

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236367**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430459**

(22) Data zgłoszenia: **01.07.2019**

(51) Int.Cl.

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

A61L 15/60 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

(54)

**Piankowy materiał opatrunkowy na rany na bazie agarozy
oraz sposób jego wytwarzania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

27.07.2020 BUP 16/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

11.01.2021 WUP 01/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**AGATA PRZEKORA-KUŚMIERZ, Lublin, PL
VLADYSLAV VIVCHARENKO, Lublin, PL
PAULINA KAZIMIERCZAK,
Kolonia Miłoszewice, PL
MICHAŁ WÓJCIK, Ożarów, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 236367 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest piankowy materiał opatrunkowy na rany na bazie agarozy do zastosowań w medycynie regeneracyjnej oraz sposób jego wytwarzania.

Gojenie ran jest dynamicznym i złożonym procesem, który wymaga odpowiedniego środowiska wspierającego proces regeneracji. W zależności od typu rany należy zastosować odpowiedni materiał opatrunkowy, który będzie spełniać stosowne wymagania, m.in.: zapewniać i utrzymywać wilgotne środowisko, stymulować migrację naskórka, wspierać angiogenezę i syntezę tkanki łącznej, umożliwiać wymianę gazową między zranioną tkanką a środowiskiem zewnętrznym, zapewniać ochronę przed infekcjami bakteryjnymi. Ponadto opatrunek powinien być nietoksyczny, nie uczulać oraz nie przylegać (przysychać) dołożyska rany (Dhivya i wsp., *BioMedicine*, 2015, 5(4):24–28; Gonzalez i wsp., *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2016, 91(5):614–20).

Wraz z rozwojem technologii i nauki, na rynku farmaceutycznym pojawiły się różnorodne rodzaje materiałów opatrunkowych (biologiczne, syntetyczne, biologiczno-syntetyczne). Bardzo często strategie opracowywania nowych materiałów opatrunkowych opierają się na wykorzystaniu naturalnych polisacharydów ze względu na ich cenne właściwości biologiczne oraz szeroką dostępność. Agarozę to naturalny polisacharyd, który charakteryzuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością, brakiem immunogenności oraz wysoką zdolnością absorpcji cieczy. Ponadto, struktura usieciowanej agarozy zapewnia odpowiednie przenikanie gazów, w tym tlenu. Wymienione powyżej właściwości agarozy, sprawiają, że stanowi ona godny zainteresowania naturalny polisacharyd do zastosowań jako matryca materiału opatrunkowego (Zarrintaj P. i wsp., *Carbohydrate Polymers*, 2018, 187:66–84).

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania kriożelowego, piankowego, porowatego, chłonnego biomateriału na bazie agarozy i kurdlanu, który będzie absorbował wysięk z rany oraz zatrzymywał go w obrębie struktury opatrunku.

Dotychczas nie został opracowany materiał opatrunkowy składający się z agarozy oraz kurdlanu (bakteryjnego β -1,3 glukanu). W dostępnej literaturze naukowej z zakresu medycyny regeneracyjnej istnieją wyłącznie doniesienia opisujące sposób produkcji oraz przypuszczalne zastosowanie materiałów opatrunkowych powstałych z β -glukanu pochodzenia innego niż bakteryjne lub powstałych z połączenia agarozy z innymi polisacharydami.

Celem wynalazku jest otrzymanie kriożelowego, piankowego materiału opatrunkowego na rany na bazie agarozy i kurdlanu, który – ze względu na cenne właściwości biologiczne wchodzących w jego skład polisacharydów – będzie wspierał proces gojenia.

Z chińskiego opisu patentu nr CN107096062 (A) znany jest sposób otrzymywania materiału opatrunkowego na bazie agarozy i karageniny do zastosowań w leczeniu powierzchniowych ran. Sposób otrzymywania polega na rozprowadzeniu karageniny w roztworze wodnym agarozy o temperaturze 75–90°C, a następnie suszeniu lub zamrożeniu i liofilizacji.

Z czeskiego opisu patentu nr CZ2007683 (A3) znany jest sposób otrzymywania kompleksu chitozan-schizofylan (grzybowy β -1,3-D-glukan) lub jego soli, występujących samodzielnie lub w połączeniu z jednym lub większą liczbą innych naturalnych polisacharydów, do zastosowań jako preparat do przyspieszania gojenia się ran oraz zapobiegania przywierania bandaża do rany. Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że chitozan i schizofylan oraz środek antyseptyczny rozprowadza się w sterylnej wodzie i następnie poddaje suszeniu na powietrzu lub zamrożeniu i liofilizacji.

Przedmiotem wynalazku jest piankowy materiał opatrunkowy na rany zbudowany z agarozy oraz kurdlanu, rozprowadzonych w wodzie destylowanej lub dejonizowanej, przy czym proporcje wagowe komponentów wynoszą odpowiednio 1–5% (w/v) agarozy oraz 1–15% (w/v) kurdlanu w odniesieniu do wody destylowanej lub dejonizowanej.

Korzystnie, gdy agarozę stosuje się w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.

Korzystnie, gdy kurdlan stosuje się w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.

Sposób wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego na rany według wynalazku polega na tym, że przygotowuje się zawiesinę 1–5% (w/v) agarozy korzystnie 1–3% (w/v) oraz 1–15% (w/v) kurdlanu korzystnie 1–3% (w/v) w wodzie destylowanej lub dejonizowanej, a następnie mieszaninę przekłada się do formy, którą inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze 90–95°C, korzystnie 95°C, przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, po czym studzi w temperaturze 4–8°C, ostudzoną próbkę umieszcza

się w zamrażarce w temperaturze od -60 do -80°C na okres 1–2 godzin, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji przez okres 16 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki.

Otrzymany według wynalazku biomateriał może znaleźć zastosowanie jako porowaty, chłonny opatrunek na rany z obfitym wysiękiem, którego powierzchnia kontaktowa nie przysycha do łożyska rany, minimalizując ryzyko uszkodzenia nowo powstałych tkanek.

Alternatywnie wynalazek zawiera dodatkowo oprócz agarozy i kurdlanu, w ilościach wcześniej opisanych, co najmniej jedną substancję bioaktywną wybraną z grupy: witamin, antybiotyków, czynników wzrostu, hormonów, kurkuminy. Korzystnie, gdy wynalazek jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę, jako czynniki wzrostu zawiera FGF i EGF, zaś jako hormony zawiera insulinę i hydrokortyzon.

Alternatywny sposób otrzymywania materiału opatrunkowego według wynalazku polega na tym, że przygotowuje się zawiesinę 1–5% (w/v) agarozy korzystnie 1–3% (w/v) oraz 1–15% (w/v) korzystnie 1–3% (w/v) kurdlanu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej, a następnie mieszaninę przekłada się do formy, którą inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze 90 – 95°C , korzystnie 95°C , przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, a następnie studzi w temperaturze 4 – 8°C , po czym ostudzoną próbkę suszy się na powietrzu. Wysuszoną próbkę nasąca się roztworem co najmniej jednej substancji bioaktywnej wybranej z grupy: witamin, antybiotyków, czynników wzrostu, hormonów, kurkuminy, przy czym korzystnie gdy jako witaminy stosuje się witaminę C oraz witaminę E, jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę, jako czynniki wzrostu zawiera FGF i EGF, zaś jako hormony zawiera insulinę i hydrokortyzon przez okres korzystnie 10 minut lub do momentu całkowitego nasączenia materiału. Nasączoną próbkę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -60 do -80°C na okres 1–2 godzin, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji przez okres 16 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki.

Korzystnie, gdy stosuje się roztwór witaminy C (kwasu askorbinowego) w stężeniu $0,05$ – 2 mg/ml lub/i roztwór witaminy E w stężeniu $0,05$ – 2 mg/ml lub/i roztwór hydrokortyzonu w stężeniu 1 – 20 μg /ml lub/i roztwór insuliny w stężeniu 5 – 50 μg /ml lub/i roztwór czynnika wzrostu FGF w stężeniu 5 – 50 ng/ml lub/i roztwór czynnika wzrostu EGF w stężeniu 5 – 50 ng/ml lub/i roztwór kurkuminy w stężeniu $0,5$ – 50 mg/ml lub/i roztwór gentamycyny w stężeniu 1 – 20 μg /ml lub/i roztwór wankomycyny w stężeniu 1 – 20 μg /ml lub/i roztwór daptomycyny w stężeniu $0,5$ – 10 μg /ml lub/i roztwór tygecykliny w stężeniu $0,5$ – 10 μg /ml – przygotowanym w soli fizjologicznej ($0,9\%$ NaCl), roztworze Ringera, HBSS lub buforze PBS.

Zaletą opracowanego według wynalazku sposobu wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego na rany jest otrzymanie porowatego, chłonnego biomateriału, który będzie absorbował wysięk z rany oraz zatrzymywał go w obrębie struktury opatrunku, co będzie zapewniać odpowiednią wilgotność środowiska rany, zapobiegając tworzeniu się strupów. Ponadto porowata struktura kriożelowego materiału będzie ułatwiać wymianę gazową między zranioną tkanką a środowiskiem zewnętrznym. Ważną cechą materiału opatrunkowego według wynalazku, jest jego brak toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych oraz powierzchnia materiału uniemożliwiająca adhezję fibroblastów skóry, dzięki czemu opatrunek może być usunięty bez naruszenia łożyska rany, zapobiegając tworzeniu się nieestetycznych blizn. Ponadto, alternatywny sposób produkcji piankowego materiału opatrunkowego, umożliwia stopniowe uwalnianie substancji bioaktywnych (np. witamina C, witamina E, kurkumina, antybiotyki, czynniki wzrostu, hydrokortyzon, insulina) w miejscu zranienia, znacząco przyspieszając regenerację skóry oraz chroniąc łożysko rany przed infekcjami.

Kriożelowy materiał opatrunkowy będący przedmiotem wynalazku, ze względu na swoje właściwości strukturalne i biologiczne będzie zapewniał odpowiednie warunki wspierające gojenie rany. Opracowany materiał opatrunkowy może znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako chłonny, piankowy opatrunek na rany wysiękowe, którego zastosowanie jest szczególnie pożądane w fazie oczyszczania i silnego wydzielania z rany. Powierzchnia kontaktowa materiału opatrunkowego według wynalazku nie sprzyja adhezji fibroblastów, zatrzymuje wysięk oraz utrzymuje wilgotne środowisko, dzięki czemu nie będzie przysychać do łożyska rany, minimalizując ryzyko uszkodzenia nowo powstałych tkanek podczas zmiany opatrunku.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

P r z y k ł a d 1.

Do $0,04$ g agarozy i $0,06$ g kurdlanu dodano 2 ml wody destylowanej i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm^2 i grubości $2,5$ mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej

w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 6°C. Ostudzony biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład II.

Do 0,02 g agarozy i 0,16 g kurdlanu dodano 2 ml wody dejonizowanej i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 25 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 4°C. Ostudzony biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -70°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład III.

Do 0,06 g agarozy i 0,10 g kurdlanu dodano 4 ml ultraczystej wody dejonizowanej i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 6 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -78°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład IV.

Do 0,02 g agarozy i 0,01 g kurdlanu dodano 1 ml wody destylowanej i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 1,5 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał wysuszono na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 10 minut roztworem zawierającym witaminę C w stężeniu 300 µg/ml oraz czynnik wzrostu (FGF lub EGF) w stężeniu 25 ng/ml, przygotowanym w buforze PBS i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 1,5 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład V.

Do 0,04 g agarozy i 0,08 g kurdlanu dodano 4 ml wody dejonizowanej i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 6 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał wysuszono na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 10 minut roztworem zawierającym hydrokortyzon w stężeniu 10 µg/ml oraz insulinę w stężeniu 20 µg/ml, przygotowanym w roztworze Ringera i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład VI.

Do 0,02 g agarozy i 0,06 g kurdlanu dodano 2 ml wody destylowanej i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał wysuszono na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 15 minut roztworem zawierającym antybiotyk (wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę lub tygecyklinę) w stężeniu 10 µg/ml oraz witaminę E w stężeniu 300 µg/ml, przygotowanym w roztworze soli fizjologicznej i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład VII.

Do 0,04 g agarozy i 0,06 g kurdlanu dodano 2 ml wody destylowanej i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał wysuszone na powietrzu. Wysuszony biomateriał nasączono przez okres 15 minut roztworem kurkuminy o stężeniu 20 mg/ml przygotowanym w buforze PBS i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Zastrzeżenia patentowe

1. Piankowy materiał opatrunkowy na bazie agarozy, **znamienny tym**, że stanowi go agarozę i kurdlan (bakteryjny β -1,3-D-glukan) rozprowadzone w wodzie destylowanej lub dejonizowanej, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 1–5% (w/v agarozy oraz 1–15% (w/v) kurdlanu w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.
2. Piankowy materiał opatrunkowy według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera agarozę w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.
3. Piankowy materiał opatrunkowy według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera kurdlan w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.
4. Sposób wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego na rany określonego w zastrz. 1, **znamienny tym**, że przygotowuje się zawiesinę 1–5% (w/v) agarozy korzystnie 1–3% (w/v) oraz 1–15% (w/v) korzystnie 1–3% (w/v) kurdlanu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej, a następnie mieszaninę inkubuje się w temperaturze 90–45°C, korzystnie 95°C, przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, a następnie studzi w temperaturze 4–8°C, ostudzoną próbkę zamraża się w temperaturze od -60 do -80°C przez okres 1–2 godzin, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji.
5. Piankowy materiał opatrunkowy na bazie agarozy, **znamienny tym**, że stanowi go agarozę i kurdlan (bakteryjny β -1,3-D-glukan) rozprowadzone w wodzie destylowanej lub dejonizowanej przy czym proporcje wagowo stałych komponentów wynoszą odpowiednio 1–5% (w/v) agarozy oraz 1–15% (w/v) kurdlanu w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej, ponadto biomateriał zawiera co najmniej jedną substancję bioaktywną wybraną z grupy: witamin, antybiotyków, czynników wzrostu, hormonów, kurkuminy.
6. Piankowy materiał według zastrz. 5, **znamienny tym**, że jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę, jako czynniki wzrostu zawiera FGF i EGF, zaś jako hormony zawiera insulinę i hydrokortyzon.
7. Piankowy materiał według zastrz. 5, **znamienny tym**, że agarozę stosuje się w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.
8. Piankowy materiał według zastrz. 5, **znamienny tym**, że kurdlan stosuje się w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.
9. Sposób wywarzania piankowego materiału opatrunkowego na rany na bazie agarozy określonego w zastrz. 5, **znamienny tym**, że przygotowuje się zawiesinę 1–5% (w/v) korzystnie 1–3% (w/v) agarozy oraz 1–15% (w/v) korzystnie 1–3% (w/v) kurdlanu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej, a następnie mieszaninę przekłada się do formy, którą inkubuje się w temperaturze 90–95°C, korzystnie 95°C, przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, a następnie studzi w temperaturze 4–8°C, po czym ostudzoną i wysuszoną próbkę nasącza się roztworem co najmniej jednej substancji bioaktywnej wybranej z grupy: witamin, antybiotyków, czynników wzrostu, hormonów, kurkuminy, przy czym korzystnie gdy jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę, jako czynniki wzrostu zawiera FGF i EGF, zaś jako hormony zawiera insulinę

i hydrokortyzon, do całkowitego nasączenia materiału. po czym nasączoną próbkę zamraża się w temperaturze od -60 do -80°C, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji.

10. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że agarozę stosuje się w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.
11. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że kurdlan stosuje się w ilości 1–3% (w/v) w odniesieniu do wody destylowanej/dejonizowanej.
12. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że związki bioaktywne stosuje się w następujących ilościach: roztwór witaminy C (kwasu askorbinowego) w stężeniu 0,05–2 mg/ml lub/i roztwór witaminy E w stężeniu 0,05–2 mg/ml lub/i roztwór hydrokortyzonu w stężeniu 1–20 µg/ml lub/i roztwór insuliny w stężeniu 5–50 µg/ml lub/i roztwór czynnika wzrostu FGF w stężeniu 5–50 ng/ml lub/i roztwór czynnika wzrostu EGF w stężeniu 5–50 ng/ml lub/i roztwór kurkuminy w stężeniu 0,5–50 mg/ml lub/i roztwór gentamycyny w stężeniu 1–20 µg/ml lub/i roztwór wankomycyny w stężeniu 1–20 µg/ml lub/i roztwór daptomycyny w stężeniu 0,5–10 µg/ml lub/i roztwór tygecykliny w stężeniu 0,5–10 µg/ml – przygotowanym w soli fizjologicznej (0,9 % NaCl) lub roztworze Ringera lub HBSS lub buforze PBS.