselé složky membrány a vytěsňuje  $\text{Ca}^{2+}$ . C) Způsobí ztrátu fluidity membrány a sekvenci fosfolipidů do hydrofobních domén a d) případně separuje jednotlivé lipidy za vzniku hydrofilních domén, které mohou přejít ve stabilnější hexagonální uspořádání vedoucí k rozpuštění membrány (Gilbert & Moore, 2005).

## 7.2 Cytotoxicita PHMB

### *In vitro:*

Creppy a kol. zjistili, že při koncentracích 0,002 – 0,005 % se PHMB váže na plazmatickou membránu a způsobí lýzi buněk, únik enzymů, cytokinů a případně může způsobit i nekrózu buněk (v buňkách byla velmi nízká až žádná aktivita kaspázy-3 indukující apoptózu) (použili myši nervové buňky, lidský hepatocelulární karcinom a adenokarcinom tlustého střeva). Studie Yabes a kol. prokazují, že PHMB je toxický pro keratinocyty, fibroblasty a osteoblasty v závislosti na čase a koncentraci (Yabes et al., 2017). Testy cytotoxicity různých antiseptik Hirsche a kol. ukázaly, že pro fibroblasty je cytotoxická koncentrace již od 0,075 % PHMB a pro keratinocyty 0,02 % (Hirsch et al., 2010). PHMB v tomto testu vycházel nejlépe ze všech testovaných antiseptik. Müller a Kramer ve svých testech cytotoxicity stanovili koncentraci 0,0113 – 0,0152 % PHMB, která usmrtí 50 % myších fibroblastů (Müller & Kramer, 2006, 2008). V další studii van Meurs a kol. použili komerčně používanou koncentraci 0,04 %, která se v jejich testu ukázala jako antibakteriální, ale 100% cytotoxická pro lidské fibroblasty i mezenchymální stromální buňky (van Meurs et al., 2014). Navíc dokázali, že již < 0,001% koncentrace PHMB po 48 h snížila životaschopnost fibroblastů o 20 % a stromálních buněk o 50 %. Oproti tomu Vörös a kol. pozorovali časovou závislost cytotoxicity 0,04% PHMB proti osteoblastickým buňkám jen do 1 minuty od ovlivnění (Vörös et al., 2014). Stejná koncentrace PHMB způsobila smrt lidským chondrocytům již po 10 min ve studii Röhnera a kol. Jejich výsledky navíc zjistili, že buňkách dochází k inhibici syntézy proteoglykanů (Röhner et al., 2011). Wiegand a kol. kultivovali keratinocyty s prokaryotickými buňkami a ze svého pozorování zjistili, že PHMB bylo toxické při koncentraci 0,00004 % po 24 h. Zároveň tvrdí, že by PHMB mohl chránit



lidské eukaryotické buňky před bakteriálním poškozením a obnovit jejich normální proliferaci v závislosti na dávce (Wiegand et al., 2009).

### ***In vivo:***

Pro léčbu chronických ran doporučili Marquardt a kol. koncentraci 0,04 % PHMB, která v jejich *ex vivo* výzkumu nezpůsobila žádné vaskulární podráždění, zatímco 0,1% roztok PMHB vedl k mírnému podráždění v CAM testu (Marquardt et al., 2010).

Daeschlein a kol. ve své klinické studii o kožních štěpech dokázali, že 0,04% PHMB neinhibuje reepitelizaci chronických ran ani popálenin druhého stupně a vykazoval lepší výsledky v porovnání s AgNO<sub>3</sub> a PVP-I (Daeschlein et al., 2007). V další studii Sibbald a kol. PHMB významně snížil množství mikroorganismů chronických ran a měl vliv na rychlejší reepitelizaci (Sibbald et al., 2011). Zároveň zde autoři uvádějí, že aplikace 0,5% PHMB na ránu způsobila výrazně menší bolest než obvaz bez PHMB. Stejně výsledky měla i studie Eberleina a kol., kteří testovali 0,3% PHMB (Eberlein et al., 2012). Rychlejší snížení velikosti rány bylo zaznamenáno při použití 0,1% PHMB ve studiích Durante a kol., kteří zaznamenali navíc snížení fibrinového filmu a nekrózy (Durante et al., 2014), Mendese a kol., kteří uvedli průměrnou dobu léčby 11,2 dne (Mendes & Rodrigues, 2014) a Andriessena a Eberleina (Andriessen & Eberlein, 2008). Ceviker a kol. uvádí, že aplikace 0,5% PHMB po 12 dnech signifikantně snížila C-reaktivní proteinu a rány se zhojily do 15 dní (Ceviker et al. 2008). Ve studii Belliegera a kol. aplikace 0,3% PHMB na chronických ranách významně urychlila hojení zejména redukcí zánětu a lepší granulací tkáně (Bellingeri et al., 2016). Kramer a kol. potvrdil, že PMHB po 18 dnech signifikantně zrychlil proces hojení aseptických prasečích ran v porovnání s ringerovým roztokem a OCT (Kramer et al., 2004). Výskyt kontaktní alergické reakce způsobené topickou aplikací PHMB je vzácný s četností jen  $\leq 0,08$  % (Schnuch et al. 2007).

Příklady přípravků pro chronické rány jsou Prontosan obsahující 0,1 % PHMB, Lavasept s 0,2% PHMB nebo Suprasorb s 0,3% PHMB. PHMB bylo cytotoxické *in vitro* od 0,001%, klinické testy však prokázaly podporu hojení v koncentracích od 0,01 – 0,5 %. Vzhledem k těmto rozporuplným výsledkům je třeba provést více studií.

## **8 Chlorhexidin**

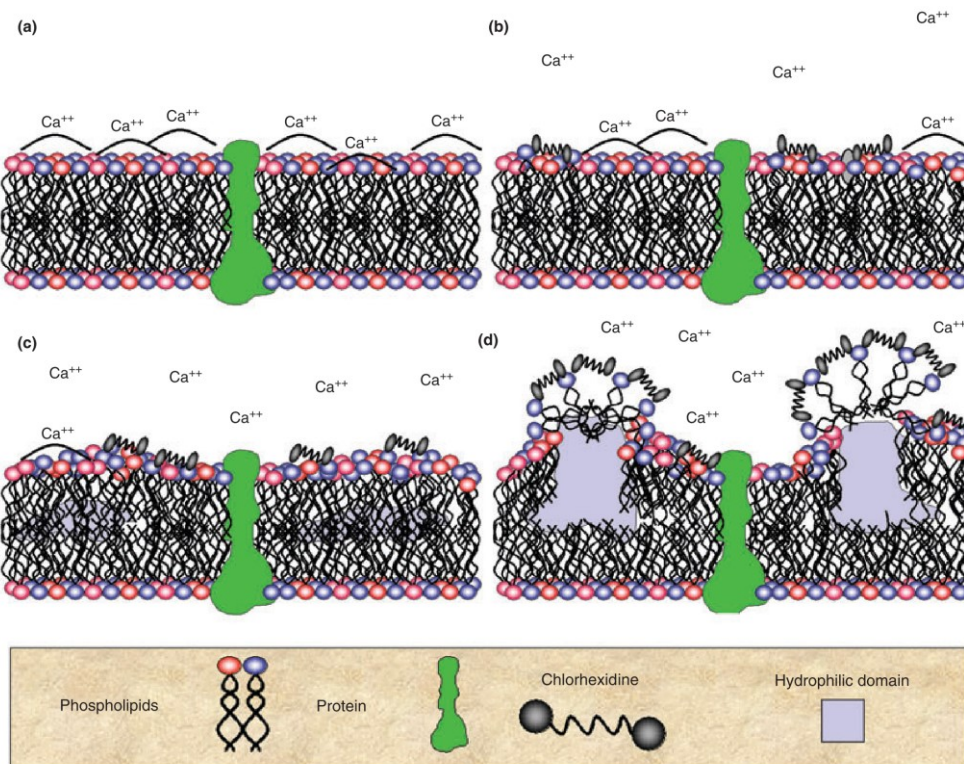
Chlorhexidin se používá již od roku 1954 v antiseptických nebo desinfekčních prostředcích, zejména v chirurgických zákrocích, ve stomatologii jako prevence před infekcí, v přípravcích na mytí rukou nebo jako konzervační prostředek (Li et al., 2014; McDonnell & Russell, 1999; Punjataewakupt et al., 2019). Ústní vody obsahují koncentraci 0,02 - 0,2 % CHX, zatímco koncentrace používaná jako topická antiseptika ve formě gelu se pohybuje v rozmezí 1 - 2 %. Je to alkalická látka ve vodě téměř nerozpustná, proto se v přípravcích používá zejména jeho acetátové (diacetátové) a glukonátové soli, které ve vodě rozpustné jsou (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; Russell & Day, 1993). Při léčbě chronických ran se používal hlavně pro zvlhčení a očištění kontaminovaných poranění (Percival et al., 2010). CHX je kationtové činidlo, a proto je neslučitelné s aniontovými povrchově aktivními látkami (např. polysorbát) a jeho toxická aktivita a účinná koncentrace je snížena v přítomnosti neiontových povrchově aktivních látek. Jeho aktivitu snižují také fosfolipidy a organické látky včetně séra (Russell & Day, 1993).

## 8.1 Antimikrobiální mechanismus působení CHX

Je toxický pro G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakterie, kvasinky a plísně, (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; Punjataewakupt et al., 2019) zabraňuje růstu spor, ale sporidní není ani při vysokých koncentracích. Proti mnoha virům vykazuje velmi malou účinnost, jeho aktivita je spojena narušením lipidových obalů, tudíž neobalené viry inaktivovat nedokáže (McDonnell & Russell, 1999; J. B. Park & Park, 1989). Vnější vrstva bakteriálních buněk, která je spojena s teichoovou kyselinou a polysacharidovými složkami G<sup>+</sup> bakterií, nebo lipopolysacharidy G<sup>-</sup> bakterií a samotnou cytoplazmatickou membránou, nese negativní náboj a je často stabilizována dvojmocnými kationty, nejčastěji Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>. CHX díky svému kladnému náboji a hydrofobní oblasti interagují s buněčným povrchem a cytoplazmatickou membránou. Vytěsňují dvojmocné kationty (Gilbert & Moore, 2005) a i při nízké koncentraci se váže nespecificky na negativně nabitě fosfolipidy v buněčné membráně a membránovými proteiny (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Touto vazbou se naruší buněčný růst, membrána ztrácí fluiditu a přestává být semipermeabilní pro buněčný materiál, dochází tak k uvolnění draslíku, fosforu a dalších molekul vedoucí až k buněčné smrti (Gilbert & Moore, 2005; Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; Punjataewakupt et al., 2019). Účinnost CHX na bakteriální stěnu je závislá na koncentraci, čase a pH prostředí (Hidalgo & Dominguez, 2001; Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; McDonnell & Russell, 1999; Punjataewakupt et al., 2019). Při nízkých koncentracích (0,02 % - 0,06 %) působí bakteriostaticky, při koncentracích vyšších než 0,12 % má baktericidní aktivitu a způsobuje smrt cytolýzou (Hidalgo & Dominguez, 2001). Poškození buněčné vrstvy nemusí být vždy pro organismů smrtelné. CHX bakteriální stěnou nebo vnější membránou prochází difúzí (McDonnell & Russell, 1999) a se vzrůstající koncentrací uvnitř buňky denaturuje cytoplazmatické složky a indukuje koagulaci intracelulárního obsahu vedoucí ke smrti buněk (Hidalgo & Dominguez, 2001; McDonnell & Russell, 1999; Percival et al., 2010).

CHX poškozuje také mitochondrie a může způsobit vyčerpání ATP v buňce (Faria, Cardoso, Larson, Silva, & Rossi, 2009; Hidalgo & Dominguez, 2001) a vyšší produkci toxického ROS. Zároveň zvyšuje intracelulární vápníkové ionty (Ca<sup>2+</sup>), které také přispívají k oxidačnímu stresu v buňkách, čímž indukuje apoptotickou a autofágickou/nekrotickou buněčnou smrt. (Faria et al., 2009; Giannelli et al. 2008; Hidalgo & Dominguez, 2001). Nadměrná hladina ROS poškozuje i DNA a vede ke genotoxicitě CHX. (Faria et al., 2009; Giannelli et al., 2008; Li et al., 2014). Potlačuje syntézu DNA tvorbou kovalentních vazeb a snižuje tím buněčnou proliferaci, negativně působí i na syntézu a akumulaci proteinů. CHX také poškozuje cytoskelet buňky a tím mění její konfiguraci. CHX je inhibitor membránově vázané i rozpustné ATPázy při vysokých koncentracích a tím naruší membránový potenciál (Harold et al., 1969; McDonnell & Russell, 1999).





Obrázek 6. Působení CHX na buněčnou membránu. A)  $Ca^{2+}$  ionty stabilizují negativně nabitou cytoplazmatickou membránu, B) se kterou interaguje CHX. C) CHX vytěsni stabilizující ionty a naruší permeabilitu membrány. D) Při zvyšující se koncentraci CHX vytěsni fosfolipidy a vytváří hydrofilní domény (Gilbert & Moore, 2005)

## 8.2 Cytotoxicita CHX

### *In vitro:*

Toxické mechanismy CHX nejsou selektivní pouze na mikroorganismy, může jimi také poškozovat různé lidské buňky podílející se na hojení ran, jako jsou fibroblasty, lymfocyty, makrofágy, endotelové buňky v závislosti na koncentraci a čase (Faria et al., 2009; Giannelli et al., 2008; Hidalgo & Dominguez, 2001; Li et al., 2014). Okamžitá cytotoxická aktivita CHX byla prokázána *in vitro* vůči lidským osteoblastům (Giannelli et al., 2008; Vörös et al., 2014), fibroblastům i epitelialním buňkám (Schmidt et al., 2015).

CHX stimulovaná apoptóza a autofágická/nekrotická buněčná smrt byla pozorována v experimentu provedeném Farií a kol. CHX v koncentraci 0,001 % navíc způsobil rozptýlení ribozomů v cytoplazmě a zvýšení počtu cytoplazmatických prázdných vakuol (Faria et al., 2009). Na krysích thymocytech bylo zjištěno, že CHX se v koncentraci 0,000269 % *in vitro* váže na aniontový fosfatidylserin, který se dostává do vnější monovrstvy lipidové membrány v rané fázi apoptózy a spustí tak nekontrolovaný proces nekrózy (Nonami et al. 2016). Hidalgo a Dominguez dokázali, že při koncentraci  $> 0,001$  % CHX způsobuje nedostatek ATP ve fibroblastech a vlivem 0,02 % CHX a vyšší už nastává celková ztráta ATP následovaná buněčnou smrtí (Hidalgo & Dominguez, 2001). V této studii pozorovali smrt fibroblastů již při koncentraci vyšší než 0,005 % a při nižší koncentraci zůstávají buňky životaschopné po dobu 3 – 8 hodin. Tato studie zjistila, že CHX je cytotoxický pro dermální lidské fibroblasty *in vitro* již v koncentracích 5 - 2400krát nižší než používaná v klinické praxi (Hidalgo & Dominguez, 2001). CHX indukovaná apoptóza byla také pozorována na fibroblastech a makrofázích ve studii Hernandez a kol. při koncentraci 0,12 % (Hernandez et al. 2005). Giannelli a kol. pozorovali apoptotické příznaky, kondenzovaný jaderný chromatin, fragmentované DNA, rozsáhlé cytoplazmatické vakuolizace na osteoblastech a to již po jedné minutě při 0,01% CHX

(Giannelli et al., 2008). Inhibici syntézy DNA zaznamenali Hidalgo a Domínguez při 0,0001 % CHX (Hidalgo & Domínguez, 2001). V další studii (od 0,002 %) CHX inhiboval syntézu celkového proteinu ve fibroblastech (Pucher & Daniel, 2012). Faria a kol. na myších fibroblastech zjistili, že CHX již v koncentraci 0,000125 % po 24 hodin způsobuje zvýšenou expresi Grp78 (glukózou regulovaný protein 78) a indukuje akumulaci špatně složených proteinů v ER, která vede k výraznému zvětšení cisterny drsného ER, jeho přetížení a expresi ER stresových proteinů indikujících smrt buňky apoptózou či nekrotózou. 0,000125% CHX způsobila také mitochondriální vakuolizaci (Faria et al., 2009).

Narušení mitochondrií a generace ROS CHX bylo potvrzeno v *in vitro* testu Giannelliho a kol. na fibroblastových, osteoblastových a endotelových buňkách. Po jedné minutě 0,01% CHX způsobil ztrátu mitochondriální transmembránové polarizaci a změnu mitochondriálního membránového potenciálu. Významné zvýšení hladiny ROS začalo až po 30 minutách. Osteoblasty v tomto experimentu generovaly více ROS než fibroblasty (Giannelli et al., 2008). Ve studii Farie a kol. pozorovali autoři v koncentracích 0,002 a 0,004 % CHX inhibici exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 (brání uvolňování cytochromu c), který se nachází v membránách ER, mitochondrií a jádra. V koncentracích od 0,000125 a 0,001 % se však jeho exprese zvyšovala (Faria et al., 2009). Newton a kol. zjistili, že CHX (0,00005 %) způsobuje změny mitochondriální permeability, čímž se může uvolňovat cytochrom c a další proteiny vyvolávajících apoptózu. CHX také způsobil otoky mitochondriálních membrán závislé na uvolňujícím se  $Ca^{2+}$ . CHX zvyšuje peroxidaci lipidů závislých na železu, a interakce s feritinem (globulární zásobní protein železa). CHX v koncentraci 0,0084 % indukoval uvolňování železa z feritinu, který indukuje oxidační stres a peroxidaci lipidů. Peroxidace lipidů byla pozorována při 0,002 % CHX (Newton et al., 2004). Ve studii Babicha a kol. bylo také pozorováno zvýšení permeability pro  $Ca^{2+}$  vlivem CHX, které bylo doprovázené únikem laktátdehydrogenázy z lidských gingiválních buněk (Babich et al., 1995). Rychlé zvýšení cytoplazmatické a jaderné koncentrace  $Ca^{2+}$  zaznamenali Giannelli a kol. již po 50 vteřinách působení 0,01% CHX (Giannelli et al., 2008).

CHX byl také schopen způsobit změny cytoskeletálního uspořádání aktinu fibroblastů a endotelových buněk ve studii Giannelliho a kol. při koncentraci 0,01 % CHX již po jedné minutě, konkrétně způsobil ztrátu aktinových filament a postupné oddělení buňky od substrátu (Giannelli et al., 2008). V jiném experimentu však narušení a dezorganizaci aktinových filament a mikrotubulů způsobil CHX při významně nižší koncentraci 0,001 % (Faria et al., 2009). Tyto změny způsobily kruhové uspořádání cytoskeletu kolem jádra a buňka ztratila svůj tvar a při 0,002 % CHX došlo k cytoskeletálnímu kolapsu bez pozorovaných svazků s difúzním aktinem. V této studii se zjistilo, že buňky vystavené 0,016 % CHX vykazovaly menší morfologické změny než ty, inkubované s 0,004 % a 0,008 % CHX, pravděpodobně protože CHX v této koncentraci buňky zafixuje (Faria et al., 2009).

Hidalgo a Domínguez ve své *in vitro* studii zaznamenali smrt fibroblastů po třech hodinách v koncentraci CHX  $>0,005$  % (Hidalgo & Domínguez, 2001) a Pucher a kol. při koncentraci 0,005 % po jedné hodině (Pucher & Daniel, 2012). Müller a Kramer stanovili cytotoxickou koncentraci pro 50 % myších fibroblastů (IC50) 0,007 - 0,0083 % (Müller & Kramer, 2006, 2008). Van Meurs a kol. uvádí, že 0,04% CHX po dvou hodinách je zcela cytotoxický pro 100 % lidských dermálních fibroblastů a mezenchymálních stromatálních buněk, necytotoxický účinek CHX byl až při 0,002 %. Výsledky Li a kol. prokazují cytotoxicitu a genotoxicitu indukovanou CHX na makrofázích závislou na dávce ( $>0,0005$  %) a čase ( $> 1$  h), která může být generována pomocí ROS. Byl zde také pozorován opožděný buněčný cyklus (Li et al., 2014). V další studii Segura a kol. způsobil CHX neschopnost adherence makrofágů k substrátu (Segura et al., 1999). Zvýšená apoptóza makrofágů byla také zaznamenána *in vitro* testem Hernandez a kol. indukovaná 0,12% CHX (Hernandez et al. 2005). Nonami a kol. zjistili, že  $\geq 0,0009$  % CHX zvyšuje letalitu buněk krysích thymocytů (1 h)

(Nonami et al. 2016). Podle Karpanena a kol. se CHX neporušenou kůží absorbuje velmi špatně a celou kůží neproniká. Na lidském modelu kůže detekovali největším množstvím CHX po 24 h v horní vrstvě kůže (tloušťka do 100  $\mu\text{m}$   $7,88 \pm 1,37 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), zahrnující vrstvu stratum corneum (tloušťka 10 - 20  $\mu\text{m}$ ) a další epidermální vrstvy. Hladiny CHX v hlubších vrstvách do 300  $\mu\text{m}$  byly nižší než 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  tkáně (Karpanen et al., 2008).

Veškeré poškození buněk indukované CHX aktivitou bylo koncentračně i časově závislé a tyto koncentrace byly hluboko pod (přibližně 200násobných) koncentracemi používaných v klinické praxi ve všech typech zkoumaných buněk.

### ***In vivo:***

Na základě těchto dat ze studií *in vitro* by mohl být narušen normální proces hojení toxickým vlivem CHX. To bylo potvrzeno v *in vivo* studiích na zvířatech, kde bylo pozorováno, že aplikace CHX významně zpomaluje tvorbu granulační tkáně a rychlost epitelizace v koncentracích od 0,1 % až 0,5 % (Bassetti & Kallenberger, 1980; Paunio et al., 1978). Bassetti a Kallenberger zaznamenali zhoršené hojení při použití 0,5% CHX, ale i koncentrace 0,1 a 0,2 % v sedmém dni měla negativní vliv. V další studii s použitím kožních štěpů zaznamenali výrazně zpožděnou reepitelizaci rány v koncentraci 0,5 % CHX (Reimer et al., 2000). V rozporu s tím je výzkum Kozlovského a kol., ve kterém rychlost epitelizace potkaní rány horního patra v ústech a celkové zahojení nebylo negativně ovlivněno CHX (Kozlovsky et al. 2007). Dokonce se rány zhojily rychleji při použití 1% CHX gelu než 0,12% roztoku CHX. Lindhe a kol. studovali účinek CHX na ústní sliznici křečka a zjistili, že CHX nepoškozeným orálním epitelem nepronikl. Histologicky ani histochemicky nevyvolával žádné změny v bazálních buněčných vrstvách (Lindhe a kol. 1970). Na lidských chronických ran v klinické studii Fumala a kol. CHX v koncentraci 5 % cytotoxicky nepůsobil, ale rychlost i doba hojení vykazovala jen mírné zlepšení (-1 % až 5 %) v porovnání s kontrolou, srovnatelné s SSD a delší dobu epitelizace oproti PVP-I (Fumal et al., 2002).

Topická aplikace CHX na kůži má i nežádoucí účinky, nejčastějším z nich je dermatitida, ve vzácných případech se může objevit i alergické reakce a anafylaktický šok. Při podání 0,05% CHX na sliznici nebo kůži byla pozorována anafylaxe (Krauthem, Jermann, & Bircher, 2004). Kromě kontaktní dermatitidy však nebyly zaznamenány jiné významné nepříznivé účinky CHX na kůži (Nonami et al., 2016).

*In vitro* testy prokázaly cytotoxicitu lidských buněk již při 0,0005 % a mechanismus účinku CHX je dobře zdokumentován. Výsledky *in vivo* testů si jsou však v rozporu, v některých CHX projevil cytotoxicitu při koncentraci 0,1 – 0,5 % zhoršenou reepitelizací, jiné však neprokázaly negativní vliv na hojení v koncentracích 5 %. Klinických studií cytotoxické aktivity CHX na lidské buňky zejména při léčbě chronických ran je velmi málo a je potřeba dalších studií. Příkladem CHX antiseptika je Bactigras s 0,5 %, vzhledem k publikovaným protichůdným výsledkům je složité určit, jestli může působit cytotoxicky *in vivo*.

## 9 Tabulky

Tabulka 1. Přehled vybraných studií *in vitro* a *in vivo* cytotoxicity stříbra. HDF - lidské dermální fibroblasty, HEK - lidské epidermální keratinocyty.

Testovaná látka	Experimentální subjekt	Cytotoxická koncentrace	Cytotoxicita/vliv na hojení/antimikrobiální účinky	Reference
0,5 - 0,00007% AgNO <sub>3</sub> , <i>in vitro</i>	HDF, <i>S. aureus</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. aeruginosa</i>	0,00014% AgNO <sub>3</sub> (+10% FBS), 2 – 24 h	<i>S. aureus</i> : 0,0007 %, <i>P. aeruginosa</i> : <i>P. aeruginosa</i> , ≥ 0,0027 %; <i>C. freundii</i> ≥ 0,0055 %, 2 h	Hidalgo et al., 1998
4,12 - 82,4 M AgNO <sub>3</sub> , <i>in vitro</i>	HDF	0,000032% AgNO <sub>3</sub>	po 8 h 0,000032 % ztráta celkového proteinu (p < 0,01), 0,000016 % inhibice proliferace - snížení syntézy DNA; 0,000064 % s 10% FBS inhibice buněčného ATP; toxicita závislá na koncentraci a čase	Hidalgo & Dominguez 1998
0,01 - 0,000625 % AgNO <sub>3</sub> , Acticoat, <i>in vitro</i>	HDF a HEK	HDF: 0,0007 % AgNO <sub>3</sub> ; HEK: 0,00125 % AgNO <sub>3</sub> , Acticoat, 24 h	3 - 24 h Acticoat toxický (p < 0,01); po 3 h 100% smrt HDF při 0,00334 % a HDF v kolagenu 0,006 % AgNO <sub>3</sub> ; od 0,0025% AgNO <sub>3</sub> časová závislost	Poon & Burd 2004
0,0005 - 0,01% AgNP, <i>in vitro</i>	lidské plicní fibroblasty a glioblastomy	fibroblasty: 0,01 %, glioblastomy: 0,02 %, 24 h	signifikantní snížení ATP a metabolismu v buňkách (P < 0,05), toxicita časově a koncentračně závislá; 0,01 % poškození DNA (P < 0,05)	AshaRani et al., 2009
AgNP, Ag soli, SSD, <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , <i>ex vivo</i>	HDF, HEK, prasečí explantáty střední epidermis, myší rány	HEK: Contreet Ag > Aquacel Ag > Acticoat > Urgotul S SD > Aquacel; HDF: Contreet Ag, Aquacel Ag > Acticoat, 24 h	24 h, HDF: netoxický PolyMem Ag, Urgotul SSD, Aquacel a HEK: netoxický PolyMerm Ag; <i>ex vivo</i> : signifikantní zpoždění reepitelizace, <i>in vivo</i> : silná inhibice epitelizace Cotreet Ag > Acticoat > Aquacel Ag > PolyMem Ag	Burd et al., 2007
AgNP, 1% SSD, Ag soli, <i>in vitro</i>	HDF, HEK, HaCaT	HaCaT: 1% SSD, Acticoat, PolyMem Ag, Ag hydrogel, HDF, HEK: 1% SSD, Acticoat, 24 h	PolyMem Ag - CellTitter-Blue Ag hydrogel - trypan blue HDF = necytotoxické	Boonkaew et al., 2014
1% SSD + 0,2% CHX, 1% SSD, Acticoat, <i>in vitro</i>	HaCaT	1% SSD, 72 h	1% SSD + 0,2% CHX usmrcení 90 % buněk (p < 0,001), 1% SSD 55 % buněk (p < 0,05) a Acticoat 25 % buněk (p > 0,05)	Fraser et al., 2004
0,00625 - 0,005% AgNP, <i>in vitro</i>	HEK	0,0025% AgNP, 24 h	Po 24 h při 0,000625 % snížení metabolické aktivity, proliferace (p < 0,01); 0,00125% aktivace kaspázy 3/7	Szmyd et al., 2012
Acticoat, <i>in vitro</i>	HEK	Acticoat, 30 min	0 - 9,3 % životaschopných buněk po 30 min	Lam et al., 2004
AgNP, Ag soli, 1% SSD, <i>in vitro</i>	HDF a myší fibroblasty	Aquacel Ag, 1 % SSD, Suprasorb A Ag, 24 h	HDF a myší fibroblasty: 87 % a 77 % Acticoat, 100 % a 81 % Silverlon po 24 h	Hájská et al., 2017
10% AgNO <sub>3</sub> a SSD, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929, <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	IC50: 0,0018% AgNO <sub>3</sub> ; 0,006% SSD, 30 min	3 log <sub>10</sub> redukce <i>E. coli</i> > 1 %; <i>S.aureus</i> >> 1 %	Müller & Kramer, 2008
0,0001 - 0,003 % AgNP, <i>in vitro</i>	lidská krev	0,0015 %, 72 h	inhibice proliferace buněk při >0,0015 % (p < 0,05); inhibice produkce cytokinů IL-5 při 0,001 %, INF-γ a TNF-α při 0,0003 % (p < 0,05) v závislosti na dávce	Shin et al., 2007

0,004 - 0,0004 % SSD, <i>in vitro</i>	lidské neutrofilily	0,5% SSD, 15 min	1 - 0,5 % inhibice oxidačního vzplanutí.	Hansbrough et al., 1991
Acticoat, <i>in vivo, in vitro</i>	neutrofilily a infikované rány morčat, <i>S. aureus</i>	x	po 5 dnech rány bez zarudnutí, otoků a infekce ( $p < 0,0001$ ), po 5 min zvýšení aktivity NK buněk ( $p < 0,006$ ) a indukce superoxidace neutrofilů ( $p < 0,05$ )	Mazurak et al., 2006
0,1% AgNP, 0,1% SSD, <i>in vitro</i>	lidská epidermis - Franzovy difúzní cely	24 h	absorpce AgNP intaktní kůži: 0,46 ng/cm <sup>2</sup> , poškozenou kůži 5x vyšší absorpce (2,32 ng/cm <sup>2</sup> )	Larese et al., 2009
1 - 0,01% AgNP, 1 - 0,001% SSD, <i>in vitro, in vivo</i>	myší model kůže; G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup> bakterie, kvasinky a dermatofyty	1% AgNP, SSD	Po 5 dnech nižší koncentrace iontů Ag absorbovaná vnitřními orgány z 1% AgNP než 1% SSD ( $p < 0,001$ ); 0,001% AgNP i SSD mikrobicidní po 24 h	Brandt et al., 2012
1% SSD, <i>ex vivo</i>	slepičí CAM embryí	1% SSD, 5 min	mírné podráždění při krátkodobém působení, vážné podráždění po 60 min	Marquardt, 2010
1% SDS, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	mírné zlepšení epitelizace (2 - 7 %) proti kontrole. Snížení hustoty bakterií, neutrofilů, fibroblastů a zánětu endotelu	Fumal et al., 2002
Acticoat, 1% SSD, <i>in vitro, in vivo</i>	popáleniny, ( <i>S. aureus</i> , MRSA, <i>P. aeruginosa</i> )	1% SSD	Acticoat signifikantně kratší doba reepitelizace ( $p < 0,01$ ), větší snížení bakteriální zátěže ( $p < 0,05$ ) oproti SSD, bez nežádoucích reakcí	Huang et al., 2007
Acticoat, 0,5% SSD, <i>in vivo</i>	popáleniny II. a III. stupně	0,5% SSD	rychlejší reepitelizace ( $p < 0,001$ ) a vyčištění rány AgNP ve srovnání s SSD, nižší frekvence převazu u AgNP,	Argirová & Hadjiiski 2011
1% AgNO <sub>3</sub> , <i>in vivo</i>	chronické rány a popáleniny	1% AgNO <sub>3</sub>	hluboká tkáňová nekróza s pozorovaným otokem a fibrinový film, cévy s otokem endotelu a migrace leukocytů stěnou cév; epitelizace bez debridementu	Daeschlein et al., 2007
0,5% AgNO <sub>3</sub> , Acticoat, <i>in vivo</i>	popáleniny	x	bez signifikantního rozdílu v rychlosti reepitelizace a bolesti mezi Acticoat a AgNO <sub>3</sub> , nižší frekvence sepce a výskytu sekundárních bakterií u popálenin léčených AgNP než AgNO <sub>3</sub>	Tredget et al., 1998
Acticoat, <i>in vivo</i>	lidské popáleniny - kožní štěpy	x	středí max množství Ag v séru: 56,8 µg /l (po 6 měsících 0,8 µg/l), (Průměrná max hladina stříbra v séru 83,4 µg/l), bez hematologické a biochemické toxicity; doba zhojení ran 10,6 dní; zhoršená reepitelizace u 23 % pacientů a infekce rány u 17 %	Vlachou et al., 2007
Acticoat, <i>in vivo</i>	lidské popáleniny - kožní štěpy	x	rychlejší reepitelizace o 40 % a dřívější zhojení ran ve srovnání s antibiotiky, bez infekce a bolesti pacientů	Demling et al., 2002
PHMB, AgNP, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	pomalejší snížení množství mikroorganismů a vyšší míra bolesti ve srovnání s PHMB obvazem ( $p < 0,001$ ), dobrá tolerance, bez nežádoucích účinků	Eberlein et al., 2012
PVP-I, Ag pěna, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	bez koncentrace aktivních látek	lepší rychlost a doba reepitelizace ( $p < 0,001$ ) a dřívější snížení exsudátu ( $p < 0,0001$ ) a pachu ( $p = 0,01$ ) ve srovnání s PVP-I	Ashwin Apte 2014
Atrauman Ag, (OCT vs. AgNP obvazy), <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	signifikantně pomalejší reepitelizace oproti OCT ( $p = 0,0182$ ), pozdější snížení bolesti; odstranění mikrobiologického množství po 56 dnech o 43 % ( $p = 0,1$ ve srovnání s OCT)	Krasowski et al., 2015

Acticoat, <i>in vivo</i>	prasečí chronické rány	x	podpora reepitelizace, vaskularizace granulační tkáně, 7. den keratinizovaná epidermální vrstva; snížení hladin MMP ( $p < 0,0001$ ); vyšší apoptóza buněk, více fibroblastů, méně polymorfonukleárních leukocytů ve srovnání s kontrolou	Wright et al., 2002
--------------------------	------------------------	---	---	---------------------

Tabulka 2. Přehled vybraných studií *in vitro* a *in vivo* cytotoxicity jódu. HDF - lidské dermální fibroblasty, LH – liposomální hydrogel, MSC – mezenchymální stomatólní buňky, HEK - lidské epidermální keratinocyty

Testovaná látka	Experimentální subjekt	Cytotoxická koncentrace	Cytotoxicita/vliv na hojení/antimikrobiální účinky	Reference
10 - 0,1% PVP-I, <i>in vitro</i>	HDF, <i>S. aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i>	2 % PVP-I, 15 min	1 % toxické pro bakterie a netoxické pro HDF, 0,2 % toxické ( <i>P.aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> )	Rabenberg, 2010
max 1%, PVP-I roztok, <i>in vitro</i>	HDF a fetální plicní fibroblasty keratinocyty,	0,01 %, 24 h	inhibice růstu při 0,1 a 1 %	Balin et al., 2002
BT1: 4% PVP-I, BT2: 10% PVP-I + nonoxinol a BT3: 10% PVP-I <i>in vitro</i>	HDF a HEK	IC50 HEK: 0,0099 - 0,0454 % PVP-I IC 50 HDF: 0,00275 - 0,0544 %, 15 min	IC50 HEK: 0,0099 % BT1, 0,0407 % BT2, 0,0454 % BT3; IC50 HDF: 0,0275 BT1, 0,00544 % BT2, 0,0544 % BT 3 *BT: Betadine 1 - 3	Damour, 1992
Braunol 7,5 % (w/w) PVP-I, Betaisodona 10 % PVP-I w/v, <i>in vitro</i>	HDF, HaCaT, HEK	HaCaT: 0,3 % BD, 1,3 % BR; HEK: 0,4 % BD, 0,68 % BR; HDF: 0,4 % BD, 0,56 % BR, 5 min	*BD = Betasidona, *BR = Braunol	Hirsch et al., 2010
0,01 - 10% PVP-I, <i>in vitro</i>	HDF, MSC; <i>S.aureus</i> a <i>S.epidermidis</i>	0,2 %, 2 h	> 0,1 % po 2 h klesající životaschopnost buněk, Po 2 min 0,132 % baktericidní (max. baktericidní účinek při 1 %)	van Meurs, 2014
10% PVP-I, <i>in vitro</i>	HDF a myší dermální fibroblasty	10 %, 24 h	snížení životaschopnosti HDF o 45 % a myších o 94 %	Hájská et al., 2017
10 % PVP-I W/v), <i>in vitro</i>	lidské gingivální fibroblasty a nosní epitely	10 % po 1 min fibroblasty, po 15 min epitely	snížení metabolické aktivity, životaschopnosti a počtu buněk ( $p < 0,0001$ )	Schmidt, 2015
PVP-I; <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929	IC50: 0,05 %, 30 min	min. IC50 0,46 %; max IC50 0,49 % (20x lépe tolerován než OCT, PHMB a CHX)	Müller & Kramer, 2006
PVP-I 1 - 0,4% w/v mast, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929; <i>S. aureus</i> a <i>E. coli</i>	IC50 0,475 % roztok, 0,63 % mast, 30 min	3 log <sub>10</sub> redukce <i>E. coli</i> 0,7% roztokem a 0,9% mastí; <i>S.aureus</i> 0,7% mast i roztok	Müller & Kramer, 2008
PVP-I <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>	HDF, krysí infikované rány; <i>S. aureus</i>	0,01 %, 24 h	0,001 % baktericidní necytotoxické účinky, <i>in vivo</i> : 1 % PVP-I zpomalení epitelizace a pouze 21% pevnost v tahu	Lineaweaver et al., 1985
0,0001 - 20 % PVP-I, <i>in vitro</i>	lidská krev	1 % pro lymfocyty 10 % granulocyty a erytrocyty, 2 h		Wagner et al., 2004
10 - 0,05 % PVP-I, <i>in vitro</i>	lidská krev	5 min, 0,05 % granulocyty; 1 % monocyty	> 0,05% toxické pro granulocyty a známky toxicity pro monocyty	Van Den Broek et al., 1982

3% PVP-I, <i>in vitro</i>	lidské granulocyty, erythrocyty	IC50 0,45 %	0,45 % indukce produkce ROS neutrofilů, 0,3 % inhibice aktivity mastocytů a podpora produkce TNF- $\alpha$ a NO makrofágy	Beukelmen, et al., 2008
0,01-0,0001% PVP-I, <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i>	lidské epitelů a krysí slizniční tkáň	> 0,001 %, 24 h	významné ztenčení slizničních epitelů při > 0,001 % po 1 dni a > 0,0001 % po 2 dnech	Sato et al., 2014
1% PVP-I, 3% PVP-I mast, <i>ex vivo</i>	potkaní, králičí model kůže	3 %	1 % signifikantně rychlejší a kratší doba epitelizace, snížení zánětu, podráždění, krvácení oproti 3% PVP-I a kontrole, bez infekce. 3 % PVP-I signifikantně pomalejší epitelizace oproti kontrole, nárůst počtu mononukleárních buněk a neutrofilů, částečná tvorba granulační tkáň a regenerace epidermis jen na okraji ran	Mitani, 2016
0,5% PVP-I, <i>in vivo</i>	akutní rány kůže potkanů	x	14. den tlustá granulační tkáň, kompaktní kolagen a kompletní vrstva epitelu; rychlejší epitelizace rány do 11. dne ( $p < 0,05$ ); zvýšení neovaskularizace ( $p < 0,05$ ); podpora exprese TGF- $\beta$ ; pokles hladiny IL-6 ( $p < 0,01$ ); podpora diferenciac epitelů ( $p < 0,05$ )	Wang et al., 2017
1% PVP-I, <i>in vivo</i>	potkaní rány, <i>P. aeruginosa</i>	x	podpora reepitelizace ( $p = 0,34$ ); snížení počtu bakterií po 7 dnech oproti kontrole	Kanno, 2016
10% PVP-I, 3% PVP-ILH; <i>in vivo</i>	lidské infikované kožní rány	x	10% PVP-I efektivnější odstranění bakterií do 10. dne a rychlejší reepitelizace (průměr 90% do 6. dne) ve srovnání s 3% PVP-I a kontrolou; 3 % PVP - ILH rychlá reepitelizace (průměr 72% do 6. dne)	Vogt et al., 2017
3% PVP-ILH a mast, <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	chronické rány a popáleniny, krysí explantáty kůže a peritoneum; <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>	x	PVP-I LH rychlejší epitelizace explantátů peritonea ve srovnání s PVP-I mastí ( $p = 0,007$ ) a kůže ve srovnání s PVP-I mastí a kontrolou ( $p = 0,0026$ ); ztráta kožních štěpů: 5 % PVP-I LH, 36 % masti, lepší reepitelizace ran PVP-I LH, než PVP-I mast ( $p = 0,05$ ), <i>S.aureus</i> : redukce 5 log <sub>10</sub> po 5 min	Reimer et al., 2000
(neředěný) PVP-I, <i>in vivo</i>	chronické rány a popáleniny	x	zpomalující hojení obdobně jako 1% AgNO <sub>3</sub> , viz Tabulka 1.	Daeschlein et al., 2007
10% PVP-I, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	rychlejší epitelizace (o 4 - 18 %, $p < 0,01$ ) a kratší doba hojení (o 2-9 týdnů $p < 0,01$ ) oproti kontrole; snížení hustoty bakterií, neutrofilů, makrofágů, fibroblastů a zánětu endotelu	Fumal et al., 2002
10% PVP-I, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	po 6 týdnech významnější snížení bakteriální infekce, zarudnutí kůže, otoku, hloubky a velikosti ran a lepší neovaskularizace oproti kontrole, bez senzibilizace	Daróczy, 2002
10% PVP-I, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	reepitelizace ran po 12 týdnech: PVP-I s kompresí 82 % ran, PVP-I bez komprese 62 %, antibiotikum s kompresí 85 %; signifikantně nižší povrchová bakteriální infekce při léčbě PVP-I (11%) v porovnání s léčbou antibiotiky (32%).	Daróczy, 2006
3% PVP-ILH, <i>in vivo</i>	lidské popáleniny	x	rychlejší epitelizace ve srovnání s CHX, 5% ztráta štěpu, bez nežádoucích účinků a změn hormonů štítné žlázy	Vogt et al., 2001



10, 1% PVP-I a 1,8%, 1% CI; <i>ex vivo</i>	CAM slepičích embryí	1% PVP-I a 1% CI, 1 h	roztok 10% a 1% PVP-I po 5 min mírné vaskulární podráždění, 1 h 10% PVP-I vážné podráždění; skupina mastí: 10% PVP-I vážné vaskulární podráždění po 5 min 3% PVP-I; 1,8% a 1% CI mírné podráždění po 1 h	Marquardt, 2010
CI, 0,23 - 1,4 %, <i>in vivo, in vitro</i>	HDF a chronické rány	0,7 %, 24 h	0,7 - 0,9% ztráta pseudopodií; <i>in vivo</i> : bez negativních efektů na epitelizaci a granulaci	Zhou et al., 2002
CI, 0,45 - 0,11%, <i>in vitro, ex vivo</i>	myší kůže, lidské makrofágy	x	0,45 % po 4 dnech necytotoxické pro makrofágy, zvýšení exprese IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ a VEG myší kožní tkáň	Ohtani et al., 2007
0,25% CI, (0,9% jodu), <i>in vitro</i>	lidská makrofágová linie U937	0,5 % CI, 24 h	při 0,25% ztrojnásobení TNF- $\alpha$	Moore et al., 1997
CI 0,9% mast, <i>in vivo</i>	prasečí rány	x	signifikantně rychlejší epitelizace než samotný kadexomer nebo kontrola, epidermis více vrstev epitelů, bez negativních účinků na granulaci tkáň, neovaskularizaci nebo kontrakci ran	Lamme, 1997

Tabulka 3. Přehled vybraných studií *in vitro* a *in vivo* cytotoxicity chloru. HDF - lidské dermální fibroblasty.

Testovaná látka	Experimentální subjekt	Cytotoxická koncentrace	Cytotoxicita/vliv na hojení/antimikrobiální účinky	Reference
0,5 - 0,00025% NaOCl, <i>in vitro</i>	HDF	0,0125 %, 2 h	>0,05% ztráta mitochondriální funkce nezávislé na čase; 0,0075% signifikantní snížení celkového obsahu proteinu na 50 % v závislosti na FBS	Hidalgo & Dominguez, 2000
0,00005 - 0,1% NaOCl, <i>in vitro</i>	HDF, <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> a <i>S. faecalis</i>	0,0125 %, 2 - 24 h	> 0,05% smrt 90 % buněk (2 - 24 h); 0,0075% po 8 h snížení mitochondriální funkce a ztráta buněčného ATP; Po 24 h 0,5 % <i>S. aureus</i> , 0,25 % <i>P. aeruginosa</i> a <i>E. coli</i> , 0,025 % <i>S. faecalis</i>	Hidalgo et al., 2002
0,025 - 0,25 % NaOCl, <i>in vitro</i>	lidské neutrofilny	0,25 %, 30 min	0,25 % po 30 min smrt 61,5% buněk ( $p < 0,05$ )	Hansbroug et al., 1991
0,5 - 0,0025 % NaOCl, <i>in vitro</i>	myší makrofágy	0,0025 %, 30 s	0,00025% netoxický, > 0,0025% snížení viability ( $p < 0,005$ ) a adherence ( $p < 0,01$ )	Cardile et al., 2014
0,025 - 0,000025 % NaOCl, <i>in vitro</i>	králíčí peritoneální neutrofilny, fibroblasty a endotely	1 h neutrofilny 0,00025 %; 30 min 0,05 % endotely a 0,025 % fibroblasty	v endotelech 0,025 % a fibroblastech 0,0025 % způsobil mitochondriální otok, cytoplazmatickou vakuolizaci, spletence jader a dilataci ER. Destrukce jader a cytoplasmy endotelů při 0,05 % a fibroblastů při 0,025 %.	Kozol et al., 1988
0,5 - 0,0005 % NaOCl, <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	HDF, krysí septické rány, <i>S. aureus</i>	0,05 %, 24 h	<i>in vivo</i> : 0,25 % zpomalení epitelizace ve srovnání s kontrolou; po 15 min 0,005 % toxický pro 100 % <i>S. aureus</i>	Lineaweaver et al., 1985
0,25 - 0,0125 % NaOCl, <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	myší fibroblasty, myší infikované rány; G <sup>+</sup> /G <sup>-</sup> bakterie	0,25 %, 10 min	0,25 % toxicita tkáň <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> (14 dní); 0,025 % baktericidní po 30 min	Heggert et al., 1991
superoxidový roztok 0,006% NaOCl, <i>in vivo</i>	lidské akutní i chronické rány, popáleniny	x	rychlejší epitelizace, granulace a snížení velikosti rány, snížení zánětu (redukce otoku a erytému) v porovnání s 10% PVP-I a lepší kosmetické výsledky hojení popálenin	Kapur et al., 2011
superoxidový roztok 0,006% NaOCl, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	signifikantní snížení velikosti rány a nižší výskyt infekce (15 % vs. 36 % u PVP-I) ve srovnání s	Pandey et al., 2011



0,004% NaOCl + 0,003% HOCl, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	5% PVP-I (p = 0,001) alergická reakce u 2 % pacientů; (4 týdny) lepší epitelizace rány (p = 0,002); kratší doba hojení (p = 0,007) a lepší redukce infekce: 88 % po 1 měsíci (PVP-I 11 %, p < 0,05) ve srovnání s PVP-I	Piaggese et al., 2010
0,002% NaOCl + 0,008% HOCl, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	po 7 dnech snížení velikosti rány o 62 % (p < 0,05), lepší a rychlejší epitelizace ve srovnání s kontrolou	Hadi et al., 2007
0,00003% NCT, HOCl, <i>in vitro</i>	bovinní aortální endotely, krysí plíce	0,00003 % NCT a NH <sub>2</sub> Cl, 0,00006% HOCl, 15 min	0,00003 % HOCl a NH <sub>2</sub> Cl reverzibilní zkrácení aktinových mikrovláken, retrakce buněk a zvýšená permeabilita po 2 min (p < 0,001). 10 min 0,00006 % HOCl a NH <sub>2</sub> Cl zvýšená permeabilita plic (p < 0,005)	Tatsumi & Fliss, 1994
do 0,00006% NCT, <i>in vitro</i>	fibroblastoidní synoviální buňky	x	50% inhibice IL-6 při 0,000026 % a při 0,00005% NCT inhibice IL-8 a spontánní proliferace (v porovnání s taurinem p = 0,05) a 0,00003 % NCT inhibice základního fibroblastového růstového faktoru (p = 0,0001), 0,00006 % > 95 % viability buněk, 24 h	Kontny et al., 1999
0,0057 - 0,057 % NCT, <i>in vitro</i>	myší dendrocyty	x	1 - 2 h 0,057 % inhibice produkce NO, ROS a cytokinů TNF-α, IL-6, IL-10 a IL-12	Marcinkiewicz et al., 1999
do 0,00005% NCT, <i>in vitro</i>	lidské leukocyty	x	48 h inhibice cytokinů IL-1β, IL-6 při 0,000045 % a IL-8 při 0,00001 % (p = 0,05); 0,0000114 % proliferace buněk	Park et al., 2002
0,0001 - 1% NCT a CAT, <i>in vivo, in vitro</i>	lidské epidermoidní karcinómalní buňky, chronické rány	0,01 % CAT a 0,1 % NCT, 30 min a 24 h	<i>in vitro</i> : 0,1 % CAT a 1% NCT po 24 h inhibice růstu buněk a jejich fragmentace 95% buněk; <i>in vivo</i> : 1% NCT rychlejší granulace (p < 0,05) a reepitelizace (p < 0,034) ve srovnání s CAT, bez zvýšené nekrózy; výrazně vyšší intenzita bolesti v porovnání s kontrolou, NCT nižší intenzita bolesti než u CAT (p < 0,05)	Nagl et al., 2003

Tabulka 4. Přehled vybraných studií *in vitro* a *in vivo* cytotoxicity OCT. HDF - lidské dermální fibroblasty, MSC - mezenchymální stomatální buňky, HEK – lidské epidermální keratinocyty

Testovaná látka	Experimentální subjekt	Cytotoxická koncentrace	Cytotoxicita/vliv na hojení/antimikrobiální účinky	Reference
0,0001 - 20 % OCT, <i>in vitro</i>	lidská krev	1 % lymfocyty, 10 % erytrocyty, 1 h	10% OCT 60 min hemolýza; 1 % smrt lymfocytů	Wagner et al., 2004
0,1% OCT w/v, <i>in vitro</i>	lidské primární gingivální fibroblasty a nosní epitely	0,1 %, 15 min	snížení viability a počtu buněk (p < 0,0001)	Schmidt, 2015
0,0001 - 1% OCT, <i>in vitro</i>	HDF, MSC	HDF 0,01 %, MSC 0,001 %	po 2 min <i>S. aureus</i> a <i>S. epidermis</i> 0,0033 %	van Meurs, 2014
0,1 - 0,0001 % OCT+ 2% PE, <i>in vitro</i>	HDF, HEK a HaCaT	HaCaT 0,003 %; HEK: 0,008 %; HDF: 0,004 %, 5 min		Hirsch et al., 2010
0,1% OCT + 2% PE, <i>in vitro</i>	HDF a myší dermální fibroblasty	0,1 %, 24 h	snížení životaschopnosti HDF o 79 % a myších o 23 %	Hájská et al., 2017

0,1% OCT + 2% PE, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929	IC50 = 0,002 %, 30 min	min. IC50: 0,002 %; max. IC50: 0,0027 %	Müller & Kramer, 2006
do 0,1 % OCT + 2% PE, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929	IC50 = 0,0038 %, 30 min	3 log <sub>10</sub> redukce <i>E. coli</i> : 0,00225 %; <i>S.aureus</i> : 0,00175 %	Müller & Kramer, 2008
0,1% OCT, <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i>	rekonstruovaná lidská epidermis, HEK	HEK: 0,1 %, 24 h	ve <i>stratum corneum</i> malé množství OCT, po 24 h redukce <i>P. aeruginosa</i> : 2,6 log <sub>10</sub> ; <i>S. aureus</i> : nedetekován	Müller et al., 2014
0,1 - 0,01% OCT + 2% PE, <i>ex vivo</i>	prasečí kůže, intaktní a bariérově narušená	0,1 %, 28 h	intaktní kůži neproniká. porušená kůže: v akceptorové komoře množství 6,28 µg/cm <sup>2</sup> (0,6 %) OCT z použitého 2000 µg. PE proniká intaktní prasečí kůži v množství 11,3 % a narušenou kůži v množství 43,9 %	Stahl et al., 2010
0,1% OCT + 2% PE, <i>ex vivo</i>	CAM slepičích embryí	0,1 %, 5 min	vážné podráždění cév; nepatrné účinky při 0,001 %	Marquardt, 2010
0,1% OCT + 2% PE, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	0,1 %	pomalejší reepiteizace ve srovnání s kontrolou, 12. týden zhojení 30,6 % ran (32 % kontrola), nežádoucí efekty v 17,7 % případech;	Vanscheidt et al., 2011
0,05% OCT gel, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	rychlejší granulace a epitelizace tkáně (p = 0,028) a snížení biologické zátěže v porovnání s moderními kryty na rány a kombinací krytů s OCT	Hämmerle & Strohal, 2016
0,1 a 0,05% OCT, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	významně rychlejší epitelizace (p = 0,0182), snížení bolesti a eradikace mikrobiologické flóry ve srovnání se stříbrnými obvazy	Krasowski et al., 2015
0,1% OCT, <i>in vivo</i>	chronické neoplastické rány	x	3. týden snížení nekrózy, hladiny exsudátu, erytému, edému, bolesti, bez výskytu infekce	Sopata et al., 2008
0,05% OCT gel, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány, popáleniny	x	bez negativního vlivu na epitelizaci, signifikantní snížení bakteriální kolonizace (p = 0,014) ve srovnání s placebem	Eisenbeiss et al., 2012
0,1% OCT + 2% PE, <i>in vivo</i>	prasečí povrchové aseptické rány	0,1%	signifikantně pomalejší a delší doba epitelizace ran a nižší neovaskularizace oproti PHMB a kontrole	Kramer et al., 2004

Tabulka 5. Přehled vybraných studií *in vitro* a *in vivo* cytotoxicity PHMB. HDF - lidské dermální fibroblasty. HEK - lidské epidermální keratinocyty

Testovaná látka	Experimentální subjekt	Cytotoxická koncentrace	Cytotoxicita/vliv na hojení/antimikrobiální účinky	Reference
0,001 - 1% PHMB, <i>in vitro</i>	Caco-2, HepG2 linie, Neuro-2A	HepG2 a Neuro-2A a 0,0035 %, IC50 Caco-2 0,0025 %, 24 h	0,002 - 0,01 %, nízká aktivita Kaspázy-3; HepG2 2 - 3krát vyšší produkce cytokinů (IL 1 α, TNF-α), 0,008% zvýšení TNF-α a nukleárního faktoru-κB v buňkách Caco-2 a Neuro-2A.	Creppy et al., 2014
0,04% PHMB, <i>in vitro</i>	lidské chondrocyty	0,04 %, 10 min	inhibice syntézy proteoglykanů: po 10 min na 12% (p < 0,05)	Röhner et al., 2011
0,04% PHMB, <i>in vitro</i>	lidské osteoblasty	0,04 %, 1 min	po 5 minutách smrštění buněk, zvýšená propustnost buněčné membrány a snížení mezibuněčné adheze	Vörös et al., 2014
0,01, 0,04 a 0,1% PHMB, <i>in vitro</i>	HDF, HEK a osteoblasty; 13 druhů plísni	0,01 %, 24 h	0,01 % po 24 h životaschopných: HDF 28 %, HEK 39 % a osteoblastů 18 %; při krátkodobém působení snížení viability při 0,04 % o cca 40 %; 0,01 % antifungální po 6 h	Yabes et al., 2017

PS 0,1 % PHMB, LS 0,2 % PHMB, <i>in vitro</i>	HDF, HEK, HaCaT	5 min, HaCaT: >0,02 % PS, >0,04 % LS; HDF: 0,0075 % PS, 0,01 % LS	*PS = Prontosan, *LS = Lavasept, pro HEK netoxické	Hirsch et al., 2010
0,00001 - 1% PHMB <i>in vitro</i>	HDF, MSC; <i>S.aureus</i> a <i>S.epidermidis</i>	0,001 %, 2 h	necytotoxická koncentrace = 0,0004%, po 2 min 0,005% baktericidní pro <i>S.epidermis</i> , pro <i>S.aureus</i> netoxický	van Meurs 2014
1% PHMB <i>in vitro</i>	HDF a myší dermální fibroblasty	1 %, 24 h	snížení životaschopnosti HDF o 88 % a myších o 91 %	Hájská et al., 2017
0,2 - 0,01 % PHMB, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty	0,01 %, 30 min	min. IC50: 0,0113 %; max. IC50: 0,0152 %	Müller & Kramer, 2006
0,2 - 0,01 % PHMB, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty; <i>S.aureus</i> a <i>E. coli</i>	IC50 0,0136 %, 30 min	3 log <sub>10</sub> redukce <i>E. coli</i> : 0,01 % mast; <i>S.aureus</i> : 0,0085% mast i roztok	Müller & Kramer, 2008
0,04% PHMB, <i>in vivo</i>	chronické rány a popáleniny kožní štěpy	x	lepší epitelizace oproti 1% SSD a PVP-I (bez debritementu po 10 dnech) a snížení bolesti, pojivová tkáň: neovaskularizace + přítomnost proliferativních fibrocytů a makrofágů v zánětlivé oblasti, granulocyty okolo cév	Daeschlein et al., 2007
0,1 a 0,04 % PHMB, <i>ex vivo</i>	CAM slepičích embryí	0,1 %, 1 h	0,1 % po 1 h vážně vaskulární podráždění, 0,04 % žádné dráždivé účinky	Marquardt et al., 2010
LS - 0,2% PHMB; <i>in vivo</i>	prasečí povrchové aseptické rány	x	28. den signifikantní snížení velikost rány ve srovnání s OCT a kontrolou (p < 0,05), reepitelizace po 22,9 dnech	Kramer et al., 2004
0,1% PHMB gel, <i>in vivo</i>	popáleniny II. stupně	x	rychlejší epitelizace a granulace rány, nižší míra bolesti, nižší doba léčby ve srovnání s 10% PVP-I	Mendes et al., 2014
0,1% PHMB, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	průměrná doba léčby: 3,31 měsíce ve srovnání se 4,42 měsíci u kontroly (p < 0,0001), větší snížení infekce	Andriesen & Eberlein 2008
0,1 % PHMB, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	signifikantní snížení velikosti rány, fibrinového filmu, nekrózy, snížení bolesti a biofilmu ve srovnání s kontrolou, po 60 dnech rány epitelizovány nebo granulovány	Durante et al., 2014
0,1 % PHMB, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	redukce zánětu (p = 0,03), zlepšení granulace tkáně (p = 0,043), snížení velikosti rány (p = 0,049), bez rozdílu v míře bolesti oproti kontrole	Bellienger et al., 2016
0,3% PHMB, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	rychlejší redukce mikroorganismů (p < 0,001) a bolesti (p < 0,001) ve srovnání s Ag obvazy; dobrá tolerance, bez nežádoucích účinků	Eberlein et al., 2012
0,5% PHMB pěnový obvaz, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	signifikantní snížení bolesti (p = 0,0006), mikroorganismů (p = 0,016) a velikosti rány po 4 týdnech o 35 % ve srovnání s kontrolou o 28 %	Sibbald et al., 2011
0,5% PHMB, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	lepší epitelizace, signifikantní snížení C-reaktivního proteinu oproti kontrole; zhojení rány po 15 ± 5 dnech (kontrola 16 ± 3 dnech)	Cerviker et al., 2015

Tabulka 6. Přehled vybraných studií *in vitro* a *in vivo* cytotoxicity CHX. HDF – lidské dermální fibroblasty, MSC – mesenchymální stomatální buňky, HEK – lidské epidermální keratinocyty

Testovaná látka	Experimentální subjekt	Cytotoxická koncentrace	Cytotoxicita/vliv na hojení/antimikrobiální účinky	Reference
0,2% CHX, <i>in vitro</i>	lidské gingivální fibroblasty a nosní epitel	0,2 %, 1 min	snížení metabolické aktivity, životaschopnosti a počtu buněk ( $p < 0,0001$ )	Schmidt, 2015
0,00005-0,025 % CHX, <i>in vitro</i>	HDF	0,01 %, 24 h	$\geq 0,02\%$ ztráta veškerého ATP; 0,0001% inhibice syntézy DNA	Hidalgo & Dominquez, 2001
0,002 - 0,12% CHX, <i>in vitro</i>	HDF a gingivální fibroblasty	0,005 %, 1 h; 0,12 %, 30 s	0,002% snížení počtu životaschopných buněk o 15 %, v gelu o 22 %, úplné potlačení buněčného dělení, inhibice syntézy celkového proteinu	Pucher et al., 2012
0,001 - 2% CHX, <i>in vitro</i>	HDF, MSC; <i>S.aureus</i> a <i>S.epidermidis</i>	0,04 %, 2 h	0,002 % necytotoxický účinek, 0,078 % baktericidní (1 % max baktericidní účinek)	van Meurs, 2014
PHMB, <i>in vitro</i>	HDF a HEK	HEK: 0,004 %; HDF: 0,002 - 0,0035 %, 15 min	IC50 HEK: 0,00359 % Hibitane; 0,0042 % Biseptine; IC50 HDF: 0,00211 % Hibitane; 0,00345 % Biseptine; baktericidní: 0,34 % Hibitane a 1,38 % Biseptine	Damour et al., 1992
0,0025 - 0,12% CHX, <i>in vitro</i>	osteoblastické buňky z lidských osteosarkomů, HDF, endotel	1 min, endotel: 0,12 %, fibroblasty a osteoblasty: 0,01 %	signifikantní ztráta mitochondriální funkce, aktinových filament; zvýšení cytoplasmatické a jaderné koncentrace $Ca^{2+}$ a produkce ROS po 15 min; buněčná smrt ve všech typech buněk při všech testovaných koncentracích po 5 min	Giannelli et al., 2008
0,1% CHX, <i>in vitro</i>	lidské osteoblasty	0,1 %, 1 min	po 5 min snížení mezibuněčných kontaktů	Vörös et al., 2014
CHX, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929	IC50 0,0063 %, 30 min	min. IC50: 0,0063 %, max. IC50: 0,0082 %	Müller & Kramer, 2006
0,000125 - 0,016% CHX, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929	0,0005 %, 24 h	Koncentračně závislé zvýšení a exprese Grp 78 proteinů a Bcl-2; nad 0,004 % naopak snížení exprese a nekróza	Faria et al., 2009
0,25% w/v, <i>in vitro</i>	myší fibroblasty L929; <i>S. aureus</i> a <i>E. coli</i>	IC50 0,0083 %, 30 min	3 $\log_{10}$ redukce <i>E. coli</i> : 0,01%; <i>S.aureus</i> : 0,0085% po 30 min	Muller & Kramer, 2008
0,12% CHX, <i>in vitro</i>	myší gingivální fibroblasty a makrofágy	0,12 %, 24 h	snížení procenta fibroblastů a makrofágů v S fázi ve srovnání s kontrolou ( $p < 0,05$ )	Hernandez et al., 2005
do 0,001% CHX, <i>in vitro</i>	myší makrofágy linie RAW264.7	0,0005 %, 4 h	Po 2 h 0,00001 - 0,001% nekróza závislá na dávce ( $p < 0,05$ ). 0,0005 % apoptóza buněk	Li et al., 2014
CHX, <i>in vitro</i>	myší thymocyty	0,00269 %, 1 h		Nonami et al., 2016
do 0,02 % CHX, <i>in vitro</i>	potkaní jaterní mitochondrie; koňský slezinný ferritin	x	$> 0,0017\%$ indukce uvolňování $Fe^{2+}$ z ferritinu ( $p < 0,05$ ); otok mitochondriální membrány při 0,000042 % (za přítomnosti $Ca^{2+}$ ); 0,0019 %, peroxidace lipidů 20 min	Newton, 2004
2% (w/v) CHX, <i>ex vivo</i>	lidská epidermis - Franzovy difúzní cely	x	malá penetrace = horní vrstva 100 $\mu$ m: po 2 min 0,157 $\mu$ g/mg (0,0000157 %) a 24h 7,88 $\mu$ g/mg; 300 $\mu$ m: vrstva po 2 min $< 0,002$ $\mu$ g/mg ( $p > 0,005$ ), po 24h $< 1$ $\mu$ g/mg (0,0001 % CHX)	Karpanen et al., 2008

0,144% CHX, <i>ex vivo</i>	rekonstruovaná lidská epidermis, HEK	0,144 %, 24 h	ve <i>stratum corneum</i> jen malé množství, po 24 h 1,6 log <sub>10</sub> redukce <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i> : nedetekován (p < 0,05)	Müller, Langer et al., 2014
1% CHX gel, 0,12% roztok CHX, <i>in vivo</i>	potkaní rány ústní sliznice	x	bez negativních vlivů na rychlost epitelizace, 1% gel vyšší rychlost ve srovnání s 0,12% CHX a kontrolou (p = 0,03)	Kozlovsky, 2007
0,2% CHX <i>in vivo</i>	potkaní kůže	0,2 %	23. den vysoký poměr DNA/RNA; více glukosaminů než galaktoaminů; významně opožděná granulace ve srovnání s kontrolou	Paunio et al., 1978
0,2% CHX, <i>in vivo</i>	krysí rány ústní sliznice	x	neproniká intaktním epitelem ani ústní sliznicí, na poškozené sliznici hemolýza, intravaskulární granulocytóza a tvorba sraženin (2 min); bez poškození pojivové tkáně	Lindhe et al., 1970
0,1, 0,2 a 0,5% CHX <i>in vivo</i>	myší sliznice ústní dutiny	0,1 %	signifikantně horší epitelizace a granulace tkáně, nižší snížení velikosti ran oproti kontrole (0,1% CHX p < 0,01; 0,2% p < 0,05 a 0,5% p < 0,01); kompozice pojivové tkáně a fibrinu	Bassetti & Kallenber- ger, 1980
0,5% CHX, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány, popáleniny	x	lepší reepitelizace ran ve srovnání s 3 % PVP-I	Reimer et al., 2000
0,5% CHX, <i>in vivo</i>	lidské popáleniny	x	horší hojení oproti PVP-I; ztráta štěpu u 35,7 % případů (p = 0,001)	Vogt et al., 2001
5% CHX, <i>in vivo</i>	lidské chronické rány	x	rychlost i doba hojení mírně lepší v porovnání s kontrolou (o -1 - 5 %), snížení hustoty bakterií, dendrocytů, makrofágů, neutrofilů, fibroblastů a zánětu endotelu	Fumal et al., 2002

## 10 Závěr

Antiseptické přípravky představují nedílnou součást léčby chronických ran, díky svým schopnostem jsou toxické pro bakterie a napomáhají odstranit biologickou zátěž ran zpomalující proces hojení. Jejich aktivita však není omezena výhradně jen na mikroorganismy a mohou působit cytotoxicky na lidské buňky a tkáň a negativně ovlivňovat proces hojení. Tato práce byla zaměřena na cytotoxické působení nejčastěji používaných antiseptik, která jsem se rozhodla antiseptika rozdělit dle aktivních látek. Cílem této práce bylo popsat mechanismy působení na buňky, shrnout a porovnat dosavadní poznatky o jejich negativním vlivu *in vitro* a *in vivo*.

Nejméně cytotoxické na základě *in vivo* srovnání se jeví PHMB, které je zároveň v bezpečné koncentraci pro tkáň mikrobicidní. Na základě *in vitro* srovnání je nejméně toxické pro lidské buňky PVP-I, které je zároveň nejvíce prostudovaným antiseptikem je PVP-I. Je třeba vzít v potaz, že se tyto srovnávací testy však nebyly jednoznačné. Přípravky obsahující jod měly také dobré klinické výsledky, ale mnoho studií porovnávalo jeho účinnost *in vivo* s HOCl/NaOCl a prokázaly lepší vliv na hojení chronických ran a popálenin HOCl/NaOCl. Kryty na bázi nanocrystalického stříbra mají největší spektrum přípravků a je také v dnešní době nejpoužívanější antiseptikum, zejména Acticoat, které je také nejvíce testující *in vivo*. Tyto výzkumy se však svými výsledky neshodují i přesto, že stříbro prokázalo dobrou antibakteriální účinnost. Neméně negativních účinků bylo popsáno u chlorotaurinu, což může být zapříčiněno zejména tím, že je poměrně nový a publikace mohou být zaujatá propagací výrobku. Studie zkoumající CHX jsou zaměřené převážně na ústní buňky a tkáň, protože se CHX hojně používá pro ústní hygienu a studií zaměřených na chronické rány a dermální buňky je zatím velmi málo. Více pozornosti by si zasloužilo i poměrně nově zavedený oktenidin, který vykazuje dobrý vliv *in vivo* na reepitelizaci, který je však v rozporu s velmi nízkými cytotoxickými koncentracemi *in vitro*.

Výsledky studií *in vitro* i *in vivo* jsou velmi nejednoznačné a často velmi odlišné. V laboratorních výzkumech mohou být rozdíly zapříčiněny zejména odlišnými testovacími koncentracemi aktivních látek, různými časy působení. *In vitro* výsledky také mohly odlišit různá kultivační séra v různých koncentracích, která mají demonstrovat realističtější prostřední *in vivo* a odlišné buněčné linie. Testů hodnotících cytotoxicitu a životaschopnost buněk je více a jsou založené na různých principech. Odlišnost výsledků byla potvrzena Boonkaewem a kol., kteří použili pět testů cytotoxicity. Rozdíly mezi testy *in vivo* a *in vitro* může být zapříčiněny mimo jiné tím, že lidská tkáň je více odolná vůči vnějším vlivům včetně antiseptik než kultivované buňky. Velkou roli může také hrát zaujatost autorů, kteří mohou uvádět zejména kladné výsledky, zatímco se o negativních vlivech nezmiňují. Stává se to zejména u nově používaných antimikrobiálních látek, kde je snaha uvést daný výrobek na trh.

Publikací zkoumajících cytotoxicitu antiseptik je málo a je potřeba více kontrolovaných studií především *in vivo*, které porovnávají více antimikrobiálních látek mezi sebou za stejných podmínek. Pro vhodný výběr a vývoj antiseptických přípravků se správnou koncentrací aktivních látek, by bylo užitečné dále prostudovat a shrnout také poznatky o účincích proti mikroorganismům a biofilmům a porovnat je s cytotoxickým vlivem.

## 11 Reference

- Ahmed, K. B. R., Nagy, A. M., Brown, R. P., Zhang, Q., Malghan, S. G., & Goering, P. L. (2017). Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro*, 38, 179–192. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2016.10.012>
- Aiba, M., Ninomiya, J., Furuya, K., Arai, H., Ishikawa, H., Asaumi, S., ... Morishita, Y. (1999). Induction of a critical elevation of povidone-iodine absorption in the treatment of a burn patient: Report of a case. *Surgery Today*, 29(2), 157–159. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS%7B%7DPAGE=reference%7B%7DD=emed4%7B%7DNEWS=N%7B%7DAN=1999069092>
- Akter, M., Sikder, M. T., Rahman, M. M., Ullah, A. K. M. A., Hossain, K. F. B., Banik, S., ... Kurasaki, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2017.10.008>
- Allen, M. J., White, G. F., & Morby, A. P. (2006). The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology*, 152(4), 989–1000. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28643-0>
- Andriessen, A. E., & Eberlein, T. (2008). Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. *Wounds : A Compendium of Clinical Research and Practice*, 20(6), 171–175. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25942522>
- Argirova, M., & Hadjiiski, O. (2011). Application of the Nanocrystalline Silver in Treatment of Burn Wounds in Children. In *Skin Grafts - Indications, Applications and Current Research*. InTech. <https://doi.org/10.5772/24646>
- AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano*, 3(2), 279–290. <https://doi.org/10.1021/nm800596w>
- Atiyeh, B. S., Costagliola, M., Hayek, S. N., & Dibo, S. A. (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns*, 33(2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2006.06.010>
- Babich, H., Wurzbürger, B. J., Rubin, Y. L., Sinensky, M. C., & Blau, L. (1995). An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biology and Toxicology*, 11(2), 79–88. <https://doi.org/10.1007/BF00767493>
- Balin, A. K., & Pratt, L. (2002). Dilute Povidone-Iodine Solutions Inhibit Human Skin Fibroblast Growth. *Dermatologic Surgery*, 28(3), 210–214. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.2002.01161.x>
- Bassetti, C., & Kallenberger, A. (1980). Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *Journal of Clinical Periodontology*, 7(6), 443–456. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med2&NEWS=N&AN=6938525>
- Bellingeri, A., Falciani, F., Trapedini, P., Moscatelli, A., Russo, A., Tino, G., ... Peghetti, A. (2016). Effect of a wound cleansing solution on wound bed preparation and inflammation in chronic wounds: a single-blind RCT. *Journal of Wound Care*, 25(3), 160–168. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.3.160>
- Beukelman, C. J., van den Berg, A. J. J., Hoekstra, M. J., Uhl, R., Reimer, K., & Mueller, S. (2008). Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel®) for wound healing in vitro. *Burns*, 34(6), 845–855. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.11.014>
- Bigliardi, P. L., Alsagoff, S. A. L., El-Kafrawi, H. Y., Pyon, J.-K., Wa, C. T. C., & Villa, M. A. (2017). Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery*, 44, 260–268. <https://doi.org/10.1016/J.IJSU.2017.06.073>
- Boonkaew, B., Kempf, M., Kimble, R., & Cuttle, L. (2014). Cytotoxicity testing of silver-containing burn treatments using primary and immortal skin cells. *Burns*, 40(8), 1562–1569. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2014.02.009>
- Brandt, O., Mildner, M., Egger, A. E., Groessl, M., Rix, U., Posch, M., ... Stingl, G. (2012). Nanoscale silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(4), 478–488. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2011.07.005>
- Broxton, P., Woodcock, P. M., & Gilbert, P. (1983). A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3), 345–353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02627.x>
- Burd, A., Kwok, C. H., Hung, S. C., Chan, H. S., Gu, H., Lam, W. K., & Huang, L. (2007). A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair and Regeneration*, 15(1), 94–104. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2006.00190.x>
- Calow, T., Oberle, K., Bruckner-Tuderman, L., Jakob, T., & Schumann, H. (2009). Contact dermatitis due to use of Octenisept® in wound care. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 7(9), 759–765. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2009.07035.x>
- Cameron, S. J., Hosseinian, F., & Willmore, W. G. (2018). Molecular Sciences A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19072030>
- Cardile, A. P., Sanchez, C. J., Hardy, S. K., Romano, D. R., Hurtgen, B. J., Wenke, J. C., ... Akers, K. S. (2014). Dakin solution alters macrophage viability and function. *Journal of Surgical Research*, 192(2), 692–699. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2014.07.019>

- Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., ... Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*, 4(2), 114–122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x>
- Ceviker, K., Proffesor, A., Canikoglu, M., Tatlioglu, S., & Bagdatli, Y. (2008). Reducing the pathogen burden and promoting healing with polyhexanide in non-healing wounds: a prospective study polyhexamethylene biguanide; antiseptics; wound healing.
- Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2007.10.004>
- Daeschlein, G., Assadian, O., Bruck, J. C., Meinel, C., Kramer, A., & Koch, S. (2007). Feasibility and clinical applicability of polyhexanide for treatment of second-degree burn wounds. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(6), 292–296. <https://doi.org/10.1159/000107577>
- Daróczy, J. (2002). Antiseptic Efficacy of Local Disinfecting Povidone-Iodine (Betadine®) Therapy in Chronic Wounds of Lymphedematous Patients. *Dermatology*, 204(1), 75–78. <https://doi.org/10.1159/000057730>
- Daróczy, J. (2006). Quality Control in Chronic Wound Management: The Role of Local Povidone-Iodine (Betadine) Therapy. *Dermatology*, 212(1), 82–87. <https://doi.org/10.1159/000089204>
- De Paula, G. F., Netto, G. I., Mattoso, L. H. C., De Paula, G. F., Netto, G. I., & Mattoso, L. H. C. (2011). Physical and Chemical Characterization of Poly(hexamethylene biguanide) Hydrochloride. *Polymers*, 3(2), 928–941. <https://doi.org/10.3390/polym3020928>
- Djordjević, V. B. (2004). Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*, 237, 57–89. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)37002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)37002-6)
- Durani, P., & Leaper, D. (2008). Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. *International Wound Journal*, 5(3), 376–387. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00405.x>
- Durante, C. M., Greco, A., Sidoli, O., Maino, C., Gallarin, A., & Ciprandi, G. (2014). Evaluation of the effectiveness of a polyhexanide and propyl betaine-based gel in the treatment of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 22(3), 343–353.
- Eberlein, T., Haemmerle, G., Signer, M., Gruber-Moesenbacher, U., Traber, J., Mittlboeck, M., ... Strohal, R. (2012). Comparison of PHMB-containing dressing and silver dressings in patients with critically colonised or locally infected wounds. *Journal of Wound Care*, 21(1), 12–20. <https://doi.org/10.12968/jowc.2012.21.1.12>
- Eisenbeiß, W., Siemers, F., Amtsberg, G., Hinz, P., Hartmann, B., Kohlmann, T., ... Kramer, A. (2012). Efficacy of Octenidine-based hydrogel on skin graft wounds. *Int J Burn Trauma* 2012;2(2):71-79 . Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/8341/1db2bdf7cd95e4da086054e6d7bd9924ad8b.pdf>
- Faria, G., Cardoso, C. R. B., Larson, R. E., Silva, J. S., & Rossi, M. A. (2009). Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), 256–265. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2008.10.012>
- Fraser, J. F., Cuttle, L., Kempf, M., & Kimble, R. M. (2004). Cytotoxicity of topical antimicrobial agents used in burn wounds in Australasia. *ANZ Journal of Surgery*, 74(3), 139–142. <https://doi.org/10.1046/j.1445-2197.2004.02916.x>
- Fumal, I., Braham, C., Paquet, P., Piérard-Franchimont, C., & Piérard, G. E. (2002). The Beneficial Toxicity Paradox of Antimicrobials in Leg Ulcer Healing Impaired by a Polymicrobial Flora: A Proof-of-Concept Study. *Dermatology*, 204(1), 70–74. <https://doi.org/10.1159/000057729>
- Garlick, J. A. (2004). Human Skin-Equivalent Models of Epidermal Wound Healing: Tissue Fabrication and Biological Implication. In D. T. Rovee & H. I. Maibach (Eds.), *The epidermis in wound healing* (pp. 3–24).
- Ghannoum, M. A., Elteen, A. K., Ellabib, M., & Whittaker, P. A. (1990). *Antimycotic effects of octenidine and pirtenidine*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 25). Retrieved from <http://jac.oxfordjournals.org/>
- Giannelli, M., Chellini, F., Margheri, M., Tonelli, P., & Tani, A. (2008). Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in Vitro*, 22(2), 308–317. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2007.09.012>
- Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Gottardi, W., & Nagl, M. (2010). N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 399–409. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp466>
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Hadi, S. F., Khaliq \*, T., Bilal, N., Sikandar \*\*, Imran Muhammad, S. \*, Muhammad, Z., & Aurangze, S. (2007). Treating Infected Diabetic Wounds With Superoxidized Water As Anti-Septic Agent : *Journal of the College of Physicians and Surgeons*, 17(12), 740–743.
- Hajská, M., Dragúňová, J., & Koller, J. (2017). Cytotoxicity testing of burn wound dressings: first results. *Cell and Tissue Banking*, 18(2), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9621-x>
- Hämmerle, G., & Strohal, R. (2016). Efficacy and cost-effectiveness of octenidine wound gel in the treatment of chronic venous leg ulcers in comparison to modern wound dressings. *International Wound Journal*, 13(2), 182–188. <https://doi.org/10.1111/iwj.12250>
- Hansbrough, J. F., Zapata-Sirvent, R. L., & Cooper, M. L. (1991). Effects of Topical Antimicrobial Agents on the Human Neutrophil Respiratory Burst. *Archives of Surgery*, 126(5), 603. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1991.01410290079016>
- Harold, F. M., Baarda, J. R., Baron, C., & Abrams, A. (1969). Dio 9 and chlorhexidine: Inhibitors of membrane-bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 183(1), 129–136.



- Hegggers, J. P., Sazy, J. A., Stenberg, B. D., Strock, L. L., McCauley, R. L., Herndon, D. N., & Robson, M. C. Bactericidal and wound-healing properties of sodium hypochlorite solutions: the 1991 Lindberg Award., 12 *The Journal of burn care & rehabilitation* § (1991). Published - 1991: Lippincott Williams and Wilkins. Retrieved from <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.33.0b/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=DJGFFPPKICDDJEMKNCDKBHMCINMHAA00&returnUrl=ovidweb.cgi%3FMain%2BSearch%2BPage%3D1%26S%3DDJGFFPPKICDDJEMKNCDKBHMCINMHAA00&directlink=http%3A%2F%2Fovidsp.tx.ovid.com%2Fovftpdfs%2FFPDDNCMCB>
- Hernandez, E. P., Botero, T. M., Mantellini, M. G., McDonald, N. J., & Nor, J. E. (2005). Effect of ProRootR MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro\*. *International Endodontic Journal*, 38(2), 137–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00922.x>
- Hidalgo, E., Bartolomé, R., Barroso, C., Moreno, A., & Domínguez, C. (1998). *Silver Nitrate: Antimicrobial Activity Related to Cytotoxicity in Cultured Human Fibroblasts. Original Research Article Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* (Vol. 11). Retrieved from <http://biomednet.com/karger>
- Hidalgo, E., Bartolome, R., & Dominguez, C. (2002). Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chemico-Biological Interactions*, 139(3), 265–282. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00003-0)
- Hidalgo, E., & Dominguez, C. (1998). Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicology Letters*, 98(3), 169–179. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00114-3)
- Hidalgo, E., & Dominguez, C. (2000). Growth-altering effects of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts. *Life Sciences*, 67(11), 1331–1344. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00727-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00727-X)
- Hidalgo, E., & Dominguez, C. (2001). Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 15(4–5), 271–276. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00020-0)
- Hirsch, T., Koerber, A., Jacobsen, F., Dissemond, J., Steinau, H. U., Gatermann, S., ... Steintraesser, L. (2010). Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics in vitro. *Journal of Surgical Research*, 164(2), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.04.029>
- Huang, Y., Li, X., Liao, Z., Zhang, G., Liu, Q., Tang, J., ... Luo, Q. (2007). A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. *Burns*, 33(2), 161–166. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2006.06.020>
- Hübner, N. O., & Kramer, A. (2010). Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(SUPPL. 1), 17–27. <https://doi.org/10.1159/000318264>
- Hübner, N. O., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Octenidine Dihydrochloride, a Modern Antiseptic for Skin, Mucous Membranes and Wounds. *Skin Pharmacol Physiol*, 23, 244–258. <https://doi.org/10.1159/000314699>
- Hugo, W. B. (1991). A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(1), 9–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04657.x>
- Ikeda, T., Ledwith, A., Bamford, C. H., & Hann, R. A. (1984). Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 769(1), 57–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90009-9)
- Kaehn, K. (2010). Polihexanide: A Safe and Highly Effective Biocide. *Skin Pharmacol Physiol*, 23(1), 7–16. <https://doi.org/10.1159/000318237>
- Kanno, E., Tanno, H., Suzuki, A., Kamimatsuno, R., & Tachi, M. (2016). Reconsideration of iodine in wound irrigation: the effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Journal of Wound Care*, 25(6), 335–339. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.6.335>
- Kapur, V., & Marwaha, A. K. (2011). Evaluation of effect and comparison of superoxidised solution (oxum) v/s povidone iodine (betadine). *The Indian Journal of Surgery*, 73(1), 48–53. <https://doi.org/10.1007/s12262-010-0189-y>
- Karinja, S. J., & Spector, J. A. (2018). Treatment of Infected Wounds in the Age of Antimicrobial Resistance. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 142(4), 1082–1092. <https://doi.org/10.1097/prs.00000000000004799>
- Karpanen, T. J., Worthington, T., Conway, B. R., Hilton, A. C., Elliott, T. S. J., & Lambert, P. A. (2008). Penetration of chlorhexidine into human skin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3633–3636. <https://doi.org/10.1128/AAC.00637-08>
- Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2015). Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application, 1321–1326.
- Kodedová, M., Sigler, K., Lemire, B. D., & Gášková, D. (2011). Fluorescence method for determining the mechanism and speed of action of surface-active drugs on yeast cells. *BioTechniques*, 50(1), 58–63. <https://doi.org/10.2144/000113568>
- König, B., Reimer, K., Fleischer, W., & König, W. (1997). Effects of Betaisodona® on Parameters of Host Defense. *Dermatology*, 195(2), 42–48. <https://doi.org/10.1159/000246029>
- Kontny, E., Grabowska, A., Kowalczewski, J., Kurowska, M., Janicka, I., Marcinkiewicz, J., & Maśliński, W. (1999). Taurine chloramine inhibition of cell proliferation and cytokine production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 42(12), 2552–2560. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199912\)42:12<2552::AID-ANR7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199912)42:12<2552::AID-ANR7>3.0.CO;2-V)
- Kozlovsky, A., Artzi, Z., Hirshberg, A., Israeli-Tobias, C., & Reich, L. (2007). Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(2), 164–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.01033.x>
- Kozol, R. A., Gillies, C., & Elgebaly, S. A. (1988). Effects of Sodium Hypochlorite (Dakin's Solution) on Cells of the Wound

- Module. *Archives of Surgery*, 123(4), 420–423. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1988.01400280026004>
- Kramer, A., Dissemond, J., Kim, S., Willy, C., Mayer, D., Papke, R., ... Assadian, O. (2018). Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(1), 28–58. <https://doi.org/10.1159/000481545>
- Kramer, A., Roth, B., Müller, G., Rudolph, P., & Klöcker, N. (2004). Influence of the Antiseptic Agents Polyhexanide and Octenidine on FL Cells and on Healing of Experimental Superficial Aseptic Wounds in Piglets. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(3), 141–146. <https://doi.org/10.1159/000077241>
- Krasowski, G., Jawieñ, A., Tukiendorf, A., Rybak, Z., Junka, A., Olejniczak-Nowakowska, M., ... Smutnicka, D. (2015). A comparison of an antibacterial sandwich dressing vs dressing containing silver. *Wound Repair and Regeneration*, 23(4), 525–530. <https://doi.org/10.1111/wrr.12301>
- Krautheim, A. B., Jermann, T. H. M., & Bircher, A. J. (2004). Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis*, 50(3), 113–116. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2004.00308.x>
- Lam, P. K., Chan, E. S. Y., Ho, W. S., & Liew, C. T. (2004). In vitro cytotoxicity testing of a nanocrystalline silver dressing (Acticoat) on cultured keratinocytes. *British Journal of Biomedical Science*, 61(3), 125–127. <https://doi.org/10.1080/09674845.2004.11732656>
- Lamme, E. N., Gustafsson, T. O., & Middelkoop, E. (1998). Cadexomer-iodine ointment shows stimulation of epidermal regeneration in experimental full-thickness wounds. *Archives of Dermatological Research*, 290(1–2), 18–24. <https://doi.org/10.1007/s004030050271>
- Lapenna, D., & Cuccurullo, F. (1996). Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: An update picture. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(7), 1145–1147. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00063-8)
- Larese, F. F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., & Maina, G. (2009). Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, 255(1–2), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.025>
- Le Ouay, B., & Stellacci, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today*. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>
- Leeper, D. J. (2006). Silver dressings: Their role in wound management. *International Wound Journal*, 3(4), 282–294. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00265.x>
- Leeper, D. J., & Durani, P. (2008). Topical antimicrobial therapy of chronic wounds healing by secondary intention using iodine products. *International Wound Journal*, 5(2), 361–368. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00406.x>
- Li, Y.-C., Kuan, Y.-H., Lee, S.-S., Huang, F.-M., & Chang, Y.-C. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages *in vitro*. *Environmental Toxicology*, 29(4), 452–458. <https://doi.org/10.1002/tox.21771>
- Lindhe, J., Heyden, G., Svanberg, G., Loe, H., & Rindom Schiott, C. (1970). Effect of local applications of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. *Journal of Periodontal Research*, 5(3), 177–182. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00713.x>
- Lineaweaver, W., Howard, R., Soucy, D., McMorris, S., Freeman, J., Crain, C., ... Rumley, T. (1985). Topical Antimicrobial Toxicity. *Archives of Surgery*, 120(3), 267–270. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1985.01390270007001>
- Lo, S.-F., Chang, C.-J., Hu, W.-Y., Hayter, M., & Chang, Y.-T. (2009). The effectiveness of silver-releasing dressings in the management of non-healing chronic wounds: a meta-analysis. *The Authors. Journal Compilation Ó*, 18, 716–728. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2008.02534.x>
- Marcinkiewicz, J., Nowak, B., Grabowska, A., Bobek, M., Petrovska, L., & Chain, B. (1999). Regulation of murine dendritic cell functions *in vitro* by taurine chloramine, a major product of the neutrophil myeloperoxidase-halide system. *Immunology*, 98(3), 371–378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00905.x>
- Marquardt, C., Matuschek, E., Bölke, E., Gerber, P. A., Peiper, M., V Seydlitz-Kurzbach, J., ... Fleischmann, W. (2010). Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). *European Journal of Medical Research*, 15(5), 204–209. <https://doi.org/10.1186/2047-783X-15-5-204>
- Mazurak, V. C., Burrell, R. E., Tredget, E. E., Clandinin, M. T., & Field, C. J. (2007). The effect of treating infected skin grafts with Acticoat™ on immune cells. *Burns*, 33(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2006.04.027>
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
- McShan, D., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2014.01.010>
- Mendes, J., & Rodrigues, A. (2014). AN OBSERVATIONAL STUDY ABOUT THE PERFORMANCE OF A W... *Health & Medicine*. Retrieved from <https://www.slideshare.net/EWMA/ewma-2014-ep436-an-observational-study-about-the-performance-of-a-wound-gel-for-the-treatment-of-burn-wounds>
- Moore, K., Thomas, A., & Harding, K. G. (1997). Iodine released from the wound dressing iodisorb modulates the secretion of cytokines by human macrophages responding to bacterial lipopolysaccharide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(1), 163–171. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00128-8)
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Müller, G., & Kramer, A. (2006). Comparative study of *in vitro* cytotoxicity of povidone-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel®) and selected antiseptics. *Dermatology*, 212(SUPPL. 1), 91–93. <https://doi.org/10.1159/000090102>
- Müller, G., & Kramer, A. (2008). Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1281–1287. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn125>

- Müller, G., Langer, J., Siebert, J., & Kramer, A. (2014). Residual antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride on reconstructed human epidermis. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000350172>
- Nagl, M., Arnitz, R., & Lackner, M. (2018). N-Chlorotaurine, a Promising Future Candidate for Topical Therapy of Fungal Infections. *Mycopathologia*, 183(1), 161–170. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0175-z>
- Nagl, M., & Gottardi, W. (1998). Rapid Killing of *Mycobacterium terrae* by N-Chlorotaurine in the Presence of Ammonium is Caused by the Reaction Product Monochloramine. *J. Pharm., Pharmacol* (Vol. 50). Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03351.x>
- Nagl, M., Nguyen, V. A., Gottardi, W., Ulmer, H., & Hopfl, R. (2003). 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), 590–597. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05432.x>
- Nebraska redox biology center educational portal. (n.d.). Retrieved July 25, 2019, from [http://genomics.unl.edu/RBC\\_EDU/hca.html](http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/hca.html)
- Newton, N. A. P., Cadena, S. M. S., Merlin Rocha, M. E., Skäre Carnieri, E. G., & Martinelli de Oliveira, M. B. (2004). New data on biological effects of chlorhexidine: Fe<sup>2+</sup> induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. *Toxicology Letters*, 151(3), 407–416. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2004.02.013>
- Niezgoda, J. A., Sordi, P. J., & Hermans, M. H. E. (2010). Evaluation of Vashe Wound Therapy in the Clinical Management of Patients with Chronic Wounds. *Advances in Skin & Wound Care*, 23(8), 352–357. <https://doi.org/10.1097/01.asw.0000383198.35815.a2>
- Noda, Y., Fujii, K., & Fujii, S. (2009). Critical evaluation of cadexomer-iodine ointment and povidone-iodine sugar ointment. *International Journal of Pharmaceutics*, 372(1–2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2009.01.007>
- Nonami, K., Saitoh, S., Nishimura-Danjobara, Y., Ishida, S., & Oyama, Y. (2016). Chlorhexidine possesses unique cytotoxic actions in rat thymic lymphocytes: Its relation with electrochemical property of membranes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 17–21. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2016.09.024>
- Ohtani, T., Mizuashi, M., Ito, Y., & Aiba, S. (2007). Cadexomer as well as cadexomer iodine induces the production of proinflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor by human macrophages. *Experimental Dermatology*, 16(4), 318–323. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00532.x>
- Panasenko, O. M. (1997). The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation. *BioFactors*, 6(2), 181–190. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060212>
- Pandey, P. K., Koushariya, M., Shukla, S., & Das, S. (2011). Outcomes of superoxide solution dressings in surgical wounds: a randomized case control trial. *International Journal of Biological & Medical Research*, 2(4), 965 – 968. Retrieved from [www.biomedscidirect.com](http://www.biomedscidirect.com)
- Park, E., Jia, J., Quinn, M. R., & Schuller-levis, G. (2002). Taurine Chloramine Inhibits Lymphocyte Proliferation and Decreases Cytokine Production in Activated Human Leukocytes. *Clinical Immunology*, 102(2), 179–184. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5160>
- Park, J. B., & Park, N.-H. (1989). Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 67(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(89\)90320-4](https://doi.org/10.1016/0030-4220(89)90320-4)
- Paunio, K. U., Knuutila, M., & Mielityinen, H. (1978). The Effect of Chlorhexidine Gluconate on the Formation of Experimental Granulation Tissue. *Journal of Periodontology*, 49(2), 92–95. <https://doi.org/10.1902/jop.1978.49.2.92>
- Peck, B., Workeneh, B., Kadikoy, H., Patel, S. J., & Abdellatif, A. (2011). Spectrum of sodium hypochlorite toxicity in man--also a concern for nephrologists. *Clinical Kidney Journal*, 4(4), 231–235. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfr053>
- Percival, S. L., Cooper, R. A., & Lipsky, B. A. (2010). Antimicrobial Interventions for Wounds. In *Microbiology of wounds* (p. 187).
- Perrin, T., Hemett, O. M., Menth, M., & Descombes, E. (2012). Contrast-induced acute kidney injury following iodine opacification other than by intravascular injection. *Clinical Kidney Journal*, 5(5), 456–458. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfs102>
- Piaggese, A., Goretti, C., Mazzurco, S., Tascini, C., Leonildi, A., Rizzo, L., ... Del Prato, S. (2010). A randomized controlled trial to examine the efficacy and safety of a new super-oxidized solution for the management of wide postsurgical lesions of the diabetic foot. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 9(1), 10–15. <https://doi.org/10.1177/1534734610361945>
- Politano, A. D., Campbell, K. T., Rosenberger, L. H., & Sawyer, R. G. (2013). Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. *Surgical Infections*, 14(1), 8–20. <https://doi.org/10.1089/sur.2011.097>
- Ponzano, G. P. (2007). Sodium hypochlorite: History, properties, electrochemical production. *Contributions to Nephrology*, 154, 7–23. <https://doi.org/10.1159/000096810>
- Poon, V. K. M., & Burd, A. (2004). In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns*, 30(2), 140–147. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2003.09.030>
- Potgieter, M. D., & Meidany, P. (2018). Evaluation of the penetration of nanocrystalline silver through various wound dressing mediums: An in vitro study. *Burns*, 44(3), 596–602. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2017.10.011>
- Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
- Pucher, J. J., & Daniel, C. (2012). The Effects of Chlorhexidine Digluconate on Human Fibroblasts In Vitro. *Journal of Periodontology*, 63(6), 526–532. <https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.6.526>
- Pullar, J. M., Vissers, M. C. M., & Winterbourn, C. C. (2000). *Critical Review Living with a Killer: The Effects of Hypochlorous Acid on Mammalian Cells. IUBMB Life* (Vol. 50). Retrieved from

<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/713803731>

- Punjataewakupt, A., Napavichayanun, S., & Aramwit, P. (2019). The downside of antimicrobial agents for wound healing. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(1), 39–54. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3393-5>
- Rabenberg, V. S., Ingersoll, C. D., Sandrey, M. A., & Johnson, M. T. (2002). The Bactericidal And Cytotoxic Effects OfAntimicrobial Wound Cleansers. *Journal of Athletic Training*, 37. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/280884478\\_Cytotoxic\\_and\\_bactericidal\\_effects\\_of\\_povidone-iodine](https://www.researchgate.net/publication/280884478_Cytotoxic_and_bactericidal_effects_of_povidone-iodine)
- Radu, C. A., Gazyakan, E., Germann, G., Riedel, K., Reichenberger, M., & Ryssel, H. (2011). Optimizing Suprathel®-therapy by the use of Octenidine-Gel®. *Burns*, 37(2), 294–298. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2010.07.001>
- Reimer, K., Vogt, P. M., Broegmann, B., Hauser, J., Rossbach, O., Kramer, A., ... Fleischer, W. (2000). An innovative topical drug formulation for wound healing and infection treatment: In vitro and in vivo investigations of a povidone-iodine liposome hydrogel. *Dermatology*, 201(3), 235–241. <https://doi.org/10.1159/000018494>
- Rodeheaver, G., Bellamy, W., Kody, M., Spatafora, G., Fitton, L., Leyden, K., & Edlich, R. (1982). Bactericidal Activity and Toxicity of Iodine-Containing Solutions in Wounds. *Archives of Surgery*, 117(2), 181. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1982.01380260051009>
- Röhner, E., Hoff, P., Winkler, T., Roth, P. von, Seeger, J. B., Perka, C., & Matziolis, G. (2011). Polyhexanide and hydrogen peroxide inhibit proteoglycan synthesis of human chondrocytes. *Journal of Histotechnology*, 34(1), 35–39. <https://doi.org/10.1179/014788811x12949268296121>
- Roth, B., & Brill, F. H. H. (2010). Polihexanide for wound treatment-How it began. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(SUPPL. 1), 4–6. <https://doi.org/10.1159/000318236>
- Russell, A. D., & Day, M. J. (1993). Antibacterial activity of chlorhexidine. *The Journal of Hospital Infection*, 25(4), 229–238. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(93\)90109-D](https://doi.org/10.1016/0195-6701(93)90109-D)
- Sato, S., Miyake, M., Hazama, A., & Omori, K. (2014). Povidone-iodine-induced cell death in cultured human epithelial HeLa cells and rat oral mucosal tissue. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(3), 268–275. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.846364>
- Schmidt, J., Zyba, V., Jung, K., Rinke, S., Haak, R., Mausberg, R. F., & Ziebolz, D. (2015). Cytotoxic effects of octenidine mouth rinse on human fibroblasts and epithelial cells - An in vitro study. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(3), 322–330. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1121274>
- Schnuch, A., Geier, J., Uter, W., Basketter, D. A., & Jowsey, I. R. (2007). The biocide polyhexamethylene biguanide remains an uncommon contact allergen. *Contact Dermatitis*, 56(4), 235–239. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01089.x>
- Segura, J. J., Jiménez-Rubio, A., Guerrero, J. M., & Calvo, J. R. (1999). Comparative effects of two endodontic irrigants, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. *Journal of Endodontics*, 25(4), 243–246. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(99\)80151-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80151-4)
- Selkon, J. B., Cherry, G. W., Wilson, J. M., & Hughes, M. A. (2006). Evaluation of hypochlorous acid washes in the treatment of chronic venous leg ulcers. *Journal of Wound Care*, 15(1), 33–37. <https://doi.org/10.12968/jowc.2006.15.1.26861>
- Shin, S. H., Ye, M. K., Kim, H. S., & Kang, H. S. (2007). The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 7(13), 1813–1818. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.08.025>
- Sibbald, R. G., Coutts, P., & Woo, K. Y. (2011). Reduction of Bacterial Burden and Pain in Chronic Wounds Using a New Polyhexamethylene Biguanide Antimicrobial Foam Dressing-Clinical Trial Results. *Advances in Skin & Wound Care*, 24(2), 78–84. <https://doi.org/10.1097/01.asw.0000394027.82702.16>
- Sopata, M., Ciupińska, M., Głowacka, A., Muszyński, Z., & Tomaszewska, E. (2008). Effect of Octenisept antiseptic on bioburden of neoplastic ulcers in patients with advanced cancer. *Journal of Wound Care*, 17(1), 24–27. <https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.1.27975>
- Sopata, M., Tomaszewska, E., Muszyński, Z., Ciupińska, M., & Kotlińska-Lemieszek, A. (2013). The pilot study assessing efficacy and versatility of novel therapy for neoplastic ulceration: clinical and microbiological aspects. *Postępy Dermatologii i Alergologii*, 30(4), 237–245. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.37034>
- Stahl, J., Braun, M., Siebert, J., & Kietzmann, M. (2010). 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 skin. *International Wound Journal*, 7(1), 62–69. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00648.x>
- Stief, T. W., Kurz, J., Doss, M. O., & Fareed, J. (2000). Singlet Oxygen Inactivates Fibrinogen, Factor V, Factor VIII, Factor X, and Platelet Aggregation of Human Blood. *Thrombosis Research*, 97(6), 473–480. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(99\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(99)00211-X)
- Strýja, J. (2008). *Repetitorium hojení ran*. (GEUM, Ed.).
- Szmyd, R., Goralczyk, A. G., Skalniak, L., Cierniak, A., Lipert, B., Filon, F. L., ... Jolanta, J. (2013). Effect of silver nanoparticles on human primary keratinocytes. *Biological Chemistry*, 394(1), 113–123. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0202>
- Tandjung, L., Waltimo, T., Hauser, I., Heide, P., Decker, E.-M., & Weiger, R. (2007). Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. *International Endodontic Journal*, 40(11), 845–851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01279.x>
- Tatsumi, T., & Fliss, H. (1994). Hypochlorous acid and chloramines increase endothelial permeability: possible involvement of cellular zinc. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 267(4), H1597–H1607. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.4.h1597>
- Test, S. T., Lampert, M. B., Ossanna, P. J., Thoene, J. G., & Weiss, S. J. (1984). Generation of nitrogen-chlorine oxidants by human phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 74(4), 1341–1349. <https://doi.org/10.1172/JCI111544>

- Thomas, E. L., Grisham, M. B., & Jefferson, M. M. (1983). Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 72(2), 441–454. <https://doi.org/10.1172/JCI110992>
- Tomic-Canic, M., Ågren, M. S., & Alvarez, O. M. (2004). Epidermal Repair and the Chronic Wound. In D. T. Rovee & H. I. Maibach (Eds.), *The epidermis in wound healing* (pp. 25-580-).
- Toy, L. W., & Macera, L. (2011). Evidence-based review of silver dressing use on chronic wounds. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 23(4), 183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2011.00600.x>
- Tredget, E. E., Shankowsky, H. A., Groeneveld, A., & Burrell, R. (1998). A Matched-Pair, Randomized Study Evaluating the Efficacy and Safety of Acticoat\* Silver-Coated Dressing for the Treatment of Burn Wounds. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 19(6), 531–537. <https://doi.org/10.1097/00004630-199811000-00013>
- Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., & Goessler, W. (2006). Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*, 60(3), 648–652. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000208126.22089.b6>
- Van den Broek, P. J., Buys, L. F., & Van Furth, R. (1982). Interaction of povidone-iodine compounds, phagocytic cells, and microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(4), 593–597. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181472>
- van Meurs, S. J., Gawlitta, D., Heemstra, K. A., Poolman, R. W., Vogely, H. C., & Kruijff, M. C. (2014). Selection of an Optimal Antiseptic Solution for Intraoperative Irrigation. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 96(4), 285–291. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00313>
- Vanscheidt, W., Harding, K., Téot, L., & Siebert, J. (2012). Effectiveness and tissue compatibility of a 12-week treatment of chronic venous leg ulcers with an octenidine based antiseptic - a randomized, double-blind controlled study. *International Wound Journal*, 9(3), 316–323. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00886.x>
- Vermeulen, H., Westerbos, S. J., & Ubbink, D. T. (2010). Benefit and harm of iodine in wound care: a systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 76(3), 191–199. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2010.04.026>
- Vick, L. R., Propst, R.-C., Bozeman, R., & Wysocki, A. B. (2009). Effect of Dakin's Solution on Components of a Dermal Equivalent. *Journal of Surgical Research*, 155(1), 54–64. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2008.08.007>
- Viljanto, J. (1980). Disinfection of Surgical Wounds Without Inhibition of Normal Wound Healing. *Archives of Surgery*, 115(3), 253–256. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1980.01380030009003>
- Vlachou, E., Chipp, E., Shale, E., Wilson, Y. T., Papini, R., & Moiemmen, N. S. (2007). The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption. *Burns*, 33(8), 979–985. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2007.07.014>
- Vogt, P. M., Hauser, J., Robbach, O., Bosse, B., Fleischer, W., Steinau, H. U., & Reimer, K. (2001). Polyvinyl pyrrolidone-iodine liposome hydrogel improves epithelialization by combining moisture and antiseptics. A new concept in wound therapy. *Wound Repair and Regeneration*, 9(2), 116–122. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2001.00116.x>
- Vörös, P., Dobrindt, O., Perka, C., Windisch, C., Matziolis, G., & Röhner, E. (2014). Human osteoblast damage after antiseptic treatment. *International Orthopaedics*, 38(1), 177–182. <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2107-y>
- Wagner, K.-H., Jürß, A., Zarembach, B., & Elmadfa, I. (2004). Impact of antiseptics on radical metabolism, antioxidant status and genotoxic stress in blood cells: povidone-iodine versus octenidine dihydrochloride. *Toxicology in Vitro*, 18(4), 411–418. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2003.12.001>
- Wang, L., Qin, W., Zhou, Y., Chen, B., Zhao, X., Zhao, H., ... Ning, J. (2017). Transforming growth factor  $\beta$  plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Scientific Reports*, 7(1), 991. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01116-5>
- Wiegand, C., Abel, M., Ruth, P., & Hipler, U. C. (2009). HaCaT keratinocytes in co-culture with Staphylococcus aureus can be protected from bacterial damage by polyhexanide. *Wound Repair and Regeneration*, 17(5), 730–738. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00536.x>
- Woo, K. Y. (2014). Management of non-healable or maintenance wounds with topical povidone iodine. *International Wound Journal*, 11(6), 622–626. <https://doi.org/10.1111/iwj.12017>
- Wright, J. B., Lam, K., Buret, A. G., Olson, M. E., & Burrell, R. E. (2002). Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair and Regeneration*, 10(3), 141–151. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2002.10308.x>
- Yabes, J. M., White, B. K., Murray, C. K., Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., ... Akers, K. S. (2017). In Vitro activity of Manuka Honey and polyhexamethylene biguanide on filamentous fungi and toxicity to human cell lines. *Medical Mycology*, 55(3), 334–343. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw070>
- Zamora, J. L. (1986). Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions. *The American Journal of Surgery*, 151(3), 400–406. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(86\)90477-0](https://doi.org/10.1016/0002-9610(86)90477-0)
- Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., & Chen, C. (2014). Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Medical Journal*, 55(2), 283. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.2.283>
- Zhou, L. H., Nahm, W. K., Badiavas, E., Yufit, T., & Falanga, V. (2002). Slow release iodine preparation and wound healing: in vitro effects consistent with lack of in vivo toxicity in human chronic wounds. *British Journal of Dermatology*, 146(3), 365–374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04605.x>