

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 951

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/46 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

A61F 13/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2024-42004**
(22) Přihlášeno: **30.05.2024**
(47) Zapsáno: **18.06.2024**

(73) Majitel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno, Veveří, CZ
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ

(72) Původce:
doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D., Měnin, CZ
Ing. Eva Černá, Brno, Kohoutovice, CZ
Ing. Jana Brtníková, Ph.D., Brno, Komín, CZ
Mgr. Lukáš Vacek, Ph.D., Brno, Staré Brno, CZ
prof. MUDr. Filip Růžička, Ph.D., Brno, Soběšice, CZ
prof. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA, LL.M., Syrovice, CZ
prof. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D., Blansko, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitého vzoru:
**Antimikrobiální polysacharidový
transparentní film pro léčbu raných infekcí**

CZ 37951 U1

Antimikrobiální polysacharidový transparentní film pro léčbu raných infekcí

Oblast techniky

5

Předmětem technického řešení je hydrogelový kryt určený pro léčbu infikovaných kožních defektů s možností sledování stavu rány, připravený z biokompatibilních a biodegradabilních polymerů, který je obohacen antimikrobiálními látkami.

10

Dosavadní stav techniky

Hojení kožních ran je komplexní proces, který zahrnuje interakci velkého množství buněk a enzymových systémů. Samotné hojení se za fyziologických i patofyziologických podmínek sestává ze čtyř navzájem se překrývajících fází: hemokoagulační, inflamatorní, proliferací a remodelační. Tento proces může být komplikován celou řadou vlivů ať již vnějších nebo vnitřních. Nejčastější příčinou narušení procesu hojení je přítomnost mikroorganismů v ráně, které vedou ke zpomalení nebo úplnému zastavení fázového postupu uzávěru rány, tedy perzistenci inflamatorní fáze. To vede k riziku rozvoje obtížně se hojících nebo nehojících se chronických ran. Aby se těmto nepříznivým vlivům zabránilo již v raném stádiu hojení, je vhodné používat antimikrobiální kryty ran, které již od aplikace na ránu potlačují a eliminují množství mikroorganismů a riziko rozvoje a perzistence infekce.

Použití na míru vyrobených hydrogelových krytů ran významně zvyšuje efektivitu hojení, jelikož materiál velmi dobře napodobuje chování kůže (pevnost a pružnost), izoluje okolí rány od vnějších vlivů a zamezuje narušení procesu hojení, například vznikem infekce. Biomateriály představují vhodnou volbu pro výrobu kožních krytů vzhledem k jejich přirozeným vlastnostem, které zahrnují biokompatibilitu, biodegradabilitu, vhodné mechanické vlastnosti, propustnost pro plyny, sorpci a retenci vody, což z nich činí ideální materiál pro výrobu krytů ran a náhrad ve tkáňovém inženýrství. Polysacharidy jsou vhodným materiálem pro výrobu kožních krytů nejen z hlediska svých fyzikálně-chemických a biologických vlastností, ale i z hlediska dostupnosti, obnovitelnosti a finanční nenáročnosti.

Ideální kožní kryt mimikující kůži u ztráty jejího kontinua by měl být plně biokompatibilní, netoxický a částečně, či plně biodegradovatelný. Pod kožním krytem vzniká nová tkáň, která by neměla adherovat ke krytu a stav hojení rány by mělo být možné skrze materiál krytu sledovat. Kromě odpovídajícího složení, by měl mít kryt mechanické a elastické vlastnosti podobné jako původní kůže a také dostatečné sorpční a retenční vlastnosti. Neméně důležitým faktorem je schopnost materiálu uvolňovat bioaktivní látku. Uvolňování těchto sloučenin a fyzikální vlastnosti krytu jsou významně ovlivňovány vnitřní a vnější strukturou materiálu. V současné době se obdobné aktivní molekuly používají zejména separátně, a to ve formě roztoků, mezi které lze zařadit například Septoderm, Octenisept, Septonex, či roztoky obsahující jód jako například Betadine a Inadine®, při jejich aplikaci je však riziko vzniku alergické reakce. Hydrogelové kryty používané v dnešní době obsahují přidané antimikrobiální složky, převážně se však jedná o ionty stříbra, které sice brání potenciálnímu vzniku infekce nicméně mohou způsobovat alergické reakce. Mezi antiseptické zdravotnické prostředky obsahující stříbro lze zařadit Atrauman® Ag nebo Aquacel®, od používání těchto materiálů se však v posledních letech začíná ustupovat, a to právě z důvodů čím dál častějšího výskytu alergických reakcí. Mezi transparentní hydrogelové kryty, které je momentálně dostupné na trhu, radíme Tegaderm® či Mepore®, které zajišťují jen mechanickou ochranu rány před vnější kontaminací a bakteriemi.

Podstata technického řešení

Předmětem tohoto technického řešení je transparentní hydrogelový kryt určený na povrchové rány, který obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná, a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, a dále plastifikátor glycerol. Hmotnostní poměr přírodního a syntetického polymeru je v rozmezí 1:1 až 1:8. Hmotnostní poměr polymerů (pryskyřice karaya s polyvinylalkoholem a/nebo polyethylenglykolem) vůči glycerolu je v rozmezí 1:1 až 1:6. Hydrogelový kryt je dále obohacen chemickými či biologickými antimikrobiálními látkami, tedy antiseptiky nebo bakteriofágy.

Pryskyřice karaya (angl. gum karaya) je biokompatibilní, biodegradabilní a má i mírné antimikrobiální vlastnosti. Pryskyřice karaya, popřípadně deacetylovaná, je používána v potravinářství pod kódem E416.

Pryskyřice karaya je přírodní vysokomolekulární polysacharid, který se získává ve formě pryskyřice ze stromu *Sterculia urens*, jedná se tedy o dostupný a obnovitelný zdroj materiálu s přirozenými antimikrobiálními vlastnostmi. Pryskyřice karaya je biologicky odbouratelný, netoxický pro lidský organismus, biokompatibilní, částečně degradabilní a resorbovatelný biopolymer, který je ve svém nativním stavu nerozpustný, avšak botnající v přítomnosti vody. Plný potenciál pryskyřice karayi lze využít po jeho chemické úpravě deacetylací, která podpoří rozpustnost polymeru, tedy jeho afinitu k vodě (deacetylaci lze ověřit pomocí infračervené spektroskopie). Úplnou deacetylací se získá ve vodě rozpustný biopolymer. Molární hmotnost deacetylované pryskyřice karayi je obvykle v rozmezí 2000 až 16000 kg/mol. Molární hmotnost deacetylované pryskyřice karayi lze stanovit pomocí metody SEC-MALS.

Polyvinylalkohol a polyethylenglykol jsou syntetické vodorozpustné polymery, které tvoří pevnou a elastickou trojrozměrnou polymerní síť, která zlepšuje mechanické vlastnosti.

Polyvinylalkohol je ve vodě rozpustný syntetický polymer vyráběný alkalickou hydrolyzou polyvinylacetátu. S výhodou se použije polyvinylalkohol v rozsahu molárních hmotností 10 až 130 kg/mol. V biomedicínských aplikacích je využíván pro své vhodné mechanické vlastnosti (vysoký elastický modul a mechanickou pevnost), chemickou stabilitu, biokompatibilitu, netoxicitu pro lidský organismus a schopnost tvořit zesíťovanou polymerní síť schopnou pojmout velké množství vody bez ztráty svých mechanických vlastností. V biomedicínských aplikacích je používán jako nosič léčiv, scaffold, biosenzor, nebo kryt ran.

Polyethylenglykol je syntetický ve vodě rozpustný polymer využívaný pro svou netoxicitu, a biokompatibilitu v biomedicínském odvětví jako systém pro dopravu léčiv, v tkáňovém inženýrství a k modifikaci povrchů. S výhodou se využívá nízkomolekulární polyethylenglykol v rozsahu molárních hmotností 200 až 600 g/mol, který je v bezvodé formě tekutý. Polyethylenglykol má aktivní hydroxylovou skupinu na obou koncích polymerního řetězce a je hojně využíván, protože má schopnost tvořit funkční hydrogely v kombinaci s ostatními polymery. Mechanické schopnosti a botnání jsou ovlivněny molární hmotností polymeru, nízkomolekulární PEG zvyšuje botnání hydrogelů a pevnost v tlaku.

Plastifikátor glycerol napomáhá k elasticitě a transparentnosti materiálu. Jedná se o ve vodě rozpustnou a biokompatibilní chemickou molekulu. Glycerol je nízkomolekulární sloučenina, která je hojně používána jako plastifikátor, humektant, či pro své nemrznoucí vlastnosti jako kryoprotektivum. Ve vyšších koncentracích vykazuje glycerol baktericidní a virucidní aktivitu.

V hydrogelovém krytu mohou být obsažena antiseptika vybraná ze skupiny benzalkoniumchlorid, jódovaný povidon, karbathopendecinium-chlorid, peroxid vodíku, oktenidin dihydrochlorid, a chlorhexidin.

Ve výhodném provedení je antiseptikem obsaženým v hydrogelovém krytu oktenidin dihydrochlorid, což je antiseptikum s nescifickým efektem, které efektivně eliminuje mikrobiální infekci bez možnosti vzniku rezistence. Je účinný proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím, ale také vůči kvasinkám a plísním.

5

Zlepšení antibakteriálních vlastností hydrogelového krytu může být také docíleno využitím biologických agens, které jsou schopny elimtovat i rezistentní druhy mikroorganismů. Bakteriofágy nebo také fágy, jsou viry napadající bakterie, kterých je využíváno v rámci biologické léčby pro takzvanou fágovou terapii. Využití fágové terapie je možností, jak efektivně potlačit a zamezit infekci s minimálním rizikem vzniku rezistence. Hlavní podstatou fágové terapie je eliminace specifického druhu, popř. kmene bakterie lytickým působením. Během tohoto procesu jsou fágy schopny se množit a eradikovat i těžké infekce bez vedlejších negativních efektů, které jsou běžné u antibiotik. Některé typy fágů jsou schopné cílit na specifické kmény druhu *Staphylococcus aureus*, gram-pozitivní bakterie rezistentní vůči široké škále antibiotik a odpovědné za závažná onemocnění zahrnující např. kožní abscesy, či infekce ran. Aby bylo možné léčit tyto rány, je nutné najít vhodný kmen fága, jeho optimální koncentraci a vhodný nosič, který fágový kmen nebo fágový koktejl (směs různých kmenů fágů) bude vhodně komplementovat a působit společně v ráně. Například 812K1/420 je dsDNA fág vhodný pro léčbu stafylokokových infekcí, je biokompatibilní a netoxický pro organismus. Hydrogel podle technického řešení je tedy obzvláště výhodně obohacen jedním či více kmény fágů eliminujících kmény bakterií rodu *Staphylococcus*, což zahrnuje např. kmény fága K, fága Twort, fága JK2(=812K1/420), fága philPLA-RODI, fága 187 nebo fága SA97.

Hydrogelový kryt podle technického řešení je mechanicky pevný a elastický, ale zároveň hydrofilní a schopný absorbovat a udržet ve své struktuře velké množství tekutiny.

Hydrogelový kryt lze připravit sušením na vzduchu, případně za sníženého tlaku, například metodou lyofilizace.

Antiseptikum nebo bakteriofágy mohou být přidány do hydrogelu při jeho přípravě nebo mohou být adsorbovány na povrch hydrogelového krytu po jeho vysušení. S výhodou jsou adsorbovány na povrchu.

Na velkém animálním modelu (hluboká infekce kůže a měkkých tkání prasete, trvání experimentu po dobu 14 dní) byla potvrzena antimikrobiální účinnost krytu rány podle předkládaného technického řešení, který potlačil bakteriální infekci v celé ploše a hloubce defektu kůže a měkkých tkání, ale také urychlil hojení a regeneraci rány.

Pro ověření a hodnocení antimikrobiálního efektu předkládaného technického řešení byly zvoleny dvě metody, a to otisky z povrchu ran a bioptický odběr tkání ran. Obě tyto metody vykazaly snížení množství patogenu v ranách o 2 až 3 řády (z původních více než 6 až 7 log CFU/g tkáně a více než 1000 CFU/25 cm² povrchu rány) v průběhu dvoutýdenních experimentů. Konkrétně kryt s fágovým preparátem vykázal snížení množství patogenu ve tkáni o $2,5 \pm 0,7$ log CFU/g tkáně, což odpovídá úspěšné léčbě infekce (snížení pod 5 log CFU/g tkáně).

45

Příklady uskutečnění technického řešení

Chemikálie:

50

Deacetylovaná pryskyřice karaya byla získána z komerčních zdrojů. Její molární hmotnost byla ověřena metodou SEC (velikostně separační chromatografie) s MALS (multi-angle light scattering) detektorem HELEOS-II a RI (refractive index) detektorem Optilab T-rEX – oba instrumenty od společnosti Wyatt Technology. Jako mobilní fáze byly použita ultračistá voda s přídatkem 200 ppm azidu sodného. Specifický inkrement indexu lomu $dn/dc = 0,145$ ml/g byl

55

použit pro vyhodnocení výsledků. Pro separaci byly použity dvě kolony Ultrahydrogel Linear 300 x 8 mm společnosti Waters, průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min. Byla stanovena hmotnostní střední molární hmotnost $M_w = 3\ 800$ kg/mol.

- 5 Polyvinylalkohol byl získán z komerčních zdrojů, s molární hmotností deklarovanou výrobcem 90 kg/mol.

Polyethylen glykol byl získán z komerčních zdrojů, s molární hmotností deklarovanou výrobcem 400 g/mol (PEG400).

10

Příklad A

Lyofilizovaný hydrogelový kryt na bázi pryskyřice karaya a polyvinylalkoholu 1:1

- 15 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu v hmotnostním poměru 8:8:1:50. Vodné roztoky pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu o hmotnostním poměru 1:1, polyethylenglykol a glycerol byly homogenizovány po dobu 24 hodin při 23 °C a následně centrifugovány pro odstranění vzduchových bublin. Homogenní roztok byl následně vylit do plastových misek
- 20 o rozměru 5 x 5 cm, zmrazen při -30 °C a poté lyofilizován při -35 °C při tlaku 1 mBar po dobu 15 hodin. Následovalo sekundární sušení při 25 °C pod tlakem 0,01 mBar (1 mBar = 100 Pa).

Příklad B

- 25 Lyofilizovaný hydrogelový kryt na bázi pryskyřice karaya a polyvinylalkoholu 1:2

Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu v hmotnostním poměru 5:10:1:50. Vodné roztoky pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu o hmotnostním poměru 1:2, polyethylenglykol a glycerol byly homogenizovány po dobu 24 hodin při 23 °C a následně centrifugovány pro odstranění vzduchových bublin. Homogenní roztok byl následně vylit do plastových misek

30 o rozměru 5 x 5 cm, zmrazen při -30 °C a poté lyofilizován při -35 °C při tlaku 1 mBar po dobu 15 hodin. Následovalo sekundární sušení při 25 °C pod tlakem 0,01 mBar.

- 35 Příklad 1

Hydrogelový lyofilizovaný kryt s přídavkem antiseptika oktenidinu dihydrochloridu

- 40 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu. Příprava materiálu byla stejná jako u příkladu A. Následně bylo na lyofilizované hydrogelové kryty o dané ploše sorbováno antiseptikum oktenidin dihydrochlorid ve finálních koncentracích 0,05 % hmotn./cm² rozpuštěné v absolutním ethanolu. Vzorky byly poté sušeny při 60 °C po dobu 2 dnů.

- 45 Příklad 2

Hydrogelový lyofilizovaný kryt s přídavkem antiseptika oktenidinu dihydrochloridu

- 50 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu. Příprava materiálu byla stejná jako u příkladu B. Následně bylo na lyofilizované hydrogelové kryty o dané ploše sorbováno antiseptikum oktenidin dihydrochlorid ve finálních koncentracích 0,1 % hmotn./cm² rozpuštěné v absolutním ethanolu. Vzorky byly poté sušeny při 60 °C po dobu 2 dnů.

Příklad 3

Hydrogelový lyofilizovaný kryt s přídavkem antiseptika oktenidinu dihydrochloridu

- 5 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyetylen glykolu a glycerolu. Příprava materiálu byla stejná jako u příkladu B. Následně bylo na lyofilizované hydrogelové kryty o dané ploše sorbováno antiseptikum oktenidin dihydrochlorid ve finálních koncentracích 0,05 % hmotn./cm² rozpuštěné v absolutním ethanolu. Vzorky byly poté sušeny při 60 °C po dobu 2 dnů.

10

Příklad 4

Hydrogelový lyofilizovaný kryt s přídavkem antiseptika oktenidinu dihydrochloridu

- 15 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyetylen glykolu a glycerolu. Příprava materiálu byla stejná jako u příkladu A. Následně bylo na lyofilizované hydrogelové kryty o dané ploše sorbováno antiseptikum oktenidin dihydrochlorid ve finálních koncentracích 0,1 % hmotn./cm² rozpuštěné v absolutním ethanolu. Vzorky byly poté sušeny při 60 °C po dobu 2 dnů.

20

Příklad 5

Hydrogelový lyofilizovaný kryt s přídavkem fágového preparátu

- 25 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyetylen glykolu a glycerolu. Příprava materiálu byla stejná jako u Příkladu A. Poté byl na lyofilizovaný hydrogelový kryt o rozměru 5 x 5 cm nasorbován 1 ml fágového preparátu (kmen 812K1/420) v koncentraci 10⁸ PFU/ml a kryt byl připraven na přímou aplikaci na ránu.

30

Příklad 6

Hydrogelový lyofilizovaný kryt s přídavkem fágového preparátu

- 35 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyetylen glykolu a glycerolu. Příprava materiálu byla stejná jako u k Příkladu A. Poté byl na lyofilizovaný hydrogelový kryt o rozměru 5 x 5 cm nasorbován 1 ml fágového preparátu (kmen 812K1/420) v koncentraci 10⁹ PFU/ml a kryt byl připraven na přímou aplikaci na ránu.

40

Příklad 7

Hydrogelový lyofilizovaný kryt s přídavkem fágového preparátu

- 45 Hydrogelový kryt je založen na lyofilizovaném polymerním roztoku z deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyetylen glykolu a glycerolu. Příprava materiálu byla stejná jako u Příkladu B. Poté byl na lyofilizovaný hydrogelový kryt o rozměru 5 x 5 cm nasorbován 1 ml fágového preparátu (kmen 812K1/420) v koncentraci 10⁸ PFU/ml a kryt byl připraven na přímou aplikaci na ránu.

50

Příklad 8

- Hydrogelové kryty připravené v příkladech A a B byly podrobeny dynamické mechanické analýze pro testování maximální pevnosti materiálu a jeho prodloužení v hydratovaném stavu. Měření bylo prováděno deformačním testem, při kterém byly vzorky nastříhány na rozměr 0,5 x 3 cm a před

55

- každým testem byla změřena i tloušťka vzorku (0,50 až 1,00 mm). Základní poloha držáku byla nastavena na 0,5 cm a z této vzdálenosti byly provedeny všechny měření. Vzorky byly hydratovány po dobu 5 až 10 minut při teplotě 37 °C přímo v přístroji ve speciální vestavěné komoře. Všechna měření byla vynesena do grafu tahovými křivkami, které znázorňují vztah napětí vůči prodloužení.
- 5 Měření byla prováděna na přístroji RSA-G2 od TA Instruments Inc. (USA).

Tabulka 1: Porovnání výsledků mechanických vlastností hydrogelových krytů: vliv složení.

Označení příkladu	Složení Karaya/PVA	Maximální pevnost	Maximální prodloužení
		kPa	%
Příklad A	1/1	25,1	139,1
Příklad B	1/2	128,7	148,1

- 10 Z Tabulky 1 vyplývá, že vliv složení výrazně ovlivňuje mechanické vlastnosti hydrogelových krytů. Vyšší obsah polyvinylalkoholu, zejména v hydratovaném stavu, kdy hydrogelová síť expanduje, významně zvyšuje pevnost materiálu a tím i její rezistenci vůči porušení, či roztrhnutí. Glycerol v hydrogelu působí jako plastifikátor, v kombinaci s polyvinylalkoholem tvoří synergii, která zvyšuje nejen pevnost v tahu, ale i maximální prodloužení (Příklad B). Hydrogel z Příkladu A
- 15 obsahuje nižší množství polyvinylalkoholu, které významně ovlivnilo maximální pevnost, která byla redukována v porovnání s ostatními příklady, nicméně, maximální prodloužení je porovnatelné s Příkladem B.

Příklad 9

- 20 Hydrogelové kryty připravené v příkladech A, B a příkladech 1 až 4 byly podrobeny analýze, která determinuje sorpční kapacitu hydrogelu a jeho schopnost si kapalinu ve struktuře ponechat. Měření probíhalo gravimetrickou metodou, kdy byl vzorek o rozměru 1x1 cm ponořen do fyziologického roztoku (0,9 hmotn. % NaCl) a měřen v určitých intervalech po dobu 90 minut při 37 °C, teplotě lidského těla. Sorpční kapacita byla vypočítána vzorcem:
- 25

$$\text{sorpční kapacita (\%)} = \frac{w_s - w_d}{w_d} \cdot 100$$

- 30 kde w_d odpovídá hmotnosti suchého vzorku a w_s hmotnosti hydratovaného vzorku. Výsledky porovnávají původní hmotnost suchého vzorku vůči hydratovanému, který si uchovává více než 100 % své původní hmotnosti v podobě nasorbované kapaliny.

Tabulka 2: Srovnání výsledků sorpční kapacity jednotlivých vzorků: vliv složení a aditiv.

Označení příkladu	Čas (min)				
	1	10	40	60	90
	Sorpční kapacita (%)				
Příklad A	102,13	194,3	231,5	225,6	204,6
Příklad B	61,0	148,3	175,6	172,3	163,7
Příklad 1	100,3	171,3	163,9	153,7	131,5
Příklad 2	111,98	147,2	140,77	136,3	123,4
Příklad 3	55,5	129,6	154,3	153,5	149,1
Příklad 4	71,1	129,7	153,7	158,3	157,2

35

Z Tabulky 2 je patrné, že Příklady A, B mají rozdílnou schopnost absorbovat a udržet si ve své struktuře kapalinu. Tato schopnost je ovlivněna chemickým složením hydrogelů a také morfologií finálního materiálu. Absorpce kapaliny materiálem, při které nedochází k jeho degradaci, je jednou z hlavních vlastností potřebných pro mokré hojení ran. V tomto stavu si materiál dlouhodobě zachovává 3D strukturu, která zajišťuje vlhké prostředí pro dlouhodobé hojení kožních ran. U Příkladu A a B lze pozorovat, že materiál dosáhl maximální absorpce již po 40 minutách měření, a přestože jeho hmotnost časem pozvolně klesá, vzorek si zachovává svou strukturu a ztrácí hmotnost velice pozvolně. Příklady 1 až 4 mají v porovnání s Příklady A a B nižší sorpční schopnost způsobenou přítomností nasorbovaného antiseptika, které nijak neovlivňuje stabilitu hydrogelu.

Příklad 10

Hydrogelové kryty připravené v příkladech A, B a příklady 1 až 5 a 7 byly podrobeny testování z hlediska antimikrobiální aktivity vůči kmenům *S. aureus* (CCM 4750) a *E. coli* (CCM 3954) získaným z České sbírky mikroorganismů pro testování citlivosti vůči antimikrobiálním látkám. Testování citlivosti bylo provedeno podle standardů bujónovou mikrodiluční metodou podle norem EUCAST s určitými modifikacemi. Testované materiály byly testovány v triplicátech ve 24jamkové mikrotitrační destičce (JET BIOFIL, Guangzhou, Čína). Bakteriální kmeny byly kultivovány přes noc v 10 ml Muellerova Hintonova bujónu (Merck, UK) při teplotě 37 °C. Tyto kultury byly poté dvakrát centrifugovány a resuspendovány v čerstvém MHB. Bakteriální kultury byly poté naředěny čerstvým MHB na finální koncentraci 5×10^5 CFU/ml. K testovaným materiálům byl přidán 1 ml příslušné bakteriální suspenze a uzavřen sterilními fóliemi ThermalSeal® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Destičky byly inkubovány při 37 °C s třepáním v readeru Tecan Infinite M200 PRO (Tecan Trading AG, Trasadingen, Švýcarsko) a každých 5 minut po dobu 20 hodin byla měřena optická denzita ($\lambda = 600$ nm). Optická denzita v tomto měření odpovídá množství bakterií v kultuře. S rostoucím množstvím bakterií v kultuře vzrůstá i optická denzita. V případě, že optická denzita vzorku v průběhu času neroste, lze tedy usoudit, že testovaný bioaktivní materiál působí antimikrobiálně vůči testovaným kmenům.

Tabulka 3: Srovnání výsledků antimikrobiální citlivosti jednotlivých vzorků a aditiv.

Označení příkladu	Mikrobiální kmen	Čas (hod)					
		0	2	4	8	12	20
Příklad A	<i>S. aureus</i>	-0,0022	0,0367	0,2659	0,6421	0,7539	0,7864
Příklad B	<i>E. coli</i>	-0,0003	0,1245	0,4212	0,4940	0,5668	0,628
	<i>S. aureus</i>	0,0005	0,0441	0,291	0,7230	0,89767	1,0508
Příklad 1	<i>E. coli</i>	-0,0080	0,1259	0,445	0,6420	0,7592	0,8595
	<i>S. aureus</i>	0,0009	-0,0017	-0,0013	-0,0023	-0,0031	-0,0034
Příklad 2	<i>E. coli</i>	-0,0016	0,0073	0,0082	0,0154	0,0155	0,0211
	<i>S. aureus</i>	0,0021	0,0058	0,0059	0,0066	0,0060	0,0049
Příklad 3	<i>E. coli</i>	0,0043	-0,0029	-0,001	-0,0009	-0,0023	-0,0083
	<i>S. aureus</i>	0,0009	-0,0009	-0,001	-0,0028	-0,0034	-0,0049
Příklad 4	<i>E. coli</i>	0,0022	0,0082	0,0067	0,0098	0,0095	-0,0007
	<i>S. aureus</i>	0,0012	0,0023	0,0025	0,0037	0,0029	0,0014
Příklad 5	<i>E. coli</i>	0,0033	0,0015	0,0007	0,0005	-0,0063	-0,0093
	<i>S. aureus</i>	0,0923	0,0866	0,0876	0,0883	0,0893	0,0933
Příklad 7	<i>S. aureus</i>	0,0866	0,0857	0,0850	0,0846	0,0894	0,1020

Z Tabulky 3 lze odvodit, že materiály Příkladu A a B nemají samy o sobě velkou antibakteriální aktivitu vůči bakteriím, což je indikováno zvyšující se optickou denzitou, která znamená zvýšený počet bakteriálních buněk, tedy samotné materiály se nehodí pro léčbu infikovaných ran. U Příkladů 1 až 4 lze pozorovat, že optická denzita neroste u obou testovaných bakteriálních kmenů, čímž se potvrzuje antibakteriální účinnost obou materiálů s různými koncentracemi antiseptika a podporuje tím jeho využitelnost v léčbě raných infekcí způsobených

5 jak gram-pozitivními (*S. aureus*), tak i gram-negativními (*E. coli*) bakteriemi. Antibakteriální testy u Příkladu 5 a 7 na kmeni *S. aureus* potvrzují antibakteriální aktivitu fágového preparátu, který je schopen účinně potlačit až eliminovat bakteriální infekci (optická denzita opět neroste). Tento výsledek indikuje použitelnost bakteriofágů v kombinaci s GK hydrogelovými filmy pro léčbu ran infikovaných stafylokokovými kmeny.

Příklad 11

10 Hydrogelové kryty připravené v příkladech 5 a 6 byly podrobeny testování na chirurgicky preformovaných defektech kůže plně tloušťky velkého animálního modelu (*Sus scrofa f. domestica*) z hlediska antimikrobiální aktivity vůči kmenu *S. aureus* (NRL/Atb 5921) získanému ze Sbírký mikroorganismů Národní referenční laboratoře pro stafylokoky. Bakteriální kmen byl kultivován přes noc v 50 ml Muellerova Hintonova bujónu (Merck, UK) při teplotě 37 °C. Tyto kultury byly poté dvakrát centrifugovány a resuspendovány v čerstvém PBS. Bakteriální kultury 15 byly poté naředěny čerstvým PBS na finální koncentraci 2×10^9 CFU/ml.

20 Celkem byly do testovaného vzorku zvířat zařazeny 4 reprezentanti (*Sus scrofa f. domestica*), u kterých bylo vytvořeno celkem 80 kožních defektů o rozměrech 5 x 5 cm (20 defektů na každé zvíře) v oblasti zad simulující ztrátu kůže v plně tloušťce a poškození svalové fascie. Do těchto defektů bylo zavedeno stafylokokové inokulum a byla tak simulována komplikovaná infekce kůže a měkkých tkání tímto patogenem.

25 Po úspěšném navození infekce byly do těchto defektů aplikovány hydrogelové kryty obsahující fágy popsané ve srovnávacích příkladech 5 a 6. Délka celého experimentu byla 14 dní, během tohoto období došlo k replikacím identických hydrogelových krytů (příklad 5 a 6) 4., 7. a 11. den po samotném navození infekční komplikace v oblasti rány. V těchto dnech probíhala zároveň mikrobiologická surveillance a získané vzorky (kvantitativní biopsie) z ran byly dále zpracovány standardními mikrobiologickými metodami a stanovena bakteriální nálož v konkrétních vzorcích.

30 V tabulce 4 je dokumentován terapeutický efekt aplikovaných hydrogelových krytů obsahujících fágy popsaných ve srovnávacích příkladech 5 a 6 vedoucích k redukci bakteriální populace v konkrétních vzorcích. Statisticky signifikantní léčebný efekt byl zaznamenán 11. a 14. den experimentu ($p < 0,001$).

35 Tabulka 4: Srovnání výsledků antimikrobiální aktivity (stanoveno v CFU/ml \pm SD) aplikovaných hydrogelových krytů s fágy v rámci *in vivo* podmínek.

Den experimentu	Den 4	Den 7	Den 11	Den 14
Kontrolní rány	6,1 \pm 0,37	6,4 \pm 1,08	6,8 \pm 0,64	7,2 \pm 0,38
Příklad 5	6,9 \pm 0,64	6,1 \pm 0,32	3,8 \pm 0,28	4,4 \pm 0,82
p-hodnota (kontrola vs. příklad 5)	0,020	0,612	<0,001	<0,001
Příklad 6	6,8 \pm 0,68	6,0 \pm 0,15	4,0 \pm 0,82	4,4 \pm 0,06
p-hodnota (kontrola vs. příklad 6)	0,039	0,510	<0,001	<0,001

40

Průmyslová využitelnost

45 Technické řešení se týká transparentního, porézního, nevstřebatelného hydrogelového krytu použitelného u kožních ran pro podporu hojení zajištěním vhodného prostředí spolu s jasně definovanými antimikrobiálními vlastnostmi. Tento kryt je podle technického řešení určen pro klinickou aplikaci v rámci kožních ran různé etiologie a doby trvání (akutní i chronické nehojící se rány) s rizikem pro rozvoj infekčních komplikací nebo potenciální terapii již rozvinuté infekce v oblasti rány (preventivní nebo terapeutická indikace).

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Hydrogelový kryt pro krytí povrchových ran, **vyznačující se tím**, že obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná, a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, a dále plastifikátor glycerol, a antimikrobiální látku vybranou z antiseptik a bakteriofágů, přičemž hmotnostní poměr přírodního a syntetického polymeru je v rozmezí 1:1 až 1:8, a hmotnostní poměr polymerů vůči glycerolu je v rozmezí 1:1 až 1:6.
- 10 2. Hydrogelový kryt pro krytí povrchových ran, **vyznačující se tím**, že obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná, a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, a dále plastifikátor glycerol, a antimikrobiální látku vybranou z oktenidin dihydrochloridu a bakteriofágů fága K, fága Twort, fága 812K1/420, fága philPLA-RODI, fága 187 a fága SA97, přičemž hmotnostní poměr přírodního a syntetického polymeru je v rozmezí 1:1 až 1:8, a hmotnostní poměr polymerů vůči glycerolu je v rozmezí 1:1 až 1:6.
- 15 3. Hydrogelový kryt pro krytí povrchových ran, **vyznačující se tím**, že obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná, a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, a dále plastifikátor glycerol, a antimikrobiální látku vybranou z oktenidin dihydrochloridu a bakteriofágů fága K, fága Twort, fága 812K1/420, fága philPLA-RODI, fága 187 a fága SA97, přičemž hmotnostní poměr přírodního a syntetického polymeru je v rozmezí 1:1 až 1:8, hmotnostní poměr polymerů vůči glycerolu je v rozmezí 1:1 až 1:6, molární hmotnost polyvinylalkoholu je v rozmezí 10 až 130 kg/mol a molární hmotnost polyethylenglykolu je 200 až 20 600 g/mol.