

**ČESKÉ VYSOKÉ  
UČENÍ TECHNICKÉ  
V PRAZE**

**FAKULTA  
BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ**



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**2024**

**PETR  
BRAŤKA**



České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta biomedicínského inženýrství

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**ZAŘÍZENÍ PRO PŘÍPRAVU  
PERSONALIZOVANÝCH KRYTŮ RAN  
A OVĚŘENÍ BEZPEČNOSTI A ÚČINNOSTI**

**Disertační práce**

**Ing. Petr Brat'ka**

Kladno, březen, 2024

Doktorský studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínská a klinická technika

Školitel: prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA



## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval prof. MUDr. Jozefu Rosinovi, Ph.D., MBA, za pomoc, odborné vedení a čas, které mi při zpracování této práce věnoval. Dále bych rád poděkoval managementu společností ING MEDICAL s.r.o. a Grade Medical s.r.o., že mi umožnily realizovat výzkum a vývoj, jehož výstupy tvoří podstatu této práce.



**Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem práci „Zařízení pro přípravu personalizovaných krytů ran a ověření bezpečnosti a účinnosti“ vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18.3.2024 .....





## **Anotace**

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  $\alpha$ -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.

**Klíčová slova:** kryty ran, doplňkový účinek, drug delivery, personalizovaná medicína, návrh a vývoj, zdravotnické prostředky, bezpečnost a účinnost, předklinické hodnocení, biologické hodnocení, biokompatibilita, ověření návrhu, validace procesu, kvalifikace zařízení, biomedicínské inženýrství



## **Annotation**

The dissertation deals with research and development related with the 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  $\alpha$ -tocopherol immobilized in solid lipid particles made of myristyl alcohol. The work demonstrates the sequence of steps to prepare, implement and evaluate 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 principles of contemporary biomedical engineering and its interconnectedness with the current needs of clinical practice.

**Keywords:** wound dressings, ancillary action, drug delivery, personalized medicine, design and development, medical devices, safety and performance, preclinical evaluation, biological evaluation, biocompatibility, design verification, process validation, device qualification, biomedical engineering



## OBSAH

1.	Úvod.....	11
2.	Cíle a metodika práce.....	13
	2.1 Cíl práce .....	14
	2.2 Hypotéza .....	15
	2.3 Postup zpracování .....	15
3.	Východiska pro plánování experimentu .....	17
	3.1 Popis technického řešení funkcionalizačního zařízení.....	17
	3.2 Varianta krytu rány pro testování.....	24
	3.3 Postupy pro realizaci předklinického testování bezpečnosti a účinnosti .....	28
	3.4 Požadavky.....	46
4.	Design experimentu .....	49
	4.1 Výběr relevantních regulatorních požadavků a postupů pro posouzení .....	49
	4.2 Hodnocení publikované literatury dle MDR v předklinické oblasti .....	50
	4.3 Plán a provedení experimentu.....	58
5.	Výsledky .....	71
	5.1 Charakterizace nosiče .....	71
	5.2 Charakterizace lipidických částic.....	72
	5.3 Experimenty <i>in vitro</i> .....	73
	5.4 Experiment <i>in vivo</i> .....	77
	5.5 Plnění požadavků .....	78
	5.6 Dopad výsledků experimentu na návrh zařízení .....	80
6	Diskuse.....	83
7.	Závěr .....	91

8.	Rejstříky a seznamy .....	93
8.1	Seznam zkratek .....	93
8.2	Seznam obrázků .....	95
8.3	Seznam tabulek .....	96
8.4	Seznam použité literatury .....	96
8.5	Seznam použité legislativy, technických norem a dalších dokumentů .....	111
8.6	Seznam prací disertanta vztahujících se k disertaci .....	113
8.7	Seznam příloh .....	115
	Upozornění .....	116

## 1. ÚVOD

**Obtížně se hojící, zejména infikované anebo chronické rány, představují významný socioekonomický problém** a podpora, či urychlení jejich hojení je zcela zásadním přínosem ve více ohledech. Význam tématu léčby obtížně se hojících, resp. chronických ran při stárnutí populace a zvyšujícím se podílu pacientů s predispozicí pro jejich vznik (např. *diabetes*) přitom dlouhodobě roste. V rámci zkvalitňování péče se i proto dlouhodobě zvyšuje zájem o moderní a inovativní postupy.

Jedním ze souvisejících trendů je **rostoucí poptávka na straně pacientů i lékařů a dalšího ošetrujícího personálu po personalizaci péče**, která nabízí prokazatelný potenciál přispět ke zlepšení a urychlení léčby a tím i k její efektivitě z pohledu poskytovatele. Těmto moderním přístupům k terapii ran nahraňuje také aktuální komplikovaná situace výrobců sériově vyráběných zdravotnických prostředků, kteří se v řadě případů obtížně vypořádávají s požadavky aktuální legislativy – Medical Device Regulation (MDR). **S reflexí všech výše uvedených aspektů se disertační práce zaměřila na jedno z možných řešení s využitím nové přístrojové techniky, která je primárním zájmem vývoje v biomedicínském inženýrství.** Práce realizuje jeden ze zásadních kroků v rámci souvisejícího výzkumu a vývoje, kterým je iterace předklinického ověření návrhu ve zvoleném rozsahu.





## 2. CÍLE A METODIKA PRÁCE

**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 komplikováno 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 (mj. komorbidit). 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** (Braška, 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, a to ING MEDICAL s.r.o. a Grade Medical s.r.o. Tyto společnosti vyvinuly za zásadní účasti autora disertační práce řadu vhodných dílčích technických řešení, která tvoří technická východiska této práce (viz též kap. 8.5). 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.

## 2.1 Cíl 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 dále 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.

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 regulatorním procesu posouzení shody.

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, jeho provedení a vyhodnocení v procesu návrhu a vývoje.

## 2.2 Hypotéza

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.“**

Východiska vyslovené hypotézy a její logické návaznosti byly upřesňovány dále v této disertační práci.

## 2.3 Postup zpracování

Stanoveným cílům a zvolené metodě odpovídal postup zpracování v teoretické i praktické části práce. Primární byl vědecký přístup dle aktuálního vývoje v biomedicíně inženýrství navázaný na potřeby klinické praxe, současně byly ovšem zohledňovány též aspekty regulatorní. Regulatorní požadavky zahrnují veškeré závazné požadavky na výrobek, nebo výrobní postupy výrobce. Pro zdravotnické prostředky je základním regulativem přímo aplikovatelné Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/745, tzv. MDR. Na základě provedené kvalifikace výrobku (viz kap. 3.3) **jsou v disertační práci zohledňovány požadavky na zdravotnické prostředky a aplikovány postupy pro předklinické hodnocení ve smyslu této platné regulatorní úpravy (MDR).**

V tomto kontextu je však třeba reflektovat, že předmět řešení, tedy otázka předklinického hodnocení jako celku, je značně multidisciplinární, neboť je předmětem řešení různých vědních oborů a technických přístupů, které je třeba v rámci jednotlivých aspektů předklinického hodnocení zdravotnických prostředků zohlednit. Bylo tedy nutné provést **výběr z relevantních požadavků** a tomu přizpůsobit zaměření a úroveň detailu. Vzhledem k charakteru výstupů připravovaných zařízení, který je podrobně popsán dále (neaktivní zdravotnické prostředky ve styku s poraněnou kůží, resp. semikritické prostředky), byla práce zacílena primárně na **oblast biologického hodnocení** a návrh vhodně zvoleného experimentu pro ověření potenciálu plnit vybrané požadavky z této oblasti. Výběr byl orientován na potřeby a také možnosti výrobce, vyplývající z dané fáze výzkumu, resp. 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 a jeho výstupů, tedy personalizovaných krytů ran s doplňkovým účinkem, včetně zejména použitých materiálů. Jsou také shrnuty přístupy a metody relevantní pro testování v rámci biologického hodnocení.

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. Zohledněna, po výchozím ověření, jsou také existující, nepublikovaná experimentální předklinická data, kterými výrobci disponují.

**Výsledky** jednotlivých provedených testů jsou podrobně shrnuty. Ve vztahu k řešeným požadavkům je také vyhodnoceno, nakolik experimentální výsledky svědčí pro potenciál předklinické bezpečnosti a účinnosti testovaného zdravotnického prostředku, stejně jako jejich dopad na návrh funkcionalizačního zařízení. Na shrnutí vytvořených poznatků navazuje jejich **diskuse**, tedy kritické srovnání s relevantními výsledky popsány v literatuře.

Práci uzavírá kapitola s formulací celkových **závěrů**, zejména ve vztahu k vyslovené hypotéze a shrnutím dopadů vytvořených poznatků pro obor biomedicínského inženýrství.

### 3. VÝCHODISKA PRO PLÁNOVÁNÍ EXPERIMENTU

#### 3.1 Popis technického řešení funkcionalizačního zařízení

Z pohledu disertační práce tvořilo konstrukční řešení funkcionalizačního zařízení jedno ze zásadních východisek, které bylo třeba popsat, jelikož se nejednalo o řešení obecně známá. V případě zdravotnického prostředku je jeho popis jedním z požadavků v rámci tvorby technické dokumentace, jejíž je předklinická dokumentace, zaznamenávající výběr, provedení a výstupy testování, součástí (srov. např. odrážka a) a d), odst. 1.1, přílohy II, MDR).



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

#### **Celková koncepce**

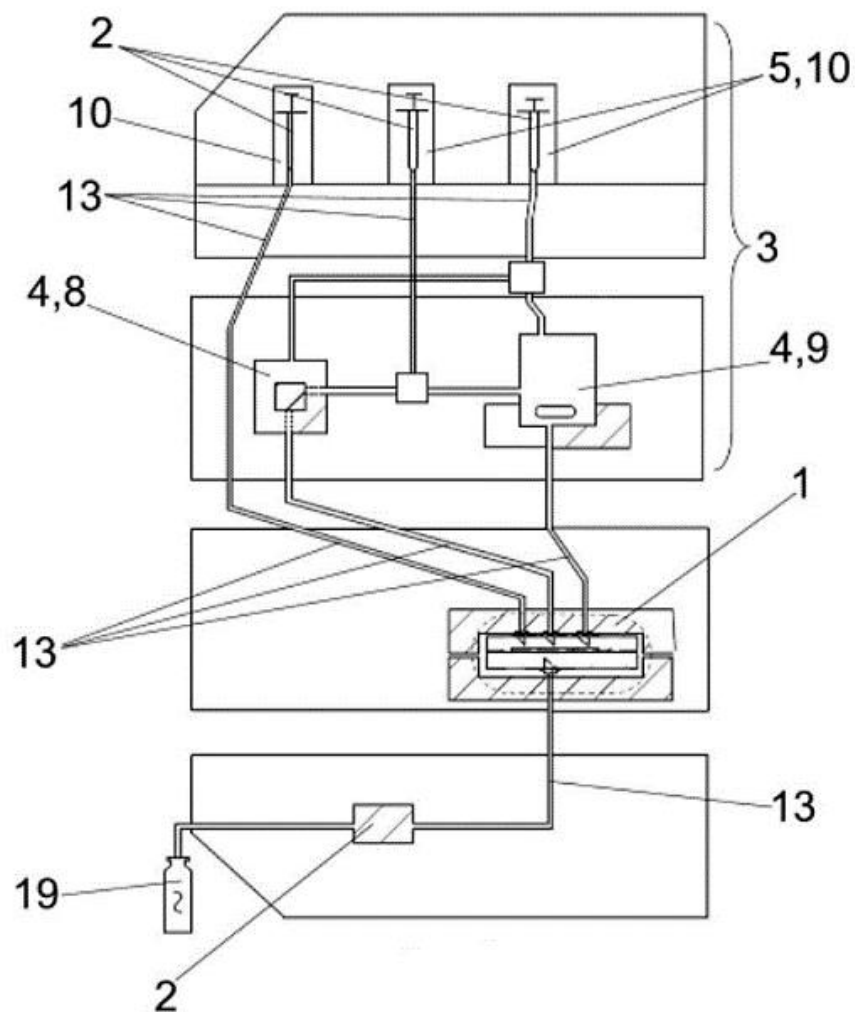
Z věcného i regulatorního pohledu je pro definování zdravotnického prostředku podstatný jeho technický popis, pro regulatorní kvalifikaci ovšem zejména určený účel použití (srov. odst. 12, článek 2, MDR). Pro účely práce byl určený účel použití řešeného funkcionalizačního zařízení vyjádřen jako „příprava krytů ran s doplňkovým účinkem, variabilního provedení pomocí validované metodiky řízené depozice účinné látky na vhodný medicínální nosič pomocí funkcionalizačního roztoku za různých procesních parametrů“.

Jako **charakteristické prvky** konceptu byly z hlediska jeho technického popisu identifikovány zejména:

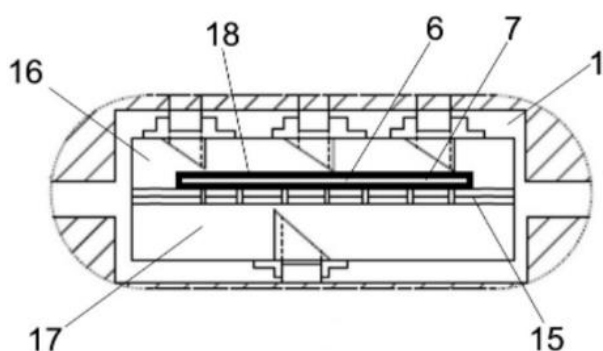
- využití funkcionalizačního zařízení k modifikaci vhodného nosiče účinnou látkou pro dosažení jeho doplňkového účinku ke krytí rány, především v humánní klinické praxi,
- funkcionalizační zařízení integruje potřebné funkcionality, kterými jsou zejména příprava funkcionalizačního roztoku, jeho přesné dávkování, řízená depozice na nosič a vhodná následná manipulace s funkcionalizovaným krytem rány před aplikací,
- doplňkový účinek krytu rány je zajištěn řízeným uvolňováním účinné látky, zejména léčiva, tedy syntézou a depozicí drug delivery systému vhodných parametrů,
- pro tvorbu drug delivery systému zařízení disponuje magnetickým míchadlem a mikrofluidními čipy (MF čipy), což jsou zařízení vhodná mj. pro emulzifikaci (nanoemulzifikaci) systémů na lipidické bázi,
- pro depozici funkcionalizačního roztoku na nosič je možno využít postupy pasivní, tj. např. zaplavení povrchu či kapání, nebo aktivní, tj. zejména využívající tlakového spádu (vytvoření tlaku nebo podtlaku),
- za účelem realizace efektivní personalizace péče o ránu v klinické praxi zařízení umožňuje
  - použít co nejširší spektrum účinných látek, tedy zejména léčiv a látek pomocných, v kombinaci s různými vhodnými drug delivery systémy,
  - nastavit (ovlivnit) parametry drug delivery systému, resp. drug delivery systémů, a to procesem přípravy, resp. nastavením provozních parametrů v rozsahu, který vede k účelné variabilitě parametrů výstupů (variabilní vlastnosti krytu),
  - použít co nejširší spektrum nosičů, tvořených rozdílnými, ovšem vždy biokompatibilními, materiály, včetně zejména materiálů nanovláknových.

Naplnění požadavku na personalizaci péče je tedy materializováno variabilním provedením krytu rány, konkrétně možností použití různých kombinací nosiče a doplňkového účinku. 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).

Celková koncepce funkcionalizačního zařízení je vyjádřena řadou chráněných technických řešení, jejichž je autor práce spoluautorem (viz kap. 8.5). Přehledným vyjádřením řešení je výkres obsažený v patentu ad [IV] (viz obr. 2 a 3).



Obrázek 2: Příklad technického řešení funkcionalizačního zařízení dle [IV]<sup>1</sup>



Obrázek 3: Příklad technického řešení funkcionalizačního zařízení (detail komory) dle [IV]<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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)

## Komponenty funkcionalizačního zařízení

Vedle zařízení jako celku je třeba v přiměřeném rozsahu popsat účel jeho zásadních součástí (srov. odst. 2, čl. 1 a čl. 23 MDR), ve smyslu komponent případně modulů, nebo příslušenství (srov. odst. 2, čl. 2 MDR). Jako zásadní komponenty funkcionalizačního zařízení byly identifikovány jednotlivé funkční subsystémy, kterými byly (viz též obr. 2 a 3):

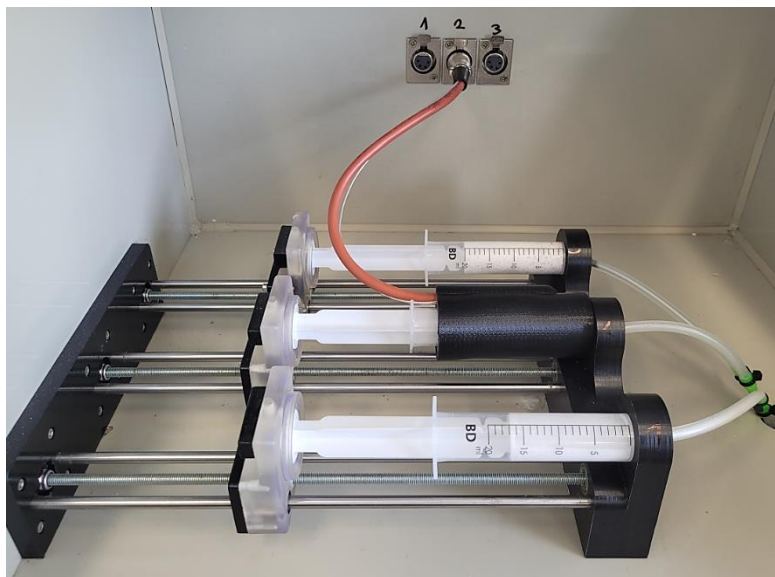
- soustava pro dávkování kapalin – zejména lineární dávkovače,
- soustava s magnetickým míchadlem – subsystém pro přípravu funkcionalizačního roztoku,
- soustava s mikrofluidními čipy (MF čipy) – subsystém pro přípravu funkcionalizačního roztoku,
- soustava pro depozici – zejména komora, umožňující aktivní anebo pasivní depozici, případně modifikovaná pro použití cartridge (příslušenství),
- komponenta nebo soustava pro manipulaci substrátu – zejména podpora pro umístění substrátu při depozici a případně cartridge,
- soustava pro vedení kapalin – soubor hadiček a ventilů, propojujících ostatní soustavy, alternativně doplněný o buffer nádoby,
- řídicí a monitorovací systém – řídicí jednotka včetně software, dále zejména čidla teploty,
- další pomocné součásti (napájení, ohřevy, zdroj podtlaku, chlazení).

### Lineární dávkovače

Z hlediska přípravy funkcionalizačního roztoku, která je dle popsané celkové koncepce funkcionalizačního zařízení uvažována s využitím různých metod řízeného mísení kapalných fází (např. v případě lipidických systémů postupy voda do oleje, v literatuře často značeno dle anglických výrazů water/oil – w/o, nebo olej do vody, angl. oil/water – o/w), tedy i z hlediska předklinického hodnocení produkovaného výstupu, je zcela zásadní přesné dávkování použitých roztoků.

V řešené verzi zařízení byly pro ten účel použity tři **lineární dávkovače vlastní konstrukce** (viz obr. 4), odpovídající běžné koncepci, tj. sestávající z krokových motorů a šroubovicové transmise, umožňující umístění injekční stříkačky standardu Luer / Luer Lock do 100 ml. Přesnost, kalibrační postupy a další funkční charakteristiky byly výrobcem již dříve testovány v rozsahu odpovídajícím regulatorním (zejména metrologickým) požadavkům.





*Obrázek 4: Lineární dávkovače během testování komponenty za účelem kvalifikace. Lineární dávkovač č. 2 (uprostřed) se zapojeným ohřevem pro manipulaci lipidické fáze. (verze Grade Medical)  
Zdroj: Autor*

#### Subsystém pro přípravu funkcionalizačního roztoku

Jak již bylo vysvětleno, pro přípravu funkcionalizačního roztoku, resp. syntézu konkrétní funkcionalizační formulace<sup>2</sup>, je v řešeném zařízení využíváno řízeného mísení kapalných fází (v případě lipidických drug delivery systémů s cílem vytvoření emulze, zpravidla nanoemulze – podrobněji viz následující kapitola). Toho je dosahováno pomocí dvou rozdílných soustav, které využívají odlišných fyzikálních principů, resp. technických řešení.

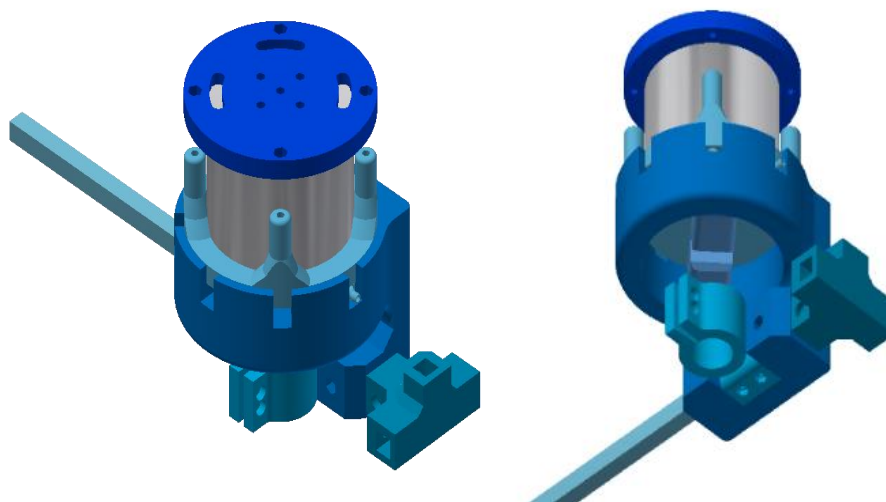
První z nich je **magnetické míchadlo**, v laboratorní praxi rozšířené zařízení, využívající rotující magnetické pole k pohonu míchadla tvořeného trvalým magnetem, s vhodným, chemicky odolným potahem, umístěného uvnitř nádoby se zpracovávanou kapalinou. Zařízení tohoto typu se pro přípravu emulzí metodami w/o i o/w za přítomnosti surfaktantu<sup>3</sup> v praxi užívá běžně. (Akram, 2021) Takto produkované nanoemulze se ovšem vyznačují polydisperzitou. (Bhattacharyya, a další, 2019)

V řešené verzi zařízení bylo použito magnetické míchadlo vlastní konstrukce (viz obr. 5 a 6), tvořené zejména hliníkovou vnější nádobou s integrovaným ohřevem a teplotním čidlem, pod níž je umístěn pohon s rotujícími permanentními magnety. Vnější nádoba umožňovala umístění skleněné kádinky vhodného tvaru do objemu 100 ml. Dávkování složek a odvod produktu (funkcionalizačního roztoku) byly zajištěny přes víčko pomocí hadiček. Na přívodu byla možnost alternativního osazení

<sup>2</sup> funkcionalizační formulací se pro účely této práce rozumí konkrétní kombinace účinné látky (zpravidla léčiva), resp. účinných látek, a látek pomocných, tedy kompatibilního drug delivery systému; podrobně viz kap. 3.2

<sup>3</sup> surfaktant (též tenzid, saponát) je povrchově aktivní látka, která snižuje povrchovou či mezifázovou energii, a proto se samovolně koncentruje ve fázovém rozhraní; toho lze využít mj. při stabilizaci emulzí

jehly standardu Luer / Luer Lock (pro případ potřeby přesného kapání). Odvodní hadička ústila ke dnu nádoby pro minimalizaci tzv. mrtvého objemu. Zařízení umožňovalo použití široké škály magnetických míchadélek (míchacích tyček) běžně dostupných na trhu.



*Obrázek 5: 3D model magnetického míchadla vlastní konstrukce  
v provedení s permanentními magnety*

*Zdroj: Autor (ve spolupráci) v rámci řešení FV40188*



*Obrázek 6: Magnetické míchadlo vlastní konstrukce  
v provedení s permanentními magnety  
(verze Grade Medical)*

*Zdroj: Autor (ve spolupráci) v rámci řešení FV40188*

Pro řešený účel byla zásadní vhodná volba materiálů, jež přichází do styku s funkcionalizačním roztokem a jeho složkami. Proto byly kádinky, hadičky a míchací tyčky používány v provedení z odpovídajících, zejména chemicky stabilních materiálů (lab. sklo, PTFE) a vždy jednorázově.

Dále je funkcionalizační zařízení vybaveno soustavou s **mikrofluidními čipy** (MF čipy, MF soustava). Mikrofluidní čip je obecně miniaturní zařízení, které integruje mikroskopické kanálky, nádrže, ventily a případně senzory pro manipulaci s velmi malými objemy kapalin (řádově mikro- až nanolitry), které je využíváno zejména v analytice, nicméně je také vhodné pro přípravu nanoemulzí. (Schmidt, a další, 2023) Emulze produkované tímto způsobem vykazují minimální polydisperzitu (Aghaei, a další, 2019), nicméně vzhledem ke zpracovávaným objemům se jedná, v porovnání s emulzifikací mícháním, o řádově méně produktivní metodu. To je důvodem, proč jsou do funkcionalizačního zařízení integrovány obě metody. Polydisperze produkované na míchadle tak mohou být dopovány výstupem z MF čipů pro posílení zastoupení určité velikosti kapek (čímž lze specificky ovlivnit výsledný uvolňovací profil vytvořeného krytu rány).

MF soustava v řešené verzi zařízení byla tvořena proměnlivým počtem MF čipů pro možnost škálování výkonu. Použité produkční MF čipy, tedy určené pro syntézu nikoliv analýzu, byly jednodušší a jejich základní charakteristikou byla specifická geometrie kanálků. Pro přípravu formulace v rámci této práce však nebyl MF čip využit, proto není dále popisován.

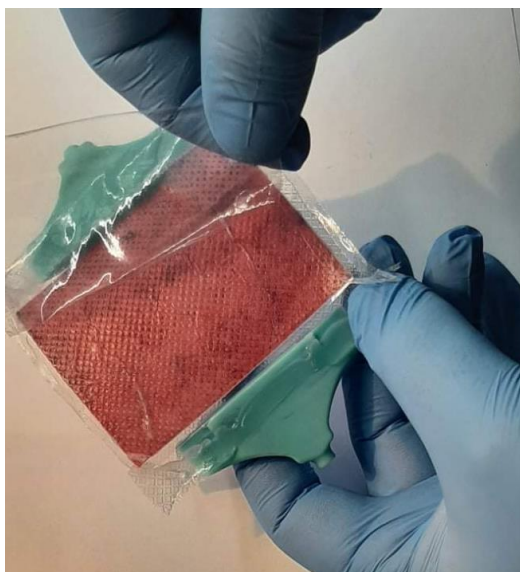
#### Soustava pro depozici a soustava pro manipulaci substrátu

Účelem soustavy pro depozici ve funkcionalizačním zařízení je vytvořit vhodné fyzikální podmínky pro pasivní (zejména napuštění, kapání) nebo aktivní (zejména podtlak) depozici funkcionalizační formulace nesené funkcionalizačním roztokem na zvolený nosič. Pro vzorky použité k testování řešené v rámci disertační práce nebyla aktivní depozice využita, zejména proto, že se jednalo o prvotní zkoušení daného provedení funkcionalizovaného krytu rány (aktivní postupy jsou využívány zejména pro zvýšení efektivity depozice) a vzorky byly celkově malých rozměrů (u vzorků o ploše nepřesahující 9 cm<sup>2</sup> byla kapáním opakovaně dosažena uspokojivá homogenita depozice, optimalizace času pro přípravu vzorků nebyla součástí požadavků v dané fázi návrhu). Systém pro aktivní, resp. podtlakovou depozici, tedy není v rámci práce dále popisován.

Ze soustavy pro manipulaci substrátu byla využita pouze podpora pro umístění nosiče během modifikace a jeho následné vynětí. Jelikož podpora přichází do přímého styku s nosičem, resp. funkcionalizovaným krytem rány, byla opět podstatná volba použitého materiálu. Podpora byla tvořena komerčně dostupnou sítkou z polyetylenu s velikostí jednotlivých ok 1 x 1 mm a vždy použita jednorázově.

### 3.2 Varianta krytu rány pro testování

Řešené funkcionalizační zařízení je koncipováno pro výrobu široké škály krytů ran s doplňkovým účinkem a jejich různých konkrétních provedení podle potřeb personalizované péče. Pro účely testování bylo ovšem třeba zvolit konkrétní variantu, tedy kombinaci nosiče a funkcionalizační formulace (účinné látky, resp. účinných látek, a drug delivery systému), a to v souladu s preferencí budoucího výrobce zařízení a uvažovaných klinických potřeb.



*Obrázek 7: Kryt rány po funkcionalizaci s využitím laboratorní verze funkcionalizační cartridge s integrovanou podporou*  
Zdroj: Autor v rámci řešení FV40189

#### **Kryt rány s doplňkovým účinkem**

Výzkum a vývoj, jež byl předmětem této práce, byl zaměřen primárně na obtížně se hojící, zejména infikované anebo chronické, rány. Hojení tohoto typu ran je často ovlivněno dalšími nemocemi pacienta. (Serra, a další, 2015) Zejména komorbidní pacienti mají vysokou pravděpodobnost výskytu bakteriálně infikovaných, nehojících se ran. Proto byl jako doplňkový účinek krytu rány preferován primárně **účinek antibakteriální**.

Biofilm je v literatuře vnímán jako významná překážka při hojení infikovaných ran a zdá se, že zejména chronické rány jsou k jeho tvorbě náchylnější. Publikovaná studie ukázala, že v 60 % chronických ran se biofilm vyskytuje ve srovnání s 6 % u ran akutních. (James, a další, 2008) Specifickým sledovaným účinkem byla tedy **inhibice, resp. eradikace bakteriálního biofilmu**.

Dle dostupných údajů je léčba bakteriální infekce, včetně buněčné proliferace a fyziologických a strukturálních změn v ráně, významně ovlivňována chemickým složením prostředí rány, zejména u ran spojených s diabetem (Ambekar, a další, 2019). Mnohé výzkumné publikace ukazují, že například nízká hladina reaktivních forem kyslíku (ROS) napomáhá k normálnímu hojení rány, normální migraci buněk

a angiogenezi, naopak vysoká koncentrace vede k oxidativnímu stresu a může významně zhoršit hojení rány, zejména chronické. Dlouhotrvající zánětlivá reakce u chronických ran vede k velké akumulaci ROS, která překračuje antioxidační kapacitu buněk a dochází k poškození zdravých buněk regenerujících ránu. (Foshi, a další, 1988) Rány nemohou přecházet ze zánětlivé fáze do fáze proliferativní. K vyřešení tohoto stavu rány je studováno mnoho látek, které mají za cíl redukovat ROS v ráně. Látkami, které mohou snížit koncentraci volných radikálů v ranách, jsou zejména antioxidanty. (Xu, a další, 2020)

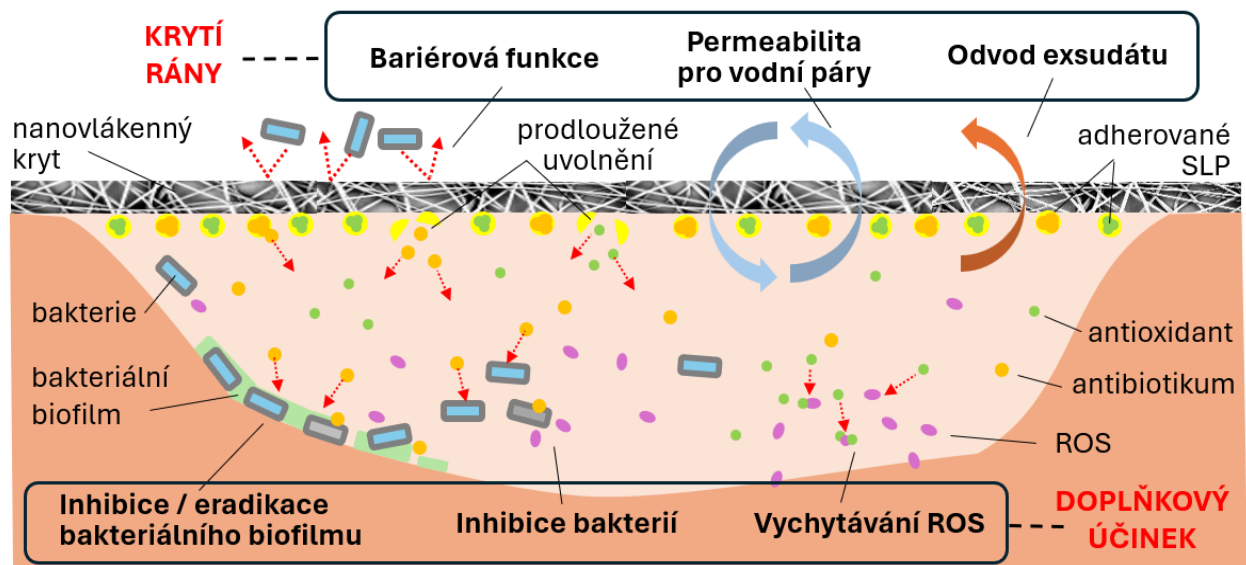
Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou v podstatě volné radikály, reaktivní chemické látky s nepárovým elektronem na vnější elektronové dráze. Jsou buňkami produkovány nepřetržitě, a to při tvorbě energie z metabolických reakcí a kyslíku, a ve zvýšené míře, když jsou vystaveny mikrobiálním infekcím, velkému zatížení, znečišťujícím látkám, resp. toxinům jako je cigaretový kouř, alkohol, pesticidy a další, nebo ionizujícímu anebo UV záření. Antioxidanty lze tedy v řešeném kontextu definovat jako látky, které snižují hladinu volných radikálů včetně ROS, nebo zabraňují jejich tvorbě. Pro dobrou proliferaci buněk je nutné docílit správnou rovnováhu mezi oxidačními a antioxidačními procesy. Je tedy mj. nutné najít rovnováhu mezi koncentrací ROS a antioxidantů, získat co nejlepší prostředí pro buněčnou proliferaci a pro s tím související hojení rány (Poljsak, a další, 2013). Proto byl jako důležitý v rámci doplňkového účinku krytu rány stanoven **účinek antioxidační**.

**Kombinací** antimikrobiálních látek eliminujících škodlivé mikroorganismy v ráně s látkami eliminujícími volné radikály, by mělo dojít k šetrnějšímu a rychlejšímu hojení ran. Popsaný přístup k hojení je plně v souladu se světovými trendy jak v medicíně běžné, tak i v medicíně válečné. (Liu, et al., 2018) (Wee, et al., 2018) (Dowd, 2011)

Oba doplňkové účinky přitom mají být zajištěny **řízeným uvolněním účinné látky**, resp. docílením jejího prodlouženého uvolnění podle zamýšleného uvolňovacího profilu (kinetika uvolnění). Toho lze dosáhnout použitím drug delivery systému, kompatibilního s konkrétními zvolenými účinnými látkami, tedy vhodné funkcionalizační formulace (viz dále).

Z hlediska použitého nosiče je zásadní **účinné krytí rány**, které je v ideálním případě doplněno o tzv. bariérovou funkci. Bariérovou funkcí se rozumí neprostupnost krytu rány, resp. alespoň jedné z jeho vrstev pro bakterie, čehož je docíleno specifickou morfologií, zejména optimální kombinací velikosti vláken a mezivláknenných prostorů. Použité nosiče přitom musí splnit řadu dalších dílčích požadavků (viz dále), zejména v oblasti biokompatibility a potenciálu pro efektivitu imobilizace drug delivery systému.

Funkce krytu rány s bariérovou funkcí a doplňkovým antimikrobiálním a antioxidačním účinkem je schematicky vyjádřena na obrázku 8.



Obrázek 8: Schematické vyjádření funkce řešeného krytu rány s bariérovou funkcí a doplňkovým antimikrobiálním a antioxidantním účinkem  
Zdroj: Autor

Lze tedy formálně shrnout také **určený účel** použití funkcionalizačním zařízením připravovaného krytu rány, kterým je „krytí rány, zejména chronické nebo obtížně se hojící, s bariérovou funkcí a doplňkovým antimikrobiálním a antioxidantním účinkem“.

### Funkcionalizační formulace

Funkcionalizační formulací se pro účely disertační práce rozumí konkrétní kombinace účinné látky, resp. účinných látek, a kompatibilního drug delivery systému.

**Gentamycin** (GEN) je léčivo používané mj. jako antibiotikum v topických aplikacích<sup>4</sup> a zdál se být vhodný pro použití jako antimikrobiální *agens* účinné proti bakteriím, které jsou běžné u chronických bakteriálních infekcí ran. Gentamycin sulfát je aminoglykosidová molekula, která vykazuje baktericidní aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů, jako *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. Coli*) a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a mnoho dalších gram pozitivních a gram negativních kmenů bakterií (Guaccio, a další, 2011) (Duan, a další, 2009).

**Vitamin E** (VitE) je jako antioxidant široce používán v kosmetickém průmyslu a průmyslu potravinových doplňků. Účinnost jeho jednotlivých forem bývá diskutována. Existují dvě podskupiny látek, označované jako vitamin E, a to tokoferoly a tokotrienoly, deriváty tokolu nebo 6-hydroxychromanu. Z nich byl zvolen  $\alpha$ -tokoferol, který patří do skupiny přirozeně se vyskytujících

<sup>4</sup> podání na určitém místě v organismu, tedy nikoli systémově

antioxidantů a jehož antioxidační účinek byl indikován při topické aplikaci (Gonzalez Flecha, a další, 1991). Protože se  $\alpha$ -tokoferol jevil na základě svých známých chemických vlastností kompatibilní s gentamycinem, byl vybrán jako vhodné antioxidační činidlo.

Konstrukce zařízení preferuje využívání drug delivery systémů na bázi **emulzifikace lipidů**, a to zejména imobilizaci účinné látky do **Solid Lipid Particles** (SLP), které z jednotlivých kapek surfaktantem stabilizované emulze vznikají po jejím zchlazení. Preferovaný lipid – **myristylalkohol** (MA), jinak označovaný jako 1-tetradekanol, je mastný alkohol široce používaný zejména v kosmetice.

SLP pro enkapsulaci účinných látek lze připravit různými metodami. Výrobce funkcionalizačního zařízení využívá (a do určité míry validoval) **metodu emulgace** o/w za přítomnosti surfaktantu. Tato metoda využívá míchání dvou nemísitelných kapalných fází, vody a oleje k přípravě emulze. Vysoká afinita účinné látky k lipidové fázi způsobuje její enkapsulaci. Surfaktant zajistí stabilitu emulze.

Účinná látka, případně směs účinných látek, je tedy zapouzdřena v pevné části lipidových částic, anebo je případně za určitých okolností navázána na jejich povrch (Ganesan, a další, 2018), což však nebylo u zvolené funkcionalizační formulace cíleně využito. Principem řízeného, resp. prodlouženého uvolnění je postupná degradace SLP vlivem okolního vodného prostředí a zejména jeho teploty. Teplota tání SLP syntetizovaných na bázi myristilalkoholu řešeným postupem byla výrobcem při předchozích testech opakovaně naměřena na hodnotách blízkých 36 °C, což je hodnota výhodná z hlediska uvažované aplikace.

Obě zvolené účinné látky se přitom jevily jako chemicky kompatibilní.

## Nosič

**Nanovláknenný substrát**, resp. nanomateriál<sup>5</sup> připravený z **polykaprolaktonu** (PCL) metodou elektrostatického zvlákňování 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 (Braňka a další, 2020).

Jedním z široce používaných postupů pro výrobu nanovláken, umožňujícím jejich výrobu v průmyslovém měřítku, je elektrostatické zvlákňování (Zhu, a další, 2017), zejména s využitím stejnosměrného proudu (DC). Princip elektrostatického zvlákňování polymerních roztoků využívá působení generovaného elektrostatického pole na povrch zvlákňovaného roztoku deponovaného na

---

<sup>5</sup> „nanomateriálem“ se dle MDR rozumí přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší výrobek nebo vyrobený materiál obsahující částice v nesloučeném stavu nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikosti 1 nm–100 nm; (srov. odrážka 18, článek 2, MDR); ve vztahu k vláknenným substrátům tedy mohou vznikat i odlišné výklady

povrchu elektrody. Tímto působením dochází v určitých bodech k vydutí roztoku směrem ke kolektoru (opačně nabitě elektrodě) za vzniku kónického útvaru známého jako Taylorův kužel. (Zhang, a další, 2022) Vznik tohoto útvaru je následkem relaxace indukovaného náboje na volném povrchu kapaliny. Tento útvar se působením pole následně v nejužší části postupně napíná, odpařením rozpouštědla dochází k polymerizaci rozpuštěných polymerů a tvorbě ultra jemných nano – či mikrovláken.

Mezi základní parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování patří intenzita indukovaného elektrostatického pole, koncentrace a viskozita zvlákňovacího roztoku, je však celá řada dalších parametrů, které na tento proces mají vliv. (Li, a další, 2013) Dle poznatků autora disertační práce mezi zásadní praktické problémy patří homogenita pole a dosažení opakovatelnosti celého procesu. Vývoj nanovláknenných materiálů probíhá typicky, ovšem velmi zjednodušeně, v mnoha iteracích kroků „volba polymeru – volba rozpouštědla – úprava formulace zvlákňovacího roztoku – úprava parametrů nastavení zvlákňovacího zařízení – charakterizace výstupů“. V rámci charakterizace výstupů je sledována jednak obecná morfologie vytvořeného substrátu (homogenita, podíl velikostních frakcí vláken, velikost pórů), zpravidla s využitím Scanning Electron Microscope (SEM), tj. skenovacího elektronového mikroskopu, ale zejména jsou testovány vlastnosti ve vztahu k zamýšlené aplikaci (specificky bariérová funkce, biokompatibilita).

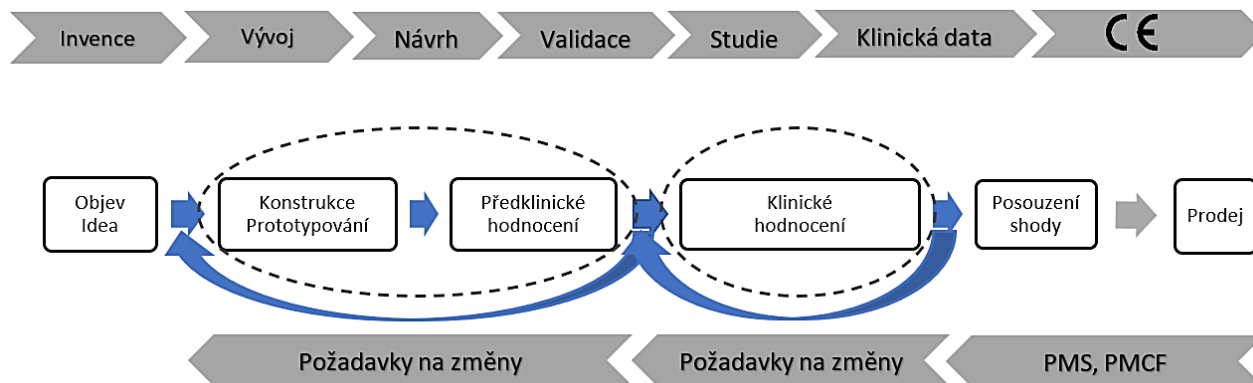
Problematika přípravy nanovláknenného substrátu vhodných parametrů je tedy velmi komplexní, její řešení je časově i finančně velmi náročné. Příprava nanovláknenných nosičů pro účely práce proběhla postupem podle metodik výrobce (Grade Medical) s využitím PCL jako polymeru. Morfologie takto připravených nanovláknenných substrátů byla již dříve testována s pozitivním výsledkem z hlediska vysoké adsorpční kapacity pro lipidové částice i vhodné kombinace vlastností pro hojení chronických ran (odvod exsudátu, propustnost vodní páry, bariérová funkce proti kontaminaci bakteriemi) v závislosti na konkrétním provedení. (Braška, 2020) Komplexní ověřování opakovatelnosti procesu přípravy, resp. jeho validace ovšem přesahovaly možnosti této práce a byly proto řešeny jen v rámci výchozích (kontrolních) charakterizací.

Spolupracující výrobci předpokládali využití, resp. poskytli tři konkrétní postupy (receptury) výroby nanovláknenného substrátu z PCL metodou elektrostatického zvlákňování, lišící se použitím rozpouštědla (aceton, chloroform + etanol, kyselina octová), které byly zařazeny mezi technická východiska.

### **3.3 Postupy pro realizaci předklinického testování bezpečnosti a účinnosti**

Vývoj zdravotnického prostředku je iterativní proces ověřování a zlepšování jeho návrhu (viz obrázek 9). Předklinické testování je nezbytným nástrojem získání dat pro fázi ověřování, která jsou následně využita pro prokázání shody anebo pro zlepšení návrhu.





Obrázek 9: Iterativní povaha návrhu a vývoje zdravotnického prostředku  
Zdroj: Autor s využitím (Chediak, a další, 2021)

Jako cíl řešeného experimentu bylo stanoveno ve zvoleném rozsahu ověřit předklinickou bezpečnost a účinnost testovaného prostředku se zaměřením zejména na **biologické hodnocení**. Cílem dílčích analýz v následujících podkapitolách je tedy zejména přehled relevantních metod testování a rozbor východisek pro výběr konkrétní testovací metody, jejíž výběr, včetně parametrického nastavení, byl následně proveden v praktické části práce. Rozdělení na bezpečnost a účinnost je ovšem v zásadě formální, jelikož oba aspekty jsou provázány a nelze je prakticky hodnotit zcela odděleně.

Z regulatorního pohledu je cílem testování prokázání splnění požadavků, v řešeném případě MDR. K tomu mohou sloužit technické normy. Doporučení pro práci s technickými normami ve vztahu k prokazování plnění požadavků MDR uvádí příslušný doporučující dokument, tzv. guide (srov. MDCG 2021-5), který zmiňuje zásadní princip „state of the art“. Vymezení tohoto pojmu v uvedeném dokumentu lze parafrázovat jako „pro prokázání požadavku vždy použij nejlepší dostupnou metodu“.

### Kvalifikace výrobku ve vztahu k MDR

Koncepce disertační práce si položila za jeden z cílů syntézu vědeckých a regulatorních požadavků na testování v dané fázi výzkumu, resp. návrhu a vývoje. Tato část práce se jeví jako velice důležitá, protože v řadě oblastí řešených biomedicínským inženýrstvím se budeme stále intenzivněji setkávat s potřebou detailních znalostí všech regulatorních požadavků v právním prostoru EU, a to již na počátku návrhu a vývoje zdravotnických prostředků. Předchozí kapitoly této práce již předjímaly coby výchozí regulativ vzhledem k charakteru řešeného výrobku (výrobků) uplatnění MDR, tedy Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/745 ve znění pozdějších předpisů, které se vztahuje

na **zdravotnické prostředky**, resp. prostředky <sup>6</sup>. Stanovení, resp. ověření relevance této legislativy bylo ovšem pro validitu výstupů a dosažení cíle práce zásadní.

Z hlediska MDR je nezbytným výchozím krokem provedení **kvalifikace**, tedy posouzení, zda se na výrobek MDR vztahuje, tedy že se jedná o prostředek ve smyslu tohoto nařízení. Tato otázka není v rozsahu celého předmětu práce z hlediska právního výkladu triviální, jelikož se jedná o hraniční výrobek ve více ohledech a příslušná ustanovení MDR umožňují více výkladů. Byly tedy zevrubně analyzovány všechny pravděpodobné varianty. V konečném důsledku je v případě hraničních výrobků otázka kvalifikace závazně oprávněn zodpovědět příslušný orgán členského státu, kterým v případě je ČR Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) <sup>7</sup>, a to rozhodnutím zejména na základě konečného znění určeného účelu použití.

Pro kvalifikaci výrobku jsou v MDR zásadní ustanovení čl. 2, která uvádí, že zdravotnickým prostředkem se rozumí:

*„nástroj, přístroj, zařízení, software, implantát, činidlo, materiál nebo jiný předmět určené výrobcem k použití, samostatně nebo v kombinaci, u lidí k jednomu nebo několika z těchto konkrétních léčebných účelů:*

- *diagnostika, prevence, monitorování, predikce, prognóza, léčba nebo mírnění nemoci,*
- *diagnostika, monitorování, léčba, mírnění nebo kompenzace poranění nebo zdravotního postižení,*
- *vyšetřování, náhrady nebo úpravy anatomické struktury nebo fyziologického či patologického procesu nebo stavu,*
- *poskytování informací prostřednictvím vyšetření in vitro, pokud jde o vzorky pocházející z lidského těla, včetně darovaných orgánů, krve a tkání,*

*který nedosahuje svého hlavního určeného účinku v lidském těle nebo na jeho povrchu farmakologickými, imunologickými ani metabolickými účinky, jehož funkce však může být takovými účinky podpořena.*

*Za zdravotnické prostředky se považují rovněž tyto výrobky:*

- *prostředky určené ke kontrole nebo podpoře početí;*
- *výrobky speciálně určené k čištění, dezinfekci nebo sterilizaci prostředků uvedených v čl. 1 odst. 4 a prostředků uvedených v prvním pododstavci tohoto bodu;*

---

<sup>6</sup> prostředky zahrnují zdravotnické prostředky, jejich příslušenství a vyjmenované výrobky bez určeného léčebného účelu

<sup>7</sup> <https://www.niszp.cz/index.php/cs/registrace-notifikace/hranicni-vyrobky>

Pro posouzení výše uvedeného je tedy zásadní posouzení určeného účelu výrobku, kterým se dle článku 2, odrážky 12) MDR rozumí:

*„použití, pro které je prostředek určen podle údajů uvedených výrobcem na označení, v návodu k použití nebo v propagačních nebo prodejních materiálech či prohlášeních a jak je výrobcem specifikováno v rámci klinického hodnocení;“*

Ve smyslu výše uvedených definic se **funkcionalizační zařízení** jako zdravotnický prostředek nekvalifikuje, jelikož jeho učený účel (viz kap 3.1) je příprava krytu rány, což není jeden ze specificky vyjmenovaných účelů (jakými jsou dezinfekce a sterilizace prostředků). V tomto ohledu je prostor pro výklad spíše minimální.<sup>8</sup> Požadavky MDR tedy nejsou na návrh zařízení přímo aplikovatelné. Jelikož jde ovšem o výrobek, který slouží k přípravě prostředku, je třeba jej pro tento účel kvalifikovat a proces výroby s jeho použitím validovat.<sup>9</sup>

Vytvořený **kryt rány** pak je, na základě předpokládaného určeného účelu užití (viz kap. 3.2), materiálem určeným výrobcem k použití u lidí k alespoň jednomu z vyjmenovaných konkrétních léčebných účelů, a to k léčbě, mírnění nebo kompenzaci poranění, specificky rány, zejména chronické anebo obtížně se hojící. Výrobek tedy může být kvalifikován jako zdravotnický prostředek, pokud další ustanovení MDR neuvádí něco jiného.

V tomto ohledu jde o výrobek hraniční zejména ve smyslu zdravotnických prostředků a léčiv, a to s ohledem na výše uvedenou podmínku *„(...) který nedosahuje svého hlavního určeného účinku v lidském těle nebo na jeho povrchu farmakologickými (...) účinky, jehož funkce však může být takovými účinky podpořena“*.

Další upřesnění, které podporuje uvedený dílčí závěr, uvádí odst. 8, článku 1, MDR:

*„Podle tohoto nařízení se posuzuje a schvaluje každý prostředek, který při uvedení na trh nebo do provozu obsahuje jako nedílnou součást látku, která by při samostatném použití byla považována za léčivý přípravek ve smyslu čl. 1 bodu 2 směrnice 2001/83/ES, včetně léčivého přípravku pocházejícího z lidské krve nebo lidské plazmy ve smyslu čl. 1 bodu 10 uvedené směrnice a která má doplňkový účinek.“*

---

<sup>8</sup> teoreticky není zcela vyloučena zejména argumentace, byť ne zcela konformní, že funkcionalizační zařízení je příslušenstvím krytu rány, tedy prostředkem

<sup>9</sup> Obecně lze říci, že cílem **kvalifikace** je průkaz, že zařízení je správně instalováno, správně pracuje a poskytuje očekávané výstupy. Kvalifikace osvědčuje zkoumáním objektivních důkazů, že zařízení splňuje zamýšlené požadavky použití i předem definovanou specifikaci. Kvalifikace je součástí validace, ale jednotlivé kroky kvalifikace samy o sobě proces validace netvoří. Obdobně **validace** je zdokumentovaný postup, jehož cílem je poskytnout záruku, že konkrétní proces bude kontinuálně poskytovat výstupy splňující předem stanovená kritéria přijatelnosti. Validace tedy osvědčuje zkoumáním objektivních důkazů, že jednotlivé procesy splňují předem stanovená kritéria přijatelnosti. Tyto definice vychází z úpravy ČSN EN ISO 13485 ed. 2, která upravuje systémy řízení kvality výrobce zdravotnických prostředků.

*Pokud ale účinek této látky je hlavním účinkem a není doplňkový k účinku daného prostředku, vztahuje se na nedílný výrobek směrnice 2001/83/ES nebo případně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 726/2004 (1). V takovémto případě se, pokud jde o bezpečnost a účinnost té části, kterou tvoří prostředek, použijí příslušné obecné požadavky na bezpečnost a účinnost stanovené v příloze I tohoto nařízení.“*

Dále je vzhledem k uvažovanému postupu přípravy prostředku na místě upozornit na následující specifické relevantní případy z hlediska kvalifikace, které nesouvisí přímo s vlastním provedením prostředku, ale zejména s postupem jeho uplatnění v klinické praxi, což může být při samotném návrhu a vývoji opomenuto.

MDR definuje specifickou úpravu pro **prostředky na zakázku** (srov. odst. 3, článek 2, MDR), a to zjednodušeně pro prostředky, které jsou vyráběny a vydávány na základě preskripce. Ustanovení je tedy relevantní pouze v případě, že by byl personalizovaný kryt rány vydáván na základě poukazu. Druhý odstavec citovaného ustanovení je ovšem jedním z těch, které umožňují ve vztahu k řešenému výrobku ve smyslu krytu rány, různé výklady.

*„Hromadně vyráběné prostředky, které vyžadují úpravu, aby splnily zvláštní požadavky jakéhokoli profesionálního uživatele, a prostředky, které jsou hromadně vyráběny prostřednictvím průmyslových výrobních postupů v souladu s lékařským předpisem jakékoliv oprávněné osoby, se však za prostředky na zakázku nepovažují;“*

Pokud by nebyla naplněna tato negativní podmínka, byla by regulatorní situace ve smyslu rozsahu požadavků jednodušší (srov. odst. 5, článku 10 Nařízení MDR), nicméně v obou případech se jedná o prostředek v gesci MDR, který tedy musí plnit obecné požadavky na bezpečnost a účinnost (dle přílohy I MDR).

Specifická je situace také v případě **prostředků vyráběných a používaných pouze v rámci zdravotnických zařízení** (srov. odstavce 5, článek 5, kapitola II, MDR), tzv. in-house prostředků. Podle tohoto ustanovení, pokud je prostředek vyroben přímo zdravotnickým zařízením a zároveň jím použit (aniž by byl převeden na jiný právní subjekt), nevztahují se na něj požadavky MDR s výjimkou příslušných obecných požadavků na bezpečnost a účinnost uvedených v příloze I a požadavků tohoto ustanovení. I v tomto případě však MDR uvádí vylučovací podmínku, k jejímuž výkladu zatím nejsou k dispozici odpovídající upřesnění (srov. MDCG 2023-1):

*„Tento odstavec se nevztahuje na prostředky vyráběné v průmyslovém měřítku.“*

Nicméně výrobek je i podle tohoto odstavce kvalifikován jako prostředek a je explicitně požadováno plnění příslušných obecných požadavků na bezpečnost a účinnost uvedených v příloze I MDR.

I se zohledněním hraničního charakteru výrobku a popsáných specifických případů lze shrnout, že **personalizovaný kryt rány s doplňkovým účinkem může být kvalifikován jako zdravotnický prostředek** a vztahuje se na něj regulace MDR, pouze s různým rozsahem požadavků. 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.

### **Hodnocení publikované literatury jako prerekvizita předklinického testování**

Výchozí konfrontace stávajícího stavu poznání je zásadním prvkem vědecké práce, realizovaným různými formami rešerší odborné literatury.

Provedení, resp. předložení výsledků **hodnocení publikované literatury** použitelné na prostředek je ovšem explicitně požadováno také v rámci požadavků na technickou dokumentaci prostředku dle MDR (srov. odrážka a), odst. 6.1, přílohy II, MDR). Konkrétní relevantní údaje z rešerše odborné literatury mají být použity v diskusi postupů a rozsahu provedeného předklinického testování anebo k odůvodnění neprovedení jednotlivých testů, pokud jsou údaje z publikované literatury vyhodnoceny jako dostatečné.

Jako výhodný postup v rámci disertační práce se tedy jeví syntéza uvedených přístupů, kterou lze realizovat zejména prováděním rešerše odborné literatury s ohledem na naplnění formálních a věcných požadavků regulace tak, aby ji následně bylo možné využít také v procesu posouzení shody jako hodnocení publikované literatury. Je však třeba mít na paměti rozdílnou míru nároků na použitelnost vyhledaných poznatků.

MDR formuluje požadavek na hodnocení publikované literatury relevantní pro prostředek případně prostředky podobné. Nalezené literární údaje staví jako obecně relevantní v případě shody v určeném účelu srovnávaných prostředků, použití dat o prostředcích podobných je však omezeno na prokazování bezpečnosti případně shody se specifikacemi (srov. odrážka a), odst. 6.1, přílohy II, MDR). V praxi je široce přijímán a používán výklad citovaného ustanovení, zejména ve vztahu k biologickému hodnocení materiálů, kde je pro relevanci, resp. podobnost akcentována zejména identita použitého materiálu z pohledu jeho fyzikálně-chemických charakteristik. (Meloni, a další, 2019)

Systematickou úpravu požadavků na hodnocení publikované literatury v předklinické oblasti, resp. konkrétní přímo aplikovatelné požadavky na hodnocení předklinické publikované literatury však MDR neuvádí.<sup>10</sup> Z obecných relevantních požadavků však vyplývá nutnost postup dokumentovat a prokázat jeho relevanci. (srov. zejména odrážka a), odst. 6.1, přílohy II, MDR)

---

<sup>10</sup> explicitní úpravu nezahrnuje ani MDR ani doporučující prováděcí dokumenty (NBOG, MDCCG) apod.

Rešerše literatury se obecně zpracovává na základě rešeršního požadavku, který je zformulován pomocí dotazovacího jazyka do rešeršního dotazu; při provádění rešerše se uplatňuje rešeršní strategie. (Švejda, 2003) Pokud bychom hledali oporu v technicko-normativní úpravě, pak jde o operaci prováděnou s cílem získat informace o dokumentech pomocí vyhledávacího systému. (srov. ČSN ISO 5127:2003) Z uvedeného je zřejmý požadavek na systematické provedení a plánování (strategii).

V úpravě nároků na literární rešerše klinických dat v MEDDEV 2.7/1 (rev.4)<sup>11</sup> lze jako zásadní požadavky identifikovat stanovení relevantního cíle vyhledávání, stanovení a popis vyhledávací strategie a zahrnutí odpovídajících zdrojů literárních dat. Akcent je položen také na dokumentaci kvalifikace osob provádějících rešerši.

Specificky z hlediska hodnocení relevance a významnosti publikované literatury v předklinické oblasti, tedy pro výběr z nalezených pramenů, jsou podstatné požadavky MDR v otázce řízení rizik (srov. zejména odst. 3 a 4 kapitoly I, přílohy I). V citovaných ustanoveních jsou upraveny požadavky na systém řízení rizik zavedený výrobcem, v rámci něhož je mj. povinen odhadovat (identifikovat) a vyhodnocovat rizika vznikající při určeném použití prostředku a při důvodně předvídatelném nesprávném použití prostředku, nebo s nimi související, a subsekventně tato rizika vyloučit nebo kontrolovat.<sup>12</sup> Primárně aplikovaným opatřením ke kontrole jednotlivého rizika je přitom vyloučit nebo snížit na nejnižší možnou míru riziko prostřednictvím bezpečného návrhu a výroby (srov. odst. 4, kap. I, přílohy I, MDR), přičemž předklinické hodnocení (vč. biologického hodnocení) zdravotnického prostředku je právě nástrojem k ověření návrhu. (Simon, 2020)

Z uvedeného lze tedy pro účely hodnocení publikované literatury v rámci předklinického hodnocení mj. dovodit, že by mělo být v odpovídajícím, resp. podstatném, rozsahu zaměřeno právě na **identifikaci souvisejících rizik**. Hlediskem pro hodnocení významnosti předklinických literárních dat je pak tedy také signifikance případně rezultujícího rizika souvisejícího s konkrétním předklinickým aspektem hodnoceného zdravotnického prostředku.

## Testování bezpečnosti

Testování technické<sup>13</sup> a biologické bezpečnosti a předklinické hodnocení, jehož součástí je hodnocení biologické, jsou zásadními prvky při prokazování shody zdravotnického prostředku (srov. článek 62, odst. 4, odrážka 1 MDR). Zároveň biologické hodnocení zdravotnických prostředků je zásadním prvkem v rámci komplexního procesu řízení rizik. (Cambiaghi, 2018) Předmětem, resp.

---

<sup>11</sup> Jelikož rešerše předklinické literatury je součástí dokumentace posuzované v rámci klinického hodnocení, lze do značné míry vycházet z požadavků pro rešerši literárních dat v rámci MEDDEV 2.7/1 rev.4. Takto při posuzování literární rešerše postupuje například Český metrologický institut, oznámený subjekt pro zdravotnické prostředky.

<sup>12</sup> dále podrobně upraveno harmonizovanou normou ČSN EN ISO 14971 Zdravotnické prostředky – Aplikace managementu rizik na zdravotnické prostředky

<sup>13</sup> technická bezpečnost není v rámci práce řešena

výstupem biologického hodnocení je posouzení relevantních předklinických aspektů ve vztahu k prostředku, zejména jeho **biologické bezpečnosti**, která je hodnocena v podstatném rozsahu na základě prokázání biokompatibility.

**Biokompatibilitu** lze definovat jako schopnost materiálu plnit požadované funkce, zejména s ohledem na potřeby léčby, tedy vyvolat vhodnou odezvu organismu pacienta v konkrétní aplikaci, a zároveň interagovat s živými organismy bez jakéhokoli rizika vzniku poranění, toxicity nebo odmítnutí imunitním systémem, které se projeví nežádoucími nebo nepřiměřenými lokálními nebo systémovými účinky. (Ghasemi-Mobarakeh, a další, 2019) Tato oblast je v praxi z hlediska posouzení shody zdravotnických prostředků, která je v souladu s cíli práce zohledňována, relativně podrobně upravena v technických normách řady ISO 10993 (též EN, ČSN), které lze považovat v tomto ohledu i z vědeckého hlediska za zlatý standard. (Williams, 2021)

Tato řada norem je velice rozsáhlá, jak ilustruje tabulka 1.

ČSN EN ISO 10993-1:2021	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 1: Hodnocení a zkoušení v rámci procesu managementu rizik
ČSN EN ISO 10993-2:2023	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 2: Požadavky na pohodu zvířat
ČSN EN ISO 10993-3:2015	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 3: Zkoušky na genotoxicitu, karcinogenitu a reprodukční toxicitu
ČSN EN ISO 10993-4:2017	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví
ČSN EN ISO 10993-5:2010	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro
ČSN EN ISO 10993-6:2017	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 6: Zkoušky lokálních účinků po implantaci
ČSN EN ISO 10993-7:2009 + A1:2022 + Opr.1:2010	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 7: Rezidua při sterilizaci ethylenoxidem
ČSN EN ISO 10993-9:2022	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 9: Obecné zásady pro kvalitativní a kvantitativní stanovení potenciálních degradačních produktů
ČSN EN ISO 10993-10:2023	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 10: Zkoušky senzibilizace kůže
ČSN EN ISO 10993-11:2018	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 11: Zkoušky na systémovou toxicitu
ČSN EN ISO 10993-12:2022	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály
ČSN EN ISO 10993-13:2010	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 13: Kvalitativní a kvantitativní stanovení degradačních produktů ze zdravotnických prostředků vyrobených z polymerních materiálů

ČSN EN ISO 10993-14:2009	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 14: Kvalitativní a kvantitativní stanovení degradačních produktů z keramických materiálů
ČSN EN ISO 10993-15:2023	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 15: Kvalitativní a kvantitativní stanovení degradačních produktů z kovů a slitin
ČSN EN ISO 10993-16:2018	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 16: Plán toxikokinetické studie degradačních produktů a vyluhovatelných látek
ČSN EN ISO 10993-17:2009	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 17: Stanovení přípustných limitů pro vyluhovatelné látky
ČSN EN ISO 10993-18:2021 + A1:2024	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 18: Chemická charakterizace materiálů zdravotnických prostředků v rámci procesu managementu rizik + Změna A1
ISO/TS 10993-19:2020	Biological evaluation of medical devices Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials
ČSN P ISO/TS 10993-20:2009	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 20: Zásady a metody imunotoxikologického zkoušení zdravotnických prostředků
ISO/TR 10993-22:2017	Biological evaluation of medical devices Part 22: Guidance on nanomaterials
ČSN EN ISO 10993-23:2021	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 23: Zkoušky dráždivosti
ISO/TR 10993-33:2015	Biological evaluation of medical devices Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity Supplement to ISO 10993-3
ISO/TR 10993-55:2023	Biological evaluation of medical devices Part 55: Interlaboratory study on cytotoxicity

*Tabulka 1: Přehled částí normy ISO 10993*

*Zdroj: Autor s využitím <http://www.iso.org> a <https://csnonline.agentura-cas.cz/>*

Jednotlivé části této normy v návaznosti na procesy řízení rizik stanoví zejména, které **koncové body** mají být z hlediska biologické bezpečnosti pro dané kategorie <sup>14</sup> prostředku testovány a jakými metodami. V rámci výběru konkrétních metod testování je tedy vhodné i z hlediska vědeckého přístupu respektovat metodiku normy ČSN EN ISO 10993, aby byla v tomto ohledu zajištěna specifická relevance dat pro proces posuzování shody, ledaže by byl dán zcela zásadní důvod pro uplatnění postupů odlišných. Ostatně, jak je u technických norem obvyklé, nejsou požadavky normy obecně závazné.

<sup>14</sup> Norma ČSN EN ISO 10933-1 v tomto ohledu stanoví kategorie podle povahy styku s tělem (přicházející do styku s povrchem těla – kůže, sliznice, porušené nebo oslabené povrchy; vstupující do těla zevnějšku – krevní řečiště / nepřímo, tkáň/kost/dentin, cirkulující krev; implantované – tkáň/kost, krev) a doby styku s tělem (omezená expozice, prodloužená expozice, dlouhodobá expozice).



Jako koncové body relevantní pro všechny kategorie prostředků, tato norma uvádí tyto: „Cytotoxicita“, „Senzibilizace“ a „Dráždivost nebo intrakutánní reaktivita“, jejichž posouzení je tedy nutné v každém případě, přičemž specifické postavení má požadavek na „Fyzikální a/nebo chemické informace“ (srov. příloha A.1, ČSN EN ISO 10993-1:2021).

### Fyzikální a chemické informace

**Chemická charakterizace**, jež je tvořena souhrnem a analýzou informací o chemickém složení výrobku, je z regulatorního pohledu popsána v části normy ČSN EN ISO 10993-18. Je zdrojem informací pro hodnocení toxikologického rizika a je alternativním přístupem k řešení některých koncových bodů<sup>15</sup> v rámci posuzování biokompatibility (např. systémová toxicita, genotoxicita, karcinogenita, reprodukční/vývojová toxicita), což může významně redukovat čas a náklady potřebné na testování a také potřebu pokusných zvířat. (Sussman, a další, 2022)

Předmětem chemické charakterizace je přitom zjištění a analýza možných sledovaných negativních účinků extrahovatelných a vyluhovatelných látek. Mezi těmi jsou přitom zastoupeny vedle látek očekávaných zejména pomocné látky a rezidua z procesu zpracování. (Jenke, 2022)

Získání úplných informací o chemickém složení, jež je výsledkem procesu zpracování všech jednotlivých vstupních surovin, není ve výrobní praxi příliš reálné, jsou proto aplikována validovaná testování využívající metod analytické chemie. Specificky analýza extrahovatelných látek využívá kombinace necílené analýzy, necíleného screeningu a/nebo cílené analýzy ke stanovení identit a množství chemických látek, které mohou být uvolněny z prostředku. Identifikované a kvantifikované extrahovatelné látky jsou poté hodnoceny pomocí přístupů k hodnocení toxikologického rizika. (Sussman, a další, 2022)

Ve smyslu relevantních technických norem je pak třeba prokázat, že nalezená množství jednotlivých látek jsou natolik nízká, že odůvodňují neprovedení další chemické analýzy, biologického hodnocení vybraných koncových bodů nebo opatření kontroly rizik, nebo je uvedenými postupy prokázáno, že jsou z hlediska porovnání přínosů a rizik akceptovatelná (srov. ČSN EN ISO 10993-17, ČSN EN ISO 10993-18).

Na základě výše uvedeného lze shrnout, že chemická charakterizace zahrnuje komplexní chemickou a toxikologickou analýzu chemických látek, které mohou být z prostředku uvolněny, přičemž potenciál nezamýšlených, resp. negativních, účinků lze předpokládat zejména u látek „znečišťujících“, tedy zejména reziduí z výrobního procesu prostředku. Chemická charakterizace je zásadní složkou biologického hodnocení, která může zcela nahradit testování některých koncových bodů.

---

<sup>15</sup> prokázání shody s požadavky může být založeno na chemické charakterizaci a zohlednění známých toxikologických účincích zjištěných látek, namísto provedení testování koncového bodu

Druhým sledovaným aspektem je **charakterizace fyzikální**. Toto rozdělení je z podstaty věci formální, vychází z rozřídění do jednotlivých částí technické normy, která ovšem již v názvu části zaměřené na tento okruh zmiňuje mj. fyzikálně-chemickou charakterizaci materiálů (srov. ISO/TS 10993-19:2020). Zde je ovšem na místě poznamenat, že uvedená část normy nebyla dosud platně vydána jako mezinárodní (ISO) ani evropská norma (EN).<sup>16</sup>

Fyzikální charakterizace je zaměřena na hodnocení fyzikální morfologie ale i chemických vlastností povrchů součástí zdravotnických prostředků. Využívá přitom odpovídajících metod, které zahrnují optickou mikroskopii, skenovací elektronovou mikroskopii (SEM), mikroskopii atomárních sil (AFM), energeticky disperzní rentgenovou spektroskopii (EDS/EDX), Augerovu elektronovou spektroskopii, hmotnostní spektrometrii sekundárních iontů (SIMS), rentgenovou fotoelektronovou spektroskopii (XPS/ESCA), infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) a Ramanovu spektroskopii. (Hanke, 2012)

Důvodem k provedení analýzy povrchu prostředku z polymerního materiálu mohou být zejména hypotézy o korelacích mezi povrchovými parametry a hemokompatibilitou polymerů. (Werner, a další, 1999). Fyzikální charakterizace je tedy podstatnou složkou biologického hodnocení ve specifických případech.

### Cytotoxicita

Účelem testování **cytotoxicity** je určit toxicitu zdravotnických prostředků s pomocí jejich expozice tkáňovým buňkám *in vitro* a vyhodnocováním zjištěných účinků. (Shanmugam, a další, 2023) Jedná se o testování prvního z trojice koncových bodů, které jsou relevantní pro všechny zdravotnické prostředky. Relevantní technickou normou je specificky ČSN EN ISO 10993-5.

Hodnocení cytotoxicity je prováděno na základě testování *in vitro*. Každá validovaná metoda pro testování cytotoxicity má odlišnou metodologii, kritéria přijatelnosti a míru detailu popisu zkušebních metod, což má vliv na výběr konkrétního testu. Obecně lze metody pro hodnocení cytotoxicity rozdělit na kvantitativní (např. MTT/XTT, NR, CFA) a kvalitativní (např. eluční test, překrytí agarem difuzní nebo přímé). Evropské normy preferují spíše metody kvantitativní. (Liu, a další, 2018)

Z hlediska kvantitativních metod je velice často užívána metoda MTT. (Grela, a další, 2018) Tato metoda pro odhadování metabolické aktivity živých buněk využívá solubilní roztok světle zbarvené tetrazoliové soli (MTT), která je enzymaticky redukována na formazan intenzivní purpurově modré barvy, který lze spektrofotometricky kvantifikovat. Byly ovšem popsány specifické případy, kdy

---

<sup>16</sup> ISO/TS 10993-19:2020 je vydána ve formě technické specifikace (Technical Specification – TS). Jde o normativní dokument přijatý ISO s možností budoucí dohody o mezinárodní nebo evropské normě, pro niž však dosud shodu na schválení nelze získat, předmět normy je stále ve stadiu technického vývoje nebo existuje jiný důvod znemožňující její vydání. Obdobně mohou postupovat vedle ISO také CEN, CENELEC a IEC.

MTT eseje nejsou vhodné z důvodu interakce testovaného materiálu, zejména v případě nanotechnologií. (Monteiro-Riviere, a další, 2009)

Existují také zdroje, které se specificky zabývají vhodností jednotlivých konkrétních postupů pro konkrétní výzkumné účely. (Riss, a další, 2003) Pro hodnocení cytotoxicity s využitím MTT má řadu výhod využití buněčných linií fibroblastů 3T3. (Abud, a další, 2015)

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že existuje celá řada metod pro posouzení cytotoxicity prostředku, z nichž více je validováno ve smyslu požadavků relevantní technické normy, a tedy formálně přijatelných pro sledovaný účel. Je však třeba věcně posoudit jejich vhodnost pro konkrétní prostředek. Existuje také řada komerčně dostupných esejí, které mají mnoho dokumentovaných použití pro relevantní účely, v literatuře je obdobně též popsáno více použitelných buněčných linií.

### Senzibilizace

Druhým z trojice základních koncových bodů je testování **senzibilizace**, které je zaměřeno na hodnocení rizik vyplývajících z expozice látkám senzibilizujícím pokožku, tedy látkám, které při expozici vedou k její následné přecitlivělosti. Testování senzibilizace může tedy identifikuje potenciál chemické látky způsobit alergickou kontaktní dermatitidu, lokální kožní reakci charakterizovanou zarudnutím, otokem a svěděním. (Murphy, 2012)

Požadavky a validované metody pro testování senzibilizace jsou popsány v technické normě ČSN EN ISO 10093-10. Normativní úprava je zaměřena převážně na testy *in vivo*, vyloučeny ovšem nejsou ani ostatní přístupy. Prosazují se zejména metody *ex-vivo* využívající explantů lidské pokožky, resp. rekonstruovaných modelů lidské kůže. (Kandarova, a další, 2018) Vyloučeno není ani použití metod *in vitro*, *in chemico* a *in silico*, pokud jsou dostatečně technicky a vědecky ověřeny pro testování zdravotnických prostředků. Vzhledem ke složitosti souvisejících biochemických pochodů se ovšem v tom případě předpokládá, že bude zapotřebí kombinace více metod testování, aby byly postiženy všechny klíčové události v procesu senzibilizace. (Svobodová, a další, 2022) Jednou z takových metod může být human Cell Line Activation Test (h-CLAT). (Kimber, a další, 2018) Některé metody se již prosadily přímo do praxe.<sup>17</sup>

Testování potenciálu senzibilizace kůže se nicméně stále provádí také pomocí testů na zvířatech<sup>18</sup>, jako je test lokálních lymfatických uzlin u myší (LLNA), maximalizační test na morčatech (GPMT) a Buehlerův test (OECD, 1992, 2010a). (Daniel, a další, 2018)

---

<sup>17</sup> <https://szu.cz/odborna-centra-a-pracoviste/centrum-toxikologie-a-zdravotni-bezpecnosti/oatm/zkousky-provadeny-v-ramci-oddeleni-alternativnich-toxikologickych-metod/>

<sup>18</sup> <https://szu.cz/odborna-centra-a-pracoviste/centrum-toxikologie-a-zdravotni-bezpecnosti/oddeleni-biomediciny/zkousky-provadeny-v-ramci-oddeleni-laboratori-biomediciny/>

Na základě nalezených výsledků lze jednoznačně konstatovat, že v dané oblasti došlo ke značnému posunu a v současné době existují testovací postupy s potenciálem plnohodnotně nahradit testy senzibilizace na zvířatech.

### Dráždivost nebo intrakutánní reaktivita

**Dráždivost**, která je třetím ze základních testovaných koncových bodů, lze definovat jako potenciál vyvolat podráždění kůže, kterým je místní reverzibilní poškození způsobené expozicí kůže chemické látky po dobu delší než 4 hodiny. Naproti tomu viditelná nevratná nekróza od epidermis po dermis způsobená expozicí kůže chemikáliím po dobu delší než 4 hodiny je již poleptání (corrosion). (Hong, 2023) Jedná se přitom o kůži před expozicí látky neporušenou (perkutánní testování).

Testování dráždivosti bylo historicky prováděno na zvířatech buď přímým kontaktem (kapaliny, gely, krémy) nebo s využitím extraktů polárních a nepolárních rozpouštědel (pevné látky). Provedení mezilaboratorní validační studie v roce 2018 vedlo organizaci ISO k publikaci normy ISO 10993-23:2021 pro testování dráždivosti, která uvádí jako aktuálně preferovanou metodou testy využívající rekonstruovanou lidskou epidermis (RhE). (Pellevoisin, a další, 2022)

Test **intrakutánní reaktivity** dle ISO je standardní protokol pro stanovení potenciálu zdravotnického prostředku způsobovat podráždění. (Upman, a další, 2003) V klinické praxi, při testování alergií, je běžné začít perkutánním testem, především z důvodů bezpečnosti pacienta, a teprve v případě jeho negativního výsledku pak provést test intrakutánní pomocí intradermálních kožních testů (IDST). (Wood, a další, 1999) Naproti tomu z pohledu požadavků normy ISO 10993-1, relevantní specificky pro zkoušení zdravotnických prostředků, je tato zkouška použitelná v případě, že stanovení dráždivosti zkouškami na kůži nebo sliznici není vhodné (např. u implantovaných zdravotnických prostředků, nebo zdravotnických prostředků jež přichází dlouhodobě do styku s krví), případně pokud jsou extrahovatelné látky hydrofobní. (srov. kap. 6.3.2.3, ČSN EN ISO 10993-1:2021)

Z pohledu řešeného prostředku se tedy jeví zkoušení dráždivosti jako relevantnější. Na základě nalezených výsledků, kdy situace s dostupností testování je v praxi podobná jako v případě hodnocení senzibilizace (tradiční i alternativní metody), lze konstatovat, že existuje více akceptovatelných postupů, jejichž vhodnost je třeba posoudit.

### **Testování účinnosti**

Druhým zásadním cílem řešeného experimentu bylo ve zvoleném rozsahu ověřit **předklinickou účinnost** prostředku. Je třeba vždy ověřit, resp. prokázat všechny zásadní charakteristiky účinnosti, tedy takové, které deklaruje výrobce (v rámci určeného účelu použití) nebo které pro daný druh prostředku implikuje regulační úprava (zpravidla prostřednictvím technických norem). Specifická, konkrétní dílčí účinnost tedy může být uvedena v rámci určeného účelu použití explicitně, nebo z něj může vyplývat.

Pro testování předklinické účinnosti je třeba vytvořit racionální strategii předklinických testů, které musí v konečném důsledku poskytnout dostatek informací pro odhad, do jaké míry bude prostředek přínosem pro pacienta v klinickém použití. (Wang, a další, 2023)

Z pohledu ověřování návrhu prostředku lze také cíl testování definovat jako prokázání, zda existuje významný účinek ve sledovaném aspektu ve srovnání se zvolenou kontrolou (Lipp, a další, 2010), častý v FDA. To může poskytnout specificky relevantní výsledky pro podporu klinického hodnocení i z pohledu hodnocení Health Technology Assessment (HTA). Toto hodnocení je v rámci biomedicínského inženýrství ve vztahu ke klinické technice zásadním tématem. (Pecchia, a další, 2019)

Předklinické strategie zaměřené na biokompatibilitu, ale i biologické účinky obecně, zahrnují tradičně zejména testování laboratorní (*in vitro*) a vhodné zvířecí modely (*in vivo*). S vývojem nových technik roste ovšem i pro testování účinnosti význam využívání explantů nebo validovaných náhrad pro zvířecí modely<sup>19</sup> (*ex vivo*) (Gorzalczany, a další, 2021) a počítačového modelování (*in silico*).

Modely *in vivo*, resp. zvířecí modely, poskytují neocenitelné informace o hojení ran zkoumáním jejich buněčných a biochemických mechanismů. Kromě toho jsou nejvíce prediktivními modely pro hodnocení účinnosti a bezpečnosti různých terapeutických *agens* a léčiv a slouží jako vhodné alternativní možnosti hodnocení hojení ran k hodnocení klinickému. (Ahmad, 2023)

Systémy *in vivo* jsou vysoce komplexní a interakce nanostruktur s biologickými složkami, jako jsou proteiny a buňky, by mohly vést k jedinečné biodistribuci, clearance<sup>20</sup>, imunitní odpovědi a metabolismu. (Fischer, a další, 2007)

Pro hodnocení předklinické účinnosti lze tedy zejména v případě použití nanotechnologií předklinická *in vivo* testování hodnotit jako nezbytná. Pro návrh strategie předklinického testování účinnosti byly vzaty v úvahu zásadní zamýšlené účinky prostředku, tedy krytí rány, antibakteriální účinnost a urychlení hojení (viz kap. 3.2), které byly uvažovány k testování zejména v rámci *in vivo* experimentu. Testy *in vitro* jsou uvažovány v případě potřeby exaktnější kvantifikace účinku nebo jako jeho ověření před *in vivo* experimentem.

### Krytí rány

Regenerace chronické rány je komplexní a složitý proces, který vyžaduje čas a vhodné prostředí. Čistá rána s granulující tkání a bez infekce se spolu s vlhkým krytím rány jeví jako nejlepší postup pro úspěšné hojení. Metoda TIME, popsána v literatuře, se jeví jako účinný nástroj k dosažení takových

---

<sup>19</sup> strategie 3R – „Replacement, Reduction, and Refinement“ (náhrada, redukce a zdokonalení) – se v předklinickém testování snaží zajistit racionální a ohleduplné používání laboratorních zvířat a zachovat adekvátní projekci z hlediska bioetických úvah

<sup>20</sup> termín užívaný při matematickém popisu farmakokinetiky; jde o poměr rychlosti eliminace léčiva a jeho koncentrace v krvi (obecně i v jiné biologické tekutině, např. v plazmě nebo séru); rychlost eliminace je množství léčiva eliminované za jednotku času (jednotka je mol/s, mg/h); jednotkou clearance je tedy objem/čas (l/h, ml/s, ml/min)

podmínek. (Alam, a další, 2021). Podle této metody je třeba odstranit devitalizovanou tkáň, eliminovat buď lokální nebo systémové infekce a nastavit správnou rovnováhu vlhkosti pomocí volby nosiče vhodných parametrů. Pokud se požadovaný výsledek hojení nedostaví, je nutné použít další vhodné postupy (tzv. epithelial edge advancement), jako jsou tkáňové náhrady, které pomáhají s migrací buněk a správnou tvorbou vrstvy. (Powers, a další, 2016) (Schultz, a další, 2003) S touto koncepcí je popsána konstrukce funkcionalizačního zařízení, resp. provedení **krytu rány** (eliminace infektu, vlhké hojení, další vhodné postupy) ve shodě, což lze využít jako obecný argument vhodnosti návrhu.



*Obrázek 10: Aplikace funkcionalizovaného krytu rány je uvažována ve vlhkém stavu, zde s využitím podpory integrované v cartridge.  
Zdroj: Autor*

Jednotlivé aspekty předklinické účinnosti a požadavky na jejich testování jsou často řešeny v technických normách, zpravidla zaměřených na konkrétní druh prostředku. Pro kryty ran se jako věcně relevantní jevila například řada norem ČSN EN 13726, části 1 až 4. První ani druhou část této normy však na základě prováděcího rozhodnutí k MDR nebylo možné použít k založení předpokladu shody s jeho požadavky (srov. prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2020/437) V relevantních zdrojích již také byla k dispozici informace o procesu vydání normy nové, všechny části uvedené normy nahrazující, která však dosud nebyla vydána.<sup>21</sup>

Pro koncepci testování v této oblasti tedy z technických norem konkrétní požadavky nevyplývaly. Recentní literatura řeší provádění testování krytů ran z hlediska účinnosti například s ohledem na savost (Minsart, a další, 2022), která však není z pohledu řešeného krytu ran charakteristikou prioritní. Identifikované dílčí aspekty účinnosti se jeví jako komplexní, a tedy

---

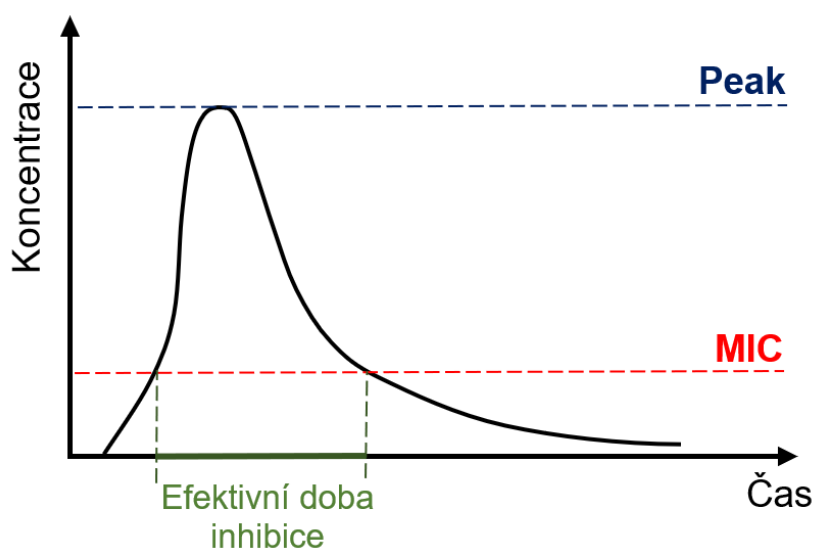
<sup>21</sup> ČSN EN 13726:2024, která přebírá evropskou normu EN 13726:2023. Tato norma tedy byla vydána až po realizaci testování, jež je předmětem této práce. Pro další iteraci ověřování návrhu prostředku, resp. plánování předklinického hodnocení, však bude nanejvýš vhodné požadavky tohoto technického standardu vyhodnotit a případně jej k prokázání zvolených požadavků použít.

s relevancí *in vivo* testování. Komplexní předklinické vyhodnocení účinnosti ve smyslu krytí ran tedy bylo vyhodnoceno jako důležité primárně v *in vivo* experimentu.

Specificky uváděnou charakteristikou účinnosti ve vztahu k řešenému krytí rány byla **bariérová funkce** proti průniku mikroorganismů. Normované testy pro tuto charakteristiku v případě krytů ran také k dispozici nebyly. V literatuře byla tato otázka řešena zejména ve vztahu k filtraci (Fahimirad, a další, 2021) kapalin i plynů. Testování v této specifické otázce, zejména s ohledem na vhodnost kvantifikace výsledků (míra účinnosti), tedy bylo identifikováno jako významné pro metody *in vitro*.

### Antibakteriální účinnost

V literatuře je často v kontextu antibakteriální účinnosti uváděna hodnota minimální inhibiční koncentrace – MIC (z angl. minimum inhibitory concentration), tedy hodnota určující minimální koncentraci antibiotika potřebnou pro inhibici (planktonické formy) bakterie (Kowalska-Krochmal, a další, 2021). Dosažení konkrétní koncentrace v roztoku, resp. exsudátu je ovšem v řešeném případě ovlivněno uvolňovacím profilem drug delivery systému v závislosti na podmínkách prostředí (viz obr. 11). Testování *in vitro* je tedy i v případě nalezení hodnot MIC v literatuře potřebné, a to zejména pro vyloučení, resp. snížení pravděpodobnosti výskytu falešně negativních výsledků *in vivo* testování.



Obrázek 11: Ilustrativní graf koncentrace antibiotika v ráně v závislosti na čase expozice krytu. Koncentrace po aplikaci je výsledkem protichůdného působení postupného uvolňování antibiotika drug delivery systémem a biochemických mechanismů v ráně snižujících jeho koncentraci (clearance). Zdroj: Autor s využitím (Lux, a další, 2014) a dat výrobců.

Metod pro *in vitro* testování **antibakteriální účinnosti** je v literatuře popsána řada (Sjollema, a další, 2018) (Omar, a další, 2017) (Balouiri, a další, 2016) (Wiegand, a další, 2015), v praxi jsou mnohé z nich používány běžně a často je popsána i vhodnost pro specifické účely. Z hlediska principu je lze rozdělit na metody eluční a diluční. (Peterson, a další, 1992) Pro antibakteriálně ošetřené textilie pro biomedicínské aplikace je jako specificky vhodný popisován diskový test. (Hosseini, a další, 2022)

Z hlediska normovaných testů platná normativní úprava v oblasti krytů ran pro Evropu k dispozici není. Existoval návrh evropské normy prEN 16756:2014, který však dosud nebyl prosazen. V procesu vydání se také stále nachází evropská norma EN 17854:2023 Antimicrobial wound dressings – Requirements and test method, která však také není dosud platná.<sup>22</sup>

Specifickou antibakteriální účinností je **inhibice bakteriálního biofilmu**, resp. jeho **eradikace** kterou výrobci u řešeného krytu ran předpokládají.<sup>23</sup> Biofilm lze popsat jako mikrobiální kolonii, např. na povrchu rány, která je obalena polysacharidovou matricí. V literatuře je často pro konkrétní antibiotika uváděna již zmíněná hodnota MIC, hodnoty MBIC, tedy minimální koncentrace antibiotika potřebná pro inhibici biofilmu, a MBEC, tedy minimální koncentrace antibiotika potřebná pro jeho eradikaci, je možné dohledat jen v některých případech. Terminologie ani metodologie navíc není v tomto ohledu zcela ustálená. (Thieme, a další, 2019)

Dosažení konkrétní koncentrace antibiotika, působící na biofilm, je ovlivněno obdobně jako v případě MIC. Testování je tedy také i při nalezení příslušných teoretických hodnot v literatuře vhodné.

Normovaný test z hlediska evropské regulační úpravy pro kryty ran není k dispozici. Podpůrně, či spíše jen teoreticky, lze využít úpravy technických norem zaměřených na odstraňování biofilmu v jiných aplikacích. (srov. ISO 4768:2023)

V jiných normativních systémech lze nalézt pro řešené testování např. Single Tube Method – STM (srov. řadu norem ASTM E2871). Použití této metody je výchozím normativním požadavkem k doložení tvrzení „zabíjí biofilm“ u antimikrobiálních látek registrovaných a prodávaných v USA. STM poskytuje kvantitativní měření logaritmického snížení počtu životaschopných bakterií v biofilmu, které je výsledkem vystavení zralého biofilmu antimikrobiální látce po určitou dobu kontaktu. STM byl navržen pro ošetření a odběr vzorků biofilmu v jedné zkumavce a objemu. STM tedy nepostihuje rozdíl mezi buňkami usmrcenými na povrchu a buňkami, které jsou z povrchu odstraněny, například povrchově aktivní látkou (surfaktantem) v antimikrobiální formulaci, a poté usmrceny aktivními činidly v roztoku. (Goeres, a další, 2019)

Mnoho dalších metod je zmiňováno v literatuře, existují také jejich systematická srovnání. (Stiefel, a další, 2016) Jednou z nich je využití krystalové violeti jako barviva s následným měřením absorbance  $A_{595nm}$  spektrofotometricky pro charakterizaci stavu biofilmu před a po aplikaci antibiotika. (Kragh, a další, 2019) Tuto metodiku autor úspěšně využil v rámci řešení výzkumného projektu FV20422, jehož byl hlavním řešitelem.

---

<sup>22</sup> ve smyslu MDCG 2021-5 by výrobce text normy i přesto mohl uplatnit podle principu „state of the art“

<sup>23</sup> rozdíl je v míře účinku; inhibice je obecně účinek, který brzdí, omezuje, zadržuje, zamezuje, utlumuje nebo zpomaluje, v případě bakteriální inhibice tedy účinek baktericidní i bakteriostatický; eradikace v lékařské terminologii znamená úplné vymýcení choroby včetně jejího původce z populace na lokální nebo na globální úrovni, což z hlediska účinků na biofilm naznačuje úplné rozrušení jeho struktury a úplnou inhibici bakteriální kolonie



## Antioxidační účinnost

Odborná literatura řeší často antioxidační kapacitu jednotlivých antioxidantů s využitím popsaných esejí. Dodnes je mnohdy využívána FRAP esej. (Benzie, a další, 1996) Tato metoda využívá redukce bezbarvého železitého komplexu  $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tris(2-pyridyl-S-triazin) ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) antioxidanty. Tento komplex vzniká reakcí TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) a chloridu železitého ( $\text{FeCl}_3$ ). Obsah produktu redukce antioxidanty přítomnými ve vzorku tmavě modré barvy se kvantifikuje fotometricky pro absorpenci  $A_{593\text{nm}}$ . Hodnoty FRAP se získají porovnáním změny absorbance v testovacích reakčních směsích s těmi, které obsahují železnaté ionty ve známé koncentraci.

V literatuře je ovšem popsána a srovnávána řada dalších metod (Alam, a další, 2013). Jedná se také o metody spektrální, tj. využívající měření změny absorbance ve vzorku, z nichž nejčastěji využívanou je pravděpodobně metoda TEAC, využívající ABTS•- radikálu 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6sulfonové kyseliny). Dále jsou popsány např. DPPH test (absorbance v UV-VIS oblasti s využitím radikálu DPPH), ORAC test a jeho obdoba TRAP, ale i další.

Využívány jsou ovšem i metody využívající faktu, že antioxidanty jsou látky s redukčními vlastnostmi a přednostně reagují s volnými radikály, tj. vysoce oxidačními činidly. To umožňuje stanovit antioxidační kapacitu neznámých vzorků elektrochemicky. Mezi častěji používané elektrochemické metody se řadí amperometrie s použitím biosensory, cyklická voltametrie a pulzní voltametrie. (Narang, a další, 2011)

K dispozici je tedy celá řada metod využívajících analytické chemie pro stanovení antioxidační kapacity konkrétního antioxidantu. Popsány jsou ovšem také metody biologické, využívající standardizované esej. V literatuře je popsán například postup expozice vhodných buněčných linií, zejména 3T3 myších fibroblastů případně keratinocitů, vhodnému činidlu vyvolávajícímu redoxní stres, zejména  $\text{H}_2\text{O}_2$ , s využitím kvantifikace pomocí MTT esej. (Vaid, a další, 2020) Tuto metodiku autor úspěšně využil v rámci řešení výzkumného projektu FV40186, jehož byl hlavním řešitelem.

Situace s vypovídací hodnotou takového měření při aplikaci s využitím drug delivery systému je ovšem obdobná, jako v případě antibakteriálního účinku, resp. MIC a potřeba *in vivo* testování je dána.

## Testování na modelech *in vivo*

Pro řadu řešených aspektů bezpečnosti anebo i účinnosti mohou poskytnout výsledky hodnocení publikované literatury anebo provedená *in vitro* testování. Pro komplexnější ověření bezpečnosti a zejména prokázání předklinické účinnosti je však **testování *in vivo***, případně alternativními metodami, nezbytné.

Pro testování kutánního hojení ran je v dané fázi výzkumu často užíván myší model, tedy model malého zvířete, který se jevil jako vhodný. (Holder, a další, 1997)

Cílem, resp. konečným bodem úspěšné léčby rány je její úplné a trvalé uzavření. V klinické praxi je rychlost změny plochy rány, také známá jako rychlost hojení rány, nejlepším způsobem, jak kvantifikovat hojení, protože nejpoužívanějším klinickým markerem hojení je velikost rány. (Papazoglou, a další, 2010) (Williams, 2000) Pro hodnocení hojení rány byla s ohledem na uvedené vyhledána ucelená metodika podle Lazara (Lazarus, a další, 1994).

Histopatologie ran je velmi užitečným nástrojem ke sledování průběhu hojení v průběhu léčby, lepšímu pochopení patofyziologie nehojících se ran, posouzení morfologických změn a pomoci s diagnózou a případně zjištění příčin malignity. (Planz, a další, 2015) (Romanelli, a další, 2013) Přestože se jedná o disciplínu spadající již do lékařské vědy a klinické praxe, s jejími poznatky je nutné v rámci biomedicínského inženýrství často pracovat. (Arevalo, a další, 2014)

V klinické praxi je nejlepším místem pro biopsii okraj rány, protože umožňuje srovnání oblasti rány a okolní kůže. (Romanelli, a další, 2013) V prostředí laboratorní biopsie pro histopatologickou analýzu zahrnuje častěji celou ránu včetně okrajů. (Caetano, a další, 2015) (Fronza, a další, 2014)

Pro histologické hodnocení, specificky vyhodnocení morfologických změn během hojení a ve zhojené ráně byla v literatuře nalezena metodika podle Simonetti. (Simonetti, a další, 2020)

### 3.4 Požadavky

Konkretizace a stanovení dílčích specifických cílů experimentu, resp. **sumarizace a selekce relevantních ověřovaných požadavků**, je nezbytným krokem, který vytváří měřítko pro hodnocení úspěšnosti testování. Jelikož práce byla zaměřena na ověření návrhu prostředku, jednalo se obecně o zjištění, případně potvrzení nebo vyvrácení, konkrétních předpokládaných vlastností.

#### Požadavky zákaznické

Účel krytu rány je přirozeně aplikace na pacienta, která musí být nejen bezpečná a vedoucí k odpovídajícím účinkům, ale také co nejvíce komfortní, ekonomicky efektivní apod. (Sood, a další, 2014) Výběr i funkcionalizace krytu jsou úkoly zdravotnického personálu. Relevantním zákazníkem je v tomto případě zdravotnické zařízení, nejčastějším uživatelem ovšem v jeho rámci zdravotní sestry.

Uspokojování potřeb zákazníka je jedním ze základních mechanismů ekonomiky (Holman, 2011). Pro zdravotnické prostředky jsou požadavky zákazníka zásadním kritériem i z pohledu harmonizované normy upravující systémy řízení kvality výrobce (srov. ČSN EN ISO 13485 ed. 2).

Obě zainteresované firmy, zabývající se vývojem funkcionalizačního zařízení a prosazením související terapie, již na trhu působí s jinými prostředky, resp. kryty ran pro které sbírají data o použití v rámci PMS, resp. PMCF. Pro identifikaci zákaznických požadavků v rámci vývoje využívají tedy zejména sekundární analýzy, která je ekonomicky méně náročná a umožňuje také obecně větší uplatnění vlastních myšlenek vývojového týmu. (Johnston, 2014)

Pro systematické zpracování dat se v podmínkách výrobce jeví jako využitelná např. metoda Quality Function Deployment (QFD). Tato metoda pracuje nejen s požadavky zákazníků, které přicházejí z trhu, ale i s interními poznatky z předchozích projektů, zohledňovány jsou znalosti a zkušenosti vývojových pracovníků výrobce, zejména o realizovatelnosti zákaznických požadavků a jejich dopadu na nastavení interních procesů. Výstupem je tabulka, která stanoví mj. priority jednotlivých požadavků. (Bossert, 2021)

V řešeném případě jsou zákaznické požadavky již do značné míry materializovány do koncepce funkcionalizačního zařízení i jím připravovaných personalizovaných krytů ran a tvoří tedy v zásadě východiska práce. Vývojový tým, resp. oba výrobci využívají jako zdroj dat pro sekundární analýzu vlastní studie a průzkumy v souvislosti s prodejem krytů ran a zejména realizací tematicky relevantních projektů VaVaI (FV20422 a FV40186 v nichž byl autor hlavním řešitelem, a dále FV10605, FV30086, FV40187, FV40188, FV40189, FX02030040 na jejichž řešení se autor podílel). Tato dokumentace je důvěrná, jelikož tvoří převážně utajované know-how obou společností.

V otázce ověřování návrhu a vývoje zařízení, které je realizováno testováním předklinické bezpečnosti a účinnosti jím připravených výstupů, také zákaznické požadavky do značné míry splývají s požadavky regulatorními (pacient chce být účinně a bezpečně léčen, zdravotník chce použít bezpečný a účinný prostředek i související zařízení). Ostatní požadavky, jako např. ekonomika provozu, nebo co nejmenší časová náročnost přípravy jednotlivého krytu, případně subjektivní pocity pacienta spojené s aplikací lze pak ověřovat v zásadě pouze ve fázi klinického testování a práce se jimi blíže nezabývala.

### **Požadavky regulatorní**

Jako **regulatorní požadavky** jsou v kontextu práce označovány veškeré závazné, tedy zákonné ale i další, požadavky na výrobek nebo postupy výrobce. Pro zdravotnické prostředky jsou dány citovaným Nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/745, tzv. MDR, a to zejména v jeho příloze I (viz kap. 3.3).

První kapitola přílohy I MDR uvádí obecné požadavky, jejichž prokázání je zejména z hlediska bezpečnosti obvykle realizováno převážně v rámci řízení rizik, jelikož jsou definovány obecně a jako kritérium staví v konečném důsledku minimalizaci rizika. Konkrétní požadavky uvádí kapitola druhá (Požadavky na návrh a výrobu) této přílohy MDR, pro biologické hodnocení zejména v odstavci 10, ale také v odstavcích 11–13.<sup>24</sup>

---

<sup>24</sup> 10. Chemické, fyzikální a biologické vlastnosti

11. Infekce a mikrobiální kontaminace

12. Prostředky obsahující látku, jež se považuje za léčivý přípravek, a prostředky složené z látek nebo kombinací látek, které jsou lidským tělem absorbovány nebo v lidském těle lokálně rozptýleny

13. Prostředky obsahující materiály biologického původu (z pohledu řešené specifikace prostředku nerelevantní)

Část technické dokumentace prostředku, která tvoří obvykle podklad k posouzení shody prostředku, je v částech zaměřených na identifikované konkrétní požadavky dle přílohy I MDR v rozsahu mnoha stran a zahrnuje celou řadu, často nákladných, testování, zaměřených na předklinickou bezpečnost a účinnost prostředku.

#### 4. DESIGN EXPERIMENTU

V této části disertační práce byly provedeny návrh a realizace řešeného experimentu. Z pohledu výrobce jsou při plánování testování kontrární dva protichůdné přístupy. Maximalistické pojetí testování směřuje k ověření co nejširšího spektra vlastností. Naproti tomu přístup ekonomický ve vazbě na náklady rozsah testování omezuje na ověřování v rozsahu nezbytném pro splnění regulačních požadavků. V rámci práce byl hledán racionální kompromis mezi oběma uvedenými.

##### 4.1 Výběr relevantních regulačních požadavků a postupů pro posouzení

V souladu s východisky v teoretické části práce a provedenou teoretickou analýzou byly identifikovány, konkretizovány a vybrány požadavky, které mají být ověřeny předklinických testováním a zvoleny odpovídající postupy.

Požadavek	Regulační reference	Postupy hodnocení
<b>Funkcionalizační zařízení</b>		
Ověření návrhu funkcionalizačního zařízení (zvolený rozsah)	---	Hodnocení publikované literatury Testování zvolené varianty krytu rány s doplňkovým účinkem
<b>Kryt rány s doplňkovým účinkem</b>		
Krytí rány	Příloha I, kapitola II, odst. 10.1, odr. f) a g) MDR	Hodnocení publikované literatury Testování
Fyzikální a chemická charakterizace	Příloha I, kapitola II, odst. 10, MDR	Hodnocení publikované literatury Testování
Cytotoxicita	Příloha I, kapitola II, odst. 10, MDR (normy řady ISO 10993)	Hodnocení publikované literatury Testování
Senzibilizace	Příloha I, kapitola II, odst. 10, MDR (normy řady ISO 10993)	Hodnocení publikované literatury Testování
Dráždivost	Příloha I, kapitola II, odst. 10, MDR (normy řady ISO 10993)	Hodnocení publikované literatury Testování
Účinnost – antibakteriální	Příloha I, kapitola I, odst. 1, MDR	Hodnocení publikované literatury Testování
Účinnost – antibakteriální – biofilm	Příloha I, kapitola I, odst. 1, MDR	Hodnocení publikované literatury Testování
Účinnost – antioxidační	Příloha I, kapitola I, odst. 1, MDR	Hodnocení publikované literatury Testování
Účinnost – zlepšení hojení	Příloha I, kapitola I, odst. 1, MDR	Hodnocení publikované literatury Testování

Tabulka 2: Přehled požadavků vybraných k řešení

Pro regulatorní účely, dle MDR, se v praxi zpracovává tzv. checklist základních požadavků (též „GSPR checklist“ z angl. General Safety and Performance Requirements). Ten je ovšem orientován pouze na jednotlivé požadavky MDR a nepostihuje požadavky ve struktuře (detailu) odpovídajícím potřebám této práce.

## 4.2 Hodnocení publikované literatury dle MDR v předklinické oblasti

Dostatek údajů z publikované literatury o prostředku nebo prostředcích podobných může dle MDR odůvodnit neprovedení nového testování prostředku.

Řešená tematika byla různorodá, bylo vhodné provést hledání strukturovaně ve více dílčích rešerších. Jako metoda byla zvolena rešerše tradiční, která uspokojivě naplňuje sledované cíle a také poskytla autorovi určitou volnost k využití vlastních myšlenek o daném tématu (Fink, 2019) v rámci cíle disertační práce. To v zásadě odpovídalo i duchu citovaného pokynu (srov. MEDDEV 2.7/1 rev.4). Postup jednotlivých kroků byl následující:

- stanovení cíle dílčí rešerše,
- identifikace klíčových slov,
- vyhledávání v relevantních zdrojích,
- vyhodnocení (analýza) výsledků,
- formulace závěru.

Cíle jednotlivých dílčích rešerší vždy odpovídaly celkovému cíli práce, s tematickým vymezením na řešený prvek. Obecně byl cíl vymezen tak, aby provedený průzkum poskytoval objektivní a přiměřeně úplné<sup>25</sup> informace o předklinické bezpečnosti prostředku.

Klíčová slova byla volena s ohledem na maximální výstižnost ve vztahu k prostředku jako celku a jeho určenému účelu použití, nebo k řešené dílčí součásti, použitému materiálu apod. Z hlediska strategie bylo využíváno postupné zpřesňování vyhledávacích výrazů. Průběžně byly odstraňovány duplicity.

Pro nalezení zdravotnických prostředků, resp. výrobků na trhu, aby mohl být jejich obchodní název využit následně jako klíčové slovo, bylo využito předřazené kolo vyhledávání v obecném vyhledávači (Google). Pro zjištění určeného účelu prostředků na trhu v ČR byl využit Registr zdravotnických prostředků (RZPRO).<sup>26</sup>

---

<sup>25</sup> V případě kvalitní argumentace lze dle názoru autora aplikovat metodiku odpovídající vzorkování. Tedy pokud se již nejví jako reálné vyhledávací frázi dále zpřesnit, a přesto je počet nalezených záznamů značný, resp. vysoký z hlediska nároků na zpracování, je vyhodnocen reprezentativní vzorek nalezených zdrojů. Pokud v reprezentativním vzorku jsou nalezeny přesvědčivé údaje a nejsou nalezeny výsledky s protichůdnými závěry, může být závěr formulován na základě analýzy vzorku. Jako vhodná součást argumentace tohoto postupu se přitom jeví zejména prokázání reprezentativnosti vzorku, tedy jeho celkové velikosti (podíl na celkovém souboru) a postupu výběru (náhodný výběr nebo argumentace relevance a významnosti apod.).

<sup>26</sup> <https://eregpublicsecure.ksrzis.cz/Registr/RZPRO/ZdravotnickyyProstredek>

Jako primární relevantní zdroje vyhledávání byly využívány obecně akceptované rejstříky vědecké literatury (PubMed/MEDLINE, Web of Science, Google Scholar, Scopus). Vyšší priorita přitom byla dána těm nalezeným literárním zdrojům, které byly publikovány v tematicky blíže zaměřených odborných zdrojích (IWJ, Nanomaterials apod.).

Hlediskem pro hodnocení významnosti byla, v souladu s teoretickými závěry, signifikance případně rezultujícího rizika, v kontextu hodnocení předklinické literatury spojená s případným neprovedením nových testování. V případě protichůdných závěrů srovnatelně relevantních nalezených literárních zdrojů byla jako pomocný parametr významnosti stanovena preference zdrojů uvádějících novější výsledky testování.

V případě pozitivního hodnocení relevance a významnosti zdroje byly dále přezkoumány jím odkazované další zdroje (reference), relevantní pro předmět rešerše.

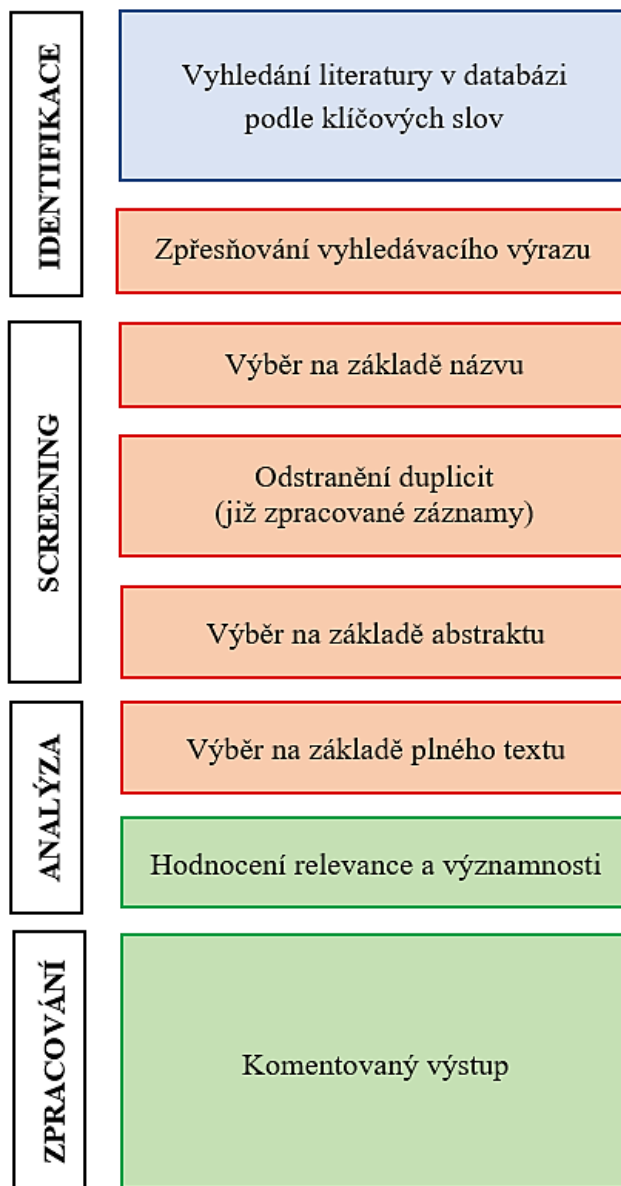
Na základě provedené interpretace zjištění z relevantních a významných zdrojů byly vytvořené výsledky průběžně spojovány do skupin se se stejným dopadem, přičemž byla informativně zaznamenávána četnost výskytu (váha).

Mezi komentované výstupy v rámci vlastní práce byly zařazeny ty, které byly hodnoceny jako nejvíce relevantní a významné, případně dokumentovaly potřebu zpřesnění vyhledávacího výrazu.

Uvedený postup je schematicky vyjádřen na obrázku 12.

Formulace závěru pak vždy probíhala jako objektivní shrnutí vyhodnocených údajů.

Při rešerši byla zaznamenána řada publikací, které se dané problematice věnují, ale různé charakteristiky prostředků, resp. technických řešení k dosažení požadované účinnosti (fyzikálně-chemické, nosné částice, principy uvolňování účinné látky apod.) neumožňují argumentaci ekvivalence na úrovni, která by umožnila náhradu testování, a nejsou tedy komentovány nebo jen souhrnně.



Obrázek 12: Postup hodnocení publikované literatury pro předklinické hodnocení



## Funkcionalizační zařízení

Při hledání literárních dat relevantních pro funkcionalizační zařízení podle jeho účelu, bylo cílem rešerše nalezení existujících, blízce podobných zařízení, resp. zdravotnických prostředků připravených obdobným zařízením.

Vyhledávání vedlo opakovaně k nalezení relevantní publikace anebo chráněných technických řešení<sup>27</sup>, což do určité míry svědčí o jeho vhodném nastavení. I přes postupné zpřesňování vyhledávacího výrazu však byly vyhledány zejména nerelevantní práce zaměřené na obecné přínosy personalizované péče o ránu, bez prakticky využitelných poznatků z hlediska předklinického hodnocení návrhu funkcionalizačního zařízení, které tedy nemohly být v rešerši využity.

Dále byly nalezeny práce, které řeší vytvoření funkcionalizovaného krytu rány s využitím konkrétního zařízení, ovšem *in situ* na těle pacienta, včetně využití nanovláken. (Chouhan, a další, 2019) Mechanismus aplikace je v tomto případě zcela odlišný. Tento přístup je relevantní spíše pro vytváření tkáňových náhrad, z regulatorního hlediska také zahrnuje řadu rizik a pro vytváření funkcionalizovaných krytů ran se nejeví jako provozně ani ekonomicky efektivní.

Vyhledáváním bylo dále nalezeno relativně vyšší množství výsledků o zařízeních, zaměřených na 3D tisk krytů ran, ovšem opět s převažujícím využitím pro účely tkáňových náhrad (scaffoldů), byť s integrovanými drug delivery systémy. (Tabriz, a další, 2022) (Mathew, a další, 2020) (Muwaffak, a další, 2017). Metody aditivní výroby jsou progresivní a slibné, nicméně data nebyla využitelná v rámci stanovených technických východisek. Touto metodou není možné, dle analyzovaných pramenů, vytvářet struktury nosičů s odpovídajícími parametry ve smyslu krytí rány (bariérová funkce). Postupy předklinického hodnocení a srovnání regulatorní strategie jsou nicméně relevantní.

Technické řešení funkcionalizačního zařízení, které by se orientovalo na obdobný srovnatelný účel nebo vykazovalo shodné zásadní charakteristické prvky jako naše v literatuře, ani následně na trhu, identifikováno nebylo. Unikátnost řešené koncepce ostatně dokumentuje i fakt, že na principy anebo součásti našeho technického řešení bylo uděleno několik patentů, jejichž je autor práce spoluautorem.

Pro účely předklinického hodnocení nebyla v rámci hodnocení publikované literatury ve vztahu k celkové koncepci funkcionalizačního zařízení identifikována relevantní data, přesahující stanovený práh významnosti.

V případě zaměření práce na vlastní design funkcionalizačního zařízení by bylo na základě výsledků rešerše vhodné navázat odpovídající analýzou ve vztahu k jednotlivým součástem. Ta by měla prokázat, že daná součást (funkční subsystém), resp. komponenta, je vhodná pro zamýšlený účel a plní stanovené dílčí požadavky. Z hlediska cíle této práce, kterým je ověření řešené koncepce, resp. návrhu

---

<sup>27</sup> Bratřka, Petr. et al. 2022; I, II, III, IV

funkcionalizačního zařízení, by však analýza tohoto typu poskytla jen omezeně využitelné poznatky, a proto se jí práce nevěnovala.

### **Kryt rány s doplňkovým účinkem odpovídajících charakteristik**

Kryty ran s doplňkovým účinkem jsou na trhu k dispozici a v literatuře řešeny hojně, úsilí bylo zaměřeno selektivně na kryty ran s antibakteriálním účinkem, sekundárně, na doplňkový účinek antioxidační v rámci určeného účelu použití.

Zdravotnický prostředek, který by explicitně deklaroval hledaný, kombinovaný doplňkový účinek na trhu nalezen nebyl. Je však otázkou, nakolik je výrobci, pravděpodobně přinejmenším z části z marketingových důvodů (srozumitelnost pro pacienta), deklarován explicitně, a zda není převážně vyjádřen různými jinými formami jako „příspěvek k hojení“.

Příkladem může být na trhu v ČR dostupný zdravotnický prostředek „Actilite“ (výrobce Advancis Medical, Spojené království) s určeným účelem použití“ *„Krytí z neadherentní viskózy. Používá se na všechny typy poranění včetně povrchových poranění, částečně nebo zcela otevřených ran, zahrnující odřeniny, řezné rány, proleženiny, bércové vředy, popáleniny, odběrové plochy a operační rány.“* Návod k použití tohoto ZP (datum revize 03/2015) dále uvádí charakteristiku: *„Účinné širokospektrální antimikrobiální krytí obsahující 99% Manuka medu a 1% Manuka oleje, určené pro slabě nebo středně exsudující rány. Krytí je určeno k ochraně rány před infekcí, podporuje hojení a umožňuje průchod exsudátu. Vhodný na epitelizující rány, které jsou vysoce náchylné k infekci.“* Použité účinné látky mají prokázány nejen antimikrobiální, ale také antioxidační účinek. (Alvarez-Suarez, a další, 2014) (Henriques, a další, 2006)

Na v zásadě shodný určený účel použití s hledaným jsou zaměřeny bioadhezivní nanostrukturované lipidové nosiče pro koenkapsulaci sloučenin s antioxidační ( $\alpha$ -tokoferol a kvercetin) a antimikrobiální (tea tree oil) aktivitou pro léčbu ran. Používaný drug delivery systém je ovšem odlišný, založený na bambuckém másle a arganovém oleji s modifikací alginátem sodným nebo chitosanem pro bioadhezivní vlastnosti. (Costa-Fernandez, a další, 2021) Data tedy nejsou přímo využitelná namísto vlastního testování, lze je však uplatnit v obecné argumentaci bezpečnosti krytu rány a použití  $\alpha$ -tokoferolu jako účinné látky.

Řada dalších nalezených pramenů popisuje kryty ran s doplňkovým účinkem, včetně těch využívajících nanovlákná a drug delivery systémy na bázi lipidů (zejména liposomální), které však z důvodu dílčích odlišností nebylo možné využít. (Mašek, a další, 2017) (Monteiro, a další, 2015) (Micková, a další, 2012)

### **Personalizovaný kryt rány**

Otázka produkce krytu rány variabilních parametrů je zásadní v rámci řešeného tématu. V literatuře jsou publikace, které řeší možnost využití přenosných zařízení pro produkci nanovláken

obsahujících účinnou látku. (Chouhan, a další, 2019) (Yan, a další, 2019) Firma Nanomedic Technologies Ltd., dříve Nicast, (Izrael) již uvedla na trh přístroj SpinCare, který má sloužit pro výrobu personalizovaných nanovlákných krytů ran s možností obsahu aktivní složky v nanovlákněch (Nanomedic Technologies Ltd.). Ta je v případě přístroje SpinCare obsažena přímo ve hmotě nanovláken (Liu, et al., 2018). Uvolňování aktivní látky je potom řízeno difuzí z hmoty vláken, která je silně závislá na rozpustnosti látky ve vodném prostředí a zároveň obsahu vlhkosti v ráně. (Leung, a další, 2011) Zařízení není uváděno na trh jako zdravotnický prostředek, kvalifikace výrobku a jím připravovaných krytí není z dostupných materiálů zřejmá. To je nutné konstatovat také v otázce dosažení deklarované personalizace. Výrobce pouze uvádí, že pro generování krytu zařízením je dodávána předplněná, sterilní, jednorázová ampule pro jednoho pacienta na jedno použití.

Tento produkt a obecně technologie produkce nanovláken *in situ* se od řešeného konceptu zásadně liší ve více ohledech. Nanovlákný nosič v řešené technologii slouží nikoli jen jako nosič aktivní látky, ale jako nosná struktura a polopropustná ochranná (s bariérovou funkcí proti bakteriální kontaminaci) membrána chránící ránu, což umožňuje jeho kvalifikaci jako zdravotnického prostředku. Nositelem aktivní látky/léčiva jsou v našem případě SLP deponované na nosiči. Zjištěné údaje tedy z pohledu cíle řešerše, pro náhradu dílčích testování, použitelná nejsou. Lze je však využít pro argumentaci bezpečnosti variabilního provedení krytu, jelikož se zdá být kvalifikován podle určeného účelu užití jako prostředek.

## Nosič

Z pohledu biokompatibility bylo zásadní provést rešerši ve vztahu k použitým materiálům, na nichž se v zásadním poměru podílí nosič, tedy nanovlákná struktura z PCL (polykaprolakton), vyráběná s použitím různých rozpouštědel.

Polymery ve formě nanovláken, včetně PCL, byly řadou autorů, včetně autora této práce, studovány z hlediska biokompatibility s dobrými výsledky. (Braška, 2020) (Mwiiri, a další, 2020)

Polykaprolakton (PCL) je biologicky odbouratelný polyester široce používaný v biomedicínských aplikacích. Nanovlákná připravená z PCL vykazují biodegradaci v závislosti na molekulové hmotnosti (Goldberg, 1995), která je tedy jeho podstatnou fyzikálně-chemickou charakteristikou. Polymery používané pro zvláknění v rámci řešených receptur v uvažovaných časech expozice do rány vykazovaly nesignifikantní degradaci a byly tedy v rámci aplikace považovány za nedegradovatelné<sup>28</sup>, což bylo ověřeno ze strany výrobců i řadou dřívějších testů. Nadto byly nalezeny studie indikující, že produkty krátkodobé degradace PCL jsou netoxické a biokompatibilní v rámci testování na kmenových buňkách a také hemokompatibilní (Sukanya, 2017) (Sukanya, a další, 2018), což případná rizika významně snižuje.

---

<sup>28</sup> v rámci biologického hodnocení tedy nejsou řešeny potenciální degradační produkty

Publikovaná data dále uvádí, že nanovlákná z PCL již byla s úspěchem testována pro použití jako kryt ran, například v rámci *in vivo* studie na králících. Testovaný substrát vedl k optimálnímu hojení indukovaných ran při použití jako integrativního krytí rány s delšími intervaly převazu. (Buzgo, a další, 2019) Literatura také ukazuje, že nanovlákná z PCL podporují adhezi a proliferaci keratinocytů, melanocytů a fibroblastů. (Vocetková, a další, 2016) V zásadě tentýž autorský kolektiv později doplnil, že buněčný růst je ovlivněn složením média, FBS nebo obsahem lyzátu krevních destiček (Sovková, a další, 2018). Růst kožních buněk byl dále ovlivněn morfologií (nano/mikrotopografií) vláken. Keratinocyty rostly lépe na nanostrukturovaném PCL, zatímco fibroblasty rostly dobře jak na 2D nanovlákněch, tak na 3D mikrovlákněch. (Vocetková, a další, 2017) Přestože dopad uvedených zjištění je spíše v oblasti využití v tkáňovém inženýrství, svědčil o důležitosti nejen chemické, ale také fyzikální charakterizace (morfologie) nosiče, zejména v případě nanovláknenného substrátu.

Recentní literatura se věnuje prokázání nízké cytotoxicity nanovláken PCL, resp. poly- $\epsilon$ -kaprolaktonu, zejména ve spojení s různými kopolymery nebo jako součásti kompozitních nanovláknenných substrátů. (Shitole, a další, 2020) (Arbade, a další, 2018) (Baranowska-Korczyk, a další, 2016) Tyto výsledky jsou použitelné zejména z pohledu chemické charakterizace, jelikož v případě prokázané biokompatibility kompozitu, je relevantní argumentovat i biokompatibilitu složek (pokud nejde o specifické případy interakce). V případě kopolymerů lze výsledky použít jen omezeně, jelikož vlastnosti výsledného materiálu mohou variovat významně.

U všech rozpouštědel použitých pro přípravu zvláknovacího roztoku (aceton, chloroform, etanol, kyselina octová) je známa cytotoxicita i při relativně malých koncentracích. Proto je nutné rezidua těchto látek důsledně eliminovat a související rizika efektivně řídit.

Lze tedy uzavřít, že za podmínek dodržení správné výrobní praxe, často označované jako GMP (z angl. good manufacturing practice), je předpoklad nízké, případně negativní, cytotoxicity nosiče z PCL nanovláken. Jelikož však nelze konstatovat zcela jednoznačně identitu testovaných vzorků (PCL prochází výrobním procesem zvláknování), je kontrolní ověření cytotoxicity na místě.

Z hlediska ostatních řešených koncových bodů lze příspěvek literatury, která byla již většinou citována výše, shrnout tak, že iritační nebo senzibilizující potenciál nebyl pozorován. Tyto koncové body jsou však komplexnější, testy nejsou nákladné a testování prostředku jako celku lze doporučit v končené fázi návrhu a vývoje, tj. po finální stabilizaci návrhu.

## **Drug delivery systém**

Z pohledu biokompatibility jsou dalšími zásadními použitými materiály myristilalkohol (1-tetradekanol, CAS 112-72-1), který je základní složkou použitých SLP, a Tween 20 (polysorbát 20), použitý při jejich syntéze jako surfaktant.

Mastné alkoholy, včetně MA, jsou nerozpustné, povrchově aktivní látky běžně používané v topických přípravcích jako koemulgátory. Řada z nich, včetně MA, je akceptována v rámci FDA i pro

orální podání, nicméně nelze je označit za běžné složky formulací na lipidické bázi. (Maher, a další, 2023) MA je považován za netoxický v povolených koncentracích. (Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, 1988)

Myristilalkohol je v literatuře považován za biokompatibilní materiál specificky v rámci aplikací při vytváření drug delivery systémů (Salimi, a další, 2023) (Gad, a další, 2022) (Brezaniová, a další, 2016).

Je také biodegradabilní, ovšem v čase přesahujícím uvažovanou aplikaci (je udávána střední doba 5,5 dne). Z provedených *in vivo* studií bylo hlášeno, že nezpůsobuje podráždění kůže. (National Center for Biotechnology Information, 2004)

U tridekanolu a tetradekanolu bylo pozorováno opožděné podráždění vzhledem k jejich lipofilnímu charakteru, rychlá difúze do *stratum corneum*, ale pomalejší difúze do vodné epidermis. (Kanikkannan, a další, 2002)

Na základě nalezených výsledků se nejevila tato složka jako významně riziková.

Polysorbát 20 je díky své stabilitě a relativní netoxicitě (Di Marzio, a další, 2013) (Moore, a další, 1984) využíván jako detergent a emulgátoru v řadě aplikací, včetně farmakologických.

Na základě animálních studií, během kterých nevyvolal systémovou ani lokální toxicitu, byl také indikován za bezpečnou látku pro intramuskulární podání (Kim, a další, 2021).

Také tato složka, vyskytující se navíc při aplikaci v prostředí v zásadě ve stopovém množství, se na základě nalezených výsledků nejevila jako významně riziková.

Závěr je, obdobně jako v případě nosiče, že za podmínek dodržení správné výrobní praxe je předpoklad nízké cytotoxicity drug delivery systému, resp. SLP na bázi myristilalkoholu a Tween 20. Jelikož však nelze konstatovat zcela jednoznačně identitu testovaných vzorků (různí výrobci, syntéza SLP), je kontrolní ověření cytotoxicity na místě. Testování ostatních řešených koncových bodů pro prostředek jako celek lze na základě hodnocení literatury doporučit v končené fázi návrhu a vývoje, tj. po finální stabilizaci návrhu.

## Účinné látky

Obě použité účinné látky, gentamycin (gentamycin-sulfát) a tokoferol ( $\alpha$ -tokoferol) jsou zahrnuté v lékopise a podmínky jejich bezpečného použití jsou tedy známy. Vzhledem ke specifické aplikaci, mj. založené na pozvolném uvolnění a společném použití, je však třeba průzkum provést.

Široká účinnost gentamycinu a jeho bezpečná topická aplikace je popsána v řadě studií. (Cooley, a další, 2023) (Wang, a další, 2021). Hodnota MIC je z literatury známa, jsou dobře dokumentovány také farmakodynamické aspekty antibakteriální účinnosti specificky proti *S. Aureus* a *P. Aeruginosa*. (Schafer, a další, 2006) (Tam, a další, 2006) Lze také nalézt hodnoty MBIC/MBEC. (Kotulová, a další,

2010) Riziko tedy spočívalo v případném nedosažení minimální účinné dávky nebo v překročení dávky pro níž je indikován potenciál nežádoucích účinků, to ovšem již bylo známo a riziko tedy řízeno.

Byl také dokumentován účinek gentamycinu pro podporu životaschopnosti buněk *in vitro* za specifických podmínek (Abdul Khodir, a další, 2018) (Kimna, a další, 2019). Oproti popsaným studiím vykazovala ovšem řešená metodika rozdíly a data tedy byla použitelná omezeně, pro obecnou argumentaci.

Antioxidační účinnost, resp. kapacita  $\alpha$ -tokoferolu je v literatuře popsána (Fryer, 1992). Také pozitivní účinky enkapsulovaného  $\alpha$ -tokoferolu v lipidických strukturách pro podporu hojení kožních ran byly v literatuře dokumentovány. (Caddeo, a další, 2018) Samostatně sestavené ferrocenové nano kapsle, naplněné  $\alpha$ -tokoferolem, prokázaly vylučování ROS na fibroblastech 3T3 a dokonce i hojivé vlastnosti, které byly testovány pomocí scratch essay. (Na, a další, 2021)

Dokumentován je také inhibiční účinek  $\alpha$ -tokoferylacétátu na tvorbu biofilmu *in vitro* za použití různých bakteriálních kmenů, např. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis* a *P. putida*. (Vergalito, a další, 2019) Uvedeným experimentem byla také zjištěna snížená tvorba biofilmu *S. aureus* a *S. epidermidis* na močových katétrech modifikovaných vitamínem E.

Bylo ovšem nalezeno také více publikací, které dokumentovaly alergické reakce spojené s topickou aplikací  $\alpha$ -tokoferolu. (Teo, a další, 2021) (Adams, a další, 2010) (de Groot, a další, 1991)

Z hodnocení publikované literatury tedy vzešla řada pozitivních i negativních poznatků, využitelných jak pro posouzení bezpečnosti, tak účinnosti účinných látek v řešené aplikaci. Vzhledem k ne zcela důsledné identifikaci forem vitamínu E v publikacích bylo testování vyhodnoceno jako v zásadě nezbytné.

Společná aplikace obou účinných látek je v literatuře také řešena, aniž byl pozorován antagonistický nebo jiný nežádoucí účinek. (Andrade, a další, 2014) Enkapsulace gentamycinu do lipidických nanočástic formulovaných pomocí  $\alpha$ -tokoferolu vedla také ke snížení jeho nefrotoxicity v jiném *in vivo* experimentu. (Elfaky, a další, 2019)

V případě požitých účinných látek, samostatně i v kombinaci, byla potvrzena známá rizika, zásadní nová nebyla identifikována. Testování cytotoxicity a antibakteriální účinnosti prostředku jako celku se na základě hodnocení literatury jeví jako potřebné, ostatní koncové body postačí ověřit až ve fázích následujících.

### 4.3 Plán a provedení experimentu

Při plánování předklinického experimentu byla vzata v úvahu popsaná východiska, využity odpovídající postupy a zohledněna všechna podstatná zjištění z hodnocení publikované literatury i předchozích experimentálních dat výrobců (viz příloha č. 1).

Respektovat bylo třeba také požadavky ekonomické, tedy potřebu provést testování nákladově efektivně. Bylo zřejmé, že pokud by bylo testování prováděno pro všechny kombinace vstupních parametrů, bylo by neúnosně časově i finančně nákladné a v řadě variant by nepřineslo užitečné výsledky. Plánem tedy bylo stanovit preferované varianty v rámci úplného vstupního souboru variant nosiče a funkcionalizačních formulací. Vzorek nebo skupina vzorků, které v daném dílčím experimentu vykázaly nejlepší výsledky, mohly být nadále určeny v rámci testovaného souboru jako preferovaná varianta. Tato varianta, případně varianty, měly být do následného dílčího testování zařazeny jako první a pokud vyhověly, v testování dalších variant se nemuselo pokračovat.

Cílem bylo také využít nejen údaje z publikované literatury, ale také dostupné údaje z předchozích dílčích testování v rámci výzkumu a vývoje zapojených výrobců. Tato data ovšem bylo třeba v nezbytně nutném rozsahu ověřit. Pokud ovšem výchozím experimentálním výsledkům data z předchozích testování odpovídala, byla hodnocena jako validní a zohledněna v dalším postupu.

Zcela zásadním požadavkem z hlediska validity výsledků pro regulační účely bylo použití zvolené konfigurace funkcionalizačního zařízení, která musela odpovídat budoucímu uvažovanému produkčnímu provedení.

Plán dílčích testování a jejich provedení byly popsány v následujících částech této podkapitoly.

### Výběr a příprava vzorků, použitá zařízení

V rámci stanovených východisek byly k dispozici tři postupy přípravy materiálu pro výrobu **nosiče**, resp. nanovlákněného substrátu vyráběného z PCL metodou elektrostatického zvlákňování. Tyto postupy se lišily použitým rozpouštědlem. Do testování byly v první fázi zařazeny všechny varianty (viz tabulka 3), jelikož hodnocení literárních dat žádnou ze zájmových variant výrobců nevyloučilo.

Nosič	Polymer	Rozpouštědlo	Plošná hmotnost
PCL_AC	PCL	aceton	18 g/m <sup>2</sup>
PCL_CHE	PCL	chloroform + ethanol	18 g/m <sup>2</sup>
PCL_AA	PCL	kyselina octová	18 g/m <sup>2</sup>

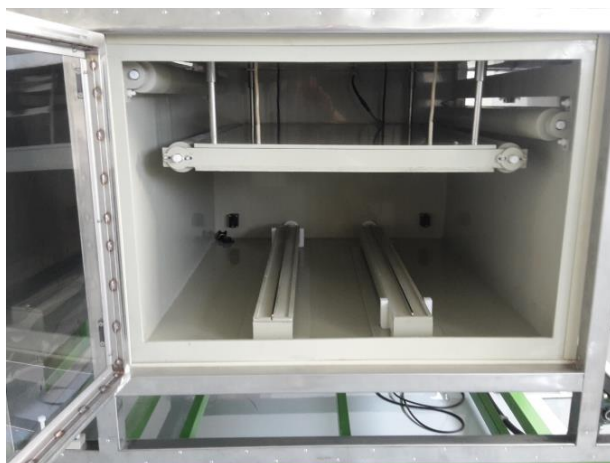
Tabulka 3: Varianty nosiče zahrnuté do testování.

Pro přípravu zvlákňovacích roztoků byl použit PCL výrobce Sigma Aldrich (Saint Luis, MO, USA) o molekulové hmotnosti  $M_w = 45\ 000$ .

Jako rozpouštědlo byly pro jednotlivé varianty (šarže) vzorků využívány aceton dodávaný P-lab výrobce Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Německo), chloroform výrobce VWR Chemicals (Leuven, Belgie), etanol o čistotě 96 % výrobce P-lab (Praha, Česká republika) a kyselina octová o čistotě 99 % výrobce Penta Chemicals (Praha, Česká republika). Pro přípravu, resp. homogenizaci, zvlákňovacích roztoků byla využívána běžná laboratorní magnetická míchadla s ohřevem.

K proplachování vyrobených nanovlákných substrátů byl v souladu s interní metodikou použit absolutní etanol výrobce Penta Chemicals.

Nanovláknenné substráty byly připravovány elektrostatickým zvlákňováním pomocí dvou strojů s bezjehlovými, plošnými elektrodami v kontinuálním výrobním procesu, na kterých byly jednotlivé postupy výroby interně validovány. První stroj vlastní konstrukce Grade Medical, používal 2 spřažené elektrody a dávkování polymeru pomocí peristaltických čerpadel (viz obrázek 13).



Obrázek 13: Detail zvlákňovací komory zařízení GradeTechLine, verze 1.1  
Zdroj: Autor

Druhý stroj, výrobce InoCure (Praha, Česká republika), měl 4 elektrody řazené v sérii ve dvou modulech s možností individuálního nastavení a tlakový systém dávkování polymeru využívající argon<sup>29</sup> (viz obrázek 14).



Obrázek 14: Detail jedné zvlákňovací komory zařízení InoCure  
Zdroj: Autor

---

<sup>29</sup> brání odpařování rozpouštědla z roztoku polymeru během zpracování, mj. tedy prodlužuje dobu použitelnosti zvlákňovacího roztoku a zlepšuje opakovatelnost procesu



Zvlákňovací roztok pro substrát PCL\_AC byl připraven z 13% roztoku PCL v acetonu mícháním přes noc při laboratorní teplotě. Elektrostatické zvlákňování na prvním stroji bylo realizováno s využitím obou elektrod. Parametry pro výrobu nanovláken byly napětí -60 kV a +40 kV, rychlost dávkování 70/38 %, vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem 24 cm a rychlost nosné textilie 2,4 cm/min.

Substrát PCL\_CHE byl připraven ze zvlákňovacího roztoku 7 % PCL v chloroformu a etanolu (3:1) mícháním přes noc v uzavřené láhvi při teplotě 40 °C. K elektrostatickému zvlákňování byl použit také první stroj a obě elektrody s nastavením napětí -65 kV a +45 kV, rychlost proudění 5/5 %, vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem 24 cm a rychlost nosné textilie 1 cm/min.

Substrát PCL\_AA byl připraven rozpuštěním 21 % PCL v kyselině octové mícháním přes noc. K elektrostatickému zvlákňování byl použit druhý z popsaných strojů, na kterém byla receptura validována. Roztok byl dávkován s využitím tlakového dávkovacího systému na všechny 4 elektrody se shodným nastavením napětí +60 kV a -60 kV, vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem 23 cm, nosná textilie se pohybovala rychlostí 1 mm/min. Vlákna byla nanášena postupně ve 3 vrstvách, podle interní metodiky výrobce.

Jako **funkcionalizační formulace**, resp. drug delivery systém, byly použity zájmové účinné látky enkapsulované do SLP, značené dle tabulky 4.

<b>Funkcionalizační formulace</b>	<b>Účinná látka</b>	<b>Lipid (Surfaktant)</b>
SLP_GEN (GEN)	gentamycin	1-tetradekanol (Tween 20)
SLP_VitE (VitE)	tokoferol	1-tetradekanol (Tween 20)
SLP_MA	-	1-tetradekanol (Tween 20)

*Tabulka 4: Varianty SLP zahrnuté do testování.*

SLP pro enkapsulaci účinných látek byly připraveny metodou emulgace w/o podle interních metodik výrobce. Proces přípravy byl odlišný pro SLP\_GEN (SLP s obsahem gentamycinu) a SLP\_VitE (SLP s obsahem  $\alpha$ -tokoferolu).

Pro SLP\_GEN se vodní fáze skládala ze 45 ml destilované vody, 0,225 ml Tween 20 a proměnlivého množství roztoku gentamycinu (50 mg/ml v destilované vodě, viz dále), mícháno při teplotě 70 °C po dobu 15 min. Olejová fáze byla připravena z 5 g 1-tetradekanolu, mícháno při teplotě 70 °C, dokud se veškerý 1-tetradekanol neroztavil. Vodná fáze byla pomalu přidána do olejové fáze za míchání rychlostí 600 otáček za minutu a ponechána při 900 ot./min. po dobu 5 minut, následovalo snížení míchání na 350 ot./min. za stálého zahřívání na pokojovou teplotu. Po ochlazení bylo 10 ml vytvořené suspenze smícháno s 30 ml destilované vody, ponecháno na míchadle po dobu 30 minut při

26 ot./min. (při laboratorním postupu v tomto kroku používána třepačka). Depozice na nosiče probíhala kapáním v dávce 3,54  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

Roztok pro přípravu SLP\_VitE byl připravován z vodné fáze tvořené 45 ml destilované vody a 0,225 ml Tween 20, mícháno po dobu 15 minut při teplotě 70 °C. Olejová fáze se skládala z 5 g 1-tetradekanolu, 0,3 g tokoferolu a 5 ml ethanolu pro snížení teploty tání a pro udržení olejové fáze v kapalném stavu během procesu depozice. Připravená lipidová fáze byla pomalu přikapána do vodné fáze za míchání rychlostí 600 ot./min. a ponechána při rychlosti míchání 900 ot./min. po dobu 5 minut. Zahřívání bylo zastaveno a rychlost míchání byla snížena na 350 ot./min. Po ochlazení suspenze na laboratorní teplotu bylo 10 ml suspenze mícháno s 30 ml destilované vody po dobu 30 minut. Suspenze lipidových částic byla nadávkována na nanovlákný substrát v množství 3,54  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

SLP byly připraveny z 1-tetradekanolu (CAS 112-72-1) výrobce Sigma Aldrich (Steinheim, Německo), destilované vody, Tween 20 třídy pro molekulární biologii výrobce WVR Chemicals (Solon, OH, USA) a absolutního ethanolu výrobce Penta Chemicals (Praha, Česká republika). Jako účinné látky byl použit gentamycin sulfát (CAS 1405-41-0) výrobce BioChemica (Darmstadt, Německo) v roztoku destilované vody a  $\alpha$ -tokoferol z rostlinného oleje, typ V (CAS 59-02-9), výrobce Sigma Aldrich (Saint Luis, MO, USA).

Specificky pro úvodní testování robustnosti metody byly pro účely fyzikálně-chemických charakterizací připravovány také SLP s použitím objemu rozpouštědla až  $\pm 10\%$ . Obdobně byly variovány i další vybrané parametry, uvedené v recepturách.

S ohledem na požadavky personalizace i věcné ověření limitních hodnot byly pro testování (antibakteriální účinnosti) používány různé **varianty krytu**, lišící se celkovým **obsahem antibakteriální účinné látky (GEN)**, značené dle tabulky 5.

<b>Funkcionalizační formulace GEN</b>	<b>Účinná látka</b>	<b>Dávka v suspenzi</b>
GEN_1	gentamycin	1,0 ml
GEN_1.5	gentamycin	1,5 ml
GEN_2	gentamycin	2,0 ml

*Tabulka 5: Varianty SLP dle obsahu GEN v suspenzi.*

Pro přípravu všech šarží vzorků byla využita popsaná verze a konfigurace **funkcionalizačního zařízení**.

Pro **testování antibakteriální účinnosti** byly zvoleny dva bakteriální kmeny a případně biofilm se směsí bakterií těchto kmenů (viz tabulka 6).

Testování	Bakteriální kmen
STAU	<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> )
PSAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )
BAC	směs / biofilm STAU+PSAE

Tabulka 6: Označení testování podle použitých bakteriálních kmenů.

Oba uvedené bakteriální kmeny se v chronických ranách vyskytují často a jejich vliv je hodnocen jako zásadní. (Fazli, a další, 2009) (Serra, a další, 2015) *S. aureus* je bakterie gram pozitivní, *P. aeruginosa* je bakterie gram negativní, jsou tedy zastoupeny obě skupiny.

Pro testování byly použity bakterie dodané ING MEDICAL s.r.o. (původní dodávka z Úseku mikrobiologie a ATB střediska CL FNKV), které nebyly hodnoceny jako multirezistentní, tj. MDR (v tomto kontext z angl. Multidrug Resistant Bacteria).

Případné **další relevantní parametry**, včetně počtu opakování, jsou popsány u jednotlivých navržených testů. Výsledky, včetně grafických, jsou shrnuty v následující kapitole.

### Výchozí charakterizace pro ověření dat z předchozích testování

Přestože se nejednalo o samostatný požadavek, bylo v souladu s teoretickými závěry navrženo úvodní ověření dat z předchozích testování, resp. údajů o návrhu prostředku, a robustnosti dodaných receptur elektrostatického zvlákňování i syntézy SLP pro vyloučení případných chyb vnesených do výsledků vzorky s individuální extrémní odchylkou.

Navržena byla zejména **charakterizace morfologie nosiče**, resp. nanovlákněných substrátů, s využitím SEM. Jejím konkrétním cílem bylo vytvoření exaktnějšího popisu velikosti a struktury vláken a identifikace případných výkyvů kvality ve výrobním procesu, resp. výchozí ověření opakovatelnosti postupů přípravy vyvinutých spolupracujícími výrobci. Morfologie substrátu byla dle zjištění z analýzy literatury identifikována jako podstatná pro biologické vlastnosti a s potenciálem ovlivnit buněčnou proliferaci na jeho povrchu.

Obdobně byla navržena **charakterizace morfologie částic drug delivery systému**, tedy SLP, s využitím SEM. V případě dostupnosti bylo pro kvantifikaci zjištění navrženo doplnění testování metodou měření statického rozptylu světla (SLS), která se pro danou aplikaci jevila jako vhodná. (Cao, 2003) (Schurtenberger, a další, 2018) Cílem bylo analogicky ověření, případně vytvoření exaktnějšího popisu struktury a velikosti částic a identifikace případných výkyvů kvality ve výrobním procesu, resp. výchozí ověření opakovatelnosti.

Naplánované charakterizace byly provedeny s využitím SEM Phenom Pro výrobce Phenom (Eindhoven, Nizozemí) za běžné laboratorní teploty. Analýza SLS byla zajištěna dodavatelsky na přístroji Analysette 22 NeXT Micro výrobce Fritsch (Idar-Oberstein, Německo).

Jako podstatná charakteristiku byla také identifikována **kinetika uvolnění účinné látky** z SLP. Ta byla výrobcí za laboratorních podmínek již dříve opakovaně testována (viz příloha 1), mj. v rámci řešení projektu FV20422, jehož byl autor práce hlavním řešitelem. Byla tedy naplánováno pouze výchozí ověření s ohledem na nejzávažnější riziko, tj. že se účinná látka během aplikace v podstatné míře neuvolní. Naplánována byla analýza výluhu vzorků nosiče s SLP s gentamycinem s využitím analýzy LC-MS, tedy kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, nebo jiné vhodné analytické metody validované pro gentamycin, pro stanovení koncentrace gentamycinu v roztoku.

Testování bylo realizováno dodavatelsky (Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT), s využitím metody HPLC-FLD, tedy kapalinové chromatografie s fluorimetrickým detektorem z důvodu aktuální dostupnosti. Vzorky na nosiči PCL\_CHE s SLP GEN\_1.5 o velikosti 4 cm<sup>2</sup> byly louhovány při teplotě 37 °C v 5 ml fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl) po dobu 24 hodin. Fyziologický roztok simuluje vhodně prostředí rány. (Milne, a další, 2014)

### **Krytí rány**

Pro tento požadavek, dříve široce testovaný oběma výrobcí, nebylo navrženo systematické testování, resp. jeho opakování. Během celého testovacího procesu bylo ovšem stanoveno za cíl průběžně **shromažďovat provozní poznatky** v rozsahu pracovních postupů při přípravě a použití vzorků. Jednalo se zejména o vhodnost fyzikálních parametrů nosičů, resp. krytů, pro manipulaci (mechanická pevnost před/po funkcionalizaci) atp., které jsou pro další vývoj cenné.

Například materiál pro obvazy na rány musí vykazovat dobrou elasticitu, aby pokryl celý povrch rány, a dobrou pevnost v tahu, aby bylo možné s ním manipulovat, specificky jej po aplikaci z rány odstranit. Všechny tyto vlastnosti byly již dříve oběma výrobcí během vývoje jednotlivých prvků (zejména nosičů) testovány, nicméně poznatky získané během předklinického experimentu je mohly vhodně doplnit.

### Bariérová funkce

Specifická morfologie nanovlákněného substrátu, která tuto specifickou charakteristiku nosiče, resp. dílčí účinnosti krytu rány zajišťuje, byla oběma spolupracujícími výrobcí opakovaně studována a testována. Nové testování tedy nebylo plánováno, ledaže by výsledky naplánovaných výchozích charakterizací nosiče poskytly výsledky nekoherentní s dřívějšími experimentálními daty (výrazně odlišná morfologie nosiče oproti očekávání).

### **Fyzikální a chemická charakterizace**

Analýza fyzikálních a chemických informací ve smyslu požadavků norem řady ISO 10993 byla identifikována jako postup relevantní pro hodnocení předklinické bezpečnosti, a tedy stanovena jako

jeden z požadavků hodnocení. Hodnocení publikované literatury se jako náhrada charakterizací nepředpokládá, v dílčích ohledech indikovalo signifikantní rizika.

**Chemická charakterizace** ve smyslu identifikovaného exaktního postupu popsaného příslušnou normou nicméně nebyla v dané fázi výzkumu naplánována. Identita použitých chemických látek byla ve fázi výzkumu známa, výrobní proces byl důsledně kontrolován, výskyt reziduí výrobního procesu jednotlivých složek byl tedy nepravděpodobný; obdobně potenciálních produktů degradace apod. Výběr surovin, resp. konkrétních dodavatelů, pro následnou výrobu ještě neproběhl. Pokud by tedy došlo ke zjištění nežádoucí kontaminace, řešení by spočívalo v zásadě v náhradě vstupní (výrobním procesem u dodavatele kontaminované) suroviny, materiálu komponent použitých při syntéze, zabezpečení proti kontaminaci při procesu apod., nikoliv v úpravě receptury (změna surovin, úprava postupu) jako takové.

Jedná se také o finančně nákladné analýzy, které nebyly v případě ne zcela stabilizovaného návrhu vyhodnoceny jako racionální. Testování chemické charakterizace podle příslušných technických norem tedy nebylo v dané fázi navrženo, jevílo se jako účelné až ve finálních fázích ověřování návrhu.

Obdobně **fyzikální charakterizace** (fyzikálně-chemická charakterizace) podle příslušné normy nebyla v dané fázi výzkumu naplánována, a to ze v zásadě stejných důvodů.

### **Antibakteriální účinnost krytu rány**

Z praktických důvodů bylo testování účinnosti v plánu předřazeno testováním zaměřeným na bezpečnost funkcionalizovaného krytu. Pokud by testovaný prostředek, resp. konkrétní vzorek, nebyl účinný, nemělo smysl ověřovat jeho bezpečnost. Hodnocení publikované literatury z regulatorního, ale ani z odborného, pohledu neposkytlo dostatek dat, které by odůvodnilo neprovedení testování.

Antibakteriální testování bylo navrženo metodami *in vitro*, s následným komplexním vyhodnocením v rámci testování *in vivo*. Navržené ověření citlivosti použitých bakteriálních kmenů na gentamycin bylo již dříve provedeno dodavatelem (viz příloha 1, obr. P1.1).

Pro testování byla navržena metodika využívající **diskový difúzní test** v agarovém médiu, která je pro tento účel nejpoužívanější. Podstatná argumentace výběru bakteriálních kmenů *S. aureus* a *P. aeruginosa* byla již uvedena výše (častý výskyt a významný vliv při hojení ran, zástupce G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> kmenů). Vedle vlastních vzorků nosiče se SLP\_GEN byl jako pozitivní kontrola (C<sup>+</sup>) použit komerčně dostupný zdravotnický prostředek (sterilní antibakteriální krytí na rány StopBac Sterile Kompres se stříbrem) a jako negativní kontrola (C<sup>-</sup>) substrát PCL bez suspenze SLP.

V souladu s návrhem byly při testování bakterie kultivovány v lyzogenním bujónu (LB) při teplotě 37 °C po dobu 18 hodin, dokud nebylo dosaženo koncentrace 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> buněk/ml. 100 µl LB bylo poté přidáno na agarovou plotnu s kruhovými kotoučovými vzorky krytu rány o průměru 0,6 cm. Tyto

destičky byly kultivovány po dobu 20 hodin při 37 °C a poté byla vyhodnocena inhibiční zóna jednotlivých vzorků jako měřítko antibakteriální aktivity.

Pro statistické vyhodnocení byl použit software SigmaStat 3.5 a jednocestný test ANOVA.

### **Antibakteriální účinnost krytu rány proti bakteriálnímu biofilmu**

Z hlediska antibakteriální účinnosti je eradikace biofilmu specifickým účinkem. Hodnocení publikované literatury dostatek dat pro konstatování účinnosti v tomto ohledu neposkytlo, nicméně indikovalo v tomto ohledu potenciál při dosažení MBIC/MBEC. Proto bylo navrženo v dalším kroku testování inhibice bakteriálního biofilmu, a to v dané fázi metodami *in vitro*, s následným komplexním vyhodnocením testování metodami *in vivo*.

Podle návrhu byl 1 ml suspenze planktonních bakterií s koncentrací  $10^8$  KTJ/ml v tryptickém sójovém bujónu umístěn do každé jamky 12jamkové mikrotitrační destičky a kultivován při 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byla suspenze na povrchu odstraněna a na biofilm byl umístěn vzorek o velikosti 1 × 1 cm a 1 ml TSB pro pokračování množení bakterií. Po kultivaci při 37 °C po dobu 24 hodin byly vzorky odebrány a vyhodnoceny inverzní mikroskopií a spektrometrií absorpance  $A_{595nm}$ . Testovány bylo naplánováno v triplicátech.

Pro testovány byly opět vybrány bakteriální kmeny *S. aureus* a *P. aeruginosa*, jak již bylo argumentováno.

Pro vyhodnocení bylo použito skenování inverzním světelným mikroskopem), absorpance byla měřena spektrofotometrem Tecan Infinite 200 M (Tecan, Grodig, Rakousko).

### **Antioxidační účinnost krytu rány**

Obdobně jako *in vitro* testování účinků antibakteriálních se na první pohled jeví jako účelné ověření účinků antioxidačních. V tomto případě však literatura poskytla přesvědčivý obraz o potenciálu účinků, který byl navíc podpořen několika dřívějšími *in vitro* testy prováděnými výrobcem (zejména v rámci řešení projektu FV30086, viz příloha 1). Bylo tedy vyhodnoceno, že nové testování by s největší pravděpodobností nové výsledky nepřineslo a nebylo tedy naplánováno. Antioxidační účinnost krytu byla tedy testována komplexně v rámci *in vivo* experimentu, jež je popsán dále.

### **Testování cytotoxicity**

Testování cytotoxicity bylo identifikováno jako významný koncový bod hodnocení biokompatibility, a tedy stanoveno jako jeden z řešených požadavků. Hodnocení publikované literatury pro jednotlivé zastoupené materiály, resp. chemické látky, neodůvodnilo neprovedení testování a v dílčích ohledech indikovalo signifikantní rizika.

Testování cytotoxicity bylo navrženo v první fázi metodami *in vitro*, které dle literatury i normativní praxe poskytují plně relevantní výsledky. Navržena byla esej MTS, která je alternativou

k MTT a formazan vytvořený z MTS je rozpustný ve vodě a méně toxický. (O'Toole, a další, 2003) Pro testování byl navržen postup **loužení na fibroblastech 3T3**, která se jevila jako specificky vhodná vzhledem k použité účinné látce (gentamycin sulfát). (Kautzky, a další, 1996)

Podle návrhu byly vzorky o průměru 6 mm vloženy do 220  $\mu$ l DMEM média s vysokým obsahem glukózy, D6429, výrobce Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), s 10% FBS. Vzorky byly inkubovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru s 10 % CO<sub>2</sub>. Po 2 dnech bylo médium ze vzorků použito pro experiment. Fibroblasty  $4 \times 10^3$  3T3 v 20  $\mu$ l DMEM médiu s 10% FBS byly vloženy do 96-jamkové destičky. Následně bylo do každé jamky přidáno 200  $\mu$ l extraktu. Pro každý vzorek bylo použito šest paralelních jamek. Po 24 h (D1), 48 h (D2), 72 h (D3), poté 6 dnech byla metabolická aktivita testována MTS esejí. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l média a 20  $\mu$ l roztoku MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promeg corp., Madison, WI, USA) a inkubováno po dobu 2 hodin.

Absorbance byla poté měřena při vlnové délce 490 nm a referenční vlnové délce 690 nm pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro.

### **Testování senzibilizace a kožní dráždivosti**

Testování senzibilizace stejně jako kožní dráždivosti bylo identifikováno jako významný koncový bod hodnocení biokompatibility, a tedy stanoveno jako jeden z požadavků hodnocení. Hodnocení publikované literatury neodůvodnilo neprovedení testování a v dílčích ohledech, zejména pro jednu z účinných látek, indikovalo signifikantní rizika.

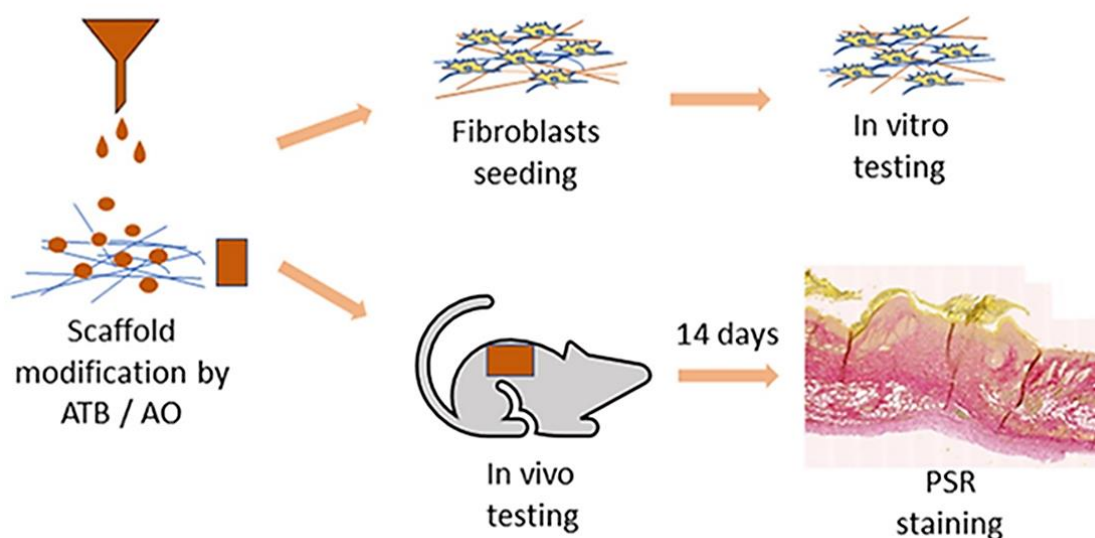
Nicméně tato testování nebyla vyhodnocena v dané fázi návrhu, který nebyl zcela stabilizován, jako účelná, a tedy nebyla naplánována.

### **Komplexní experiment *in vivo***

Pro řadu řešených aspektů bezpečnosti a účinnosti poskytly výsledky hodnocení publikované literatury, dřívější nebo v rámci experimentu provedená *in vitro* testování. Pro komplexnější ověření předklinické bezpečnosti a zejména prokázání předklinické účinnosti bylo však třeba přikročit k testům *in vivo*.

Pro testování byla navržena v souladu s teoretickými závěry metodika využívající **myší model**. Pro alespoň omezenou simulaci nehojící se rány bylo navrženo u všech defektů použití silikonového kroužku, který by měl zpomalit uzavírání defektů. (Fang, a další, 2008) K navození bakteriální infekce byly zvoleny opět bakterie *S. aureus* a *P. aeruginosa*.

Koncepci *in vivo* experimentu ve vazbě na provedená *in vitro* testování shrnuje obrázek 15.



Obrázek 15: Koncepce testování funkcionalizovaného krytu rány *in vitro* a *in vivo* (Brašková, a další, 2022)

Fyzická realizace *in vivo* experimentu byla zajištěna dodavatelsky (ÚEM). Podle výchozího návrhu byl kvalifikovanou osobou vypracován plán pokusů a provedení experimentu bylo před jeho realizací schváleno v souladu s legislativou platnou v ČR na ochranu zvířat (povolení č. 71/2020). To byl mj. určitý důkaz dobré argumentace účelnosti *in vivo* testování.

Následně bylo postupováno podle tohoto schváleného plánu pokusů. Padesát samic myši BALB/c ve věku 4–5 měsíců bylo zakoupeno od schváleného licencovaného zařízení (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Německo) a byly umístěny ve standardních klecích po dobu přibližně 3 týdnů před vstupem do experimentu. Zvířata byla krmena *ad libitum* standardní stravou. Operace kůže byla provedena v celkové anestezii isofluranem. Na hřbetech myši byl použit děrovač kůže o průměru 8 mm k přípravě defektu v plné tloušťce. Nad defektem byl přišit kruh ze silikonové pěny standardu kvality FDA o vnějším průměru 2 cm, vnitřním průměru 1 cm a tloušťce 1 mm (kSil GP60, Gumex, Strážnice, ČR). Fixace na kůži 6-8 stehy.

Ve skupinách, které měly plánovanou bakteriální infekci, bylo přidáno 10  $\mu$ l suspenze se směsí bakterií ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) v konečné koncentraci 10<sup>7</sup> CFU/ml *S. aureus* a 10<sup>7</sup> CFU/ml *P. aeruginosa*. Defekty skupin s nanovláknem (skupiny 2–5) byly poté překryty vzorky PCL\_AA (nanovláknem bez funkcionalizace), PCL\_AA se SLP\_GEN\_1,5 (nanovláknem funkcionalizovaným SLP s gentamycinem) nebo PCL\_AA s SLP\_GEN a SLP\_VitE (nanovláknem funkcionalizovaným SLP s gentamycinem a SLP s antioxidantem), viz též tabulka 7.



Skupina	Označení	Popis
1	Kontrola	Rána bez infektu, bez nanovláken
2	PCL+BAC	Rána s bakteriemi, pokrytá vzorkem PCL_AA (bez SLP)
3	PCL+GEN+BAC	Rána s bakteriemi, pokrytá vzorkem PCL_AA s SLP_GEN
4	PCL+GEN+VitE+BAC	Rána s bakteriemi, pokrytá vzorkem PCL_AA s SLP_GEN a SLP_VitE
5	PCL+GEN+ VitE	Rána bez infektu, pokrytá vzorkem PCL_AA s SLP_GEN a SLP_VitE

*Tabulka 7: Skupiny v in vivo experimentu*

V kontrolní skupině (1) neinfikované rány nebyly pokryty nanovlákný, pouze sekundárním krytím. Jako sekundární krytí bylo u všech ran použito 3M Tegaderm™ a pomocná fixace elastickými adhezivními obvazy.

Po operaci byla zvířatům podána meloxicamum 5 mg. kg<sup>-1</sup>s.c. a NaCl s.c. Zdravotní stav zvířat byl kontrolován každý den. Vzorky a sekundární kryt (Tegaderm) byly měněny dvakrát týdně. V den 14 byla zvířata usmrcena pomocí cervikální dislokace (po celkové anestezii isofluranem). Defekty byly zkontrolovány, byly pořízeny snímky pro další hodnocení oblasti rány a vzorky obsahující celou plochu hojené rány byly zalaty do 4% pufovaného formaldehydu pro histologickou analýzu.

Histologické zpracování a vyhodnocení bylo zajištěno dodavatelsky (ÚMG, Czech Centre for Phenogenomics). Po vynětí z konzervačního roztoku a po fixaci po dobu 48 hodin byly vzorky oříznuty na polovinu a přemístěny do roztoku 70% etanolu ke zpracování pomocí automatizovaného tkáňového procesoru (Leica ASP 6025, Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Následně byly zalaty do parafinových bloků pomocí Leica EG 1150H stanice (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Řezy 2 μm a 4,5 μm byly nařezány pomocí mikrotomu (Leica RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) na standardní sklíčka. Tři reprezentativní řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem (HE) a upevněny pomocí automatického barvicího přístroje Leica ST5020 v kombinaci s krycím sklíčkem Leica CV5030. Řezy na sklíčkách Superfrost byly obarveny pomocí soupravy Gram Stained Kit na systému VENTANA BenchMark Special Stains System (Roche, Basel, Švýcarsko) pro detekci bakterií. Picro-Sirius Red (PSR) pro kvantifikaci kolagenu byla obarvena ručně.

Anti-alfa aktinové antigeny hladkého svalstva (alfa SMA) byly získány zahřátím sklíček v EDTA pufru s hodnotou pH 9. Endogenní peroxidáza byla neutralizována 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jako primární protilátka byla použita kozí anti-myší alfa SMA monoklonální protilátka (ab21027, Abcam, Cambridge, UK) s ředěním 1:200. Řezy byly inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Po promytí byly inkubovány s anti-kozí sekundární protilátkou konjugovanou HRP (Zytomed Systems, Berlín, Německo). Barvení řezů bylo provedeno pomocí soupravy pro diaminobenzidinový substrát (Dako,

Agilent, Santa Clara, CA, USA) a řezy byly kontrastně barveny pomocí Hematoxylinin Multistainer Leica ST5020 (Leica Biosystems, Wetzlar, Německo).

Pro stanovení regenerace defektu byly měřeny rozměry rány, délka poškozených vrstev kůže, tloušťka nově regenerovaných vrstev kůže a tloušťka i délka tkáně jizvy. Pro hodnocení morfologických změn byla využita navržená metodika podle Simonetti (Simonetti, a další, 2020), pro celkové hojení podle Lazara (Lazarus, a další, 1994)

Skupina	Epitelizace	Granulace	Organizace dermis	Zánět	Hojení	Bakterie
0	stopová nebo mírná migrace keratinocytů	stopová	bez	bez	bez	bez
1	evidentní migrace keratinocytů	hypocelulární a bez cév	stopová	mírný	minimální	+
2	diferenciace	mnoho buněk a málo cév	mírná	lehký	přijatelné	++
3	hypertrofovaná a částečná <i>stratum corneum</i>	mnoho fibroblastů, výskyt vláken, výskyt cév	lehká	evidentní	ideální	+++
4	kompletní a normální	více vláken a výskyt buněk	evidentní	bez	-	-

*Tabulka 8: Histologické hodnocení morfologických změn a hojení ran. Upraveno (Simonetti, a další, 2020) a (Lazarus, a další, 1994)*

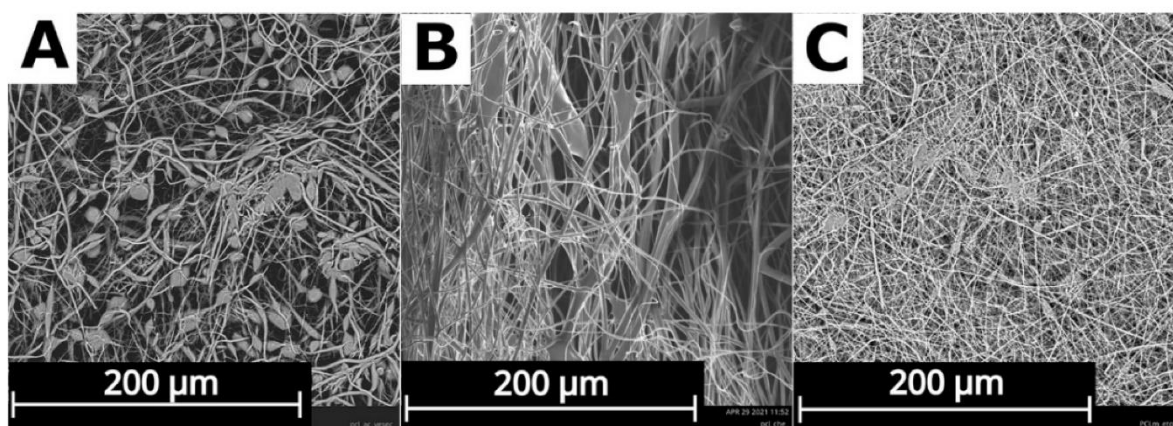
Pro měření byl použit software Zen lite 3.1 v (Zeiss, Jena, Německo), pro kvantifikaci kolagenu a SMA v softwaru ImageJ modul FIJI (ImageJ 1.53f51, NIH, Bethesda, MD, USA) s aplikací mřížky 100 000  $\mu\text{m}^2$  a 50 000  $\mu\text{m}^2$ . Shromážděné pozitivní body z celého vzorku byly normalizovány na kontrolní skupinu. Data byla statisticky analyzována v GraphPad Prism 8. Testována byla normalita s následným provedením neparametrického Kruskal–Wallisova testu a Dunnova *post hoc* testu. Významný rozdíl byl stanoven na  $p < 0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

Výsledky provedených testování jsou přehledně shrnuty v jednotlivých částech této podkapitoly. Z pohledu cíle práce nejdůležitější výsledky, tedy dopady zkoušení připravených krytů ran na návrh zařízení, jsou uvedeny v závěrečné podkapitole, jelikož se jedná o interpretaci předchozích dosažených experimentálních výsledků.

### 5.1 Charakterizace nosiče

Testované **nosiče**, připravené podle odlišných receptur, vykazovaly na snímcích SEM podle předpokladu vzájemně odlišnou **morfologii** vláken (obrázek 16). Z hlediska velikosti, resp. průměru, vláken byly ve všech vzorcích zastoupeny jak nanovláknna, tak i mikrovláknna.



Obrázek 16: 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).

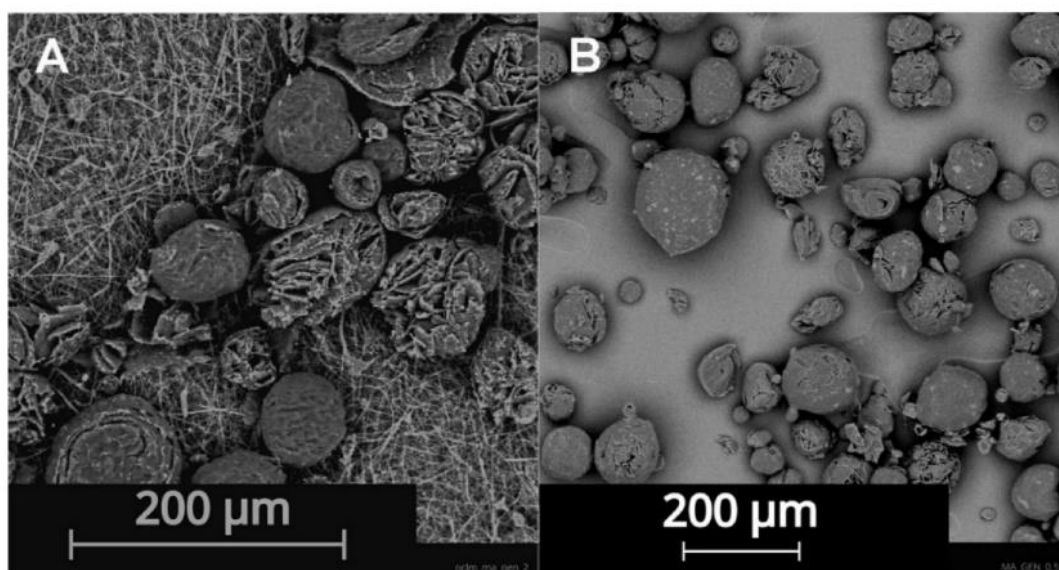
Vzorky PCL\_AC vykazovaly z pohledu zamýšlené struktury nehomogenitu ve struktuře, a to útvary kulovitěho tvaru o velikost do 15  $\mu\text{m}$  (obrázek 16A). Výrobní proces vykazoval relativně nízkou produktivitu, k dosažení adekvátní mocnosti vrstvy vláken bylo, oproti předpokladu, nutné nanesení více vrstev. Vzorek PCL\_CHE byl tvořen vlákny s relativně malým průměrem bez výrazných nehomogenit nebo jiných defektů (obrázek 16B). Výrobní proces ovšem v rámci používaných vzorků vykazoval relativně malou opakovatelnost. Vlákna s nejmenším průměrem vykazovaly vzorky PCL\_AA (obrázek 16C). Proces výroby těchto vzorků nevykazoval problémy s opakovatelností a v rámci dostupných vzorků vykazoval srovnatelnou finální morfologii nanovláknenného substrátu. Žádný ze substrátů nevykazoval solitérní vlákna nebo jiné útvary, ve struktuře nefixované, která byla z pohledu plánované aplikace jako kryty ran nežádoucí.

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**.

## 5.2 Charakterizace lipidických částic

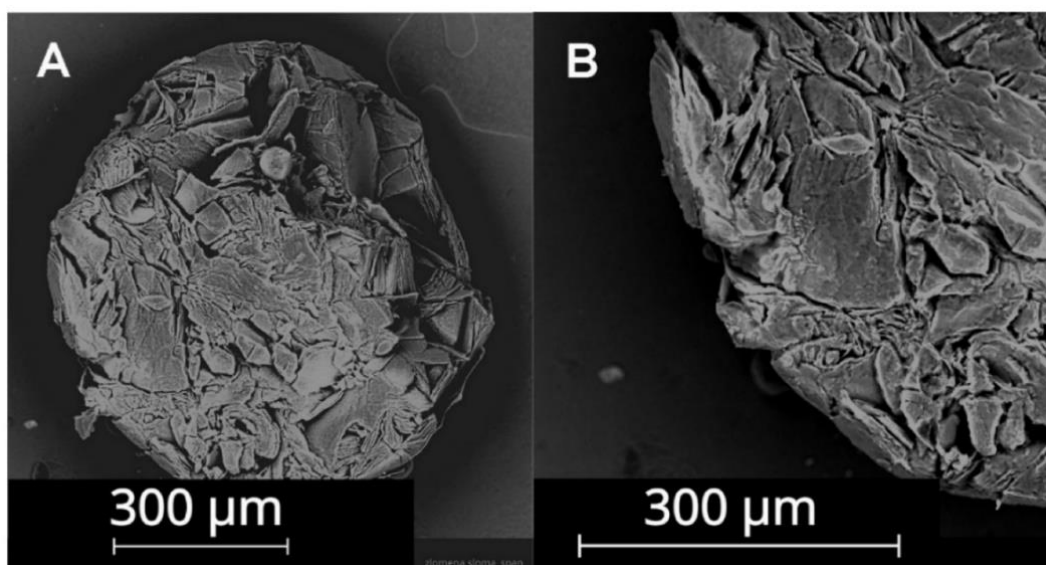
**Analýza struktury a velikosti SLP** byla zacílena na opakovatelnost procesu syntézy a imobilizace částic, hodnoceny byly částice po nánosu na povrch substrátu v suchém stavu (pro možnost snímkování SEM). Částice vykazovaly v zásadě kulovitý tvar, průměrná hodnota průměru byla 76,6  $\mu\text{m}$  (rozmezí hodnot od 25  $\mu\text{m}$  do 101  $\mu\text{m}$ ). 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 (viz příloha 3, obr. P3.1 A), představující velikost částic v suspenzi před nánosem (viz příloha 3, obr. P3.1 B).

Podrobnější informace o charakteru jednotlivých částic poskytla analýza SEM. Byly identifikovány dva typy povrchů částic: hladký a zvrásněný (viz obrázek 17). Převážně hladký povrch vznikl v částicích vyrobených za použití vyšších koncentrací rozpouštědla během emulgačního procesu a pokud byla emulze udržována (v kapalném skupenství obou fází) až do ztuhnutí pozvolným poklesem teploty. Převážně zvrásněný povrch vznikl při vysoké rychlosti tuhnutí (chlazení). Tento efekt mohl být způsoben pravděpodobně nízkou lokální teplotou vodní fáze, nízkou lokální koncentrací rozpouštědla během dávkování, nebo vysokou rychlostí rozpouštění rozpouštědla ve vodě. Vrásčité částice vykazují vyšší aktivní povrch, což může mít vliv na kinetiku uvolnění účinné látky.



Obrázek 17: SEM analýzy struktury vytvořených SLP. Deponovány (A) na nanovláknenný substrát PCL\_AA, (B) na destičce pro tkáňové kultury.

Struktura jednotlivé SLP s povrchem převážně zvrásněného charakteru je patrná ze snímků SEM na obrázku 18.



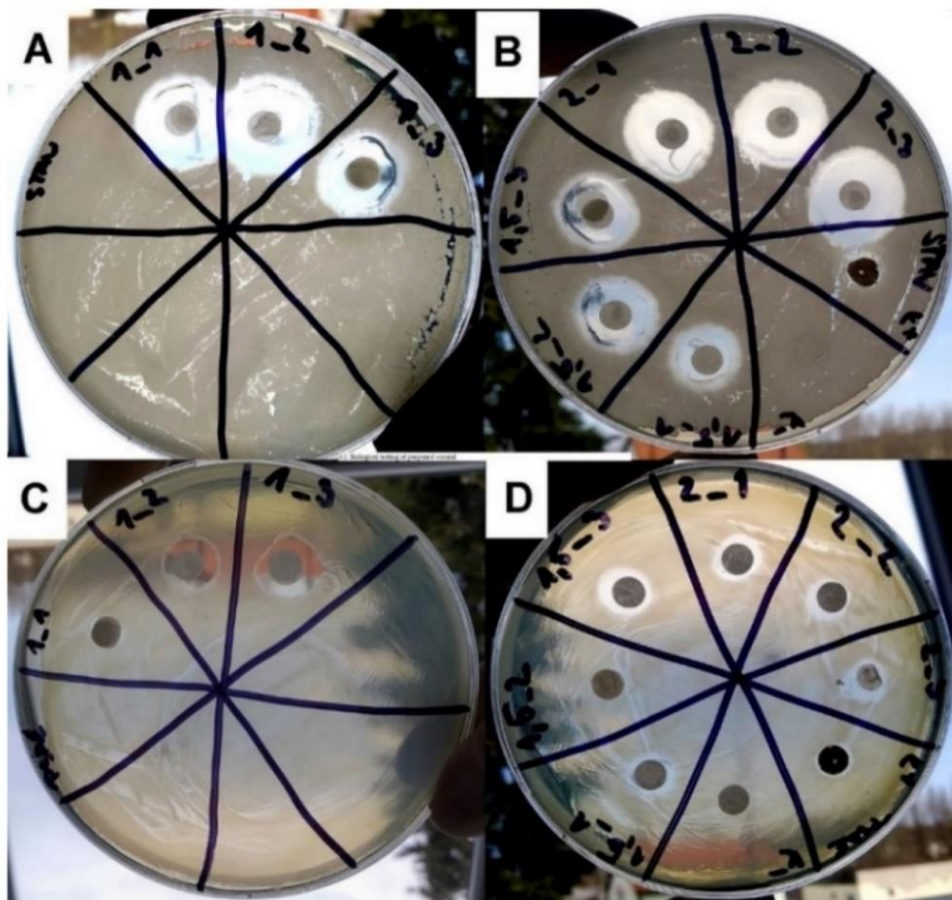
Obrázek 18: Struktura SLP částice s povrchem zvrásněného charakteru pomocí SEM. Zvětšení (A) 300×, (B) 550×.

Identifikované dva rozdílné typy povrchu částic by mohly vést k různému uvolňování účinné látky, jelikož částice vykazovala jiný celkový povrch a jinak by na ni působily okolní podmínky. Tato skutečnost byla tedy identifikována jako podstatná jak pro věcné využití při návrhu funkcionalizačních formulací, tak jako zásadní vstup pro řízení rizik řešeného zdravotnického prostředku.

Plánováno a provedeno bylo také kontrolní testování **uvolňování gentamycinu** z připravených vzorků SLP\_GEN\_1.5 (s využitím základní receptury). Na základě zjištěné koncentrace po 24 h louhování v simulovaném prostředí (903,9 ng/ml) bylo stanoveno, že se z lipidové struktury uvolnilo 91 % gentamycinu. Jelikož hodnota odpovídala dřívějším měřením výrobce, testování nepokračovalo pro další varianty SLP a všechny vzorky byly propuštěny do dalšího testování.

### 5.3 Experimenty *in vitro*

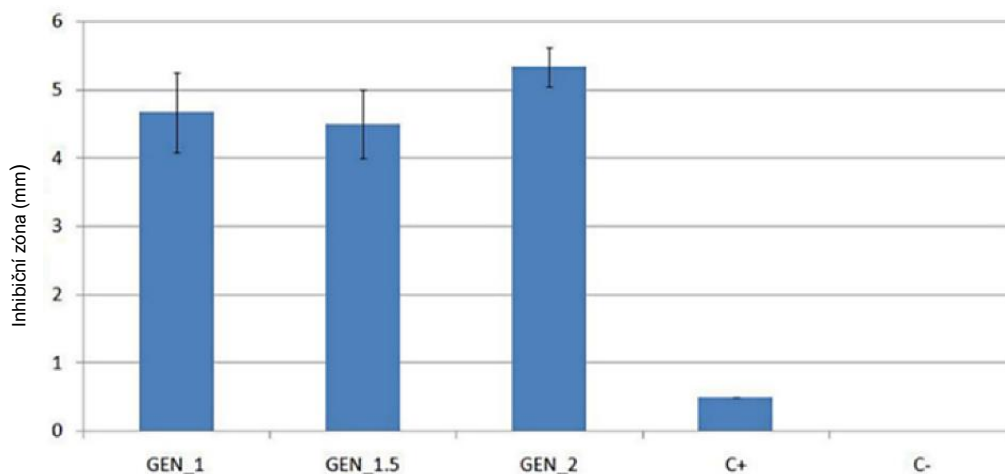
První test byl zaměřen obecně na **antibakteriální účinnost proti zvoleným bakteriálním kmenům** *S. aureus* (STAU) a *P. aeruginosa* (PSAE), kterou mikrobiologické testování **diskovým difúzním testem** potvrdilo u všech vzorků (viz obrázek 19). Antibakteriální účinnost *in vitro* tedy prokázaly všechny testované varianty krytu rány. Vzorky byly účinnější na grampozitivní *S. aureus*, kde je inhibiční zóna vzorku PSAE\_GEN\_2 větší než 5 mm.



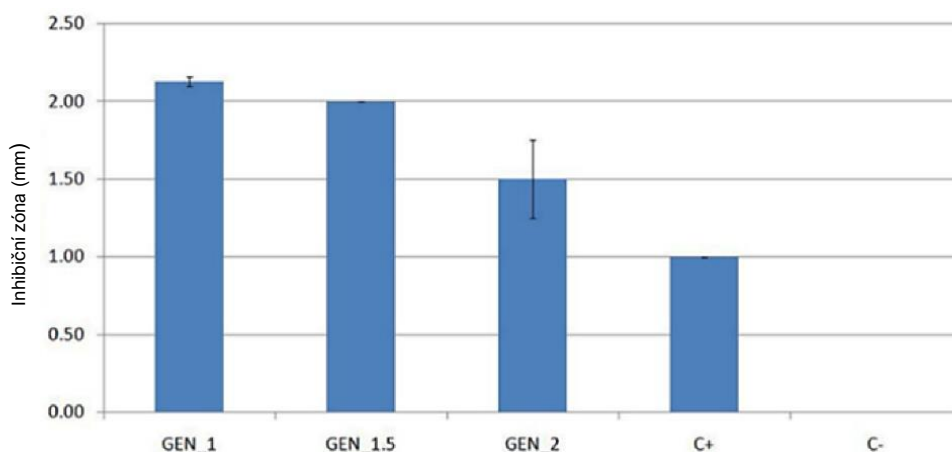
Obrázek 19: Výsledky diskového difúzního testu antibakteriální účinnosti  
 Agarové plotny s bakteriálními kmeny (A, B) *S. aureus* (STAU) a (C, D) *P. aeruginosa* (PSAE).  
 Vzorky GEN\_1 (ve 3 opakováních 1\_1, 1\_2, 1\_3), GEN\_1.5 (ve 3 opakováních 1.5\_1, 1.5\_2, 1.5\_3)  
 a GEN\_2 (ve 3 opakováních 2\_1 2\_2, 2\_3).

Antibakteriální účinnost vzorků v závislosti na celkové dávce gentamycinu (GEN) ve vzorku na použité bakteriální kmeny (STAU, PSAE) po 20 hodinách inkubace na agarové plotně při teplotě 37 °C shrnují také grafy (viz obrázky 9 a 10). Jako pozitivní kontrola (C+) byl použit antibakteriální kryt rány s obsahem stříbra (zdravotnický prostředek na trhu), jako kontrola negativní (C-) PCL substrát bez SLP (PCL\_CHE).

Inhibiční zóna byla měřena vždy ve dvou vzájemně kolmých osách procházejících středem vzorku, a to na obou jeho protilehlých stranách, tedy byly pro každý vzorek naměřeny 4 hodnoty z nichž byl vypočten aritmetický průměr.



Obrázek 20: Účinnost vzorků na bakterie *S. Aureus*.  
 Na ose X jednotlivé hodnocené varianty SLP podle celkového obsahu gentamycinu (GEN) a kontroly.  
 Na ose Y měřená inhibiční zóna kolem vzorku na agarové plotně.



Obrázek 21: Účinnost vzorků na bakterie *P. Aeruginosa*.  
 Na ose X jednotlivé hodnocené varianty SLP podle celkového obsahu gentamycinu (GEN) a kontroly.  
 Na ose Y měřená inhibiční zóna kolem vzorku na agarové plotně.

Statistická analýza ukazuje, 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. Důvodem mohlo být technické omezení experimentálního uspořádání (celkový počet opakování, také během testování byla snaha o zajištění maximálně homogenního prostředí z hlediska teploty, nicméně malé rozdíly nebylo možné v dostupných podmínkách zcela vyloučit). Určitý vliv také mohly mít i drobné odchylky v procesu přípravy SLP (viz přechází část podkapitoly). 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 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* (viz příloha 3, obr. P3.2). 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 funkcionalizovanými 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.

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) (viz příloha 3, obr. P3.3), 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 (viz příloha 3, obr. P3.4). Výsledky ukázaly významně nižší metabolickou aktivitu fibroblastů 3T3 na vzorcích PCL\_AC i PCL\_AC\_GEN. 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 nanovlákněném 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.



## 5.4 Experiment *in vivo*

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 příloha 3, mimo jiné ve formě fotodokumentace postupu hojení defektů (viz příloha 3, obr. P3.5). Šest zvířat z různých skupin s aplikovanými bakteriemi nepřežilo do posledního experimentálního dne a jeden vzorek byl zničen během procesu extrakce (Kaplan-Meierova analýza přežití, viz příloha 3, obr. P3.6).

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 (viz příloha 3, obr. P3.7).

V rámci **histologické analýzy** měření nově vytvořené kůže podle předpokladu indikovalo, že bakteriální infekce prodlužuje konstrikci 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 (viz příloha 3, obr. P3.8 B). 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 (viz

příloha 3, obrázky P3.7, P3.8, P3.9, P3.10). Všechny vzorky vykazovaly alespoň přijatelně zhojenou ránu (stav hojení viz příloha 3, obr. P3.5).

V rámci histologické analýzy byly dále jednotlivě hodnoceny různé aspekty histologického hodnocení, které charakterizují hojení rány (viz příloha 3, obr. P3.9). 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 (viz příloha 3, obr. P3.10 a P3.11). 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 (viz příloha 3, obrázek P3.9). Reprezentativní snímky ilustrují nově vytvořenou tkáň na obrázku P3.10 a obrázku P3.11 v příloze 3. Neovaskularizační marker SMA nevykazoval žádné významné rozdíly mezi skupinami, ale často se v nich měnil (viz příloha 3, obrázky P3.9, P3.10, P3.11). Tuková vrstva hypodermis se zřídka plně vytvořila, i když se objevily jednotlivé tukové buňky, přesto se papily objevily ve skupinách postrádajících bakteriální infekci.

## 5.5 Plnění požadavků

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.

Shrnutí vyhodnocení uvádí tabulka:

Požadavek	Provedení hodnocení	Výsledek
<b>Krytí rány s doplňkovým účinkem</b>		
Krytí rány	Hodnocení publikované literatury Vyhodnocení poznatků o průběhu testování	potenciál shody
Fyzikální a chemická charakterizace	Hodnocení publikované literatury Testování	potenciál shody
Cytotoxicita	Hodnocení publikované literatury Testování	potenciál shody
Senzibilizace	Hodnocení publikované literatury Testování	v dalších fázích
Dráždivost	Hodnocení publikované literatury Testování	v dalších fázích
Účinnost – antibakteriální	Hodnocení publikované literatury Testování <i>in vitro</i>	potenciál shody
Účinnost – antibakteriální – biofilm	Hodnocení publikované literatury Testování <i>in vitro</i>	potenciál shody
Účinnost – antioxidační	Hodnocení publikované literatury Testování <i>in vitro</i>	potenciál shody
Účinnost – zlepšení hojení	Hodnocení publikované literatury Testování <i>in vivo</i>	neprokázána
<b>Funkcionalizační zařízení</b>		
Ověření návrhu funkcionalizačního zařízení (zvolený rozsah)	Hodnocení publikované literatury Testování zvolené varianty krytu rány s doplňkovým účinkem	potenciál validace procesu potenciál kvalifikace zařízení

Tabulka 9: Přehled plnění požadavků na základě výsledků testování

## 5.6 Dopad výsledků experimentu na návrh zařízení

Výsledky zkoušení krytu rány je třeba shrnout a interpretovat ve vztahu k návrhu funkcionalizačního zařízení a jeho ověření.

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 m<sup>3</sup>/min. (Omron, Japonsko), pro chlazení vnější nádoby magnetického míchadla je použita dvojice bezkartáčových ventilátorů s průtokem 7,8 CFM, tj. 220,74 dm<sup>3</sup>/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 přidávanými 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  $\alpha$ -tokoferol, k hojení chronické rány za přítomnosti zvoleného antibiotika. To se bohužel potvrdit nepodařilo. Navzdory slibným výsledkům z literatury a *in vitro* testování, aplikace  $\alpha$ -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 validace<sup>30</sup>, jsou vedle poznatků získaných samotným experimentem zásadní také vytvořené **poznatky provozní**.

Z hlediska následného použití v klinické praxi se jako podstatná projeví 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

---

<sup>30</sup> 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)

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 prismaticem 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.

## 6 DISKUSE

Provedené **úvodní charakterizace** v kombinaci s testováním cytotoxicity vedly ke stanovení preference nosiče ve formě substrátu z PCL, připraveného DC elektrostatickým zvláknováním, s využitím **kyseliny octové jako rozpouštědla**. Vhodnost tohoto rozpouštědla pro zvláknování PCL byla konstatována také jinými autory (Ramazani, a další, 2014) (Chakrapani, a další, 2012) (Van der Schueren, a další, 2011), i když, jak uvádějí další, častěji je využívána kombinace kyselina octová / kyselina mravenčí z důvodu lepší zvláknitelnosti roztoku polymeru. (Dobrzański, a další, 2014) Přestože obě rozpouštědla jsou relativně málo toxická, z hlediska zpracování je kyselina mravenčí nevýhodná, jelikož jde o na vzduchu dýmající, ostře páchnoucí kapalinu s leptavými účinky. (National Library of Medicine).

V experimentu použita **metoda emulzifikace** pro přípravu SLP, někdy též označovaných jako solid lipid nanoparticles (SLN), solid lipid microparticles (SLM) nebo nanostructured lipid carriers (NLC), je v literatuře, vedle řady dalších metod pro enkapsulaci léčiv, používána opakovaně s výsledky odpovídajícími vytvořeným experimentálním datům pro lipofilní účinné látky. (Khairnar, a další, 2022) (Sastri, a další, 2020) (Jaspart, a další, 2005)

Pro **fyzikální charakterizaci vytvořených částic** byla v souladu s plánovaným postupem použita SEM. Pouze někteří autoři starších prací upozorňují, na možné problémy s použitelností této zobrazovací techniky pro lipidické částice. Tyto formulace využívají lipidy s nízkou teplotou tání a zdroj elektronů používaný v elektronové mikroskopii tak může způsobit tavení lipidové částice, což ovlivní její pozorovanou strukturu a integritu. (Kumar, a další, 2013) Kromě toho mohou být lipidické částice citlivé na techniky přípravy nutné pro aplikaci elektronové mikroskopie, zejména sušení. (Garti, 1988) Vzorky připravené v rámci testování byly pro SEM snímkování zpracovány všechny stejným způsobem, přesto byl pozorován hladký i zvrásněný povrch. Počet vzorků nebyl statisticky významný, tedy nelze konstatovat korelaci, nicméně byly indikovány potenciální závislosti výskytu těchto rozdílných povrchů na popsáných parametrech procesu přípravy. Dosažené výsledky tedy naznačují, v souladu s převážnou většinou publikací, použitelnost SEM pro fyzikální charakterizace SLP částic. (Gad, a další, 2022) (Kathe, a další, 2014) (Jaspart, a další, 2005) Pro charakterizaci SLP a nanoemulzí je shodně s naším postupem dalšími autory používána vedle SEM také DLS (De Gaetano, a další, 2021).

V rámci **in vitro testování** byla ověřena **antibakteriální účinnost** krytu proti zvoleným bakteriálním kmenům *S. aureus* (STAU) a *P. aeruginosa* (PSAE), kterou mikrobiologické testování diskovým difúzním testem potvrdilo u všech vzorků. Tyto výsledky jsou ve shodě s řadou publikací, které řeší topikální aplikaci gentamycinu dodávaného různými metodami (Overstreet, a další, 2015) (Tam, a další, 2006) (Schafer, a další, 2006) (Kaliyamurthy, a další, 2005), i když lze u jednotlivých studií namítnout rozdílnost aplikačního schématu.

U všech testovaných vzorků bylo také možné pozorovat **signifikantní inhibici, resp. eradikaci, biofilmu**, což odpovídalo v literatuře popsané *in vitro* vysoké účinnosti aplikace gentamycinu na bakteriální biofilm tvořený *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae* (Maczynska, a další, 2019) a také předpokladu o dosažení v literatuře uváděné MBIC (Kotulová, a další, 2010) v podmínkách *in vitro*.

Za podstatný lze považovat také fakt, že **nebyla zjištěna cytotoxicita nanovláčenného substrátu PCL\_AA**, tedy preferované varianty nosiče zvolené pro *in vivo* testování. Tato zjištění přitom podpořena i výsledky dalších testování, publikovanými v literatuře, které popisují negativní toxicitu nanovláčků z PCL zvláčněné s použitím kyseliny octové. (Machado-Paula, a další, 2020) Toto zjištění umožnilo realizaci navazujících experimentů bez zatížení případnou chybou, kterou by cytotoxicita nosiče způsobila.

Výsledky ***in vivo* experimentu** přinesly pozitivní výsledek v první řadě v tom, že hojení čisté rány bez bakteriální kontaminace nebylo negativně ovlivněno aplikací samotného nosiče, tedy nanovláčenného krytu z PCL, ani tohoto nosiče funkcionalizovaného GEN a VitE enkapsulovanými v SLP. Výsledky byly velmi podobné ve všech skupinách, což **indikuje biokompatibilitu všech materiálů při hojení ran**. Tyto výsledky odpovídají již citovaným studiím, které uvádí, že PCL nanovláčky jsou biokompatibilní a podporují proliferaci fibroblastů, keratinocytů a melanocytů, i když buněčný růst je ovlivněn složením média, FBS nebo obsahem lyzátu krevních destiček (Sovková, a další, 2018). Růst kožních buněk je ovlivněn i nano/mikrotopografií vláčků. (Vocetková, a další, 2017)

**Antibakteriální účinnost** gentamycinu při topikální aplikaci byla potvrzena více autory také na základě různě designovaných *in vivo* experimentů (Gemeinder, a další, 2021) (Lochman, a další, 2012) i klinických studií (Cooley, a další, 2023) (Kozioł, a další, 2014), což také vedlo k jeho volbě. Experimentální nastavení použité v této práci nebylo zaměřeno selektivně na kvantifikaci antibakteriálního účinku aplikovaných vzorků krytů ran, nicméně dosažené výsledky komplexního *in vivo* experimentu mohou vzbuzovat dojem, že antibakteriální účinek nebyl dostatečně prokázán. Je však třeba vzít v potaz, že výsledky hojení ve skupině s bakteriální infekcí ošetřené kryty s GEN vykazovaly největší rozdíly a variovaly od ran zhojených až k ranám obsahujícím hnis. Přitom ve skupině s bakteriální infekcí, ošetřené kryty s GEN a VitE takto zásadní interindividuální rozdíly pozorovány nebyly. To může být vysvětleno působením nepopsaného faktoru, který ovlivňuje antibakteriální účinnost gentamycinu, ovšem jeho účinek je omezen v přítomnosti  $\alpha$ -tokoferolu.

Studie Andrade a dalších zjišťovala *in vitro* modulační účinky  $\alpha$ -tokoferolu v kombinaci s aminoglykosidovými antibiotiky při testování proti multirezistentním kmenům *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *E. coli*. Vzhledem k jeho lipofilnímu charakteru předpokládala možné účinky  $\alpha$ -tokoferolu spočívající v rozrušení bakteriální buněčné membrány, obdobně jako u cholesterolu, což by mělo za následek narušení její integrity a vzrůst permeability pro antibiotika. Samotný  $\alpha$ -tokoferol nevykazoval žádné antimikrobiální účinky proti použitým bakteriálním kmenům. Žádný efekt



$\alpha$ -tokoferolu nebyl pozorován na antibiotické účinky aminoglykosidů také pokud byly podávány v koncentracích odpovídajících MIC. Přidání  $\alpha$ -tokoferolu k subinhibičním koncentracím antibiotik však vedlo k synergickým účinkům. Kombinace  $\alpha$ -tokoferolu s aminoglykosidovými antibiotiky vedla k poklesu MIC, s markantními výsledky při MIC/8 zejména pro *S. aureus* při kombinaci  $\alpha$ -tokoferolu s gentamycinem. Při MIC/2 bylo u všech testovaných bakteriálních kmenů zjištěno snížení MIC příslušných aminoglykosidů, konkrétně neomycinu, amikacinu a gentamycinu. (Andrade, a další, 2014)

Ve výše uvedeném kontextu se jeví jako pravděpodobné, že faktorem ovlivňujícím dosažené výsledky by mohlo být nedosažení MIC z krytu uvolněného gentamycinu, nebo její nedosažení po potřebnou dobu, v ránách, které nebyly dobře zhojeny. Tento efekt se nedostavil za přítomnosti  $\alpha$ -tokoferolu jako modulátoru zvyšujícího antibakteriální účinnost gentamycinu, resp. snižujícího jeho MIC. Toto vysvětlení odpovídá situaci, kdy uvolňovací profil z SLP\_GEN zabezpečuje efektivní dobu inhibice „bez rezervy“, takže za určitých podmínek (větší bakteriální nálož, menší pohyb jedince vedoucí k jeho nižší průměrné tělesné teplotě, a tedy pomalejšímu uvolnění účinné látky, která se uvolňuje déle a není dosaženo MIC apod.) efektivní inhibice není dosažena nebo je omezena.

Z hlediska **celkového vlivu na hojení rány u krytu s plným doplňkovým účinkem (GEN+VitE)** výsledky *in vivo* experimentu neindikovaly výraznou změnu velikosti rány, ovšem histologické vyhodnocení ukázalo **příspěvek k hojení reprezentovaný lepší tvorbou všech tří vrstev kůže**, a dokonce i tenčích vrstev ve srovnání s kontrolní skupinou bez vyvolané infekce. Rychlejší uzavření rány a úplná regenerace kožních vrstev vede k rychlejší obnově jejich strukturální a fyziologické funkce, což je důležitý aspekt dobrého hojení. (Han, 2023)

Výsledky též nasvědčují tomu, že kryt GEN+VitE měl **pozitivní vliv na granulaci tkáně a organizaci dermis**, ve srovnání pouze s krytím PCL vlákny. Kryt neeliminovat zcela dopad zánětu způsobeného bakteriální infekcí v ráně, přesto se zvýšilo histologické skóre reepitelizace a granulace tkáně i organizace dermis, a také marker zánětu tkáně indikoval pozitivní účinek gentamycinu. Jak je uvedeno v literatuře, přestože se jedná o do značné míry nespecifický indikátor (Germolec, a další, 2018) jeho význam v hodnocení hojení je značný. (Ballantyne, a další, 2005)

Účinek gentamycinu a  $\alpha$ -tokoferolu uvolněných z lipidové vrstvy krytu se v případě bakteriální infekce rány jeví jako nedostatečný pro její úplnou eliminaci, což je pravděpodobně způsobeno jeho hraničně účinnou dávkou, jak již bylo diskutováno. Olekson a tým studovali účinek přímé topické aplikace ultravysoké dávky gentamycinu při léčbě kožních štěpů na prasečím modelu. Prokázali, že gentamycin v ultravysoké dávce může bránit neovaskularizaci v ráně, což prokázaly downregulované markery angiogeneze, a upregulované markery prozánětlivé odpovědi týden po transplantaci. Nepozorovali však ani specifické rozdíly v době hojení, ani kontrakci rány v průběhu hojení (Olekson, a další, 2017). Podobné výsledky pocházejí od Junkera, který *in vitro* prokázal negativní vliv vysoké dávky gentamycinu (1000  $\mu\text{m}/\text{ml}$ ) na proliferaci buněk, konkrétně lidských keratinocytů. Tento tým se

také zaměřil na topickou aplikaci gentamycinu v různých koncentracích na prasečím modelu rány a na další analýzy krve, tekutiny z rány a na zánětlivou a antibakteriální odpověď (Junker, a další, 2015).

Ve srovnání se studii Oleksona a Junkera nebyla koncentrace gentamycinu předimenzována, protože aktin hladkého svalstva – SMA (z angl. smooth muscle actin), marker vaskularizace, byl ve vzorcích ošetřených kryty s GEN zvýšen a bylo možné pozorovat migraci keratinocytů i definovanější tvorbu epidermis. Náš přístup se přitom jeví jako bezpečnější, jelikož aminoglykosidová antibiotika, včetně gentamycinu, se z pohledu klinické praxe obecně vyznačují úzkým terapeutickým indexem (rozmezím), tedy rozdílem mezi účinnou a toxickou koncentrací. (Kacířová, a další, 2015)

Výsledky také indikovaly interindividuální variabilitu hojení i v přítomnosti bakteriální infekce s výjimkou SMA. Marker vaskularizace se u vzorků s GEN při probíhající bakteriální infekci více lišil, ale jeho přítomnost prokázala **pozitivní vliv gentamycinu na novotvorbu cév i přes bakteriální zánět**. Všechny tyto výsledky podporují zjištění skupiny Abdula Khodira, která tvrdí, že gentamycin by mohl také podporovat životaschopnost buněk *in vitro*, pokud je přímo smíchán s PCL a kolagenem, důležitým stavebním kamenem extracelulární matrix, za vzniku vlákna (Abdul Khodir, a další, 2018). Kimna dokonce potvrdil pozitivní účinek gentamycinu uvolňovaného z nanovláken rostlinného původu *in vitro*. (Kimna, a další, 2019)

Mezi studii podporujícími dosažená zjištění a použitým experimentálním nastavením je ovšem určitý rozdíl. Ve výše uvedených studiích byl gentamycin buď přímo přidán nebo smíchán s polymerem před vytvořením vláken, zatímco v našem případě byla směs antibiotika a antioxidantu nanosena na PCL vlákna v lipidickém drug delivery systému. Antimikrobiální účinek funkcionalizační formulace použité v této práci byl prokázán *in vitro*. U zvířat se zdá, že biologická dostupnost léčiva by měla být vyšší a jeho účinek převládající, protože není nutná degradace vláken PCL anebo difúze účinné látky z jejich hmoty, aby došlo k uvolnění gentamycinu. Navíc uvolňování ze vzorků GEN i VitE bylo podpořeno zvýšenou teplotou na 37 °C.

**Předpoklad příspěvku  $\alpha$ -tokoferolu** coby antioxidantu k hojení chronické rány za přítomnosti zvoleného antibiotika se bohužel potvrdit nepodařilo. Dosažené výsledky lze vysvětlit mnoha způsoby, jedním z nich by mohlo být technické omezení experimentálního uspořádání.

Zájem o používání přírodních účinných látek s antioxidačními účinky k léčbě kožních defektů a mnoha dalších nepříznivých zdravotních stavů, významně vzrostl v 80. a 90. letech 20. století. V tomto období byl testován také vitamín E se slibnými experimentálními výsledky právě v oblasti topické aplikace (Gonzalez Flecha, a další, 1991), ovšem jeho příznivé účinky na hojení kožních ran byly zároveň jinými autory zpochybnovány. (Havlik, a další, 1997) (Jenkins, a další, 1986)

Na účinky různých antioxidantů v hojení ran se s obnoveným zájmem, ovšem převážně kriticky zaměřuje také řada recentních studií. (Viaña-Mendieta, a další, 2022) (Comino-Sanz, a další, 2021) (Neha, a další, 2019). Autoři se shodují, že reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou klíčovými regulátory

několika fází hojení ran. Nízké úrovně ROS jsou vnímány jako nezbytné pro proces potlačení infektu a hojení defektu (Dunnill, a další, 2017). Nadměrný oxidační stres působící na buňky tkáně a snížení jejich antioxidační schopnosti, zejména v případě jiných nemocí organismu (komorbidit) má za následek redoxní nerovnováhu, která je hlavní příčinou nehojících se ran, zejména diabetických. (Cano Sanchez, a další, 2018) Kim a kol. dokonce naznačují, že vysoké úrovně oxidačního stresu v kombinaci s bakteriální infekcí jsou zásadním predispozičním faktorem podporujícím rozvoj chronické rány. (Kim, a další, 2019) Prokázání účinku anebo klinického přínosu konkrétních antioxidantů ovšem hodnotí autoři často kriticky, nebo je nepovažují za signifikantní.

Specificky na vitamín E byla zaměřena starší studie Zampieriho, která hodnotila účinky jeho topické aplikace při léčbě incizí u dětí. (Zampieri, a další, 2010) Děti byly léčeny lokálně vazelínou jako kontrolou nebo topickou formulací vitamínu E. U dětí předléčených a následně ošetřených formulací vitamínu E byla pozorována snížená tvorba jizev a keloidů během hojení, což do určité míry odpovídá dosaženým experimentálním výsledkům v této práci. Ačkoli popsáný výsledek je slibný, tuto studii bohužel nelze akceptovat jako zcela validní, jelikož nepoužila adekvátní formulaci testované látky. Jako kontrola byla adekvátně použita vazelína, nicméně testovaná topická formulace vitamínu E ve vazelíně obsahovala zároveň ricinový olej a palmitát, které byly použity k urychlení hojení ran v jiných studiích. (Gray, a další, 2004) (Carson, a další, 2003)

Tanayidin a další zhodnotili naopak topickou aplikaci vitamínu E na kožní jizvy a hojení ran s nelichotivými výsledky. Došli k závěru, že monoterapie topickou aplikací vitamínu E dosud neposkytla dostatečné důkazy o jejím významném příznivém účinku na vzhled jizvy, které by ospravedlnily její širší použití (Tanayidin, a další, 2016).

V roce 2018 byla publikována několik studií, které se zaměřily na enkapsulaci vitamínu E, resp.  $\alpha$ -tokoferolu v lipidových nanoformulacích určených pro podporu hojení kožních ran. Caddeo a kol. pozorovali antioxidační účinek transferosomů, nanovezik na bázi sojového fosfatidylcholinu-Tween, naplněných  $\alpha$ -tokoferolacetátem, proti peroxidu vodíku a průchod těchto částic přes prasečí kůži *ex vivo*. Tyto transferozomy dokonce podporovaly buněčnou proliferaci a migraci epidermálních keratinocytů (HaCaT) a 3T3 dermálních fibroblastů, což vedlo ke zrychlení uzavírání rány (Caddeo, a další, 2018). Bonferroni zapouzdřil  $\alpha$ -tokoferol do chitosan oleátu, amfifilní polymerní lipidové soli, a pozoroval *in vitro* statistický rozdíl v proliferaci keratinocytů exponovaných chitosan oleátu s obsahem  $\alpha$ -tokoferolu ve srovnání se skupinou exponovanou pouze chitosan oleátu po 24 hodinách. Během 7denní inkubace však buňky na chitosan oleátu, prosperující z počátku pomaleji, dosáhly hodnot skupiny v prostředí s  $\alpha$ -tokoferolem (Bonferroni, a další, 2018), což naznačuje buď nižší zapojení  $\alpha$ -tokoferolu do pozdější proliferace keratinocytů, nižší biologickou dostupnost aktivní molekuly, nebo obecný nedostatek koncentrace molekuly 7. den. Tyto práce naznačují, že správný výběr lipidu, resp. formulace drug delivery systému jsou pro úspěch  $\alpha$ -tokoferolu zásadní.

Horikoshi dokonce našel signální dráhu polarizace keratinocytů prostřednictvím  $\alpha$ -tokoferolové regulace Par3 a lokalizace aPKC a vznik komplexu během hojení rány (Horikoshi, a další, 2018).

Na a kol. o něco později vytvořili samostatně sestavené ferrocenové nanokapsle naplněné  $\alpha$ -tokoferolem. Tyto nanokapsle prokázaly vlastnosti vychytávání ROS na fibroblastech 3T3 a dokonce i hojivé vlastnosti, které byly testovány na tzv. scratch testu (Na, a další, 2021). Horikoshiho výsledky by potvrdily dosažené experimentální výsledky více definované derma, protože keratinocyty se lokálně pohybují, ale zbytek studií nemůžeme s jistotou potvrdit. Vitamin E je také dalšími autory stále více uznáván spíše jako modulátor imunitního systému a zánětu, jak široce diskutují Lewis a další v publikovaném přehledu (Lewis, a další, 2019).

Protože  $\alpha$ -tokoferol je rozpustný v tucích, byl v rámci technických východisek experimentu pro jeho administraci použit drug delivery systém na bázi lipidických částic, resp. SLP. Jako lipid byl zvolen myristilalkohol, mastný alkohol široce používaný v kosmetice, v topických aplikacích jako koemulgátor ale i pro přípravu perorálních formulací, který je za stanovených koncentrací netoxický. MA se při topické aplikaci osvědčil např. v boji proti bakteriím vyvolávajícím paradentózu u králíků. V koncentraci 100 mg/ml vykazoval protizánětlivé vlastnosti, zastavoval progresi zánětu, a dokonce podporoval obnovu paradontální tkáně (Hasturk, a další, 2007) (Hasturk, a další, 2009) Jeho přítomnost by tedy neměla provedený experiment negativně ovlivnit.

Bylo ovšem také popsáno, že nasycené mastné alkoholy, jako je MA, zvyšují penetraci melatoninu kůží. (Kanikkannan, a další, 2000) Nejvyšší průnik melatoninu kůží potkana byl pozorován u dekanolu a se zvyšující se délkou uhlíkového řetězce mírně klesal. Pozitivní vliv na průnik lipofilních léčiv byl však doprovázen podrážděním kůže. Transepidermální ztráta vody (TEWL) tetradekanolu byla nejvyšší (48,4 g.m<sup>-2</sup>) mezi ostatními alkoholy po 48 hodinách. Skóre erytému tetradekanolu (1,3) se zvýšilo u dekanolu (1,7) až po dodekanol (2,0) a snížilo se u tridekanolu (skóre 1,0). U tridekanolu a tetradekanolu bylo pozorováno opožděné podráždění vzhledem k jejich lipofilnímu charakteru, rychlá difúze do *stratum corneum*, ale pomalejší difúze do vodné epidermis. (Kanikkannan, a další, 2002)

Naguib a Valvano uvedli, že jak ve vodě, tak v tuku rozpustné formy vitamínu E inhibovaly vazbu bakteriálního lipokalinového proteinu BcnA, produkovaného gramnegativními bakteriemi *Burkholderia Cenocepacia*, na antibiotika. Následně byla *in vitro* prokázána zvýšená MIC norfloxacinu a ceftazidinu (Naguib, a další, 2018).

Naopak inhibiční účinek  $\alpha$ -tokoferylacétátu na tvorbu biofilmu *in vitro* za použití různých bakteriálních kmenů, např. *S. aureus* a dále *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis* a *Pseudomonas putida*, prokázal Vergalito. (Vergalito, a další, 2019) Autoři také prokázali sníženou tvorbu biofilmu *S. aureus* a *S. epidermidis* na močových katétrech modifikovaných vitamínem E.

Další vysvětlení horších výsledků krytů VitE, mnohem jednodušší, nabízí souvislost s přítomností bakteriální infekce. Pro správné fungování přirozené imunity vůči infekci jsou nezbytnou zbraní organismu volné oxidační radikály. Jak Wink a kol. široce diskutoval a objasnil, role redoxních molekul, jako jsou ROS a NO, jsou zásadní v imunitě savců a dokonce i v regulaci tkáňové regenerace. Kombinace reaktivních oxidačních a dusíkatých látek vytváří účinný baktericidní nástroj. (Wink, a další, 2011) V případě infikované rány, která odpovídá použitému experimentálnímu nastavení s aplikovanou směsí *S. aureus* a *P. aeruginosa*, mohl antioxidační účinek  $\alpha$ -tokoferolu, jako lapače volných radikálů, zpozdít správnou imunitní reakci a zhoršit proces hojení. Niki navíc tvrdí, že  $\alpha$ -tokoferol vychytává hlavně peroxylové radikály (RO<sub>2</sub>•), což naznačuje jeho roli v infikované hojící se ráně (Niki, 2014). Nicméně  $\alpha$ -tokoferolová specifčnost vychytávání radikálů RO<sub>2</sub> nemusí být primárním důvodem našich negativních výsledků.

Wink a kol. uvádí, že NO, redoxní imunomodulátor zapojený do zánětu, regenerace tkání, buněčné proliferace, restrukturalizace extracelulární matrix a dokonce revaskularizace, je lipofilní molekula (Wink, a další, 2011). Na základě obecně horších výsledků histologických rozborů hodnocení aplikace PCL vláken, hydrofobní struktura na jedné straně a lipidová vrstva SLP nabitá aktivními molekulami na straně druhé, v modelu chronické rány s indukovanou bakteriální infekcí nemusí vytvářet nejlepší prostředí k jejímu vymýcení. Kombinace PCL, gentamycinu a  $\alpha$ -tokoferolu v čisté, neinfikované ráně proces hojení nezhoršila. Tyto výsledky souhlasí se studií léčby akutních kožních defektů, kde PCL nanovláknina vykazovala horší výsledky než hydrofilní polyvinylalkoholová nanovláknina (Buzgo, a další, 2019).

Popsané výsledky bylo třeba také posoudit z hlediska **potenciálu plnit vybrané požadavky**, které byly v rámci práce identifikovány. Podle Wanga je zohlednění požadavků na zdravotnický prostředek důležitým krokem už od raných fází výzkumu a vývoje. V rámci přezkumu je třeba definovat zejména technické požadavky a související normy, které jsou na daný výrobek aplikovatelné, tj. zejména požadavky obecně závazných předpisů a národních norem nebo průmyslových standardů. Konkrétně by měly být již ve výzkumně-vývojových fázích definovány detailní technické požadavky, jako jsou zkušební metody a kritické hodnoty výsledků. Požadavky norem a předpisů jsou formulovány tak, aby jednoznačně vymezily nároky na materiály, procesy a finální výstupy tak, aby byla zajištěna jejich bezpečnost a účinnost. Výzkumník tedy musí relevantní požadavky vyhledat a identifikovat, které by měly být aplikovány jako technické požadavky na výstup. (Wang, a další, 2022)

Kromě plnění požadavků na výstupy, které bylo široce diskutováno výše, **přispěly experimenty k ověření proveditelnosti koncepce přípravy krytí ran v ambulantních podmínkách pomocí funkcionalizačního zařízení**, jelikož položily základ pro dokumentaci souvisejících validačních kvalifikačních procesů. Borkenstein doporučuje, aby výrobní procesy zdravotnických prostředků, byly během celého životního cyklu řízeny podle správné výrobní praxe (GxP/GMP), aby bylo možné zdravotnické prostředky uvést na trh v souladu s regulačními požadavky. Podle pravidel GMP musí

být výrobní proces „kvalifikovaný“. Cílem kvalifikace je dle tohoto autora poskytnout dokumentovaný důkaz, že výrobní proces, včetně dodavatelů vstupů, je jednak v již běžící výrobě realizován v souladu s dokumentací, ale zejména že funguje reprodukovatelně v definovaných rozsazích, tedy dodává požadovaný výsledek. (Borkenstein, a další, 2023) Tímto výstupem je v případě funkcionalizačního zařízení, které je zcela zásadní součástí výrobního procesu, kryt rány s doplňkovým účinkem podle stanovených technických specifikací.

Konkrétní složení funkcionalizační formulace tvořilo do značné míry technická východiska. Z pohledu kvalifikace funkcionalizačního zařízení lze konstatovat, že jednotlivé vzorky vykazovaly konzistentní sledované parametry (např. biokompatibilitu) a indikují tak zajištění potřebné opakovatelnosti procesu přípravy, tedy potenciál funkcionalizačního zařízení naplnit požadavky kvalifikace. Tím došlo **do značné míry také k ověření řešeného konceptu**, resp. vyslovené teze ve vztahu k použitelnosti v klinické praxi. Jak ve své práci upozorňuje Derakhshandeh a další, zajištění dodávky terapeutik, která přerušují patofyziologické procesy a navozují fyziologické hojení, se ukázalo jako velmi slibná terapie. Vzhledem ke složitosti obtížně se hojících ran může časoprostorová distribuce podávaných terapeutik zásadně ovlivnit rychlost a kvalitu hojení. Paradigma podávání léků v péči o rány se musí dle tohoto autora posunout k zaměření na „co, kdy, kde“, aby se vyřešila tato patologická složitost. Toho dosahují chytré systémy, které mohou aktivně řídit rychlost podávání a distribuci léků. (Derakhshandeh, a další, 2020) Vedle experimentální přístrojové techniky, které je řešena v citované studii, jsou efektivním nástrojem právě personalizované kryty ran s doplňkovým účinkem podle popsaného konceptu, pro jejichž přípravu je možné kvalifikovat popsané funkcionalizační zařízení.

Lze také do značné míry akceptovat zamýšlený přínos pro prokázání **potenciálu pro rozšíření personalizace péče** i na péči o rány. Jak uvádí Faramarzi, v současné klinické praxi péče o rány personál zajišťující zdravotní péči provádí klinické posouzení rány, na jeho základě vybírá krytí a poté monitoruje hojení v reakci na léčbu. Určení primární patologie u komplikovaných ran však není vždy jednoduché a lékaři mohou změnit léčebnou strategii až poté, co se nedostaví klinická odpověď na počáteční léčbu. Systém, který by dokázal přesně detekovat stavy rány, jako je nedostatečné hojení, nekrotická tkáň nebo superinfekce, a účinně se zaměřovat na jedinečné patologické stavy jednotlivce, by způsobil revoluci v péči o rány a drasticky snížil zátěž pro systémy zdravotní péče. (Faramarzi, a další, 2021) Logickým komplementem takového systému je popsaný systém přípravy personalizovaných krytů ran s využitím funkcionalizačního zařízení. Systém využívající sériově vyráběný nanovláknový nosič s garantovanými parametry, který je funkcionalizován na zařízení umožňujícím nastavení řady parametrů (zejména obsahu účinné látky v částicích a celkového objemu ukládaných částic), poskytuje v tomto ohledu aktuálně alternativu s velmi vysokou přidanou hodnotou.

Dílním ověřením návrhu funkcionalizačního zařízení bylo dosaženo také kýženého **přínosu pro biomedicínské inženýrství**, jelikož vývoj terapeutických a rehabilitačních procedur a zejména techniky jsou jeho významnou součástí. (Enderle, a další, 2012)

## 7. 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 regulačními. 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 nanovlákněné substráty z polykaprolaktonu obohacené o antibiotikum (gentamycin) a antioxidant (vitamín E ve formě  $\alpha$  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  $\alpha$ -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.



## 8. REJSTŘÍKY A SEZNAMY

### 8.1 Seznam zkratk

AFM	atomic force microscopy (mikroskopie atomárních sil)
aPKC	atypical protein kinase C (atypické proteinkinasy C)
CAS	Chemical Abstracts Service US
CEN	European Committee for Standardization
CENELEC	European Committee for Electrotechnical Standardization
CFA	colony formation assays (esej pro analýzu kolonii tvořících jednotek)
DC	direct current (stejnoseměrný proud)
EDS/EDX	energeticky disperzní rentgenová spektroskopie
FBS	fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací)
GEN	gentamycin (pro označení vzorků)
GMP	good manufacturing practice (dobrá výrobní praxe)
GPMT	guinea pig maximisation test (maximalizační test na morčatech)
GSPR	General Safety and Performance Requirements (obecné požadavky na bezpečnost a účinnost)
h-CLAT	human Cell Line Activation Test
HaCaT	spontánně transformovaná aneuploidní nesmrtelná keratinocytová buněčná linie z kůže dospělého člověka
HE	hematoxylin-eosin
HPLC-FLD	high-pressure liquid chromatography - fluorimetric detector (kapalinová chromatografie s fluorimetrickým detektorem)
HRP	horseradish peroxidase (křenová peroxidáza)
HTA	Health Technology Assessment (hodnocení zdravotnických technologií)
IDST	intra-dermal skin tests (intradermální kožní testy)
IEC	International Electrotechnical Commission (Mezinárodní elektrotechnická komise)
ISO	International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)

IWJ	International Wound Journal
LB	lyzogení bujón
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
LLNA	local lymph node assay (test lokálních lymfatických uzlin, u myši)
MA	myristilalkohol (pro označené vzorků)
MDCG	Medical Device Coordination Group
MEDDEV	Medical Devices Documents (pokyny pro zdravotnické prostředky)
MDR	Medical Devices Regulation
MDR	Multidrug Resistant Bacteria
MF	mikrofluidní
MIC	minimum inhibitory concentration (minimální inhibiční koncentrace)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NBOG	Notified Body Operations Group
NLC	nanostructured lipid carriers
NR	neutral red (neutrální červeň)
o/w	oil/water (olej do vody)
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PBS	phosphate buffered saline (fosfátem pufovaný fyziologický roztok)
PMCF	Post Market Clinical Follow-Up (studie po uvedení na trh)
PMS	Post-Market Surveillance (poprodejní sledování)
PSAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , též <i>P. aeruginosa</i>
PSR	Picro-Sirius Red
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUV	příhláška užitého vzoru
PV	příhláška vynálezu
QFD	Quality Function Deployment
RhE	reconstituted human epidermis (rekonstruovaná lidská epidermis)
RZPRO	registr zdravotnických prostředků
s.c.	<i>subcutaneum</i> (podkožně)
SEM	scanning electron microscope (skenovací elektronová mikroskopie / skenovací elektronový mikroskop)

SIMS	secondary ion mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů)
SLS	static light scattering (statický rozptyl světla)
SLM	solid lipid microparticles
SLN	solid lipid nanoparticles
SMA	smooth muscle actin
STAU	<i>Staphylococcus aureus</i> , též <i>S. aureus</i>
STM	single tube method
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TEWL	transepidermal water loss (transepidermální ztráta vody)
TRAP	total radical-trapping potential
UV	ultrazvuk
ÚEM	Ústav experimentální medicíny Akademie věd ČR, v.v.i.
ÚMG	Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.
VaVaI	výzkum, vývoj a inovace
w/o	water/oil (voda do oleje)
XPS/ESCA	rentgenová fotoelektronová spektroskopie
XTT	tetrazoliová sůl
ZP	zdravotnický prostředek

## 8.2 Seznam obrázků

Obrázek 1: Funkcionalizační zařízení .....	17
Obrázek 2: Příklad technického řešení funkcionalizačního zařízení .....	19
Obrázek 3: Příklad technického řešení funkcionalizačního zařízení (detail komory) .....	19
Obrázek 4: Lineární dávkovače během testování komponenty za účelem kvalifikace .....	21
Obrázek 5: 3D model magnetického míchadla vlastní konstrukce .....	22
Obrázek 6: Magnetické míchadlo vlastní konstrukce .....	22
Obrázek 7: Kryt rány po funkcionalizaci .....	24
Obrázek 8: Schematické vyjádření funkce řešeného krytu rány .....	26
Obrázek 9: Iterativní povaha návrhu a vývoje zdravotnického prostředku .....	29
Obrázek 10: Aplikace funkcionalizovaného krytu rány .....	42
Obrázek 11: Ilustrativní graf koncentrace antibiotika v ráně v závislosti na čase expozice krytu .....	43

Obrázek 12: Postup hodnocení publikované literatury pro předklinické hodnocení.....	52
Obrázek 13: Detail zvlákňovací komory zařízení GradeTechLine, verze 1.1.....	60
Obrázek 14: Detail jedné zvlákňovací komory zařízení InoCure.....	60
Obrázek 15: Koncepce testování funkcionalizovaného krytu rány in vitro a in vivo .....	68
Obrázek 16: Struktura testovaných vzorků analyzovaná pomocí SEM .....	71
Obrázek 17: SEM analýzy struktury vytvořených SLP. ....	72
Obrázek 18: Struktura SLP částice s povrchem zvrásněného charakteru pomocí SEM. ....	73
Obrázek 19: Výsledky diskového difúzního testu antibakteriální účinnosti .....	74
Obrázek 20: Účinnost vzorků na bakterie S. Aureus. ....	75
Obrázek 21: Účinnost vzorků na bakterie P. Aeruginosa.....	75

### 8.3 Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled částí normy ISO 10993 .....	35
Tabulka 2: Přehled požadavků vybraných k řešení.....	49
Tabulka 3: Varianty nosiče zahrnuté do testování.....	59
Tabulka 4: Varianty SLP zahrnuté do testování.....	61
Tabulka 5: Varianty SLP dle obsahu GEN v suspenzi.....	62
Tabulka 6: Označení testování podle použitých bakteriálních kmenů.....	63
Tabulka 7: Skupiny v <i>in vivo</i> experimentu .....	69
Tabulka 8: Histologické hodnocení morfologických změn a hojení ran.....	70
Tabulka 9: Přehled plnění požadavků na základě výsledků testování.....	79

### 8.4 Seznam použité literatury

**Abdul Khodir, Wan et al. 2018.** Encapsulation and characterization of gentamicin sulfate in the collagen added electrospun nanofibers for skin regeneration. *Journal of functional biomaterials*. 2018, Sv. 9, 2, str. 36.

**Abud, Ana P. R. et al. 2015.** The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015, Sv. 73, 3.

**Adams, Alison K. a Connolly, Suzanne M. 2010.** Allergic contact dermatitis from vitamin E: the experience at Mayo Clinic Arizona, 1987 to 2007. *DERM*. 2010, Sv. 21, 4, stránky 199-202.

**Aghaei, Halimeh a Solaimany Nazar, Ali Reza. 2019.** Continuous production of the nanoscale liposome in a double flow-focusing microfluidic device. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2019, Sv. 58, 51, stránky 23032-23045.

- Ahmad, Naveed. 2023.** In Vitro and In Vivo Characterization Methods for Evaluation of Modern Wound Dressings. *Pharmaceutics*. 2023, Sv. 15, 1, str. 42.
- Akram, Salman et al. 2021.** Water-in-oil nano-emulsions prepared by spontaneous emulsification: New insights on the formulation process. *Pharmaceutics*. 2021, Sv. 13, 7.
- Alam, Md Nur et al. 2013.** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*. 2013, Sv. 21, 2, stránky 143-152.
- Alam, Wahila, Hasson, Jonathan a Reed, May. 2021.** Clinical approach to chronic wound management in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2021, Sv. 69, 8, stránky 2327-2334.
- Alvarez-Suarez, José M. et al. 2014.** The composition and biological activity of honey: a focus on Manuka honey. *Foods*. 2014, Sv. 3, 3, stránky 420-432.
- Ambekar, Rushikesh S. a Kandasubrama, Balasubramanian. 2019.** Advancements in Nanofibers for Wound Dressing: A Review. 2019, 117, stránky 304-336.
- Andrade, Jacqueline C. et al. 2014.** Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014, Sv. 68, 8, stránky 1065-1069.
- Arbade, Gajanan K. et al. 2018.** Antibacterial, sustained drug release and biocompatibility studies of electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/chloramphenicol blend nanofiber scaffolds. *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2018, Sv. 4, 4, str. 045011.
- Arevalo, John et al. 2014.** Histopathology image representation for automatic analysis: A state-of-the-art review. *Revista Med*. 2014, Sv. 22, 2, stránky 79-91.
- Ballantyne, Christie M. a Nambi, Vijay. 2005.** Markers of inflammation and their clinical significance. *Atherosclerosis Supplements*. 2005, Sv. 6, 2, stránky 21-29.
- Balouiri, Mounyr et al. 2016.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2016, Sv. 6, 2, stránky 71-79.
- Baranowska-Korczyn, Anna et al. 2016.** Antimicrobial electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for gingival fibroblast growth. *RSC advances*. 2016, Sv. 6, 24, stránky 19647-19656.
- Benzie, Iris F. a Strain, John J. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996, Sv. 239, 1, stránky 70-76.
- Bhattacharyya, Sayani a Sogali, Bharani S. 2019.** Application of statistical design to assess the critical process parameters of ethanol injection method for the preparation of liposomes. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019, Sv. 18, 1.

- Bonferoni, M. C. et al. 2018.** Alpha tocopherol loaded chitosan oleate nanoemulsions for wound healing. Evaluation on cell lines and ex vivo human biopsies, and stabilization in spray dried Trojan microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018, Sv. 123, stránky 31-41.
- Borkenstein, Clemens et al. 2023.** Integrated Qualification of Manufacturing Systems for Medical Devices. [autor knihy] Christian Baumgartner, Johann Harer a Jörg Schrött. *Medical Devices and In Vitro Diagnostics*. Cham : Springer, 2023.
- Bossert, James L. 2021.** *Quality function deployment: The practitioner's approach*. Boca Raton, NW, USA : CRC Press, 2021. ISBN 978-1850758846.
- Boutrand, Jean- Pierre (ed.). 2019.** *Biocompatibility and performance of medical devices*. Second Edition. místo neznámé : Woodhead Publishing, 2019. ISBN 9780081026441.
- Braťka, 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.
- Braťka, Petr et al. 2020.** Brno: NANOCON, 2020. Proceedings of the 12th International Conference on Nanomaterials—Research & Application. ISBN 9788087294987.
- Brezaniová, Ingrid et al. 2016.** Temoporfin-loaded 1-tetradecanol-based thermoresponsive solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*,. 2016, 241, stránky 34-44.
- Buzgo, Matej et al. 2019.** Poly-ε-caprolactone and polyvinyl alcohol electrospun wound dressings: adhesion properties and wound management of skin defects in rabbits. *Regenerative medicine*. 2019, Sv. 14, 5, stránky 423-445.
- Caddeo, Carla et al. 2018.** Tocopherol-loaded transfersomes: In vitro antioxidant activity and efficacy in skin regeneration. *International journal of pharmaceutics*. 2018, Sv. 551, 1-2, stránky 34-41.
- Caetano, Guilherme F. et al. 2015.** Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2015, Sv. 103, 5, stránky 1013-1022.
- Cambiaghi, Alice. 2018.** Biological Evaluation of Medical Devices as an Essential Part of the Risk Management Process: Updates and Challenges of ISO 10993-1: 2018. *Eurofins Medical Device Testing*. 2018.
- Cano Sanchez, Mariola et al. 2018.** Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants*. 2018, Sv. 7, 8, str. 98.
- Cao, A. 2003.** Light scattering. Recent applications. *Analytical Letters*. 2003, Sv. 36, 15, stránky 3185-3225.
- Carson, Stanley N. et al. 2003.** Using a castor oil-balsam of Peru-trypsin ointment to assist in healing skin graft donor sites. *Ostomy/wound management*. 2003, Sv. 49, 6, stránky 60-64.

- Comino-Sanz, Inés M. et al. 2021.** The role of antioxidants on wound healing: A review of the current evidence. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, Sv. 10, 16, str. 3558.
- Cooley, Jennifer et al. 2023.** Delivery of topical gentamicin cream via platform wound device to reduce wound infection—A prospective, controlled, randomised, clinical study. *International Wound Journal*. 2023, Sv. 20, 5, stránky 1426-1435.
- Costa-Fernandez, Sandra et al. 2021.** Nanostructured lipid carriers containing chitosan or sodium alginate for co-encapsulation of antioxidants and an antimicrobial agent for potential application in wound healing. *International journal of biological macromolecules*. 2021, Sv. 183, stránky 668-680.
- Daniel, Amber B. et al. 2018.** International regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018, Sv. 95, stránky 52-65.
- De Gaetano, Federica et al. 2021.** Rutin-loaded solid lipid nanoparticles: characterization and in vitro evaluation. *Molecules*. 2021, Sv. 26, 4, str. 1039.
- de Groot, Anton C. et al. 1991.** Allergic contact dermatitis from tocopheryl acetate in cosmetic creams. *Contact Dermatitis*. 1991, Sv. 25, 5, stránky 302-304.
- Derakhshandeh, Hossein et al. 2020.** A wirelessly controlled smart bandage with 3D-printed miniaturized needle arrays. *Advanced Functional Materials*. 2020, Sv. 30, 13, str. 1905544.
- Di Marzio, Luisa et al. 2013.** Polysorbate 20 vesicles as oral delivery system: in vitro characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, Sv. 104, stránky 200-206.
- Dobrzański, L. A. a Hudecki, A. 2014.** Structure, geometrical characteristics and properties of biodegradable micro-and polycaprolactone nanofibers. *Archives of Materials Science and Engineering*. 2014, Sv. 70, 1, stránky 5-13.
- 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.
- Duan, Rui, et al. 2009.** Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food chemistry*. 2009, Sv. 112, 3, stránky 702-706.
- Dunnill, Christopher et al. 2017.** Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*. 2017, Sv. 14, 1, stránky 89-96.
- Elfaky, Mahmoud A. et al. 2019.** Development of a novel pharmaceutical formula of nanoparticle lipid carriers of gentamicin/ $\alpha$ -tocopherol and in vivo assessment of the antioxidant protective effect of  $\alpha$ -tocopherol in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antibiotics*. 2019, Sv. 8, 4, str. 234.
- Enderle, John a Bronzino, Joseph. 2012.** *Introduction to biomedical engineering*. Oxford : Academic press, 2012. ISBN 978-0-08-096121-7.

- Fahimirad, Shohreh et al. 2021.** Efficient removal of water bacteria and viruses using electrospun nanofibers. *Science of the Total Environment*. 2021, Sv. 751, str. 141673.
- Fang, Robert C. a Mustoe, Thomas A. 2008.** Animal models of wound healing: utility in transgenic mice. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2008, Sv. 19, 8, stránky 989-1005.
- Faramarzi, Negar a Tamayol, Ali. 2021.** How can smart dressings change the future of wound care?. *Journal of Wound Care*. 2021, Sv. 30, 7, stránky 512-513.
- Fazli, Mustafa et al. 2009.** Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of clinical microbiology*. 2009, Sv. 47, 12, stránky 4084-4089.
- Fink, Arlene. 2019.** *Conducting research literature reviews: From the internet to paper*. místo neznámé : Sage publications, 2019. ISBN 9781544318479.
- Fischer, Hans C. a Chan, Warren C.W. 2007.** Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Current opinion in biotechnology*. 2007, Sv. 18, 6, stránky 565-571.
- Foshi, D. et al. 1988.** The effects of oxygen free radicals on wound healing. *International journal of tissue reactions*. 1988, Sv. 10, 6, stránky 373-379.
- Fronza, Marcio et al. 2014.** Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *PLoS One*. 2014, Sv. 9, 11, str. e112297.
- Fryer, M. J. 1992.** The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant, Cell & Environment*. 1992, Sv. 15, 4, stránky 381-392.
- Gad, Heba A. et al. 2022.** Novel approaches of solid lipid nanoparticles as drug carrier. *Nanoengineering of Biomaterials*. 2022, stránky 107-143.
- Gad, Heba A. et al. 2022.** Novel approaches of solid lipid nanoparticles as drug carrier. [autor knihy] Jana Sougata. *Nanoengineering of Biomaterials*. 2022, stránky 107-143.
- Ganesan, Palanivel et al. 2018.** Recent developments in solid lipid nanoparticle and surface-modified solid lipid nanoparticle delivery systems for oral delivery of phyto-bioactive compounds in various chronic diseases. *International journal of nanomedicine*. 2018, 13, stránky 1569-1583.
- Garti, Nissim. 1988.** [autor knihy] Nissim Garti a Sato Kiyotaka. *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*. místo neznámé : M. Dekker, 1988.
- Gemeinder, José L. P. et al. 2021.** Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2021, Sv. 32, 1, stránky 93-111.
- Germolec, Dori R. et al. 2018.** Markers of inflammation. *Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols*. 2018, stránky 57-79.
- Ghasemi-Mobarakeh, Laleh et al. 2019.** Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. 2019, Sv. 10, stránky 45-50.



- Goeres, Darla M. et al. 2019.** Development, standardization, and validation of a biofilm efficacy test: The single tube method. *Journal of microbiological methods*. 2019, Sv. 165, str. 105694.
- Goldberg, D. 1995.** A review of the biodegradability and utility of poly (caprolactone). *Journal of environmental polymer degradation*. 1995, 3, stránky 61-67.
- Gonzalez Flecha, B. S. et al. 1991.** Inhibition of microsomal lipid peroxidation by  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopherol acetate. *Xenobiotica*. 1991, Sv. 21, 8, stránky 1013-1022.
- Gorzalczany, Susana B. a Rodriguez Basso, Angeles G. 2021.** Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2021, Sv. 9, 5, str. e00863.
- Gray, Mikel a Jones, David P. 2004.** The effect of different formulations of equivalent active ingredients on the performance of two topical wound treatment products. *Ostomy/wound management*. 2004, Sv. 50, 3, stránky 34-8.
- Grela, Ewa et al. 2018.** Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta histochemica*. 2018, Sv. 120, 4, stránky 303-311.
- Guaccio, Angela et al. 2011.** Influence of Electrospun Fiber Mesh Size on HMSC Oxygen Metabolism in 3D Collagen Matrices: Experimental and Theoretical Evidences. *Biotechnology Bioengineering*. 2011, Sv. 108, 196.
- Haase, Hajo et al. 2017.** Comparison of methods for determining the effectiveness of antibacterial functionalized textiles. *PLoS One*. 2017, Sv. 12, 11, str. e0188304.
- Han, Seung-Kyu. 2023.** Basics of wound healing". *Innovations and Advances in Wound Healing*. Singapore : Springer Nature Singapore, 2023, stránky 1-42.
- Hanke, Larry D. 2012.** *Surface Characterization for Medical Devices*. místo neznámé : ASM International, 2012. Sv. 24A. ISBN 978-1-62708-198-6.
- Hasturk, Hatice et al. 2007.** 1-Tetradecanol Complex Reduces Progression of Porphyromonas gingivalis–Induced Experimental Periodontitis in Rabbits. *Journal of periodontology*. 2007, Sv. 78, 5, stránky 924-932.
- Hasturk, Hatice et al. 2009.** 1-Tetradecanol complex: therapeutic actions in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*. 2009, Sv. 80, 7, stránky 1103-1113.
- Havlik, Robert J. a Committee, Plastic Surgery Educational Foundation DATA. 1997.** Vitamin E and wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 1997, Sv. 100, 7, stránky 1901-1902.
- Henriques, Ana et al. 2006.** Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, Sv. 58, 4, stránky 773-777.
- Holder, Ian A. et al. 1997.** Mouse models to study wound closure and topical treatment of infected wounds in healing-impaired and normal healing hosts. *Wound repair and regeneration*. 1997, Sv. 5, 2, stránky 198-204.

**Holman, Robert. 2011.** *Ekonomie*. 5. vydání. místo neznámé : Nakladatelství CH Beck, 2011. ISBN 978-80-7400-006-5.

**Hong, Huixiao (ed.). 2023.** *QSAR in safety evaluation and risk assessment*. Londýn : Academic Press, 2023. 978-0-443-15339-6.

**Horikoshi, Yosuke et al. 2018.**  $\alpha$ -Tocopherol promotes HaCaT keratinocyte wound repair through the regulation of polarity proteins leading to the polarized cell migration. *Biofactors*. 2018, Sv. 44, 2, stránky 180-191.

**Hosseini, Rezvan et al. 2022.** Processing techniques, test methods and regulatory issues of bioactive textiles for medical and healthcare uses. *Medical Textiles from Natural Resources*. místo neznámé : Woodhead Publishing, 2022, Sv. Woodhead Publishing,, stránky 663-694.

**Chakrapani, Yogeshwar V. et al. 2012.** Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012, Sv. 125, 4, stránky 3221-3227.

**Chediak, Alex J. a Phillips, Kenneth. 2021.** Preclinical Performance Testing of Medical Devices with Antimicrobial Effects: Shifting the Focus from “Bench” to “Bedside”. *U.S. Food & Drug Administration (FDA)*. [Online] 26. 05 2021. <https://www.fda.gov/science-research/fda-science-forum/preclinical-performance-testing-medical-devices-antimicrobial-effects-shifting-focus-bench-bedside>.

**Chouhan, Dimple et al. 2019.** Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*. 2019, Sv. 216 , 119267.

**James, Garth A. et al. 2008.** Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and regeneration*. 2008, Sv. 16, 1, stránky 37-44.

**Jaspart, Séverine et al. 2005.** Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. *Expert opinion on drug delivery*. 2005, Sv. 2, 1, stránky 75-87.

**Jenke, Dennis. 2022.** *Extractables and Leachables: Characterization of Drug Products, Packaging, Manufacturing and Delivery Systems, and Medical Devices*. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, 2022. ISBN: 978-1-119-60510-2.

**Jenkins, Marilyn et al. 1986.** Failure of topical steroids and vitamin E to reduce postoperative scar formation following reconstructive surgery. *The Journal of burn care & rehabilitation*. 1986, Sv. 7, 4, stránky 309-312.

**Johnston, Melissa P. 2014.** Secondary data analysis: A method of which the time has come. *Qualitative and quantitative methods in libraries*. 2014, Sv. 3, 3, stránky 619-626.

**Junker, Johan P.E. et al. 2015.** Topical delivery of ultrahigh concentrations of gentamicin is highly effective in reducing bacterial levels in infected porcine full-thickness wounds. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015, Sv. 135, 1, stránky 151-159.

- Kacířová, Ivana a Grundmann, Milan. 2015.** Terapeutické monitorování amikacinu a gentamicinu v rutinní klinické praxi. *Vnitřní lékařství*. 2015, Sv. 61, 1, stránky 33-41.
- Kaliamurthy, J. et al. 2005.** Comparison of in vitro susceptibilities of ocular bacterial isolates to gatifloxacin and other topical antibiotics. *Ophthalmic research*. 2005, Sv. 37, 3, stránky 117-122.
- Kandarova, Helena et al. 2018.** Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™. *Toxicology in Vitro*. 2018, Sv. 50, stránky 407-417.
- Kanikkannan, N. et al. 2000.** Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Current medicinal chemistry*. 2000, Sv. 7, 6, stránky 593-608.
- Kanikkannan, N. a Singh, M. 2002.** Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, Sv. 248, 1-2, stránky 219-228.
- Kathe, Niranjana et al. 2014.** Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. *Drug development and industrial pharmacy*. 2014, Sv. 40, 12, stránky 1565-1575.
- Kautzky, Florian et al. 1996.** In vitro cytotoxicity of antimicrobial agents to human keratinocytes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1996, Sv. 6, 2, stránky 159-166.
- Khairnar, Sakshi V. et al. 2022.** Review on the scale-up methods for the preparation of solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2022, Sv. 14, 9, str. 1886.
- Kim, Jane H. et al. 2019.** High levels of oxidative stress and skin microbiome are critical for initiation and development of chronic wounds in diabetic mice. *Scientific reports*. 2019, Sv. 9, 1, str. 19318.
- Kim, Junhyung et al. 2021.** Safety verification for polysorbate 20, pharmaceutical excipient for intramuscular administration, in Sprague-Dawley rats and New Zealand White rabbits. *Plos one*. 2021, Sv. 16, 8, str. e0256869.
- Kimber, Ian et al. 2018.** Skin and respiratory chemical allergy: confluence and divergence in a hybrid adverse outcome pathway. *Toxicology Research*. 2018, Sv. 7, 4, stránky 586-605.
- Kimna, C., et al. 2019.** Novel zein-based multilayer wound dressing membranes with controlled release of gentamicin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019, Sv. 107, 6, stránky 2057-2070.
- Kotulová, D. a Slobodníková, L. 2010.** Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to vancomycin, gentamicin and rifampin. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti J.E. Purkyně*. 2010, Sv. 59, 2, stránky 80-87.
- Kowalska-Krochmal, Beata a Dudek-Wicher, Ruth. 2021.** The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*. 2021, Sv. 10, 2, str. 165.

- Koziol, Malgorzata et al. 2014.** Gentamicin-impregnated collagen sponge for preventing sternal wound infection after cardiac surgery. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska/Polish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2014, Sv. 11, 1, stránky 21-25.
- Kragh, Kasper N. et al. 2019.** Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*. 2019, Sv. 1, str. 100006.
- Kumar, Sacheen a Randhawa, Jaspreet K. 2013.** High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, Sv. 33, 4, stránky 1842-1852.
- 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.
- Leung, Victor et al. 2011.** Bioactive nanofibres for wound healing applications. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*. 2011, Sv. 4, 1, stránky 1-14.
- Lewis, Erin D. et al. 2019.** Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB life*. 2019, Sv. 71, 4, stránky 487-494.
- Li, Zehao et al. 2016.** Increased cutaneous wound healing effect of biodegradable liposomes containing madecassoside: Preparation optimization, in vitro dermal permeation, and in vivo bioevaluation. *International journal of nanomedicine*. 2016, stránky 2995-3007.
- Li, Zhenyu et al. 2013.** Effects of working parameters on electrospinning. [autor knihy] Zhenyu Li a et al. *One-dimensional nanostructures: Electrospinning technique and unique nanofibers*. místo neznámé : Springer, 2013, stránky 15-28.
- Lipp, C. et al. 2010.** Testing wound dressings using an in vitro wound model. *Journal of wound care*. 2010, Sv. 19, 6, stránky 220-226.
- Liu, Guo-Sai et al. 2018.** In situ electrospinning iodine-based fibrous meshes for antibacterial wound dressing. *Nanoscale Research Letters*. 2018, 13, stránky 1-7.
- Liu, Xuemei et al. 2018.** A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 2018, Sv. 97, stránky 24-32.
- Lochman, Petr, a další. 2012.** TOPICALLY-USED GENTAMICIN ATTACHED TO NANOFIBRE MDOCTM COMPARED WITH GARAMYCIN SCHWAMM® IN AN ACUTE WOUND INFECTION MODEL. AN EXPERIMENTAL STUDY. *Military Medical Science Letters*. 2012, Sv. 81, 1, stránky 9-15.
- Lux, Linda J. et al. 2014.** Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Measures for Guiding Antibiotic Treatment for Hospital-Acquired Pneumonia. *National Library of Medicine*. [Online] 2014. [Citace: 10. 09 2022.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK266264/>.

- Maczynska, Beata et al. 2019.** In vitro efficacy of gentamicin released from collagen sponge in eradication of bacterial biofilm preformed on hydroxyapatite surface. *PLoS One*. 2019, Sv. 14, 6, str. e0217769.
- Maher, Sam et al. 2023.** Safety of surfactant excipients in oral drug formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023, Sv. 115086.
- Machado-Paula, M. M. et al. 2020.** A comparison between electrospinning and rotary-jet spinning to produce PCL fibers with low bacteria colonization. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, Sv. 111, str. 110706.
- Martineau et al. 2000.** *Hydrogel wound dressing containing liposome-encapsulated therapeutic agent*. WO2001015750A1 2000.
- Mary Ann Liebert, Inc., Publishers. 1988.** Final Report on the Safety Assessment of Cetearyl Alcohol, Cetyl Alcohol, Isostearyl Alcohol, Myristyl Alcohol, and Behenyl Alcohol. *Journal of the American College of Toxicology*. 1988, Sv. 7, 3, stránky 359-413.
- Mašek, Josef a et al. 2018.** *Carrier*. WO2018033744 2018.
- Mašek, J. et al. 2017.** Multi-layered nanofibrous mucoadhesive films for buccal and sublingual administration of drug-delivery and vaccination nanoparticles-important step towards effective mucosal vaccines. *Journal of Controlled Release*. 2017, 249, stránky 183-195.
- Mathew, Essyrose et al. 2020.** 3D printing of pharmaceuticals and drug delivery devices. *Pharmaceutics*. 2020, Sv. 12, 3, str. 266.
- Meloni, Marisa et al. 2019.** The biological evaluation of medical devices: Transition to 2017/745 MDR in progress. *ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTATION*. 2019, Sv. 36, 3, stránky 472-475.
- Micková, Andrea et al. 2012.** Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules*. 2012, Sv. 13, 4, stránky 952-962.
- Milne, Stephen D. a Connolly, Patricia. 2014.** The influence of different dressings on the pH of the wound environment. *Journal of wound care*. 2014, Sv. 23, 2, stránky 53-57.
- Minsart, Manon et al. 2022.** Commercial wound dressings for the treatment of exuding wounds: an in-depth physico-chemical comparative study. *Burns & Trauma*. 2022, Sv. 10.
- Monteiro, Nelson et al. 2015.** Antibacterial activity of chitosan nanofiber meshes with liposomes immobilized releasing gentamicin. *Acta biomaterialia*. 2015, 18, stránky 196-205.
- Monteiro-Riviere, Nancy A. et al. 2009.** Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009, Sv. 234, 2, stránky 222-235.
- Moore, J. et al. 1984.** Final report on the safety assessment of polysorbates 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81, and 85. *J. Am. Coll. Toxicol.*. 1984, Sv. 3, stránky 1-82.

- Murphy, Michael J. 2012.** Toxicology Cases. [autor knihy] Michael E. Peterson a Patricia A. Tacott. *Small Animal Toxicology*. 2012, 13, str. 133.
- Muwaffak, Zaid et al. 2017.** Patient-specific 3D scanned and 3D printed antimicrobial polycaprolactone wound dressings. *International journal of pharmaceutics*,. 2017, Sv. 527, 1-2, stránky 161-170.
- Mwiiri, Francis K. a Daniels, Rolf. 2020.** Electrospun nanofibers for biomedical applications. *Delivery of drugs*. místo neznámé : Elsevier, 2020, stránky 53-74.
- Na, Yoonhee et al. 2021.**  $\alpha$ -Tocopherol-loaded reactive oxygen species-scavenging ferrocene nanocapsules with high antioxidant efficacy for wound healing. *International journal of pharmaceutics*. 2021, Sv. 596, str. 120205.
- Naguib, Marwa M. a Valvano, Miguel A. 2018.** Vitamin E increases antimicrobial sensitivity by inhibiting bacterial lipocalin antibiotic binding. *Msphere*. 2018, 6, stránky e00564-18.
- Nanomedic Technologies Ltd.** Spincare system. *Spincare*. [Online] [Citace: 10. 12 2023.] <https://nanomedic.com/>.
- Narang, Jagriti et al. 2011.** A nylon membrane based amperometric biosensor for polyphenol determination. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011, Sv. 72, 3-4, stránky 276-281.
- National Center for Biotechnology Information. 2004.** PubChem Compound Summary for CID 8209, 1-Tetradecanol. *PubChem*. [Online] 2004. [Citace: 23. 10 2022.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Tetradecanol#section=Toxicity>.
- National Library of Medicine.** Compound Summary: Formic Acid. *PubChem*. [Online] [Citace: 16. 08 2023.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/284>.
- Neha, Kumari et al. 2019.** Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2019, Sv. 178, stránky 687-704.
- Niki, Etsuo. 2014.** Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014, 66, stránky 3-12.
- Nnamani, P. O. et al. 2013.** Transdermal microgels of gentamicin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2013, Sv. 84, 2, stránky 345-354.
- O'Toole, Sharon A. et al. 2003.** The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detection and Prevention*. 2003, Sv. 27, 1, stránky 47-54.
- Olekson, Melissa A. et al. 2017.** Ultrahigh dose gentamicin alters inflammation and angiogenesis in vivo and in vitro. *Wound Repair and Regeneration*. 2017, Sv. 25, 4, stránky 632-640.
- Omar, Amin a Nadworny, Patricia. 2017.** Antimicrobial efficacy validation using in vitro and in vivo testing methods. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017, 112, stránky 61-68.

- Overstreet, Derek et al. 2015.** Local gentamicin delivery from resorbable viscous hydrogels is therapeutically effective. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2015, Sv. 473, stránky 337-347.
- Papazoglou, Elisabeth S. et al. 2010.** Image analysis of chronic wounds for determining the surface area. *Wound repair and regeneration*. 2010, Sv. 18, 4, stránky 349-358.
- Pecchia, Leandro et al. 2019.** Health technology assessment and biomedical engineering: global trends, gaps and opportunities. *Medical engineering & physics*. 2019, Sv. 72, stránky 19-26.
- Pellevoisin, Christian et al. 2022.** ISO 10993-23 In vitro irritation testing for medical devices: Substantiating applicability to mild irritants and non-extractables. *Toxicology in Vitro*. 2022, Sv. 82, str. 105371.
- Peterson, L. R. et al. 1992.** Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clinical microbiology reviews*. 1992, Sv. 5, 4, stránky 420-432.
- Planz, Viktoria et al. 2015.** Novel in vitro approaches for the simulation and analysis of human skin wounds. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2015, Sv. 28, 2, stránky 91-96.
- Poljsak, Borut et al. 2013.** Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013, Sv. 2013.
- Powers, Jennifer G. et al. 2016.** Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2016, Sv. 74, 4, stránky 607-625.
- Ramazani, Soghra a Karimi, Mohammad. 2014.** Investigating the influence of temperature on electrospinning of polycaprolactone solutions. *e-Polymers*. 2014, Sv. 14, 5, stránky 323-333.
- Riss, Terry et al. 2003.** Choosing the right cell-based assay for your research. *Cell note*. 2003, Sv. 6, 11, str. 6.
- Romanelli, Marco et al. 2013.** Use of diagnostics in wound management. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care 7.1 (2013): 106-110*. 2013, Sv. 7, 1, stránky 106-110.
- Salimi, Marzieh et al. 2023.** A temperature-responsive drug release system based on MoS<sub>2</sub> nanosheets and 1-tetradecanol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2023, Sv. 676, 132061.
- Sastri, Koduru T. et al. 2020.** Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies. *J Appl Pharm Sci*. 2020, Sv. 10, 6, stránky 126-141.
- Serra, Raffaele et al. 2015.** Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert review of anti-infective therapy*. 2015, Sv. 13, 5, stránky 605-613.
- Shanmugam, Prakash S. T. et al. 2023.** Cytotoxicity. [autor knihy] Prakash S. T. Shanmugam et al. *Biocompatibility Protocols for Medical Devices and Materials*. místo neznámé: Academic Press, 2023, stránky 1-18.

- Shitole, Ajinkya A. et al. 2020.** Poly (vinylpyrrolidone)-iodine engineered poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers as potential wound dressing materials. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, Sv. 110, str. 110731.
- Schafer, Jeremy A. et al. 2006.** Consistent rates of kill of *Staphylococcus aureus* by gentamicin over a 6-fold clinical concentration range in an in vitro pharmacodynamic model (IVPDM). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, Sv. 58, 1, stránky 108-111.
- Schmidt, Svenja et al. 2023.** Microfluidic Spontaneous Emulsification for Generation of O/W Nanoemulsions—Opportunity for In-Space Manufacturing. *Advanced Healthcare Materials*. 2023.
- Schultz, Gregory S. et al. 2003.** Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound repair and regeneration*. 2003, Sv. 11, stránky 1-28.
- Schurtenberger, Peter a Newman, Meredith E. 2018.** Characterization of biological and environmental particles using static and dynamic light scattering. [autor knihy] Jacques Buffle a Herman P. van Leeuwen. *Characterization of Environmental Particles*. Boca Raton : CRC Press, 2018, Sv. 2.
- Simon, Josh. 2020.** *Verification and Validation: From Bench to Human Studies*. In: *Biomaterials Science*. místo neznámé : Academic Press, 2020. stránky 1447-1456.
- 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.
- Sjollema, Jelmer et al. 2018.** In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs. *Acta Biomaterialia*. 2018, Sv. 70, stránky 12-24.
- Sood, Aditya et al. 2014.** Wound dressings and comparative effectiveness data. *Advances in wound care*. 2014, Sv. 3, 8, stránky 511-529.
- Sovková, Věra et al. 2018.** Platelet lysate as a serum replacement for skin cell culture on biomimetic PCL nanofibers. *Platelets*. 2018, Sv. 29, 4, stránky 395-405.
- Special Nanofiber Scaffold Designed for Cellular Products in the Treatment of Chronic Wounds.*
- Stiefel, Philipp et al. 2016.** Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016, Sv. 100, stránky 4135-4145.
- Sukanya, V.S. a Mohanan, P.V. 2018.** Degradation of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and bio-interactions with mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1. Mar 2018, 163, stránky 107-118.
- Sukanya, V.S. 2017.** *Toxicity of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) using mouse bone marrow mesenchymal stem cells*. místo neznámé : SCTIMST, 2017. PhD Thesis.



- Sussman, Eric M. et al. 2022.** Chemical Characterization and Non-targeted Analysis of Medical Device Extracts: A review of current approaches, gaps, and emerging practices. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2022, Sv. 8, 3, stránky 939-963.
- Svobodová, Lada et al. 2022.** Sensitization potential of medical devices detected by in vitro and in vivo methods. *Physiological Research*. 2022, Sv. 71, 1.
- Švejda, Jan. 2003.** *rešerše*. [KTD: Česká terminologická databáze knihovnictví a informační vědy (TDKIV) [online]] 2003.
- Tabriz, Atabak G. a Douroumis, Dennis. 2022.** Recent advances in 3D printing for wound healing: A systematic review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022, 103564.
- Tam, Vincent H. et al. 2006.** Comparative pharmacodynamics of gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006, Sv. 50, 8, stránky 2626-2631.
- Tanaydin, Volkan et al. 2016.** The role of topical vitamin E in scar management: a systematic review. *Aesthetic surgery journal*. 2016, Sv. 36, 8, stránky 959-965.
- Teo, Cheryl W.L. et al. 2021.** Vitamin E in atopic dermatitis: from preclinical to clinical studies. *Dermatology*. 2021, Sv. 237, 4, stránky 553-564.
- Thieme, Lara et al. 2019.** MBEC versus MBIC: the lack of differentiation between biofilm reducing and inhibitory effects as a current problem in biofilm methodology. *Biological procedures online*. 2019, Sv. 21, stránky 1-5.
- Upman, Paul J. et al. 2003.** An Analysis of ISO Intracutaneous Reactivity Test Results to Justify a Reduction in Animal Requirements. *Lab Animal*. 2003, Sv. 32, stránky 26–27.
- Vaid, Bhavna et al. 2020.** Antioxidant and wound healing property of gelsolin in 3T3-L1 cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020, Sv. 2020, 4045365.
- Van der Schueren, Lien et al. 2011.** An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *European Polymer Journal*. 2011, Sv. 47, 6, stránky 1256-1263.
- Vergalito, Franca et al. 2019.** Vitamin E for prevention of biofilm-caused Healthcare-associated infections. *Open Medicine*. 2019, Sv. 15, 1, stránky 14-21.
- Viaña-Mendieta, Pamela et al. 2022.** Rational selection of bioactive principles for wound healing applications: Growth factors and antioxidants. *International Wound Journal*. 2022, Sv. 19, 1, stránky 100-113.
- Vocetková, Karolína et al. 2017.** A comparison of high throughput core-shell 2D electrospinning and 3D centrifugal spinning techniques to produce platelet lyophilisate-loaded fibrous scaffolds and their effects on skin cells. *Rsc Advances*. 2017, Sv. 7, 85, stránky 53706-53719.

- Vocetková, K., et al. 2016.** Nanofibrous polycaprolactone scaffolds with adhered platelets stimulate proliferation of skin cells. *Cell proliferation*. 2016, Sv. 49, 5, stránky 568-578.
- Wang, Hao et al. 2023.** Preclinical performance testing of medical devices with antimicrobial effects. 2023, Sv. 1, stránky 589–605.
- Wang, Li et al. 2022.** Key considerations on the development of biodegradable biomaterials for clinical translation of medical devices: With cartilage repair products as an example. *Bioactive materials*. 2022, 9, stránky 332-342.
- Wang, S. et al. 2021.** Application of topical gentamicin—a new era in the treatment of genodermatosis. *World Journal of Pediatrics*. 2021, 17, stránky 568-575.
- Wee, Corinne E. et al. 2018.** Soft Tissue Reconstruction of Complex Blast Injuries in Military and Civilian Settings: Guidelines and Principles. [autor knihy] Joseph M. Galante et al. *Managing Dismounted Complex Blast Injuries in Military & Civilian Settings*. místo neznámé: Springer, 2018, stránky 209-223.
- Werner, C. a Jacobasch, H. J. 1999.** Surface Characterization of Polymers for Medical Devices. *The International Journal of Artificial Organs*. 1999, Sv. 22, 3.
- Wiegand, Cornelia et al. 2015.** In vitro assessment of the antimicrobial activity of wound dressings: influence of the test method selected and impact of the pH. *Journal of materials science: Materials in medicine*. 2015, Sv. 26, stránky 1-13.
- Williams, Clare. 2000.** The Verge Videometer wound measurement package. *British Journal of Nursing*. 2000, Sv. 9, 4, stránky 237-239.
- Williams, David F. 2021.** Assessing the triad of biocompatibility, medical device functionality and biological safety. *Medical Devices & Sensors*. 2021, Sv. 4, 1.
- Wink, David A. et al. 2011.** Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of leukocyte biology*. 2011, Sv. 89, 6, stránky 873-891.
- Wood, Robert A. et al. 1999.** A comparison of skin prick tests, intradermal skin tests, and RASTs in the diagnosis of cat allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*. 1999, Sv. 103, 5, stránky 773-779.
- Xu, Zejun, et al. 2020.** Advances and impact of antioxidant hydrogel in chronic wound healing. *Advanced Healthcare Materials*. 2020, Sv. 9, 5.
- Yan, Xu et al. 2019.** Advances in portable electrospinning devices for in situ delivery of personalized wound care. *Nanoscale*. 2019, Sv. 11, 41, stránky 19166-19178.
- Zampieri, Nicola et al. 2010.** A prospective study in children: Pre-and post-surgery use of vitamin E in surgical incisions. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. 2010, Sv. 63, 9, stránky 1474-1478.

**Zhang, Xingshuang et al. 2022.** Electrospinning super-assembly of ultrathin fibers from single-to multi-Taylor cone sites. *Applied Materials Today*. 2022, Sv. 26, 101272.

**Zhu, Guocheng et al. 2017.** Effect of experimental parameters on nanofiber diameter from electrospinning with wire electrodes. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2017, str. 012043.

## **8.5 Seznam použité legislativy, technických norem a dalších dokumentů**

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

Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2020/437 ze dne 24. března 2020 o harmonizovaných normách pro zdravotnické prostředky vypracovaných na podporu směrnice Rady 93/42/EHS (C/2020/1901)

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 10993-2:2023	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 2: Požadavky na pohodu zvířat
ČSN EN ISO 10993-3:2015	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 3: Zkoušky na genotoxicitu, karcinogenitu a reprodukční toxicitu
ČSN EN ISO 10993-4:2017	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví
ČSN EN ISO 10993-5:2010	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro
ČSN EN ISO 10993-6:2017	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 6: Zkoušky lokálních účinků po implantaci
ČSN EN ISO 10993-7:2009 + A1:2022 + Opr.1:2010	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 7: Rezidua při sterilizaci ethylenoxidem
ČSN EN ISO 10993-9:2022	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 9: Obecné zásady pro kvalitativní a kvantitativní stanovení potenciálních degradačních produktů
ČSN EN ISO 10993-10:2023	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 10: Zkoušky senzibilizace kůže
ČSN EN ISO 10993-11:2018	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 11: Zkoušky na systémovou toxicitu

ČSN EN ISO 10993-12:2022	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály
ČSN EN ISO 10993-13:2010	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 13: Kvalitativní a kvantitativní stanovení degradačních produktů ze zdravotnických prostředků vyrobených z polymerních materiálů
ČSN EN ISO 10993-14:2009	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 14: Kvalitativní a kvantitativní stanovení degradačních produktů z keramických materiálů
ČSN EN ISO 10993-15:2023	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 15: Kvalitativní a kvantitativní stanovení degradačních produktů z kovů a slitin
ČSN EN ISO 10993-16:2018	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 16: Plán toxikokinetické studie degradačních produktů a vyluhovatelných látek
ČSN EN ISO 10993-17:2009	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 17: Stanovení přípustných limitů pro vyluhovatelné látky
ČSN EN ISO 10993-18:2021 + A1:2024	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 18: Chemická charakterizace materiálů zdravotnických prostředků v rámci procesu managementu rizik + Změna A1
ISO/TS 10993-19:2020	Biological evaluation of medical devices Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials
ČSN P ISO/TS 10993-20:2009	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 20: Zásady a metody imunotoxikologického zkoušení zdravotnických prostředků
ISO/TR 10993-22:2017	Biological evaluation of medical devices Part 22: Guidance on nanomaterials
ČSN EN ISO 10993-23:2021	Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 23: Zkoušky dráždivosti
ISO/TR 10993-33:2015	Biological evaluation of medical devices Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity Supplement to ISO 10993-3
ISO/TR 10993-55:2023	Biological evaluation of medical devices Part 55: Interlaboratory study on cytotoxicity
ČSN EN ISO 13485 ed. 2	Zdravotnické prostředky - Systémy managementu kvality - Požadavky pro účely předpisů
ČSN ISO 5127:2003	Informace a dokumentace - Slovník
ISO 4768:2023	Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non- porous surfaces

CEN prEN 16756:2016 Antimicrobial wound dressings - Requirements and test methods  
EN 17854:2023 Antimicrobial wound dressings - Requirements and test method

MEDDEV 2.7/1 rev.4 Clinical evaluation: Guide for manufacturers and notified bodies

MDCG 2021-5 Pokyny ke standardizaci zdravotnických prostředků (Duben 2021)

MDCG 2023-1 Pokyn k výjimce pro zdravotnické zařízení podle čl. 5 odst. 5 nařízení (EU) 2017/45  
a nařízení (EU) 2017/746 (Leden 2023)

ASTM E2871-13 Standard Test Method for Evaluating Disinfectant Efficacy Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Grown in CDC Biofilm Reactor Using Single Tube Method

ASTM E2871-21 Standard Test Method for Determining Disinfectant Efficacy Against Biofilm Grown in the CDC Biofilm Reactor Using the Single Tube Method

## 8.6 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, 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 Braňka, prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc., MBA, doc. Ing. Petr Kaštánek, Ph.D.

## **8.7 Seznam příloh**

Příloha č. 1: Přehled výsledků předchozích testování

Příloha č. 2: Přehled provedených testování

Příloha č. 3: Výsledky testování – doplňující údaje

## **UPOZORNĚNÍ**

Uváděné údaje o návrhu, včetně nikoliv výlučně popisu konkrétních technických řešení anebo hodnot měření, jejichž je autor původcem, případně spolupůvodcem, mohou být zcela nebo z části majetkem společností ING MEDICAL s.r.o, nebo Grade Medical s.r.o., jelikož byla vytvořena zcela nebo z části v rámci pracovního poměru autora k uvedeným společnostem.



## PŘÍLOHA Č. 1:

### VÝSLEDKY PŘEDCHOZÍCH TESTOVÁNÍ – PŘEHLED

Přehled vybraných předchozích výsledků testování poskytnutých výrobcí:

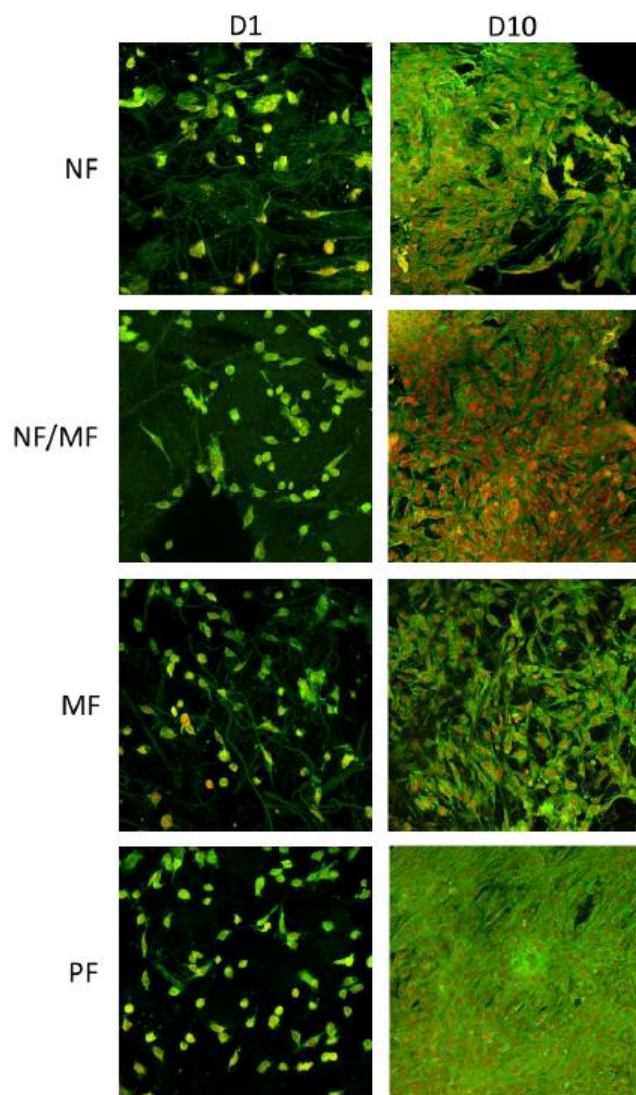
- manipulace s nanovláknými substráty SiO<sub>2</sub>, PLA, PVB, PCL, PLCL v podmínkách odpovídajících klinické praxi a potenciál využití pro kryty ran; empirický výzkum a dotazníkové šetření; závěrečná zpráva;
- hodnocení biodegradability nanovlákných substrátů SiO<sub>2</sub>, PCL, PLCL; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu;
- hodnocení bariérové funkce proti průniku mikroorganismů membránou tvořenou různými variantami nanovláken z polykaprolaktonu; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu;
- metodika syntézy drug delivery systému na bázi pevných lipidických částic s využitím myristilalkoholu a vybraných surfaktantů; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,
- vliv podmínek syntézy na teplotu tání pevných lipidických částic (SLP) z 1-tetradekanolu a zvolených surfaktantů se zaměřením na zastoupení velikostních frakcí; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,
- hodnocení antibakteriální účinnosti tetracyklinu, vankomycinu, gentamycinu a klindamycinu *in vitro* proti *S. aureus* a *P. aeruginosa*, stanovení MIC; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,
- hodnocení antibakteriální účinnosti vankomycinu a gentamycinu *in vitro* proti MRSA a VRSA; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,
- metodika přípravy biofilmu z bakteriálních kmenů *S. aureus* a *P. aeruginosa*; operativní evidence výzkumného projektu,
- antioxidační účinky  $\alpha$ -tokoferolu v podmínkách redoxního stresu vytvořeného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hodnocené s využitím myších 3T3 fibroblastů a keratinocytů; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,
- hodnocení enkapsulační kapacity pevných lipidických částic (SLP) vytvořených z 1-tetradekanolu a Tween 20 pro gentamycin; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,
- hodnocení enkapsulační kapacity pevných lipidických částic (SLP) vytvořených z 1-tetradekanolu a Tween 20 pro  $\alpha$ -tokoferol; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,
- hodnocení kinetiky uvolnění gentamycinu z pevných lipidických částic (SLP) formulovaných z 1-tetradekanolu a Tween 20 s využitím LC-MS; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu,

- statický test funkcionalizačního zařízení; laboratorní testování; operativní evidence,
- hodnocení opakovatelnosti syntézy lipidických částic tvořených podle interní metodiky s využitím funkcionalizačního zařízení; laboratorní testování; operativní evidence výzkumného projektu;

Doprovodné obrázky:



*Obrázek P1.1: Ověření citlivosti požitých bakteriálních kmenů na gentamycin bylo důležité zejména pro eliminaci falešně negativních výsledků, pokud by se např. jednalo o „multiple drugs resistant“ (MDR) kmeny.  
Zdroj: ING MEDICAL s.r.o.*



*Obrázek P1.2: Testování biokompatibility nosičů s využitím kontaktní kultivace fibroblastů, výsledky v 1. a 10. den pokusu*

*NF – nosiče tvořené převážně nanovláknky z polykaprolaktonu (>90%),  
 NF/MF – nosiče tvořené směsí nanovláken a mikrovláken z polykaprolaktonu,  
 MF – nosiče tvořené převážně mikrovláknky z polykaprolaktonu (>90%),*

*PF – porézní nosiče pro buněčné kultivace*

*Zdroj: Grade Medical s.r.o. (FV 30086)*



**PŘÍLOHA Č. 2:**  
**PŘEHLED TESTOVÁNÍ**

	PCL_AC	PCL_CHE	PCL_AA
<b>Kontrolní charakterizace nosiče</b>	OK	OK	<u>OK</u>
<b>Cytotoxicita (MTT 3T3 fibroblasty)</b>	<u>NOK</u>	OK	OK

*Tabulka P2.1: Přehled provedených testování nosičů (kontrolní charakterizace a test in vitro).  
 OK – vyhovující výsledek, NOK – nevyhovující výsledek  
 Cytotoxicita viz též tabulka P2.3.*

	GEN 1	GEN 1.5	GEN 2
<b>Kontrolní charakterizace SLP</b>	OK	OK	OK
<b>Kinetika uvolnění</b>	~	OK	~

*Tabulka P2.2: Přehled provedených testování SLP (kontrolní charakterizace).  
 OK – vyhovující výsledek, NOK – nevyhovující výsledek*

	PCL_AC GEN 1	PCL_AC GEN 1.5	PCL_AC GEN 2	PCL_CHE GEN 1	PCL_CHE GEN 1.5	PCL_CHE GEN 2	PCL_AA GEN 1	PCL_AA GEN 1.5	PCL_AA GEN 2
Antibakteriální účinnost STAU								OK	
Antibakteriální účinnost PSAE								OK	
Inhibice biofilmu PSAE+STAU								OK	
Cytotoxicita (MTT 3T3 fibroblasty)	-	NOK	-	-	OK	-	-	OK	-

Tabulka P2.3: Přehled provedených testování variant krytu rány *in vitro*.

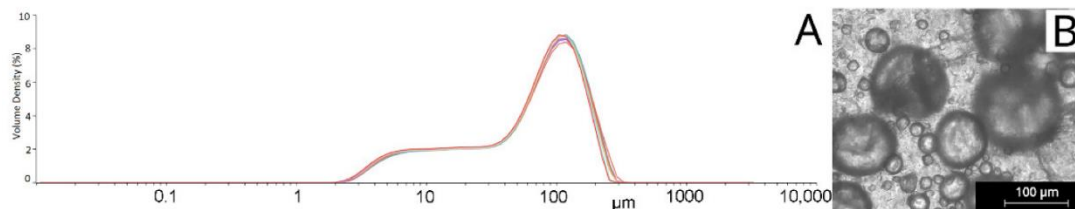
OK – vyhovující výsledek, NOK – nevyhovující výsledek.

	PCL_AA BAC	PCL_AA BAC GEN 1,5	PCL_AA BAC GEN 1,5 + ViTE	PCL_AA - GEN 1,5 + ViTE
Myší model	K	K	K	K
Histologická analýza	K	K	K	K

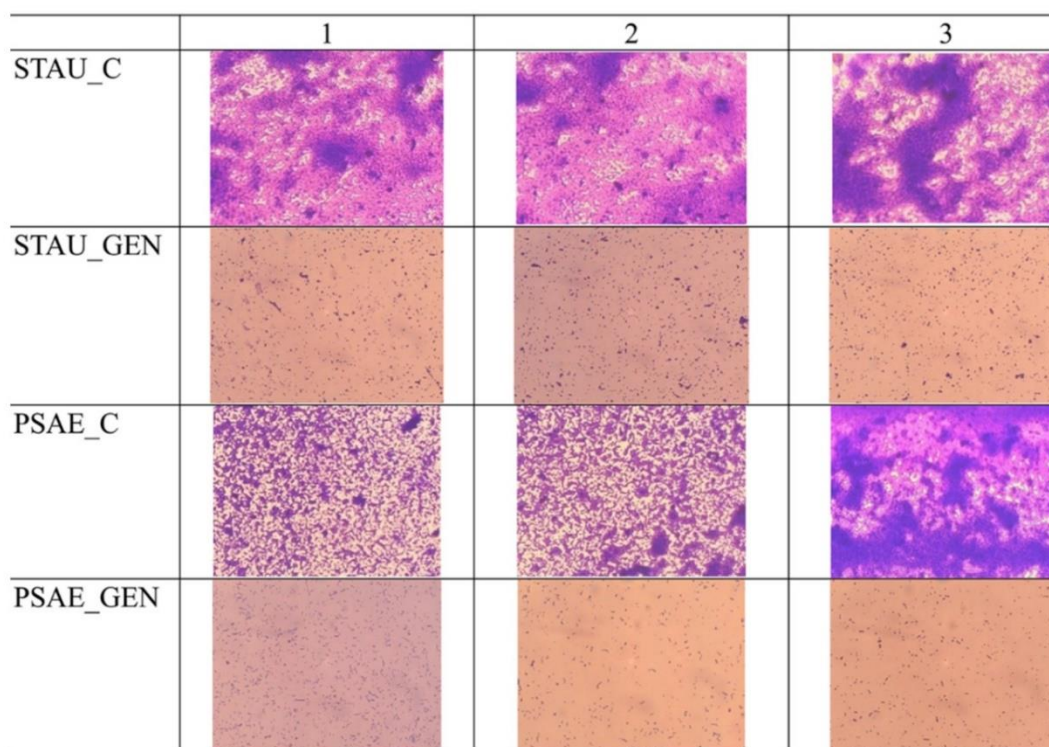
Tabulka P2.4: Přehled testování variant krytu rány *in vivo*.

K – kvantitativní vyhodnocení (viz diskuse výsledků).

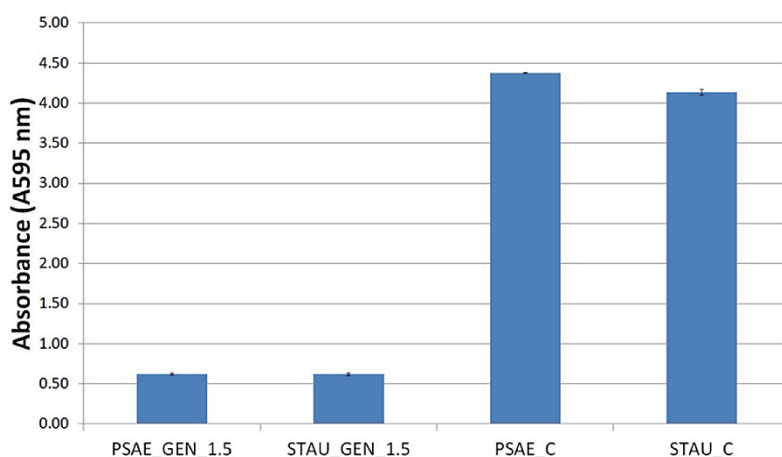
**PŘÍLOHA Č. 3:**  
**VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ – DOPLŇUJÍCÍ ÚDAJE**



*Obrázek P3.1: Analýza velikosti SLP ve vzorku GEN\_1.5  
 (A) Distribuce velikosti SLP měřená metodou SLS  
 (B) Emulze SLP před imobilizací  
 (Braňka, a další, 2022)*

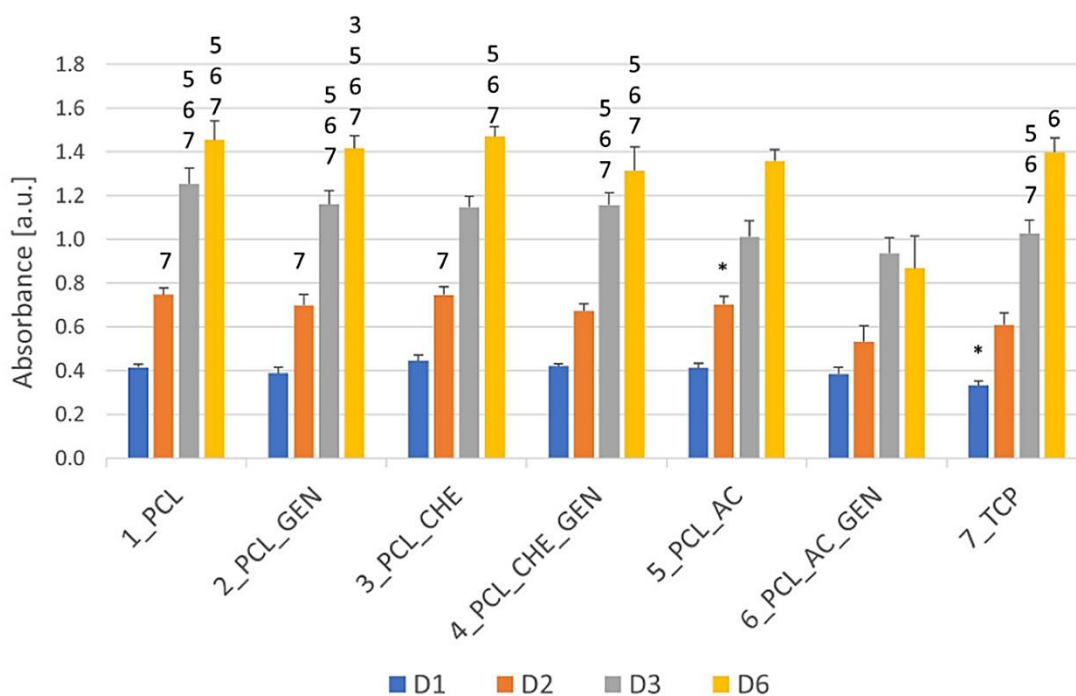


*Obrázek P3.2: Analýza eradikace biofilmu pomocí skenování inverzním světelným mikroskopem.  
 Testován biofilm tvořený bakteriálními kmeny *P. aeruginosa* (PSAE) a *S. aureus* (STAU).  
 Jako nosič byla využít nanovlákněný substrát PCL\_AA.  
 Vzorky s antibakteriálními SLP (SLP\_GEN\_1,5, na obrázku 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 triplikátech – výsledky uvedeny ve sloupcích.  
 (Braňka, a další, 2022)*



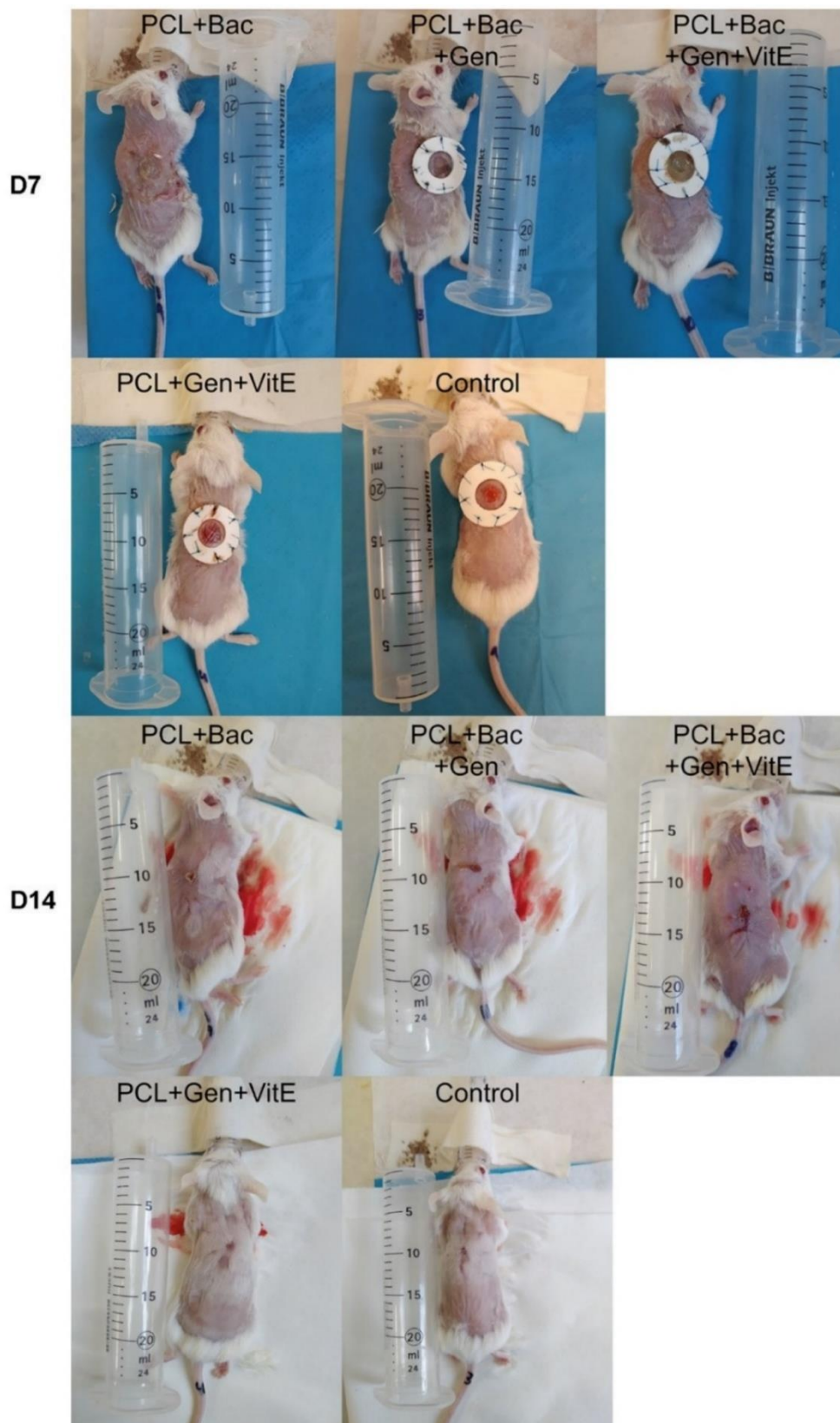
Obrázek P3.3: Spektrofotometrická analýza eradikace bakteriálního biofilmu. Použitá suspenze GEN\_1.5 na biofilmy tvořené bakteriemi *P. aeruginosa* (PSAE) a *S. aureus* (STAU). (Braška, a další, 2022)

### Metabolic activity of 3T3 fibroblasts from extracts



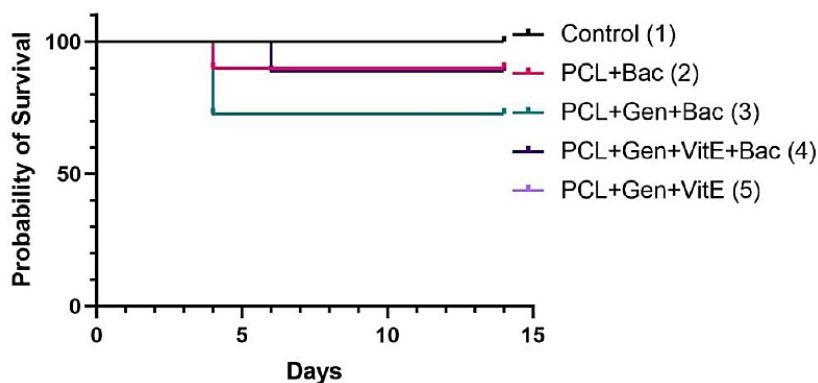
Obrázek P3.4: Výsledky testování cytotoxicity extraktů metodou MTT s využitím 3T3 fibroblastů. Hodnoceny varianty nosiče bez SLP, tj. nanovláčkové substráty z PCL připravené s použitím různých rozpouštědel (PCL\_AA v grafu jako PCL, PCL\_CHE, PCL\_AC) a též nosiče s imobilizovanou formulací SLP GEN\_1,5 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 se všemi ostatními vzorky, číslo představuje číslo vzorku. (Braška, a další, 2022)





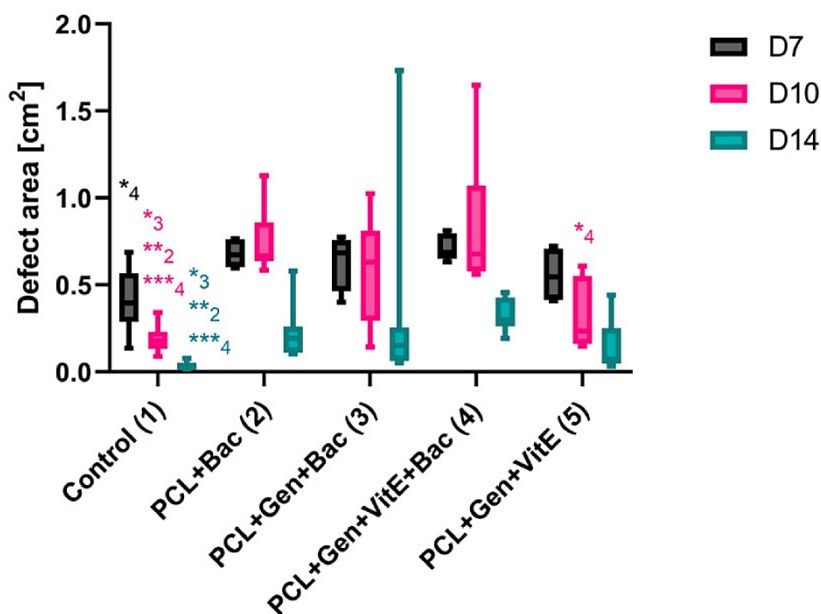
Obrázek P3.5: Fotodokumentace hojení kožních defektů během experimentu. Indukované rány infikovány *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Bac) nebo bez bakterií. Rány ošetřené vzorky nosiče PCL\_AA (PCL) bez funkcionalizace, funkcionalizovanými suspenzemi SLP\_GEN\_1,5 s gentamycinem (Gen) anebo suspenzí SLP\_VitE s  $\alpha$ -tokoferolacetátem (VitE). Kontrola (Control) ošetřena jen sekundárním krytím. Hodnoceno 7. a 14. den po operaci. (Brašková, a další, 2022)

### Survival of Murine Chronic Wound Model

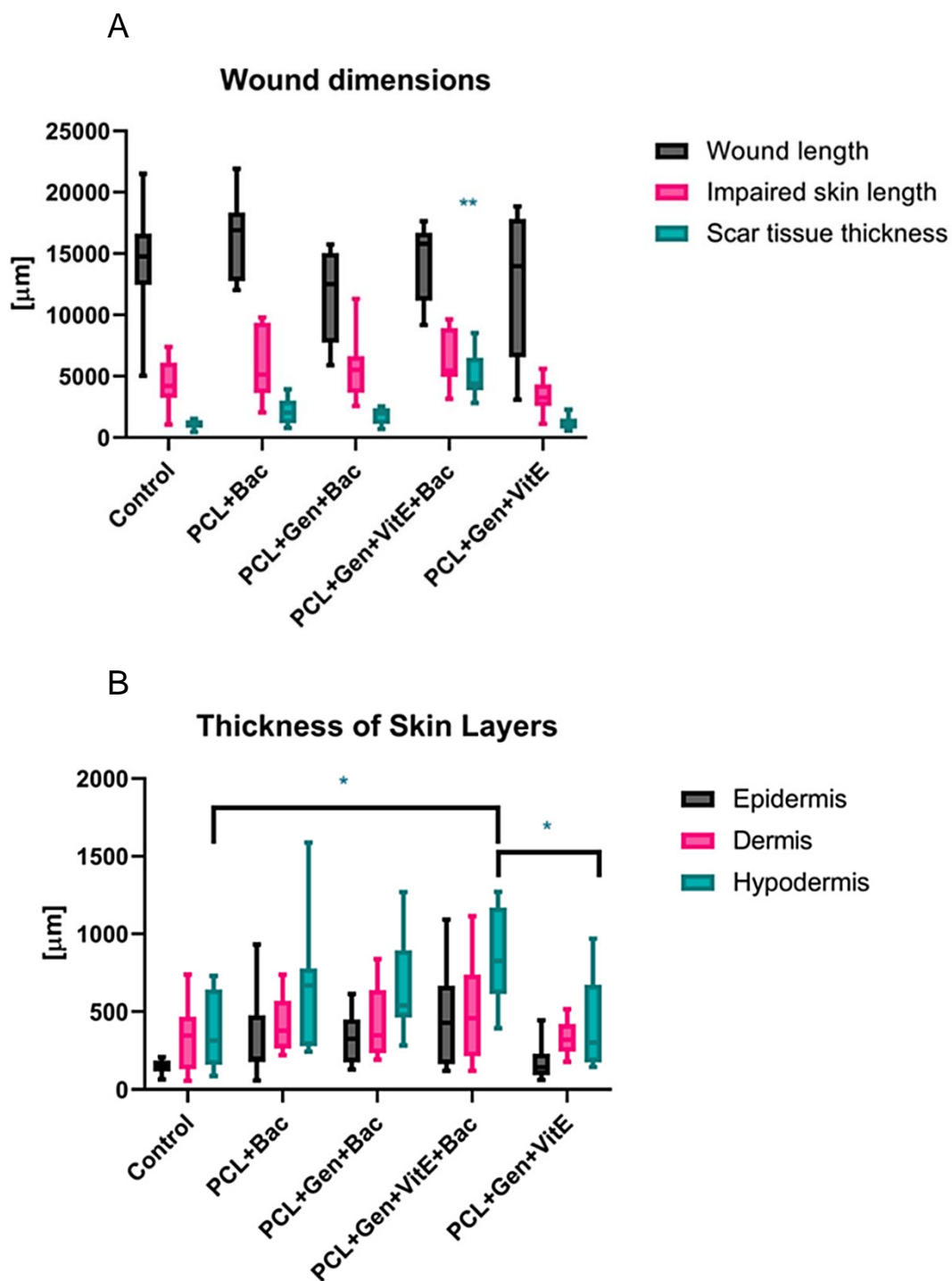


Obrázek P3.6: Analýza přežití zvířat v experimentu podle Kaplan-Meiera. Myši model chronického defektu ve 14denním experimentu in vivo (% živých zvířat). (Braňka, a další, 2022)

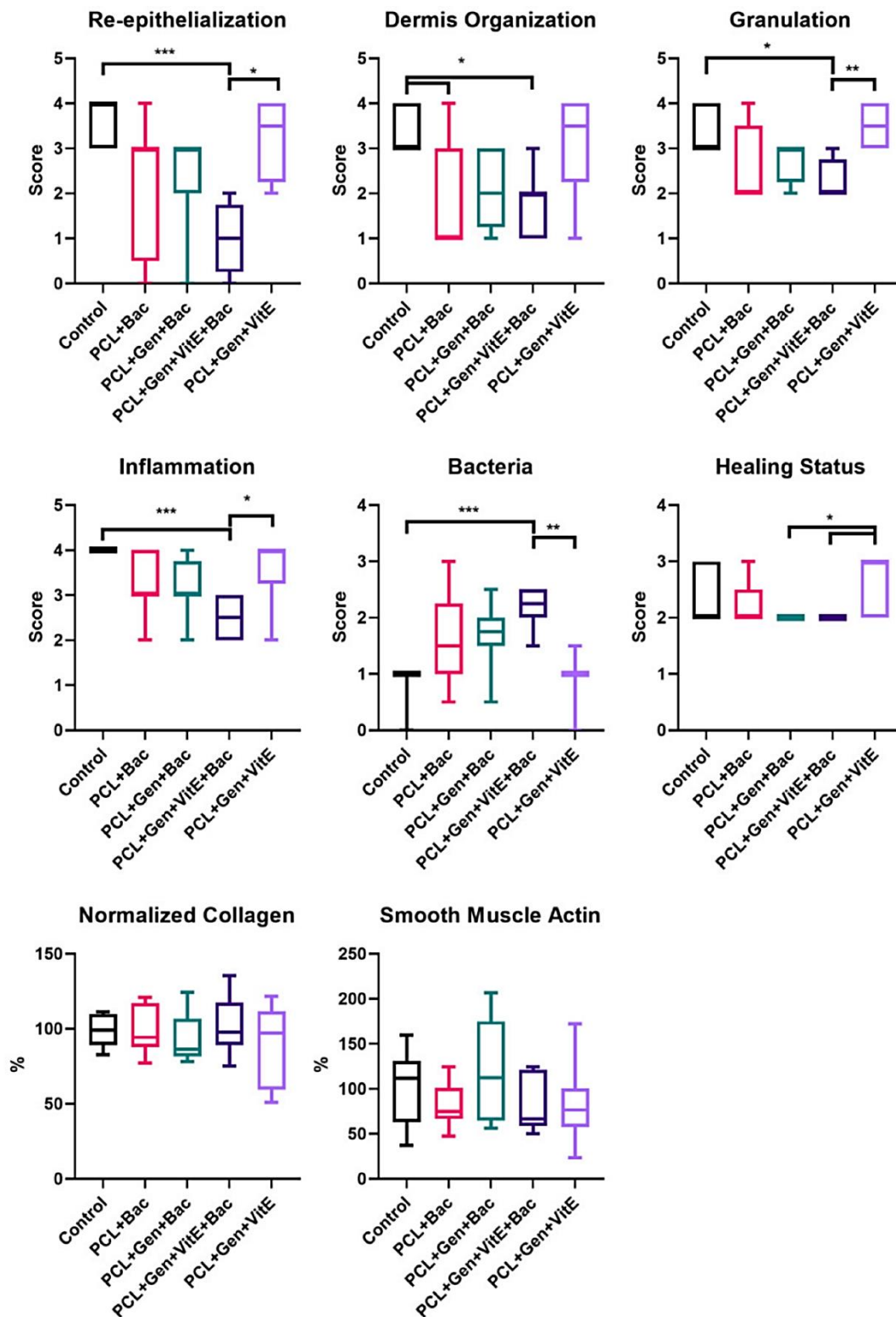
### Size of the skin defect



Obrázek P3.7: 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  $\alpha$ -tokoferolem (VitE). Kontrola (Control) ošetřena jen sekundárním krytím. Statistická významnost byla označena jako číslo reprezentující skupinu. Významný rozdíl \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (Braňka, a další, 2022)



Obrázek P3.8: Histologické hodnocení nově vytvořené tkáně zvolenou metodikou. 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  $\alpha$ -tokoferolem (VitE). Kontrola (Control) ošetřena jen sekundárním krytím. Metodika hodnocení podle tabulky 8. Významný rozdíl \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . (Braška, a další, 2022)



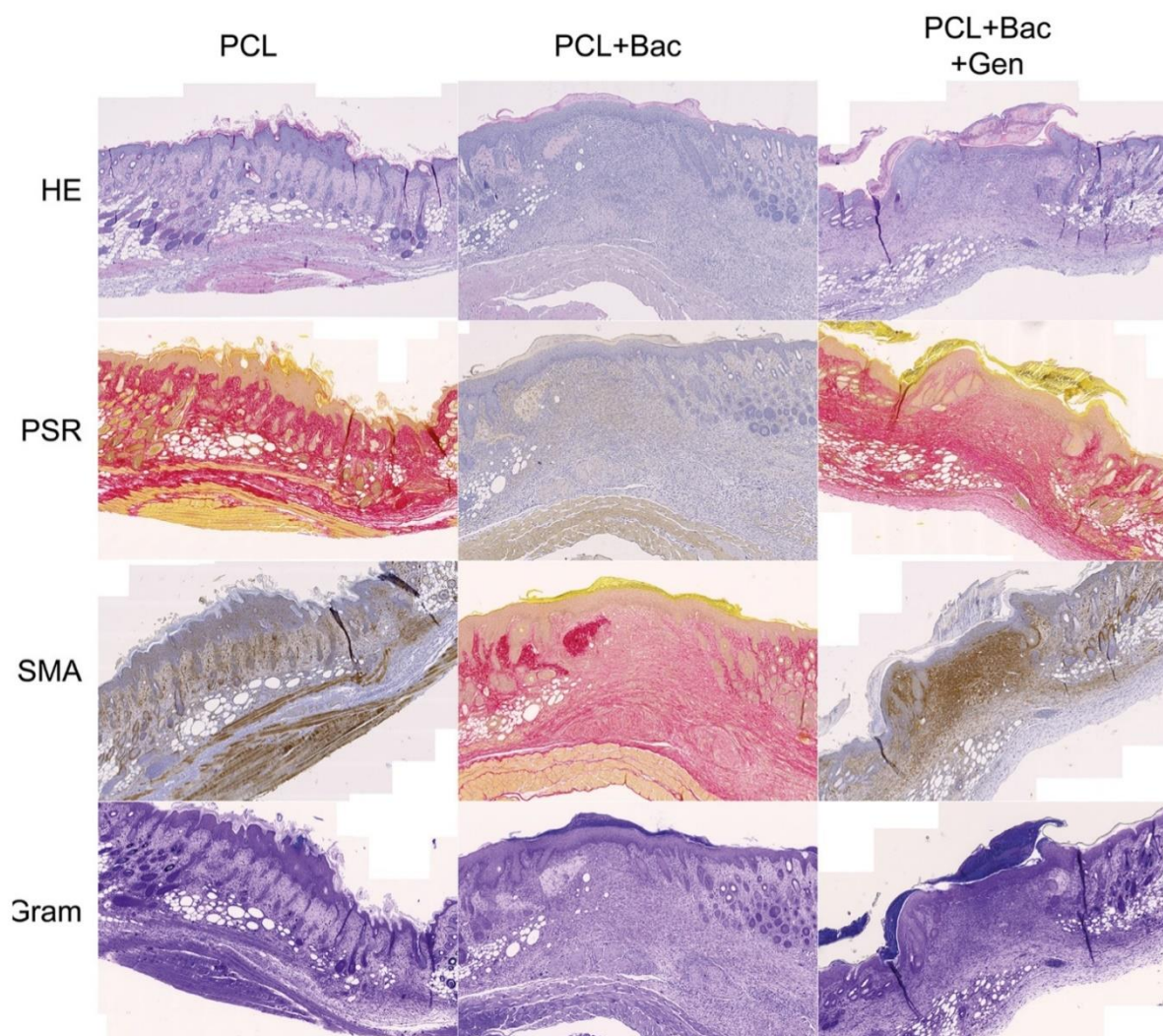
Obrázek P3.9: Histologické hodnocení jednotlivých aspektů, charakterizujících hojení rány, podle zvolené metodiky.

Indukované rány infikovány *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Bac) nebo bez bakterií.

Rány ošetřené vzorky nosiče PCL\_AA (PCL) bez funkcionalizace, funkcionalizovanými suspenzemi SLP\_GEN\_1,5 s gentamycinem (Gen) anebo suspenzemi SLP\_VitE s  $\alpha$ -tokoferolem (VitE).

Kontrola (Control) ošetřena jen sekundárním krytím.

Metodika hodnocení podle tabulky 8. Významný rozdíl \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (Braňka, a další, 2022)



Obrázek P3.10: Histologické hodnocení nově vytvořené kůže.

Tkáň 5 × 3,33 cm, měřítko 500 μm.

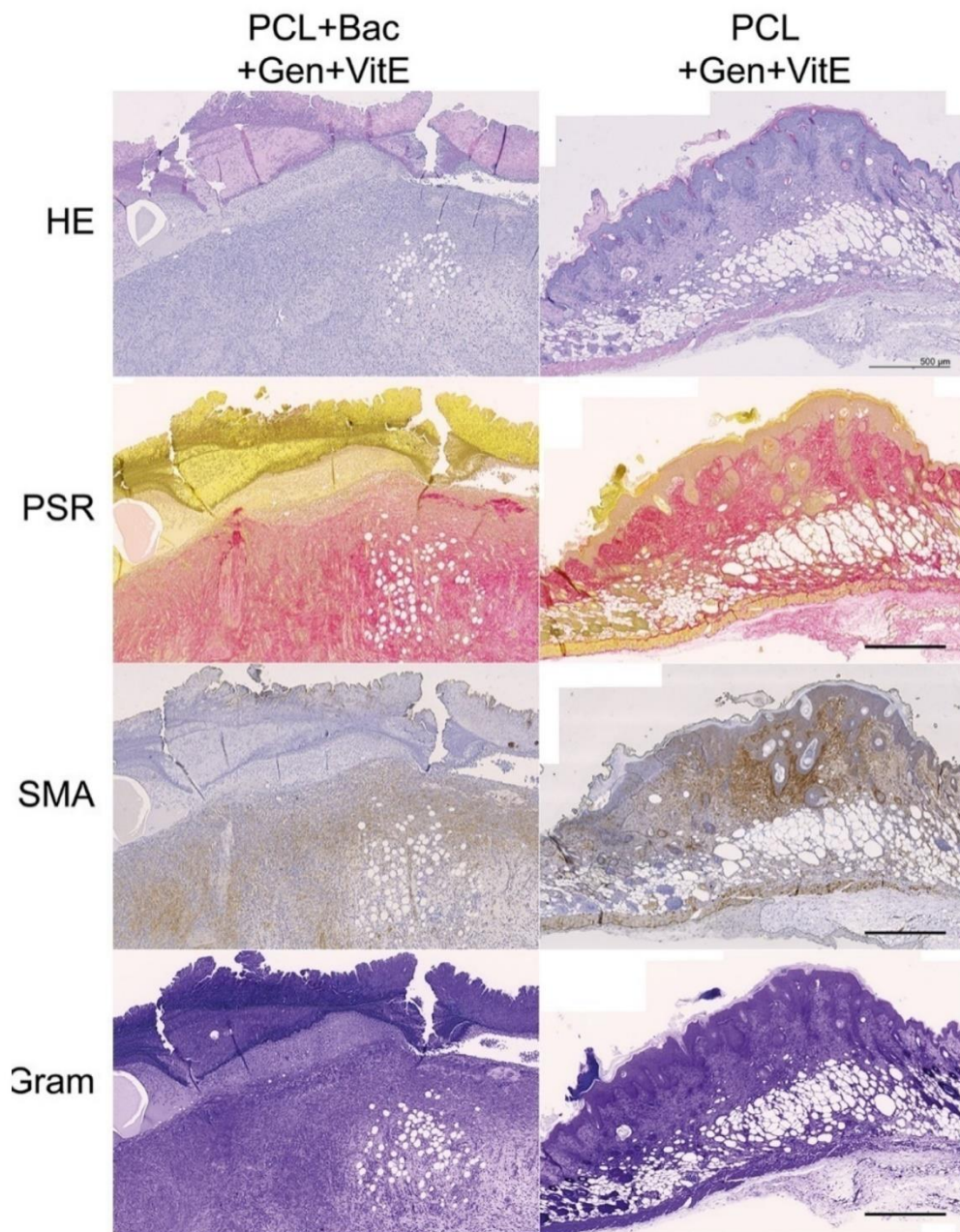
Indukované rány infikovány *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Bac) nebo bez bakterií.

Rány ošetřené vzorky nosiče PCL\_AA (PCL) bez funkcionalizace, funkcionalizovanými suspenzí SLP\_GEN\_1,5 s gentamycinem (Gen).

HE – hematoxylin – eosin, PSR – pikrosirová červeň, SMA – aktin alfa hladkého svalstva.

Pokračování na obr. P3.11.

(Braška, a další, 2022)



Obrázek P3.11: Histologické hodnocení nově vytvořené kůže.  
Tkáň 5 × 3,33 cm, měřítko 500 μm.

Indukované rány infikovány *S. aureus* a *P. aeruginosa* (Bac) nebo bez bakterií.  
Rány ošetřené vzorky nosiče PCL\_AA (PCL) funkcionalizovanými suspenzemi SLP\_GEN\_1,5  
s gentamycinem (Gen) a suspenzí SLP\_VitE s  $\alpha$ -tokoferolem (VitE).  
HE – hematoxylin – eosin, PSR – pikrosirová červec, SMA – aktin alfa hladkého svalstva.  
Pokračování obrázku P3.10.  
(Brašková, a další, 2022)