

Hitosan in možna uporaba v medicini

Chitosan and its possible use in medicine

Andreja Erman

Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Lipičeva 2, SI-1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

doc. dr. Andreja Erman,
dipl. biol.
Inštitut za biologijo celice
Medicinska fakulteta
Univerze v Ljubljani
Lipičeva 2, SI-1000
Ljubljana
Tel: 01-543-7691

Ključne besede:

hitosan, bioadhezija,
ciljani vnos učinkovin,
dostavni sistem učinkovin

Key words:

chitosan, bioadhesion,
drug targeting, drug
delivery system

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2011;
80: 489-498

Prispelo: 12. maj 2010,
Sprejeto: 26. nov. 2010

Izvleček

Izhodišča: Iskanje novih farmacevtskih oblik zdravil, ki omogočajo ciljani vnos zdravilnih učinkovin v določena tkiva ali celice, je v velikem razmahu. Raziskave polimerov, med njimi tudi hitosana, so zaradi njihovih ugotovljenih fizikalnih in kemijskih lastnosti nakazale številne možnosti uporabe v farmaciji in tako tudi v medicini. Hitosan je naravni polimer, pridobljen z deacetilacijo hitina. Njegovi kationska narava in konformacija mu omogočata vezavo z anionskimi zdravilnimi učinkovinami in bioadhezijo, s tem pa tudi njihovo kontrolirano in ciljano dostavo.

Zaključki: Hitosan se je v študijah *in vitro* izkazal kot uspešen, varen in nestrupen dostavni sistem učinkovin, prve potrditve pa se pojavljajo tudi že v raziskavah *in vivo*. To nakazuje možnosti uporabe hitosana pri zdravljenju nekaterih perečih zdravstvenih problemov, kot so npr. ateroskleroza, alergije in razjede v prebavilih. Uspešna in varna uporaba hitosana pa se v prihodnosti kaže tudi na področju zdravljenja bakterijskih okužb, v tkivnem inženirstvu, imunoprofilaksi in v gen-skem zdravljenju.

Abstract

Background: Searching for new drug formulations, which enable drug targeting to specific tissues and cells, is in full swing. Various investigations of polymers including chitosan indicate a wide applicability in the pharmaceutical field and consequently also in medicine due to its established physicochemical properties. Chitosan is a natural polymer obtained by deacetylation of chitin. Cationic nature and conformation permit chitosan to react with anionic drugs and to be a promising bioadhesive material. All this gives chitosan a potential to be a controlled delivery system for drug targeting.

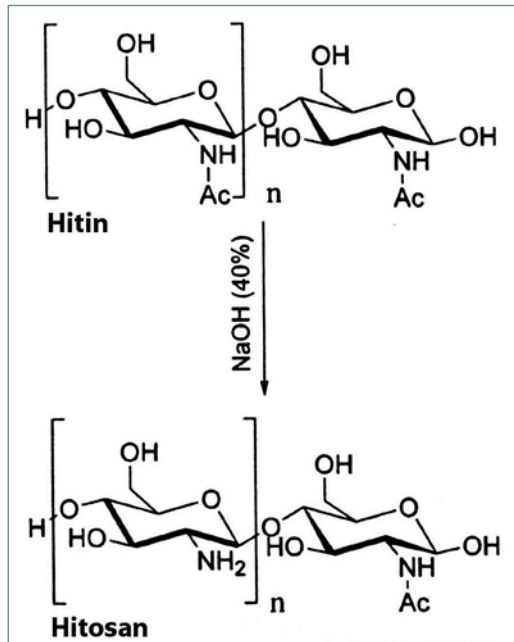
Conclusions: In *in vitro* investigations, chitosan has proved to be a successful, safe and non-toxic drug delivery system. These results are confirmed also by recent *in vivo* investigations. This implies that chitosan has wide possibilities in the treatment of some urgent medical problems, such as atherosclerosis, allergies and gastric ulcers. Its successful and safe applicability render chitosan potentially useful in the treatment of bacterial infections, in tissue engineering, immunoprophylaxis and in gene therapy.

Uvod

Hitosan je naravni kationski polisaharid in linearni polimer oz. poliamin, sestavljen iz glukozamina in N-acetil glukozamina. Nastane z delno deacetilacijo hitina (Slika 1), katerega glavni vir so celične stene nekaterih gliv ter zunanje ogrodje žuželk in rakov. Hitosan predstavlja vrsto polimerov, ki se med seboj razlikujejo v molekularni masi (50 kDa–200 kDa), stopnji deacetilacije (40–98 %) ter viskoznosti.^{1,2} Predvsem stopnja deacetilacije hitina določa hitosa-

nu osnovno fizikalno lastnost, tj. pozitiven naboj zaradi številnih protoniranih aminoskupin ($-NH_3^+$). Ta mu omogoča vezavo na anionske snovi in negativno nabite površine. Od stopnje deacetilacije je odvisna tudi njegova topnost. Hitosan je topen v kisljih raztopinah, slabo topen v organskih topilih, vodi in v alkalnem okolju, njegove soli (glutamat, klorid) pa so dobro topne v vodi. V kislem okolju se poveča stopnja protonacije njegovih aminoskupin, kar poveča topnost hitosana.^{3,4} Zaradi svoje velike molekularne mase in linearne nerazvejane zgradbe hito-

Slika 1: Kemijska zgradba hitina in hitosana.⁷



san omogoča povečanje viskoznosti snovi, ki so vezane nanj. Njegove verižne molekule so prožne, njihova konformacija je močno odvisna od ionske jakosti. Te lastnosti so nujne za t. i. mukoadhezijo, torej sposobnost pritrditve na sluz na površini sluznice.^{5,6} Hitosan proizvajajo v različnih oblikah, kot so mikro- in nanokroglice, mikro- in nanodelci, nanovlakna, hidrogeli, membrane, mreže in filmi nanometrskih debelin.

Delovanje hitosana

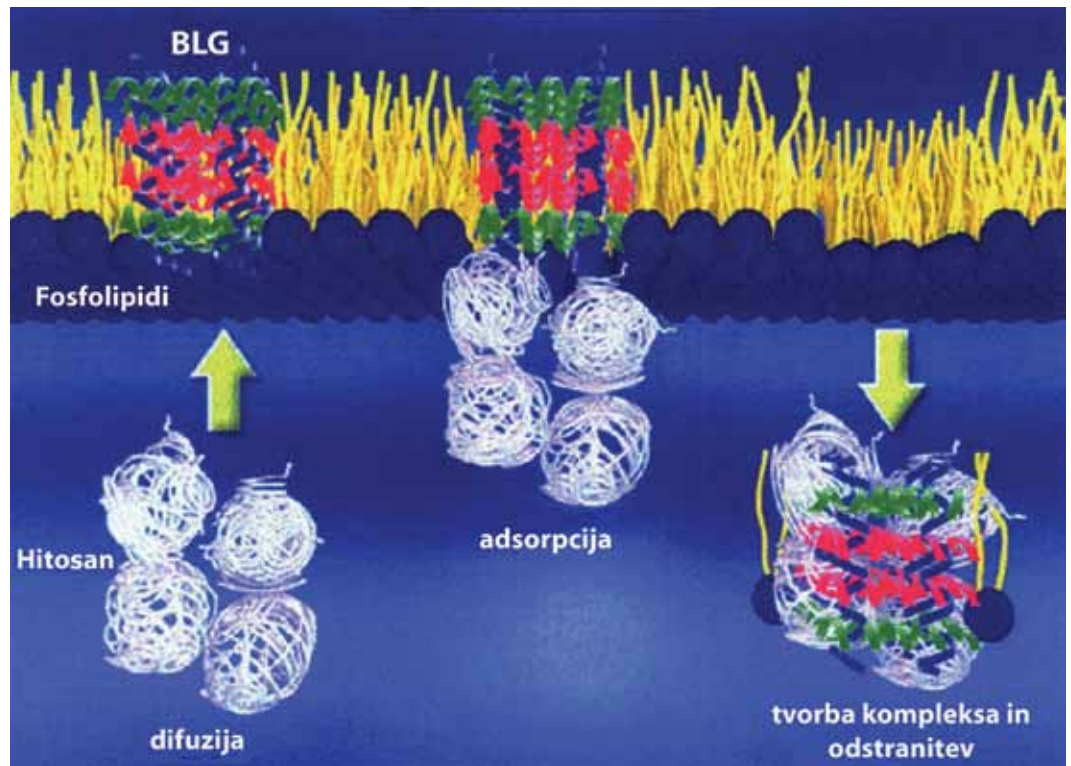
Hitosan je kompatibilen s številnimi zdravilnimi učinkovinami in organskimi spojinami, kot so površinsko aktivne snovi, škrob in amonijeve soli. Multivalentni anioni z lahkoto prehajajo skozi hitosan, povzročijo prečne povezave med molekulami hitosana in nastanek gela ali precipitata.⁸ Kationska narava hitosana omogoča tvorbo kompleksov z negativno nabitimi zdravilnimi učinkovinami, kar spremeni fizikalno-kemijske značilnosti zdravila. Vse to je razlog, da so se študije hitosana v aplikativne namene farmacije in tudi sama uporaba hitosana izredno razmahnili v zadnjih letih. Mukoadhezivni polimeri, kot je hitosan, so vzbudili pozornost raziskovalcev, saj so zaradi svojih lastnosti zelo primerni kot snovi za nadzorovano sproščanje in ciljano dostavljanje zdravilnih učinkovin. To jim omogoča močan stik z absorpcijsko površino in

s tem podaljšan čas zadrževanja na mestu absorpcije. Številni pozitivni naboji na površini hitosana tvorijo namreč močne elektrostatske vezi z negativnimi naboji sialične kisline v glikoproteinih in proteoglikanih, ki tvorijo sluz (mukus) na površini sluznic.⁹ Rezultati študij interakcij med hitosanom in umetnimi modeli biomembran so razkrili, da so elektrostatske sile z negativno nabitimi membranskimi fosfolipidi zelo pomembne za delovanje hitosana. Hitosan namreč s pomočjo vezave na alkilne verige fosfolipidov in negativno nabite fosfatne skupine prodre v plazmalemo, poveča red v fosfolipidni plasti, spremeni lokalno vrednost pH ter močno zmanjša elastičnost plazmaleme, vendar pa pri tem ne odstrani holesterola, kot je bila prvotna domneva.¹⁰

Polimeri, kot je hitosan, so znani kot »biološka lepila«, ker omogočajo učinkovini, s katero so vezani, močno vezavo na tarčno tkivo, vendar brez sprožitve vnetnega odgovora. Vezava kompleksa iz hitosana kot mukoadhezivnega polimera in zdravilne učinkovine na sluz poveča koncentracijo učinkovine na mestu delovanja. To omogoči, da je večina vnesene količine učinkovine na voljo na specifičnih tarčnih mestih za doseganje želenega terapevtskega učinka. Uporaba polimerov, kot je hitosan, je torej izredno pomembna in zaželena, saj bistveno poveča lokalno učinkovitost zdravila.

Hitosan poveča prepustnost sluznic v organizmu in s tem pospeši absorpcijo nanj vezanih učinkovin, kar je ena od njegovih glavnih odlik. Merilo za povečano prepustnost sluznice je padec t. i. transepitelne električne upornosti (TEER). Raziskave na modelnih enoslojnih epitelih *in vitro* so pokazale, da hitosan učinkovito zniža transepitelno električno upornost, ker povzroči premestitev proteinov tesnih stikov (ZO-1, okcludin) s plazmaleme v notranjost celic. Pri tem sproži v celicah tudi prerazporeditev citoskeleta zlasti F-aktina, ki je povezan s proteini tesnih stikov.¹¹⁻¹⁴ Dodatni vzrok za prekinitev tesnih stikov je zmožnost hitosana, da kot kationska makromolekula zamenja katione v tesnih stikih. Ugotovili so, da že majhne spremembe v relativnih koncentracijah specifičnih vrst ionov znotraj tesnega stika, ki je močno hidratiran in ki vsebuje

Slika 2: Model delovanja hitosana v primeru odstranitve β -laktoglobulina (BLG) iz fosfolipidnega sloja.³⁶



stalne negativne naboje, lahko zmanjšajo funkcionalnost tesnih stikov in tako povečajo njihovo prepustnost.¹⁵

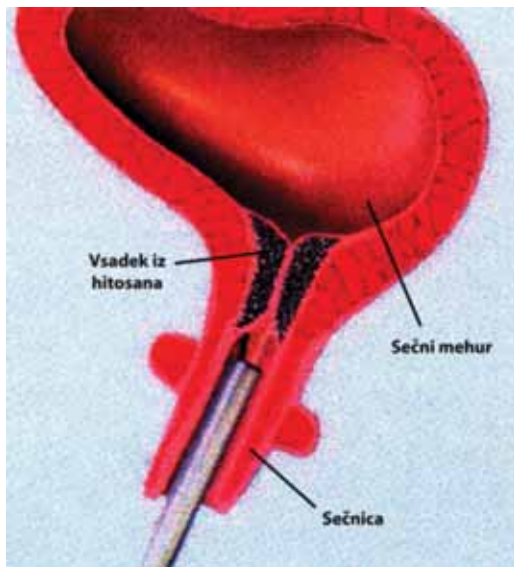
Večina študij s hitosanom potrjuje njegovo netoksičnost ali nizko toksičnost. Ta lastnost hitosana je odvisna od njegove molekulske mase, čistosti, stopnje deacetilacije, odmerka in načina uporabe. Znano je, da je peroralna toksičnost hitosana nizka, tako je za miši ugotovljena LD₅₀ (smrtni odmerek 50 %) večja od 16g/kg telesne mase.¹⁶ Obstajajo pa nekateri redki podatki o toksičnem delovanju hitosana v raziskavah *in vitro*, kjer je hitosan zmanjšal viabilnost celic.^{17,18} Neugodno delovanje hitosana na celice se je pokazalo tudi v študijah pospeševanja absorpcije skozi epitel sečnega mehurja. Hitosan namreč poveča prepustnost tega epitela tako, da povzroči luščenje njegovih površinskih celic in na ta način odstrani močno permeabilnostno pregrado med krvjo in urinom, ki je prisotna v normalnem sečnem mehurju.^{19,20} Verjetno je razlog prav v epitelu, za katerega je znano, da se tudi na različne fizikalne in kemijske dejavnike²¹ ter bakterijsko okužbo²² odzove z luščenjem. Do sedaj namreč ni podatkov o tovrstnem delovanju hitosana na ostale sluznice organizma.

Možnosti uporabe farmacevtskih pripravkov iz hitosana

Hitosan se je zaradi svoje stisljivosti izkazal kot uporabno sredstvo za izdelavo tablet za peroralno uporabo, vendar pa so le te preveč prhke, če so iz samega hitosana.²³ Dodatek nekaterih snovi, kot so npr. natrijev alginat, natrijeva karboksimetil celuloza (CMC) in kristalina mikroceluloza (MCC) izboljšajo zelene lastnosti tablet, ki so čim večja količina sproščene zdravilne učinkovine, čim večja adhezija ter čim manjše draženje sluznice. Tablete pripravljajo z direktnim stisnjenjem vseh sestavin, ki so nenevarne in brez dodanih škodljivih organskih topil. Postopek je enostaven, poceni in hiter. Vse to v prihodnosti nakazuje možnost izdelave in uporabe različnih farmacevtskih oblik s hitosanom, tako tablet za peroralno uporabo in tudi vaginalet ter svečk.^{24,25}

Miyazaki in sodelavci so že pred leti v svoji študiji ugotovili, da hitosan pomembno vpliva na podaljšano sproščanje indometacina (v vodi netopna učinkovina) iz granul hitosana.²⁶ Čas sproščanja učinkovine iz zmesi z dvakrat večjo vsebnostjo hitosana se je podaljšal za 3- do 4-krat v primerjavi s

Slika 3: Endoskopsko vbrizganje hitosanskega hidrogela pod sluznico sečnice, kjer bo nastal vsadek.



takrat običajno komercialno kapsulo, pri kateri so po zaužitju zaznali visok, a le kratkotrajen vrh koncentracije učinkovine v plazmi. Podoben vpliv hitosana je dokazala tudi skupina Sawayanagija in sodelavcev za zdravilo propranolol HCl, ki je topno v vodi.²⁷

Poskusi so pokazali na možnost uporabe hitosana kot sredstva za ciljni vnos zdravila v črevo, kar bi lahko povečalo učinkovitost nekaterih zdravil. Zdravljenje kolitisa pri podganah z neposrednim vnosom 5-amino salicilne kisline (5-ASA) v kapsulah s hitosanom v črevo se je dejansko izkazalo za bolj učinkovito v primerjavi z zdravljenjem z ostalimi standardnimi oblikami zdravil.²⁸

Številne študije hitosana so bile usmerjene tudi v iskanje možnosti uporabe hitosana za vnašanje proteinov ali proteinskih zdravil. Za bolnika je najbolj enostavno in udobno jemanje skozi usta, vendar pa je znano, da je absorpcija peptidnih učinkovin v prebavilih izredno slaba. Zelo spodbudni so bili zato rezultati raziskave *in vivo* Lueßna in sodelavcev s peptidnim zdravilom buserelinom.²⁹ Pri podganah so z 1,5-odstotnim (w/v) hitosanom-HCl za petdesetkrat povečali biološko uporabnost (delež zdravilne učinkovine, ki pride v sistemski krvni obtok in je na voljo na mestu delovanja) buserelina, vnešenega neposredno v dvanajstnik, v primerjavi s kontrolnimi živalmi, ki so dobivale le buserelin. Tudi rezultati številnih kasnejših raziskav so dokazali, da hitosan poveča absorpcijo peptidov v sluznico z razklenitvijo tesnih stikov.^{30,31} Hitosan se je

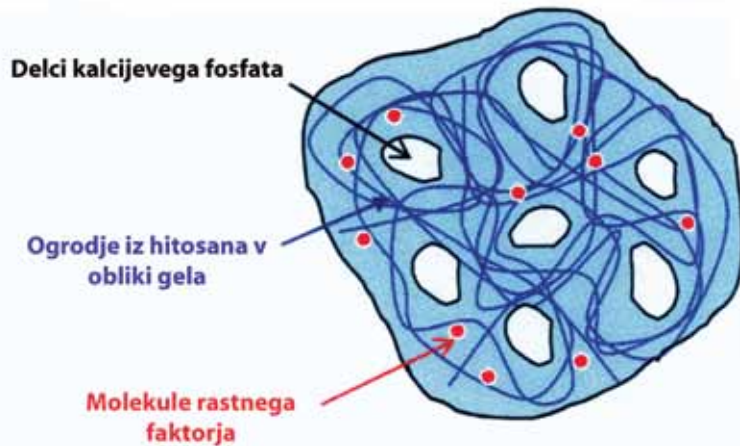
izkazal tudi kot sredstvo za povečanje obsega absorpcije peptidnih zdravil skozi nosno sluznico, ki je sicer slabo prepustna za peptide. Tako se je na primer hitosan v obliki gela izkazal kot učinkovito sredstvo za vnos inzulina skozi nosno sluznico, kar so potrdile tudi raziskave *in vivo*.³²

Možnosti uporabe hitosana v medicini

Hitosan je biokompatibilen, bioadheziven, biorazgradljiv in nizko toksičen polimer, ki je zaradi teh svojih lastnosti obetavno sredstvo za povečevanje permeabilnosti sluznic ter biološke uporabnosti vanj vgrajenih učinkovin.^{33,34} Vse to omogoča številne možnosti uporabe hitosana tudi v medicini.

Najnovejše študije Pavinatta in sodelavcev dokazujejo, da je za delovanje hitosana poleg njegovih funkcionalnih amino skupin ključnega pomena tudi njegova specifična konformacija, ki je odvisna od ionske jakosti raztopine.³⁵ Oboje skupaj omogoča hitosanu še dodatno delovanje, in sicer odstranjevanje proteinov iz modelne membrane, kar so že dokazali za npr. β -laktoglobulin.³⁶ Ta protein je eden od močnih alergenov, ki ga najdemo v kravjem mleku. Če bi ga s hitosanom odstranili, bi lahko znatno zmanjšali alergenost kravjega mleka, kar v prihodnosti nakazuje pomembne možnosti za odstranjevanje tudi drugih alergenov in s tem pomoč pri zaščiti ljudi pred alergijami (Slika 2).

Rezultati številnih raziskav na živalih in ljudeh so potrdili, da hitosan po peroralnem vnosu v telo v črevesu veže nase maščobe, poveča njihovo izločanje z blatom iz organizma ter tako zmanjša absorpcijo maščob v kri. Hitosan naj bi tako kljub uživanju s holesterolom bogate hrane bistveno zmanjšal dvig količine holesterola v serumu poskusnih živali.^{37,38} Te spodbudne ugotovitve so zato napeljele znanstvenike, da raziščejo možnost uporabe hitosana za preprečevanje nastanka aterosklerotičnih plakov. Raziskave Omroda in sodelavcev na miših so potrdile, da hitosan zavira razvoj ateroskleroze pri živalih s hiperholesterolemijo.³⁹ Primerjava hitosana z drugimi snovmi, ki se uporabljajo za zniževanje ravni holesterola v krvi in s tem za zdravljenje hiperholesterolemi-



Slika 4: Glavne sestavine kostnega nadomestka na osnovi hitosana.

je, kot je npr. holestiramin, je pokazala, da ima hitosan podoben učinek na zniževanje maščob kot holestiramin.⁴⁰ Vendar pa je histološka preiskava črevesa po zdravljenju s holestiraminom pokazala znatno zдебelitev sluznice debelega črevesa, medtem ko v primeru jemanja hitosana raziskovalci niso opazili škodljivih vplivov na črevesno sluznico. V nasprotju s temi raziskavami pa so nekatere študije pokazale, da jemanje hitosana brez hkratne dietne prehrane z zmanjšano vsebnostjo maščob ne povzroči znižanja telesne mase niti ne vpliva na fekalno izločanje maščob^{41,42} oz. da ima lahko dolgotrajno uživanje hitosana celo negativne posledice za zdravje ljudi. Hitosan lahko namreč v črevesju poleg maščob veže nase tudi v maščobah topne vitamine in minerale, kar lahko vpliva na njihovo absorpcijo v telesu in posledično pomanjkanje, npr. vitamina E. Poleg tega lahko hitosan vpliva tudi na metabolizem kalcija, ker pospeši njegovo izločanje z urinom. Dolgotrajna uporaba hitosana kot prehranskega dodatka lahko celo poruši normalno črevesno floro in omogoči razrast odpornih patogenih bakterij. Vse te ugotovitve kažejo na dejstvo, da je potrebna določena previdnost pri dolgotrajnem jemanju visokih odmerkov hitosana.⁴³

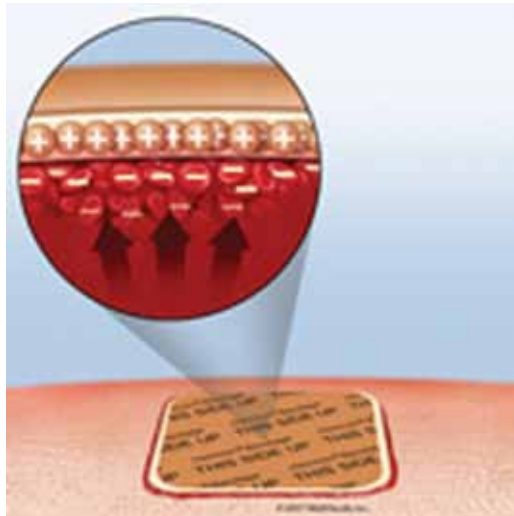
Hitosan se je pokazal tudi kot potencialno pomožno sredstvo pri zdravljenju ledvične odpovedi. V raziskavi na 40 bolnikih z odpovedjo ledvic in hemodializnim zdravljenjem ter jemanjem hitosana (1350 mg dvakrat dnevno) so opazili znatno znižanje ravni sečnine in kreatinina v serumu bolnikov.⁴⁴

Hitosan je zmanjšal razjede v želodčni sluznici albino podgan, sprožene z nesteroidnimi, protivnetnimi snovmi kot sta npr. oksifenbutazon in glafenin. V kislem okolju želodca se je hitosan raztopil, nabrekli in s tem deloval blažilno in zaščitno na želodčno sluznico ter tako zmanjšal ulcerogeno delovanje obeh učinkovin.^{45,46} Edinstvena sposobnost nabrekanja in tvorbe gela v kislem okolju nakazuje učinkovito uporabo hitosana pri zaščiti sluznice prebavil kot tudi pri nadzorovanem in podaljšanem sproščanju zdravnih učinkovin v prebavnih. Hitosan je šibka baza z vrednostjo približno 6,5, zato je netopen v nevtralnem in bazičnem okolju, kot je debelo črevo ali kolon, kjer je pri normalnem človeku vrednost pH med 6,4 in 7,5. Za preprečitev te ovire in za pospešitev absorpcije v teh delih organizma zato preizkušajo različne derivate hitosana, zlasti N-trimetil hitosan, katerega topnost je učinkovito povečana s trimetilizacijo aminoskupin hitosana.^{47,48} Tako se lahko kemijsko modificirani hitosan uporabi za dostavo zdravnih učinkovin v številne dele človeškega telesa z različnimi lokalnimi vrednostmi pH.

Hitosan v obliki hidrogela preizkušajo tudi pri zdravljenju inkontinence, ki je posledica stresa in prizadene številne ženske ter tudi nekatere moške, zlasti po prostatektomiji. To motnjo odvajanja urina bi se lahko rešilo s pomočjo vbrizganja hitosanskega hidrogela pod sluznico sečnice, kjer bi se zaradi precipitacije tvoril mehanski vsadek, ki bi bil primerno elastičen (Slika 3). V ta namen so preizkusili gel iz hitosana, ki omogoča vbrizganje in hiter nastanek vsadka *in situ*. Prvi rezultati študije na prašičih so zelo spodbudni, saj je histološki pregled devet mesecev po endoskopskem vbrizganju pokazal, da so se vsadki zelo dobro vključili v tkivo brez poškodb sluznice in brez vnetnega odziva.^{49,50}

Veliko število raziskav je usmerjenih v proučevanje uporabe hitosana tudi v tkivnem inženirstvu, zlasti za izdelavo zobnih in kostnih nadomestkov ter za tridimenzionalna porozna ogrodja za zdravljenje poškodb in hitrejšo obnovo kostnega tkiva na mestu poškodbe dolgih kosti. Vgraditev nanodelcev hidroksiapatita ali kalcijevega fosfata v ogrodje hitosana izboljša mehanske lastnosti

Slika 5: Shematski prikaz delovanja obliža iz hitosana. V okroglem polju je povečani izsek, ki prikazuje pozitivne naboje hitosana in nanj vezane negativno nabite eritrocite.



nadomestkov, vsaditev živih celic (osteoblastov ali zarodnih celic) pa pospeši celjenje in obnovo kostnega tkiva. Hitosan tako po eni strani nudi mehansko oporo nadomestkom ali poškodovanemu delu tkiva. Obenem pa lahko služi tudi kot dostavni sistem za različne učinkovine, kot so npr. rastni dejavniki (Slika 4). Z vezavo v hitosanski hidrogel namreč preprečimo prehitro difuzijo iz nadomestka in mesta vbrizganja, ohranimo pa njihovo bioaktivnost, kar je nujno za pospešeno rast in obnovo kostnega tkiva.^{51,52}

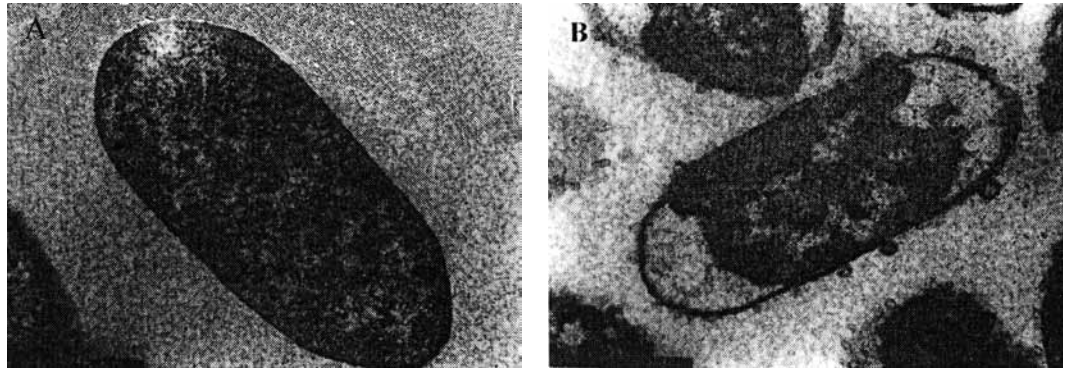
V vedno več študijah ugotavljajo tudi možnost uporabe hitosana za zdravljenje rakavih bolezni. Strokovnjaki skušajo povečati ciljano uničevanje rakavih celic ter se izogniti visokim odmerkom zdravil, ki so sicer učinkovita, vendar povzročajo številne neželene učinke. Rezultati raziskav *in vitro* so zelo spodbudni. Učinkovine, vgrajene v hitosansko ogrodje, imajo namreč po eni strani veliko sposobnost vezave na hitosan, po drugi strani pa se iz tega polimera sproščajo v okolico počasi in s tem podaljšajo čas zadrževanja in delovanja učinkovine v primerjavi z nevezano učinkovino.⁵³ Obenem pa v laboratorijih že preizkušajo nove možnosti ciljanega uničevanja rakavih celic s pomočjo vezave specifičnih molekul na nanodelce hitosana z učinkovino, kar omogoči vezavo na ustrezne specifične receptorje, prekomerno izražene na površini rakavih celic. Skupina Sahuja in sodelavcev je tako med prvimi izvedla raziskavo, v kateri so na površino nanodelcev iz hitosana, ki so obdajali v vodi netopno učinkovino paklitaksel, kovalentno

vezali folno kislino (FA). Na ta način so dosegli ciljano vezavo hitosanskih nanodelcev kot nosilcev učinkovine na folatne receptorje na površini rakavih celic.⁵⁴

Učinkovito delovanje hitosana so zasledili tudi pri zdravljenju kožnih ran. Okamoto in sodelavci so s hitosanom in hitinom zdravili odprte rane pri psih ter pri njih ugotovili bistveno hitrejšo celjenje kot pri kontrolnih živalih.⁵⁵ Prav tako znanstveniki v poskusih *in vitro* in *in vivo* proučujejo uporabo hitosanskih hidrogelov za pospešeno celjenje kožnih opeklin.⁵⁶ V novejšem času se na trgu že pojavljajo obliži z oblogo iz hitosana (Slika 5), ki izkoriščajo že dokazano antibakterijsko delovanje kot tudi pozitiven naboj hitosana, ki privlači negativno nabite eritrocite. To zelo hitro zatesni rano, ustavi krvavitev in pospeši celjenje.

Razumevanje genskih osnov in molekularnih mehanizmov bolezni omogoča možnost zdravljenja z vplivanjem na DNA oz. določene gene. V zadnjih letih so ugotovili, da se kationski polimeri lahko povežejo z DNA v komplekse in tako služijo kot nevirusni vektorji za prenos terapevtskih genov. Ta preprosta metoda samopovezovanja polimera in DNA *in vitro* v t. i. poliplekse nanometrskih velikosti bi lahko v prihodnosti nudila številne možnosti pri zdravljenju nekaterih bolezni. Dosedanje raziskave kažejo na uspešno peroralno uporabo nanodelcev hitosan-DNA v imunoprofilaksi oz. pri zmanjševanju anafilaktičnega odgovora poskusnih živali na antigene arašidov. Roy in sodelavci so s pomočjo hitosana vnesli v črevesne celice plazmide z genom *Arah2*, ki kodira glavni alergen arašidov. Kljub peroralnemu dajanju je bila DNA v kompleksu s hitosanom zaščitena pred razgradnjo, v celicah pa hitosan ni oviral prepisovanja v alergene proteine. Ti so povzročili imunizacijo živali, pri katerih je po ponovnem stiku z alergenom arašidov nastopil znatno manjši preobčutljivostni oz. alergijski odziv, izražen v manjši prepustnosti žil ter v nižji ravni IgE in histamina v plazmi kot pri neimuniziranih živalih ali pri živalih, zdravljenih z »golo« DNA. Rezultati te raziskave dokazujejo, da je imunizacija s peroralnim vnosom nanokompleksov hitosan-DNA učinkovita pri zmanjševanju anafilaktičnega odgovora

Slika 6: Slika TEM bakterije *E.coli* na kontrolnem gojišču (A) in 4 ure po vezavi hitosana (B) (4000-kratna povečava).⁵⁹



glodalcev.⁵⁷ S tem pa se nakazujejo možnosti uporabe te metode pri preprečevanju oz. zdravljenju alergij na hrano pri ljudeh.

Eden najpomembnejših ugotovljenih in dokazanih učinkov hitosana je njegovo protibakterijsko in protiglivično delovanje. Tako so dokazali učinkovitost hitosana pri povzročiteljih *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* in *Klebsiella pneumoniae*.⁷ Mehanizem delovanja hitosana na mikroorganizme najverjetneje sloni na povezavah med kationskimi skupinami hitosana in anioni na bakterijski steni, ki spremenijo prepustnost bakterijske stene, povzročijo poškodbe membrane in osmotsko neravnovesje celice, kar posledično vodi v izhajanje celične vsebine in smrt⁵⁸ (Slika 6).

Skupina Chunga in sodelavcev je ugotovila, da je delovanje hitosana v neposredni povezavi z gostoto negativnega naboja na celični steni bakterij. Več ko je negativnih ionov na površini bakterij, večja je stopnja vezave hitosana. Ker je na po Gramu pozitivnih bakterijah njihova gostota bistveno manjša kot na po Gramu negativnih bakterijah, se na slednje veže več hitosana. To razloži dejstvo, da so po Gramu negativne bakterije bolj občutljive na hitosan kot po Gramu pozitivne bakterije.⁵⁹ Rezultati laboratorijskih študij so že pokazali zelo obetavne možnosti uporabe hitosana kot zaščitnega sredstva pred pritrjanjem bakterije *Streptococcus mutans* na zobe⁶⁰ ali kot učinkovitega sredstva proti patogenemu povzročitelju *Escherichia coli* (*E.coli*).⁵⁸ Tako je bilo ugotovljeno, da zaščita pred bakterijami v ustni votlini in z njimi povezano zobno gnilobo ni samo rezultat bakteriocidnega delovanja hitosana, saj pospešuje tudi obnovo mehkih obzobnih tkiv, kjer se

rade nabirajo bakterije, ter preprečuje škodljiv vpliv organskih kislin, zaradi katerih je zobna sklenina bolj občutljiva za delovanje bakterij. Vse to nakazuje smotrno uporabo hitosana v zobnih pastah, ustnih vodah in žvečilnih gumijih, kar bi zmanjšalo poselitev zob z bakterijami in s tem nastanek zobne gnilobe. Zaradi že dokazanega bakteriocidnega delovanja hitosana *in vitro* na *E.coli* pa bi bilo smiselno preizkusiti uporabo hitosana tudi *in vivo* z namenom odstranitve uropatogene *E.coli* iz sečnega mehurja, ki je zlasti pri ženskah najpogostejši povzročitelj vnetja sečnega mehurja. Protibakterijsko delovanje hitosana skušajo znanstveniki še povečati z vezavo različnih kovinskih ionov, na primer srebra, ki je že dolgo znano po svojem bakteriocidnem delovanju.^{61,62,63} Tovrstni derivati hitosana imajo izreden potencial za zdravljenje kroničnega cistitisa, še zlasti v primeru odpornosti na antibiotike. Možni metodi odstranjevanja *E.coli* iz sečnega mehurja s pomočjo hitosana bi lahko bili intravezikalno vbrizganje hitosana ob hkratnem peroralnem jemanju antibiotika ali pa intravezikalno vbrizganje hitosana, na katerega je vezan antibiotik. Prednosti teh metod bi bile po eni strani, da hitosan veže nase bakterije, ki se nahajajo v svetlini mehurja in na površini epitela, po drugi strani pa hitosan dokazano povzroča luščenje epitelnih celic, ki lahko vsebujejo velike količine znotrajceličnih parazitskih bakterij.^{19,64} Na ta način bi torej iz mehurja lahko odstranili tudi tiste bakterije, ki so znotraj evkariontskih celic zaščitene pred delovanjem antibiotikov. Odstranitev epitelnih celic sečnega mehurja tudi v večjem obsegu ni sporna, saj ima ta epitel izredno regenerativno sposobnost in se obnovi že v nekaj urah ali celo prej, odvisno od obsega poškodbe.⁶⁴

Zaključek

Hitin, ki je po količini drugi najbolj zastopani polisaharid v naravi, je slabo topen, zato ima prednost njegov deacetilirani derivat hitosan. Zaradi svojih strukturnih in kemijskih lastnosti velja hitosan za biokompatibilni, bioadhezivni in biorazgradljivi polimer, ki bi ga lahko uporabili na mnogih področjih biomedicine. S svojim dokazanim antimikrobnim delovanjem se je njegova uporabnost in pomembnost v zadnjih letih še povečala. Večina dokazov njegovega delovanja je sicer še vedno na ravni bazičnih raziskav. Vendar pa številne študije na živalih potrjujejo njegovo učinkovito in varno uporabo tudi *in vivo* ter tako že spodbujajo klinično preizkušanje zdravil s hitosanom za uporabo pri ljudeh.

Literatura

1. Bodek KH. Potentiometric method for determination of the degree of acetylation of chitosan. In: Karnicki ZS, Pajak AW, Breziski MM, Bylowsky PJ, eds. Chitin world. Bremerhaven: Wirtschaftsverlag; 1994. p.456–61.
2. Illum R. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 1998; 15: 1326–31.
3. Knapczyk J, Krowczynski L, Krzek J, Brzeski M, Nurnberg E, Schenk D, et al. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sanford P, eds. Chitin and chitosan-Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. London: Elsevier; 1989. p.757–64.
4. Sanford PA. Chitosan nad aliginat: new forms of commercial interest. *Am Chem Soc Div Polym Chem* 1990; 31: 628.
5. Peppas NA, Bury PA. Surface interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J Control Rel* 1985; 2: 257–75.
6. Robinson JR, Mlynek GM. Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery. *Adv Drug Del Rev* 1995; 16: 45–50.
7. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1457–65.
8. Skaugrud O. Chitosan-New biopolymer for cosmetics and drugs. *Drug Cosmetic Ind* 1991; 148: 24–9.
9. Lueßen HL, Lehr CM, Rentel CO, Noach ABJ, de Boer AG, Verhoef JC, et al. Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. *J Control Rel* 1994; 29: 329–38.
10. Pavinatto FJ, Pacholatti CP, Montanha EA, Caseli L, Silva HS, Miranda PB, et al. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Langmuir* 2009; 25: 10051–61.
11. Ranaldi G, Marigliano I, Vespignani I, Perozzi G, Sambuy Y. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. *Nutr Biochem* 2002; 13: 157–67.
12. Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm Res* 2004; 21: 43–9.
13. Artursson P, Lindmark T, Davis SS, Illum L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1994; 11: 1358–61.
14. Vllasaliu D, Exposito-Harris R, Heras A, Casettari L, Garnett M, Illum L, Stolnik S. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. *Int J Pharm* 2010; 400: 184–93.
15. Madara J. Loosening tight junctions. *J Clin Invest* 1989; 83: 1089–94.
16. Arai K, Kinumaki T, Fujita T. Toxicity of chitosan. *Bull Tokai Reg Fish Lab* 1968; 43: 89–94.
17. Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res* 2004; 21: 344–53.

18. Florea BI, Thanou M, Junginger HE, Borchard G. Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation. *J Control Release* 2006; 110: 353–61.
19. Kos Kerec M, Bogataj M, Veranič P, Mrhar A. Permeability of pig urinary bladder wall: Time and Concentration dependent effect of chitosan. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1685–91.
20. Kos Kerec M, Bogataj M, Mrhar A. Heparin decreases permeability of pig urinary bladder wall preliminary enhanced by chitosan. *Drug Dev Ind Pharm* 2008; 34: 215–20.
21. Jezernik K, Medalia O, Aronson M. A comparative study of the desquamation of urothelial cells during gestation and in adults mice following moderate stress or endotoxin treatment. *Cell Biol Int* 1995; 19: 887–93.
22. Mulvey M, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1998; 282: 1494–97.
23. Knapczyk J. Excipient ability of chitosan for direct tableting. *Int J Pharm* 1993; 89: 1–7.
24. Miyazaki S, Nakayama A, Oda M, Takada M, Atwood D. Chitosan and sodium alginate based bioadhesive tablets for intraoral drug delivery. *Biol Pharm Bull* 1994; 17: 745–7.
25. El-Kamel A, Sokar M, Naggat V, Al Gamal S. Chitosan and sodium alginate-based bioadhesive vaginal tablets. *AAPS Pharm SCI* 2002; 4: 1–7.
26. Miyazaki S, Yamaguchi H, Yokouchi C, Takada M, Hou WM. Sustained-release and intragastric-floating granules of indomethacin using chitosan in rabbits. *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 1623–5.
27. Sawayanagi Y, Nambu N, Nagai T. Use of chitosan for sustained-release preparations of water-soluble drugs. *Chem Pharm Bull* 1982a; 30: 4464–7.
28. Tozaki H, Fujita T, Odoriba T, Terabe A, Okabe S, Muranishi S, et al. Validation of a pharmacokinetic model of colon-specific drug delivery and the therapeutic effects of chitosan capsules containing 5-aminosalicylic acid on 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *J Pharm Pharmacol* 1999a; 51: 1107–12.
29. Lueßen HL, de Leeuw BJ, Langemeyer MWE, de Boer AG, Verhoef JC, Juninger HE. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug busserelin in vivo. *Pharm Res* 1996; 13: 1668–72.
30. Lueßen HL, Rentel CO, Kotze AF, Lehr CM, de Boer AG, Verhoef JC, et al. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. IV. Polycarbophil and chitosan are potent enhancers of peptide transport across intestinal mucosae in vitro. *J Control Rel* 1997; 45: 15–23.
31. Bernkop-Schnurch A, Krajicek ME. Mucoadhesive polymers as platforms for peroral peptide delivery and absorption: Synthesis and evaluation of different chitosan-EDTA conjugates. *J Control Rel* 1998; 50: 215–23.
32. Varshosaz J, Sadrai H, Heidari A. Nasal delivery of insulin using bioadhesive chitosan gels. *Drug Delivery* 2006; 13: 31–8.
33. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 1047–67.
34. Kerec Kos M. Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm Vestn* 2006; 57: 287–91.
35. Pavinatto A, Pavinatto FJ, Barros-Timmons A. Electrostatic interactions are not sufficient to account for chitosan bioactivity. *ACS Appl Mater Interfaces* 2010; 27: 246–51.
36. Caseli L, Pavinatto FJ, Nobre TM, Zaniquelli MED, Viitala T, Oliveira ON Jr. Chitosan as a removing agent of β -lactoglobulin from membrane models. *Langmuir* 2008; 24: 4150–6.
37. Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume M, Ohtakara A. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids* 1988; 23: 187–91.
38. Gallaher CM, Munion J, Hesslink R Jr, Wise J, Gallaher DD. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr* 2000; 130: 2753–59.
39. Ormrod DJ, Holmes CC, Miller TE. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 138: 329–34.
40. Jennings CD, Boleyn K, Bridges SR, Wood PJ, Anderson JW. A comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan, and oat gum in rats. *Proc Soc Exp Biol* 1988; 189: 13–20.
41. Pittler MH, Abbot NC, Harkness EF, Ernst E. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 379–81.
42. Guerciolini R, Radu-Radulescu L, Boldrin M, Dallas J, Moore R. Comparative evaluation of fecal fat excretion induced by orlistat and chitosan. *Obes Res* 2001; 9: 364–7.
43. Koide SS. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr Res* 1998; 18: 1091–101.
44. Jing SB, Li L, Ji D, Takiguchi Y, Yamaguchi T. Effect of chitosan on renal functions in patients with chronic renal failure. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 721–3.
45. Meshali MM, el-Dien EZ, Omar SA, Luzzi LA. A new approach to encapsulating nonsteroidal anti-inflammatory drugs. IV. Effect of cellulose derivatives with different functional groups on the bioavailability and gastric ulcerogenic activity of acidic as well as basic nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Microencap* 1989; 6: 355–60.
46. Acikgoz M, Kas HS, Hascelik Z, Milli U, Hincal AA. Chitosan microspheres of diclofenac sodium. II. In vitro and in vivo evaluation. *Pharmazie* 1995; 50: 275–7.
47. Kotze AF, Thanou MM, Luessen HL, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Effect of the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Eur J Pharm Biopharm* 1999; 47: 269–74.
48. Kotze AF, Luessen HL, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci* 1998; 7: 145–51.

49. Jordan O, Doelker E, Defabiani N, Caviezel A, Ise-lin C. Novel injectable urethral bulking agents for the treatment of urinary incontinence. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 519–22.
50. Patois E, Osorio-da Cruz S, Tille JC, Walpoth B, Gurny R, Jordan O. Novel thermosensitive chito-san hydrogels: in vivo evaluation. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91: 324–30.
51. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2010; 47: 1–4.
52. Weir MD, Xu HH. Osteoblastic induction on calcium phosphate cement-chitosan constructs for bone tissue engineering. *Biomed Mater Res A* 2010; 94: 223–333.
53. Arias JL, Lopez-Viota M, Gallardo V, Ruiz MA. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug Dev Ind Pharm* 2010; 36: 744–50.
54. Sahu SK, Maiti S, Maiti TK, Ghosh SK, Pramanik P. Hydrofobically modified carboxymethyl chito-san nanoparticles targeted delivery of paclitaxel. *J Drug Target* 2011; 19: 104–13.
55. Okamoto Y, Shibazaki K, Minami S, Matsuhashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. Evaluation of chitin and chitosan in open wound healing in dogs. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 851–4.
56. Sezer AD, Hatipoğlu F, Cevher E, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS Pharm Sci Tech* 2007; 8: E1–8.
57. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 1999; 5: 387–91.
58. Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1999; 62: 239–43.
59. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HI, Wu JCG, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 932–6.
60. Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzman CA, Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chito-sans. *J Dent Res* 1997; 76: 665–72.
61. Sanpui P, Murugadoss A, Prasad PVD, Ghosh SS, Chattopadhyay A. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *Int J Food Microbiol* 2008; 124: 142–6.
62. Banerjee M, Mallick S, Paul A, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of a three component iodinated chitosan-silver nanoparticle composite. *Langmuir* 2010; 26: 5901–8.
63. Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydr Res* 2009; 344: 2375–82.
64. Veranič P, Erman A, Kerec-Kos M, Bogataj M, Mr-har A, Jezernik K. Rapid differentiation of superficial cells after chitosan-induced desquamation. *Histochem Cell Biol* 2009; 131: 129–39.