

Enzymová léčba infekcí kůže a měkkých tkání

Kobzová Š.¹, Vacek L.^{1,2}, Lipový B.³, Hanslianová M.⁴, Vojtová L.⁵, Janda L.¹

¹Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

²Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno

³Klinika popálenin a rekonstrukční chirurgie, Fakultní nemocnice Brno

⁴Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

⁵Pokročilé biomateriály, CEITEC – Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně

SOUHRN

Zánětlivá onemocnění kůže a měkkých tkání představují významnou skupinu infekcí člověka. Jejich nejčastějšími původci jsou bakterie *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. S ohledem na pokračující růst antibiotické rezistence těchto patogenů se aktuální výzkum zaměřuje na hledání nových látek účinných na infekce, u nichž selhává konvenční antimikrobní terapie. Slibnou v tomto smyslu je léčba založená na antibakteriálním účinku enzymatických preparátů (tzv. enzybiotik), které degradují bakteriální buněčnou stěnu. Tyto látky působí specificky na daný patogen, nikoliv však na kožní mikrobiom, což příznivě ovlivňuje léčebný proces. Enzymy mohou být špatně rozpustné, nestabilní nebo se rychle eliminují z organismu, a proto je snaha o vytvoření tzv. „biobetters“, enzymů s vylepšenými vlastnostmi. Důraz je také kladen na vývoj nových nosičů pro enzybiotika či krytů s hojivým efektem, do nichž jsou enzymy inkorporovány.

KLÍČOVÁ SLOVA

infekce kůže a měkkých tkání – enzybiotika – antibakteriální účinek – rezistence – biobetters – antibakteriální kožní kryt

ABSTRACT

Kobzová Š., Vacek L., Lipový B., Hanslianová M., Vojtová L., Janda L.: Enzyme-based treatment of skin and soft tissue infections

Inflammatory diseases of the skin and soft tissues are an important group of human infections. The most common causes are the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Given the growing resistance of these pathogens to antimicrobials, the current research focuses on the search for novel therapeutic options that would be effective against infections refractory to conventional antimicrobials. A promising alternative is the use of enzyme-based antimicrobials (enzybiotics) that degrade the bacterial cell wall. They target the specific pathogen but do not affect the skin microbiome, thus helping the healing process. As enzymes can be poorly soluble, unstable, or subject to rapid elimination from the body, efforts are made to create biobetters, i.e., enzymes with improved characteristics. Emphasis is also put on the development of novel enzybiotic carriers or wound healing dressings with integrated enzymes.

KEYWORDS

skin and soft tissue infections – enzybiotics – antibacterial activity – resistance – biobetters – antibacterial wound dressing

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2021;70(1):52–61

INFEKCE KŮŽE A MĚKKÝCH TKÁNÍ

Infekce kůže a měkkých tkání (SSTIs – Skin and Soft Tissue Infections) představují heterogenní skupinu onemocnění s širokým spektrem klinických projevů [1, 2]. V této skupině jsou obsažena nejen relativně mírná a terapeuticky velmi dobře ovlivnitelná onemocnění, ale také stavy, které bezprostředně ohrožují pacienta na životě. S tímto typem infekční komplikace se proto může setkat lékař v primární péči i specialista na urgentním příjmu.

Vzhledem ke klinické symptomatologii existuje několik klasifikačních schémat, které zpravidla respektují následující kritéria [3]:

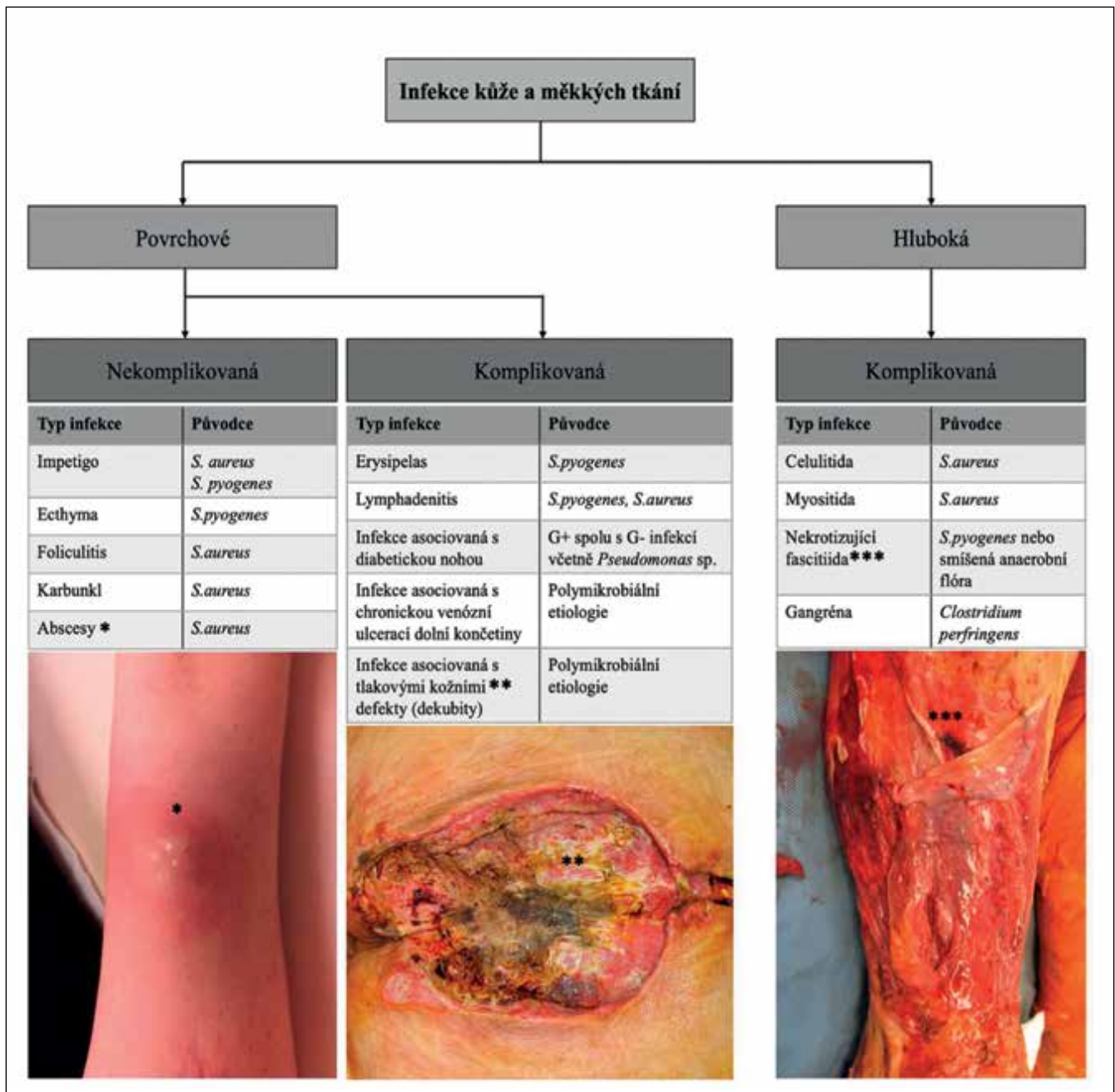
1. Rozsah kožního poškození
2. Dynamika progresu (akutní a chronické infekce)
3. Přítomnost nekrózy

Dalším důležitým parametrem, podle kterého se infekce kůže a měkkých tkání třídí, je hloubka tkáňového poškození (typicky epidermální infekce – např. impetigo nebo furunkl, nebo infekce zasahující hlouběji uložené struktury – např. myozitida nebo nekrotizující fasciitida).

Posledním, ovšem neméně důležitým klasifikačním kritériem, je etiologie infekce (bakterie, viry, houby).

V souvislosti s SSTIs byla v USA zavedena nozologická jednotka „akutní bakteriální infekce kůže a měkkých tkání (ABSSTIs – Acute Bacterial Skin and Soft Tissue Infections)“. Pro ABSSTIs je diagnostickým kritériem bakteriální původ infekce spolu s minimálním rozsahem postižené plochy nad 75 cm² [4].

SSTIs se vyskytují celosvětově a ve všech věkových skupinách. K nejdůležitějším predisponujícím faktorům patří zejména diabetes mellitus, předchází posti-



Obr. 1. Klasifikace infekcí kůže a měkkých tkání [7]

(foto archiv autorů)

Figure 1. Classification of skin and soft tissue infections [7]

(photo: authors' archive)

žení kůže, alkoholismus, malnutrice, kontakt se zvířaty, malignita, imunoprese, užívání intravenózních léků, periferní arteriální či venózní onemocnění a trauma (např. popáleniny) [5].

Klasifikace SSTIS

Jedna z nejvíce používaných klasifikací vychází z lokalizace a povahy primárně infikovaných struktur. Základní dělení je na povrchní a hluboké SSTIs, jež se dále člení na komplikované a nekomplikované s tím, že hluboké SSTIs jsou vždy komplikované (obr. 1) [6].

Jiné, v literatuře časté, je dělení SSTIs podle přítomnosti či absence nekrózy. Infekce nezpůsobující nekrózu zahrnují impetigo, furunkly, karbunkly, kožní defekty způsobené lidským nebo zvířecím kousnutím aj. K nim dále patří ABSSTIs jako erysipel, celulitida, chirurgické infekce a abscesy. V druhé skupině, nekrotizujících SSTIs patří nekrotizující fasciitida, myonekróza/myozitida, gangréna aj. [6].

Vzhledem k velké rozmanitosti klinické manifestace SSTIs nepřekvapí, že nozologických jednotek reprezentujících jednotlivé typy je nepřehledné množství. Na

obrázku 1 popisujeme nejdůležitější zástupce z této skupiny.

S. aureus v etiologii SSTIs

Jak je patrné z obrázku 1, většina SSTIs je způsobena grampozitivními koky, zejména *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*, nicméně poměrně časté jsou také infekční komplikace způsobené gramnegativními bakteriemi nebo infekce smíšené etiologie. Podobně jako u jiných infekčních komplikací, dochází také v případě SSTIs k nárůstu rezistence původců. Týká se to zejména *S. aureus* a jeho rezistence k methicilinu/oxacilinu (*S. aureus* rezistentní k methicilinu/oxacilinu – MRSA) [8]. K vankomycinu rezistentní *S. aureus* (VRSA) způsobující SSTIs byl popsán spíše sporadicky u případů z USA [9]. Naopak u gramnegativních patogenů narůstá podíl multirezistentních kmenů, a to zejména u chirurgických infekcí (SSIs – surgical site infections) [10].

V roce 1997 byl spuštěn program monitorující antimikrobiální rezistenci v různých částech světa s názvem „SENTRY antimicrobial surveillance program“ [11]. Z jeho výsledků plyne, že *S. aureus* byl dominantním původcem SSTIs ve všech sledovaných regionech (následovaný *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*). Podíl MRSA kolísá na různých kontinentech, tradičně nejvyšší zastoupení má v Severní Americe a v Evropě. Mezi lety 2003 a 2008 byl proveden sběr dat u pacientů s SSTIs ve 13 zemích napříč Evropou [12]. V této studii výrazně dominoval *S. aureus* (71,1 % případů SSTIs), následovaný beta-hemolytickými streptokoky (10,5 %) a enterokoky (9,3 %). Další studie, která byla provedena mezi lety 2008 a 2009 na souboru více než 3000 SSTIs z 19 zemí Evropy ukázala, že téměř dvě třetiny těchto infekcí byla způsobena *S. aureus* a podíl MRSA dosahoval téměř 50 % [13]. Ray et al. v roce 2013 publikovali rozsáhlou epidemiologickou studii zahrnující 648 699 SSTIs u 495 458 pacientů [2]. Dominantní SSTIs u těchto pacientů byla celulitida a absces (63 % všech případů). Napříč všemi typy SSTIs byl identifikován jako dominantní patogen opět *S. aureus* (80 % všech izolací), následovaly β -hemolytický streptokok (9 %), *E. coli* (4 %) a *P. aeruginosa* (3 %).

Současné možnosti antimikrobiální terapie stafylokokových SSTIs

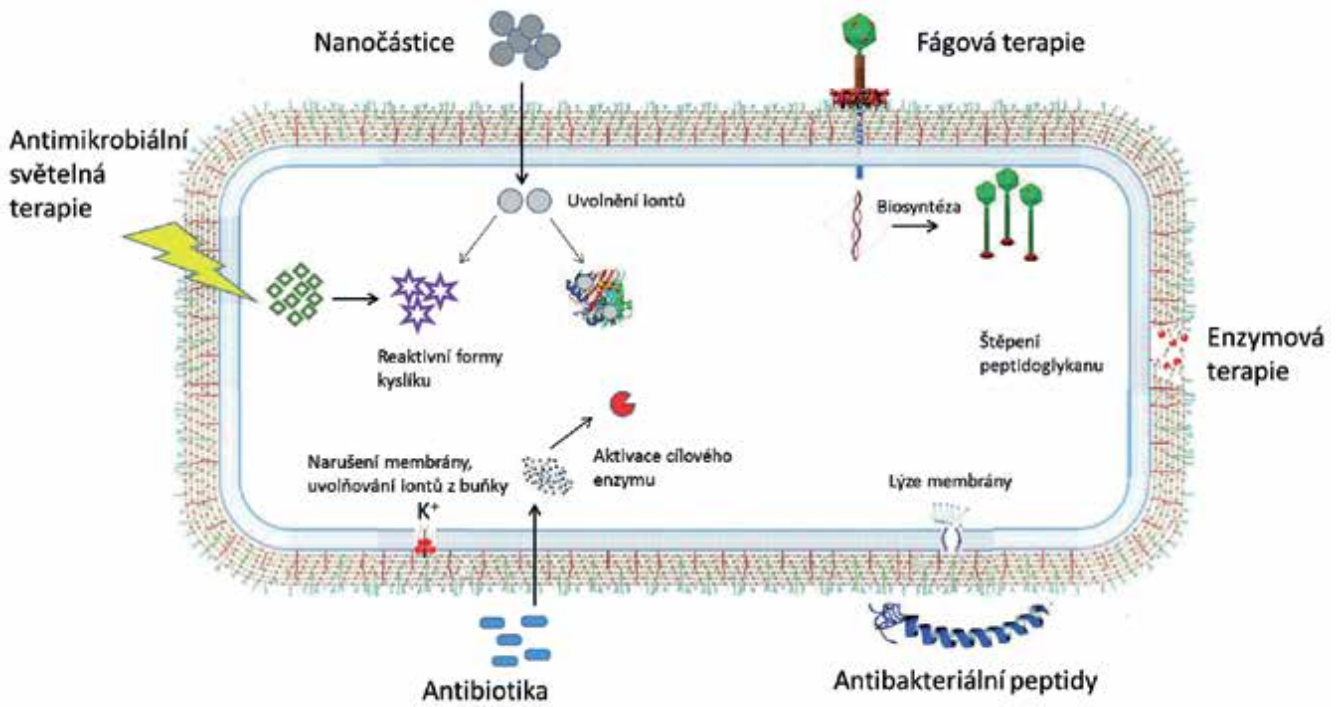
Základním antibiotikem pro terapii infekcí vyvolaných *S. aureus* (mimo MRSA) je oxacilin. Antibiotikum je baktericidní a má dobrý průnik do cílových tkání a rychlý nástup účinku, proto zůstává i téměř 70 let po svém uvedení na trh u stafylokokových infekcí lékem volby pro parenterální podání. U pacientů alergických k penicilinům lze využít klindamycin nebo kotrimoxazol. Kotrimoxazol je také hojně užívaný u infekcí vyvolaných MRSA, většina těchto kmenů má vůči kotrimoxazolu stále zachovanou citlivost. I když v současné

době narůstají počty VRSA patogenů, u vážnějších infekcí MRSA je možné podat vankomycin, který je stále brán jako rezervní antibiotikum. Dále se mohou používat antibiotika ze skupiny oxazolidinonů linezolid či ceftarolin fosamil. Uvedená antibiotika se užívají v terapii infekcí vyvolaných MRSA, případně u závažně probíhajících infekcí vyvolaných citlivými stafylokoky. Linezolid je zatížen vyšším rizikem vzniku rezistence, i když v našich podmínkách jde o výskyt raritní. Pro ambulantní podání se pro nedostupnost perorální formy oxacilinu v ČR využívají jiná betalaktamová antibiotika (amoxicilin-klavulanát, cefuroxim či cefadroxil), perorální klindamycin nebo kotrimoxazol – opět pro pacienty alergické k penicilinům. Využit lze také tetracykliny. Pro lokální aplikaci je výběr přípravků omezený, v našich podmínkách lze použít pouze mupirocin, nebo kyselinu fusidovou, nebo individuálně připravované masti s antibiotiky podle potřeby a možnosti výroby.

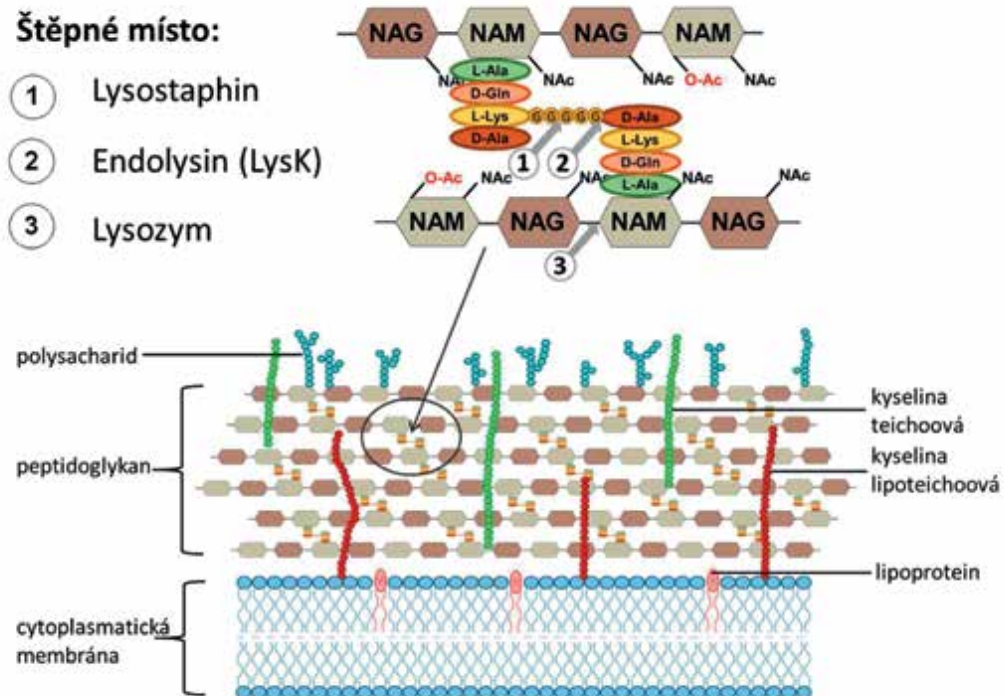
ALTERNATIVNÍ MOŽNOSTI LÉČBY

Vzhledem k narůstající antibiotické rezistenci je potřeba hledat nové terapeutické postupy. Alternativní léčbu lze obecně rozdělit na chemickou a biologickou. Chemická léčba používá organické látky, kam patří i antibiotika. Kromě organických sloučenin se nově využívají např. látky způsobující fotooxidační stresovou reakci a hromadění kyslíkových radikálů, které jsou pro buňku toxické [14], nebo kovové nanočástice (Ag^+), které adherují k mikrobiálním buňkám (obr. 2) [15]. Tyto látky však nemají selektivní účinek a mohou narušovat mikrobiom kůže, což může prodloužit hojení rány. Naproti tomu biologická léčba je vysoce selektivní, neboť při ní nedochází k poškození kožního mikrobiomu ani eukaryotických buněk hostitele. Pro léčbu pak stačí nízké dávky léčiva [18]. Biologická léčba zahrnuje fágovou terapii, antimikrobiální peptidy a enzymovou terapii. Následující text se zaměří na popis enzymů s antimikrobiálními účinky, tzv. enzybiotik.

Enzybiotika představují možnost léčby infekcí kůže a měkkých tkání pomocí lytických enzymů. Tyto enzymy hydrolyticky štěpí kovalentní vazby v peptidoglykanu buněčné stěny, což vede k lýze buněk důsledkem osmotické nerovnováhy [18]. Peptidoglykan je klíčová komponenta grampozitivních bakterií, která tvoří 30–70 % jejich buněčné stěny (obr. 3). Podle místa štěpení vazby v peptidoglykanu se enzybiotika klasifikují jako muramidázy, glukosaminidázy, amidázy a endopeptidázy. Díky unikátnímu mechanismu účinku působí tyto enzymy i na bakterie rezistentní ke všem hlavním skupinám antibiotik [19]. Peptidoglykanové hydrolázy jako enzybiotika představují rozsáhlou skupinu a mohou být získány z různých zdrojů, například z bakteriofágů (endolysiny), z bakterií (autolysiny a bakteriociny) či některých tělních tekutin (lysozymy) [20].



Obr. 2. Hlavní strategie terapie bakteriálních infekcí (upraveno podle obrázky z článku Mulani et al., 2019 [16])
Figure 2. The main therapeutic strategies for bacterial infections (adapted based on the figure in Mulani et al., 2019 [16])



Obr. 3. Struktura buněčné stěny gramozitivních bakterií
 Detail peptidoglykanu je znázorněn spolu se zásahovými místy pro lysostaphin, endolysin (LysK) a lysozym.
 (volně upraveno podle obrázky z článku Assis et al., 2017 [17] a podle obrázky z článku Kashani et al., 2017 [48])
Figure 3. Cell wall architecture of Gram-positive bacteria
 A peptidoglycan detail is represented along with the target sites for lysostaphin, endolysin (LysK), and lysozyme.
 (adapted based on the figures in Assis et al., 2017 [17] and Kashani et al., 2017 [48])

Lysozym objevil Alexander Fleming v roce 1922 jako první enzym s antibakteriálními účinky. Produkují ho fágy, bakterie, houby, obratlovci i bezobratlí. Patří mezi nejlépe prostudovaná enzybiotika. Štěpí β -1,4-glykosidickou vazbu peptidoglykanu (mezi N-acetyl glukosaminem a kyselinou N-acetyl muramovou), některé lysozymy také hydrolyzují chitin [20].

Lysozym byl podroben rozsáhlému zkoumání jako antimikrobiální látka a léčivo. Obecně vykazuje *in vitro* antimikrobiální aktivitu proti některým grampozitivním bakteriím, jako je *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Geobacillus* (dříve *Bacillus*) *stearothermophilus* či *Clostridium tyrobutyricum*. V mlékárenském průmyslu se přidává do tvrdých sýrů pro zamezení růstu *C. tyrobutyricum* [21]. V mnoha zemích se díky své schopnosti bránit růstu škodlivých bakterií používá jako konzervační prostředek v potravinách (včetně zeleniny, mořských plodů, sójových výrobků, masných výrobků a polotvrdých sýrů) [22].

Dalším enzymem, který se využíval jako antimikrobiální agens k léčbě stafylokokových infekcí, byl bakteriocin lysostaphin. Toto enzybiotikum bylo poprvé nalezeno jako produkt bakterie *Staphylococcus simulans*, která ho tvoří za účelem lýzy buňky jiného kmene nebo druhu [23]. Mead-Johnson Research Center v roce 1965 začalo vyrábět čistý lysostaphin připravený ze *Staphylococcus staphylolyticus*. Ukázalo se, že lysostaphin vykazuje lytické účinky pro většinu kmenů *S. aureus* a je schopen odstranit zákal v bakteriální suspenzi během deseti minut [24, 25]. Účinky lysostaphinu se testovaly např. u pacientů s endokarditidou, při selhání ledvin nebo při infekcích horních cest dýchacích, přičemž lysostaphin neměl vedlejší účinky na lidech ani zvířatech.

Úplně první klinické použití proběhlo roku 1967, kdy se lysostaphin použil jako přísada do nosního spreje proti *S. aureus*. U dospělých lidí byl použit 0,5% roztok lysostaphinu, který redukoval 80 % *S. aureus* v rozmezí 7–12 dní [26]. Mezníkem v testování lysostaphinu byl rok 1974, kdy bylo toto enzybiotikum poprvé použito při léčbě stafylokokové sepse u člověka, který trpěl akutní myeloidní leukémií. Infuzí mu bylo podáno 500 mg lysostaphinu a ještě po čtyřech hodinách byla zjištěna koncentrace enzymu 10 μ g v 1 ml krve. Po uplynutí 24 hodin nebyla zjištěna přítomnost lysostaphinu a došlo k ústupu známek infekce [27]. Roku 1986 byla určena sekvence strukturního genu pro lysostaphin, který byl získán z přirozeného hostitelského kmene *S. simulans*. Tento kmen obsahoval plasmid pACK1, jehož součástí byl i lysostaphinový gen [28, 29].

Bakteriocinová enzybiotika jsou značně rozmanitá, liší se velikostí, strukturou, mechanismem působení a inhibičním spektrem. Většina bakteriocinových enzybiotik je zaměřena na úzké spektrum cílových buněk a vykazují antimikrobiální aktivitu pouze vůči příbuzným kmenům bakterií [30]. Díky produkci bakteriocinů mají bakterie v přírodních podmínkách kompetitivní výhodu vůči okolním mikroorganismům. Syntéza bak-

teriocinů začíná v buňce tvorbou inaktivního proenzymu, který se aktivuje následným štěpením. Bakteriocinová enzybiotika byla v různých studiích úspěšně použita jako potravinové konzervanty, prostředky proti potlačení růstu biofilmu nebo jako aditiva či alternativa k antibiotikům, aby minimalizovala vznik rezistentních kmenů [31].

Endolysinová enzybiotika jsou peptidoglykanové hydrolázy, které bakteriofágy produkují na konci replikačního cyklu za účelem degradace peptidoglykanu a svého následného uvolnění do prostředí. Endolysin štěpí peptidoglykan i pokud působí na bakteriální buňky z vnějšku. To umožňuje jejich využití k cílené destrukci buněk [32]. Počínaje rokem 2001 řada preklinických studií prokázala schopnost endolysinových enzybiotik eliminovat patogeny mukózních povrchů [33]. Například v roce 2007 bylo využito enzybiotika endolysinu MV-L z fága Φ MR11 k eliminaci MRSA v nosní sliznici u myši. U myši byla pozorována míra přežití po dobu 60 dnů od infekce. Samotná infekce do 1 hodiny vyvolala fyzické zhoršení myši (snížená aktivita, zježená srst), smrt u všech testovaných myši nastala do 24 hod. Endolysin byl aplikován v čase 0, 30 a 60 minut po infekci. Při podání do 30 minut přežilo 100 % myši, po aplikaci za 60 minut přežilo 60 % testovaných myši [34]. Enzybiotikum endolysin PlyC je peptidoglykanová hydroláza izolovaná ze streptokokového bakteriofága C1. PlyC je mezi lysiny jedinečný svým rychlým letálním účinkem. Relativně nízké koncentrace PlyC byly úspěšně použity k degradaci biofilmů *S. pyogenes* (5 μ g/ml) a také k prevenci a eliminaci *S. pyogenes* u myši [33, 35]. Několik dalších endolysinových enzybiotik prokázalo úspěch také při léčbě systémových infekcí při intraperitoneálním dávkování, např. PlyG, MV-L, CF-301, Ply30 a PlyF307 cílící na *Bacillus anthracis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Streptococcus suis* a *Acinetobacter baumannii* [36]. Endolysiny byly také testovány v kombinaci s antibiotiky. Synergický účinek byl pozorován například u endolysinového enzybiotika Cpl-1 v kombinaci s penicilinem či gentamycinem proti kmenům *S. pneumoniae* s různou kvantitativní mírou citlivosti k penicilinu [37].

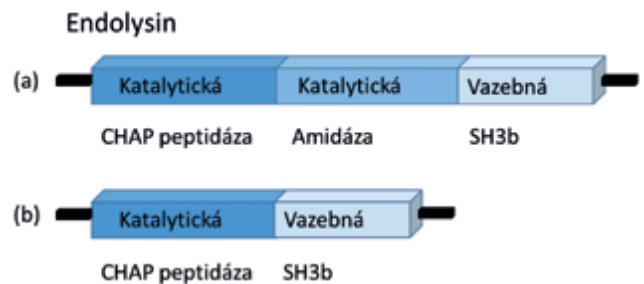
Endolysinová enzybiotika nacházejí využití nejen na poli medicíny, ale také v potravinářství či v zemědělství [38]. Mnohé studie poukazují na jejich potenciál při kontrole a detekci patogenů v potravinách [39]. Jednou z možností je přidání purifikovaného endolysinu do potravin jako konzervační prostředek. Jinou možností je vytvoření geneticky modifikovaných potravin produkujících enzybiotika na bázi peptidoglykanových hydroláz. Ty se ukázaly jako úspěšné, ale čelí regulačním a etickým problémům [38]. Bylo též doloženo, že purifikované enzybiotikum endolysin z bakteriofága Φ H5 je schopno rychle zabít *S. aureus* rostoucí v pasterizovaném mléce. Patogen nebyl detekován po čtyřech hodinách inkubace při 37 °C [40]. Endolysinové enzybiotikum může také sloužit k ochraně rostlin před fytopatogenními bakteriemi. Například

transgenní brambory produkující T4 lysozym byly odolné vůči patogenu *Pectobacterium carotovorum* (dříve *Erwinia carotovora*) způsobující měkkou hnilobu [41]. Nahromaděných enzymů v rostlinách se dá využít nejen k ochraně samotných rostlin, ale také k produkci enzybiotik, které se mohou uplatnit v humánní a veterinární medicíně [39].

DŮLEŽITÉ ASPEKTY PRO LÉČEBNÉ POUŽITÍ ENZYBIOTIK

Pro léčebné využití enzybiotik je potřebné je připravit v dostatečném množství. Dnes se využívá expresních systémů, kdy jsou proteiny získány vnesením rekombinantní DNA do heterologního hostitele (např. *E. coli* nebo kvasinky), ve kterém dojde k expresi genu [18, 42]. Nelson a kolegové v roce 2001 poprvé publikovali použití purifikovaných rekombinantních endolysinových enzybiotik [33]. Ty redukovaly vysoké množství bakterií na zvířecím modelu. Po dvou hodinách od perorálního podání fágového enzybiotika lysinu C1 došlo ke kompletní eradikaci *S. pyogenes*, jenž kolonizoval ústní sliznici. Od té doby mnoho klinických studií demonstrovalo terapeutický potenciál enzybiotik [43]. Přestože byl vyřešen problém s produkcí enzybiotik, neustále se pracuje na zlepšení proteinových vlastností. Enzybiotika jsou někdy špatně rozpustná, nestabilní, rychle se eliminují z organismu či hrozí vznik rezistence, a proto se je snaha o vytvoření tzv. „biobetters“, což jsou enzybiotika s vylepšenými vlastnostmi.

Jedním z aplikačních omezení je rychlá eliminace enzybiotik z krevního oběhu. Existují způsoby, jak počas rozpadu léčiva prodloužit. Jednou z možností je fúze enzybiotika s další molekulou (např. doménou vázající albumin). Jinou je vytvoření dimeru proteinu, např. lysostaphinu s prodlouženým poločasem rozpadu [44]. Další strategií, jak zlepšit vlastnosti enzybiotika, je manipulace s jejich funkčními doménami. Enzybiotikum se obvykle skládá z několika funkčních domén. Záměnou a fúzí katalytických a vazebných domén různého původu vznikají chimérická enzybiotika. P128 je chimérický antistafylokokový protein, který má katalytickou doménu z bakteriofága K a vazebnou doménu z lysostaphinu. Přítomnost vazebné domény vedla k více než stonásobnému zvýšení baktericidní aktivity ve srovnání s izolovanou katalytickou doménou. P128 štěpil několik stafylokokových druhů, včetně MRSA, byl také účinný při eradikaci biofilmu *S. aureus* a vykazoval mnohem větší termostabilitu než lysostaphin. Jiné přístupy zahrnují například úplné odstranění domény z proteinu, nebo naopak jejich duplikování, fúzi s peptidy či fúzi kompletních enzybiotik. Příkladem odstranění celé domény je F1 mutantní forma stafylokokového endolysinu LysK (obr. 4). V rámci molekuly se také provádí náhodná nebo místně cílená mutagenese, která taktéž může vést ke zvýšení stability proteinu [45, 46].



Obr. 4. Doménová struktura enzybiotika endolysinu F812 (LysK)

a) Endolysin obsahuje doménu zodpovědnou za vazbu k substrátu (SH3b) a dvě katalytické domény (peptidáza CHAP a amidáza)
b) Enzymaticky aktivní mutantní forma F1 bez amidázové domény (volně upraveno podle obrázku z článku Kashani et al., 2017 [48])

Figure 4. Domain structure of the enzybiotic endolysin F812 (LysK)

(a) Endolysin carries a domain responsible for substrate binding (SH3b) and two catalytic domains (peptidase CHAP and amidase)
(b) Enzymatically active mutant F1 without amidase domain (adapted based on the figure in Kashani et al., 2017 [48])

Většina enzybiotik na bázi peptidoglykanových hydroláz je druhově specifická. Vysoká specifita je považována za jednu z jejich hlavních předností, jelikož při aplikaci nedochází k selektivnímu tlaku na komezální populaci a také snižuje pravděpodobnost vzniku rezistence [47]. Tato enzybiotika štěpí konzervované struktury buněčné stěny na vnější straně. Do buňky tedy nevstupují, a proto nedochází ke vzniku některých forem antibiotické rezistence (aktivní transport z buňky a snížená propustnost membrány) [39, 47, 48].

Navzdory těmto pozitivům však existují údaje o vzniku rezistentních bakterií vůči enzybiotikům na bázi peptidoglykanových hydroláz. Příkladem je lidský lysozym, u něhož došlo ke vzniku rezistence modifikací peptidoglykanu pomocí enzymů O-acetyl transferázy či N-acetylglukosamin deacetylázy [49, 50]. Mezi bakterie odolné vůči lysozymu patří také stafylokoky, což výrazně přispívá k jejich kolonizaci sliznic a kůže člověka. U *S. aureus* byla prokázána přítomnost O-acetyl transferázy, enzymu zodpovědného za O-acetylaci kyseliny muramové v peptidoglykanu [51, 52]. Podobně byly identifikovány kmeny *S. aureus* rezistentní k lysostaphinu. Příčinou rezistence bylo nahrazení pentaglycinového můstku peptidoglykanu jedním glycinem. Lysostaphin následně nebyl schopen peptidoglykan štěpit [42, 53]. Další možností vzniku rezistence je začlenění jiných aminokyselin (serin nebo alanin) do pentaglycinových můstků [54]. Ačkoli byly identifikovány kmeny rezistentní k lysostaphinu, získaná rezistence vedla k významnému zvýšení citlivosti vůči betalaktamovým antibiotikům a zvýšení citlivosti MRSA kmenů k methicilinu. Pentaglycin zároveň slouží jako opora pro vazbu proteinů na buněčný povrch. Bez přítomnosti tohoto můstku mají některé bakteriální adheziny

sníženou schopnost vázat se na buněčnou stěnu, což může vést ke snížené schopnosti bakterií kolonizovat povrchy [54].

Vůči enzybiotiku endolysinu vznik rezistence zatím popsán nebyl. Podle dosavadních studií opakovaná expozice nízkými koncentracemi endolysinu nevede ke snížení citlivosti bakterie na toto endolysinové enzybiotikum [55, 56]. Nízké riziko rezistence je spojováno s vysokou specifičtostí a rychlým účinkem. Zatímco lysostaphin štěpí pouze méně konzervovaný pentaglycin stafylokoků, endolysinová enzybiotika mohou mít i dvě katalytické domény, které hydrolyzují různé vazby v peptidoglykanu [57]. Pro terapeutickou aplikaci by se dalo využít synergického účinku několika enzybiotik, kdy lze zvýšit počet cílových míst v peptidoglykanu. Další možností je použití enzybiotik v kombinaci s antibiotiky, neboť byly pozorovány synergické účinky nejen mezi samotnými endolysinovými enzybiotiky, ale také mezi endolysin a jinými antimikrobiálními látkami [39, 48, 53, 58].

Jeden z dalších faktorů, který může snížit účinnost proteinu jako terapeutika, je indukce imunitní odpovědi [59]. Řada studií však prokázala, že specifické protilátky neblokují, ale mírně snižují antibakteriální aktivitu enzybiotik [19, 60]. U myši, které dostaly trojnásobnou dávku enzybiotika Cpl-1, byla prokázána přítomnost protilátek třídy IgG proti Cpl-1 v pěti ze šesti případů. Loeffler et al. zjistili, že preinkubace Cpl-1 s hyperimunním králičím sérem po dobu 10 nebo 60 minut vedla pouze k mírnému poklesu aktivity enzybiotika *in vitro* [61]. Nejpravděpodobnějším vysvětlením těchto neočekávaných nálezů je velmi vysoká afinita enzybiotik k substrátu na bakteriální buněčné stěně [60].

Jun et al. v klinické studii testovali imunogenicitu fágového enzybiotika Sal200. Anti-rSAL-1 protilátky byly detekovány u 37 % účastníků. Hladiny protilátek anti-rSAL-1 v séru se pohybovaly od 2 do 5 µg/ml. Nejvyšší hladina byla 12,055 µg/ml. Co se týká vztahu mezi hladinou protilátky anti-rSAL-1 a dávkou, zdá se, že hladina protilátky se zvyšuje úměrně s dávkou, nicméně enzybiotikum Sal200 v klinických studiích nevykazovalo žádné významné nežádoucí účinky, resp. většina z nich byla mírné závažnosti, přechodného rázu či spontánně vymizela u všech 36 mužských účastníků [62, 63].

Ukazuje se, že zjevná imunogenicita enzybiotik nemusí po opakovaném systémovém podání výrazně snižovat jejich terapeutickou účinnost [55]. Je ale třeba brát v úvahu, že některá enzybiotika mají určitá omezení (krátký čas trvání aktivity *in vivo*, produkce zánětlivých cytokinů a protilátek) a většina enzybiotik nebyla testována na animálních modelech. Ovšem existují přístupy, jako je proteinové inženýrství, vývoj doručovacích (delivery) systémů a cílené léčby, jejichž cílem je konstruovat, upravovat a cíleně směřovat enzymy do místa působení za použití nových strategií, což může snížit rizika spojená s rozvojem imunitní odpovědi [64].

APLIKACE ENZYMŮ

Výzkum se dnes zaměřuje na vývoj nových nosičů pro antimikrobiální látky včetně enzybiotik. Tyto systémy s řízeným uvolňováním mohou být zvláště zajímavé pro budoucí vývoj, protože umožňují dodávání neporušených enzybiotik na místo infekce v závislosti na parametrech vyvolávajících zánět [48]. Nabízí se možnosti jako enkapsulace do lipozomů, využití sférických nanočástic a nanoemulzí, přidávání enzybiotik do adheziv, vláknenných systémů (nano-mikro) a v neposlední řadě zabudování do hydrogelů, ve vysušené formě pak xerogelů, lyofilizovaných aerogelů nebo filmů (obr. 5) [65]. Pham et al. poukazují na fibroinové nanočástice (FNP). Díky jejich univerzálnosti a chemické modifikovatelnosti jsou tyto nanočástice schopny zapouzdřit různé typy terapeutických sloučenin, včetně malých a velkých molekul, proteinů, enzymů, vakcín a genetického materiálu [66]. V literatuře jsou různé příklady popisující konjugaci nebo kombinovanou aplikaci fágových enzybiotik s různými typy nanočástic. Například konjugát enzybiotika Ply500 s nanočásticemi oxidu křemičitého (SNP) byl schopen úspěšně ničit buňky *Listeria innocua* v suspenzi obsahující 10⁵ CFU/ml (**Colony forming unit**) [67].



Obr. 5. Systémy pro cílené doručování enzybiotik (upraveno podle obrázku z článku Pinto et al., 2020 [65])
Figure 5. Targeted enzybiotic delivery systems (adapted based on the figure in Pinto et al., 2020 [65])

Lipozomy, přírodní lipidové kapsle, byly studovány kvůli biokompatibilitě s fágy, bioresorpci, toxicitě a imunogenicitě a jsou obecně uznávané jako bezpečné (Generally Recognized As Safe – GRAS) [68]. Zapouzdření enzybiotik do lipozomů také umožňuje

antibakteriálním látkám proniknout vnější membránou gramnegativních bakterií. Bai et al. v roce 2019 připravili fágové enzybiotikum BSP16Lys (izolováno z bakteriofága infikujícího *Salmonella typhimurium*) a použili ho pro enkapsulaci do kationtového lipozomu složeného z DPPC (dipalmitoylfosfatidylcholin), cholesterolu a hexadecylaminu. Lipozomy obsahující enzybiotika (BSP16Lys nebo lysozym) účinně lyzovaly buňky *S. typhimurium* i *E. coli* bez předchozího ošetření membránovým permeabilizérem [69].

Antibakteriální kryty

Kromě systémového využití enzymů se také nabízí možnost využít enzymy lokálně, např. pro vytvoření krytů na infekční rány. Biologicky aktivní kryt se snaží konjugovat enzym s biomateriálem, který zabraňuje kolonizaci bakterií. Enzybiotikum lysostaphin byl široce testován jako potenciální terapeutická látka na mnoha zvířecích modelech, bylo však jen málo pokusů o použití tohoto proteinu jako složky biologicky aktivních ob vazů pro léčbu kožních infekcí. Ve srovnání se systémovým dodáním, místně cílené dodání antimikrobiálních léčiv umožňuje dosáhnout vyšších koncentrací léčiva v místě infekce po delší časové období s nižším rizikem toxicity [70, 71].

Miao et al. úspěšně použili enzybiotikum pro přípravu celulózového obvazu s antistafylokokovou aktivitou. Autoři modifikovali celulózová vlákna tak, aby vytvářela aldehydové skupiny pro kovalentní imobilizaci lysostaphinu. Výsledná celulózová vlákna s lysostaphinem byla dále zpracována za účelem získání obvazového materiálu, který vykazoval aktivitu proti *S. aureus* v *in vitro* modelu kůže [72]. Cui et al. vyvinuli hydrogelové obvazové materiály na bázi chitosanu a kolagenu s imobilizovaným lysostaphinem. Vyrobený materiál vykazoval výhodné fyzikálně-chemické parametry, anti-stafylokokovou aktivitu a byl úspěšně použit při léčení ran u králíků [73]. Desbois et al. použili kombinaci lysostaphinu s antimikrobiálním peptidem ranalexinem k léčbě ran infikovaných stafylokoky. Kombinace enzybiotika s antibakteriálním peptidem vykazovala synergický antibakteriální účinek při léčbě ran infikovaných MRSA v ráně králíčího modelu. V této studii se však jako obvaz na rány použila klasická gáza [74].

Lytické enzymy v nosičích, jako jsou masti, krémy a pleťové vody by také mohly vylepšit proces hojení ran. Společnost Biosynexus Inc. se začala zabývat výrobou lysostaphinového krému, aby se snížila intranazální kolonizace *S. aureus*. Humánní klinické studie prokázaly bezpečnost a účinnost této látky, ovšem klinickému standardu mupirocinu skončila patentová ochrana, čímž se stal vývoj lysostaphinového krému ekonomicky nerentabilní [75]. Na základě těchto studií však existuje významný potenciál pro použití tohoto enzybiotika u antibakteriálních krytů k léčbě stafylokokových infekcí.

Ortopedické implantáty

Ortopedické infekce implantátů obvykle vyžadují dlouhodobou antibiotickou terapii, aby nedocházelo k selhání s následným odstraněním implantátu. Na bázi polyethylen glykolu (PEG) se podařilo vytvořit injektovatelný hydrogel, který ulpívá na exponovaných površích tkáně a fraktur. Spolu s enzybiotikem lysostaphinem, pokud je aplikován do infikovaných implantovaných fixovaných myších femorálních zlomenin, je velice účinný proti *S. aureus*. Ukázalo se, že přítomnost lysostaphinu v hydrogelu zvyšuje stabilitu enzymu a poskytuje zvýšenou antibiofilmovou aktivitu. Testování ortopedických implantátů u preklinického zvířecího modelu poukázalo na schopnost hydrogelu s enzybiotikem lysostaphinem odstranit infekci a zároveň podpořit regeneraci kosti. Důležité je, že hydrogely dodávající enzybiotikum lysostaphin jsou účinné proti bakteriím rezistentním na antibiotika. Způsob aplikace pomocí dodávání enzybiotik ve formě hydrogelů by mohl být vysoce účinný při léčbě a prevenci bakteriálních infekcí [76].

SHRNUTÍ

Růst rezistence bakteriálních patogenů ke konvenčním antibiotikům a nedostupnost nových antimikrobiálních látek vedla k zájmu o využití enzybiotik k léčbě SSTIs. Vysoká antibakteriální aktivita, nízké riziko rezistence, antibiofilmová aktivita enzybiotik a jejich synergie s antibiotiky z nich činí slibnou alternativu pro léčbu infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny včetně dominantního patogenu *S. aureus*.

Enzybiotika s optimalizovanými nebo novými vlastnostmi umožní efektivnější léčebné postupy. Většina enzybiotik je biochemicky a strukturálně charakterizována, což umožňuje tvorbu jejich vylepšených „bio-betters“ variant, a tím i rozšiřuje pole jejich působení. Díky rekombinantním technikám lze zlepšovat vlastnosti enzymů a umožnit jejich zavedení do praxe. Četné preklinické studie již prokázaly léčebný potenciál enzybiotik. V současné době probíhá několik klinických studií, které přibližují využití těchto k přírodě šetrných, lehce odbouratelných antibakteriálních látek v humánně-medicínských praxi.

LITERATURA

1. Ki V, Rotstein C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2008;19(2):173–184.
2. Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Microbiology of skin and soft tissue infections in the age of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013;76(1):24–30.
3. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue

- infections: 2014 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*, 2014;59(2).
4. Tirupathi R, Areti S, Salim SA, et al. Acute bacterial skin and soft tissue infections: new drugs in ID armamentarium. *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 2019;9(4):310–313.
 5. Eron LJ, Lipsky BA, Low DE, et al. Expert panel on managing skin and soft tissue infections. Managing skin and soft tissue infections: expert panel recommendations on key decision points. *J Antimicrob Chemother*, 2003;52(1):i3–17.
 6. Esposito S, Bassetti M, Concia E, et al. Italian Society of Infectious and Tropical Diseases. Diagnosis and management of skin and soft-tissue infections (SSTI). A literature review and consensus statement: an update. *J Chemother*, 2017;29(4):197–214.
 7. Esposito S, Bassetti M, Bonnet E, et al. Hot topics in the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Int J Antimicrob Agents*, 2016;48(1):19–26. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.04.011
 8. Johnson JK, Khoie T, Shurland S, et al. Skin and soft tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *Emerg Infect Dis*, 2007; 13(8):1195–1200.
 9. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res*, 2019;12(21):169–176.
 10. Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *J Hosp Infect*, 2008;70(Suppl 2):3–10.
 11. Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, et al. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007;57(1):7–13.
 12. Sader HS, Farrell DJ, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from skin and skin-structure infections in European medical centres. *Int J Antimicrob Agents*, 2010;36(1):28–32.
 13. Morrissey I, Leakey A, Northwood JB. In vitro activity of ceftazolin and comparator antimicrobials against European and Middle East isolates from complicated skin and skin-structure infections collected in 2008–2009. *Int J Antimicrob Agents*, 2012;40(3):227–234.
 14. Mahmoudi H, Bahador A, Pourhajibagher M, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 2018;9(3):154–160.
 15. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, et al. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 2016;7.
 16. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 2019;10:539. Dostupný na www: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>.
 17. Assis, LM, Nedeljković M, Dessen A. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 2017;31:1–14.
 18. Domingo-Calap P, Delgado-Martínez J. Bacteriophages: Protagonists of a Post- Antibiotic Era. *Antibiotics*, 2018;7(3).
 19. Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Górski A. Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents. *Experimental Biology and Medicine*, 2006;231(4):366–377.
 20. Vollmer W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008;32(2):287–306.
 21. Pellegrino L, Tirelli A. A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 2000;10(7):435–442.
 22. Aminlari L, Mohammadi Hashemi M, Aminlari M. Modified Lysozymes as Novel Broad Spectrum Natural Antimicrobial Agents in Foods. *Journal of Food Science*, 2014;79(6):1077–1090.
 23. Schuardt VT, Schindler CA. Lysozaphin therapy in mice infected with *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1964;88(3):815–816.
 24. Cropp CB, Harrison EF. The in vitro effect of lysostaphin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1964;10(6):823–828.
 25. Zygumt WA, Browder HP, Tavormina PA. Lytic action of lysostaphin on susceptible and resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1967;13(7):845–853.
 26. Quickel KE, Selden R, Caldwell JR, et al. Efficacy and Safety of Topical Lysozaphin Treatment of Persistent Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*, 1971;22(3):446–450.
 27. Stark FR, Thornsvarð C, Flannery EP, et al. Systemic lysostaphin in man – Apparent antimicrobial activity in a neutropenic patient. *N. Engl. J. Med*, 1974;291:239–240.
 28. Recsei PA, Gruss AD, Novick RP. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987; 84(5):1127–1131.
 29. Gargis SR, Heath HE, LeBlanc PA, et al. Inhibition of the Activity of Both Domains of Lysozaphin through Peptidoglycan Modification by the Lysozaphin Immunity Protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010;76(20):6944–6946.
 30. Hegarty JW, Guinane CM, Ross RP, et al. Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Research*, 2016;5.
 31. Fahim HA, Khairalla AS, El-Gendy AO. „Nanotechnology: A Valuable Strategy to Improve Bacteriocin Formulations.“ *Frontiers in Microbiology*, 2016;7. Dostupný na www: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01385>.
 32. Schmelcher M, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 2014;4(2).
 33. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001;98(7):4107–4112.
 34. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, et al. Efficient Elimination of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* by Cloned Lysin Derived from Bacteriophage ϕ MR11. *The Journal of Infectious Diseases*, 2007;196(8):1237–1247.
 35. Lood R, Raz A, Molina H, et al. A highly active and negatively charged *Streptococcus pyogenes* lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against streptococcal bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014;58(6):3073–3084.
 36. Oliveira H, São-José C, Azeredo J. Phage-Derived Peptidoglycan Degrading Enzymes: Challenges and Future Prospects for In Vivo Therapy. *Viruses*, 2018;10(6).
 37. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic Killing of *Streptococcus pneumoniae* with the Bacteriophage Lytic Enzyme Cpl-1 and Penicillin or Gentamicin Depends on the Level of Penicillin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005;49(3):1225–1228.
 38. Callewaert L, Walmagh M, Michiels CW, et al. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011;22(2):164–171.
 39. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 2012;7(10):1147–1171.
 40. Obeso JM, Martínez B, Rodríguez A, et al. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage Φ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 2008;128(2):212–218.
 41. de Vries J, Harms K, Broer I, et al. The Bacteriolytic Activity in Transgenic Potatoes Expressing a Chimeric T4 Lysozyme Gene and the Effect of T4 Lysozyme on Soil- and Phytopathogenic Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999;22(2):280–286.
 42. Kumar JK. Lysozaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008;80(4):555–561.
 43. Dams D, Briers Y. Enzybiotics: Enzyme-Based Antibacterials as Therapeutics. In Labrou, N. (ed.). *Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications*, 2019.
 44. Grishin AV, Lavrova NV, Lyashchuk AM, et al. The Influence of Dimerization on the Pharmacokinetics and Activity of an Antibacterial Enzyme Lysozaphin. *Molecules*, 2019;24(10).
 45. São-José C. Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes: Improving Their Potential as Antimicrobials. *Antibiotics*, 2018;7(2).
 46. Saravanan SR, Paul VD, George S, et al. Properties and mutation studies of a bacteriophage-derived chimeric recombinant staphylolytic protein P128. *Bacteriophage*, 2014;3(3).
 47. Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, 2005;13(10):491–496.

48. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, et al. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017;31(1): e00071–17.
49. Guariglia-Oropeza V, Helmann JD. *Bacillus subtilis* σ V Confers Lysozyme Resistance by Activation of Two Cell Wall Modification Pathways, Peptidoglycan O-Acetylation and d-Alanylation of Teichoic Acids. *Journal of Bacteriology*, 2011;193(22):6223–6232.
50. Herbert S, Bera A, Nerz C, et al. Molecular Basis of Resistance to Muramidase and Cationic Antimicrobial Peptide Activity of Lysozyme in *Staphylococci*. *PLoS Pathogens*, 2007;3(7):07-PLPA-RA-0107.
51. Davis KM, Akinbi HT, Standish AJ, et al. Resistance to Mucosal Lysozyme Compensates for the Fitness Deficit of Peptidoglycan Modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathogens*, 2008;4(12).
52. Bera A, Herbert S, Jakob A, et al. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2005;55(3):778–787.
53. Grundling AD, Missiakas M, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* Mutants with Increased Lysozyme Resistance. *Journal of Bacteriology*, 2006;188(17):6286–6297.
54. Kusuma C, Jadanova A, Chanturiya T, et al. Lysozyme-Resistant Variants of *Staphylococcus aureus* Demonstrate Reduced Fitness In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007;51(2):475–482.
55. Fenton M, McAuliffe O, O'Mahony J, et al. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs*, 2010;1(1):9–16.
56. Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 2015;5(3).
57. Szveda P, Schielmann M, Kotlowski R, et al. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012;96(5):1157–1174.
58. Becker SC, Foster-Frey J, Donovan DM. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS Microbiology Letters*, 2008;287(2):185–191.
59. De Groot AS, Scott DW. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology*, 2007;28(11):482–490.
60. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology*, 2008;11(5):393–400.
61. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia. *Infection and Immunity*, 2003;71(11):6199–6204.
62. Abdelkader K, Gerstmans H, Saafan A, et al. The Preclinical and Clinical Progress of Bacteriophages and Their Lytic Enzymes: The Parts are Easier than the Whole. *Viruses*, 2019;11(2).
63. Jun SY, Jang IJ, Yoon S, et al. Pharmacokinetics and Tolerance of the Phage Endolysin- Based Candidate Drug SAL200 after a Single Intravenous Administration among Healthy Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017;61(6): e02629–02716.
64. Gondil VS, Harjai K, Chhibber S. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020;55(2).
65. Pinto AM, Cerqueira MA, Bañobre-López M, et al. Bacteriophages for Chronic Wound Treatment: From Traditional to Novel Delivery Systems. *Viruses*, 2020;12(2).
66. Pham DT, Tiyafoonchai W. Fibroin nanoparticles: a promising drug delivery system. *Drug Delivery*, 2020;27(1):431–448.
67. Solanki K, Grover N, Downs P, et al. Enzyme-Based Listericidal Nanocomposites. *Scientific Reports*, 2013;3(1).
68. Cui F, Li G, Huang J, et al. Development of chitosan-collagen hydrogel incorporated with lysostaphin (CCHL) burn dressing with anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and promotion wound healing properties. *Drug Delivery*, 2010;18(3):173–180.
69. Bai J, Yang E, Chang PS, et al. Preparation and characterization of endolysin-containing liposomes and evaluation of their antimicrobial activities against gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019;128:40–48.
70. Johnson CT, García AJ. Scaffold-based Anti-infection Strategies in Bone Repair. *Annals of Biomedical Engineering*, 2015;43(3):515–528.
71. A ter Boo GJ, Grijpma DW, Moriarty TF, et al. Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic- and trauma surgery. *Biomaterials*, 2015;52:113–125.
72. Miao J, Pangule RC, Paskaleva EE, et al. lysostaphin-functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. *Biomaterials*, 2011;32(36):9557–9567.
73. Cui H, Yuan L, Lin L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. *Carbohydrate Polymers*, 2017;177:156–164.
74. Desbois AP, Gemmell CG, Coote PJ. In vivo efficacy of the antimicrobial peptide ranalexin in combination with the endopeptidase lysostaphin against wound and systemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections." *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010;35(6):559–565.
75. Tegos G, Mylonakis E. Antimicrobial drug discovery: Emerging strategies. *Advances in Molecular and Cellular Microbiology (CABI)*, 2012;p. X, 357.
76. Johnson CT, Wroe JA, Agarwal R, et al. Hydrogel delivery of lysostaphin eliminates orthopedic implant infection by *Staphylococcus aureus* and supports fracture healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018;115(22).

Poděkování

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s registračním číslem NV19-05-00214. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Do redakce došlo dne 17. 4. 2020.

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.
 Hudcova 296/70
 621 00 Brno
 e-mail: janda@vri.cz