

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE



TEZE K DISERTAČNÍ PRÁCI

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Ing. Petr Bratřka

**ZAŘÍZENÍ PRO PŘÍPRAVU
PERSONALIZOVANÝCH KRYTŮ RAN
A OVĚŘENÍ BEZPEČNOSTI A ÚČINNOSTI
PERSONALIZED WOUND DRESSING
PRODUCTION DEVICE
AND VERIFICATION OF SAFETY AND PERFORMANCE**

Doktorský studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínská a klinická technika

Teze disertace k získání akademického titulu "doktor", ve zkratce "Ph.D."

Praha, březen 2024

Disertační práce byla vypracována v kombinované formě doktorského studia
na katedře zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva
Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze.

Uchazeč: Ing. Petr Bratka
Český metrologický institut,
Centrum pro certifikaci zdravotnických prostředků
Hvoždanská 2053/3, 148 00 Praha – Chodov

Školitel: prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva
Fakulta biomedicínského inženýrství
náměstí Sítná 3105, 272 01 Kladno 1

Oponenti:
.....
.....

Teze byly rozeslány dne:

Obhajoba disertace se koná dne v hod. před
komisí pro obhajobu disertační práce ve studijním oboru Biomedicínská a klinická technika
v místnosti č Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze.

S disertací je možno se seznámit na děkanátu Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT
v Praze, na oddělení pro vědu, výzkum a zahraniční styky, nám. Sítná 3105 272 01 Kladno 2.

doc. Ing. Martin Rožánek, Ph.D.
předseda komise pro obhajobu disertační práce
ve studijním oboru
Biomedicínská a klinická technika
Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT,
nám. Sítná 3105 272 01 Kladno 2

1. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Personalizace péče o ránu významným způsobem přispívá k lepším výsledkům léčebného procesu. (Dowd, 2011) Důležitým nástrojem v péči o ránu je medikace, která může být realizována systémovou nebo lokální aplikací vhodného léčiva, jehož volba potřebám zvolené terapie odpovídá.

Pro lokální aplikaci léčiva, která je z pohledu léčby rány v řadě ohledů výhodnější a šetrnější, mj. jelikož k dosažení efektu *in situ* je potřeba menší dávky, lze využít přímé podání sériově vyráběných léčivých přípravků (srov. § 2 zákona o léčivech) nebo léčivých přípravků formulovaných *magistra liter* farmaceutem, resp. lékárnou.

Pro podpůrnou aplikaci léčiva na ránu lze využít také sériově vyráběné zdravotnické prostředky s doplňkovým účinkem (srov. odst. 2, čl. 1, MDR), které primárně zajišťují mechanické krytí a ochranu rány. I v tomto případě je určité míry personalizace dosahováno konkrétní volbou sériově vyráběného zdravotnického prostředku.

Využití *magistra liter* léčiv se ovšem v praxi omezuje na několik tradičních variant a také automatizace jejich přípravy je minimální. Nabídka sériově vyráběných zdravotnických prostředků, zejména ve smyslu kombinace konkrétního krytu rány a specifické účinné látky pro doplňkový účinek, je limitovaná a prosazení nových, inovativních variant je značně komplikována náročnými regulačními požadavky MDR v kombinaci s požadavky regulace léčiv.

Jako možnost pro dosažení vyšší míry personalizace v péči o ránu se jeví personalizované kryty ran s doplňkovým účinkem, jejichž vlastnosti by bylo možné ve větší míře modulovat s ohledem na etiologii rány, její stav a další potřeby terapie ve vztahu ke konkrétnímu pacientovi. Toho lze dosáhnout zejména individuálním zhotovením krytu rány (s konkrétními parametry) na základě požadavku ošetřujícího personálu. Jedním z možných postupů pro zhotovení takového krytu je depozice vybrané účinné látky, zejména ve formě drug delivery systému pro její řízení, resp. prodloužené uvolňování, na vhodný nosič, tedy *funkcionalizace* nosiče. **Pro tento účel se jako prakticky realizovatelná varianta jeví postup přípravy s využitím vývoje funkcionalizačního zařízení** (Braťka, a další, 2022), který naplní všechny regulační požadavky a zároveň, díky využití určitého stupně automatizace, může funkcionalizace nosiče probíhat nejen v lékárně (např. centrální lékárna nemocnice), ale také přímo ve zdravotnickém zařízení, resp. ambulanci, a za přírodních katastrof nebo válečných stavů také v podmínkách medicíny katastrof nebo válečné medicíny. **Vývoj zdravotnických přístrojů a zařízení je základním konceptem oboru biomedicínského inženýrství.**

Vývojem, zaměřeným na odpovídající funkcionalizační zařízení a personalizované kryty ran s doplňkovým účinkem, se zabývají mimo dalších subjektů dva české podniky, které vyvinuly za zásadní účasti autora disertační práce řadu vhodných dílčích technických řešení, která tvoří technická východiska této práce. Související výzkum nebyl dosud zcela ukončen, funkcionalizační zařízení a jím

připravované kryty ran s doplňkovým účinkem se nachází ve fázi pokročilého návrhu a vývoje (srov. ČSN EN ISO 13485 ed. 2).

Pro uvedení zdravotnického prostředku na trh **je nezbytné provedení ověření jeho návrhu**, a to s ohledem na věcné uživatelské (vědecké, technické, provozní, obchodní), ale i regulatorní požadavky. Z pohledu platné regulace, tedy MDR, je přitom značná část tohoto procesu součástí předklinického hodnocení, kterému je proto v disertační práci věnována odpovídající pozornost.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Motivací disertační práce je v uvedeném kontextu přispět k prokázání proveditelnosti a prosazení konceptu klinické aplikace personalizovaných krytů ran s doplňkovým účinkem, připravených s využitím funkcionalizačního zařízení, které využívá popsaných technických východisek.

Jako cíl disertační práce byla stanovena iterace ověření návrhu funkcionalizačního zařízení ve zvoleném rozsahu, tedy obecně identifikace, návrh a realizace kroků ke zjištění míry plnění vybraných uživatelských a regulatorních požadavků v dané fázi vývoje. Zcela zásadním požadavkem je v tomto ohledu produkce krytu rány požadovaných parametrů, přičemž vývoj funkcionalizačního zařízení od vývoje jednotlivých variant produkovaných krytů ran v zásadě nelze oddělit z důvodu zpětného, resp. vzájemného ovlivnění vstupních požadavků.

Na základě stanovených cílů byla formulována hypotéza, kterou práce ověřovala:

„Personalizované kryty ran jako zdravotnické prostředky pro humánní medicínu lze připravovat s využitím funkcionalizačního zařízení podle popsaných technických parametrů, a takto připravené zdravotnické prostředky mají potenciál prokázat v rozsahu ověřovaných aspektů předklinickou bezpečnost a účinnost.“

3. METODY ZPRACOVÁNÍ

Předklinické studie jsou zásadním nástrojem pro ověření návrhu zdravotnického prostředku. (Boutrand, 2019) Testování v předklinických studiích zdravotnického prostředku je zaměřeno obecně na ověření konkrétních požadavků na bezpečnost a účinnost. Jako **metoda vhodná pro dosažení stanoveného cíle bylo tedy zvoleno testování vybraných konkrétních předklinických charakteristik** s pomocí předklinického experimentu, resp. experimentů, pro účely návrhu a vývoje zařízení, ovšem s potenciálem následného využití v regulačním procesu posouzení shody.

Stanoveným cílům a zvolené metodě odpovídal postup zpracování v teoretické i praktické části práce. **Primární byl vědecký přístup dle aktuálního vývoje v biomedicínském inženýrství navázaný na potřeby klinické praxe, současně byly ovšem zohledňovány též aspekty regulační** (pro zdravotnické prostředky je základním regulativem přímo aplikovatelné Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/745, tzv. MDR).

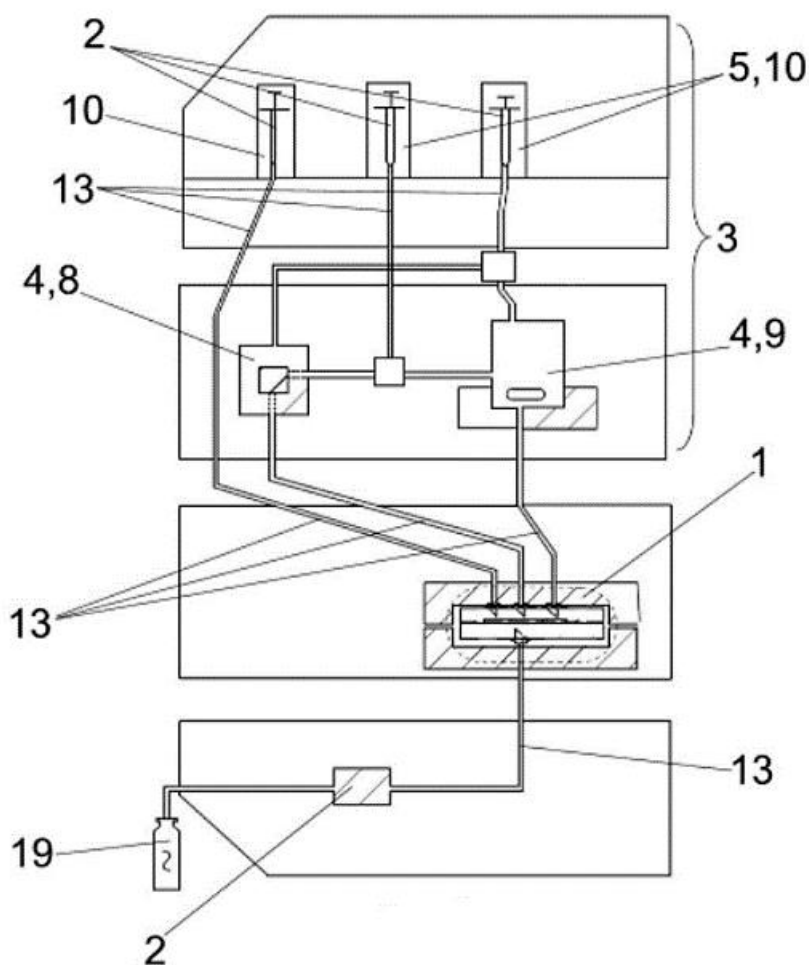
V kontextu velkého množství relevantních požadavků na bezpečnost a účinnost, které vyplývají z MDR, bylo však třeba cíl disertační práce realisticky vymezit z hlediska rozsahu. V tomto ohledu se jako vhodný postup jeví testování výstupů, připravených s využitím aktuální verze funkcionalizačního zařízení, tedy konkrétního provedení funkcionalizovaného krytu rány s doplňkovým účinkem, ve zvoleném rozsahu. **Disertační práce je tedy zaměřena na předklinický experiment**, zaměřený na testování zařízením připravené vybrané varianty personalizovaného krytu rány. Specificky práce řeší design experimentu zaměřeného na předklinickou bezpečnost a účinnost, a to s akcentem na **oblast biologického hodnocení**, jeho provedení a vyhodnocení v procesu návrhu a vývoje.

V první kapitole jsou systematicky popsána **východiska pro design experimentu**. Zcela zásadním je v tomto ohledu charakteristika technických řešení použitých pro realizaci zařízení (obrázek 1) a jeho výstupů.

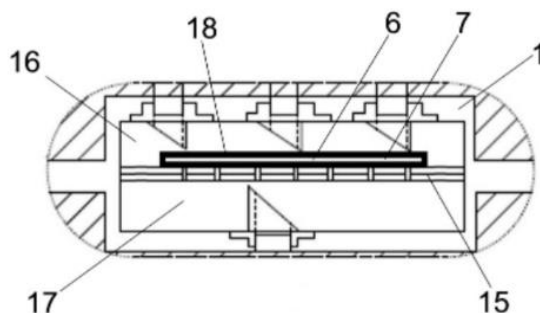


*Obrázek 1: Funkcionalizační zařízení
(verze ING MEDICAL)
Zdroj: Autor*

Jsou identifikovány a popsány zásadní charakteristické prvky konceptu ale i konkrétně jednotlivé funkční subsystémy, tj. soustava pro dávkování kapalin, subsystém pro přípravu funkcionalizačního roztoku (magnetické míchadlo, mikrofluidní čipy), soustava pro depozici, komponenta pro manipulaci substrátu a pomocné systémy, jako je soustava pro vedení kapalin, řídicí a monitorovací systém a další pomocné součásti (napájení, ohřevy, zdroj podtlaku, chlazení). Přehledným vyjádřením technického řešení je výkres obsažený v CZ patentu 308630 „Zařízení pro přípravu funkcionalizovaných substrátů“ ad [IV] (obrázky 2A a 2B).



Obrázek 2A: Příklad technického řešení funkcionalizačního zařízení dle patentu CZ 308630 ¹



*Obrázek 2B: Příklad technického řešení funkcionalizačního zařízení (detail komory)
dle patentu CZ 308630¹*

Z pohledu řešených výstupů zařízení, tedy personalizovaných krytů ran s doplňkovým účinkem, pak jde zejména o charakterizaci použitých materiálů a účinných látek. Naplnění požadavku na personalizaci péče je materializováno variabilním provedením krytu rány, konkrétně možností použití různých kombinací nosiče a doplňkového účinku.



*Obrázek 3: Kryt rány po funkcionalizaci
s využitím laboratorní verze funkcionalizační cartridge s integrovanou podporou
Zdroj: Autor v rámci řešení FV40189*

Doplňkový účinek, zajištěný variabilní kombinací účinných látek a drug delivery systému, resp. systémů, přitom v rámci technických limitů umožňuje parametrické nastavení, zejména celkového obsahu účinné látky (dose) a uvolňovacího profilu (kinetika uvolnění). Jako účinné látky pro účely experimentu byly zvoleny gentamycin (antibiotikum) a α -tokoferol, coby nejrozšířenější z forem vitamínu E (antioxidant). Drug delivery systém byl použit dle validovaných metodik výrobce, tj.

¹ seznam vztahových značek k obr. 2 a 3: 1 modifikační komora, 2 zdroj pro vytvoření tlakového spádu, 3 modul pro přípravu modifikačního roztoku, 4 prostředek pro smíšení, 5 zásobník, 6 nosný substrát, 7 funkcionalizovaný substrát, 8 mikrofluidní čip, 9 míchadlo, 10 dávkovač, 13 rozvodná soustava, 15 aplikační deska, 16 vstupní část, 17 výstupní část, 18 pouzdro, 19 jímací nádoba (terminologie použitá pro účely PV, práce užívá označení odlišná)

založený na enkapsulaci účinných látek do Solid Lipid Particles (SLP) formulovaných pomocí myristilalkoholu a Tween 20 (surfaktant). Jako vlastní kryt rány byl zvolen nanovláknenný substrát připravený z polykaprolaktonu metodou elektrostatického zvlákňování, který se již dříve ukázal být vhodným nosičem s prokázanou biokompatibilitou pro použití v humánní medicíně, zejména pro přípravu sofistikovaných krytů ran nebo scaffoldů modifikovaných deponovanými drug delivery systémy na bázi lipidů (Bratka a další, 2020).

Je také ověřována kvalifikace ve vztahu k MDR, což je zásadní pro aplikaci relevantních regulačních požadavků. **Personalizovaný kryt rány s doplňkovým účinkem může být kvalifikován jako prostředek** a vztahuje se na něj regulace MDR, pouze s různým rozsahem požadavků v závislosti na postupu uplatnění v klinické praxi. Ve všech identifikovaných případech je však požadováno prokázání plnění příslušných obecných požadavků na bezpečnost a účinnost uvedených v příloze I MDR, mezi kterými jsou zejména požadavky na biologickou bezpečnost, resp. prokázání biokompatibility. **Funkcionalizační zařízení** se jako zdravotnický prostředek nekvalifikuje. Jelikož jde ovšem o výrobek, který slouží k přípravě prostředku, je třeba jej pro tento účel kvalifikovat a proces výroby s jeho použitím validovat.

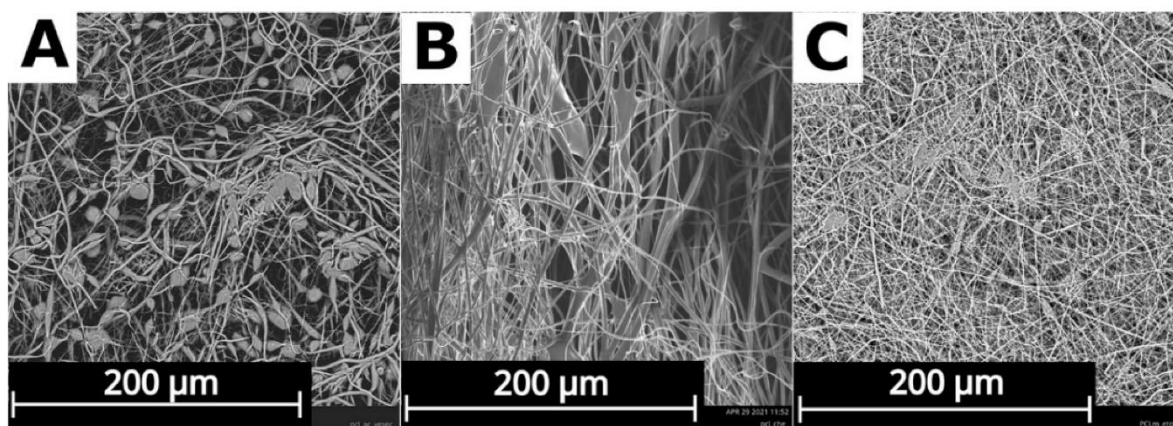
V návaznosti na dílčí závěry o kvalifikaci jsou analyzovány a podrobně shrnuty přístupy a metody relevantní pro testování biokompatibility zdravotnických prostředků. Pozornost je věnována příslušným tzv. koncovým bodům „Cytotoxicita“, „Senzibilizace“ a „Dráždivost nebo intrakutánní reaktivita“ včetně požadavku na „Fyzikální a/nebo chemické informace“ podle řady norem ČSN EN ISO 10993, které lze považovat i z vědeckého hlediska za zlatý standard. (Williams, 2021) Dále jsou s obdobným přístupem analyzována východiska pro testování předklinické účinnosti.

V kapitole následující je proveden **návrh a popsána realizace předklinického experimentu** zaměřeného na vybrané aspekty předklinického hodnocení, specificky ověření vybraných aspektů bezpečnosti a účinnosti připravených krytů ran, což je zásadní výstup pro ověření návrhu funkcionalizačního zařízení samotného. Zohledněny jsou přitom zejména vybrané identifikované požadavky, uživatelské a regulační. Při plánování testování je v souladu s regulačními požadavky nejprve hodnoceno, zda data již dostupná, zejména v publikované literatuře, nejsou dostatečná pro odůvodnění neprovedení nových testů.

V rámci experimentu je popsán výběr a příprava vzorků i použitá zařízení. Před vlastním testováním je provedena výchozí charakterizace pro ověření dat z předchozích testování, aby mohla být zohledněna také existující, nepublikovaná experimentální předklinická data, kterými výrobci disponují. Dále jsou řešeny jednotlivé okruhy požadavků a zvoleny konkrétní postupy, v rámci identifikovaných v teoretické části práce pro krytí rány, tedy fyzikální a chemická charakterizace, testování *in vitro* antibakteriální účinnosti krytu rány, včetně inhibice a eradikace bakteriálního biofilmu, antioxidační účinnosti krytu rány, cytotoxicita, senzibilizace a kožní dráždivost a následně pak, s využitím získaných poznatků, komplexní *in vivo* experiment.

4. VÝSLEDKY

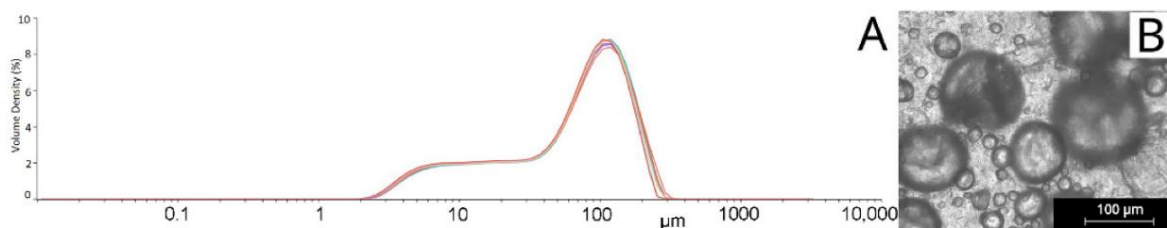
Testované **nosiče**, připravené podle odlišných receptur (použité rozpouštědlo – aceton, chloroform, kyselina octová) a na dvou různých zařízeních pro elektrostatické zvlákňování, vykazovaly na snímcích SEM podle předpokladu vzájemně odlišnou **morfologii** vláken (obrázek 4). Z hlediska velikosti, resp. průměru, vláken byly ve všech vzorcích zastoupeny jak nanovlákná, tak i mikrovlákná.



*Obrázek 4: Struktura testovaných vzorků analyzovaná pomocí SEM
Substrát z PCL s použitím různých rozpouštědel
(A) aceton (PCL_AC), (B) chloroform + ethanol (PCL_CHE) a (C) kyselina octová (PCL_AA).*

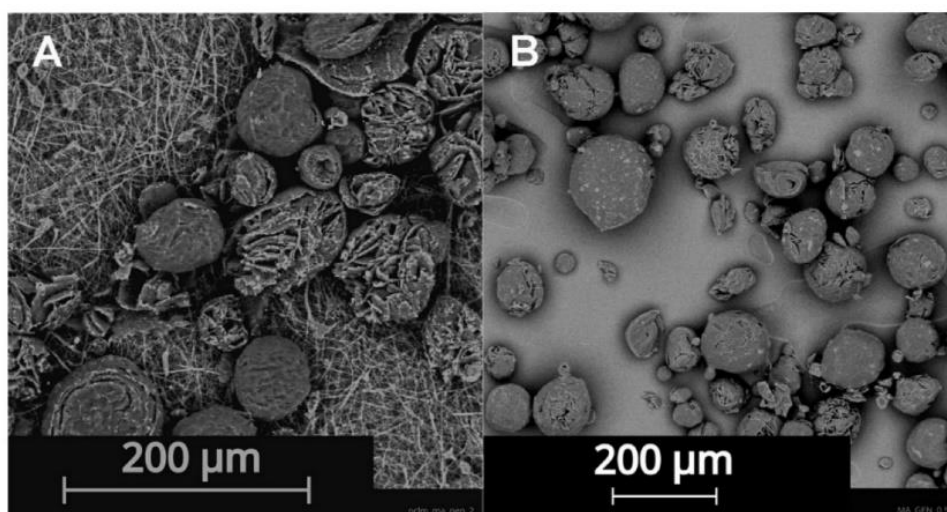
Morfologie jednotlivých vzorků byly podrobně charakterizovány podle sledovaných kritérií. Výstupy poskytly cenné podklady pro řízení rizik (zejména rizika spojená s opakovatelností), žádný substrát nebyl vyhodnocen jako zcela nevyhovující, a vzorky všech tří variant nosiče byly propuštěny do dalšího testování, byla však stanovena preference pro nanovláknenný substrát PCL_AA.

Analýza struktury a velikosti SLP byla zacílena na opakovatelnost procesu syntézy a imobilizace částic, hodnoceny byly částice po nánosu na povrch substrátu v suchém stavu (pro možnost snímkování SEM – skenovacím elektronovým mikroskopem). Částice vykazovaly v zásadě kulovitý tvar, průměrná hodnota průměru byla 76,6 µm (rozmezí hodnot od 25 µm do 101 µm). Velikost částic byla stanovena odečtem ze snímků SEM a následně také z hlediska distribuce jednotlivých velikostí kvantifikována pomocí navržené analýzy statického rozptylu světla (SLS), z níž byly patrná dvě maxima (píky) v distribuci velikosti částic (obrázek 5A), představující velikost částic v suspenzi před nánosem (obrázek 5B).



Obrázek 5: Analýza velikosti SLP ve vzorku GEN_1.5
 (A) Distribuce velikosti SLP měřená metodou SLS
 (B) Emulze SLP před imobilizací
 (Braňka, a další, 2022)

Podrobnější informace o charakteru jednotlivých částic poskytla analýza SEM. Byly identifikovány dva typy povrchů částic: hladký a zvrásněný (obrázek 6). Počet vzorků nebyl statisticky významný, tedy nelze konstatovat korelaci, nicméně byly indikovány potenciální závislosti výskytu těchto rozdílných povrchů na popsanych parametrech procesu přípravy. Vrásčité částice vykazují vyšší aktivní povrch, což může mít vliv na kinetiku uvolnění účinné látky.

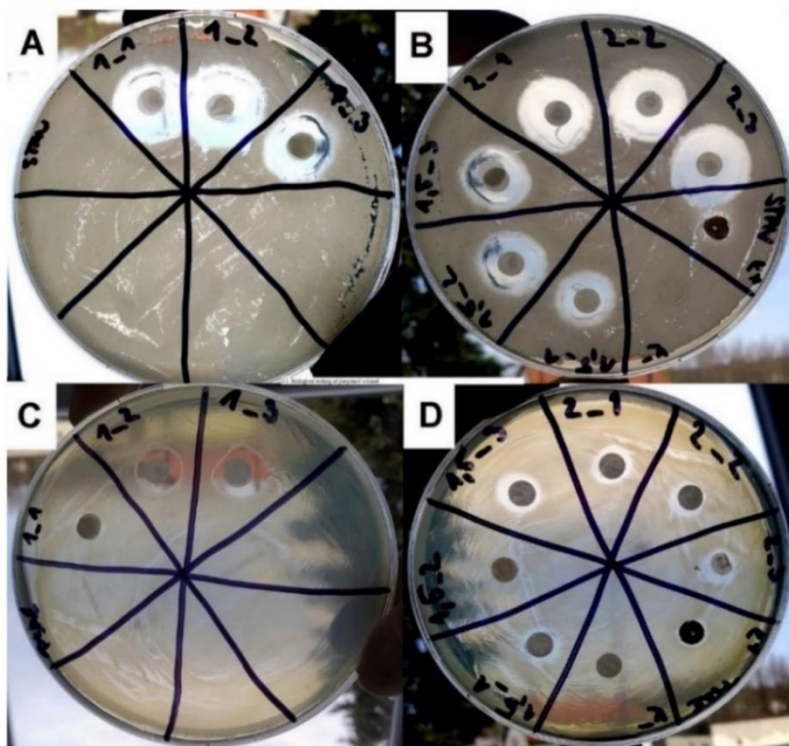


Obrázek 6: SEM analýzy struktury vytvořených SLP.
 Deponovány (A) na nanovláknový substrát PCL_AA, (B) na destičce pro tkáňové kultury.

Plánováno a provedeno bylo také kontrolní testování **uvolňování gentamycinu** z připravených vzorků SLP_GEN_1.5 (s využitím základní receptury). Jelikož hodnota odpovídala dřívějším měřením výrobce, testování nepokračovalo pro další varianty SLP a všechny vzorky byly propuštěny do dalšího testování.

První test *in vitro* byl zaměřen obecně na **antibakteriální účinnost proti zvoleným bakteriálním kmenům** *S. aureus* (STAU) a *P. aeruginosa* (PSAE), kterou mikrobiologické testování **diskovým difúzním testem** potvrdilo u všech vzorků (obrázek 7). Antibakteriální účinnost *in vitro* tedy

prokázaly všechny testované varianty krytu rány. Vzorky byly účinnější na grampozitivní *S. aureus*, kde je inhibiční zóna vzorku PSAE_GEN_2 větší než 5 mm.



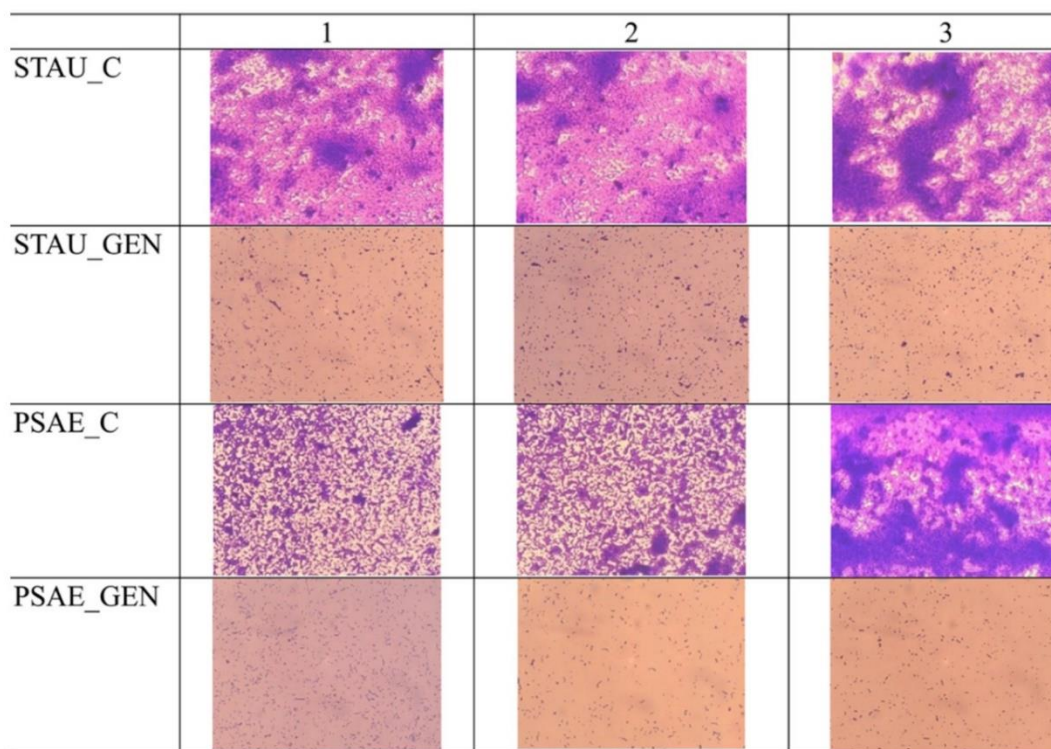
Obrázek 7: Výsledky diskového difúzního testu antibakteriální účinnosti
Agarové plotny s bakteriálními kmeny (A, B) *S. aureus* (STAU) a (C, D) *P. aeruginosa* (PSAE).
Vzorky GEN_1 (ve 3 opakováních 1_1, 1_2, 1_3), GEN_1.5 (ve 3 opakováních 1.5_1, 1.5_2, 1.5_3)
a GEN_2 (ve 3 opakováních 2_1 2_2, 2_3).

Antibakteriální účinnost vzorků v závislosti na celkové dávce gentamycinu (GEN) ve vzorku na použité bakteriální kmeny (STAU, PSAE) byla stanovena po 20 hodinách inkubace na agarové plotně při teplotě 37 °C. Statistická analýza ukázala, že neexistuje statisticky významný rozdíl pro *S. aureus* ($p = 0,152$) nebo pro *P. aeruginosa* ($p = 0,164$). Výsledky nevykázaly předpokládanou lineární závislost velikosti inhibiční zóny na celkové dávce účinné látky. Nicméně z pohledu cíle této práce zásadním výstupem bylo, že všechny vzorky vykázaly antibakteriální účinnost. Všechny formulace SLP GEN tedy mohly být propuštěny do dalšího testování. Na základě plánu testování však byla stanovena preference pro funkcionalizační formulaci SLP_GEN_1.5.

Testována byla dále specifická účinnost ve smyslu inhibice, v ideálním případě **eradikace bakteriálního biofilmu**. Pro testování byl použit preferovaný nosič PCL_AA.

Všechny testované vzorky podle hodnocení s využitím **inverzního světelného mikroskopu** účinně inhibovaly bakteriální biofilm tvořený bakteriálními kmeny *S. aureus* a *P. aeruginosa* (obrázek 8). V jamkách s kontrolou (STAU_C, PSAE_C), tvořenou nosičem se suspenzí SLP bez účinné látky (SLP_MA), došlo k velkému bakteriálnímu růstu ve srovnání s jamkami se

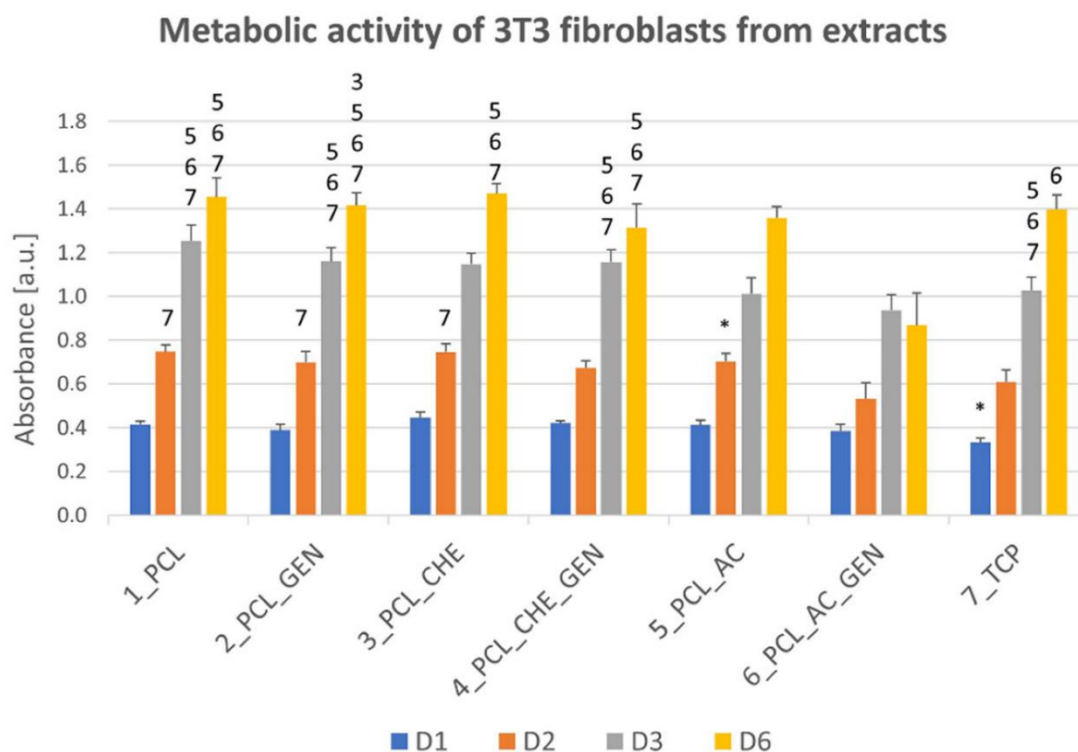
vzorky funkcionalizované SLP_GEN_1,5 (STAU_GEN, PSAE_GEN). U všech testovaných vzorků (vzorky testovány v tripletech) bylo možné pozorovat signifikantní inhibici, resp. eradikaci, biofilmu. V jamkách se vzorky s GEN byly při vyhodnocení pozorovány pouze planktonní buňky nebo malé shluky bakterií, ale pod vzorky nebo kolem nich v celé jamce se nevyskytla žádná souvislá vrstva nerozpuštěného biofilmu.



Obrázek 8: Analýza eradikace biofilmu pomocí skenování inverzním světelným mikroskopem. Testován biofilm tvořený bakteriálními kmeny P. aeruginosa (PSAE) a S. aureus (STAU). Jako nosič byla využit nanovlákněný substrát PCL_AA. Vzorky s antibakteriálními SLP (SLP_GEN_1,5, na obrázku GEN) prokázaly eradikaci bakteriálního biofilmu tvořeného samostatně oběma testovanými kmeny. Kontroly s SLP bez účinné látky (SLP_MA, na obrázku C) neprokázaly viditelný účinek. Vzorky byly testovány v triplicátech – výsledky uvedeny ve sloupcích. (Bratka, a další, 2022)

Provedená **spektrofotometrická analýza** biofilmů po aplikaci vzorků modifikovaných suspenzí SLP_GEN_1.5 ukázala, že absorbance se po aplikaci funkcionalizovaného substrátu snížila o 85 % u *S. aureus* (STAU) a o 86 % u *P. aeruginosa* (PSAE), což byly uspokojivé hodnoty. Výsledky ukázaly, že testované nosiče s deponovanými SLP_GEN_1.5 nejen inhibují biofilm tvořený testovanými bakteriemi, ale eradikují také jeho strukturu. Varianta SLP GEN_1.5 tedy mohla být propuštěna do dalšího testování.

Metodami *in vitro* bylo dále dle plánu realizováno **testování cytotoxicity**, a to všech tří variant nosiče bez SLP (PCL_AA, PCL_CHE, PCL_AC) a všech tří variant nosiče s preferovanou variantou SLP GEN_1.5. Výsledky ukázaly významně nižší metabolickou aktivitu fibroblastů 3T3 na vzorcích PCL_AC i PCL_AC_GEN (obrázek 9).



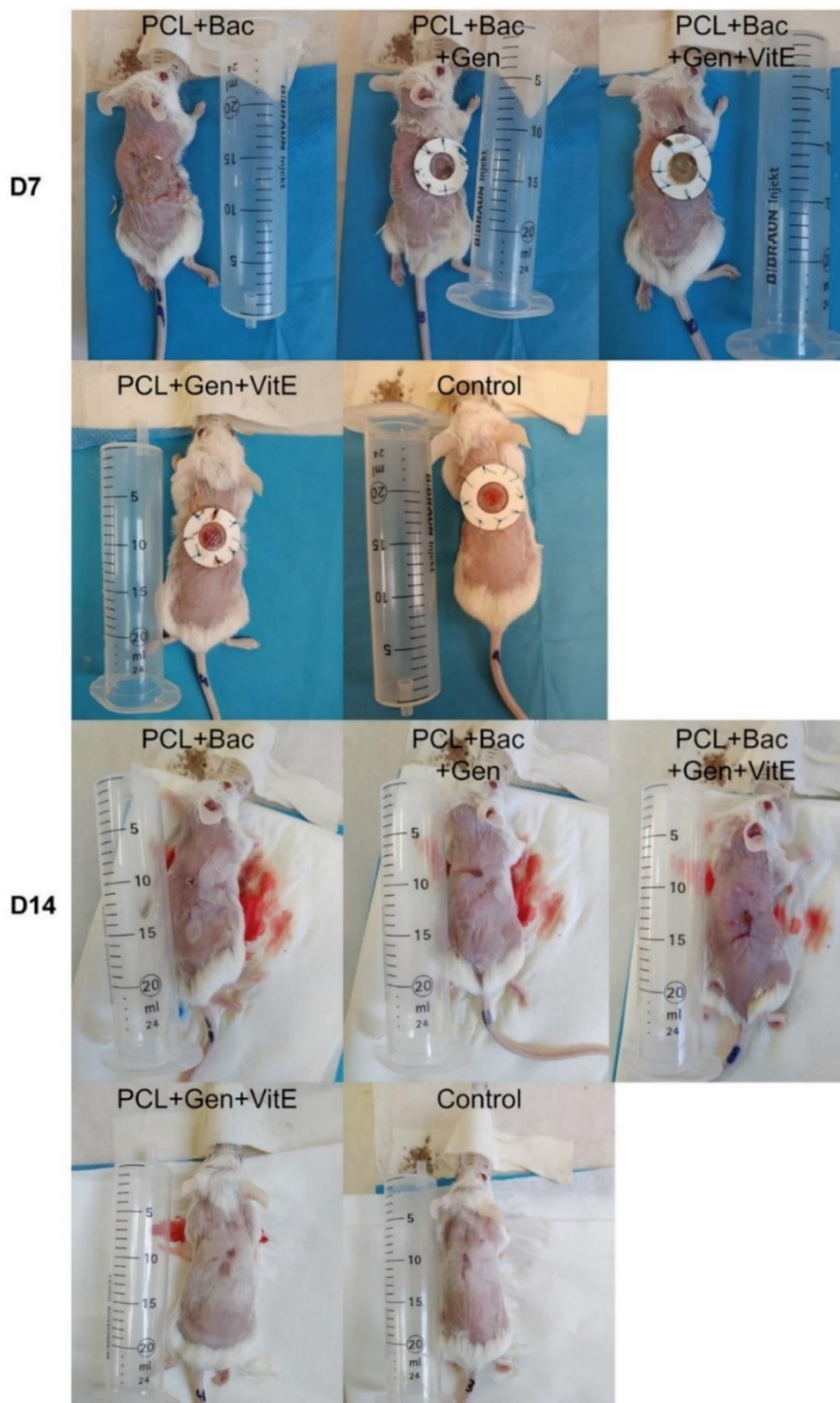
Obrázek 9: Výsledky testování cytotoxicity extraktů metodou MTT s využitím 3T3 fibroblastů. Hodnoceny varianty nosiče bez SLP, tj. nanovláknenné substráty z PCL připravené s použitím různých rozpouštědel (PCL_AA v grafu jako PCL, PCL_CHE, PCL_AC) a též nosiče s imobilizovanou formulací SLP GEN_1,5 s obsahem gentamycinu (v grafu GEN). Pro testování použity myší fibroblasty 3T3. Hodnocení ve dnech 1, 2, 3, a 6. Statistická významnost mezi skupinami byla stanovena na $p < 0,05$ a je popsána ve výše uvedených sloupcích. * ukazuje statistický rozdíl ve srovnání s ostatními vzorky, číslo představuje číslo vzorku. (Brašková, a další, 2022)

Na základě hodnocení publikované literatury lze mít biokompatibilitu, specificky nízkou cytotoxicitu, PCL za prokázanou. Jelikož byla cytotoxicita zjištěna u substrátu bez SLP a ostatní vzorky se stejnou formulací cytotoxicitu nevykázaly, cytotoxicita vzorků s PCL_AC tedy byla pravděpodobně způsobena, i přes provedená opatření, zejména rezidui výrobního procesu, konkrétně zbytky acetonu v nanovláknenném substrátu. Tento poznatek vytvořil další zásadní vstup pro řízení rizik a vedl k vyloučení nosiče PCL_AC z dalšího testování.

Vzorky nosičů PCL_CHE (připraven s použitím chloroformu) a PCL_AA (připraven s použitím kyseliny octové) naopak nebyly cytotoxické samostatně ani s imobilizovanými SLP a podporovaly buněčný růst a metabolickou aktivitu. Nosiče PCL_CHE a PCL_AA a formulace SLP GEN_1,5 proto mohly být propuštěny do dalšího testování.

Před zahájením realizace *in vivo* experimentu bylo třeba vyhodnotit výsledky *in vitro* testování. S ohledem na zadání, jehož zásadními parametry byly také minimalizace potřeby pokusných zvířat z důvodu jejich ochrany a ekonomická efektivita testování, byly pro *in vivo* experiment na základě analýzy výsledků provedené v předchozích částech této podkapitoly, **zvoleny varianty** nosiče PCL_AA a funkcionalizační formulace SLP GEN_1.5, tedy preferovaní, resp. nejslibnější kandidáti. Zároveň hodnocení publikované literatury v kombinaci s výsledky *in vitro* experimentů pro tuto kombinaci provedení *in vivo* experimentu opodstatnily.

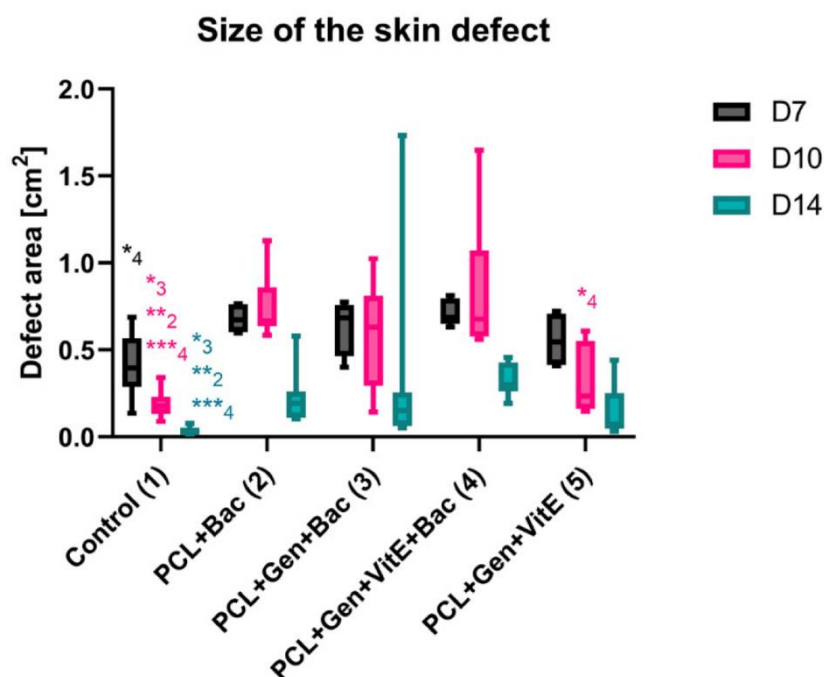
Průběh **experimentu na myším modelu** a dílčí výsledky dokumentuje mimo jiné fotodokumentace postupu hojení defektů (obrázek 10). Šest zvířat z různých skupin s aplikovanými bakteriemi nepřežilo do posledního experimentálního dne a jeden vzorek byl zničen během procesu extrakce.



Obrázek 10: Fotodokumentace hojení kožních defektů během experimentu.
 Indukované rány infikovány *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Bac) nebo bez bakterií.
 Rány ošetřené vzorky nosiče PCL_AA (PCL) bez funkcionalizace, funkcionalizovanými suspenzí
 SLP_GEN_1,5 s gentamycinem (Gen) anebo suspenzí SLP_VitE s α -tokoferolacetátem (VitE).
 Kontrola (Control) ošetřena jen sekundárním krytím.
 Hodnoceno 7. a 14. den po operaci. (Bratka, a další, 2022)

V kontrolní skupině bez bakteriální infekce (kontrola) lze hojení defektu označit za rychlé, 14. den byl defekt téměř zhojen. U některých zvířat byly defekty částečně pokryty srstí. Ve skupině PCL + GEN + VitE, která také neobsahovala bakterie, se rozsah defektu průběžně zmenšoval a po 14 dnech byl téměř zhojen, což byl podobný výsledek jako u kontrolní skupiny, ovšem s přítomností malého strupu a srsti na defektu.

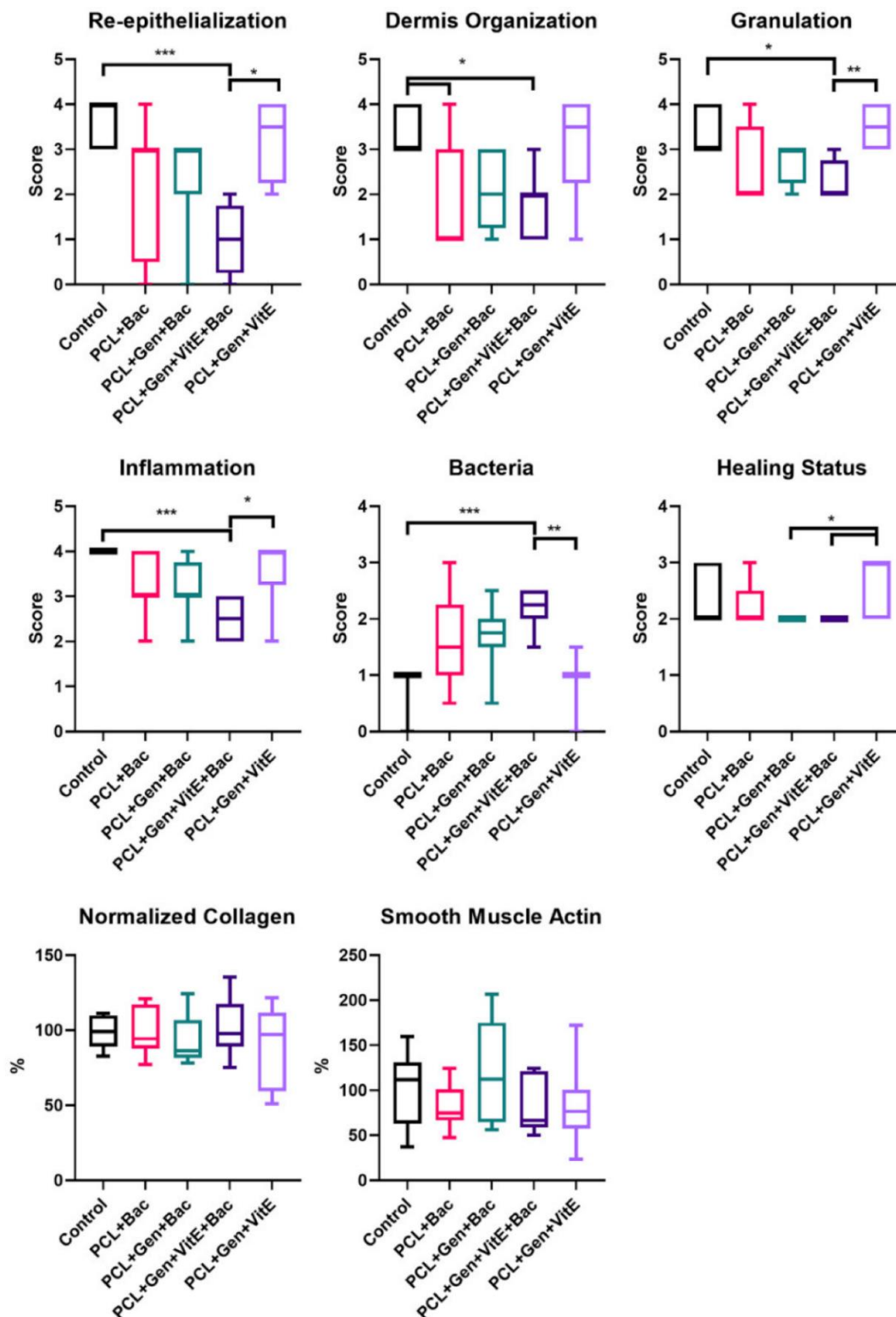
Defekty ve skupině PCL + BAC, tedy s nosičem PCL_AA bez funkcionalizace a s bakteriální infekcí, se hojily pomaleji a byly větší než u skupiny kontrolní. Některé defekty byly viditelně vyplněny granulační tkání a strupem. Skupina PCL + GEN + BAC, ošetřená nosičem funkcionalizovaným SLP GEN_1,5, vykazovala větší rozdíly, zejména ve vyhodnocení 14. den. U některých zvířat byly defekty téměř zhojeny, ale u jiných zvířat byl stroupek velikosti původního defektu nebo větší a defekty obsahovaly hnis. Defekty ve skupině PCL + GEN + BAC + VitE, ošetřené nosičem se SLP GEN_1,5 a SLP_VitE, se hojily pomalu, velikost defektu se zmenšila a byly vyplněny granulační tkání a/nebo strupem. Plocha defektů byla měřena ze snímků pořízených 7., 10. a 14. den (obrázek 11).



Obrázek 11: Velikost kožních defektů během experimentu hodnocená 7., 10. a 14. den po operaci. Indukované rány infikovány *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Bac) nebo bez bakterií. Rány ošetřené vzorky nosiče PCL_AA (PCL) bez funkcionalizace, funkcionalizovanými suspenzí SLP_GEN_1,5 s gentamycinem (Gen) anebo suspenzí SLP_VitE s α -tokoferolacetátem (VitE). Kontrola (Control) ošetřena jen sekundárním krytím. Statistická významnost byla označena jako číslo reprezentující skupinu. Významný rozdíl * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Bratka, a další, 2022)

V rámci **histologické analýzy** měření nově vytvořené kůže podle předpokladu indikovalo, že bakteriální infekce prodlužuje konstriktci a regeneraci rány, přestože rozdíly mezi skupinami v tomto smyslu nebyly příliš významné. Nevýznamný rozdíl byl patrný ve skupině ošetřené krytem s plným doplňkovým účinkem, kde se objevila nejkratší nekompletní kůže, signalizující slibný efekt kombinace PCL + GEN + VitE. Přítomnost bakterií v ráně významně zvýšila tloušťku jizvy a také vedla k vyšší hypertrofii nově vytvořených vrstev kůže. Ve skupinách s indukovanou bakteriální infekcí narostla epidermis do mnohonásobné tloušťky. Podobné výsledky byly pozorovány v dermis a hypodermis, kde hypodermis ve skupině ošetřené PCL + GEN + VitE + BAC tvořila téměř dvojnásobnou tloušťku ve srovnání s kontrolními skupinami bez indukované bakteriální infekce. Všechny vzorky vykazovaly alespoň přijatelně zhojenou ránu.

V rámci histologické analýzy byly dále jednotlivě hodnoceny různé aspekty histologického hodnocení, které charakterizují hojení rány (obrázek 12).



Obrázek 12: Histologické hodnocení jednotlivých aspektů, charakterizujících hojení rány, podle zvolené metodiky. Indukované rány infikovány *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Bac) nebo bez bakterií. Rány ošetřené vzorky nosiče PCL_AA (PCL) bez funkcionalizace, funkcionalizovanými suspenzí SLP_GEN_1,5 s gentamycinem (Gen) anebo suspenzí SLP_VitE s α -tokoferolacetátem (VitE).

Kontrola (Control) ošetřena jen sekundárním krytím.

Metodika hodnocení podle (Simonetti, a další, 2020) a (Lazarus, a další, 1994).

Významný rozdíl * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Bratka, a další, 2022)

Nově vytvořená tkáň dosáhla adekvátní tloušťky a keratinocyty migrovaly do vnějších částí rány a vytvořily epidermis, jak je vidět při hodnocení reepitelizace. *Stratum corneum* se často zcela vytvořilo v kontrolních skupinách bez aplikované bakteriální směsi. Významné rozdíly se objevily mezi kontrolní skupinou a PCL + GEN + VitE + BAC a také mezi PCL + GEN + VitE + BAC a PCL + GEN + VitE v neinfikovaných ranách. Dermis a hypodermis zůstaly většinou ve fázi granulace tkáně; stanovení dermis však bylo problematické kvůli neúplné tvorbě vrstvy. V kontrolní skupině byla zjištěna významně vyšší organizace dermis ve srovnání se skupinami PCL + GEN + VitE + BAC a PCL + BAC, zatímco při hodnocení granulace tkáně byly signifikantní rozdíly podobné jako u reepitelizace, opět mezi PCL + GEN + VitE + BAC a kontrolní skupina a skupina PCL + GEN + VitE + BAC a neinfikovanou skupinou PCL + GEN + VitE.

Zánět tkáně byl podle očekávání výraznější u infikovaných skupin i přes přidaná antibiotika, což bylo stejné jako přítomnost bakterií v nově vytvořené tkáni; výsledky hodnocení zánětu a přítomnosti bakterií sledovaly stejný vzorec jako výsledky reepitelizace a granulace tkáně, s významnými rozdíly mezi PCL + GEN + VitE + BAC a kontrolní skupinou a PCL + GEN + VitE + BAC a neinfikovaná PCL + GEN + VitE skupina, také prezentovaná na obrázku P3.9 v příloze 3. V kontrolních skupinách se objevilo vyšší množství kolagenových vláken a nižší počet buněk bez indukované bakteriální infekce, přesto jim chyběly významné rozdíly. Neovaskularizační marker SMA nevykazoval žádné významné rozdíly mezi skupinami, ale často se v nich měnil. Tuková vrstva hypodermis se zřídka plně vytvořila, i když se objevily jednotlivé tukové buňky, přesto se papily objevily ve skupinách postrádajících bakteriální infekci.

Dosažené výsledky bylo třeba interpretovat ve vztahu k řešeným požadavkům. Regulatorní reference byly v designu experimentu zohledněny, v dané fázi ovšem nebylo předpokládáno plné prokázání jejich plnění. Testování však mělo vytvořit podklad pro testy za účelem jejich prokázání v konečné fázi návrhu a vývoje a v tomto ohledu byl identifikován potenciál shody.

Z pohledu cíle práce nejdůležitější výsledky, tedy dopady zkoušení připravených krytů ran na návrh zařízení, jsou uvedeny na závěr, jelikož se jedná o interpretaci předchozích dosažených experimentálních výsledků.

Z hlediska **celkové koncepce** funkcionalizačního zařízení jsou podstatné v zásadě všechny výsledky testování vytvářeného krytu rány, tj. zaměřené na jeho bezpečnost i účinnost.

Výchozí charakterizace prokázaly produkci funkcionalizační formulace, resp. SLP ve shodě s předpokládanými parametry, ovšem s tím, že **byly identifikovány nové požadavky na robustnost metodiky pro přípravu SLP**. Výsledky indikovaly nové parametry receptury, které by bylo vhodné stanovit, validovat a následně během syntézy SLP kontrolovat (zejména zohlednit dobu zahřívání a chlazení zpracovávaných roztoků, mj. v závislosti na okolní teplotě), nebo přinejmenším zohlednit v řízení rizik. Stávající provedení funkcionalizačního zařízení využívá pro chlazení pracovního prostoru axiální ventilátor 120 x 120 x 38 mm s průtokem 2.1 m³/min. (Omron, Japonsko), pro chlazení vnější

nádoby magnetického míchadla je použita dvojice bezkartáčových ventilátorů s průtokem 7,8 CFM, tj. 220,74 dm³/min (Zhengzhou Airwowing Technology, Čína). Tento systém by bylo vhodné pro naplnění nově identifikovaných požadavků nahradit přiměřeně výkonným systémem aktivního chlazení a doplnit o monitoring okolní teploty pro korekci výkonu.

Výsledky *in vivo* experimentu neukázaly negativní účinky aplikace nosiče funkcionalizovaného GEN a VitE enkapsulovanými v SLP_MA, což svědčí pro jeho biokompatibilitu. Výsledky byly v tomto ohledu velmi podobné ve všech skupinách. Na základě histologického vyhodnocení lze konstatovat lepší tvorbu všech tří vrstev kůže, a dokonce i tenčích vrstev ve skupině ošetřené krytem s plným doplňkovým účinkem (GEN+VitE) ve srovnání s kontrolní skupinou bez vyvolané infekce, což umožňuje také konstatovat pozitivní vliv krytu na hojení. Ve srovnání s krytím pouze PCL vlákny měla varianta krytu s plným doplňkovým účinkem také pozitivní vliv na granulaci tkáně a organizaci dermis. Dosažené výsledky u vzorků s bakteriální infekcí také naznačují, že formulace SLP_GEN zabezpečuje prodloužené uvolnění a stabilizuje jeho koncentraci. Ve stejném srovnání bylo možné indikovat interindividuální variabilitu hojení i v přítomnosti bakteriální infekce s výjimkou SMA. Marker vaskularizace se v přítomnosti GEN při probíhající bakteriální infekci více lišil, ale jeho přítomnost prokázala pozitivní vliv GEN na novotvorbu cév i přes bakteriální zánět. **Nebyl tedy zjištěn problém s kvalitou výstupu nebo jeho opakovatelností, ani nedostatky návrhu ve smyslu např. kontaminace vzorku.**

Antibakteriální účinnost krytu rány, prokázaná *in vitro* jak proti planktonním formám použitých bakteriálních kmenů, tak proti biofilmu tvořenému jejich směsí, se v rámci *in vivo* experimentu ukázala jako nedostatečná. Její zvýšení je v rámci stávající koncepce realizovatelná více způsoby (zvýšení množství deponovaných SLP_GEN, úprava množství GEN enkapsulovaného v SLP, modulace uvolňovacího profilu GEN z SLP zejména úpravou velikosti částic, náhrada GEN za jinou účinnou látku), a to **bez nutnosti zásahu do návrhu funkcionalizačního zařízení.**

Také kombinovaný účinek GEN a VitE uvolněných z lipidové vrstvy krytu se v případě bakteriální infekce rány jeví jako nedostatečný pro její úplnou eliminaci. Aplikace směsi bakterií *S. aureus* a *P. aeruginosa* v rámci experimentu však způsobila zánět natolik závažný, aby vedl k předčasné smrti některých pokusných zvířat, zatímco zvířata ošetřená krytem s přidanými antibiotiky experiment přežila. To naznačuje opět potřebu parametrické změny nastavení krytu, ve smyslu zvýšení celkové dávky antibakteriální složky anebo modulace uvolňovacího profilu pro dosažení delší efektivní doby inhibice, **tedy změn provozního protokolu, které jsou plně v možnostech funkcionalizačního zařízení.**

Implicitní součástí ověřované hypotézy byl předpoklad příspěvku vitamínu E, jehož nejčastější formou je v rámci experimentu použitý α -tokoferol, k hojení chronické rány za přítomnosti zvoleného antibiotika. To se bohužel potvrdit nepodařilo. Navzdory slibným výsledkům z literatury a *in vitro* testování, aplikace α -tokoferolu prodlouženým uvolněním ze SLP_MA deponovaných na nosiči z PCL

významně neovlivnila zánět způsobený bakteriální infekcí ani nezvýšila histologické skóre směrem k hojení ve srovnání s výsledky skupin bez VitE a s GEN. Kromě toho nebyly pozorovány žádné negativní změny ve srovnání výsledků kontrolních skupin bez indukované infekce a nanovláken a kontroly bez infekce s krytem s plným doplňkovým účinkem (GEN + VitE). Tato skupina (PCL + GEN + VitE) vykazovala ještě o něco více vytvořenou dermis. Tyto skutečnosti mají zásadní vliv na návrh řešeného krytu rány, **nikoli ovšem přímý vliv na návrh funkcionalizačního zařízení.**

Závěry vyslovené pro celkovou koncepci funkcionalizačního zařízení jsou do značné míry platné i specificky pro návrh jeho zásadních **dílčích komponent**, tedy lineárních dávkovačů, subsystému pro přípravu funkcionalizačního roztoku, soustavy pro depozici a soustavy pro manipulaci substrátu.

Pro ověření návrhu funkcionalizačního zařízení, ve smyslu jeho validace², jsou vedle poznatků získaných samotným experimentem zásadní také vytvořené **poznatky provozní.**

Z hlediska následného použití v klinické praxi se jako podstatná projevila také **časová náročnost přípravy a snadná realizace celého procesu** z pohledu personálu, která se v rámci laboratorní přípravy menšího počtu vzorků nebylo dosud možné relevantně hodnotit. V tomto ohledu se jako více než potřebné jeví provedení optimalizace doby trvání procesu funkcionalizace. To je možné realizovat zejména úpravou receptury, bez dopadu na návrh zařízení. Naopak **usnadnění manipulace se zařízením a jeho sanitace**, včetně například větší automatizace sanitačních protokolů nebo náhrada i dalších komponent jednorázovými, je vhodné zvážit pro zapracování do návrhu pro zvýšení celkové efektivity provozu. Z hlediska řešených aspektů bezpečnosti a účinnosti jsou však tyto procesy vyhovující. Obdobným prismatem je třeba nahlížet celkový tzv. mrtvý objem zařízení, resp. soustavy využívající magnetické míchadlo, který vede k do určité míry neefektivnímu hospodaření se surovinou v případě potřeby velmi malého objemu funkcionalizačního roztoku. Jako efektivnější alternativa se tedy jeví využití MF čipů, kterými zařízení ovšem již disponuje, byť z hlediska předklinické bezpečnosti a účinnosti vytvářeného zdravotnického prostředku jsou v tomto ohledu požadavky opět plněny.

V průběhu realizace experimentu bylo, také za účasti autora této práce, vyvinuto řešení funkcionalizační cartridge, chráněné užitným vzorem [V]. Toto řešení nemohlo být z důvodu srovnatelnosti a návaznosti výsledků pro realizaci *in vivo* experimentu plně využito, nicméně je velice slibné pro zásadní usnadnění manipulace s funkcionalizovaným krytem i ve smyslu výše uvedených požadavků na sanitaci zařízení.

² součástí procesu ověření návrhu zdravotnického prostředku je jeho validace a verifikace; dle ustálené terminologie validace návrhu zdravotnického prostředku zahrnuje ověření plnění požadavků, jde tedy o pojem širší než verifikace, která ověřuje plnění (technického) zadání (Kumar, a další, 2019)

5. ZÁVĚR

Disertační práce se zaměřila na komplexní řešení výzkumu a vývoje v oblasti jedné iterace ověření návrhu zdravotnického prostředku a zařízení pro jeho produkci. Řešená tematika byla specifická také zaměřením na dílčí předklinické ověření výstupu připraveného funkcionalizačním zařízením, které se samo o sobě jako zdravotnický prostředek nekvalifikovalo. Tento výstup, kryt rány s doplňkovým účinkem, byl také posouzen z pohledu regulace jako ve více ohledech hraniční. Tato komplikovaná analýza ovšem přinesla zároveň zajímavé výsledky z pohledu možnosti relativně rychlého uplatnění výstupu v klinické praxi formou tzv. in house zdravotnických prostředků ve zdravotnickém zařízení.

V rámci práce byla prakticky demonstrována zejména posloupnost jednotlivých kroků přípravy, realizace a vyhodnocení testování, a to se zohledněním protichůdných priorit výzkumníka a výrobce a také s cílem provést syntézu vědeckých a technických požadavků s požadavky regulatorními. Specifickou, nikoli triviální otázkou v rámci designu experimentu, byla otázka, které aspekty již testovat, a které je racionální zkoušet až po finální stabilizaci návrhu testovaného zdravotnického prostředku.

S využitím řešeného zařízení byly připraveny a hodnoceny kryty ran s doplňkovým účinkem podle technických východisek, tedy nanovláknenné substráty z polykaprolaktonu obohacené o antibiotikum (gentamycin) a antioxidant (vitamín E ve formě α tokoferolu), enkapsulované v pevných lipidových částicích z myristilalkoholu. Zvolená varianta krytu, identifikovaná v rámci kontrolních charakterizací jako nejslibnější kandidát, prokázala sledované aspekty účinnosti v rámci *in vitro* experimentů, což podpořilo předchozí laboratorní výsledky výrobců.

V rámci *in vivo* experimentu na myším modelu se podařilo úspěšně simulovat chronickou ránu kombinovanou aplikací bakteriální směsi *S. aureus* a *P. aeruginosa* a silikonových O-kroužků do indukované rány. Provedený *in vivo* experiment poskytl celou řadu dále využitelných poznatků. Zejména nebyly indikovány reakce, které by značili že testované prostředky nejsou biokompatibilní, což byl zásadní sledovaný aspekt ve vztahu k předklinické bezpečnosti řešených prostředků. Z hlediska antibakteriální účinnosti byla indikována potřeba parametrické úpravy krytu za účelem zvýšení antibakteriálního účinku pomocí vyšší dodané dávky gentamycinu, coby antibiotika uvolněné do rány, která je plně v praktických možnostech funkcionalizačního zařízení. Zároveň se jako relevantní jeví závěr, že α -tokoferol jako antioxidant by neměl být aplikován před eradikací bakteriální infekce v léčbě chronické rány. I tento nový požadavek, vzešlý z provedeného testování, je z pohledu navrženého konceptu řešitelný, a to buď definováním „kaskády“ po sobě aplikovaných variant krytu rány ale i v rámci jednotlivého krytu, kdy drug delivery systém může zabezpečit odklad uvolnění jedné ze složek zajišťujících doplňkový účinek krytu, specificky antioxidantu. Tyto a další, zejména provozní poznatky budou aplikovány v procesu návrhu a vývoje nejen konkrétní verze krytu, ale i funkcionalizačního zařízení.

Tato práce však zejména úspěšně přispěla k prokázání proveditelnost koncepce přípravy krytí ran v ambulantních podmínkách pomocí vhodného funkcionalizačního zařízení, tedy prokázala ověřovanou tezi. Vedle potenciálního využití navrženého inovativního přístupu v oblasti urgentní medicíny, válečné medicíny anebo medicíny katastrof byl také realizován příspěvek pro rozvoj oboru biomedicínského inženýrství, a to vytvořením aplikací a propojením poznatků z oblasti ověřování návrhu klinické techniky a zkoušení zdravotnického prostředku.

Seznam v tezích použité literatury

Boutrand, Jean- Pierre (ed.). 2019. *Biocompatibility and performance of medical devices*. Second Edition. místo neznámé : Woodhead Publishing, 2019. ISBN 9780081026441.

Bratřka, Petr et al. 2022. The Preparation and Biological Testing of Novel Wound Dressings with an Encapsulated Antibacterial and Antioxidant Substance. *Nanomaterials*. 2022, Sv. 12, 21.

Bratřka, Petr et al. 2020. Brno: NANOCON, 2020. Proceedings of the 12th International Conference on Nanomaterials—Research & Application. ISBN 9788087294987.

Dowd, Scot E. et al. 2011. Molecular diagnostics and personalised medicine in wound care: assessment of outcomes. *Journal of wound care*. 2011, Vol. 20, 5, pp. 232-239.

Lazarus, Gerald S. et al. 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound repair and regeneration*. 1994, Sv. 2, 3, stránky 165-170.

Simonetti, Oriana et al. 2020. New evidence and insights on dalbavancin and wound healing in a mouse model of skin infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020, Sv. 64, 4.

Williams, David F. 2021. Assessing the triad of biocompatibility, medical device functionality and biological safety. *Medical Devices & Sensors*. 2021, Sv. 4, 1.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/745, ze dne 5. dubna 2017, o zdravotnických prostředcích, ve znění pozdějších předpisů.

Zákon č. 378/2007 Sb., Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), ve znění pozdějších předpisů

ČSN EN ISO 10993-1:2021 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků -
Část 1: Hodnocení a zkoušení v rámci procesu managementu rizik

ČSN EN ISO 13485 ed. 2 Zdravotnické prostředky - Systémy managementu kvality - Požadavky
pro účely předpisů

Seznam prací disertanta vztahujících se k disertaci

Odborné publikace

Bratřka, Petr et al. 2022. *The Preparation and Biological Testing of Novel Wound Dressings with an Encapsulated Antibacterial and Antioxidant Substance.* Nanomaterials. 2022, Sv. 12, 21.

Bratřka, Petr et al. 2020. *Special Nanofiber Scaffold Designed for Cellular Products in the Treatment of Chronic Wounds.* In: NANOCON 2020. Proceedings of the 12th International Conference on Nanomaterials—Research & Application. Brno: 2020. ISBN 978-80-87294-98-7.

Technická řešení s průmyslově-právní ochranou

- [I] **Patent CZ 308352**, PV 2015-438, **Soustava pro aplikaci účinné látky z jednorázového zásobníku na enkapsulovaný nosič a způsob její činnosti**; ING MEDICAL s.r.o.; původci JUDr. Jan Kavalírek, Ing. Petr Bratřka
- [II] **Patent CZ 307805**, PV 2015-439, **Zařízení pro funkcionalizaci vláknitých struktur v lékařství a způsob jeho činnosti**; vlastník ING MEDICAL s.r.o.; původce JUDr. Jan Kavalírek, Ing. Petr Bratřka
- [III] **Patent CZ 308361**, PV 2015-440, **Soustava pro aplikaci účinné látky na enkapsulovaný nosič a způsob její činnosti**; ING MEDICAL s.r.o.; původci JUDr. Jan Kavalírek, Ing. Petr Bratřka
- [IV] **Patent CZ 308630**, PV 2019-720, **Zařízení pro přípravu funkcionalizovaných substrátů**; vlastník Grade Medical s.r.o.; původci Ing. Petr Bratřka, JUDr. Jan Kavalírek, Praha 5, Velká Chuchle, Česká republika; analogicky **PCT CZ2020-000049**
- [V] **Užitný vzor CZ 36359**, PUV 2022-39834, **Prostředek pro přípravu funkcionalizovaných nosičů**; vlastníci Grade Medical s.r.o., České vysoké učení technické v Praze; původci Ing. Petr Bratřka, prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D.
- [VI] **Užitný vzor CZ 36360**, PUV 2022-39841, **Zařízení pro depozici roztoků**; vlastníci Grade Medical s.r.o., Technická univerzita v Liberci; původci Ing. Petr Bratřka, prof. MUDr. Tomáš Trč, CSc., MBA, Praha 4, Hodkovičky, Česká republika, prof. Ing. Václav Kopecký, CSc., Ing. Michal Kotek, Ph.D., Ing. Darina Jašíková, Ph.D.
- [VII] **Užitný vzor CZ 36823**, PUV 2022-39558, **Substrát s funkční vrstvou s antimikrobiálním účinkem**, vlastníci Grade Medical s.r.o., Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Univerzita Karlova; původci Ing. Petr Bratřka, prof. MUDr. Tomáš Trč, CSc., MBA, prof. MUDr. David Pokorný, CSc., Mgr. Eva Filová, Ph.D.
- [VIII] **Užitný vzor CZ 36922**, PUV 2022-39718, **Substrát s funkční vrstvou s antioxidačním účinkem**; vlastníci Grade Medical s.r.o., Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Univerzita Karlova; původci Ing. Petr Bratřka, prof. MUDr. Tomáš Trč, CSc., MBA, prof. MUDr. David Pokorný, CSc., Mgr. Eva Filová, Ph.D.

- [IX] **Užitný vzor CZ 36369**, PUV 2022-39775, **Prostředek pro aplikaci na kůži s antimikrobiálními účinky**; vlastníci ING MEDICAL s.r.o., Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., České vysoké učení technické v Praze, KAR BioTech s.r.o.; původci Mgr. Ing. Hana Havlová, Ing. et Ing. Taťána Fenclová, Ph.D., Ing. Petr Bratřka, Mgr. Eva Filová, Ph.D., prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., JUDr. Jan Kavalírek, Mgr. Jana Hlinková, Ph.D., Mgr. Radmila Žižková, Mgr. Veronika Blahnová, Mgr. Viktorie Sedláčková, Mgr. Lenka Uherková, Mgr. Eva Šebová
- [X] **Užitný vzor CZ 36370**, PUV 2022-39776, **Prostředek pro aplikaci na kůži s antioxidačními účinky**; vlastníci ING MEDICAL s.r.o., Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., České vysoké učení technické v Praze, KAR BioTech s.r.o.; původci Mgr. Ing. Hana Havlová, Ing. et Ing. Taťána Fenclová, Ph.D., Ing. Petr Bratřka, Mgr. Eva Filová, Ph.D., prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., JUDr. Jan Kavalírek, Mgr. Jana Hlinková, Ph.D., Mgr. Radmila Žižková, Mgr. Veronika Blahnová, Mgr. Viktorie Sedláčková, Mgr. Lenka Uherková, Mgr. Eva Šebová
- [XI] **Patent CZ 309661**, PV 2022-42, **Krycí prostředek s obsahem účinné látky**; vlastníci ING MEDICAL s.r.o., EcoFuel Laboratories s.r.o., Fakultní Nemocnice Královské Vinohrady; původci Ing. Petr Bratřka, doc. Ing. Petr Kaštánek, Ph.D., prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc., MUDr. Lukáš Havlůj
- [XI] **Užitný vzor CZ 36371**, PUV 2022-39835, **Nosič s vrstvou funkčních částic**; vlastníci Grade Medical s.r.o., České vysoké učení technické v Praze; původci Ing. Petr Bratřka, prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., prof. MUDr. David Pokorný, CSc.
- [XII] **Užitný vzor CZ 36218**, PUV 2022-39839, **Mikrofluidní čip**; vlastníci Grade Medical s.r.o., Technická univerzita v Liberci; původci Ing. Petr Bratřka, prof. Ing. Václav Kopecký, CSc., Ing. Michal Kotek, Ph.D., Ing. Darina Jašíková, Ph.D.
- [XIII] **Užitný vzor CZ 36094**, PUV 2022-39840, **Emulzifikační zařízení**; vlastníci Grade Medical s.r.o., Technická univerzita v Liberci; původci Ing. Petr Bratřka, prof. MUDr. Tomáš Trč, CSc., MBA, prof. Ing. Václav Kopecký, CSc., Ing. Michal Kotek, Ph.D., Ing. Darina Jašíková, Ph.D.
- [XIV] **Užitný vzor CZ 36840**, PUV 2022-40636, **Krycí prostředek**; vlastníci ING MEDICAL s.r.o., EcoFuel Laboratories s.r.o., Fakultní Nemocnice Královské Vinohrady; původci Ing. Petr Bratřka, prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc., MBA, doc. Ing. Petr Kaštánek, Ph.D.

Bez ohlasů a recenzí.

SUMMARY

The dissertation deals with the research and development related with device to produce personalized wound dressings with an ancillary action, which is provided by the prolonged release of active substances. The work validates the design of the device using pre-clinical testing of the safety and performance of the device-prepared wound dressing. The tested version of the dressing consisted of a nanofibrous mat made of polycaprolactone with a deposited drug delivery system consisting of gentamicin and α -tocopherol immobilized in solid lipid particles made of myristyl alcohol. The work demonstrates the sequence of the individual steps of preparation, implementation and evaluation of testing, up to the pre-clinical *in vivo* experiment on a mouse model, focusing on the synthesis of essential technical and regulatory requirements. The motivation of the dissertation is, in the given context, to contribute to the demonstration of the feasibility and promotion of the concept of clinical application of personalized wound dressings with an ancillary action, prepared by the functionalization device that uses the given technical concept and is based on the basic principles of contemporary biomedical engineering and its interconnectedness with the current needs of clinical practice.

RESUMÉ

Disertační práce řeší výzkum a vývoj zařízení pro přípravu personalizovaných krytů ran s doplňkovým účinkem, který je zajištěn prodlouženým uvolňováním účinných látek. Práce provádí ověření návrhu zařízení s využitím předklinického testování bezpečnosti a účinnosti zařízením připraveného krytu rány. Testovaná varianta krytu byla tvořena nanovlákněným substrátem z polykaprolaktonu s deponovaným drug delivery systémem, tvořeným gentamycinem a α -tokoferolem imobilizovanými v pevných lipidických částicích z myristilalkoholu. Práce demonstruje posloupnost jednotlivých kroků přípravy, realizace a vyhodnocení testování, až po předklinický *in vivo* experiment na myším modelu, a to se zaměřením na syntézu zásadních technických a regulačních požadavků. Motivací disertační práce je v uvedeném kontextu přispět k prokázání proveditelnosti a prosazení konceptu klinické aplikace personalizovaných krytů ran s doplňkovým účinkem, připravených s využitím funkcionalizačního zařízení, které využívá daných technických východisek a vychází ze základních principů současného biomedicínského inženýrství a jeho provázaností s aktuálními potřebami klinické praxe.