

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 450667 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **450667**

(22) Data zgłoszenia: **2024.12.22**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2026.06.29 BUP 26/2026**

(51) MKP:

A61L 15/18 (2006.01)

A61L 15/22 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/60 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet Rolniczy im. Hugona
Koźłataja w Krakowie, Kraków, PL
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie,
Kraków, PL
Uniwersytet Jagielloński, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y):

**EDYTA MOLIK, Kraków, PL
PIOTR SZATKOWSKI, Kraków, PL
ANNA PTAK, Czechówka, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Maciej Czarnik, Kraków, PL

(54) Tytuł:

Opatrunek hydrożelowy zawierający substancje bioaktywne i sposób jego wytwarzania

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest opatrunek hydrożelowy zawierający co najmniej jedną warstwę matrycy hydrożelowej z co najmniej jedną substancją bioaktywną charakteryzujący się tym, że wspomniana matryca hydrożelowa zawiera od 4% do 8% wag. wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA) i 4% wag. wodnego roztworu czteroboranu sodu (boraksu), a substancją bioaktywną jest mleko owcze w ilości od 5% do 20% wag i/lub mleko wielbłądziej w ilości od 2,5% do 15% wag. Zgłoszenie obejmuje także sposób wytwarzania opatrunku hydrożelowego.

Opatrunek hydrożelowy zawierający substancje bioaktywne i sposób jego wytwarzania

Przedmiotem wynalazku jest opatrunek hydrożelowy zawierający substancje bioaktywne oraz sposobu jego wytwarzania. Wynalazek dotyczy również zastosowania opatrunku hydrożelowego zawierającego substancje bioaktywne do leczenia ran.

Choroby cywilizacyjne do których zaliczamy między innymi choroby sercowo-naczyniowe, otyłość, cukrzycę czy nowotwory są powodem śmierci około 40 milionów osób każdego roku, co stanowi około 70% wszystkich zgonów na świecie. Szacuje się, że, choroby sercowo-naczyniowe, rak, a następne choroby układu oddechowego i cukrzyca są najczęstszymi przyczynami zgonów wśród wszystkich chorób cywilizacyjnych. Aktualnie w Polsce na cukrzycę choruje ponad 2 mln osób, z czego około 25% o tym nie wie. Prognozy przewidują, że w najbliższych 15–20 latach podwoi się liczba chorych na cukrzycę w naszym kraju. Warto podkreślić, iż ryzyko powstania owrzodzenia w ciągu całego życia chorego na cukrzycę wynosi 12–25%, a prawdopodobieństwo amputacji u pacjentów z cukrzycą jest 30–40 razy wyższe niż u osób bez cukrzycy. Co więcej gojenie ran u chorych na cukrzycę jest zaburzone. Dlatego poszukiwanie produktów leczniczych pochodzenia naturalnego, które przyczyniłyby się do poprawy zdrowia pacjenta, jest ważne nie tylko z punktu widzenia społeczno-gospodarczego, ale również klinicznego.

Według danych literaturowych problem ran trudno gojących się dotyka 2 osoby na 100, natomiast u ponad 10% pacjentów z cukrzycą może dojść do rozwinięcia się zespołu stopy cukrzycowej i dysfunkcji zawodowej. Zgodnie z prognozami liczba chorych na cukrzycę w 2025 roku na świecie osiągnie 333 miliony. Choroba ta oraz jej powikłania, w tym rany i wrzody cukrzycowe, uważa się za globalną epidemię XXI wieku. Dlatego opracowany hydrożelowy opatrunek zawierający substancje bioaktywne mleka owczego i wielbłądziego może mieć zastosowanie międzynarodowe. Problemy chorób cywilizacyjnych dotyczą zarówno społeczeństwa rozwinięte jak i ubogie. Według WHO to kraje o niskich i średnich dochodach, a także osoby mniej zamożne we wszystkich państwach, są najbardziej dotknięte zgonami spowodowanymi chorobami cywilizacyjnymi. Jest to błędne koło ryzyka, w którym biedni są coraz bardziej narażeni na pośrednie czynniki ryzyka chorób cywilizacyjnych (palenie tytoniu, niezdrową dietę, niewystarczającą aktywność fizyczną i szkodliwe spożywanie alkoholu), a z kolei takie choroby mogą odgrywać znaczącą rolę w popychaniu ludzi i ich rodzin do ubóstwa.

Jak donoszą Sezik et al., (2001), mleko owcze znalazło swoje zastosowanie w starej medycynie tradycyjnej do leczenia trudno gojących się ran, ukąszeń oraz zmian ropnych skóry. Nieodpowiednia dieta, powtarzające się urazy oraz cukrzyca to niektóre z czynników, które sprawiają, że proces gojenia się ran jest poważnie zaburzony. W zależności od wielkości rany i stopnia uszkodzenia, mogą wystąpić rozległe zmiany fizjologiczne i metaboliczne powodujące komplikacje w procesie gojenia i spadek

odporności pacjentów (Hrynyk i Neufeld, 2014). Dlatego w dobie szeroko rozwijających się chorób cywilizacyjnych, metabolicznych, wszelkiego rodzaju alergii oraz nowotworów (np. czerniaka) bardzo ważne jest wspieranie organizmu naturalnymi produktami o szczególnych właściwościach leczniczych. Do takiej grupy należą mleko owcze oraz mleko wielbłądzie ze względu na swój bogaty profil substancji bioaktywnych. Oba te produkty, w porównaniu do np. mleka krowiego, zawierają wysoki poziom insuliny, która ma szczególne znaczenie w procesie gojenia się ran. Insulina reguluje poziom glukozy we krwi i może wspomagać gojenie uszkodzonej skóry poprzez regulację reakcji oksydacyjnych i zapalnych oraz stymulację migracji komórkowej. Badania wykazują, że miejscowe podanie insuliny ma znaczący wpływ na gojenie się ran na podłożu cukrzycowym oraz ran oparzeniowych, ostrych i przewlekłych. U pacjentów cukrzycowych miejscowa iniekcja insuliny w miejscu rany sprzyja gojeniu się ran poprzez poprawę wzrostu tkanki ziarninowej (Zhang i Lv, 2016). Jednakże iniekcja we wrażliwą tkankę jest bolesna dla pacjentów i trudna do wykonania samemu, natomiast w przypadku kremów medycznych z insuliną problematyczna może być skuteczność wchłaniania, na skutek ścierania się preparatu z powierzchni rany. Dlatego, ze względu na łatwość w aplikacji i użyciu, integracja insuliny z opatrunkami hydrożelowymi może okazać się przełomowa. Badania Zhao et al., (2017) ujawniły, że włączenie insuliny i fibroblastów do opatrunku w formie hydrożelu może sprzyjać neowaskularyzacji i odkładaniu się kolagenu oraz usprawniać proces gojenia się ran cukrzycowych (Zhao et al., 2017). Z tego względu zaprojektowanie i wytworzenie opatrunków hydrożelowych zawierających mleko owcze i wielbłądzie jest obiecującym krokiem na rynku opatrunków specjalistycznych na trudno gojące się rany.

Laktoferyna (LF) to glikoproteina wiążąca żelazo, która wspomaga wiele procesów biologicznych związanych z gojeniem się ran. Wykazuje działanie przeciwzapalne, bezpośrednio sprzyja tworzeniu się tkanki ziarninowej, stymuluje proliferację i migrację fibroblastów i keratynocytów oraz nasila syntezę kolagenu i hialuronianu. Mleko owcze, ze względu na najwyższą zawartość laktoferyny zmniejsza autoimmunologiczne procesy zapalne i działa ochronnie przed infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi (Caboni et al., 2019).

Mleko wielbłądzie jest bogate w bioaktywne substancje, takie jak aktywne peptydy, LF, cynk oraz jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Z tego powodu, mleko wielbłądzie ma również działanie przeciwutleniające, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwcukrzycowe i przeciwcholesterolowe. Zawartość LF w mleku wielbłądzim wynosi 0,2-0,9 g/kg, w owczym 0,7-0,9 g/kg natomiast w mleku krowim zaledwie 0,02-0,5 g/kg (Alichanidis et al., 2016).

Zastosowanie biomateriałów jako opatrunków na rany przyciągają w ostatnich latach coraz większą uwagę, a hydrożele wypełnione bioaktywnymi substancjami mają potencjał w leczeniu ran jako ukierunkowany system leczniczy (Zhao et al., 2017). Mleko wielbłądzie może być stosowane w leczeniu cukrzycy typu 1 i typu 2, ze względu na wysoki poziom insuliny - około 52-59 jednostek/litr i substancji insulinopodobnych (Abdalla et al., 2015). Białka mleka owczego również są obiecującym źródłem insuliny, peptydów przeciwcukrzycowych i hipotensyjnych (Iram et al., 2022).

Opracowanie nowatorskich opatrunków na rany o właściwościach przyspieszających gojenie ran jest w ostatnim czasie przedmiotem wielu badań. Wang et al., (2022) zsyntetyzowali hydrożel

zawierający LF i krzemian litowo-magnezowy, który po iniekcji skutecznie wspomaga gojenie się ran (Wang et al., 2022). Perspektywa wyprodukowania opatrunku hydrożelowego zawierającego naturalne składniki takie jak mleko owcze i wielbłądzie, które są bogate w substancje bioaktywne jest bardzo obiecująca. Jest to ogromna szansa dla polepszenia komfortu leczenia pacjentów z ranami oparzeniowymi lub na podłożu cukrzycowym. Kuleczka tłuszczu mlecznego jest ważnym elementem strukturalnym mleka o znaczeniu technologicznym i biologicznym. Błona kuleczek tłuszczowych mleka wielbłądziego posiada właściwości antyadhezyjne i antybakteryjne. Jak donoszą Mansour et al., (2015), krem zawierający 25% kuleczek owczego tłuszczu mlecznego przyspiesza gojenie oparzeń i zmniejsza nasilenie stanu zapalnego, przyspiesza obkurczanie się rany, minimalizuje blizny i poprawia leczenie ran oparzeniowych. Innymi lipidami pełniącymi ważną rolę biologiczną są: kwas masłowy, sprzężony kwas linolenowy (CLA), sfingolipidy (składniki błon cząsteczek tłuszczu) oraz nośniki witamin A, D, E, K i karotenoidów. Najbardziej aktywny biologicznie izomer CLA to cis-9, trans-11, który hamuje występowanie i rozwój raka skóry (Wang i Jones, 2004). Wśród przeżuwaczy największą ilość CLA również zawiera mleko owcze (Molik et al., 2020). Jedną ze specyficznych cech mleka wielbłądziego jest obecność CLA, który ma działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne. Badania Park et al., (2010) wykazały, że suplementacja CLA przyspiesza gojenie się ran skóry poprzez regulację funkcji przeciwutleniających i przeciwzapalnych. Stwarza to możliwość do zbadania powierzchniowego wpływu CLA na proces gojenia się ran.

Hydrożele charakteryzują się dobrą ciągliwością, dużą zawartością wody i korzystnym transportem tlenu, co czyni je jednymi z najbardziej obiecujących materiałów na opatrunki na rany (Zhang et al., 2023). Dodatkowo nanomateriały wykazują lepszą biodegradowalność, biokompatybilność i stabilność koloidalną w gojeniu się ran i mogą odgrywać rolę w promowaniu gojenia dzięki swoim właściwościom lub jako nośniki innych bioaktywnych substancji (Zhang et al., 2023). W obecnych czasach konsumenci są zainteresowani produktami pochodzenia naturalnego o prozdrowotnych właściwościach. Ze względu na zawartość wielu substancji biologicznie czynnych mleko owcze oraz wielbłądzie zyskuje na znaczeniu, dlatego niezwykle obiecującym i nowatorskim rozwiązaniem jest wykorzystanie mleka tych zwierząt do produkcji opatrunków hydrożelowych na trudno gojące się rany.

W stanie techniki znane są też dokumenty patentowe dotyczące opatrunków hydrożelowych. Na przykład amerykańskie zgłoszenie patentowe US2024277894 AA opisuje kompozytowy hydrożelowy opatrunek antybakteryjny, jego metodę wytwarzania oraz zastosowanie w leczeniu ran. Opatrunek składa się z hydrożelu, który zatrzymuje dużą ilość wody, tworząc wilgotne środowisko wspomagające regenerację tkanek. Dodatkowo zawiera składniki o działaniu antybakteryjnym, takie jak nanocząsteczki metali (np. srebro), substancje organiczne lub związki chemiczne, które eliminują patogeny i zapobiegają infekcjom. Struktura opatrunku jest wielowarstwowa, co umożliwia jednoczesne działanie antybakteryjne i skuteczną absorpcję wysięków z rany. Materiały użyte do jego produkcji są biodegradowalne i biokompatybilne, co minimalizuje ryzyko działań niepożądanych. Proces wytwarzania obejmuje mieszanie składników hydrożelu i sieciowanie, co zapewnia odpowiednią elastyczność i trwałość produktu.

Z kolei zgłoszenie wzoru użytkowego DE202023104875 U1 opisuje kompozytowy opatrunek hydrożelowy zaprojektowany do leczenia ran składający się z hydrożelowego korpusu, który umożliwia utrzymanie wilgotnego środowiska, wspomagając proces gojenia i regeneracji tkanek. Dzięki swojej kompozytowej strukturze opatrunek może być wzbogacony o składniki o właściwościach antybakteryjnych, takie jak nanocząsteczki metali (np. srebra) lub substancje wspierające odbudowę skóry. Hydrożel jest elastyczny, biokompatybilny i dostosowany do skutecznego zarządzania wysiękiem z rany, co czyni opatrunek odpowiednim do leczenia zarówno ran przewlekłych, jak i ostrych. Proces produkcji obejmuje formowanie wielowarstwowego materiału, który łączy w sobie funkcje ochronne, antybakteryjne i terapeutyczne.

Zgłoszenie patentowe CN115414523 A ujawnia hydrożelowy opatrunek na rany oraz metodę jego wytwarzania. Opatrunek ten składa się z warstwy hydrożelowej, która zapewnia wilgotne środowisko sprzyjające gojeniu się ran. Dzięki swojej strukturze hydrożel może absorbować wysięki z rany, co pomaga w utrzymaniu czystości i przyspiesza proces regeneracji tkanek. Metoda wytwarzania opatrunku obejmuje mieszanie odpowiednich polimerów z wodą, tworząc jednolitą mieszaninę, którą następnie poddaje się procesowi żelowania w kontrolowanych warunkach temperaturowych i pH. Tak otrzymany hydrożel charakteryzuje się elastycznością, biokompatybilnością oraz zdolnością do dostosowywania się do kształtu rany, co zwiększa komfort pacjenta i skuteczność leczenia. Opatrunek może być stosowany w leczeniu różnych typów ran, w tym oparzeń drugiego stopnia, dzięki swoim właściwościom adhezyjnym i ochronnym.

Żaden ze wspomnianych dokumentów nie ujawnia zastosowania mleka owczego i/lub wielbłądziego w opatrunkach hydrożelowych, ani też liofilizatów mleka owczego i/lub wielbłądziego.

Celem wynalazku było opracowanie nowego opatrunku hydrożelowy zawierający substancje bioaktywne. Wysoka zawartość korzystnych dla zdrowia substancji bioaktywnych w mleku owczym i wielbłądzim wpływa na szczególne właściwości tych produktów. Kolejnym celem było opracowanie sposobu wytwarzania opatrunku hydrożelowy zawierający substancje bioaktywne. Ważnym aspektem opracowanego opatrunku jest fakt, że zawiera substancje bioaktywne mleka owczego i wielbłądziego, które jest pozyskiwane w wielu krajach, więc nie jest produktem kosztownym i trudno dostępnym. Dlatego też technologia produkcji opracowanego opatrunku nie będzie kosztowna i możliwa do wprowadzenia w każdym kraju. Wytworzony opatrunek hydrożelowy sfunkcjonalizowany substancjami bioaktywnymi mleka owczego i wielbłądziego jest produktem pochodzenia naturalnego. Celem wynalazku było także zastosowanie opatrunku do leczenia ran. Opracowany opatrunek hydrożelowy może stanowić istotny czynnik w leczeniu trudno gojących się ran w tym ran cukrzycowych ze względu na bogatą zawartość bioaktywnych substancji w tym insuliny, laktoferyny, kwasu orotowego czy sprzężonego kwasu linolenowego. Substancje te mają szczególnie znaczenie w procesie gojenia ran ze względu na ich właściwości między innymi przeciwzapalne, stymulujące proliferację i migrację komórek, czy stymulujące syntezę kolagenu. Opracowane biomateriały na bazie naturalnych substancji bioaktywnych mleka mogą znacząco poprawić wydajność oraz komfort leczenia pacjentów z problemami skórnymi ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów cukrzycowych. Opracowany

opatrunek stanowi innowacyjne, ale nie kosztowne rozwiązanie technologiczne możliwe do zastosowania w krajach UE i nie tylko.

Istotą wynalazku jest opatrunek hydrożelowy zawierający co najmniej jedną warstwę matrycy hydrożelowej z co najmniej jedną substancją bioaktywną charakteryzujący się tym, że wspomniana matryca hydrożelowa zawiera od 4 do 8% wag. wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA) i 4% wag. wodnego roztworu czteroboranu sodu (boraksu), a substancją bioaktywną jest mleko owcze w ilości od 5 do 20% wag i/lub mleko wielbłądzie w ilości od 2,5 do 15% wag.

Hydrożel posiada odpowiednią strukturę umożliwiającą swobodną dyfuzję w strukturze żelowej bioaktywnych cząstek. Czteroboran sodu jest najlepszym sieciownikiem dla PVA, jest to sieciownik bezpieczny, ma lekkie właściwości bakteriobójcze sam w sobie. Doskonale utrwala rusztowanie hydrożelu i umożliwia wytworzenie powtarzalnych hydrożeli.

Korzystnie, gdy w opatrunku hydrożelowym według wynalazku matryca hydrożelowa zawiera 4% wag. wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA).

Testowano także hydrożele alginianowe, ale w tym przypadku ciężko było o powtarzalność i stabilność hydrożelu, struktury te szybko ulegały degradacji biologicznej.

Korzystnie, gdy w opatrunku hydrożelowym według wynalazku mleko owcze i/lub mleko wielbłądzie jest w postaci liofilizatu.

Liofilizacja ma na celu nieuszkodzenie bioaktywnych składników zawierających się w mleku. Stosowanie termicznej obróbki mleka powoduje, że najdelikatniejsze cząsteczki ulegają degradacji termicznej. Liofilizat umożliwia również przetrzymywanie mleka w bezpiecznej i stabilnej formie proszku, nie jest to możliwe w przypadku, gdy w mleku mamy wodę, zachodzą wtedy procesy biodegradacji, rozkładu pod wpływem bakterii i grzybów. Inną metodą testowaną w celu wydzielenia substancji bioaktywnych z mleka było odwirowywanie mleka z prędkością 35 tys. obrotów na minutę. Jednak otrzymane produkty były nieodpowiednie do stosowania w opatrunkach hydrożelowych z uwagi na zawartość wody. Liofilizacja jest zdecydowanie najlepszą metodą, jest to metoda przede wszystkim dająca powtarzalny produkt, zawsze zachowujący pełny skład mleka (bioaktywne substancje) i pozbawiony wody. Wirowanie jest obarczone ryzykiem, gdyż podczas zlewania odsącza mleka z nam cząstek stałym zostaje trochę wody, a proszek odwirowany jest mokry. Może to prowadzić do skrócenia się terminu użycia takiego proszku pozyskanego metodą odwirowania.

Równie korzystnie, gdy opatrunek hydrożelowy według wynalazku zawiera 3 warstwy, przy czym: warstwa wewnętrzna najbliższej rany zawiera liofilizat mleka owczego w ilości od 10 do 20% wag i liofilizat mleka wielbłądziego w ilości od 10 do 15% wag.; warstwa środkowa zawiera od 5 do 15 % wag. liofilizatu mleka owczego i od 2,5 do 10 % wag. liofilizatu mleka wielbłądziego; warstwa zewnętrzna zawiera wyłącznie matrycę hydrożelową.

Szczególnie korzystnie, gdy opatrunek hydrożelowy według wynalazku zawiera 3 warstwy, przy czym: warstwa wewnętrzna najbliższej rany zawiera liofilizat mleka owczego w ilości 15% wag. i liofilizat

mleka wielbłądziego w ilości 10% wag.; warstwa środkowa zawiera liofilizat mleka owczego w ilości 5% wag. i liofilizat mleka wielbłądziego w ilości 5% wag.; warstwa zewnętrzna zawiera wyłącznie matrycę hydrożelową.

W innym aspekcie wynalazek także dotyczy sposobu wytwarzania opatrunku hydrożelowego obejmującego następujące etapy:

- a) przygotowuje się substancję bioaktywną w postaci liofilizatu z mleka owczego i/lub liofilizatu z mleka wielbłądziego w temperaturze mieszczącej się w zakresie od -90 do -60°C .
- b) przygotowuje się matrycę hydrożelową mieszając wodny roztwór alkoholu poliwinylowego przygotowany w temperaturze mieszczącej się w zakresie od 60 do 80°C oraz mieszając wodny roztwór czteroboranu sodu w temperaturze mieszczącej się w zakresie od 35 do 45°C , a następnie wkrapla się wodny roztwór czteroboranu sodu do wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego i miesza się do otrzymania żelu,
- c) dodaje się substancję bioaktywną do matrycy hydrożelowej w postaci mleka owczego w ilości od 5 do 20% wag i/lub mleka wielbłądziego w ilości od $2,5$ do 15% wag.

Korzystnie, gdy substancję bioaktywną w etapie a) sposobu wytwarzania opatrunku hydrożelowego według wynalazku przygotowuje się w temperaturze -80°C .

Równie korzystnie, gdy roztwór boraksu w etapie b) sposobu wytwarzania opatrunku hydrożelowego według wynalazku przygotowuje się w temperaturze 40°C .

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania nieograniczających jego zakresu oraz na rysunku, na którym:

- fig. 1 ilustruje sposób przygotowania roztworu PVA,
- fig. 2 ilustruje sposób przygotowania roztworu boraksu,
- fig. 3 ilustruje sposób przygotowania hydrożelu $4/8\%$ PVA,
- fig. 4 stanowi wykres krzywej DSC dla warstwy opatrunku zawierającej 15% wagowo mleka owczego,
- fig. 5 stanowi wykres krzywej DSC dla matrycy hydrożelowej PVA/boraks,
- fig. 6 stanowi wykres krzywej DSC dla próbki PVA/boraks + 10% liofilizat mleka wielbłądziego,
- fig. 7 stanowi wykres krzywej TG i DTG dla matrycy PVA/boraks,
- fig. 8 stanowi wykres krzywej TG i DTG dla warstwy samo mleko owcze (MO),
- fig. 9 stanowi wykres krzywa TG i DTG dla matrycy hydrożelowej z dodatkiem mleka wielbłądziego (MW),
- fig. 10 ilustruje przebieg zmian wartości E' i E'' czystej matrycy hydrożelowej w funkcji częstotliwości,
- fig. 11 ilustruje przebieg zmian wartości E' i E'' opatrunku MW (mleko wielbłądzie) w funkcji częstotliwości,
- fig. 12 ilustruje przebieg zmian wartości E' i E'' opatrunku 3MEB (mleko owcze) w funkcji częstotliwości,

fig. 13 stanowi zdjęcie próbki opatrunku MW 10B przed badaniem wytrzymałości na ściskanie,
 fig. 14 stanowi zdjęcie próbki opatrunku MW 10E przed badaniem wytrzymałości na ściskanie,
 fig. 15 stanowi wykres ściskania próbki z hydrożelu PVA/boraks,
 fig. 16 stanowi wykres ściskania próbki z hydrożelu MW 5%,
 fig. 17 stanowi wykres ściskania próbki z hydrożelu MW 10%,
 fig. 18 stanowi wykres ściskania próbki z hydrożelu MO 5%,
 fig. 19 stanowi wykres ściskania próbki z hydrożelu MO 10%,
 fig. 20 stanowi wykres ściskania próbki z hydrożelu MO 10+MW15%,
 fig. 21 stanowi zdjęcie opatrunku w świetle widzialnym (Axiocam503, Zeiss, powiększenie 5x)

W przykładzie wykonania poniżej przedstawiono szczegółowy opis opatrunku wraz z jego charakterystyką, sposób jego wytwarzania oraz wyniki badań dotyczących bezpieczeństwa jego stosowania oraz wpływ na skórę.

Opatrunek w przykładzie wykonania przygotowano w 3 etapach. W pierwszym przygotowano substancję aktywną, w drugim matrycę hydrożelową a w trzecim opatrunek.

Przygotowanie substancji aktywnej: Mleko wielbłądzie i owcze zostało zliofilizowane w -80°C (zakres testowanych temperatur od -95 do -60°C). Zaobserwowano, że w zastosowanych temperaturach aktywne substancje zawarte w mleku nie ulegały rozkładowi. Warunek ten jest kluczowy w kontekście zakleszczenia substancji czynnych pochodzących z mleka owczego i mleka wielbłądziego w strukturze hydrożelowej opatrunku.

Przygotowanie hydrożelowej matrycy: Hydrożelową matrycę otrzymano z alkoholu poliwinylowego (PVA) i czteroboranu sodu (Boraks) (**Fig. 1-3**). Przygotowanie roztworu PVA obejmuje rozpuszczanie czystego proszku PVA w wodzie w temperaturze wody 80°C przy intensywnym mieszaniu. Przygotowanie roztworu boraksu obejmuje rozpuszczanie boraksu w wodzie o temp 40°C przy intensywnym mieszaniu. Do roztworu PVA wkrapla się roztwór boraksu. Podczas wkrapiania roztwór PVA jest poddawany intensywnemu mieszaniu na mieszadle.

Do wyboru najlepszego stężenia posłużyły badania DMA (wyniki uwidocznione na fig. od 10 do 13), które zweryfikowały odporność mechaniczną przy częstotliwości drgań 1 Hz do 100 Hz oraz badanie wytrzymałości mechanicznej na ściskanie (wyniki uwidocznione na fig. od 15 do 20).

Przygotowanie opatrunku trójwarstwowego: Liofilizat mleka dodaje się do rozpuszczonego PVA w wodzie, który miesza się po dodaniu liofilizatu przez 3-5 minut. Następnie dodaje się czteroboran sodu do PVA z liofilizatem i ponownie miesza aż do otrzymania żelu. Opatrunek trójwarstwowego posiada trzy gradientowe warstwy:

- a) warstwa wewnętrzna (najbliżej przy skórze) to 20% wag. liofilizatu mleka owczego i 15% wag. liofilizatu mleka wielbłądziego (najbardziej optymalna zawartości mleka owczego to 15% wag. a liofilizatu mleka wielbłądziego to 10% wag.),
- b) warstwa środkowa - najbardziej optymalna, zawartość liofilizatu mleka owczego to od 5 do 10%, a liofilizatu mleka wielbłądziego od 5 do 10% liofilizatu wielbłądziego i mleka owczego),

c) warstwa zewnętrzna będąca warstwą ochronną nie zawierała mleka owczego i wielbłądziego.

W ramach przeprowadzonych badań przetestowano różne receptury i składy opatrunków hydrożelowych (wyniki przedstawiono w Tabeli 1). Wnioski jakie wyciągnięto z przeprowadzonych badań są następujące: (1) poniżej 2,5% MW i 5% MO nie ma efektu koncentracji bioaktywnej substancji, jest jej zbyt mało i efekt jest niezadowalający (dyfuzja bioaktywnych substancji z liofilizatu mleka do rany); (2) powyżej 15% MW i 20% MO następują problemy podczas syntezy, hydrożel zaczyna się separować i liofilizat wydostaje się wraz z wodą z hydrożelu; nie ma możliwości związania w strukturze większej ilości liofilizatu.

Otrzymane opatrunki badano metodami: TG, DSC, DMA, badania wytrzymałości na ściskanie, mikroskopia optyczna, konduktometria – tempo uwalniania jonów z warstw - pośrednie określenie przenikania insuliny.

Tabela 1. Testowane receptury i składy opatrunków hydrożelowych
(MW – mleko wielbłądzie, MO – mleko owcze)

PVA/Boraks lub MW 0, MO 0	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu		
MW 1	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,03 g MW		
MW 2,5	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,075 g MW		
MW 5	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,15 g MW		
MW 10	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,3 g MW		
MW 15	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,45 g MW		
MO 15	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,45 g MO		
MO 10	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,3 g MO		
MO 5	3 ml 4% r-r PVA + 1 ml 4% r-r Boraksu + 0,15 g MO		
Rodzaj trójwarstwowego opatrunku	Warstwa zewnętrzna	Warstwa środkowa	Warstwa wewnętrzna (stosowana przy skórze)
	Objętości i masy stosowanych substancji		
Skrajnie niskie	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 0% MW 0% MO	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 2,5% MW 5% MO	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 5% MW 5% MO
Skrajnie wysokie	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 5% MW 5% MO	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 10% MW 15% MO	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 15% MW 20% MO
Optymalny skład	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 0% MW 0% MO	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 5% MW 5% MO	3 ml 4% r-r PVA 1 ml 4% r-r Boraksu 10% MW 15% MO

Wyniki badań DSC i TG

Przy pomocy skaningowej kalorymetrii różnicowej otrzymano krzywe DSC różnych rodzajów warstw wytworzonych materiałów hydrożelowych. Eksperymentowi poddano takie substancje jak hydrożel PVA/boraks, który stanowił materiał referencyjny oraz poszczególne warstwy opatrunku hydrożelowego składające się z matrycy PVA/Boraks i wykorzystywanych substancji aktywnych. Poniżej zamieszczono uzyskane wykresy (Fig. 4-6).

Tabela 2. Wartości odczytane z uzyskanych krzywych TG/TDG dla poszczególnych hydrożeli.

Rodzaj badanej próbki	Uzyskane wartości podczas badania DSC				
	Parowanie wody do 100 °C		Rozkład próbki do 220 °C		
	Początek parowania wody [°C]	Energia parowania [J/g]	Koniec parowania wody [°C]	Energia parowania [J/g]	Liczba pików
PVA/Boraks	30,12	170,54	178,79	1424,07	4
Mleko W	34,58	344,24 (↑ 101,85%)	144,23	1761,41 (↑ 23,69%)	3
Mleko O	36,97	245,07 (↑50,61%)	154,42	1756,74 (↑22,30%)	8

Porównując wartości energii parowania dla zbadanych materiałów do 100°C wynika, że najmniejszą energią potrzebną do odparowania 1g masy cechowała się podstawowa matryca hydrożelowa PVA/Boraks. Każdy dodatek substancji zwiększał energię parowania wody do 100°C i tym samym umacniał strukturę wytworzonego hydrożelu. W zakresie temperaturowym całego przeprowadzonego badania zauważyć można, że każdy dodatek substancji aktywnej do czystej matrycy hydrożelowej PVA/Boraks spowodował obniżenie temperatury końca parowania hydrożelu, co świadczyć to może o rozluźnieniu struktury matrycy lub o wzroście zawartości wody luźnej. Aczkolwiek, dodając do rozważań uzyskane w zakresie do 220°C energie potrzebne do wyparowania owej wody z matrycy zauważyć można, w większości wypadków, ich wzrost. Wzrost energii świadczy o wzroście zwięzłości hydrożelu. Jedynym przypadkiem sytuacji odwrotnej jest hydrożel 10 MW, MO 15 u którego obserwuje się spadek energii parowania wody, który w swojej strukturze posiadał zarówno mniej luźnej i związanej wody w swojej objętości (co wykazała analiza TG). Jednakże, opatrunek stosowany w leczeniu ran pracuje w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała człowieka. Analiza ta wykazała, że każdy dodatek substancji aktywnej podnosi energię parowania powodując trudniejsze parowanie wody z hydrożelu. Takie opatrunki, dzięki tej zależności, będą mogły utrzymywać wilgotne środowisko niezbędne w procesach regeneracji.

Wyniki badań TG

Wyniki krzywych TG i DTG uzyskane dla wytworzonej czystej matrycy hydrożelowej oraz tych wzbogaconych wybranymi dodatkami (mleko owcze i wielbłądzie) przedstawione zostały na fig. 7-9.

Hydrożel PVA/boraks jako matryca na pograniczu ciała stałego i wody ma wysoką zawartość, na poziomie 17%, luźnej wody wbudowaną w swojej objętości. Matryca dodatkowo ma wbudowaną mocno

związaną wodę, której parowanie kończy się w okolicach 200°C. Pomimo małej stabilności Boraksu, substancje wykorzystane do produkcji podstawowej matrycy pozwalają na stworzenie stabilnej struktury hydrożelu z dużą zawartością związanej wody. W porównaniu do czystego hydrożelu zawartość luźnej wody w matrycy z dodatkiem liofilizatu mleka wielbłądziego jest większa jedynie o 1 p. p. Zawartość mocno związanej wody różniła się już o 4 p. p. co pozwala stwierdzić, że dodatek liofilizatu mleka wielbłądziego umocnił strukturę hydrożelu.

Informacje zawarte w wynikach w przedziale temperaturowym od 0-100°C ilustrują informacje o ilości wody luźniej w strukturze hydrożelu. Matryca PVA/Boraks oraz warstwa EE posiada jej najwięcej, wartość ta mieści się w przedziale od 17-20%. Dodatek substancji aktywnej do hydrożelu znacząco zmniejsza ilość wyparowanej wody luźniej w strukturze już o 6-8 p. p. Świadczy to o umocnieniu struktury hydrożelu przy pomocy dodatków aktywnych wbudowanych w jej strukturę. Matryce hydrożelowe charakteryzują się również obecnością mocno związanej wody w ich strukturze. Jej parowanie kończy się w okolicach 200°C. W tym przedziale temperatur również można zauważyć zmniejszone parowanie wody. Dodatki sprawiły, że zawartość mocno związanej wody w strukturze hydrożelu różniła się nawet o 51 p.p. Taki wynik udało się uzyskać w warstwie MEE. Procent zachowanej masy końcowej przy temperaturze 400°C jest największy dla warstwy MO.

Wyniki badań DMA

Przeprowadzone badanie miało na celu zasymulowanie warunków w jakich opatrunek będzie pracował będąc mieszczonej na skórze pacjenta. Temperatura badania była stała, o wartości 36°C, natomiast parametrem ulegającym zmianie była częstotliwość. Z racji tego, że opatrunek pracuje wraz ze skórą, na którą jest nałożony oraz musi przeciwstawiać się siłom ściskającym, badanie to pozwoliło na ocenę jego zdolności do przenoszenia naprężeń i wartości krytycznych częstotliwości, które powodują zniszczenie hydrożelu. Analiza badała zmiany wartości modułu zachowawczego E' (odpowiadającego za przenoszenie naprężeń w ciałach stałych) oraz zmiany wartości modułu stratności E'' (odpowiadającego za rozpraszanie energii), które przedstawiono na **fig. 10-12**, które odpowiadają czystej matrycy hydrożelowej i docelowym opatrunkom z dodatkami mleka.

W przypadku czystej matrycy hydrożelowej, badanie wykazało, że wartość modułu zachowawczego E' jest stała w zakresie częstotliwości od 1–32Hz i oscyluje wokół wartości 8500000 Pa. Spadek wartości E' a zatem osłabienie właściwości hydrożelu PVA/Boraks zauważyć można dopiero po przekroczeniu częstotliwości pracy 32Hz. Podobne zależności można zaobserwować w opatrunku z dodatkiem mleka wielbłądziego. Uzyskane wartości modułu zachowawczego E' wskazują, że najlepsze wyniki, czyli stabilność właściwości w największym zakresie częstotliwości, uzyskano dla opatrunku zawierającego dodatek owczego.

Wytworzony opatrunek wykazuje odpowiednią wytrzymałość mechaniczną statyczną i dynamiczną w częstotliwości drgań umożliwiającą przenoszenie naprężeń, które mogą wystąpić i występują podczas codziennego użytkowania takiego typu opatrunków.

Wyniki badań mechanicznych

Podczas próby ściskania wytworzonych opatrunków przebadano osobno poszczególne warstwy wybranych opatrunków oraz całe opatrunki hydrożelowe. Każde badanie wykonano w dwóch powtórzeniach. Wygląd przykładowych próbek poddanych badaniu wytrzymałości na ściskanie przedstawiono na wykresach. Kształt badanych próbek był ograniczony ze wszystkich stron, a podczas badania mierzono siłę nacisku do momentu osiągnięcia 80% skrócenia względnego. Krzywe zależności przyłożonej siły odkształcającej (w niutonach N) od skrócenia próbki (wyrażonego w procentach), przedstawiono dla poszczególnych próbek na odpowiednich wykresach (**figury 13-20**).

W przypadku czystej matrycy hydrożelowej PVA/Boraks, której krzywa ściskania została przedstawiona na **fig 13.**, hydrożel wytrzymuje nacisk o wartości ~ 6N zmniejszając swój wymiar o 10% co odpowiada skróceniu o 1,7 mm i opór ten utrzymywany jest przez kolejne 12 cm powodując skrócenie próbki o 80% względem początkowej wielkości. Drobne fluktuacje, obecne na tym wykresie oraz na kolejnych, świadczą o obecności powietrza w objętości hydrożelu i o uwalnianiu ich ze struktury podczas ściskania materiału. Dodatek 1% mleka wielbłądziego względem objętości użytego PVA podczas wytwarzania matrycy sprawił, że hydrożel zmniejszył swoją wysokość o 10% przy sile nacisku o 2N mniejszej. Przy dalszym obciążeniu próbka delikatnie umacnia się. Na podstawie tej wartości stwierdzić można, że pomimo tak małej ilości dodanej substancji aktywnej do fazy rozproszonej, hydrożel jest bardziej plastyczny i odkształca się przy użyciu mniejszej siły. Znaczącą zmianę właściwości mechanicznych zaobserwować można dla hydrożelu z 10% dodatkiem liofilizatu mleka wielbłądziego, dla którego wynik badania przedstawiono na **fig. 17**. Najwyższy opór stawiany przez hydrożel zaobserwowano dla 15-20% skrócenia o wartości 7N. Obecność większej ilości liofilizatu w strukturze mleka korzystnie wpływa na jego przenoszenie obciążeń ściskających, a więc takich z którymi opatrunki najczęściej mają do czynienia. Jest to pozytywny efekt obecności liofilizatu mleka w hydrożelowym rusztowaniu.

W kolejnym etapie wykonano analizy z wykorzystaniem technik *in vitro*, stosując w tym celu prawidłowe komórki ludzkiej skóry. Prowadzenie badań z wykorzystaniem keratynocytów daje możliwość określenia w warunkach laboratoryjnych bezpieczeństwa stosowania danej substancji oraz jej wpływu na skórę. Keratynocyty to komórki nabłonkowe występują we wszystkich warstwach naskórka, stanowią około 95% komórek naskórka. Celem prowadzonych analiz była obserwacja zachowania komórek naskórka - keratynocytów w procesach gojenia się ran podczas stosowaniu wytworzonego opatrunku. Podczas gojenia rany wyróżnia się trzy nachodzące na siebie fazy: zapalenia, proliferacji i przebudowy. Przy czym faza proliferacji jest kluczowa dla tego procesu, dlatego była analizowana w badaniach komórkowych.

Bezpieczeństwo stosowania opatrunku hydrożelowego według wynalazku oraz jego wpływ na skórę.

Przeprowadzono dwa rodzaje badań: (1) Posiew komórek bezpośrednio na trójwarstwowe opatrunki hydrożelowe; (2) Hodowla komórek w pożywce kondycjonowanej (ang. conditioned medium).

W obu wariantach doświadczenia wytworzone opatrunki wysterylizowano stosując 30 minutową ekspozycję na promienie UV w temperaturze pokojowej. Każdy rodzaj trójwarstwowego opatrunku przygotowano w 3 powtórzeniach.

W badaniach stosowano ludzkie pierwotne keratocyty, dostępne komercyjnie. Do hodowli komórkowej wykorzystywano pełną pożywkę hodowlaną Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM, numer 1145, Sigma Aldrich), zawierającą 10% FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*, Płodowa surowica bydlęca) zapewniając w ten sposób warunki optymalne dla hodowli *in vitro*. Dodatkowo do pożywki dodano antybiotyki (penicylina + streptomycyna) w celu zapewnienia sterylności całej hodowli. Hodowle prowadzono w inkubatorze z dozowanym CO₂ (5%CO₂/95% tlenu) w 37°C (warunki standardowe dla ludzkich komórek).

Posiew komórek bezpośrednio na opatrunku

Komórki przed posianiem wybarwiono barwnikiem CellTracker Green CMFDA (firmy Invitrogen, USA), który miał umożliwić obserwację ilości, morfologii i położenia komórek w mikroskopie fluorescencyjnym poprzez wzbudzenie ich fluorescencji światłem niebieskim ($\lambda_x = 492 \text{ nm}$; $\lambda_m = 517 \text{ nm}$). Inkubacja z barwnikiem trwała 30 minut w temperaturze 37°C w inkubatorze (zgodnie z wytycznymi producenta).

W przypadku pierwszego rodzaju przeprowadzonego badania komórki zostały wysiane na trójwarstwowy opatrunek, tak by były w bezpośrednim kontakcie z warstwą docelowo znajdującą się przy skórze pacjenta. Do dołka hodowlanego, z opatrunkiem, od pipetowano 200 μl zawiesiny komórek w pełnej pożywce hodowlanej, co odpowiadało 10 tyś. komórek na dołek. Komórki z opatrunkiem inkubowano przez 48h w warunkach standardowych (37°C, 5% CO₂, 95% tlenu).

Niestety nieprzezroczystość opatrunku spowodowała, że nie można było dokonać oceny morfologii i ilości komórek z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego, pomiary te nie dostarczały pożądanych wyników.

Dlatego w kolejnym etapie, po wysianiu komórek i wybarwieniu CellTracker Green CMFDA, zastosowano czytnik wielopłytkowy do ilościowego pomiaru fluorescencji, jednak ze względu na niską czułość metoda ta została odrzucona w dalszych badaniach, potwierdziła jedynie obecność komórek na opatrunku. Po 24h największą intensywność fluorescencji proporcjonalnie przekładającą się na liczbę żywych komórek zarejestrowano dla opatrunku kontrolnego. W przypadku opatrunku z dodatkiem mleka wielbłądziego oraz witaminy E (MWE), największą żywotność zaobserwowano dla 5% stężenia witaminy E, a najmniejszą dla 2,5% stężenia (Tabela 3). Dla opatrunku z witaminą B (MWB) zaobserwować można wzrost żywotności komórek wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia tej witaminy (Tabela 4). Jednak, uzyskane wyniki nie były satysfakcjonujące, niezaobserwowany istotnych statystycznie różnic pomiędzy opatrunkiem kontrolnym (składającego się jedynie z czystej matrycy hydrożelowej PVA/Boraks) w stosunku do opatrunków wzbogaconych.

Tabela 3. Wartości pomiarów intensywności fluorescencji dla komórek z opatrunkami po 24h inkubacji z użyciem barwnika CellTracker Green CMFDA.

Intensywność fluorescencji komórek po hodowli na opatrunku po 24h [a.u.]				
Rodzaj opatrunku	PVA/Boraks	MWB (2,5)	MWB (5)	MWB (10)
Dołek 1	9,90	7,43	9,14	8,05
Dołek 2	11,55	9,18	10,84	7,48
Dołek 3	12,75	7,10	10,33	8,44
Wartość średnia	11,40	7,90	10,10	8,14
Odchylenie standardowe	1,43	1,12	0,87	0,57

Tabela 4. Wartości pomiarów intensywności fluorescencji dla komórek z opatrunkami po 24h inkubacji z użyciem barwnika CellTracker Green CMFDA.

Intensywność fluorescencji komórek po hodowli na opatrunku po 24h [a.u.]				
Rodzaj opatrunku	PVA/Boraks	MWB (2,5)	MWB (5)	MWB (10)
Dołek 1	9,90	9,24	8,42	9,99
Dołek 2	11,55	9,71	9,26	11,45
Dołek 3	12,75	8,15	12,65	9,98
Wartość średnia	11,40	9,03	10,11	10,48
Odchylenie standardowe	1,43	0,80	2,24	0,84

W kolejnym etapie, po wysianiu komórek na opatrunki jak powyżej zastosowano test CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega), który określa liczbę żywych komórek na podstawie ilościowego oznaczenia obecnego ATP. Test ten wymaga jedynie bezpośredniego dodania odczynnika do komórek i dokonanie pomiaru. Po 48h wykonano pomiar luminescencji, którego wynik przedstawiono w tabeli 5. W przeciwieństwie do wcześniejszego testu, po 48h najmniejszą ilość żywych komórek można było zaobserwować dla czystej matrycy hydrożelowej PVA/Boraks. Świadczy to o tym, że każdy dodatek modyfikatora, w postaci substancji aktywnej, pozytywnie wpłynął na żywotność komórek.

Tabela 5. Żywotności komórek po 48h inkubacji z opatrunkiem na podstawie ilościowego pomiaru ATP

Intensywność luminescencji po hodowli komórek na opatrunku po 48h				
Rodzaj opatrunku	PVA/Boraks	MWB 2,5	MWB 5	MWB 10
Dołek 1	1101	7728	6919	10896
Dołek 2	908	6614	8873	10680
Dołek 3	1349	4505	8616	12770
Wartość średnia	1119	6282	8136	11449
Odchylenie standardowe	221	1637	1062	1149

Hodowla komórek w pożywce kondycjonowanej (ang. conditioned medium)

Drugi rodzaj przeprowadzonego badania, z wykorzystaniem keratynocytów polegał na hodowli komórek w pożywce kondycjonowanej (ang. conditioned medium). Badanie to miało na celu określenie wpływu substancji uwalniających się z matrycy hydrożelowej na keratynocyty ludzkie. Pożywkę kondycjonowaną otrzymano poprzez inkubację opatrunków w pożywce DMEM przez 24h w temperaturze 4°C, tak, aby warstwa opatrunku mająca mieć kontakt ze skórą była w kontakcie z pożywką (ang. spend medium). Następnie, spend medium zebrano z opatrunku i wymieszano w różnych proporcjach z pełną pożywką hodowlaną. Keratynocyty wysiano na płytki hodowlane 96-dółkowe w gęstości 4 tys. komórek/dółek i hodowano w pożywce kondycjonowanej przez 24 godziny. Prolifercję mierzono z użyciem komercyjnego fluorymetrycznego testu do analizy proliferacji komórek PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific). Dla proporcji 1:1 wymieszano 50% obj. *spend medium* z 50% obj. pełnej pożywki hodowlanej, a dla proporcji 1:4 wymieszano 20% obj. *spend medium* z 80% obj. pożywki hodowlanej, a dla proporcji 1:19 wymieszano 5% obj. *spend medium* z 95% obj. pożywki hodowlanej. Tabela 6 przedstawia wyniki dla proporcji 1:1. Tabela 7 przedstawia wyniki dla proporcji 1:4, gdzie zaobserwowano wzrost proliferacji komórek w stosunku do kontroli (PVA/Boraks).

Tabela 6. Żywotność komórek po 24h inkubacji w pożywce kondycjonowanej 1:1 otrzymane na podstawie pomiaru intensywności luminescencji z wykorzystaniem barwnika PrestoBlue

Intensywność fluorescencji komórek po inkubacji (24h) z pożywką kondycjonowaną 1:1 [a.u.]				
Rodzaj opatrunku	PVA/Boraks	MWE 2,5	MWE 5	MWE 10
Dółek 1	72,92	114,1	113,8	114,6
Dółek 2	64,39	100,1	101,6	134,2
Dółek 3	65,27	103,0	107,2	105,9
Wartość średnia	67,5	105,7	107,5	118,2
Odchylenie standardowe	4,7	7,4	6,1	14,5

Tabela 7. Żywotność komórek po 24h inkubacji w pożywce kondycjonowanej 1:4 otrzymane na podstawie pomiaru intensywności luminescencji z wykorzystaniem barwnika PrestoBlue

Intensywność fluorescencji komórek po inkubacji (24h) z pożywką kondycjonowaną 1:4 [a.u.]				
Rodzaj opatrunku	PVA/Boraks	MWE 2,5	MWE 5	MWE 10
Dółek 1	105,5	116,1	113,2	125,5
Dółek 2	84,29	117,1	101,8	107,2
Dółek 3	89,08	101,9	120,7	108,4
Wartość średnia	93,0	111,7	111,9	113,7
Odchylenie standardowe	11,1	8,5	9,5	10,2

Tabela 8 przedstawia wyniki dla proporcji 1:19, gdzie pomiaru dokonano po 48 h dla mleka owczego (MO), uzyskując istotny i wysoki wzrost proliferacji komórek w stosunku do kontroli (PVA/Boraks).

Tabela 8. Żywotność komórek po 48h inkubacji w pożywce kondycjonowanej 1:19 otrzymane na podstawie pomiaru intensywności luminescencji z wykorzystaniem barwnika PrestoBlue

Rodzaj opatrunku	PVA/Boraks	MO
Dołek 1	7816	12303
Dołek 2	8519	13506
Dołek 3	7895	14033
Dołek 4	8317	14880
Dołek 5	7384	14458
Dołek 6	7868	12994
Wartość średnia	7967	13696
Odchylenie standardowe	401	956

Współczesna koncepcja miejscowego leczenia trudno gojących się ran zakłada zgodnie z opracowaną przez European Wound Management Association strategią TIME (T – tissue management, I – infection and inflammation control, M – moisture balance, E – epithelial advancement) kolejno: oczyszczanie rany, kontrolę infekcji i zapalenia w ranie, zapewnienie odpowiedniej wilgotności i stymulację naskórkowania. Zapewnienie właściwej wilgotności w dnie rany i wspomaganie zachodzących w niej procesów samoodnowy to z kolei zadania, w których kluczową rolę odgrywają nowoczesne, aktywne biologicznie opatrunki. Odchodzi się od tradycyjnych metod opatrywania ran suchym bądź wysychającym opatrunkiem gazowym. Suchy kompres nie spełnia, bowiem żadnej dodatkowej funkcji poza zewnętrzną osłoną rany. Ponadto zmiana suchego opatrunku może towarzyszyć uraz nadbudowanych struktur tkankowych, co znacznie wydłuża całkowity czas gojenia. Do alternatywnych metod terapii najbardziej w praktyce klinicznej zaliczają się preparaty komórkowych czynników wzrostu, opatrunki podciśnieniowe (ang. negative pressure wound therapy–NPWT) czy wykazujące właściwości przeciwbakteryjne opatrunki z dodatkiem srebra. Opracowany nowoczesny, aktywny biologicznie opatrunek, sfunkcjonalizowany substancjami czynnymi pochodzącymi z mleka owczego i wielbłądziego, posiada cechy, umożliwiające konkurencję z dostępnymi na rynku produktami. Nie ma do tej pory na rynku podobnego rozwiązania technologicznego. Bogaty profil substancji bioaktywnych mleka owczego i wielbłądziego dzięki posiadanym właściwościom, poza zewnętrzną osłoną rany, stymulują naturalne procesy reparacji tkanek, zapewniają właściwe środowisko dla procesu gojenia, a także zabezpieczają wnętrze rany przed rozwojem infekcji.

Literatura cytowana:

1. Abdalla, E. et al. Milk Production Potential in Maghrebi She-Camels. Small Rumin. Res. 2015, 123, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.11.004>.
2. Alichanidis, E. et al. Chapter 5—Composition and Properties of Non-Cow Milk and Products. In Non-Bovine Milk and Milk Products; Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2016; pp. 81– 116, ISBN 978-0-12-803361-6.

3. Caboni, P. et al. A Metabolomics Comparison between Sheep's and Goat's Milk. *Food Res. Int.* 2019, 119, 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.071>.
4. Iram, D. et al. In Silico Identification of Antidiabetic and Hypotensive Potential Bioactive Peptides from the Sheep Milk Proteins-a Molecular Docking Study. *J. Food Biochem.* 2022, 46, e14137. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14137>.
5. Mansour, N. et al. Clinical study on the effect of the sheep milk fat globules on deep second degree burns on pigs. *Assiut Vet. Med. J.* 2015, 61, 1–14. <https://doi.org/10.21608/avmj.2015.170258>.
6. Molik E i Kordeczka K. 2020.: Walory prozdrowotne tłuszczu mleka owczego i jego wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka. *Wiadomości Zootechniczne, R. LVIII (2020), 3–4: 38–42*
7. Park, N.-Y. et al. Effect of Dietary Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Early Inflammatory Responses during Cutaneous Wound Healing. *Mediat. Inflamm.* 2010, 2010, e342328. <https://doi.org/10.1155/2010/342328>
8. Sezik, E. et al. Traditional Medicine in Turkey X. Folk Medicine in Central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.* 2001, 75, 95–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00399-8).
9. Hrynyk i Neufeld, 2014. Hrynyk M, Neufeld RJ. Insulin and wound healing. *Burns.* 2014, 40(8), 1433-46. doi: 10.1016/j.burns.2014.03.020
10. Wang, B. et al. The Preparation of Lactoferrin/Magnesium Silicate Lithium Injectable Hydrogel and Application in Promoting Wound Healing. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, 220, 1501–1511. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.126>
11. Wang, Y.W. and Jones, P.J.H. (2004) Conjugated Linoleic Acid and Obesity Control: Efficacy and Mechanisms. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 28, 941 - 955. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0802641>
12. Zhang, Z.; Lv, L. Effect of Local Insulin Injection on Wound Vascularization in Patients with Diabetic Foot Ulcer. *Exp. Ther. Med.* 2016, 11, 397–402. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2917>
13. Zhang, X.; Wei, P.; Yang, Z.; Liu, Y.; Yang, K.; Cheng, Y.; Yao, H.; Zhang, Z. Current Progress and Outlook of Nano-Based Hydrogel Dressings for Wound Healing. *Pharmaceutics* 2023, 15, 68. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010068>
14. Zhao, L. et al. et al. pH and Glucose Dual-Responsive Injectable Hydrogels with Insulin and Fibroblasts as Bioactive Dressings for Diabetic Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 37563–37574. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09395>.

Zastrzeżenia patentowe

1. Opatrunek hydrożelowy zawierający co najmniej jedną warstwę matrycy hydrożelowej z co najmniej jedną substancją bioaktywną **znamienny tym, że** wspomniana matryca hydrożelowa zawiera od 4 do 8% wag. wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA) i 4% wag. wodnego roztworu czteroboranu sodu (boraksu), a substancją bioaktywną jest mleko owcze w ilości od 5 do 20% wag i/lub mleko wielbłądziej w ilości od 2,5 do 15% wag.
2. Opatrunek hydrożelowy według zastrz. 1, **znamienny tym, że** matryca hydrożelowa zawiera 4% wag. wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA).
3. Opatrunek hydrożelowy według zastrz. 1, **znamienny tym, że** mleko owcze i/lub mleko wielbłądziej jest w postaci liofilizatu.
4. Opatrunek hydrożelowy według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym, że** zawiera 3 warstwy, przy czym:
 - warstwa wewnętrzna najbliższej rany zawiera liofilizat mleka owczego w ilości od 10 do 20% wag i liofilizat mleka wielbłądziej w ilości od 10 do 15% wag.,
 - warstwa środkowa zawiera od 5 do 15 % wag. liofilizatu mleka owczego i od 2,5 do 10 % wag. liofilizatu mleka wielbłądziej,
 - warstwa zewnętrzna zawiera wyłącznie matrycę hydrożelową.
5. Opatrunek hydrożelowy według zastrz. 4, **znamienny tym, że** zawiera 3 warstwy, przy czym:
 - warstwa wewnętrzna najbliższej rany zawiera liofilizat mleka owczego w ilości 15% wag. i liofilizat mleka wielbłądziej w ilości 10% wag.,
 - warstwa środkowa zawiera liofilizat mleka owczego w ilości 5% wag. i liofilizat mleka wielbłądziej w ilości 5% wag.,
 - warstwa zewnętrzna zawiera wyłącznie matrycę hydrożelową.
6. Sposób wytwarzania opatrunku hydrożelowego określonego w którymkolwiek z zastrz. od 1 do 5 obejmujący następujące etapy:
 - a) przygotowuje się substancję bioaktywną w postaci liofilizatu z mleka owczego i/lub liofilizatu z mleka wielbłądziej w temperaturze mieszczącej się w zakresie od -90 do -60°C.
 - b) przygotowuje się matrycę hydrożelową mieszając wodny roztwór alkoholu poliwinylowego przygotowany w temperaturze mieszczącej się w zakresie od 60 do 80°C oraz mieszając wodny roztwór czteroboranu sodu w temperaturze mieszczącej

się w zakresie od 35 do 45°C, a następnie wkrapla się wodny roztwór czteroboranu sodu do wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego i miesza się do otrzymania żelu,

c) dodaje się substancję bioaktywną do matrycy hydrożelowej w postaci mleka owczego w ilości od 5 do 20% wag i/lub mleka wielbłądziego w ilości od 2,5 do 15% wag.

7. Sposób wytwarzania opatrunku hydrożelowego według zastrz. 6, **znamienny tym, że** substancję bioaktywną w etapie a) przygotowuje się w temperaturze -80°C.
8. Sposób wytwarzania opatrunku hydrożelowego według zastrz. 6 **znamienny tym, że** do roztwór broraksu w etapie b) przygotowuje się w temperaturze 40°C.

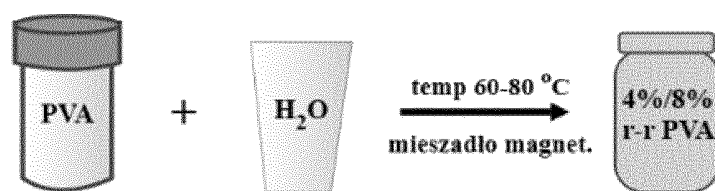


Fig. 1

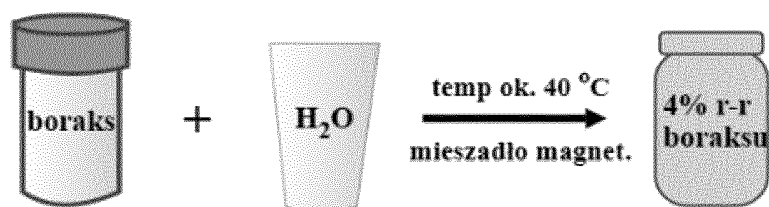


Fig. 2

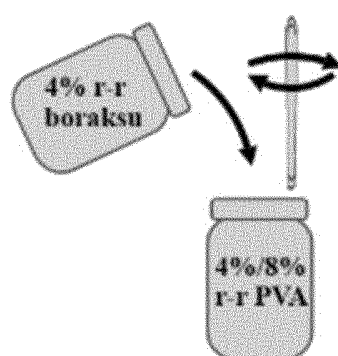


Fig. 3

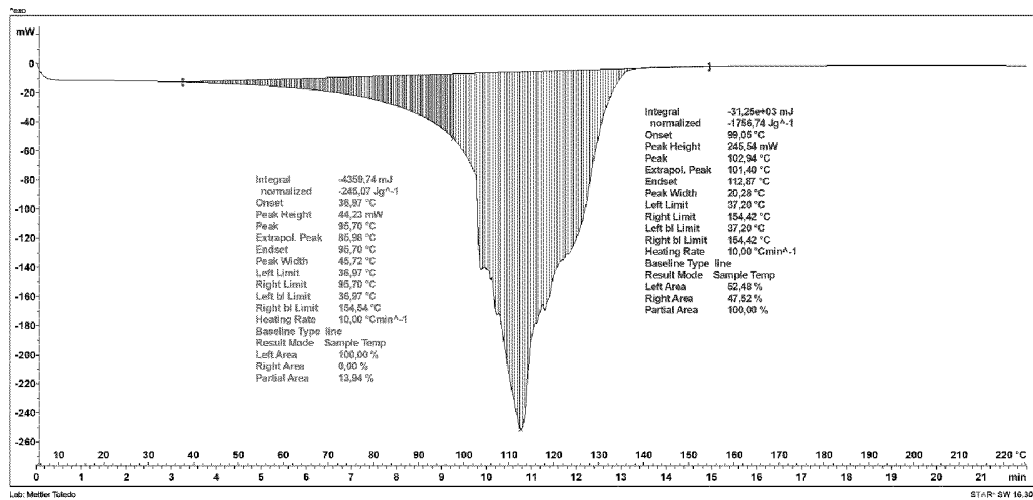


Fig. 4

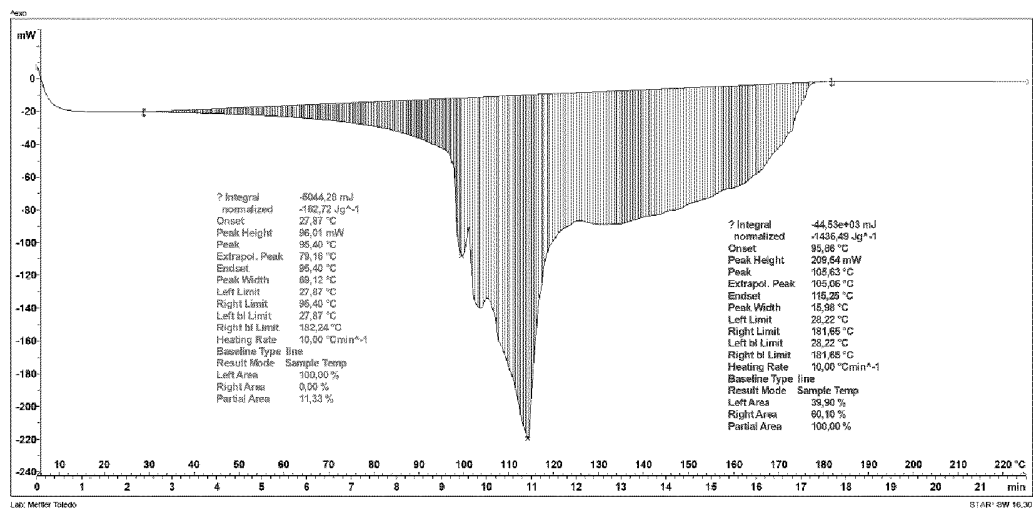


Fig. 5

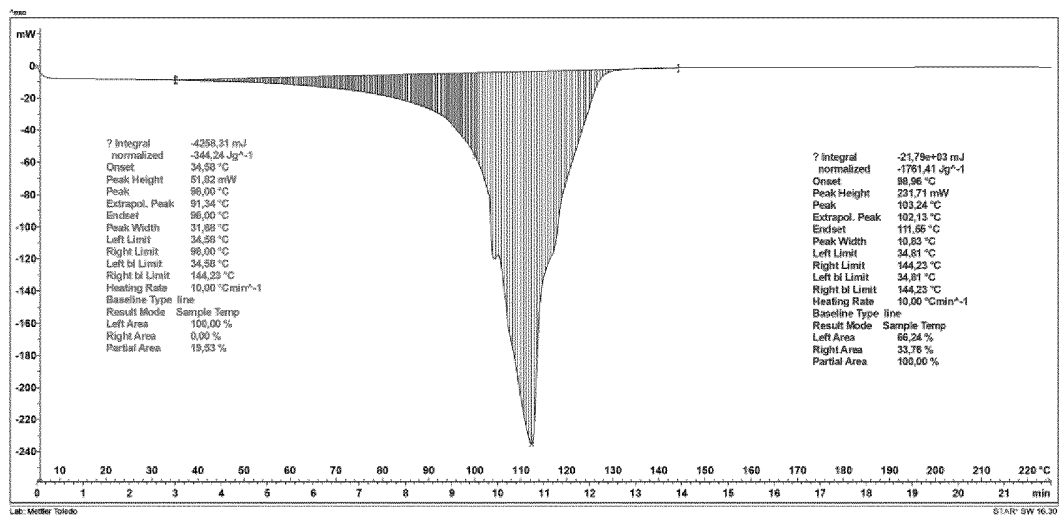


Fig. 6

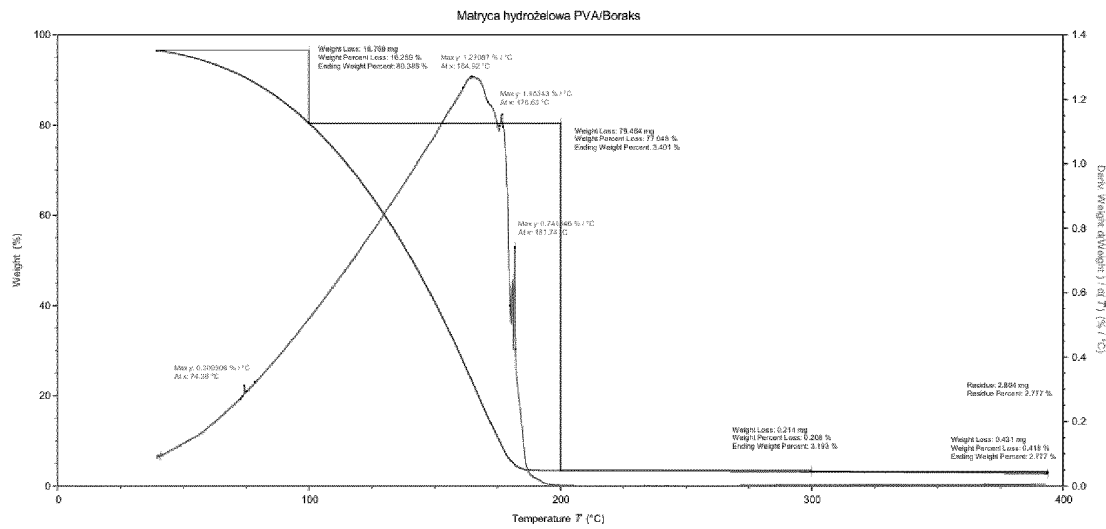


Fig. 7

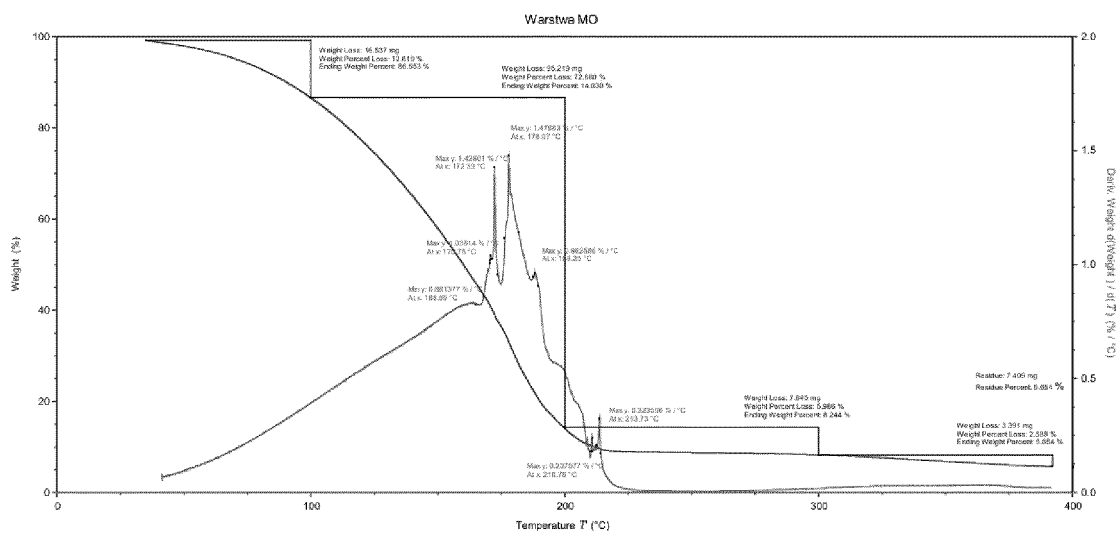


Fig. 8

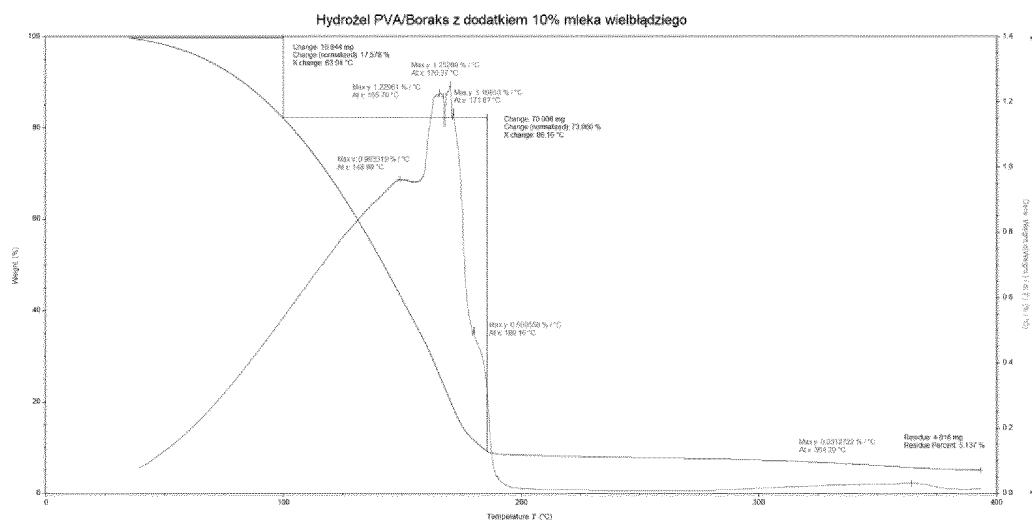


Fig. 9

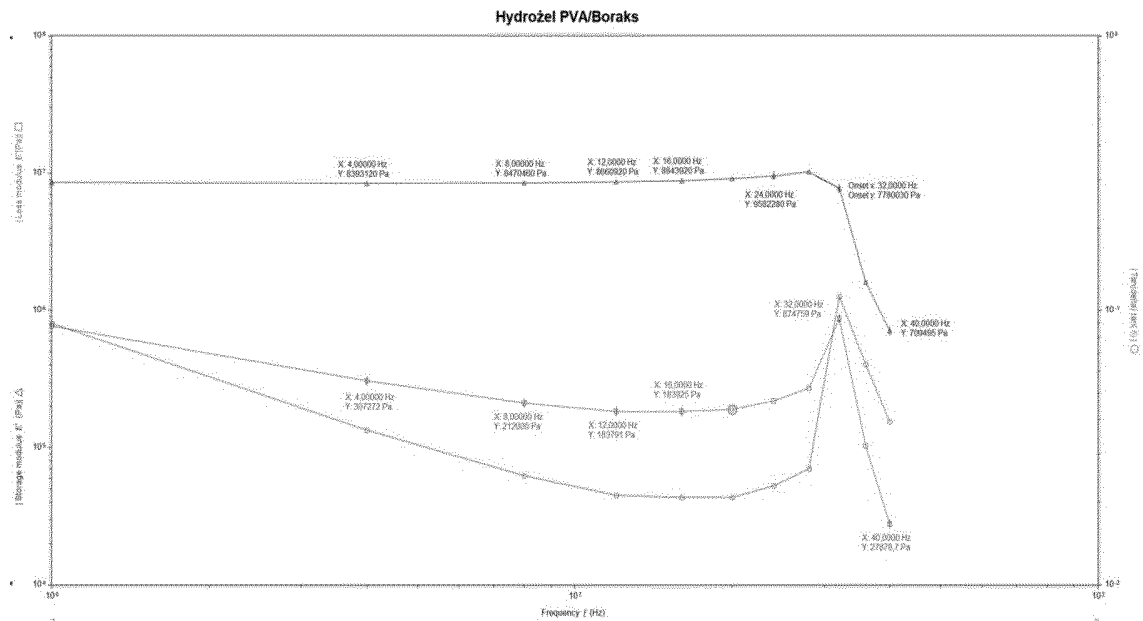


Fig. 10

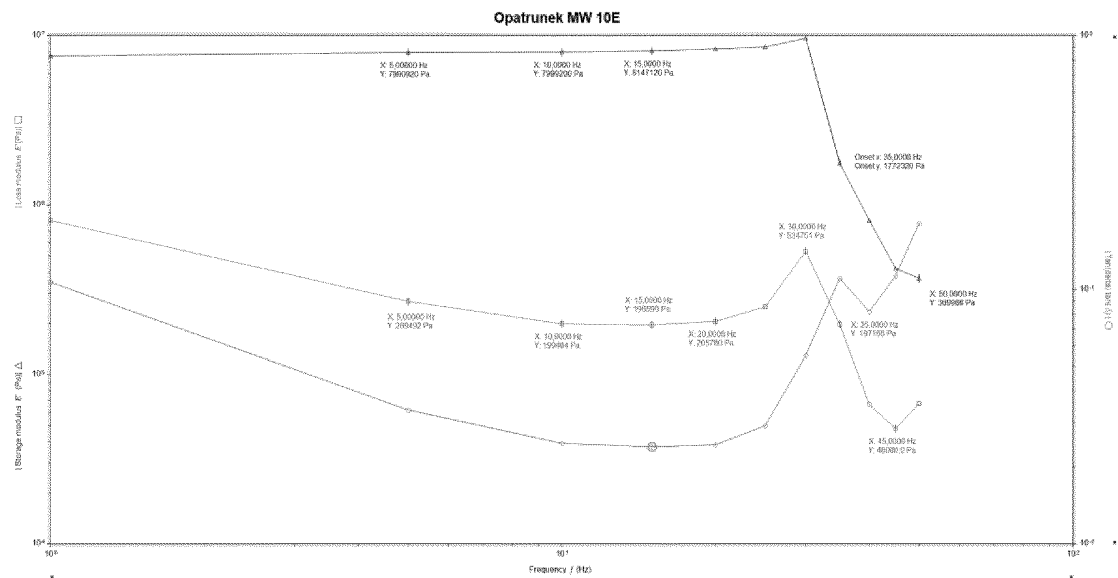


Fig. 11

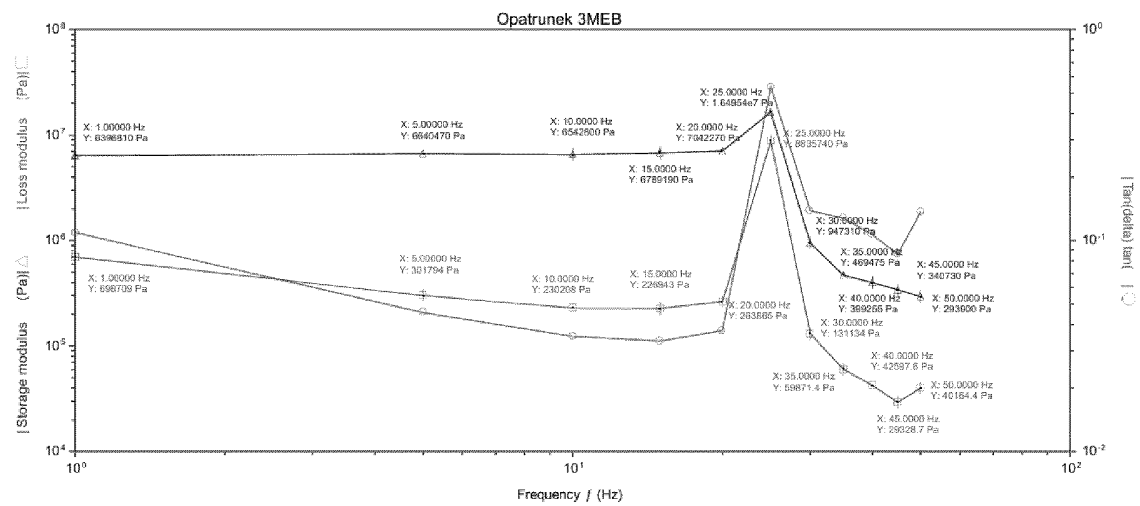


Fig. 12

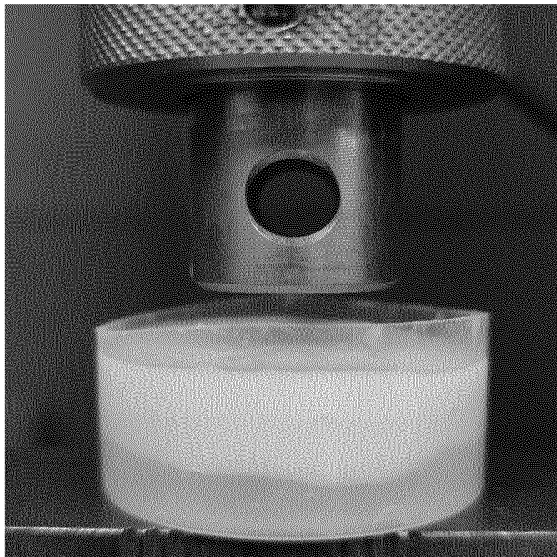


Fig. 13

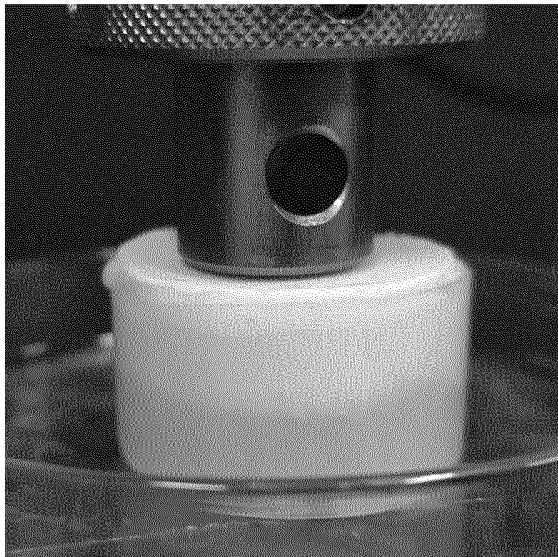


Fig. 14

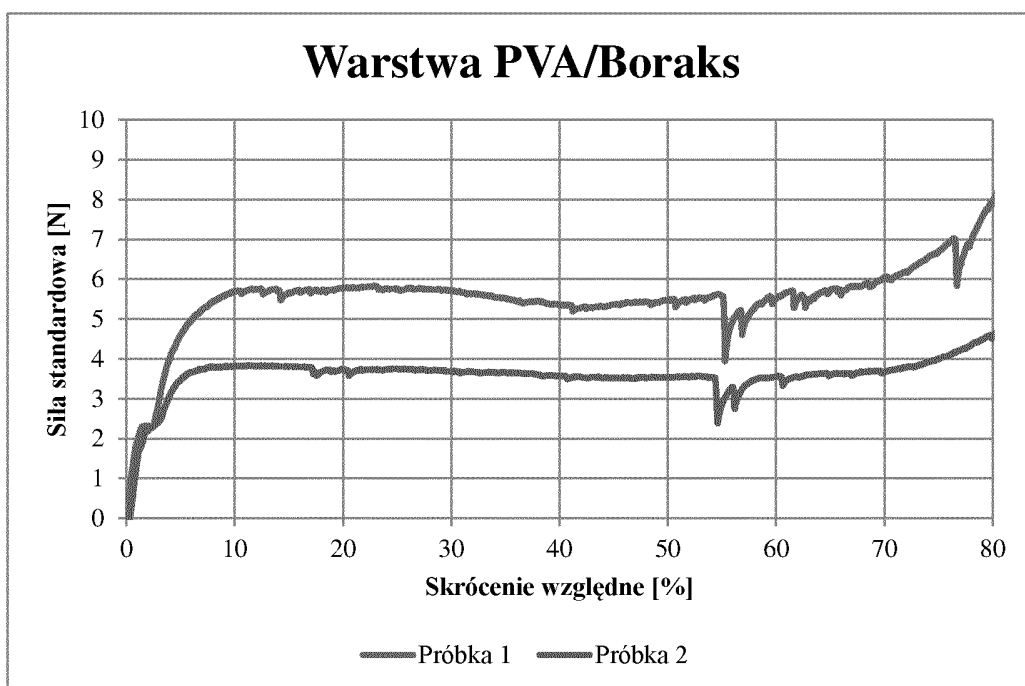


Fig. 15

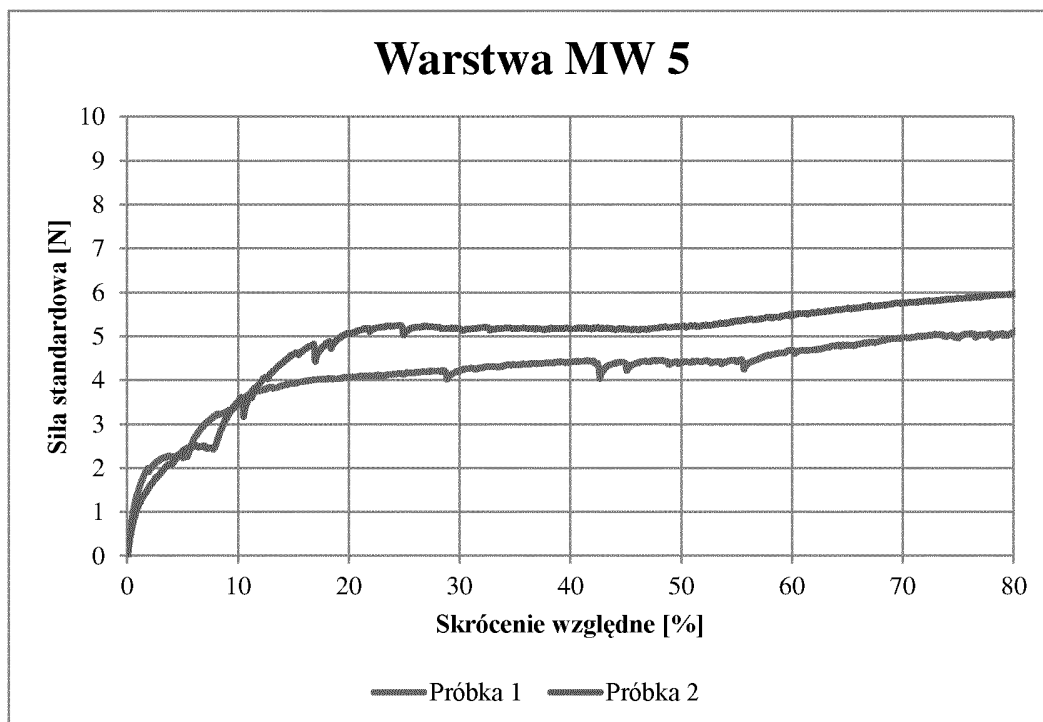


Fig. 16

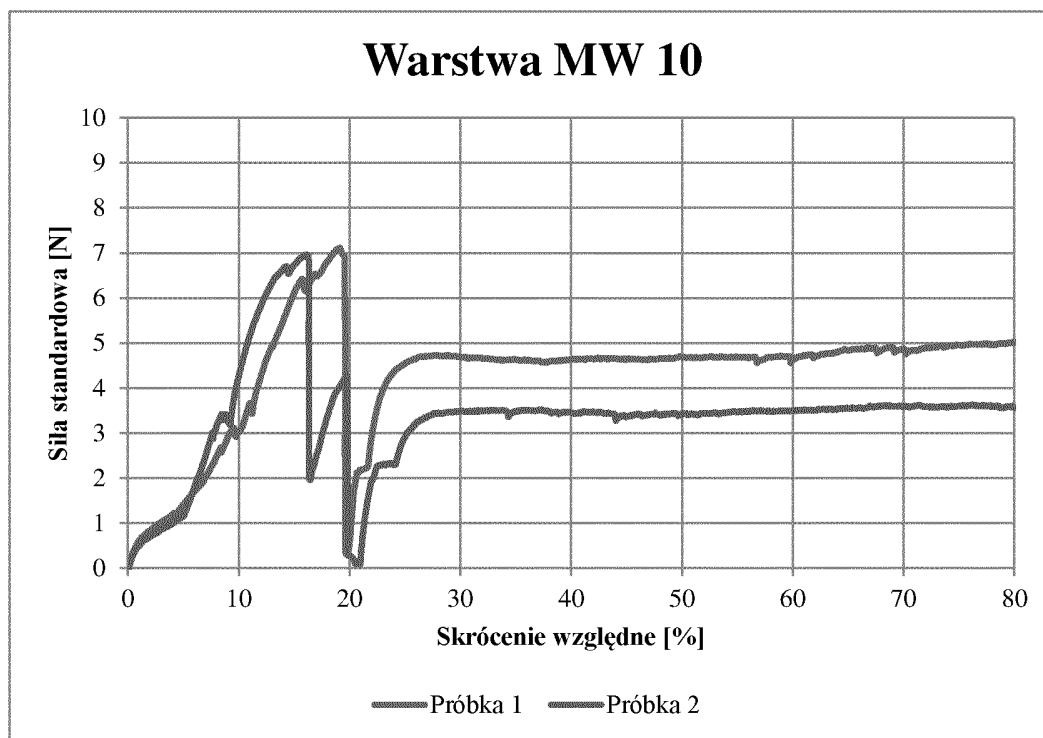


Fig. 17

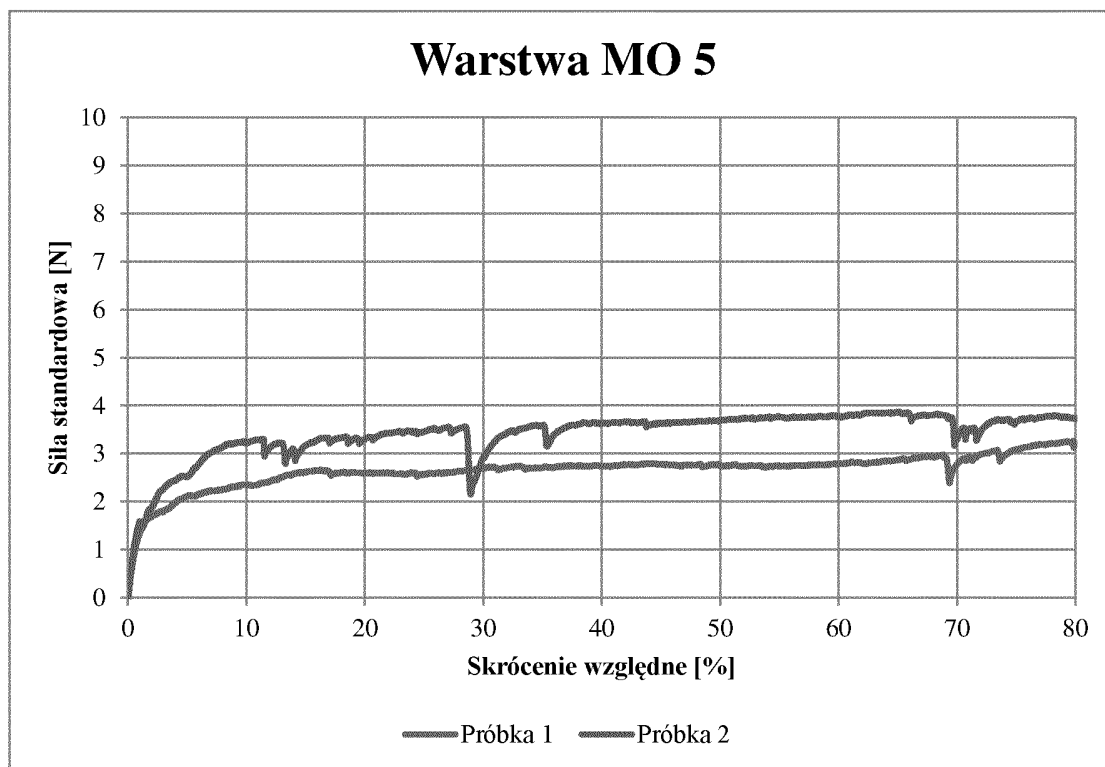


Fig. 18

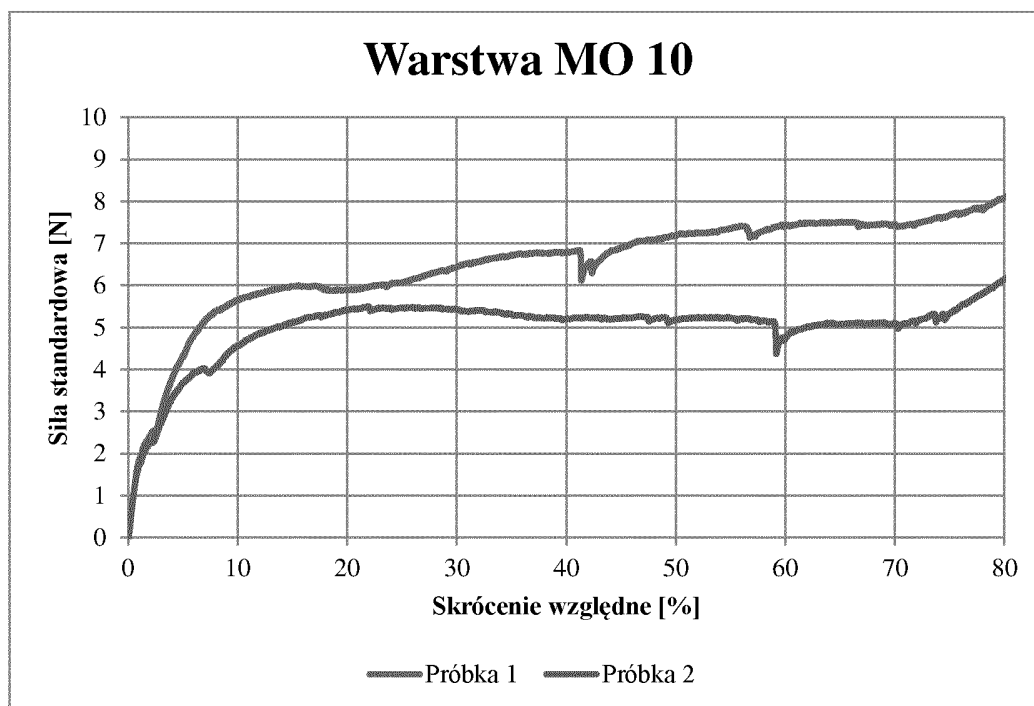


Fig. 19

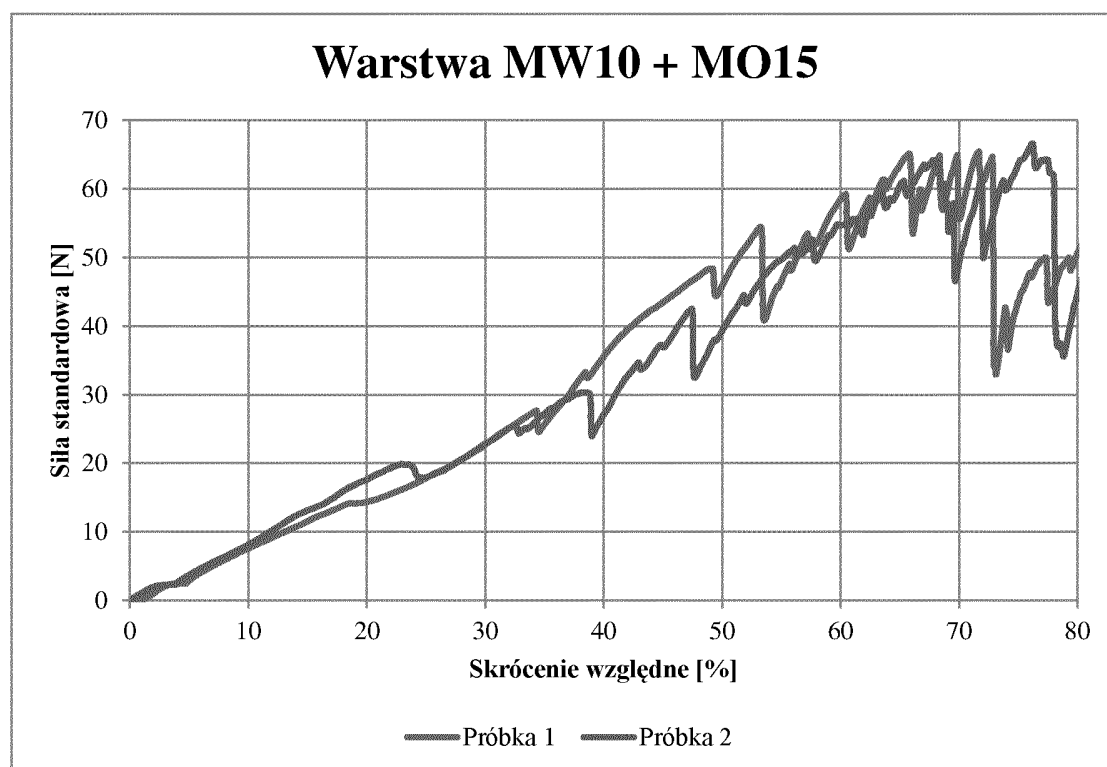


Fig. 20

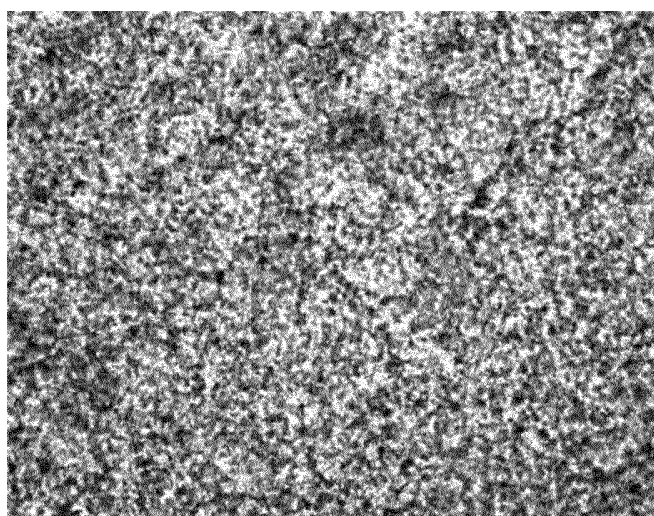


Fig. 21



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.450667

Klasyfikacja zgłoszenia: A61L 15/18, A61L 15/22, A61L 15/42, A61L 15/60, A61L 26/00		
Podklasy w których prowadzono poszukiwania: A61L15 A61L26		
Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: Bazy EPO AbS bazy UPRP		
Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	Flis Z., Szatkowski P., Pielichowska K., Edyta M. The Potential of Sheep or Camel Milk Constituents to Contribute to Novel Dressings for Diabetic Wounds. Int. J. Mol. Sci. 2023;24:17551. doi: 10.3390/ijms242417551, MDPI	1-8
A	“Camel milk dressings for hard-to-heal wounds. Researchers are working on novel solution”, cienceinpoland.pl/en/news/news%2C103501%2Ccamel-milk-dressings-hard-heal-wounds-researchers-are-working-novel-solution.html, 19.07.2024, Science in Poland	1-8
A	CN113274542 A (SHAANXI GIANT BIOGENE TECH CO LTD, UNIV NORTHWESTERN) 20-08-2021, zastrzeżenia	1-8
☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.		

Sprawozdanie wykonał/-a:

Beata Chasieniewicz
Ekspert

Data:

26.09.2025

Podpis:

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. 1-8 z dnia 22.12.2024r