(19) URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

(10) **PL 246410 B1**

(12) # Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **446279**
(22) Data zgłoszenia: **2023.09.30**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.04.22 BUP 17/2024**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.01.20 WUP 03/2025**

(51) MKP:
A61K 35/19 *(2015.01)*
A61L 15/32 *(2006.01)*

(73) Uprawniony z patentu:
KEYMED SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Jelenia Góra, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MAKSYMILIAN KASPEREK, Jelenia Góra, PL
SYLWIA KASPEREK, Jelenia Góra, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Grzelak, Warszawa, PL

(54) Tytuł:
Zestaw do wytwarzania autologicznego opatrunku z krwi, opatrunek, sposób jego wytwarzania i jego zastosowania

PL 246410 B1

Opis wynalazku

DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku jest zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi pełnej osobnika, sposób wytwarzania autologicznego opatrunku na rany, autologiczny opatrunek i jego zastosowanie do leczenia ran i stanów chorobowych skóry. Zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego służy do tworzenia tkankowych opatrunków autologicznych tj. pochodzących z krwi własnej pacjenta, przyspieszających proces gojenia się m.in. ran oparzeniowych, odleżynowych, pooperacyjnych i owrzodzeniowych. Wynalazek ma zastosowanie w dziedzinie medycyny, ochrony zdrowia czy weterynarii. Zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego może być wykorzystywany przez profesjonalistów z dziedziny zdrowia przy szerokiej gamie zabiegów planowych lub innych, które mogą odbywać się w ośrodkach zdrowia, gabinetach zabiegowych, pielęgniarskich, lekarskich czy dentystycznych, które mogą mieć miejsce w placówkach szpitalnych, ale również przychodniach pierwszej pomocy, jednostkach podstawowej opieki zdrowotnej, a nawet w odległych miejscach o ograniczonej infrastrukturze, takich jak strefy działań wojennych, czy obszary wiejskie.

STAN TECHNIKI

W ostatnich latach nastąpił znaczący rozwój produktów biologicznych zawierających płytki krwi wykorzystywane do leczenia trudno gojących się ran. Podstawowym komponentem tych produktów są płytki krwi, które odgrywają istotną rolę w regulacji homeostazy i tworzeniu się skrzepu fibrynowego. Płytki krwi są odpowiedzialne za aktywację i uwalnianie się ważnych cząsteczek, w tym białek specyficznych dla płytek krwi, czynników wzrostowych, czynników krzepnięcia, cząsteczek adhezyjnych, cytokin, chemokin oraz czynników angiogennych, które uczestniczą w stymulacji proliferacji i aktywacji komórek biorących udział w gojeniu ran, takich jak fibroblasty, neutrofile, makrofagi czy mezenchymalne komórki macierzyste (Eisinger i wsp., 2018).

Na rynku dostępne są również opatrunki interaktywne, które pełnią nie tylko funkcję ochronną i zabezpieczającą, ale również wspierającą i stymulującą naturalne procesy zachodzące w gojącej się ranie, np. hydrożelowe, piankowe, fibrynowe, kolagenowe czy alginianowe oraz opatrunki uwalniające substancje o określonym działaniu terapeutycznym lub przeciwbakteryjnym. Istnieje wiele badań klinicznych, które wykazują dobroczynny wpływ czynników wzrostu na gojenie się ran. W różnych badaniach klinicznych wykazano poprawę parametrów gojenia rany po miejscowej aplikacji takich czynników jak: NGF, GM-CSF, b FGF oraz EGF. Dotychczas jednak największe nadzieje wiąże się z PDGF-BB, który przeszedł pomyślnie wszystkie fazy badań klinicznych. Dostępne są już żele zawierające PDGF, które aplikowane na ranę stymulują gojenie ran powstałych np. z powodu neuropatii cukrzycowej.

Podejmowane są również próby stosowania preparatów bogatopłytkowych w leczeniu ran przewlekłych. Osocze bogatopłytkowe jest koncentratem autologicznych czynników wzrostu, w tym m.in. PDGF, IGF, VEGF, dlatego naturalnie stymuluje zarówno komórki naskórka, jak również fibroblasty skórne i mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs), doprowadzając do regeneracji uszkodzonej tkanki.

Znane są także opatrunki hydrożelowe, posiadające wiele zalet, których nie mają tradycyjne opatrunki. Plastry z żelowej substancji utrzymują odpowiedni stopień wilgoci, pozwalają skórze oddychać, są też przezroczyste, co pozwala na obserwowanie procesu gojenia się rany. Hydrożel posiada właściwości absorpcyjne, dzięki czemu wchłania wydzielinę z mikroorganizmami, sączącą się z rany.

Dokument EP0998949A2 ujawnia elastyczny opatrunek na rany zawierający włókna fibrynowe, który jest przygotowywany z intensywnie dializowanych składników lub całkowicie wolnego fibrynogenu. Dokument ujawnia również sposób wytwarzania elastycznego opatrunku na rany na bazie fibryny, w którym roztwór fibrynogenu poddaje się jedno- lub wieloetapowej dializie, a następnie w wyniku działania wodnego roztworu trombiny na roztwór fibrynogenu tworzy się elastyczna włóknina fibrynowa, którą następnie poddaje się liofilizacji.

Dokument WO2014209620A1 ujawnia produkt do opatrywania ran pokryty fibryną, posiadający elastyczną warstwę folii, wrażliwą na nacisk warstwę klejącą umieszczoną na elastycznej warstwie folii oraz warstwę proszku fibrynowego umieszczoną na powierzchni, wrażliwej na nacisk warstwy klejącej, umiejscowionej naprzeciwko elastycznej warstwy folii. Dokument ten ujawnia również sposób wytwarzania wyrobu do opatrywania ran, obejmujący etapy: dostarczenia elastycznej warstwy folii, umieszczenia wrażliwej na nacisk warstwy klejącej na elastycznej warstwie folii, formowania warstwy proszku fibrynowego na powierzchni wrażliwej na nacisk warstwy klejącej naprzeciwko elastycznej warstwy foliowej, w celu przygotowania wyrobu do opatrywania ran.

Publikacja US2018311404 ujawnia urządzenie do przygotowywania autologicznego fibrynowego opatrunku biologicznego, który składa się z urządzenia zawierającego cylindryczny pojemnik, którego dno ma boczne nachylenia α, prowadzące do centralnego kanału z nachyleniem β, które kieruje płynny uszczelniacz powstały w wyniku tłoczenia fibrynowego koagulatu przez sito w kierunku dyszy wylotowej, a następnie w kierunku wielokanałowego systemu zbierania. Zgodnie z ujawnieniem, odwirowaną już krew w formie skrzepu wprowadza się do urządzenia na sito, a w celu ukształtowania skrzepu na skrzep fibrynowy przykładany jest nacisk. Wadą jest to, że ucisk mechaniczny niszczy komórki zawarte w skrzepie, wpływając na właściwości biologiczne i zdolności regeneracyjne uzyskanego za pomocą urządzenia opatrunku z krwi. Dokument nie ujawnia sposobu wytwarzania autologicznego opatrunku na rany.

Opisany jest sposób wytwarzania opatrunku autologicznego ActiGraft® System (https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/wounds/original-research/safety-and-efficacy-autologous-blood-clot-product-management-texas-1a), w którym krew pełną pacjenta pobiera się z zastosowaniem antykoagulantu cytrynianowego, który hamuje kaskadę krzepnięcia krwi. Następnie dla wytworzenia skrzepu ponownie aktywuje się krzepnięcie krwi w plastikowym jednorazowym pojemniku poprzez wymieszanie jej z zawiesiną glukonianu wapnia i proszku kaolinu. Niestety tak wytworzony skrzep nie odtwarza wszystkich właściwości biologicznych i regeneracyjnych, które zostają ograniczone poprzez dodanie środka hamującego krzepnięcie, a następnie uaktywnienia w sposób sztuczny krzepnięcia, poprzez dodanie środków aktywujących proces.

Z publikacji Ghanaati i wsp., 2014 znany jest sposób wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi pełnej. Dla uzyskania frakcji fibryny komórkowej (A-PRF) próbkę krwi odwirowuje się z prędkością 1500 RPM przez 14 minut. Po odwirowaniu skrzepy są ostrożnie wydobywane z probówek, frakcję czerwonych krwinek (RBC) usuwa się w taki sposób, aby nie uszkodzić dna skrzepu bogatego w fibrynę. Skrzepy na bazie fibryny z kożuszkiem leukocytarnym i częścią krwinek czerwonych utrwalane są 4% roztworem paraformaldehydu przez 24 godziny. Następnie zostają umieszczone wzdłuż osi podłużnej w kasetach osadzających. Poprzez dociśnięcie skrzepów w kasecie osadzającej uzyskuje się opatrunek o rozmiarach ok. 3,5 cm długości x 1 cm szerokości x 0,1 cm grubości z 10 ml krwi pełnej. Wadą opisanej metody jest mała wydajność powierzchni i objętości opatrunku z 1 ml krwi pełnej, a opatrunek jest w niejednolitej formie, ponadto ucisk mechaniczny niszczy komórki zawarte w skrzepie, wpływając na właściwości biologiczne i zdolności regeneracyjne uzyskanego za pomocą danego sposobu opatrunku autologicznego z krwi. W opatrunku pozostają resztki paraformaldehydu stosowanego w trakcie wytwarzania.

Szacuje się, że około 1,5% obywateli krajów rozwiniętych w ciągu życia dotyka problem przewlekłej, trudno gojącej się rany. Cierpienie, ból, nieprzyjemny zapach, ryzyko infekcji oraz wysokie koszty związane z zakupem środków opatrunkowych, materaców przeciwodleżynowych i rehabilitacją, wpływają na jakość życia pacjentów z ranami przewlekłymi oraz ich opiekunów i rodzin. Chorzy dotknięci problemem ran przewlekłych wymagają profesjonalnej opieki w zakresie zaopatrywania ran, w tym m.in. częstej wymiany specjalistycznych opatrunków, dlatego regularnie odwiedzają lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej, ambulatoryjne gabinety specjalistyczne oraz niejednokrotnie wymagają częstej hospitalizacji. Stanowi to poważny problem społeczny, leczniczy i ekonomiczny. Problem leczenia trudno gojących się i przewlekłych ran wymusza konieczność poszukiwania nowych, skuteczniejszych metod terapii. Aktualnie, do leczenia i zaopatrywania ran stosuje się przede wszystkim opatrunki i bandaże materiałowe, jałowe lub niejałowe, które nie przyspieszają procesów leczenia, mają krótką przydatność użytkowania oraz mogą wywoływać reakcje alergiczne ze względu na zawartość syntetycznych składników. Tradycyjne opatrunki sprawiają ból podczas czynności higienicznych, w szczególności przy konieczności ich częstej zmiany. Stosowane powszechnie opatrunki łatwo ulegają zabrudzeniu od ubrań, a ich brzegi stosunkowo łatwo ulegają samoistnemu odklejaniu. Opatrunek z bawełnianej gazy nie utrzymuje ciepła rany, nie jest wodoodporny i nie pozwala na kąpiel lub hydroterapię. Zmoczenie opatrunku każdorazowo wymaga jego zmiany, gdyż mogłoby pogłębić niepożądaną maceracje skóry wokół rany. Tradycyjny opatrunek nie zapewnia również ruchomości stawu i powoduje napinanie skóry otaczającej ranę podczas ruchu, wymuszając zakładanie opatrunku na już zgiętą kończynę.

Oparzenia są jednymi z najcięższych obrażeń ciała. W większości ich charakter jest nagły, silnie uszkadzający tkanki i nawet na niewielkim obszarze prowadzi do głębokiego i rozległego obrażenia. Szczególnie narażone na oparzenia są dzieci i osoby w podeszłym wieku. Oparzenia dzieci do siódmego roku życia stanowią jedną czwartą wszystkich oparzeń. Na całym świecie oparzenia są bardzo dużym problemem zdrowia publicznego, zarówno w aspekcie następstw fizycznych, psychologicznych, jak i ekonomicznych. Corocznie różnego rodzaju oparzeniom ulega około 1% mieszkańców. Związany z oparzeniami ból, oszpecenie, deformacje ciała, wymagają długotrwałego specjalistycznego leczenia.

Zaburzenia ogólnoustrojowe określane mianem choroby oparzeniowej, zagrażają bezpośrednio życiu osób dorosłych, jak i dzieci. Wypadki te wymagają wdrożenia wysokospecjalistycznego, intensywnego leczenia ogólnego i miejscowego. Leczenie oparzeń obejmuje w głównej mierze zwalczanie zakażenia, uzupełnianie krwi i białka oraz pokrywanie powierzchni oparzonych odpowiednimi przeszczepami skóry. Stosowane są opatrunki jałowe i częste oczyszczanie ran, co jednak stanowi terapię długotrwałą. Innym problemem technicznym jest zapewnienie odpowiedniego opatrunku dla osób z odleżynami. Stosowane obecnie metody są inwazyjne, sprawiają ból i cierpienie pacjentom, wydłużają okres rekonwalescencji. Odpowiedni opatrunek dla osób z odleżynami powinien minimalizować ból, zmniejszać inwazyjność leczenia i skracać okres rekonwalescencji. Odleżyny stanowią poważny problem społeczny, gdyż wraz ze starzeniem się społeczeństw obejmują coraz szerszą grupę osób.

Nie ma zatem w stanie techniki dedykowanego dla uzyskania dopasowanego do rany autologicznego opatrunku, pod kątem dostarczenia zestawu do wytwarzania opatrunku autologicznego, do łatwego wytworzenia opatrunku autologicznego z materiału pochodzącego z krwi pacjenta, dopasowanego do rozmiaru i kształtu rany, ani łatwego sposobu otrzymywania autologicznego opatrunku, z materiału pochodzącego z krwi pacjenta, dla którego opatrunek jest przeznaczony. Jak dotąd nie ujawniono żadnego kompletnego produktu do łatwego otrzymywania dopasowanych opatrunków autologicznych tj. opatrunków pozyskanych bezpośrednio z krwi pacjenta, który umożliwiałby dobór jego rozmiaru do wielkości rany. Nie opracowano również sposobu wytwarzania, ani dedykowanych do tego sposobu zestawów, do pozyskiwania opatrunków autologicznych, szczególnie do uzyskiwania opatrunku z dwóch frakcji krwi pacjenta, o różnej wielkości i kształcie, odpowiednio dostosowanych do wielkości rany, które nałożone bezpośrednio na ranę pacjenta przyspieszałyby proces gojenia nie tylko ze względu na zawartość opatrunku, ale na jego właściwe dopasowanie do rany i żelową konsystencję. W stanie techniki brak jest więc zestawów do wytwarzania autologicznych opatrunków do leczenia ran o różnej wielkości, dostosowanych do kształtu i rozległości rany, które umożliwią dopasowanie opatrunku do rany, a zatem polepszenie procesu leczenia, przyspieszenie gojenia się ran, redukcję bliznowacenia oraz minimalizację bólu i odczynu alergicznego w przypadku zmiany opatrunków, czy stosowania opatrunków zawierających substancje, mogące wywołać odczyn alergiczny.

Istota wynalazku

Celem wynalazku jest dostarczenie prostego i łatwego w obsłudze zestawu do wytwarzania opatrunku autologicznego, umożliwiającego wytwarzanie autologicznego opatrunku na rany prostym sposobem, w różnych placówkach opieki medycznej, który może być wytwarzany o różnych kształtach i wielkościach, a przez to zapewniać możliwość dopasowania wielkości opatrunku do danej rany oraz opatrunku wytworzonego tym sposobem, co przezwycięża niedogodności ze stanu techniki. Opracowane rozwiązanie według wynalazku ma na celu dostarczenie prostego w obsłudze i użytkowaniu, łatwego do wykorzystania w każdych warunkach, w tym do wielokrotnego wykorzystania, nawet w podstawowej placówce opieki medycznej, zestawu do wytwarzania opatrunku autologicznego, pozwalającego na dostosowanie wielkości i głębokości opatrunku do powierzchni rany, ograniczenie bólu towarzyszącego wymianie opatrunku w porównaniu do wymiany opatrunków standardowych, brak konieczności częstej wymiany opatrunków w porównaniu do wymiany opatrunków standardowych, naturalne wchłanianie opatrunku, zapobieganie występowaniu infekcji bakteryjnych na ranach, zapobieganie powstawaniu nieprzyjemnego zapachu w ranie, przyspieszenie gojenia się ran. Celem wynalazku jest również dostarczenie łatwego sposobu wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi własnej osobnika, opatrunku wytworzonego tym sposobem oraz dostarczenie sposobu leczenia ran skóry z wykorzystaniem autologicznego opatrunku z krwi osobnika.

Wynalazek dotyczy zestawu do wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi, który zawiera pojemnik kształtujący i pokrywę pojemnika kształtującego o kształcie i rozmiarze wynikającym z n-typo-szeregu; pojemnik kształtujący ma zasadniczo płaską podstawę i ściany boczne pojemnika kształtującego o zasadniczo równej wysokości; pokrywa ma wieko i ściany boczne pokrywy o zasadniczo równej wysokości; pokrywa spasowana jest kształtem i rozmiarem z pojemnikiem kształtującym tak, że po nałożeniu pokrywy na pojemnik kształtujący, ściany boczne pokrywy zasadniczo przylegają wewnętrzną stroną do zewnętrznej strony ścian bocznych pojemnika kształtującego; ściany boczne pojemnika kształtującego są wyższe niż ściany boczne pokrywy, pojemnik kształtujący jest wytworzony ze stali nierdzewnej i co najmniej powierzchnia dna pojemnika kształtującego od wewnątrz ma chropowatą powierzchnię, o stopniu chropowatości w zakresie 0,01–100 μm.

W korzystnym zestawie zarówno pojemnik kształtujący i pokrywa pojemnika kształtującego wykonane są ze stali nierdzewnej, korzystnie ze stali nierdzewnej dopuszczonej do użytku medycznego.

W korzystnym zestawie w pokrywie znajduje się co najmniej jeden otwór i/lub wpust wprowadzający.

W korzystnym zestawie wpust wprowadzający jest wytworzony jako typu luer – lock lub luer.

W korzystnym zestawie pojemnik kształtujący i pokrywa pojemnika kształtującego w n-typoszeregu jest wybrana z kształtu o przekroju poprzecznym o kształcie zbliżonym do kwadratu, koła, elipsy, prostokąta, trójkąta, sześciokąta, kształtu serca, korzystnie kwadratu z zaokrąglonymi wierzchołkami.

W korzystnym zestawie stopnień chropowatości jest w zakresie 0,05–10 μm, korzystniej w zakresie 0,2–0,4 μm.

W korzystnym zestawie chropowata powierzchnia jest typu powierzchnia piaskowana, typu diamentowy pył, powierzchnia o porowatości liniowej, powierzchnia o porowatości krzyżowej.

W korzystnym zestawie chropowata powierzchnia piaskowana, ma mikro nacięcia i/lub mikro zagłębienia. Korzystnie mikro nacięcia i/lub mikro zagłębienia wytwarzane są laserem lub mechanicznie.

Korzystny zestaw jest o kształcie w przekroju poprzecznym zbliżonym do kwadratu o zaokrąglonych wierzchołkach, o rozmiarze zewnętrznym 52x52±20% mm, ścianie bocznej pokrywy o wysokości 10±20% mm; w pokrywie są rozmieszczone równomiernie cztery otwory oraz centralnie wpust wprowadzający typu luer – lock, przy czym zarówno pojemnik kształtujący i pokrywa wykonane są ze stali nierdzewnej, przy czym wewnętrza powierzchnia dna pojemnika kształtującego ma strukturę chropowatą w zakresie od 0,2 do 0,4 mikrometra, korzystniej cała wewnętrza powierzchnia pojemnika kształtującego ma strukturę chropowatą o stopniu chropowatości od 0,2 do 0,4 μm.

Wynalazek dotyczy również sposobu wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi osobnika, obejmującego etapy, w których a) pobraną od osobnika krew rozdziela się na dwie objętości, korzystnie dwie zasadniczo równe objętości; z pierwszej objętości uzyskuje się frakcję fibryny bogato komórkowej (l-PRF) poprzez wirowanie stosując od 50 RCF (xg) do 70 RCF (xg) przez 3 do 5 minut; z drugiej objętości uzyskuje się frakcję fibryny strukturalnej S-PRF poprzez wirowanie stosując od 600 RCF (xg) do 800 RCF (xg) przez 8 do 16 minut; b) uzyskane w a) frakcje l-PRF i S-PRF wprowadza się do wnętrza pojemnika kształtującego zestawu do wytworzenia tkankowych opatrunków autologicznych z krwi według wynalazku, przy czym frakcje l-PRF i S-PRF łączy się ze sobą w proporcji 1:5±20% frakcji l-PRF do frakcji S-PRF; c) dla wytworzenia opatrunku autologicznego zestaw do tworzenia tkankowych opatrunków autologicznych z połączonymi frakcjami l-PRF i S-PRF odstawia się na czas potrzebny do wytworzenia formy żelowej, korzystnie na 5 do 240 minut.

W korzystnym sposobie w etapie c) zestaw do tworzenia tkankowych opatrunków autologicznych z połączonymi frakcjami l-PRF i S-PRF odstawia się na czas w zakresie 10–40 min, korzystniej w zakresie 15–30 minut.

W korzystnym sposobie w etapie c) połączone frakcje l-PRF i S-PRF przed odstawieniem zestawu dla wytworzenia tkankowego opatrunku autologicznego delikatnie się miesza ze sobą, korzystnie poprzez delikatne kołysanie pojemnikiem kształtującym zestawu.

W korzystnym sposobie w etapie b) frakcje l-PRF i S-PRF łączy się ze sobą korzystniej w proporcji 1,5:4±20% frakcji l-PRF do frakcji S-PRF.

W korzystnym sposobie w etapie b) frakcje l-PRF i S-PRF łączy się ze sobą w strzykawce, korzystnie w strzykawce zaopatrzonej w końcówkę typu luer – lock.

W korzystnym sposobie dla wytworzenia 1 cm^3 opatrunku autologicznego o grubości 1±10% mm wprowadza się do wnętrza pojemnika kształtującego zestawu 2,1–2,3 ml, korzystniej 2,15–2,25 ml mieszaniny połączonych frakcji l-PRF i S-PRF.

W korzystnym sposobie w etapie a) rozdzielanie na frakcję fibryny bogato komórkowej (l-PRF) i frakcję fibryny strukturalnej (S-PRF) prowadzi się poprzez wirowanie równoległe w dwóch wirówkach.

W korzystnym sposobie w etapie b) połączone frakcje l-PRF i S-PRF wprowadza się do wnętrza pojemnika kształtującego przez otwór w pokrywie zestawu do wytworzenia tkankowych opatrunków autologicznych i/lub przez wpust wprowadzający w pokrywie, korzystniej wprowadza się przez wpust wprowadzający, korzystniej wprowadza się przez wpust typu luer, luer – lock.

W korzystnym sposobie w etapie a) rozdzielanie na frakcję fibryny bogato komórkowej (l-PRF) i frakcję fibryny strukturalnej (S-PRF) prowadzi się poprzez wirowanie krwi w probówkach apirogennych.

W korzystnym sposobie osobnikiem jest ssak, korzystnie człowiek.

Wynalazek dotyczy również opatrunku autologicznego z krwi wytworzonego sposobem według wynalazku.

Wynalazek dotyczy również opatrunku autologicznego z krwi według wynalazku i/lub wytworzonego sposobem według wynalazku do zastosowania do leczenia rany, rany cukrzycowej, rany stopy cukrzycowej, rany oparzeniowej, rany odleżynowej, rany odmrożeniowej, rany owrzodzeniowej, rany

pourazowej, rany chirurgicznej, rany przewlekłej, rany ciętej, rany kłutej, rany tłuczonej, rany będącej wynikiem działania energii promienistej, rany po terapii radiologicznej, rany po urazach chemicznych, rany pooperacyjnej, skaleczenia skóry, otarcia skóry, zadrapania skóry, stanu zapalnego skóry, choroby dermatologicznej, trądziku różowatego, choroby alergicznej skóry u osobnika.

Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania korzystnie jest stosowany do leczenia rany cukrzycowej, rany stopy cukrzycowej, rany oparzeniowej, rany odleżynowej, rany odmrożeniowej, rany owrzodzeniowej, rany pooperacyjnej.

Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania korzystnie w czasie leczenia jest zmieniany co najmniej co siedem dni.

Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania korzystnie w czasie leczenia jest zmieniany co 3–4 dni, korzystnie u osobnika w zastosowaniu do leczenia rany owrzodzeniowej, rany odleżynowej.

Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania jest korzystnie stosowany u osobnika, którym jest ssak, korzystnie człowiek.

Wynalazek dotyczy zatem nowego i prostego do wytworzenia sposobu wytwarzania opatrunku autologicznego za pomocą zestawu do wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi do tworzenia tkankowych opatrunków autologicznych tj. z krwi własnej pacjenta, który przyspiesza proces gojenia się m.in. ran oparzeniowych, odleżynowych, pooperacyjnych i owrzodzeniowych i stanów chorobowych skóry.

Sposób wytwarzania opatrunku według wynalazku polega na pozyskaniu dwóch frakcji fibryny z krwi własnej pacjenta: frakcji fibryny bogatokomórkowej (l-PRF), zawierającej skoncentrowaną ilość płytek krwi, leukocytów, cytokin, komórek macierzystych MSC i CD 34+ oraz frakcji fibryny strukturalnej (S-PRF) z włóknikiem, następnie obydwie frakcje zostają połączone, celem otrzymania autologicznego opatrunku tkankowego, korzystnie z zastosowaniem zestawu do wytwarzania tkankowych opatrunków autologicznych według wynalazku. Głównym osiągniętym celem zgodnie z ujawnionym wynalazkiem jest opracowanie opatrunku autologicznego, który skróci czas gojenia się ran o ok. 50% czasu, obecnie potrzebnego do wygojenia się ran, a także zredukuje koszty leczenia. Do dodatkowych korzyści osiągniętych za pomocą opatrunku autologicznego z krwi własnej pacjenta uzyskanego zgodnie z wynalazkiem zalicza się redukcję bliznowacenia oraz minimalizację bólu i możliwości wystąpienia reakcji uczuleniowej w porównaniu do standardowych opatrunków.

Sposób wytwarzania opatrunku według wynalazku, ze względu na osobne wirowanie dwóch frakcji fibryny na niskich obrotach oraz brak mechanicznego nacisku na skrzep w celu jego uformowania, w odróżnieniu od znanych metod minimalizuje proces niszczenia komórek i czynników krwi, które w postaci niezmienionej mogą uczestniczyć w kaskadzie krzepnięcia i tworzeniu opatrunku autologicznego.

W odróżnieniu od znanych dotąd metod dla wytworzenia opatrunku autologicznego zgodnie z wynalazkiem nie są stosowane żadne dodatkowe substancje czy dodatki, a autologiczny opatrunek według wynalazku powstaje w wyniku odtworzenia naturalnego i fizjologicznego procesu krzepnięcia krwi.

W trakcie wykonanych wielu doświadczeń z testami różnych typów materiałów do wytworzenia pojemnika kształtującego (plastiki, płytki laboratoryjne), nawet wytwarzając opatrunek z frakcji fibryny bogato komórkowej (l-PRF) i frakcji fibryny strukturalnej (S-PRF) zgodnie z ujawnionym sposobem nie uzyskiwano tak dobrych rezultatów, jak gdy pojemnik kształtujący wytworzony był z metalu, korzystnie stali nierdzewnej co najmniej z chropowatą powierzchnią dna wnętrza pojemnika kształtującego. W innym przypadku krzepnięcie było dość wolne, a otrzymywana skrzeplina nie miała tak jednolitej konsystencji żelowej o zasadniczo równomiernej grubości na powierzchni całego wytworzonego opatrunku. Przeprowadzono wiele doświadczeń z testami, podczas których porównano parametry wirowania, czasy krzepnięcia opatrunku autologicznego, trwałość opatrunku oraz łatwość w odseparowaniu od powierzchni dna wnętrza pojemnika kształtującego w zależności od typu materiału, z którego wytworzony był pojemnik kształtujący. W przypadku prób z pojemnikami plastikowymi oraz pojemnikami wykonanymi z medycznej stali nierdzewnej o całkowicie gładkiej powierzchni wewnętrznej – opatrunek pozostawał półpłynny, a nie żelowy. Zapewne dlatego właśnie, w znanych dotąd metodach zwykle dodawane są substancje aktywujące krzepnięcie, natomiast w przypadku pojemnika kształtującego zgodnego z niniejszym ujawnieniem nie ma takiej konieczności.

Nie wiążąc się żądną teorią, to właśnie chropowatość wewnętrznej powierzchni pojemnika kształtującego aktywuje przyleganie do powierzchni pojemnika kształtującego komórek płytek krwi z pozyskanej fibryny bogatokomórkowej l-PRF i fibryny strukturalnej S-PRF, przez co materiał komórkowy szybko polimeryzuje i tworzy opatrunek autologiczny o konsystencji żelu. Uruchamiany proces krzepnięcia opatrunku zachodzi w znacznie szybszym czasie, niż na pozostałych badanych powierzchniach. Nieocze-

kiwanie okazało się, że porowata powierzchnia wewnątrz pojemnika przyspiesza i odpowiednio strukturyzuje wytwarzanie opatrunku, co prowadzi do wytworzenia opatrunku w formie żelowej. Ponadto zapewnia odpowiednią strukturę wytwarzanego opatrunku, przez co uzyskuje się zasadniczo równomiernej grubości opatrunek ukształtowany co do kształtu zgodnie z użytą formą pojemnika kształtującego. Chropowatość na dnie pojemnika kształtującego najprawdopodobniej pozwala na adhezję – przyleganie płytek, która następnie aktywizuje i uruchamia kolejne etapy kaskady krzepnięcia. W trakcie doświadczeń wykazano, że pH stali nie ma wpływu na zatrzymanie procesu krzepnięcia i utworzenie żelowego opatrunku autologicznego. Uzyskana zgodnie z wynalazkiem forma opatrunku autologicznego umożliwia łatwe nałożenie i dopasowanie opatrunku do rany, jak również wpływa na jego właściwości terapeutyczne.

W zestawie do wytwarzania tkankowych opatrunków autologicznych jest on wytworzony ze stali nierdzewnej, przeznaczonej do użytku medycznego. W pojemniku kształtującym od wewnątrz co najmniej powierzchnia dna pojemnika kształtującego ma chropowatą powierzchnię, o stopniu chropowatości w zakresie 0,01–100 μm. Powierzchnia chropowata może być typu powierzchnia piaskowana, typu diamentowy pył, może być w postaci porowatości liniowej i krzyżowej przykładowo wytworzonej w wyniku nacięć czy zagłębień np. nacięć wykonanych laserem, czy dowolnym sposobem mechanicznym. Korzystnie przykładowo powierzchnia chropowata uzyskiwana jest podczas procesu piaskowania, dzięki któremu możemy otrzymać powierzchnię chropowatą z zakresu 0,05–10 μm, korzystniej z zakresu 0,2–0,4 μm.

W jednym z wykonań pokrywa zestawu do wytwarzania tkankowych opatrunków autologicznych może nie posiadać żadnego otworu i zestaw można po prostu sterylizować dłużej, w wyższej temperaturze lub jako dwie osobno rozłożone części, czyli pojemnik kształtujący i pokrywę górną osobno. W takim przypadku materiał komórkowy do wytworzenia opatrunku autologicznego wlewa się bezpośrednio do pojemnika kształtującego, a następnie nakłada dopasowaną kształtem i wielkością pokrywę, starając się przeprowadzić proces w warunkach sterylnych. W jednym z wykonań pokrywa zestawu do wytwarzania tkankowych opatrunków autologicznych posiada wpust wprowadzający, korzystnie typu luer – lock lub luer, które służą do wstrzyknięcia materiału autologicznego do środka zestawu, jak również ułatwiają sterylizację zestawu. W korzystnym wykonaniu zestawu pokrywa górna posiada otwór lub otwory przydatne do łatwiejszej sterylizacji zestawu (otwory zapewniają szybkie i równomierne wyrównanie ciśnienia i temperatury wewnątrz zestawu w procesie sterylizacji). W przypadku pojemnika o małej wielkości z powodzeniem wpust wprowadzający jednocześnie jest otworem, zapewniającym łatwą sterylizację.

Jedną z zalet opisanego rozwiązania jest proponowane podejście nie tylko w postaci zoptymalizowanego sposobu wytwarzania autologicznego opatrunku, ale i dopasowania wielkości i kształtu opatrunku do rany, wykorzystując dedykowany zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego, przez co opatrunek zapewnia równomierne i dość szczelne przykrycie całkowitej powierzchni rany i przyspiesza proces jej gojenia.

Żelowa konsystencja otrzymanego opatrunku, umożliwia dopasowanie się go do kształtu rany. Opatrunek ze względu na swoją konsystencję, wypełnia całkowicie przestrzeń rany, zatrzymuje dostęp bakterii, wirusów oraz innych drobnoustrojów ze środowiska zewnętrznego. Komórki obecne w opatrunku: leukocyty, cytokiny, płytki krwi, czynniki wzrostu, komórki macierzyste hematopoetyczne i mezenchymalne, stymulują przyspieszony proces gojenia się rany i regeneracji tkanki. Opatrunek autologiczny działa na podobnej zasadzie co przeszczep tkankowy. Podany na ranę, stanowi matrycę dla nowo tworzącej się tkanki, całkowicie wbudowując się w przestrzeń rany.

Do tej pory nie opracowano zestawów do wytwarzania opatrunku autologicznego do pozyskiwania opatrunków autologicznych z krwi własnej pacjenta o różnej wielkości, odpowiednio dostosowanych do wielkości rany, które nałożone bezpośrednio na ranę pacjenta przyspieszałyby proces gojenia.

Zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego będący przedmiotem niniejszego zgłoszenia przezwycięża niedogodności stanu techniki poprzez zapewnienie możliwości wytworzenia opatrunku autologicznego w łatwy sposób i dopasowanego do rany, który znacząco upraszcza i przyspiesza proces leczenia, minimalizuje ból oraz oszpecenie. Co więcej, przedmiotowy wynalazek pozwala na wytworzenie opatrunku autologicznego, który umożliwia zaopatrywanie trudno gojących się ran przewlekłych takich jak np. rany odleżynowe, tętnicze i żylne owrzodzenia nóg oraz rany oparzeniowe i pooperacyjne. Zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi pacjenta ma rozmiary i kształt wynikający z n-typoszeregu, przez co możliwe jest wytworzenie opatrunku dostosowanego do rozmiaru / rozległości rany, jak również głębokości rany. Wytworzony zgodnie z wynalazkiem opatrunek autologiczny przyśpiesza gojenie rany oraz zapobiega występowaniu powikłań rany, poprzez zapewnienie odpowiedniej

wilgotności, pH, wymiany gazowej i termoregulacji oraz kontrolowanego wycieku z rany, przy braku równoczesnej potrzeby częstej wymiany opatrunku, jak ma to miejsce w przypadku znanych opatrunków materiałowych czy hydrożelowych. Wytworzony zgodnie z wynalazkiem opatrunek autologiczny eliminuje ryzyko wystąpienia infekcji bakteryjnych oraz reakcji alergicznych. W odróżnieniu od znanych opatrunków nie ogranicza ruchomości stawu, a tym samym umożliwia aktywność fizyczną niezbędną do rehabilitacji.

Zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego zawiera spasowane kształtem i wielkością pojemnik kształtujący i pokrywę. Pojemnik kształtujący ma zasadniczo płaską podstawę i ściany boczne o zasadniczo równej wysokości. Pokrywa ma wieko pokrywy oraz ściany boczne pokrywy o zasadniczo równej wysokości. Pokrywa jest dopasowana wielkością do pojemnika kształtującego tak, że po nałożeniu pokrywy na pojemnik kształtujący ściany boczne pokrywy przylegają wewnętrzną stroną do zewnętrznej strony ścian bocznych pojemnika kształtującego. Wysokość ścian bocznych pojemnika kształtującego jest wyższa niż wysokość ścian bocznych pokrywy, tak, że po nałożeniu pokrywy na pojemnik kształtujący ściany boczne pojemnika kształtującego nie są całkowicie zakryte przez ściany boczne pokrywy. W pokrywie znajduje się co najmniej jeden otwór oraz wpust wprowadzający, umożliwiający bezpośrednie wprowadzenie do złożonego zestawu materiału autologicznego pacjenta np. za pomocą strzykawki. Korzystnie wpust wprowadzający jest typu luer – lock, co umożliwia łatwe wprowadzenie materiału autologicznego pacjenta z nakręconej na końcówkę typu luer – lock strzykawki z zakończeniem typu luer – lock.

Spasowane kształtem i wielkością pojemnik kształtujący i pokrywa mogą mieć w przekroju poprzecznym kształt zbliżony do kwadratu, prostokąta, elipsy, koła, serca, trójkąta, pięciokąta, sześciokąta, czy innego wielokąta i wykonane w rozmiarze wynikającym z n-typoszeregu.

Różne wielości i kształty zestawu pozwalają na wytworzenie opatrunku autologicznego o kształcie i wielkości zbliżonym do rany, na którą ma być nałożony opatrunek.

Korzystne jest gdy zestaw zawiera spasowane kształtem i wielkością pojemnik kształtujący i pokrywę w przekroju poprzecznym o kształcie wielokąta np. zasadniczo kwadratu czy prostokąta, to wierzchołki są zaokrąglone, co zapobiega zrywaniu czy fragmentowaniu opatrunku po jego wytworzeniu w trakcie jego wyjmowania z pojemnika kształtującego.

Przykładowo zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego zawiera spasowane kształtem i wielkością pojemnik kształtujący i pokrywę o kształcie w przekroju zasadniczo kwadratu o zaokrąglonych wierzchołkach w zakresie 1–25 cm długość każdej ściany bocznej pojemnika kształtującego i wysokości ściany bocznej pojemnika kształtującego w zakresie 0,2 cm – 10 cm, przykładowo o wielkości 5 cm x 5 cm x 2 cm, 7,5 cm x 7,5 cm x 3 cm, 10 cm x 10 cm x 4. Przykładowo zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego zawiera spasowane kształtem i wielkością pojemnik kształtujący i pokrywę o kształcie w przekroju koła w zakresie średnicy 1–30 cm i wysokości ściany bocznej pojemnika kształtującego w zakresie 0,2–10 cm. Przykładowo o średnicy 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25.

Zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego o różnych kształtach i rozmiarach zgodnych z n-typoszeregiem opatrywanej rany i wytworzony z jego wykorzystaniem zgodnie z opisanym sposobem opatrunek autologiczny jest odpowiedzią na problemy związane z gojeniem trudno gojących się ran, szczególnie oparzeniowych i odleżynowych.

Są możliwe różne wykonania zestawów, ale co najmniej pojemnik kształtujący jest wytworzony z metalu, korzystnie stali nierdzewnej, korzystnie szlachetnej, najlepiej stali nierdzewnej, dopuszczonej do użycia w medycynie i weterynarii. Pokrywa korzystnie jest wykonana z tego samego rodzaju materiału, ale dopuszczalne jest wykonanie jej z plastiku, korzystnie transparentnego.

W założeniu zestaw jest do wielokrotnego wykorzystania i nadaje się do sterylizacji.

A zatem, gdy zestaw do wytwarzania autologicznych opatrunków jest przeznaczony do wielokrotnego użycia, najczęściej cały zestaw jest wykonany z materiału z metalu, najczęściej stali nierdzewnej, nadaje się do sterylizacji. Zestaw można łatwo umyć, wysterylizować i ponowne wykorzystać. Łatwość i skuteczność sterylizacji oraz odpowietrzanie w trakcie podawania materiału do wytworzenia do złożonego zestawu, zapewnia co najmniej jeden otwór ukształtowany w pokrywie.

Opatrunki wytwarzane z autologicznej fibryny bogatopłytkowej zgodnie ze sposobem według wynalazku, umożliwią leczenie ran wykorzystujące autologiczne płytki krwi, czynniki wzrostu, komórki macierzyste, pozyskane z krwi własnej pacjenta. Proces tworzenia opatrunku polega na pozyskaniu dwóch frakcji fibryny z krwi własnej pacjenta: frakcji fibryny bogato komórkowej (l-PRF) oraz frakcji fibryny strukturalnej (S-PRF). Następnie obydwie frakcje są łączone, celem otrzymania autologicznego opa-

trunku tkankowego. Korzystnie do wytworzenia opatrunku stosowany jest zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego dopasowany do rany kształtem i rozmiarem zgodnych z n-typoszeregiem opatrywanej rany. Opatrunek autologiczny zapewnia m.in:

- przyspieszenie gojenia się ran o ok. 50%;
- redukcję częstości zmiany opatrunku: raz na 7 dni (w porównaniu do zwykłych opatrunków, które zmienia się pierwotnie codziennie, następnie co ok. 2–3 dni, przy czym, czynność ta nie powoduje bólu, w odróżnieniu od zmiany zwykłego opatrunku);
- ulega całkowitemu wchłonięciu;
- zapewnia bezpieczeństwo stosowania (ze względu na użycie materiału autologicznego wyeliminowane jest ryzyko wystąpienia reakcji alergicznej).

Okazało się, że opatrunek autologiczny według wynalazku wbudowuje się w tkankę rany, na którą jest zaaplikowany. Poszczególne elementy komórkowe fibryny: leukocyty, cytokiny, płytki krwi, czynniki wzrostu, komórki macierzyste hematopoetyczne i mezenchymalne stymulują przyspieszony proces gojenia się rany i regeneracji tkanki. Płytki krwi uwalniają czynniki wzrostu. Same ulegają degradacji w ciągu 7 dni, na drodze naturalnych procesów fizjologicznych. Obecne w opatrunku czynniki wzrostu stymulują procesy naprawcze, między innymi: angiogenezę, proliferację fibroblastów, proliferację komórek naskórka, wzrost syntezy kolagenu, wzrost syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej, migrację mezenchymalnych komórek macierzystych. Leukocyty stymulują migrację makrofagów z tkanki łącznej, makrofagi mają za zadanie oczyścić tkankę z resztek komórkowych, co umożliwia rozpoczęcie procesu regeneracji i odbudowy tkanki. Hematopoetyczne komórki macierzyste mają zdolności do nieograniczonej liczby podziałów i różnicowania się w komórki innych tkanek. Stopniowo depolimeryzująca fibryna stanowi tymczasową matrycę dla nowo tworzącej się tkanki. Opatrunek zatem działa jak autologiczny przeszczep tkankowy.

W przeprowadzonych badaniach klinicznych wykazano wysoką skuteczność działania opatrunku autologicznego, wytworzonego zgodnie ze sposobem wytwarzania opatrunku według wynalazku, w zestawie do wytwarzania opatrunku według wynalazku, w różnych typach ran u pacjentów, z różnymi jednostkami chorobowymi m.in. w grupach pacjentów z ranami owrzodzeniowymi, odleżynowymi, oparzeniowymi, pooperacyjnymi i stopą cukrzycową. We wszystkich badanych przypadkach zastosowanie opatrunku według wynalazku skutkowało znacznym zmniejszeniem długości, szerokości i głębokości ran.

Skuteczność opatrunku potwierdzono nawet w ranach, które występowały u pacjentów od bardzo długiego czasu, przykładowo udało się uzyskać proces gojenia rany odleżynowej, która w żaden sposób nie poddawała się leczeniu od 10 lat. Autologiczny opatrunek działa nie tylko na rany płytkie, ale i na rany głębokie, nawet do 100 mm głębokości. W przeprowadzonych badaniach skuteczne działanie opatrunku wykazano u pacjenta z raną odleżynową na pośladku, która z głębokości 70 mm, zmniejszyła swoją głębokość do 50 mm (redukcja ponad 30%) już po dwóch tygodniach od rozpoczęcia terapii (wyniki nie pokazane).

W trakcie stosowania opatrunku według wynalazku zwykle zmieniano opatrunek raz na 7 dni, co było w pełni wystarczające i nie zaburzało procesu gojenia się rany. Zaobserwowano jednak, że u pacjentów z dużymi i rozległymi ranami owrzodzeniowymi i odleżynowymi, które charakteryzują się dużym wysiękiem, korzystnie można zmieniać opatrunek częściej np. co 3–4 dni, co w konsekwencji dodatkowo redukowało ryzyko wystąpienia przesączania rany oraz maseracji tkanek i dodatkowo przyspieszało proces gojenia.

Z uwagi na powyższe efekty, autologiczny opatrunek według wynalazku stanowi doskonałą alternatywę do aktualnie stosowanych opatrunków i znacznie upraszcza oraz skraca procedurę leczenia trudno gojących się ran, a tym samym wpływa na zwiększoną skuteczność leczenia i komfortu życia pacjentów. Jednocześnie stosowanie autologicznego opatrunku ogranicza koszty leczenia ran. Dla przykładu, obecny koszt leczenia rany oparzeniowej szacuje się na poziomie od 2 tys. do 58 tys. zł. Koszt pobytu w szpitalu pacjenta z odleżyną szacuje się na ok. 120 PLN dziennie, a leczenie może trwać nawet do kilkudziesięciu miesięcy. Dodatkowo odleżyny niweczą zwykle nakłady poniesione na rehabilitację, leczenie zachowawcze i operacyjne. Otrzymany opatrunek autologiczny według wynalazku przyspiesza proces gojenia się ran, m.in. oparzeniowych, odleżynowych, owrzodzeniowych, cukrzycowych i pooperacyjnych o 50%, a tym samym, poza zwiększoną skutecznością, obniża koszty ich leczenia.

KRÓTKI OPIS FIGUR RYSUNKU

Przykładowe realizacje wynalazku zaprezentowano na figurach rysunku, na których:

Fig. 1 Przedstawia zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego o kształcie pojemnika kształtującego i pokrywy zasadniczo kwadratowym w przekroju poprzecznym z zaokrąglonymi brzegami, z 4 otworami w pokrywie. **A** – zestaw złożony w widoku z boku, **B** – zestaw złożony w widoku

rzutu z góry po skosie, **C** – zestaw złożony w widoku z góry, **D** – zestaw złożony w widoku z dołu, **E** – zdjęcie zestawu w widoku z góry z boku, **F** – zdjęcie zestawu w formie rozłożonej, **G** – pojemnik kształtujący z góry po skosie z chropowatą powierzchnią na dnie wnętrza pojemnika kształtującego.

Fig. 2 Przedstawia schematycznie przykładowy zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego o kształcie pojemnika kształtującego i pokrywy o kształcie okręgu w przekroju poprzecznym, z jednym otworem w pokrywie. **A** – zestaw złożony w widoku z boku – zestaw złożony w widoku rzutu z góry po skosie, **C** – zestaw złożony w widoku z dołu, **D** – zestaw złożony w widoku z góry.

Fig. 3 Przedstawia schematycznie przykładowy zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego pojemnika kształtującego i pokrywy o kształcie elipsy w przekroju poprzecznym, z 8 otworami w pokrywie. **A** – zestaw złożony w widoku z boku, **B** – zestaw złożony w widoku rzutu z góry po skosie, **C** – zestaw złożony w widoku z dołu, **D** – zestaw złożony w widoku z góry.

Fig. 4 Przedstawia schematycznie złożone zestawy do wytwarzania opatrunku autologicznego o różnych kształtach pojemnika kształtującego i pokrywy. **A** – prostokątnym z 12 kwadratowymi otworami w widoku rzutu z góry z boku, **B** – trójkątnym w widoku rzutu z góry z boku z wpustem wprowadzającym i trzema otworami w kształcie trójkątów, **C** – sześciokątnym w widoku rzutu z góry z boku z wpustem wprowadzającym i ośmioma otworami w pokrywie, **D** – o kształcie serca, bez otworu i bez wpustu wprowadzającego w widoku rzutu z góry z boku.

Fig. 5 Przedstawia odpowiednio zdjęcia: **A** i **B** – opatrunków z krwi wytworzonych zgodnie z metodą ze stanu techniki, **C** – opatrunku z krwi wytworzonego sposobem według wynalazku (przed wyjęciem z pojemnika kształtującego), **D** – probówki po odwirowaniu krwi z frakcją I-PRF (lewa) i frakcją S-PRF (prawa) przed ich połączeniem, **E** – strzykawki z pobranymi po odwirowaniu frakcjami I-PRF (lewa) oraz S-PRF (prawa) przed umieszczeniem w pojemniku kształtującym.

Fig. 6 Przedstawia odpowiednio zdjęcia z poszczególnych faz leczenia ran owrzodzeniowych: **A** – rana bez opatrunku w D1 (próba 1), **B** – rana w D1 po założeniu opatrunku autologicznego (próba 1), **C** – rana w D49 leczenia opatrunkiem autologicznym po jego zdjęciu (próba 1), **D** – rana bez opatrunku w D1 (próba 2a), **E** – rana w D1 po założeniu opatrunku Aqua-Gel® (próba 2a), **F** – rana w D7 po zdjęciu opatrunku Aqua-Gel® (próba 2a), **G** – rana w D7 po założeniu opatrunku autologicznego (próba 2b), **H** – rana w D14 po zdjęciu opatrunku autologicznego (próba 2b), **I** – rana w D49 po zdjęciu opatrunku autologicznego (próba 2b).

Fig. 7 Przedstawia odpowiednio zdjęcia z poszczególnych faz leczenia rany odleżynowej: **A** – rana bez opatrunku w D1 (próba 3), **B** – rana w D1 po założeniu opatrunku autologicznego (próba 3), **C** – rana w D7 leczenia opatrunkiem autologicznym po jego zdjęciu (próba 3), **D** – rana w D28 leczenia opatrunkiem autologicznym po jego zdjęciu (próba 3), **E** – rana w D28 po założeniu opatrunku autologicznego (próba 3), **F** – rana w D49 po zdjęciu opatrunku autologicznego (próba 3).

Fig. 8 Przedstawia odpowiednio zdjęcia z poszczególnych faz leczenia ran oparzeniowych: **A** – rana bez opatrunku w D1 (próba 4), **B** – rana w D1 po założeniu opatrunku autologicznego (próba 4), **C** – rana w D21 po zdjęciu opatrunku autologicznego (próba 4), **D** – rana bez opatrunku w D1 (próba 5), **E** – rana w D1 po założeniu opatrunku autologicznego (próba 5), **F** – rana w D21 po zdjęciu opatrunku autologicznego (próba 5).

Fig. 9 Przedstawia odpowiednio zdjęcia z poszczególnych faz leczenia rany cukrzycowej stopy: **A** – rana bez opatrunku w D1 (próba 6), **B** – rana w D7 leczenia opatrunkiem autologicznym po jego zdjęciu (próba 6), **C** – rana w D21 leczenia opatrunkiem autologicznym po jego zdjęciu (próba 6), **D** – rana w D28 leczenia opatrunkiem autologicznym po jego zdjęciu (próba 6), **E** – rana w D28 po założeniu opatrunku autologicznego (próba 6), **F** – rana w D35 po zdjęciu opatrunku autologicznego (próba 6).

PRZYKŁADY WYKONANIA WYNALAZKU

Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są w całości niniejszym włączone, jako referencje. Poniższe przykłady ilustrują wynalazek, nie ograniczając go w żaden sposób

W przykładach stosowano standardowe materiały i metody zgodne z zaleceniami producentów, chyba, że wskazano inaczej.

Przykład 1. Zestaw do wytwarzania autologicznych opatrunków na rany

Zestaw do wytwarzania autologicznych opatrunków przedstawiony na Fig. 1 A-F składa się ze spasowanych kształtem i wielkością pojemnika kształtującego 1 i pokrywy 2 o kształcie w przekroju poprzecznym zasadniczo zbliżonym do kwadratu o zaokrąglonych wierzchołkach kwadratu. Pojemnik kształtujący 1 ma zasadniczo płaską podstawę 5 o wielkości 50x50 mm. Ściany boczne 6 pojemnika

kształtującego mają wysokość 19 mm. Zestaw po złożeniu ma wysokość 20 mm. Pokrywa 2 ma wieko 7 o kształcie w przekroju poprzecznym zbliżonym do kwadratu o zaokrąglonych wierzchołkach, o rozmiarze zewnętrznym 52x52 mm. Ściany boczne 8 pokrywy mają wysokość 10 mm. Pokrywa 2 jest dopasowana wielkością do pojemnika kształtującego 1 tak, że po nałożeniu pokrywy na pojemnik kształtujący, ściany boczne pokrywy zasadniczo przylegają wewnętrzną stroną do zewnętrznej strony ścian bocznych pojemnika kształtującego. W pokrywie 2 znajdują się rozmieszczone równomiernie cztery otwory 4 o średnicy 4 mm każdy oraz wpust wprowadzający 3, wytworzony jako gwint typu luer dla nakręcania strzykawki z materiałem autologicznym od pacjenta. Wpust wprowadzający 3 ma wysokość 7 mm, średnicę zewnętrzną 4 mm i średnicę wewnętrzną 3 mm. Wpust typu luer – lock ma gwint i umożliwia nakręcenie strzykawki na wpust wprowadzający i zapewnia łatwe wprowadzenie materiału autologicznego pacjenta z nakręconej na końcówkę typu luer – lock strzykawki z zakończeniem typu luer – lock, jak również zapewnia higienę i sterylność, przy wprowadzaniu materiału do złożonego zestawu.

W tym wykonaniu cały zestaw został wytworzony ze stali nierdzewnej. Co najmniej wewnętrza powierzchnia 9 dna pojemnika kształtującego 1 ma strukturę chropowatą w zakresie od 0,2 do 0,4 mikrometra, przy czym chropowatość wytworzono metodą piaskowania wewnętrznej powierzchni pojemnika. W przypadku zestawu przedstawionego na **Fig. 1 A-F** chropowatość jest na całej wewnętrznej powierzchni pojemnika kształtującego jak i pokrywy 2. Korzystne jest gdy chropowatość jest wytworzona jedynie na wewnętrznej powierzchni 9 dna pojemnika kształtującego, a powierzchnia ścian bocznych pojemnika kształtującego jest gładka, gdyż wytwarzany w takim pojemniku kształtującym opatrunek autologiczny łatwiej się z niego w całości wyjmuje (**Fig. 1G**).

Zestaw do wytwarzania autologicznych opatrunków pozwala na wytworzenie opatrunku autologicznego o powierzchni i kształcie odpowiadającym wewnętrznej powierzchni pojemnika kształtującego 1 o grubości opatrunku w zakresie od 0,5 do 10 mm, korzystnie w zakresie od 1 do 5 mm, korzystniej w zakresie od 2 do 4 mm, w zależności od ilości wykorzystanego do jego wytworzenia materiału biologicznego.

Gotowy do wytworzenia zestaw do wytwarzania autologicznego opatrunku na ranę uzyskuje się poprzez nałożenie pokrywy 2 na pojemnik kształtujący 1.

Przykład 2. N-typoszeregi zestawów o różnych kształtach

N-typoszeregi zestawów do wytwarzania autologicznych opatrunków ze spasowanym kształtem i wielkością pojemnika kształtującego i pokrywy o przekroju poprzecznym o kształcie zbliżonym do kwadratu (**Fig. 1 A-F**), koła (**Fig. 2 A-D**), elipsy (**Fig. 3 A-D**), prostokąta (**Fig. 4A**), trójkąta (**Fig. 4B**), sześciokąta (**Fig. 4C**), kształtu serca (**Fig. 4D**), wykonano w rozmiarze wynikającym z n-typoszeregu o danym kształcie zgodnie z poniższym opisem schematycznym i ich przedstawieniu na ww. figurach. Zestawy wykonano ze stali nierdzewnej.

Każdy zestaw w danym N-typoszeregi różni się rozmiarem i składa się ze spasowanych kształtem i wielkością pojemnika kształtującego 1 i pokrywy 2, jak opisano w Przykładzie 1 z tą różnicą, że:

- zestaw z **Fig. 4D** nie ma otworu 4 ani wpustu wprowadzającego 3;
- w zestawie z **Fig. 4A** jest wiele otworów 4, z których dowolny pełni rolę wpustu wprowadzającego 3;
- w zestawie z **Fig. 2** wpust wprowadzający 3 jest zwykłym otworem i jednocześnie umożliwia łatwą sterylizację, czyli pełni funkcje otworów 4 z innych wykonań.

W zestawach pojemnik kształtujący 1 ma zasadniczo płaską podstawę 5 i ściany boczne 6 pojemnika kształtującego są o zasadniczo równej wysokości. Pokrywa 2 ma wieko 7 pokrywy oraz ściany boczne 8 pokrywy o zasadniczo równej wysokości. Pokrywa 2 jest dopasowana wielkością do pojemnika kształtującego 1 tak, że po nałożeniu pokrywy na pojemnik kształtujący, ściany boczne pokrywy zasadniczo przylegają wewnętrzną stroną do zewnętrznej strony ścian bocznych pojemnika kształtującego. Wysokość ścian bocznych 6 pojemnika kształtującego jest wyższa niż wysokość ścian bocznych 8 pokrywy, tak, że po nałożeniu pokrywy 2 na pojemnik kształtujący 1, ściany boczne 6 pojemnika kształtującego nie są całkowicie zakryte przez ściany boczne 8 pokrywy. Gdy w pokrywie znajduje się co najmniej jeden otwór 4 i/lub wpust wprowadzający 3, możliwe jest bezpośrednie wprowadzenie do złożonego zestawu materiału autologicznego pacjenta np. za pomocą strzykawki czy to przez otwór, czy przez wpust wprowadzający. Korzystnie wpust wprowadzający 3 jest wytworzony jako typu luer, czy gwint luer – lock.

W poniższej **Tabeli 1** przedstawiono rozmiary wytworzonych różnych zestawów do wytwarzania autologicznych opatrunków.

Tabela 1

Kształt	Rozmiar podstawy kształtującej [cm]	Rozmiar pokrywy [cm]	Wysokość zestawu po złożeniu [cm]	Ilość otworów w pokrywie	Wpust wprowadzający
kwadrat	2x2 (boki)	2,1x2,1 (boki)	2	2	Bez gwintu
	7,5x7,5 (boki)	7,6x7,6 (boki)	2,5	4	typu luer – lock
	10x10(boki)	10,1x10,1 (boki)	4	6	typu luer – lock
prostokąt	2x6 (boki)	2,1x6,1 (boki)	2	1	Bez gwintu
	3x8 (boki)	3,1x8,1 (boki)	3	2	typu luer – lock
	4x10 (boki)	4,1x10,1 (boki)	5	4	typu luer – lock
Elipsa	3x7 (w osi małej i osi wielkiej)	3,1x7,1 (w osi małej i osi wielkiej)	2	2	typu luer – lock
	2x6 (w osi małej i osi wielkiej)	2,1x6,1 (w osi małej i osi wielkiej)	5	3	Bez gwintu
	7x15 (w osi małej i osi wielkiej)	7,1x15,1 (w \osi małej i osi wielkiej)	6	5	typu luer – lock
koło	3 (średnica)	3,1 (średnica)	2	2	typu luer – lock
	6 (średnica)	6,1 (średnica)	4	4	Bez gwintu
	20 (średnica)	20,1 (średnica)	10	8	typu luer – lock

Przykład 3. Sposób wytwarzania opatrunku autologicznego

Wytwarzanie autologicznego opatrunku według wynalazku przeprowadzono przy użyciu następujących materiałów i sprzętów: wirówki laboratoryjnej z wirowaniem w zakresie zapewniającym wirowanie 60–720xg, pincety anatomicznej 16 cm, probówek apirogennych z przeznaczeniem do obróbki materiału biologicznego, zestawu do wytwarzania opatrunku autologicznego, wykonanego zgodnie z **Przykładem 1**, igły motylkowej z holderem, igły pobraniowej, strzykawki 5 ml, łopatki do modelowania wygiętej obustronnie.

Pobranie krwi i jej frakcjonowanie

Krew pobrano od pacjenta, dla którego miał być wytworzony opatrunek autologiczny, w ilości łącznej 18 ml i rozdzielono do dwóch probówek po około 9 ml, przy pomocy igły motylkowej z holderem. Każdą próbkę odwirowywano w innej wirówce, choć możliwe jest odwirowanie probówek jedna po drugiej, w tej samej wirówce, z zachowaniem innych warunków wirowania.

Dla uzyskania frakcji fibryny bogato komórkowej (l-PRF) próbkę krwi odwirowywano z prędkością 860 RPM (60xg) przez 4 minuty, co prowadziło do uzyskania frakcji l-PRF w górnej warstwie probówki. Dla uzyskania frakcji fibryny strukturalnej (S-PRF), drugą probówkę odwirowywano z prędkością 2880 RPM (720xg) przez 12 min, co prowadziło do uzyskania frakcji S-PRF w górnej warstwie próbki. Po wirowaniu otrzymano około 1,5 ml frakcji l-PRF oraz 4 ml frakcji S-PRF. Zarówno l-PRF oraz S-PRF po odwirowaniu są w supernatancie, czyli stanowią górną frakcję odwirowanej krwi, łatwą do odróżnienia i oddzielenia, gdyż dolną frakcję stanowią erytrocyty, które pod wpływem wirowania opadają na dno, co uwidoczniono na **Fig. 5 D**. Dla uzyskania frakcji fibryny komórkowej l-PRF, wirowanie prowadzi się stosując od 50 RCF (xg) do 70 RCF (xg), w czasie od 3 do 5 minut. Dla uzyskania frakcji fibryny strukturalnej S-PRF, wirowanie prowadzi się stosując od 600 RCF (xg) do 800 RCF (xg), w czasie od 8 do 16 minut.

Wytworzenie opatrunku autologicznego

Przy użyciu strzykawki z igłą pobrano cały uzyskany materiał z fibryną z nad osadu z obu probówek tj. frakcje l-PRF oraz S-PRF (**Fig. 5E**), strzykawki nakręcono jedna po drugiej na otwór typu luer – lock, na złożonym zestawie do wytwarzania autologicznych opatrunków, wytworzonym zgodnie z **Przykładem 1** (Fig. 1 A-E) i przeniesiono za pomocą strzykawki mieszaninę frakcji fibryny do wnętrza zestawu do tworzenia tkankowych opatrunków autologicznych. Całość delikatnie zamieszano i odstawiono na 20 minut (korzystnie w zakresie 10–40 min, korzystniej w zakresie 15–30 minut) do wytworzenia się opatrunku w formie żelowej (czas ten jest indywidualną kwestią zależną od pacjenta oraz ilości pobranego materiału, w związku z czym może on się wydłużyć lub skrócić).

Alternatywnie frakcję l-PRF oraz S-PRF można połączyć w jednej strzykawce i wprowadzić do pojemnika kształtującego 6 zestawu do wytworzenia tkankowych opatrunków autologicznych z krwi.

Z przeprowadzonych prób wynika, że dla wytworzenia około 1±20% cm^3 opatrunku o standardowej grubości 1±20% mm potrzeba około 2,1–2,3 ml, najczęściej około 2,15–2,25 ml materiału autologicznego (połączonej fibryny komórkowej l-PRF oraz fibryny strukturalnej S-PRF). Najlepsze rezultaty otrzymuje się przy zastosowaniu proporcji 1:5±20%, korzystniej 1,5:4±20% frakcji l-PRF do frakcji S-PRF.

Na opatrunek o wymiarach 5 cm długości x 5 cm szerokość x 0,1 cm grubości wykorzystano 1,5 ml odwirowanego supernatantu fibryny bogatokomórkowej (l-PRF) z jednej probówki oraz 4 ml odwirowanego supernatantu fibryny strukturalnej (S-PRF) z drugiej probówki, czyli łącznie 5,5 ml materiału autologicznego z obu frakcji fibryn, wykorzystanego do otrzymania opatrunku autologicznego. Po przeliczeniu wychodzi około 2,15–2,25 ml materiału autologicznego w postaci połączonej fibryny komórkowej l-PRF oraz fibryny strukturalnej S-PRF) na centymetr sześcienny objętości, dla opatrunku o standardowej grubości około 0,1 cm.

Sposobem według wynalazku z 1 ml krwi wyjściowej uzyskuje się opatrunek o grubości około 1 mm o objętości około 0,14 cm^3 (na wytworzenie 1 cm^3 opatrunku potrzeba zatem jedynie 7,14 ml krwi wyjściowej).

Nakładanie opatrunku na ranę

Wytworzony opatrunek miał grubość około 1 mm, który to następnie oddzielono od ścianek bocznych 6 pojemnika kształtującego 1 zestawu do wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi za pomocą dwustronnie wygiętej łopatki po lekkim podważeniu opatrunku. Gotowy opatrunek nakładano na ranę, wyciągając go z pojemnika za pomocą łopatki oraz pęsety anatomicznej dołączonej do zestawu łapiąc za róg opatrunku. Wytworzony sposobem według wynalazku opatrunek nakładano na ranę i ewentualnie dodatkowo zabezpieczano jałową gazą i/lub bandażem i/lub plastrem.

Wytworzenie opatrunków porównawczych z krwi dla porównania wydajności z opatrunkiem według wynalazku

W ramach przeprowadzonych badań porównawczych z 10 ml krwi wytworzono:

A) Skrzep fibrynowy wytworzony znanym sposobem

Z 10 ml krwi wytworzono opatrunek sposobem opisanym w Ghanaati i wsp., 2014. Pobrano 10 ml krwi pełnej. Dla uzyskania frakcji fibryny komórkowej (A-PRF) próbkę krwi odwirowywano z prędkością 1500 RPM przez 14 minut. Po odwirowaniu skrzepy ostrożnie wydobyto z probówek (**Fig. 5A**). Frakcję czerwonych krwinek (RBC) usunięto w taki sposób, aby nie uszkodzić dna skrzepu bogatego w fibrynę. Skrzepy na bazie fibryny z kożuszkiem leukocytarnym i częścią krwinek czerwonych utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu przez 24 godziny. Następnie zostały one umieszczone wzdłuż osi podłużnej w kasetach osadzających. Poprzez dociśnięcie skrzepów w kasecie osadzającej uzyskano opatrunek o rozmiarach ok. 3,5 cm długości x 1 cm szerokości x 0,1 cm grubości (**Fig. 5B**). Tym sposobem można uzyskać z 10 ml krwi wyjściowej opatrunek o grubości 1 mm o wielkości ok 0,35 cm^3. Dla wytworzenia 1 cm^3 opatrunku potrzeba 28,57 ml krwi wyjściowej.

B) Wytwarzając opatrunek sposobem według wynalazku z 10 ml krwi wyjściowej uzyskuje się opatrunek o grubości 1 mm o wielkości ok 1,39 cm^3 (na wytworzenie 1 cm^3 opatrunku potrzeba zatem jedynie 7,14 ml krwi wyjściowej).

Wytwarzanie opatrunku autologicznego sposobem według wynalazku, z zastosowaniem zestawu do tego dedykowanego, daje wyższą wydajność jeśli chodzi o objętość i powierzchnię opatrunku z tej samej ilości krwi wyjściowej.

Przykład 4 Zastosowanie opatrunku autologicznego w terapii ran

Skuteczność działania autologicznych opatrunków wytworzonych zgodnie z wynalazkiem potwierdzono w klinicznym badaniu porównawczym gojenia ran w różnych jednostkach chorobowych. Opatrunki autologiczne wykonywano z krwi własnej pacjentów zgodnie z **Przykładem 3**. Kolejne dni leczenia oznaczano jak D z odpowiednim numerem dnia leczenia.

A. Leczenie ran w przewlekłym w owrzodzeniu podudzi

Badanie porównawcze przeprowadzono u pacjenta w wieku 72 lat z niegojącymi się ranami obu podudzi. Pacjent z: przewlekłym owrzodzeniem podudzia lewego i prawego o typie mieszanym, implantem stentu do lewej tętnicy udowej, miażdżycą kończyn dolnych, żylakami kończyn dolnych, nadciśnieniem tętniczym i przerostem prostaty. Rany powstały 9 miesięcy przed włączeniem do próby klinicznej i były uprzednio bezskutecznie leczone w poradni chirurgicznej opatrunkami ze srebrem, Granuflex, opatrunkami hydrokoloidowymi. W dniu rozpoczęcia badania rany bolesne z wysiękiem zapalnym.

W dniu pierwszym D1 leczenia rana na nodze lewej (próba nr 1) została zaopatrzona opatrunkiem autologicznym, a rana na nodze prawej sterylnym opatrunkiem hydrożelowym Aqua-Gel® (Kikgel, Polska). Opatrunek stanowi transparentny płat hydrożelu o grubości ok. 3,5 mm (+/- 0,5 mm), który stanowi wodną kompozycję usieciowanych naturalnych oraz syntetycznych polimerów, tworzących trójwymiarową, przestrzenną sieć, o zawartości wody ponad 90%, (kontrolna pozytywna do D7 – próba 2a).

Po 7 dniach leczenia (D7) zdjęto oba opatrunki. Dla rany z opatrunkiem autologicznym zaobserwowano znaczną poprawę, a dla leczonej opatrunkiem Aqua-Gel® zaobserwowano znaczne pogorszenie stanu rany, w związku z tym ze względów humanitarnych włączono ranę na nodze prawej do badania jako próbę badawczą i na obie rany, zarówno na nodze lewej i prawej nałożono opatrunek autologiczny w D7. Po kolejnym tygodniu w D14 od rozpoczęcia leczenia, na obu kończynach zaobserwowano znaczną poprawę i zmniejszenie się ran. Opatrunki zmieniano w odstępach co siedem dni do dnia 49 (D49). Uzyskane wyniki przedstawiono w **Tab. 1**, a zdjęcia z poszczególnych faz leczenia obu ran na **Fig. 6 A-I**.

B. Leczenie ran odleżynowych

Badanie przeprowadzono u pacjenta w wieku 18 lat z odleżyną grzbietu prawej stopy, spowodowaną ciągłym naciskiem danego miejsca o podłoże. Pacjent z: mózgowym porażeniem dziecięcym, końsko-szpotawą stopą prawą, odleżyną grzbietu prawej stopy, spowodowaną ciągłym naciskiem o podłoże. W przeszłości przeprowadzono u niego zabieg operacyjny korekty stopy lewej. Pacjent ma tendencję do złego gojenia się ran i bliznowców. Rana powstała 12 miesięcy przed włączeniem do próby klinicznej i była uprzednio bezskutecznie leczona w poradni chirurgicznej opatrunkami ze srebrem, Granuflex, opatrunkami hydrokoloidowymi. Pacjent na opatrunki wydał około 12 tysięcy złotych w przeciągu roku przed przystąpieniem do leczenia. W dniu rozpoczęcia leczenia rana z dużym obrzękiem grzbietu stopy, bolesna, zaczerwieniona, z wysiękiem zapalnym.

W dniu pierwszym D1 leczenia rana na nodze prawej (próba nr 3) została zaopatrzona opatrunkiem autologicznym. Po 7 dniach (D7) zdjęto opatrunek. Dla rany z opatrunkiem autologicznym zaobserwowano znaczną poprawę. Po kolejnym tygodniu w dniu D14 od rozpoczęcia leczenia zaobserwowano znaczną poprawę i zmniejszenie się rany. Opatrunki zmieniano w odstępach co siedem dni do dnia 49 (D49). Uzyskane wyniki przedstawiono w **Tab. 1**, a zdjęcia z poszczególnych faz leczenia rany na **Fig. 7 A-F**.

C. Leczenie ran oparzeniowych

Badanie przeprowadzono u pacjenta w wieku 23 lat z otwartymi ranami obu stóp, będącymi wynikiem oparzenia, które uniemożliwiały mu normalne chodzenie. Pacjent z: oparzeniami 19% powierzchni ciała, będącymi wynikiem utraty przytomności pod prysznicem i długotrwałego efektu działania gorącej wody na ciało. Oparzenia obejmowały obie dłonie, przedramię prawe oraz obie stopy i prawe podudzie. Pacjent leczony był w Szpitalu Kotliny Jeleniogórskiej, skąd został przetransportowany śmigłowcem na oddział oparzeń w Nowej Soli, w którym spędził 3 miesiące. Wykonano liczne przeszczepy skóry z ud na podudzia oraz stopy. Rany powstały 3 miesiące przed włączeniem do próby klinicznej i były uprzednio bezskutecznie leczone opatrunkami hydrożelowymi, opatrunkami ze srebrem, Granuflex, opatrunkami hydrokoloidowymi. W dniu rozpoczęcia badania pacjent miał otwarte rany na obu stopach, ze znaczną bolesnością miejscową, zaczerwienieniem i obrzękiem.

W dniu pierwszym D1 leczenia rana na nodze prawej (próba nr 4) i rana na nodze lewej (próba nr 5) zostały zaopatrzone opatrunkiem autologicznym. Po 7 dniach (D7) zdjęto opatrunek. Dla obu ran z opatrunkiem autologicznym zaobserwowano znaczną poprawę. Po kolejnym tygodniu w dniu D14 od rozpoczęcia leczenia zaobserwowano znaczną poprawę i zmniejszenie się rany. Ustąpiły dolegliwości bólowe oraz stan zapalny. Opatrunki zmieniano w odstępach co siedem dni do dnia 21 (D21). Uzyskane wyniki przedstawiono w **Tab. 1**, a zdjęcia z poszczególnych faz leczenia rany na **Fig. 8 A-F**.

D. Leczenie rany cukrzycowej – rana stopy cukrzycowej

Badanie przeprowadzono u pacjenta w wieku 48 lat z raną cukrzycową prawej stopy. Pacjent z: otyłością, żylakami podudzi, zespołem pozakrzepowym, cukrzycą typu 2, w trakcie insulinoterapii. Rana powstała 9 miesięcy przed włączeniem do próby klinicznej i była uprzednio wielokrotnie oczyszczana przez chirurga z tkanek martwiczych i zrogowaciałego naskórka oraz bezskutecznie leczona w poradni chirurgicznej opatrunkami ze srebrem, Granuflex, opatrunkami hydrokoloidowymi. W dniu rozpoczęcia badania rana bolesna z obrzękiem wokół rany i znacznym wysiękiem zapalnym.

W dniu pierwszym D1 leczenia rana na nodze prawej (próba nr 6) została zaopatrzona opatrunkiem autologicznym. Po 7 dniach (D7) zdjęto opatrunek. Dla rany z opatrunkiem autologicznym zaobserwowano

znaczną poprawę. Po kolejnym tygodniu w dniu D14 od rozpoczęcia leczenia zaobserwowano znaczną poprawę i zmniejszenie się rany. Opatrunki zmieniano w odstępach co siedem dni do dnia 35 (D35). Uzyskane wyniki przedstawiono w **Tab. 1**, a zdjęcia z poszczególnych faz leczenia rany na **Fig. 9 A-F**.

W poniższych **Tabelach 1–3** przedstawiono zestawienia wyników uzyskanych dla badań klinicznych z pkt A-D.

Tab. 1. Pomiary długości, szerokości i głębokości rany u pacjentów z ranami takimi jak owrzodzenie żylne, odleżyna, oparzenie oraz stopa cukrzycowa leczonych wykorzystaniem opatrunku autologicznego według wynalazku (z badań z pkt A-D).

Schorzenie	Rodzaj próby	Numer próby	Zastosowany opatrunek	Dzień eksperymentu	Długość [mm]	Szerokość [mm]	Głębokość [mm]
Owrzodzenie	Badawcza	1	Opatrunek autologiczny	1	45	28	2
				49	28	14	0
Owrzodzenie	Kontrolna	2a	Aqua-Gel	1	46	38	3
				7	50	44	3
Owrzodzenie	Badawcza	2b	Opatrunek autologiczny	7	50	44	3
				56	36	28	0
Odleżyna	Badawcza	3	Opatrunek autologiczny	1	49	25	3
				49	15	5	0
Oparzenie	Badawcza	4	Opatrunek autologiczny	1	10	7	1
				21	4	2	0
Oparzenie	Badawcza	5	Opatrunek autologiczny	1	27	13	1
				21	9	3	0
Stopa cukrzycowa	Badawcza	6	Opatrunek autologiczny	1	15	13	1
				35	3	3	0

Tab. 2. Procentowa zmiana długości, szerokości i głębokości rany u pacjentów z ranami leczonymi z wykorzystaniem opatrunku autologicznego według wynalazku z badań z pkt A-D.

Schorzenie	Rodzaj próby	Numer próby	Zmniejszenie długości [%]	Zmniejszenie szerokości [%]	Zmniejszenie głębokości [%]
Owrzodzenie	Badawcza	1	38	50	100
Owrzodzenie	Kontrolna	2a	-9	-16	0
Owrzodzenie	Badawcza	2b	28	36	100
Odleżyna	Badawcza	3	69	80	100
Oparzenie	Badawcza	4	60	71	100
Oparzenie	Badawcza	5	67	77	100
Stopa cukrzycowa	Badawcza	6	80	77	100

Tab. 3. Procentowa wartość skrócenia długości czasu leczenia u pacjentów biorących udział w badaniu klinicznym ran z wykorzystaniem opatrunku autologicznego według wynalazku z badań z pkt A-D.

Rodzaj próby	Numer próby	Długość leczenia przed badaniem [dni]	Długość leczenia podczas badania [dni]	Skrócenie długości czasu leczenia [%]
Badawcza	1	274	49	82
Badawcza	2b	274	49	82
Badawcza	3	365	49	87
Badawcza	4	91	21	77
Badawcza	5	91	21	77
Badawcza	6	274	35	87

Zastosowanie opatrunków autologicznych wytworzonych zgodnie z wynalazkiem skutkowało znacznym zmniejszeniem długości, szerokości i głębokości ran u każdej z badanych grup pacjentów z ranami owrzodzeniowymi, odleżynowymi, oparzeniami i ranami stopy cukrzycowej (**Tab. 1** i **Tab. 2**). W przypadku pacjenta z występującymi przewlekłymi owrzodzeniami podudzi długość rany zmniejszyła się średnio o 33%, natomiast szerokość o 43%. U pacjenta z odleżyną długość i szerokość zmniejszyły się odpowiednio o 69 i 80% względem wartości początkowej. Z kolei u pacjenta z oparzeniem długość rany zmniejszyła się średnio o 63,5%, natomiast szerokość o 74%. W przypadku pacjenta ze stopą cukrzycową zaobserwowano zmniejszenie się długości rany o 80% oraz szerokości rany o 77%. Dla każdej z badanych grup pacjentów odnotowano całkowite zmniejszenie się głębokości ran. Przed przystąpieniem pacjentów do badania, każda z ran charakteryzowała się znaczną bolesnością miejscową, zaczerwienieniem, obrzękiem, a w wielu przypadkach również wysiękiem. Już po tygodniu od pierwszego zastosowania opatrunku autologicznego, u pacjentów ustępowały miejscowe dolegliwości bólowe, jak również zmniejszał się obrzęk i zaczerwienienie ran. Zastosowanie opatrunków autologicznych według wynalazku znacznie skróciło czas leczenia ran w każdej z badanych grup (**Tab. 3**). Najkrótszym czasem leczenia charakteryzowały się rany oparzeniowe, natomiast dłużej trwał proces leczenia ran owrzodzeniowych i odleżynowych. Skrócenie długości czasu leczenia mieściło się w granicach od 77% u pacjenta z raną oparzeniową do 87% u pacjentów z odleżyną oraz stopą cukrzycową. W przypadku pacjenta z występującymi przewlekłymi owrzodzeniami żylnymi podudzi zaobserwowano skrócenie czasu leczenia o 82% względem długości czasu trwania leczenia przed badaniem klinicznym. Przed przystąpieniem do badania klinicznego u każdego z pacjentów stosowano bezskutecznie lub z nieznacznymi rezultatami dostępne obecnie na rynku opatrunki, takie jak opatrunki ze srebrem, Granuflex, opatrunki hydrokoloidowe, Aqua-Gel® itp., które u pacjenta z raną odleżynową trwało nawet 12 miesięcy. Badanie wykazało znaczne pogorszenie stanu rany owrzodzeniowej i zwiększenie jej wymiarów po zastosowaniu opatrunku Agua-Gel® tj. w próbie 2a (**Tab. 2** i **Fig. 6E**). Po zastosowaniu opatrunku kontrolnego (próba 2a) długość rany zwiększyła się o 9%, natomiast szerokość o 16%, względem stanu początkowego, bez zmiany głębokości. Zastosowanie opatrunków autologicznych z krwi własnej pacjenta, pozwoliło na zmniejszenie czasu gojenia się rany o minimum 77% w przypadku każdej

z badanych grup pacjentów, co stanowi przełom w leczeniu rożnego typu ran i może być podstawą do dalszych badań nad autologicznymi opatrunkami i ich wykorzystaniem w przypadku ran owrzodzeniowych, odleżynowych, oparzeniowych, pooperacyjnych i stopy cukrzycowej oraz ran występujących w innych schorzeniach.

WYKAZ OZNACZEŃ

1 – pojemnik kształtujący
2 – pokrywa
3 – wypust wprowadzający, korzystnie typu luer – lock
4 – otwór
5 – podstawa pojemnika kształtującego
6 – ściany boczne pojemnika kształtującego
7 – wieko pokrywy (czyli zasadniczo płaska część pokrywy)
8 – ściany boczne pokrywy
9 – chropowata wewnętrzna powierzchnią dna pojemnika kształtującego

LITERATURA

F. Eisinger, J. Patzelt, and H. F. Langer, "The Platelet Response to Tissue Injury," Front. Med., vol. 5, p. 317, 2018.

P. Martin and S. J. Leibovich, "Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly," Trends Cell Biol., vol. 15, no. 11, pp. 599–607, 2005.

S. Ghanaati et al., "Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering

Zastrzeżenia patentowe

1. Zestaw do wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi, **znamienny tym**, że zawiera pojemnik kształtujący (1) i pokrywę (2) pojemnika kształtującego o kształcie i rozmiarze wynikającym z n-typoszeregu;

   pojemnik kształtujący (1) ma zasadniczo płaską podstawę (5) i ściany boczne (6) pojemnika kształtującego o zasadniczo równej wysokości;

   pokrywa (2) ma wieko (7) i ściany boczne (8) pokrywy o zasadniczo równej wysokości;

   pokrywa (2) spasowana jest kształtem i rozmiarem z pojemnikiem kształtującym (1) tak, że po nałożeniu pokrywy na pojemnik kształtujący, ściany boczne pokrywy zasadniczo przylegają wewnętrzną stroną do zewnętrznej strony ścian bocznych pojemnika kształtującego;

   ściany boczne (6) pojemnika kształtującego są wyższe niż ściany boczne (8) pokrywy;

   pojemnik kształtujący (1) jest wytworzony ze stali nierdzewnej i co najmniej powierzchnia dna pojemnika kształtującego od wewnątrz ma chropowatą powierzchnię (9), o stopniu chropowatości w zakresie 0,01–100 μm.
2. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zarówno pojemnik kształtujący (1) i pokrywa (2) pojemnika kształtującego wykonane są ze stali nierdzewnej, korzystnie ze stali nierdzewnej dopuszczonej do użytku medycznego.
3. Zestaw według zastrz. 1–2, **znamienny tym**, że w pokrywie (2) znajduje się co najmniej jeden otwór (4) i/lub wpust wprowadzający (3).
4. Zestaw według zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że wpust wprowadzający (3) jest wytworzony jako typu luer – lock lub luer.
5. Zestaw według zastrz. 1–4, **znamienny tym**, że pojemnik kształtujący (1) i pokrywa (2) pojemnika kształtującego w n-typoszeregu jest wybrana z kształtu o przekroju poprzecznym o kształcie zbliżonym do kwadratu, koła, elipsy, prostokąta, trójkąta, sześciokąta, kształtu serca, korzystnie kwadratu z zaokrąglonymi wierzchołkami.
6. Zestaw według zastrz. 1–5, **znamienny tym**, że stopnień chropowatości jest w zakresie 0,05–10 μm, korzystniej w zakresie 0,2–0,4 μm.
7. Zestaw według zastrz. 1–6, **znamienny tym**, że chropowata powierzchnia jest typu powierzchnia piaskowana, typu diamentowy pył, powierzchnia o porowatości liniowej, powierzchnia o porowatości krzyżowej.

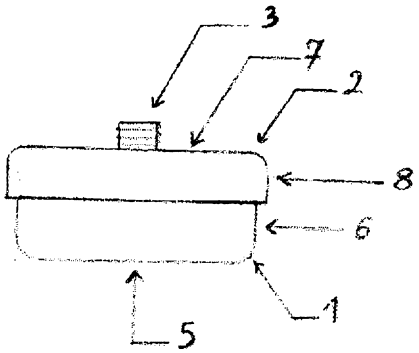
8. Zestaw według zastrz. 1–7, **znamienny tym**, że chropowata powierzchnia jest piaskowana, ma mikro nacięcia i/lub mikro zagłębienia.
9. Zestaw według zastrz. 1–8, **znamienny tym**, że zestaw jest o kształcie w przekroju poprzecznym zbliżonym do kwadratu o zaokrąglonych wierzchołkach, o rozmiarze zewnętrznym 52x52±20% mm, ścianie bocznej (8) pokrywy o wysokości 10±20% mm; w pokrywie (2) są rozmieszczone równomiernie cztery otwory (4) oraz centralnie wpust wprowadzający (3) typu luer – lock, przy czym zarówno pojemnik kształtujący (1) i pokrywa (2) wykonane są ze stali nierdzewnej, przy czym wewnętrza powierzchnia dna (9) pojemnika kształtującego 1 ma strukturę chropowatą w zakresie od 0,2 do 0,4 mikrometra, korzystniej cała wewnętrza powierzchnia pojemnika kształtującego (1) ma strukturę chropowatą o stopniu chropowatości od 0,2 do 0,4 μm.
10. Sposób wytwarzania opatrunku autologicznego z krwi osobnika, **znamienny tym**, że obejmuje etapy, w których
    a) pobraną od osobnika krew rozdziela się na dwie objętości, korzystnie dwie zasadniczo równe objętości;
        - z pierwszej objętości uzyskuje się frakcję fibryny bogato komórkowej (l-PRF) poprzez wirowanie stosując od 50 RCF (xg) do 70 RCF (xg) przez 3 do 5 minut;
        - z drugiej objętości uzyskuje się frakcję fibryny strukturalnej S-PRF poprzez wirowanie stosując od 600 RCF (xg) do 800 RCF (xg) przez 8 do 16 minut;
    b) uzyskane w a) frakcje l-PRF i S-PRF wprowadza się do wnętrza pojemnika kształtującego (6) zestawu do wytworzenia tkankowych opatrunków autologicznych z krwi jak określonego w zastrz. 1–9, przy czym frakcje l-PRF i S-PRF łączy się ze sobą w proporcji 1:5±20% frakcji l-PRF do frakcji S-PRF;
    c) dla wytworzenia opatrunku autologicznego zestaw do tworzenia tkankowych opatrunków autologicznych z połączonymi frakcjami l-PRF i S-PRF odstawia się na czas potrzebny do wytworzenia formy żelowej, korzystnie na 5 do 240 minut.
11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że w etapie c) zestaw do tworzenia tkankowych opatrunków autologicznych z połączonymi frakcjami l-PRF i S-PRF odstawia się na czas w zakresie 10–40 min, korzystniej w zakresie 15–30 minut.
12. Sposób według zastrz. 10–11, **znamienny tym**, że w etapie c) połączone frakcje l-PRF i S-PRF przed odstawieniem zestawu dla wytworzenia tkankowego opatrunku autologicznego delikatnie się miesza ze sobą, korzystnie poprzez delikatne kołysanie pojemnikiem kształtującym (6) zestawu.
13. Sposób według zastrz. 10–12, **znamienny tym**, że w etapie b) frakcje l-PRF i S-PRF łączy się ze sobą w proporcji 1,5:4±20% frakcji l-PRF do frakcji S-PRF.
14. Sposób według zastrz. 10–13, **znamienny tym**, że w etapie b) frakcje l-PRF i S-PRF łączy się ze sobą w strzykawce, korzystnie w strzykawce zaopatrzonej w końcówkę typu luer– lock.
15. Sposób według zastrz. 10–14, **znamienny tym**, że dla wytworzenia 1 cm^3 opatrunku autologicznego o grubości 1±10% mm wprowadza się do wnętrza pojemnika kształtującego (6) zestawu 2,1–2,3 ml, korzystniej 2,15–2,25 ml mieszaniny połączonych frakcji l-PRF i S-PRF.
16. Sposób według zastrz. 10–15, **znamienny tym**, że w etapie a) rozdzielanie na frakcję fibryny bogato komórkowej (l-PRF) i frakcję fibryny strukturalnej (S-PRF) prowadzi się poprzez wirowanie równoległe w dwóch wirówkach.
17. Sposób według zastrz. 10–16, **znamienny tym**, że w etapie b) połączone frakcje l-PRF i S-PRF wprowadza się do wnętrza pojemnika kształtującego (6) przez otwór (4) w pokrywie (2) zestawu do wytworzenia tkankowych opatrunków autologicznych i/lub przez wpust wprowadzający (3) w pokrywie (2), korzystniej wprowadza się przez wpust wprowadzający (3), korzystniej wprowadza się przez wpust typu luer, luer – lock.
18. Sposób według zastrz. 10–17, **znamienny tym**, że w etapie a) rozdzielanie na frakcję fibryny bogato komórkowej (l-PRF) i frakcję fibryny strukturalnej (S-PRF) prowadzi się poprzez wirowanie krwi w probówkach apirogennych.
19. Sposób według zastrz. 10–18, **znamienny tym**, że osobnikiem jest ssak, korzystnie człowiek.
20. Opatrunek autologiczny z krwi wytworzony sposobem jak określonym w zastrz. 10–19.
21. Opatrunek autologiczny z krwi jak określony w zastrz. 20 i/lub wytworzony sposobem jak określonym w zastrz. 10–19 do zastosowania do leczenia rany, rany cukrzycowej, rany stopy cukrzycowej, rany oparzeniowej, rany odleżynowej, rany odmrożeniowej, rany owrzodzeniowej,

rany pourazowej, rany chirurgicznej, rany przewlekłej, ran ciętej, rany kłutej, rany tłuczonej, rany będącej wynikiem działania energii promienistej, rany po terapii radiologicznej, rany po urazach chemicznych, rany pooperacyjnej, skaleczenia skóry, otarcia skóry, zadrapania skóry, stanu zapalnego skóry, trądziku różowatego.

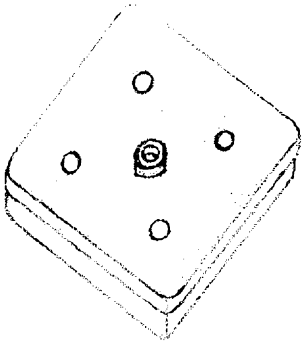
22. Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania według zastrz. 21, **znamienny tym**, że jest stosowany do leczenia rany cukrzycowej, rany stopy cukrzycowej, rany oparzeniowej, rany odleżynowej, rany odmrożeniowej, rany owrzodzeniowej, rany pooperacyjnej.
23. Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania według zastrz. 21–22, **znamienny tym**, że opatrunek w czasie leczenia jest zmieniany co najmniej co siedem dni.
24. Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania według zastrz. 21–23, **znamienny tym**, że opatrunek w czasie leczenia jest zmieniany co 3–4 dni, korzystnie u osobnika w zastosowaniu do leczenia rany owrzodzeniowej, rany odleżynowej.
25. Opatrunek autologiczny z krwi do zastosowania według zastrz. 21–24, **znamienny tym**, że osobnikiem jest ssak, korzystnie człowiek.

Rysunki

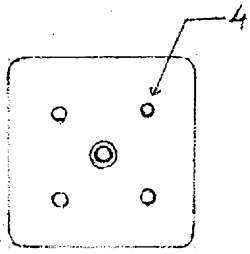
Fig. 1



A



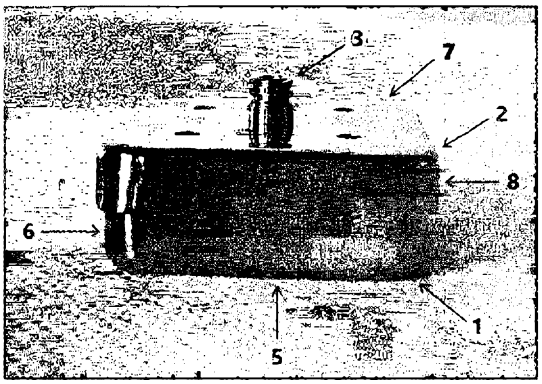
B



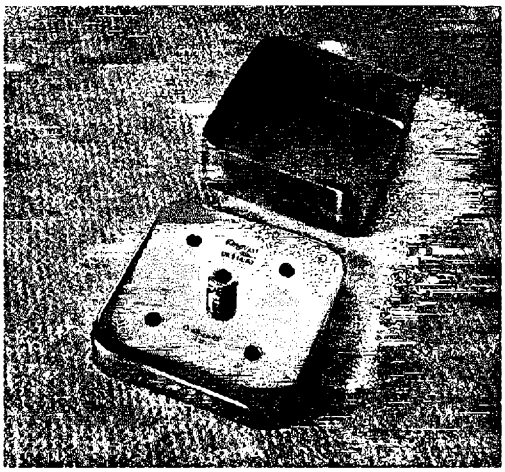
C



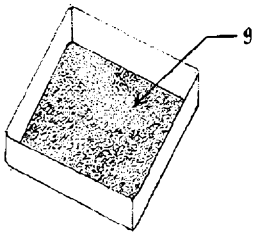
D



E

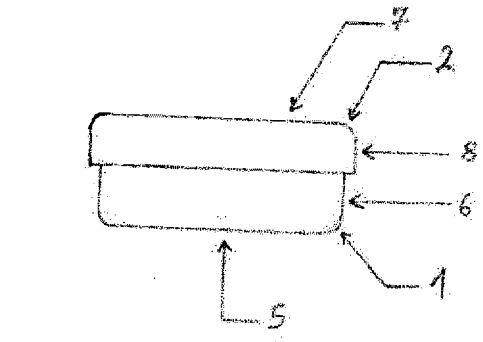


F

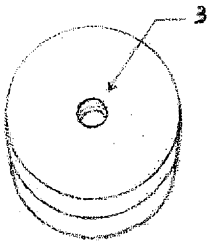


G

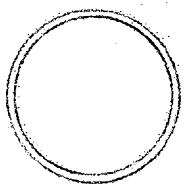
Fig. 2



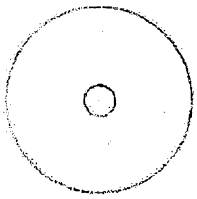
A



B

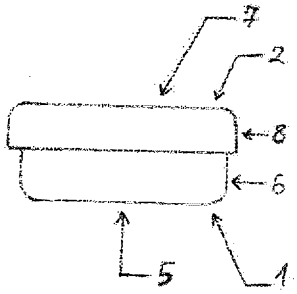


C

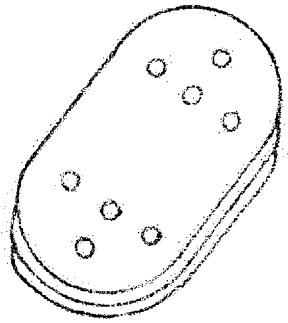


D

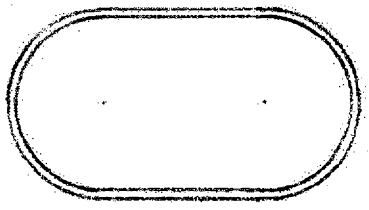
Fig. 3



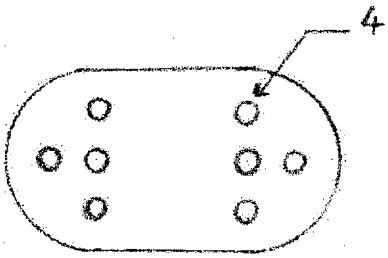
A



B



C



D

Fig. 4

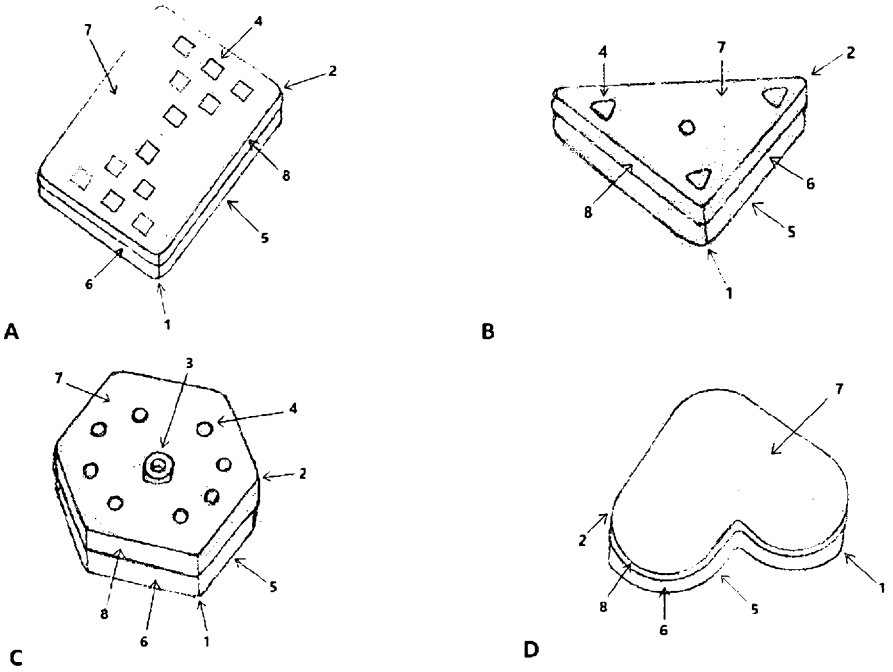


Fig. 5

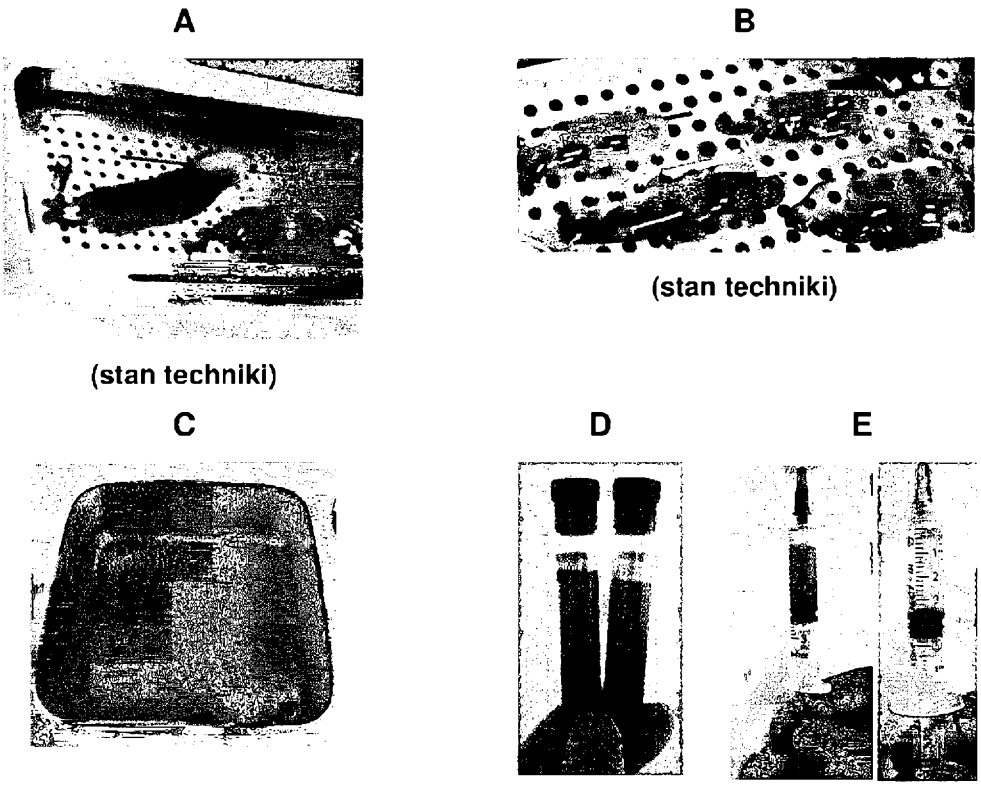


Fig. 6

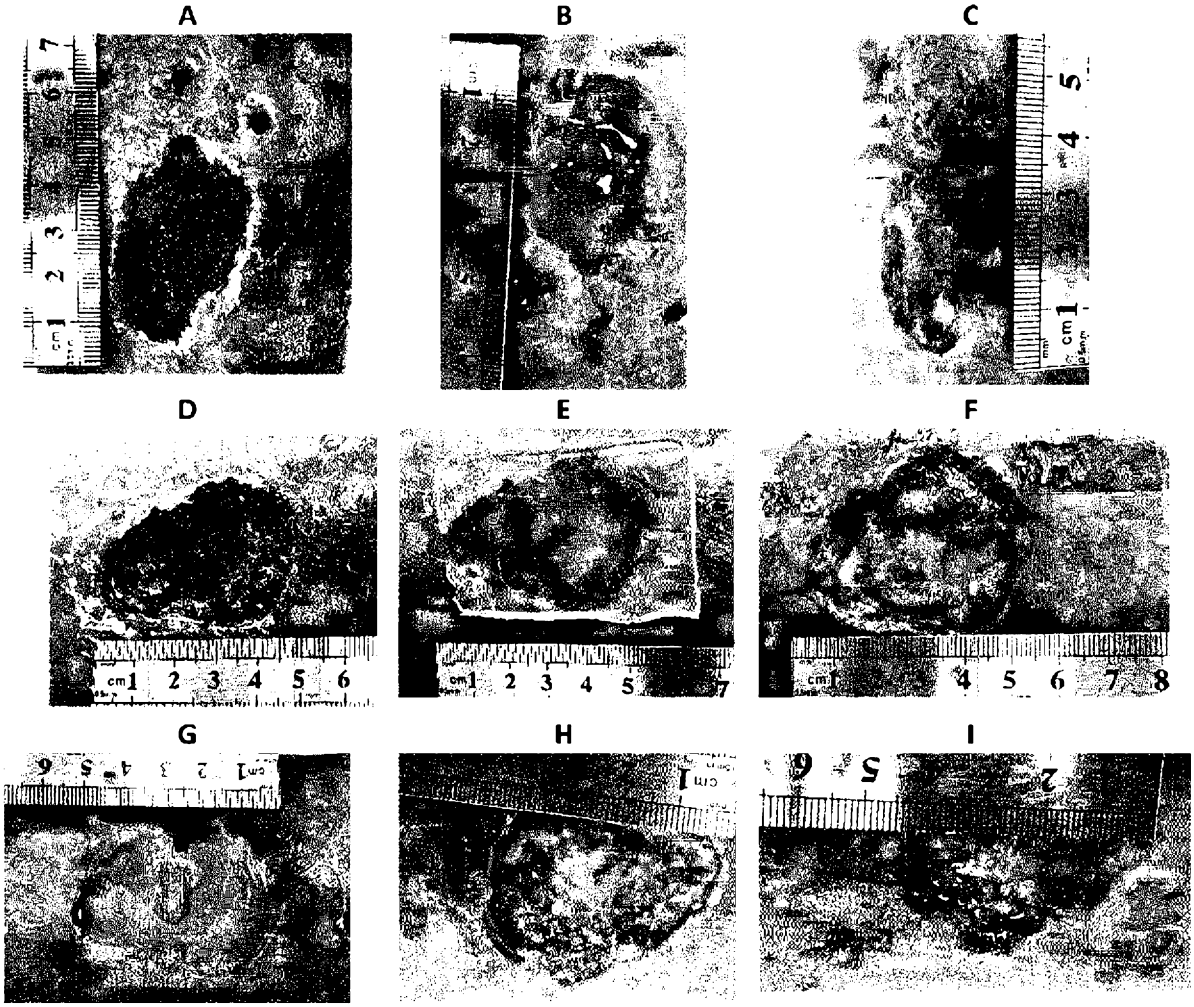


Fig. 7

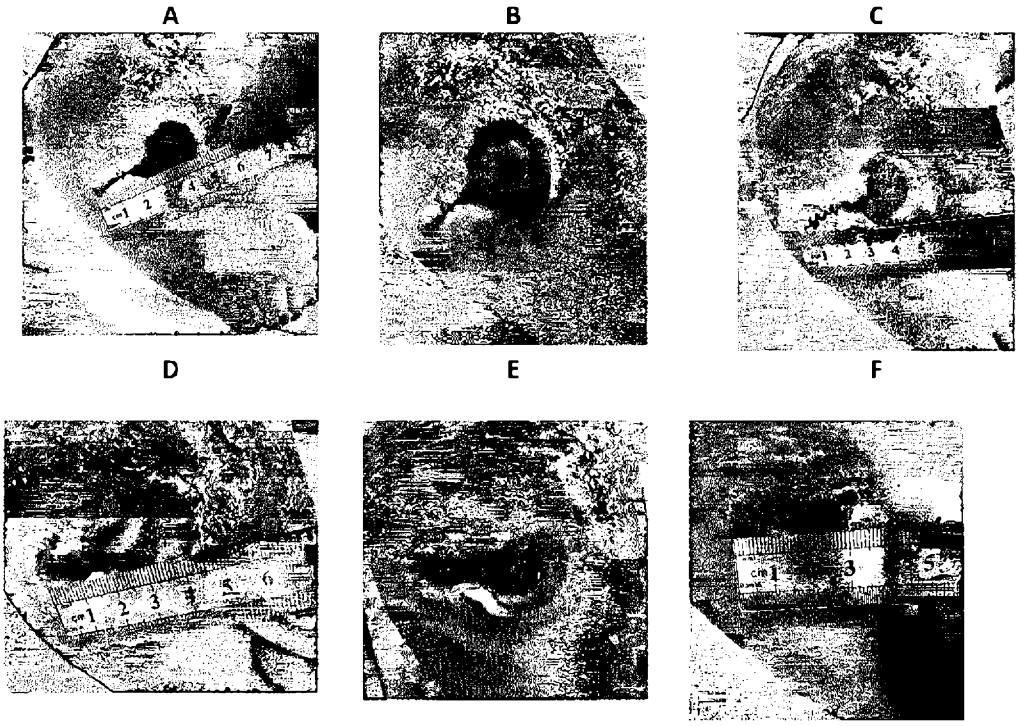


Fig. 8

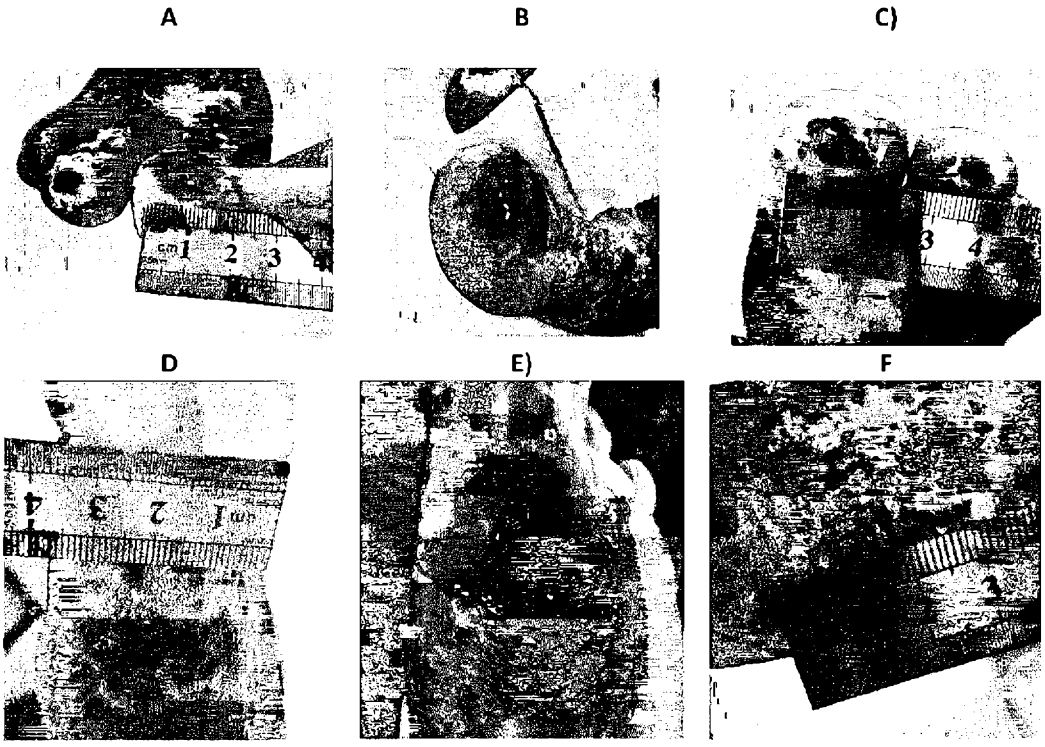


Fig. 9

