

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 243058 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **430458**

(22) Data zgłoszenia: **2019.07.01**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.01.11 BUP 01/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.06.12 WUP 24/2023**

(51) MKP:

**A61L 15/28** (2006.01)

**A61L 15/42** (2006.01)

**A61L 15/44** (2006.01)

**A61L 15/60** (2006.01)

(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**

(74) Pełnomocnik:

**Anna Bełz, Lublin, PL**

(54) Tytuł:

**Hydrożelowy substytut skóry na bazie agarozy i chitozanu oraz sposób jego wytwarzania**

**PL 243058 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest hydrożelowy bioaktywny substytut skóry stanowiący preparat na bazie chitozanu i agarozy do zastosowań w medycynie regeneracyjnej skóry oraz sposób jego wytwarzania.

Substytuty skóry to niejednorodna grupa materiałów wykorzystywanych do pokrywania powierzchni rany w celu zapewnienia przejściowego lub trwałego fizjologicznego zamknięcia rany, w tym ochronę przed urazami mechanicznymi, kolonizacją bakterii oraz zapewnienia wilgotnego środowiska rany. Bioaktywne opatrunki na rany nowej generacji, które zwykle są wytwarzane przy użyciu syntetycznych lub naturalnych polimerów, powinny przede wszystkim dostarczać tlen, zapobiegać przesuszeniu rany i sprzyjać gojeniu. Bioaktywne substytuty skóry powinny posiadać pewne kluczowe cechy, takie jak wysoka zdolność absorpcji płynów, biokompatybilność, biodegradowalność, brak toksyczności oraz zdolność do stymulowania procesu regeneracji skóry (Dai i wsp., *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9:857–79; Dhivya i wsp., *BioMedicine*, 2015, 5(4):22).

Agarozą jest biokompatybilnym polisacharydowym polimerem otrzymany z wodorostów morskich (Bhat i wsp., *J Biosci Bioeng*, 2012, 114(6):663–70; Hu i wsp., *Materials*, 2016, 9(10):816). Agarozą jest szeroko wykorzystywana w dziedzinie inżynierii biomedycznej do produkcji biomateriałów wspomagających gojenie się ran, naprawę chrząstki czy regenerację tkanki nerwowej (Bhat i wsp., *J R Soc Interface*, 2010, 8(57):540–54). Niemniej jednak, wadą agarozy jest brak zdolności wspomaganie adhezji komórek eukariotycznych. Zdolność materiału do stymulowania adhezji komórek do jego powierzchni jest kluczową cechą w przypadku wykorzystania biomateriału jako substytutu skóry zasiedlanego komórkami pacjenta (Cao i wsp., *Biomacromol*, 2009, 10(10):2954–59). Dlatego, połączenie agarozy z innymi biopolimerami, np. chitozaniem, jest niezbędne dla uzyskania powierzchni biomateriału sprzyjającej adhezji komórek (Felfel i wsp., *Carbohydr Polym*, 2019, 204:59–67). Chitozan jest naturalnym kationowym polimerem otrzymany z chityny. Chitozan jest rozpuszczalny w kwaśnym środowisku wodnym i często wykorzystywany do przygotowania hydrożeli, folii, włókna lub gąbek – zatem większości biomateriałów stosowanych w inżynierii biomedycznej, dla której biokompatybilność jest cechą kluczową. Do najważniejszych cech chitozanu zalicza się: biokompatybilność, brak toksyczności, biodegradowalność, zdolność przyspieszania procesu gojenia ran, zdolność zatrzymywania płynów oraz właściwości przeciwbakteryjne (Rinaudo, *Prog Polym Sci*, 2006, 31(7):603–32). Ponadto, chitozan jest w stanie tworzyć wiązania wodorowe z innymi polimerami ze względu na obecność grup polarnych takich jak -OH i -NH<sub>2</sub> (Chaudhary i wsp., *ACS App Mater Interface*, 2015, 7(44):24957–62). Z tego względu chitozan został również z powodzeniem wykorzystany w kombinacji z różnymi naturalnymi i syntetycznymi polimerami, takimi jak alginian, kolagen, kwas hialuronowy, agarozą, celulozą, skrobia, żelatyna, polikaprolakton, kwas polimlekowy i alkohol poliwinylowy (Lewandowska i wsp., *Inter J Biol Macromol*, 2014, 65:534–41; Zheng i wsp., *Macromol Biosci*, 2014, 14(5):655–66; Lewandowska i wsp., *J Molec Liq*, 2015, 212:879–84).

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania hydrożelowego, cienkiego, elastycznego substytutu skóry, który będzie zapewniał przejściowe fizjologiczne zamknięcie rany, ochronę przed wnikaniem patogenów oraz przyspieszoną regenerację lub rekonstrukcję skóry w przypadku wcześniejszego zasiedlenia materiału komórkami pacjenta.

Dotychczas nie został opracowany hydrożelowy substytut skóry na bazie chitozanu i agarozy, mający postać cienkiego, elastycznego filmu. W dostępnej literaturze naukowej z zakresu medycyny regeneracyjnej istnieją wyłącznie doniesienia opisujące sposób produkcji oraz przypuszczalne zastosowanie materiałów na bazie chitozanu i agarozy, mających postać trójwymiarowych rusztowań, hydrożeli do miejscowych wstrzykiwań lub hydrożelowych nośników leków. Celem wynalazku jest otrzymanie bioaktywnego substytutu skóry na bazie chitozanu i agarozy w formie cienkiego, hydrożelowego filmu, który – ze względu na cenne właściwości biologiczne wchodzących w jego skład polisacharydów – będzie zapewniał fizjologiczne zamknięcie rany oraz przyspieszał proces regeneracji uszkodzonej tkanki. Z francuskiego opisu patentu nr FR2843972 (A1) znany jest sposób otrzymywania substytutu skóry na bazie matrycy chitozanowej zasiedlonej fibroblastami i/lub keratynocytami do zastosowań jako bioaktywny opatrunek komórkowy do leczenia ran przewlekłych, ostrych oraz do zastosowań w testach *in vitro* w toksykologii. Metoda otrzymywania substytutu skóry polega na przygotowaniu roztworu chitozanu w kwasie maleinowym lub w innym kwasie z dodatkiem lub bez dodatku alkoholu poliwinylowego, glicerolu, środka porogennego (chlorek sodu, glukoza, sacharoza), a następnie suszeniu lub liofilizacji oraz stabilizacji matrycy w roztworze zasadowym, płukaniu w wod-

nym roztworze izopropanolu, w PBS i/lub w pożywce hodowlanej, a następnie hodowli komórkowej *in vitro* na matrycy chitozanowej.

Z czeskiego opisu patentu nr CZ2007683 (A3) znany jest sposób otrzymywania kompleksu chitozan-schizofylan (grzybowy  $\beta$ -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.

Znany jest również hydrożel do wstrzykiwań na bazie chitozanu i agarozy do zastosowań w regeneracji skóry. Metoda wytwarzania hydrożelu polega na rozpuszczeniu deacetylowanego chitozanu (w stężeniu od 0,75% do 2,5%) w 1% kwasie octowym, dodaniu agarozy (3%) w formie proszku i zmieszaniu otrzymanej zawiesiny w temperaturze 50°C. Otrzymany żel służy do miejscowego wstrzykiwania w miejsce zranienia i posiada zdolność tężenia w temperaturze ciała człowieka – 37°C (Miguel i wsp., *Carbohydr Polym*, 2014, 111:366–73).

Znany jest sposób otrzymywania potencjalnego hydrożelowego materiału opatrunkowego na bazie chitozanu i agaru, który polega na rozpuszczeniu chitozanu w 1,5% roztworze kwasu octowego, dodaniu wody dejonizowanej, agaru w postaci proszku oraz opcjonalnie TMPGDE jako środka sieciującego. Tak przygotowaną zawiesinę poddaje się działaniu temperatury 120°C w autoklawie (Sahiner i wsp., *Curr Appl Polym Sci*, 2017, 1(1):52–62).

Znany jest sposób wytwarzania trójwymiarowego rusztowania na bazie chitozanu, agarozy i żelatyny do zastosowań w inżynierii tkankowej, w tym do regeneracji tkanki chrzęstnej. Sposób produkcji biomateriału obejmuje rozpuszczenie chitozanu w 1% wodnym roztworze kwasu octowego, dodanie żelatyny, zmieszanie powstałego roztworu z wodnym roztworem agarozy o temperaturze 50°C, a następnie dodanie aldehydu glutarowego (środka sieciującego). Powstały roztwór przelewa się do strzykawek i inkubuje 16 godzin w łaźni chłodzącej w temperaturze -12°C. Po inkubacji żele rozmraża się w wodzie dejonizowanej w temperaturze pokojowej, przemywa wodą dejonizowaną i suszy na powietrzu (Bhat i wsp., *J R Soc Interface*, 2010, 8(57):540–54; Bhat i wsp., *J Biosci Bioeng*, 2012, 114(6):663–70).

Znany jest również hydrożel na bazie chitozanu i agarozy do zastosowań jako nośnik leków. Metoda wytwarzania hydrożelu polega na rozpuszczeniu agarozy w 60°C w roztworze chitozanu przygotowanym w wodnym roztworze kwasu octowego. Następnie do przygotowanego roztworu chitozanu i agarozy o temperaturze 60°C dodaje się 5-Fluorouracil (lek o aktywności przeciwnowotworowej), całość przelewa do teflonowych form i studzi w temperaturze 4°C (Zamora-Mora i wsp., *Carbohydr Polym*, 2014, 111:348–55).

Przedmiotem wynalazku jest bioaktywny substytut skóry na bazie chitozanu i agarozy, charakteryzujący się tym, że chitozan jest rozpuszczony w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego a agarozę w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 2–4% (w/v) chitozanu w odniesieniu do kwasu octowego i 4% (w/v) agarozy w odniesieniu do zasady sodowej a komponenty są ze sobą zmieszane w stosunku 1:1 (v:v) dając końcowe stężenie w finalnym produkcie 1–2% (w/v) chitozanu i 2% (w/v) agarozy.

Korzystnie, gdy chitozan stosuje się w ilości 3% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy wynalazek zawiera dodatkowo oprócz chitozanu i agarozy, w ilościach wcześniej opisanych, substancje bioaktywne jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkuminę, gdzie jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, zaś jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygocyklinę.

Sposób wytwarzania substytutu skóry według wynalazku polega na tym, że do 2–4% (w/v) roztworu chitozanu przygotowanego w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego dodaje się w stosunku 1:1 (v:v) 4% (w/v) zawiesinę agarozy przygotowaną w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, całość miesza się na mieszadle magnetycznym z płytą grzejącą w temperaturze 70–90°C, korzystnie 75°C, przez 10–25 minut lub do całkowitego rozpuszczenia agarozy, a następnie otrzymaną mieszaninę rozprowadza się w postaci cienkiej 0,5–2 mm warstwy na powierzchni formy i suszy na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Korzystnie, gdy otrzymaną mieszaninę doprowadza się do temperatury 45–65°C i dodaje się związki bioaktywne jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkuminę, korzystnie gdy stosuje się jako witaminy witaminę C oraz witaminę E, zaś jako antybiotyki wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygocyklinę.

Korzystnie gdy stosuje się witaminę C (kwas askorbinowy) w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu lub/i witaminę E w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu lub/i hydrokortyzon w ilości 1–20  $\mu\text{g}$  na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu lub/i kurkuminę w ilości 0,5–50 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu lub/i gentamycynę w ilości 1–20  $\mu\text{g}$  na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu lub/i wankomycynę w ilości 1–20  $\mu\text{g}$  na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu lub/i daptomycynę w ilości 0,5–10  $\mu\text{g}$  na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu lub/i tygecyklinę w ilości 0,5–10  $\mu\text{g}$  na 1 ml mieszaniny chitozan/agarozu.

Otrzymany według wynalazku biomateriał może znaleźć zastosowanie jako:

- funkcjonalny ekwiwalent skóry – biokompatybilny i biodegradowalny biomateriał zasiedlony w warunkach *in vitro* komórkami własnymi pacjenta, który będzie stanowić barierę przed patogenami, będzie zapewniać wilgotne środowisko w miejscu zranienia oraz swobodną wymianę gazową,
- bioaktywny substytut skóry – biokompatybilny i biodegradowalny biomateriał zapewniający wilgotne środowisko w miejscu zranienia, umożliwiający łatwy transport tlenu oraz składników odżywczych, który będzie izolować ranę od środowiska zewnętrznego, zapobiegając zakażeniu.

Opracowana według wynalazku metoda wytwarzania hydrożelowego substytutu skóry, wykorzystująca neutralizację kwaśnego roztworu chitozanu za pomocą zasadowej zawiesiny agarozu, jest metodą dotychczas niestosowaną w procesie tworzenia biomateriałów, ze względu na dobrze znany mechanizm żelowania i wytrącania się kwaśnego roztworu chitozanu w środowisku zasadowym. Wszystkie opisane dotychczas metody produkcji materiałów agarozowo-chitozanowych zakładają zmieszanie wodnego roztworu agarozu z kwaśnym roztworem chitozanu lub dodanie proszku agarozowego do kwaśnego roztworu chitozanu. Sposób produkcji materiału według wynalazku zakłada dodanie zawiesiny agarozu w zasadzie sodowej do kwaśnego roztworu chitozanu. Sposób produkcji jest unikatowy, ponieważ uwzględnia takie stężenia poszczególnych komponentów (chitozanu i agarozu) oraz rozpuszczalników (kwasu octowego i zasady sodowej), które umożliwiają neutralizację kwaśnego roztworu chitozanu z jednoczesnym zachowaniem jednolitej mieszaniny bez znamion strącenia/żelowania chitozanu. Nowością jest również możliwość dodawania (immobilizowania metodą pułapkowania) na etapie produkcji związków bioaktywnych: antybiotyków, hormonów, witamin czy ekstraktów roślinnych.

Zaletą opracowanego według wynalazku sposobu wytwarzania bioaktywnego substytutu skóry jest otrzymanie biokompatybilnego biomateriału w formie cienkiego, elastycznego, chłonnego, hydrożelowego filmu, który charakteryzuje się biodegradowalnością oraz brakiem toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych. Ponadto powierzchnia materiału sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych. Biomateriał sprzyja również tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym włókien kolagenowych, co przyczynia się do przyspieszenia procesu odbudowy zranionej tkanki. Bioaktywny oraz biodegradowalny substytut skóry według wynalazku będzie zapewniał fizjologiczne zamknięcie rany chroniąc przed rozwojem infekcji, a dzięki zdolności zatrzymywania wysięku będzie utrzymywał wilgotne środowisko rany, stwarzając optymalne warunki dla procesu regeneracji.

Bioaktywny substytut skóry będący przedmiotem wynalazku, ze względu na swoje właściwości biologiczne będzie zapewniał odpowiednie warunki wspierające regenerację skóry. Opracowany biomateriał może znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako bioaktywny substytut skóry do pokrywania powierzchniowych ran lub jako funkcjonalny ekwiwalent skóry zasiedlany komórkami pacjenta w warunkach *in vitro*.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

#### Przykład I

Do 0,06 g chitozanu dodano 2 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,08 g agarozu dodano 2 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 15 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 75°C, po czym rozprowadzono w postaci cienkiej (1,5 mm) warstwy na powierzchni płaskiej polistyrenowej formy o powierzchni 20 cm<sup>2</sup> i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego hydrożelowego filmu, jest nietoksyczny, biodegradowalny a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

#### Przykład II

Do 0,02 g chitozanu dodano 1 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,04 g agarozy dodano 1 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 10 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 70°C. Mieszaninę ostudzono do temperatury 45°C, dodano 25 µl roztworu witaminy C (kwasu 3-o-etylo-L-askorbinowego) o stężeniu 24 mg/ml (końcowe stężenie w materiale 300 µg/ml) i 5 µl roztworu hydrokortyzonu o stężeniu 4 mg/ml (końcowe stężenie w materiale 10 µg/ml), po czym rozprowadzono w postaci cienkiej (1,5 mm) warstwy na powierzchni płaskiej polistyrenowej formy o powierzchni 10 cm<sup>2</sup> i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego hydrożelowego filmu, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny, biodegradowalny a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

#### Przykład III

Do 0,03 g chitozanu dodano 1 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,04 g agarozy dodano 1 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 10 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 75°C. Mieszaninę ostudzono do temperatury 50°C, dodano 3 mg witaminy E (końcowe stężenie w materiale 1,5 mg/ml) i 5 pl roztworu antybiotyku (wankomycyny, gentamycyny, daptomycyny lub tygecykliny) o stężeniu 4 mg/ml (końcowe stężenie w materiale 10 µg/ml), po czym rozprowadzono w postaci cienkiej (1,5 mm) warstwy na powierzchni płaskiej polistyrenowej formy o powierzchni 10 cm<sup>2</sup> i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego hydrożelowego filmu, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny, biodegradowalny a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

#### Przykład IV

Do 0,03 g chitozanu dodano 1 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,04 g agarozy dodano 1 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 10 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 80°C. Mieszaninę ostudzono do temperatury 55°C, dodano 30 mg kurkuminy (końcowe stężenie w materiale 15 mg/ml), po czym rozprowadzono w postaci cienkiej (1,5 mm) warstwy na powierzchni płaskiej polistyrenowej formy o powierzchni 10 cm<sup>2</sup> i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego hydrożelowego filmu, uwalnia związki bioaktywne, jest nietoksyczny, biodegradowalny a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Hydrożelowy substytut skóry na bazie chitozanu i agarozy, **znamienny tym**, że stanowi go chitozan rozpuszczony w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego oraz agarozę rozpuszczoną w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, a proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 2–4% korzystnie 3% (w/v) chitozanu w odniesieniu do kwasu octowego i 4% (w/v) agarozy w odniesieniu do zasady sodowej, przy czym komponenty są ze sobą zmieszane w stosunku 1:1 (v:v) zachowując stężenie 1–2% (w/v) chitozanu i 2% (w/v) agarozy w otrzymanym produkcie.
2. Hydrożelowy substytut według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera substancje bioaktywne takie jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkuminę, gdzie jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, zaś jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę.

3. Sposób wytwarzania hydrożelowego substytutu skóry na bazie chitozanu i agarozy, **znamienny tym**, że do 2–4% (w/v) roztworu chitozanu przygotowanego w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego dodaje się w stosunku 1:1 (v:v) 4% (w/v) zawiesinę agarozy przygotowaną w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, całość miesza się w temperaturze 70–90°C, korzystnie 75°C, przez 10–25 minut lub do całkowitego rozpuszczenia agarozy, a następnie otrzymaną mieszaninę rozprowadza się w postaci cienkiej i suszy.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że chitozan stosuje się w ilości 3% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że otrzymaną mieszaninę doprowadza się do temperatury 45–65°C i dodaje się związki bioaktywne, takie jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkuminę, przy czym jako witaminy stosuje się korzystnie witaminę C oraz witaminę E, zaś jako antybiotyki wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę.
6. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że związki bioaktywne stosuje się w następujących ilościach: witaminę C (kwas askorbinowy) w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i witaminę E w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i hydrokortyzon w ilości 1–20 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i kurkuminę w ilości 0,5–50 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i gentamycynę w ilości 1–20 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i wankomycynę w ilości 1–20 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i daptomycynę w ilości 0,5–10 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i tygecyklinę w ilości 0,5–10 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz.