

Príloha č. 1 - Projekt

Názov projektu: Testovanie účinkov sekrétov/exkrétov lariev bzučivky zelenej *Lucilia sericata* v polymérnych géloch na liečenie dlhodobo sa nehojajúcich rán.

Skratka projektu: LUCILIA

Žiadateľ :

- **Obchodný názov:** *PRO BIOS, spol.s.r.o., neštátna poliklinika*
- **Adresa:** *Ružova dolina 21, 821 09 Bratislava*
- **Štatutárny orgán:** *Mgr. Vlasta Provazníková, štatutárny zástupca, 0903438759, e-mail: provaznikova@probios.sk*
- **Vedúci projektu:** *Mgr. Vlasta Provazníková, štatutárny zástupca, 0903438759, e-mail: provaznikova@probios.sk*
- **Termín riešenia:** **11. 2014 /12. 2014**

Cena riešenia celkom: (v tis. EUR)

- z toho - oprávnené náklady: 5 000.- €
 - vlastné zdroje: 0.- €
 - dotácia: 5 000.- €

Popis Projektu

Hmyz a z hmyzu derivované produkty sa od staroveku široko používali v ľudovom liečiteľstve v mnohých častiach sveta. V súčasnosti je už všeobecne známe, že hmyz predstavuje bohatú zásobáreň látok, ktoré môžu byť efektívne využité vo farmaceutickom priemysle alebo v medicínskej praxi.

Rôzne druhy hmyzu produkujú široké spektrum biologicky aktívnych látok, vrátane hormónov, obranných látok a jedov.

Jednou metódou využitia hmyzu je **Terapia larvami** – pri ktorej sa využívajú najčastejšie larvy muchy *bzučivky zelenej* (*Lucilia sericata*) – je dobrým príkladom využitia biomolekúl produkovaných hmyzom na liečenie pacientov trpiacich chronickými nehojacimi sa ranami, ktoré spôsobujú významné zhoršenie kvality života pacienta a jeho okolia, často vedú k septickým komplikáciám či k amputáciám končatín. Mnohé klinické štúdie z celého sveta čoraz častejšie popisujú vynikajúce účinky larválnej terapie, ktoré spočívajú hlavne vo vyčistení, v dezinfekcii a urýchlení hojenia chronických nehojacích sa rán. Larválna terapia v jeje modernej podobe bola v podmienkach Slovenskej republiky postupne zavádzaná do klinickej praxe od roku 2004 firmou Medicínska alternatíva, n.o. a neskôr od roku 2007 firmou Scientica, s.r.o. Spolu s jej implementáciou sa muselo vyriešiť množstvo praktických problémov, od založenia a udržania chovu muchy bzučivky zelenej, sterilizáciu jej vajícok, financovanie celého projektu, certifikáciu kvality produkcie lariev až po rýchlu distribúciu na klinické pracoviská. V súčasnosti sa larválna terapia používa už na 15tich klinických pracoviskách po celom Slovensku.

Larválna terapia má na ranu tri podstatné prospešné efekty:

debridement

dezinfekciu

zlepšenie hojenia

V poslednom čase sa predpokladá i ďalší mechanizmus účinku - **inhibícia a likvidácia biofilmov rôznych baktérií**

Debridement

Primárnym cieľom debridementu je transformácia rany z chronického do akútneho štádia pomocou vhodných materiálov a menežmentu liečby rany pomocou materiálov a technológií, ktoré zlepšujú hojivý proces.

Počas zápalovej fázy hojenia rany hrajú leukocyty hostiteľa pomocou uvoľňovaných proteáz dôležitú úlohu v debridemente degradovaním poškodeného extracelulárneho matrix. Defekt je spočiatku vyplnený provizórnym extracelulárnym matrix pozostávajúcim predovšetkým z fibrínu a z fibronektínu. Z neutrofilov, makrofágov, fibroblastov, epitelových a endotelových buniek sú uvoľňované ďalšie proteolytické enzýmy a poškodený extracelulárny matrix je týmito proteázami odstraňovaný. Pokračovaním hojenia sú syntetizované nové zložky extracelulárneho matrix ako kolagén, elastín a proteoglykány. Analyzovaním sekkrétov / exkrétov lariev (ES), boli identifikované tri skupiny proteolytických enzýmov. Tieto enzýmy efektívne degradujú zložky extracelulárneho matrix vrátane laminínu a fibronektínu. Sekréty preto môžu asistovať pri trávení matrix rany, čo vedie k efektívnemu debridementu.

Dezinfekcia

Za účelom hojenia rany, respektíve pokračovania hojenia cez štádium deštrukcie a proliferácie do štádia dozrievania, musí byť z rany eliminovaná infekcia. Väčšina rán je polymikrobiálne osídlená, hostí spektrum aeróbnych a anaeróbných baktérií. Antimikrobiálna liečba klinicky infikovanej a nehojacej sa rany by teda mala zahŕňať široké spektrum antimikrobiálnych látok, ktoré by boli schopné ranu efektívne vyčistiť.

Spôsob akým larvy v ranách bojujú proti klinickej infekcii sa intenzívne študuje už mnoho rokov. V strednom čreve larvy *L. sericata* hostí komenzál *Proteus mirabilis*. Tento komenzál produkuje účinné látky, ako napríklad kyselina fenyloctová (PAA) a fenylacetaldehyd (PAL), ktoré sú známe svojimi antibakteriálnymi vlastnosťami. *Proteus mirabilis* je endosymbiozant lezúcich lariev a niektorých mäsiarok a môže sa zúčastňovať kontroly flóry v čreve a zároveň i v rane. pH larválnej sekrecie je medzi 8–8,5. Je známe, že žalúdok larvy bol silno kontaminovaný životaschopnými baktériami a koncové črevo larvy bolo sterilné. Vyšlo najavo, že proximálny alimentárny kanál bol oveľa viac zamorený, až so 67 % v pažeráku usídlenými živými baktériami. Posunom baktérií v tráviacom kanáli distálnym smerom ich počet dramaticky klesal. Živé baktérie obsahovalo len 18 % sledovaných zadných častí tráviacej sústavy larvy *L. sericata*. Pri

pokusoch *in vitro* sa zistila silná antibakteriálna aktivita larválnych exkrétov proti *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus foecalis*, *Streptococcus mitor*, *Clostridium perfringens*, *Proteus vulgaris* a *Salmonella typhi*.

Zlepšenie hojenia rán

Medzi základné charakteristiky larválnej terapie patrí rýchlosť hojenia liečenej rany a skoré objavenie sa nového zdravého extracelulárneho matrix – granulačného tkaniva.

Hojenie rán je komplexný a interaktívny proces. Dôležitými regulátormi hojenia rán sú tri skupiny bioaktívnych molekúl: rastové faktory, cytokíny a chemokíny. Všetky tri sú polypeptidy alebo proteíny syntetizované a uvoľňované lokálne. Proces hojenia rany začína bezprostredne po poškodení tkaniva. Je iniciovaný množstvom rozpustných mediátorov uvoľňovaných trombocyty počas hemostázy. Medzi inými sa uplatňujú i rastové faktory, ktoré sú dôležitými mitogénmi stimulujúcimi proliferáciu a chemotaxiu ranových buniek (epiteliálne bunky, fibroblasty a vaskulárne endoteliálne bunky).

Spôsoby aplikácie larválnej terapie

aplikácia voľných larvičiek

aplikácia biovreciek

aplikácia sekrétov exkrétov

Aplikácia voľných larvičiek

Do rany sa aplikujú larvy muchy bzučivky, prekryjú sa sterilným dakronovým šifónom alebo nylonovou pančuchou, ktorá sa prilepí k podložke z hydrokoloidnej náplasti netoxickým lepidlom na báze disperzných lepidiel špeciálne vyvinutým na Ústave polymérov SAV.

Aplikácia biovreciek

Aplikácia lariev v biovreckách je relatívne moderným spôsobom larválnej terapie. Metodika tohto spôsobu aplikácie lariev spočíva vo vytvorení „retenčnej klietky“ ktorá sa aplikuje priamo do rany bez fixácie k okolitej koži. Larvy muchy bzučivky sú zatavené v biovrecku, ktorého stena umožňuje prestup tráviacich enzýmov lariev do liečeného defektu, prestup rozpustených nekrotických tkanív do biovrecka a tiež umožňuje prístup kyslíka k larvám . Aplikácia je jednoduchá a rýchla, podobne ako aj odstránenie biovrecka z defektu. Pred aplikáciou ranu vypláchneme fyziologickým roztokom a uvedeným roztokom zvlhčíme aj biovrecko.

Aplikácia sekrétov/exkrétov

Špeciálne pripravené sekréty/exkréty získané zo slinných žliaz a čriev bzučiviek zelených s prítomnosťou antimikrobiálnych peptidov, lucifenzínu, serínových proteáz a iných aktívnych komponentov, zamiešaných do polymérnych hydrogélů vyvinutých na Ústave polymérov SAV a aplikované priamo do rán pacientov



Dospelá bzučivka *Lucilia sericata*



Sterilné larvy bzučivky zelenej v transportných skúmavkách



Aplikácia biovrecka



Aplikácia sekrétov/exkrétov v hydrogéle

1. Ciele riešenia

Neštátna poliklinika PRO BIOS poskytuje zdravotnú starostlivosť v odboroch : ambulantná zdravotná starostlivosť o deti a dorast, gynekológia a pôrodníctvo, ultrazvuk v gynekológii a pôrodníctve, všeobecné lekárstvo, akupunktúra, anesteziológia a intenzívna medicína, dermatovenerológia, detská chirurgia, diabetológia, poruchy látkovej premeny a výživy, endokrinológia aj so zameraním na osteodenzitometriu, chirurgia, vnútorné lekárstvo, kardiológia, klinická psychológia, nefrológia, neurológia, ortopédia, pediatrická ortopédia, otorinolaryngológia, urológia, oftalmológia, pediatrická oftalmológia, onkológia vo vnútornom lekárstve, angiológia, klinická imunológia a alergológia, pediatrická endokrinológia, onkológia v gynekológii, fyziatria, balneológia a liečebná rehabilitácia, neurochirurgia. V chirurgickej a ortopedickej ambulancii sa často vyskytujú pacienti s otvorenými dlhodobými sa nehojacimi ranami. Z týchto dôvodov nosným cieľom projektu je testovanie účinkov sekrétov/exkrétov lariev bzučivky zelenej *Lucilia sericata* v polymérnych géloch na liečenie dlhodobých sa nehojajúcich rán. Priniesť nové poznatky o antibiofilmovej aktivite larválnych exkrétov/sekrétov (ES) proti biofilmu významných izolátov chronických rán *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* a *Proteus mirabilis*, taktiež charakterizovať efekt extraktu zo slinných žliaz (SGE) lariev *L.sericata*, počas eradikácie baktérií v rane. Ďalším dôležitým cieľom projektu je vývoj nového netoxického polymérneho hydrogélu, správnej konzistencie a hustoty vhodného na aplikáciu do rán pacientov s dlhodobými sa nehojacimi ranami. Dosiahnuté výsledky budú priamo aplikovateľné na pacientoch s dlhodobými sa nehojacimi ranami.

2. Základné parametre riešenia

Technologický pokrok síce viedol k významnému zlepšeniu zdravotnej starostlivosti, čo sa týka i starostlivosti o ranu. Nehojace sa rany však naďalej predstavujú významný problém. Prevalencia nehojajúcich sa rán neustále stúpa. K jej narastaniu dochádza čiastočne preto, že medicínsky pokrok premenil mnohé smrteľné ochorenia na ochorenia chronické a zároveň sa neustále zvyšuje očakávaná dĺžka života. Zdravotný stav mnohých ľudí je náchylný k tvorbe rán alebo narušuje ich hojenie. Naš antibiotický arzenál už nie je dlhšiu dobu v kontrole infekcií kože a mäkkých tkanív efektívny pre narastajúci počet a prevalenciu na antibiotiká rezistentných mikroorganizmov.

Použitím obväzových materiálov zamedzujeme lokálnej kontaminácii rany, uľahčujeme odstraňovanie exsudátov a predchádzame infekcii. Za účelom vývoja nových techník na zdokonalenie a urýchlenie procesu hojenia rany (lokálne rastové faktory, produkty tkaninového inžinierstva, hyperbarická oxygenoterapia a vákuové ošetrovanie rany, bolo vykonaných mnoho štúdií.

Pre často beznádejný prístup v starostlivosti o ranu sa mnoho lekárov a výskumníkov pozerá späť do medicínskej histórie a znovu skúšajú dávnejšie technológie s pokročilými nástrojmi a múdrosťou 21. storočia. Jednou z týchto znovuobjavených technológií je larválna terapia (tiež známa ako maggot debridement therapy (MDT), biodebridement alebo jednoducho terapia larvami). Maggot debridement therapy).

Maggot debridement therapy rany sa preto v súčasnosti uplatňuje v mnohých krajinách ako alternatíva chirurgického ošetrovania, ktorá poskytuje rýchly a efektívny debridement rany a prispieva tak k procesu hojenia a k zníženiu celkových nákladov na liečbu.

Svetové trendy výskumu a vývoja v tejto oblasti sa orientujú hlavne na priamu aplikáciu lariev do rán, poprípade na aplikáciu v biovreckách. S aplikáciou sekrétov/exkrétov na liečenie dlhodobých sa nehojajúcich rán pacientov prichádza firma Scientica, s.r.o. ako prvá.

Niekoľko štúdií sa sústredilo na cenovú efektívnosť MDT. Wayman (Wayman et al. 2001) prospektívne hodnotil náklady na personál a materiál pri defektoch liečených pomocou MDT v porovnaní s defektmi liečenými hydrogelom pri chronických venózných ulkusoch. Náklady na liečbu v skupine MDT boli £79 v porovnaní ku £136 v skupine s hydrogelom ($P<0,05$). Skupina s MDT tiež potrebovala na dosiahnutie plného debridementu menej lekárskeho kontrol ako kontrolná skupina (medián počtu kontrol 3 vs 19, $P<0,05$).

Keď Thomas a Jones (2001) zarátali i ošetrovateľské náklady, celkové výdavky na preväzový materiál za účelom úspešného debridementu jednej rany boli £82 vs £503 v prospech MDT (približne 6,1-krát menšie náklady !!!). Redukcia celkových nákladov môže byť pripisovaná redukovanému počtu debridementov, ako

aj redukovanému počtu návštev v nemocnici alebo dní hospitalizácie, ktoré viedli k signifikantným úsporám pre zdravotnícky systém.

V ďalšej práci S. Thomasa z roku 2006 bolo dokázané, že použitie MDT môže ročne v Spojenom kráľovstve Veľkej Británie a Írska ušetriť takmer £50 miliónov (Gottrup 2011).

V USA sú náklady na MDT všeobecne hradené treťou stranou, ale tento stav nemusí byť trvalý. Špecialistom v starostlivosti o rany a zariadeniam pre hospitalizovaných pacientov sú v závislosti od diagnózy alebo potreby pacienta náklady refundované (skôr ako operácia). Larválna terapia je často považovaná za finančne prezieravú liečbu prvej voľby, pretože je nenákladná, rýchla, efektívna, jednoduchá a bezpečná v takej miere, aby mohla byť aplikovaná stredným zdravotným personálom. Granty na pomoc pacientom (Assistance Grants) sú v Spojených štátoch dostupné napríklad od BTER Foundation (www.BTERfoundation.org) za účelom pomoci pacientom bez poistného krytia (Sherman 2009).

Uvedené ekonomické analýzy vychádzajú z podmienok v „západných krajinách“, kde je cena práce zdravotníckeho personálu i cena za medicínsky výkon priam neporovnateľná z cenou v podmienkach Slovenskej republiky. Podľa doterajších skúseností je cena lokálnych prostriedkov vlhkej terapie (prostriedky dnes „štandardne používané pri hojení rán“, napr. hydrogely) na Slovensku a v zahraničí porovnateľná. Uvedené štúdie dokázali vysokú cenovú efektívnosť larválnej terapie v porovnaní s konvenčnými prostriedkami i pri skutočnosti, že cena samotných medicínálnych lariev je v zahraničí niekoľkonásobne vyššia. Tiež náklady na transport lariev kuriérskymi službami sú niekoľkonásobne vyššie.

Predpokladáme, že larválna terapia je i v našich podmienkach v konečnom dôsledku **výrazne** pre zdravotný systém výhodnejšia (pri zachovaní správnych indikácií) ako bežne používané postupy hojenia chronických rán. Toto tvrdenie však nemáme dokázané objektívnou ekonomicko – zdravotnou analýzou.

Pri zhodnocovaní ekonomických nákladov liečby treba vziať do úvahy i nepriame ekonomické náklady spojené so základným ochorením a jeho liečbou – práceneschopnosť pacienta i členov jeho rodiny, náklady na sociálny systém – náklady na opatrovateľské služby, transport pacienta, invalidizácia a pod. V neposlednom rade je nutné spomenúť i neekonomické efekty akejkoľvek liečby a najmä jej trvania a výsledkov – zníženie kvality života pre imobilizáciu, bolesti, zápach chronickej rany a následné obmedzenie životných aktivít a možností nielen samotného pacienta, ale i jeho rodiny a okolia.

3. Charakteristika projektu, postup riešenia,

Hlavným zámerom navrhovaného projektu je testovanie účinkov sekrétov/exkrétov lariev bzučivky zelenej *Lucilia sericata* v polymérnych géloch na liečenie dlhodobo sa nehojajúcich rán. Zároveň testovanie antibiofilmovej aktivity larválnych exkrétov/sekrétov (ES) proti biofilmu významných izolátov chronických rán *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* a *Proteus mirabilis*, taktiež charakterizovať efekt extraktu zo slinných žliaz (SGE) lariev *L. sericata*, počas eradikácie baktérií v rane. Ďalším dôležitým cieľom projektu je vývoj nového netoxického polymérneho hydrogelu, správnej konzistencie a hustoty vhodného na aplikáciu do rán pacientov s dlhodobo sa nehojajúcimi ranami.

Návrh riešenia projektu

1. Zabezpečenie chovu bzučiviek *Lucilia sericata* na experimentálne účely

- muchy *L. sericata* chováme v kliebkach (60 x 80 x 60 cm)
- kŕmime ich :kockovým cukrom, 100 g sušených kvasníc, 300 g kryštálového cukru a 110 ml vody
- stály prísun vody
- insektárium – štandardné podmienky chovu: - teplota 25°C, vlhkosť vzduchu 60%, fotoperiodicita 16:8 (svetlo:tma)
- muchy kladú vajíčka (cca 150-200 kusov/samička) na kúsok pečene v Petriho miske v priebehu 2 – 24 hodín v závislosti od teploty a svetla (vajíčka sú biele alebo bledožlté, poukladané v skupinách alebo v masách, podlhovasté 1,5 mm dlhé) → po 24.hodinách preniesieme vyliahnuté larvy I. instaru z pečene v Petriho miske z kliebky na mletú pečeň s otrubami (výživový substrát pre larvy)
- larválne instary: 1. instar: 8 – 24 hodín, 2,5 – 4 mm
2. instar: 1- 2 dni, 4 – 7 mm
3. instar: 2 – 3 dni, 11 – 15 mm

2. Príprava ES z lariev *L.sericata*

- 3.štádium lariev bzučiviek *L.sericata* využívame na prípravu ES (výlučky slinných žliaz a čriev lariev), ktoré obsahujú (antimikrobiálne peptidy – lucifenzín, serínové proteázy..., ktoré významne prispievajú k hojeniu rán, k dezinfekcii a k debridementu.
- na prípravu ES používame nesterilný 3. instar lariev muchy *L.sericata* (2 – 3 dňové) u týchto lariev je aktivita ES najvyššia, larvy vypúšťajú ES do vody (na 50 lariev/200µl dH₂O)
- do deliaceho skleneného lievika nasypeme 1200 lariev – pridáme 4800 µl dH₂O a inkubujeme pri teplote 4°C 1 hodinu
- po hodinovej inkubácii lariev v destilovanej vode odoberieme vylúčené ES pipetou a uskladníme v 2 ml Eppendorfkách pri teplote -20°C na ďalšie spracovanie,
- centrifugácia 60 min, 14 000 otáčok, 4°C
- supernatant prepipetujeme do čistej 50 ml skúmavky
- filtrácia ES: scentrifugované ES prefiltrujeme cez 0,22 µm filtre do novej skúmavky
- takto scentrifugované a prefiltrované ES (baktérie a iné MO sa zachytili na filtroch – sterilita ES) – lyofilizácia vymrazených vzoriek na suchom ľade s etanolom

3. Test sterility ES

Scentrifugované a prefiltrované ES otestujeme na agarových platniach či sú aj po prefiltrovaní 0,22 µm filtrami sterilné.

4. Antimikrobiálna aktivita

- typ testovaného extraktu: Exkréty/Sekréty (ES) a Extrakt zo slinných žliaz (SGE)

Príprava ES:

- natívne vzorky: vyslintanie pri 4°C počas 60min, potom lyofilizácia do sucha, rozpustenie v PBS alebo v médiu, filtrácia
- varené vzorky : vyslintanie pri 4°C počas 60min, potom lyofilizácia do sucha, rozpustenie v PBS alebo v médiu, filtrácia, 10 min inkubácia 100°C, centrifugácia 10min, max, supernatant na testovanie

Príprava SGE:

- natívne: vypitvanie neporušených slinných žliaz na suchom ľade, zhomogenizovať v H₂O, centrifugácia 4°C, max, 30min, SpeedVac nie do sucha, úprava koncentrácie na 0.5 žlasy na ul
- varené: vypitvanie neporušených slinných žliaz na suchom ľade, zhomogenizovať v H₂O, centrifugácia 4°C, max, 30min, SpeedVac nie do sucha, úprava koncentrácie na 0.5 žlasy na ul, 10 min inkubácia 100°C, centrifugácia 10min, max, supernatant na testovanie

Testovanie:

Difúzny radiálny test (*M. luteus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*)

- natívne ES
- varené ES
- natívne SGE
- varené SGE

5. Antibiofilmová aktivita

- typ testovaného extraktu: Exkréty/Sekréty (ES) a Extrakt zo slinných žliaz (SGE)

Príprava ES:

- natívne vzorky: vyslintanie pri 4°C počas 60min, potom lyofilizácia do sucha, rozpustenie v PBS alebo v médiu, filtrácia
- varené vzorky : vyslintanie pri 4°C počas 60min, potom lyofilizácia do sucha, rozpustenie v PBS alebo v médiu, filtrácia, 10 min inkubácia 100°C, centrifugácia 10min, max, supernatant na testovanie

Príprava SGE:

- natívne: vypitvanie neporušených slinných žliaz na suchom ľade, zhomogenizovať v H₂O, centrifugácia 4°C, max, 30min, SpeedVac nie do sucha, úprava koncentrácie na 0.5 žlasy na ul
- varené: vypitvanie neporušených slinných žliaz na suchom ľade, zhomogenizovať v H₂O, centrifugácia 4°C, max, 30min, SpeedVac nie do sucha, úprava koncentrácie na 0.5 žlasy na ul, 10 min inkubácia 100°C, centrifugácia 10min, max, supernatant na testovanie

Testovanie:

a) vplyv na vznikajúci biofilm (S. aureus, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis, P. aeruginosa)

- natívne ES
- varené ES
- natívne SGE
- varené SGE

b) Vplyv na maturovaný biofilm

- natívne ES
- varené ES
- natívne SGE
- varené SGE

c) Vplyv na viabilitu baktérii maturovaného biofilmu

- natívne ES
- varené ES
- natívne SGE
- varené SGE

6. Príprava hydrogélů

Hydrogély sú všeobecne gélové krytia na báze hydrofilných polymérov s vysokým obsahom vody. Majú amorfnú povahu, absorbujú nadbytočný exsudát, udržujú optimálnu vlhkosť (i v [suchej rane](#)), [autolyticky odstraňujú nekrózu](#) a povlaky a neporušujú okolité zdravé bunky. Chránia ranu pred vstupom sekundárnej [infekcie](#). Gély vyplňajú neinfikovanú ranu vo fáze zápalovej i vo fáze granulácie. Rany so suchou spodinou, nekrotické rany, slabo až stredne silnesecernujúce rany rôznej hĺbky. Mimoriadna stabilita, po nanesení zostáva na mieste.

Zloženie hydrogélů: Purifikovaná voda, Glycerol , Želatínachné činidlo

Hydrogély sa pripravujú za sterilných podmienok v laminárnom boxe s UV žiarením

navážime potrebné množstvo ES na prípravu 10 ml hydrogélů (10mg ES/1ml roztoku) do sterilnej plastovej skúmavky, do ktorej vytlačíme celý obsah hydrogélů zo striekačky

hydrogél spolu s ES vortexujeme, pokým sa nevytvorí celistvá, hustá hmota, ktorú vylejeme do sterilnej Petriho misky a naberieme späť do striekačky

pripravený hydrogél uskladníme pri 4°C alebo odnesieme priamo k pacientovi na použitie

7. Testovanie ES s hydrogélom

- a) Príprava a testovanie 0,2% polymérneho hydrogélů s ES na dlhodobu sa nehojajících ranách
- b) Príprava a testovanie 0,5% polymérneho hydrogélů s ES na dlhodobu sa nehojajících ranách
- c) Príprava a testovanie 1,0 % polymérneho hydrogélů s ES na dlhodobu sa nehojajících ranách

8. Štatistické vyhodnotenie pokusov

Identifikácia rizík riešenia

Ekonomické riziká

Ekonomické riziká pri riešení projektu aplikovaného výskumu vyplývajú hlavne z nedostatku finančných prostriedkov na zabezpečenie materiálnych potrieb chovného zariadenia, chemikálií na zabezpečenie pokusov a zároveň aj hmotnej zainteresovanosti výskumných pracovníkov .

Technické riziká

Technické riziká spočívajú hlavne v získavaní dostatečného počtu vhodných pacientov s dlhodobou sa nehojacimi ranami s podobnými etiologickými vlastnosťami na dosiahnutie dostatečného počtu výsledkov použiteľných pri štatistickom vyhodnotení.

Prínosy riešenia projektu

- úspešná aplikácia polymérnych hydrogélů s ES bude úplne nový mimoriadne účinný spôsob liečenia dlhodobu sa nehojajících rán.
- polymérny hydrogél s ES budeme môcť aplikovať do rany priamo, bez nepříjemných pocitů, ako to majú pacienti pri aplikácii lariev
- účinkom ES dochádza k redukcií počtu bakteriálních druhů infikujících liečený defekt, k redukcií spektra rezistence mikroorganizmů vůči antibiotikám, čo spolu s účinkom odstránenia nekrotických tkanív, na ktorých mikroorganizmy prežívajú a môžu patogénne pôsobiť a spolu so stimuláciou rastu nového granulačného tkaniva vedie k naštartovaniu hojivého procesu v prospech liečeného pacienta.
- aplikácia ES prinesie značnú úsporu finančných nákladů na liečbu dlhodobu sa nehojajících rán
- o podobnej aplikácii ES s hydrogélom nenachádzame v odborenej literatúre žiadne záznamy.
- na základe našich skúseností môžeme konštatovať, že ES s hydrogélom mení chronickú ranu na „akútnu“ tým, že ju zbavuje nekrotického tkaniva, bakteriálnej nálože a biofilmu a zároveň stimuláciou hojenia rany vytvára predpoklady pre použitie ďalších vhodných terapeutických metód za účelom jej definitívneho zhojenia.

4. Realizačné výstupy

Realizačným výstupom projektu bude kompletná dokumentácia laboratórných výsledkov testů:

- antimikrobiálních aktivit ES a SGE na *M. luteus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*
- antibiofilmových aktivit ES a SGE na *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*

Najvýznamnejším prínosom riešenia projektu budú klinické výsledky aplikácie unikátneho hydrogélů so sekretní/ exkretní slinných žláz a čriev bzučiviek zelených *Lucilia sericata*. Výsledky budú dokumentované opisom jednotlivých kazuistik liečených pacientů

Výsledným realizačným výstupom projektu bude nová pomôcka na vlhké hojenie rán.

Pomôcka bude následne patentovaná.

5. Harmonogram riešenia

- názov číastkovej úlohy (etapy)
- testovanie antimikrobiálních aktivit ES a SGE – 1.11.2014 – 31.12.2014
- testovanie antibiofilmových aktivit ES a SGE - 1.11.2014 – 31.12.2014
- testovanie rôznych koncentracií hydrogélů s ES - 1.11.2014 – 31.12.2014
- termín začatia/ukončenia 11-2014/12-2014
- riešitel' (v prípade kooperácie názov sídlo a právna forma organizácie, SCIENTICA, s.r.o.
- Kontrolné body riešenia - forma, charakter, termín
- Pribežná správa o plnění projektu 31.11.2014

6. Financovanie riešenia projektu	<i>Rok</i>	<i>2014</i>	<i>201...</i>	<i>201...</i>
Cena projektu celkom: (v tis. EUR)				
z toho - oprávnené náklady celkom:		<i>5000.-€</i>		
- vlastné zdroje		<i>0.00.- €</i>		
- štátna dotácia		<i>5000.- €</i>		

7. Stručná charakteristika doterajšej činnosti žiadateľa

Spoločnosť PRO BIOS spol. s r. o. neštátna poliklinika bola založená v roku 1996 a poskytuje všeobecnú, špecializovanú a špecializovanú inú ambulantnú zdravotnú starostlivosť v Bratislave na štyroch miestach.

Spoločnosť PRO BIOS spol. s r. o. neštátna poliklinika získala 11. 01. 2007 certifikát systému manažérstva kvality podľa STN EN ISO 9001:2001. Neštátna poliklinika PRO BIOS má určený rozsah zdravotného obvodu pre poskytovanie zdravotnej starostlivosti od 27.01.2012 v týchto špecializačných odboroch: poskytovanie ambulantnej zdravotnej starostlivosti : ambulancie v odboroch : všeobecná ambulantná zdravotná starostlivosť o deti a dorast, gynekológia a pôrodnictvo, ultrazvuk v gynekológii a pôrodnictve, všeobecné lekárstvo, akupunktúra, anesteziológia a intenzívna medicína, dermatovenerológia, detská chirurgia, diabetológia, poruchy látkovej premeny a výživy, endokrinológia aj so zameraním na osteodenzitometriu, chirurgia, vnútorné lekárstvo, kardiológia, klinická psychológia, nefrológia, neurológia, ortopédia, pediatrická ortopédia, otorinolaryngológia, urológia, oftalmológia, pediatrická oftalmológia, onkológia vo vnútornom lekárstve, angiológia, klinická imunológia a alergológia, pediatrická endokrinológia, onkológia v gynekológii, fyziatria, balneológia a liečebná rehabilitácia, neurochirurgia

8. Stručná charakteristika doterajšej činnosti vedúceho projektu

Vedúca projektu Mgr. Vlasta Provazníková je štatutárny zástupca Spoločnosti PRO BIOS spol. s r. o. neštátna poliklinika od jej založenia v roku 1996. Je výkonnou riaditeľkou spoločnosti a ktívne zabezpečuje chod zdravotnej starostlivosti neštátnej polikliniky. V uvedenom zariadení na jednotlivých pracoviskách pracujú lekári špecialisti, MUDr. Jaroslav Sekáč, PhD. (chirurg) a MUDr. Igor Vico (ortopéd) ktorí prejavili záujem o liečbu larválnou terapiou ako aj o aplikáciu hydrogéllov so sekrétmi/exkrétmi zo slinných žliaz a čriev lariev bzučiviek zelených *Lucilia sericata*.

Mgr. Vlasta Provazníková zabezpečí implementáciu uvedenej metódy v Spoločnosti PRO BIOS spol. s r. o. neštátna poliklinika.

V Bratislave dňa 28.10.2014

<i>Odtlačok pečiatky žiadateľa</i>	<i>Podpis štatutárneho orgánu žiadateľa</i>

