

Zofia MODRZEJEWSKA

e-mail: zmodrzej@wipos.p.lodz.pl

Katedra Systemów Inżynierii Środowiska, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka

Formy chitozanowe do zastosowań w inżynierii biomedycznej

Wstęp

Chitozan jest polimerem pochodzenia naturalnego, który budzi duże nadzieje na zastosowanie w inżynierii biomedycznej. Jest to pochodna chityny. Chityna (N-acetylo D-glukozaamina) jest po celulozie najbardziej rozpowszechnionym polimerem w przyrodzie. Z uwagi jednak na trudną rozpuszczalność zastosowanie jej jest ograniczone. W związku z tym chitynę przeprowadza w formę o lepszej rozpuszczalności. Najczęściej prowadzi się proces hydrolizy grup acetyloaminowych otrzymując polimer zwany chitozanem, z którego roztworów możliwe jest formowanie różnych struktur (membrany, mikrogranulki, gąbki, itp.).

Korzystne właściwości chitozanu to: zdolność tworzenia związków chelatowych, nietoksyczność, biogodność z organizmem ludzkim, biodegradowalność, zdolność tworzenia żeli.

Znane jest również jego terapeutyczne działanie: jako polikation łącząc się z kwasem żółciowym obniża poziom cholesterolu frakcji LDL, a także na tej samej zasadzie najprawdopodobniej obniża poziom lipidów. Stosowany jest jako substancja wspomagająca odchudzanie.

Według jednych autorów chitozan regulując gospodarkę kwasowo-zasadową wykazuje własności przeciwnowotworowe, według innych hamuje nadmiernie pobudzoną glikolizę w komórkach nowotworowych poprzez zahamowanie produkcji mleczanu i obniżenie poziomu ATP oraz zmniejsza elastyczność komórek nowotworowych.

Chitozan wykorzystywany jest przede wszystkim jako materiał opatrunkowy. Powoduje zwiększenie napływu do miejsca zakażenia komórek fagocytujących (granulocyty segmentowane i makrofagi) i stymulację migracji i proliferacji komórek naczyń śródbłonna i fibroblastów. Wpływ chitozanu na proliferację fibroblastów zależy od stopnia deacetylacji i masy cząsteczkowej. Formy o wyższym stopniu deacetylacji i niższej masie cząsteczkowej bardziej stymulowały proliferację fibroblastów.

Wykazano, że działa statycznie, a nawet bójczo na komórki bakterii oraz grzybów drożdżoidalnych. Dodatkowo naładowane grupy aminowe w cząsteczce chitozanu mogą powodować łączenie chitozanu ze ścianą komórkową bakterii, co powoduje destrukcję membrany i niszczenie komórki (mechanizm taki proponuje się dla chitozanu o wysokiej masie cząsteczkowej), bądź po adsorpcji chitozanu na ścianie komórkowej bakterii następuje wniknięcie chitozanu do wnętrza żywej komórki, które powoduje zahamowanie działania różnych enzymów i oddziaływanie na syntezę mRNA oraz protein.

Duże nadzieje budzi zastosowanie chitozanu w inżynierii tkankowej. Szeroko badany jest pod kątem wykorzystania w rekonstrukcji kości i tkanki chrzęstnej [1–4].

Kierunki badań własnych

Prace własne nad wykorzystaniem chitozanu w inżynierii biomedycznej prowadzono dla hydrożelowych membran, granulek, hydrożeli formujących się w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego.

Membrany chitozanowe

Opatrunki

Hydrożelowe membrany chitozanowe otrzymywane metodą inwersji faz bądź w reakcji z fosforanami (trifosforanem sodu) mogą być potencjalnymi materiałami opatrunkowymi. Charakteryzują się stosunkowo dużą wytrzymałością mechaniczną. Siła zrywająca wynosi od 0,2 do 2 N/mm². Zawierają w strukturze wodę o różnym charakterze; swobodną wypełniającą pory oraz częściowo lub całkowicie związaną z polime-

rem. Są nietoksyczne. Wykazują własności bakteriostatyczne. Można otrzymywać układy hybrydowe o wysokich właściwościach antybakteryjnych np. z gentamycyną [5–9].

Nośniki leków

Hydrożelowe membrany mogą również stanowić nośnik do kontrolowanego uwalniania środków farmakologicznych. Przeprowadzono badania z wprowadzoną w strukturę hydrożelu gentamycyną oraz ampicyliną. Antybiotyki wprowadzono na drodze sorpcji (*post loading*) oraz w trakcie formowania – dodając do roztworu membranotwórczego (*in situ*). Wytwarzanie tą metodą wymaga przede wszystkim doboru środka koagulującego, tak aby nie dezaktywował antybiotyku oraz minimalizować jego desorpcję do medium koagulującego. W przypadku gentamycyny wykorzystano 75% roztwory C₂H₅OH zawierające NaOH oraz wodne roztwory Na₂CO₃. Antybiotyki wprowadzone drogą sorpcji są uwalniane z charakterystycznym „wybuchem”, co niestety jest zjawiskiem raczej niekorzystnym i dąży się do jego eliminacji, lecz może mieć pozytywne znaczenie np. przy opatrunkach silnie zainfekowanych. Najkorzystniejsze profile wskazujące na spowolniony proces uwalniania gentamycyny uzyskano dla membrany wytworzonej z mrówczanu chitozanu i koagulowanej w Na₂CO₃ – proces można opisać równaniem dyfuzji Ficka [10–15].

Separacja składników krwi

Membrany chitozanowe stanowić mogą również materiał do separacji białek osocza [5, 16]. Granica odcięcia dla membran płaskich oznaczona na podstawie separacji dekstanu wynosi około 30 kDa. Potwierdziły to próby separacji składników osocza krwi przeprowadzone dla membran kapilarnych, co przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Separacja składników krwi na membranach kapilarnych

	H	M	K	B	A	I	Ch
n	21,63	30,79	1,57	7,5	4,12	3,97	47,78
p	2,62	30,29	1,09	0,59	0,29	0,07	0

H – Hemoglobina, M – Mocznik, K – Kreatynina, B – Białko ogółem, A – Albumina, I – Immunoglobulina, Ch – Cholesterol, n – nadawa, p – permeat.

Membrany enzymatyczne – biosynteza kwasu asparaginowego

Możliwe jest wytworzenie chitozanowych membran z immobilizowanymi komórkami *Escherichia coli*, które posiadają aktywność w zakresie biosyntezy kwasu L-asparaginowego.

Czynnikiem żelującym, który nie powoduje inaktywacji enzymu w czasie formowania membrany jest *orto*-fosforan sodu. Stężenie kwasu asparaginowego w permeacie jest tego samego rzędu co stężenie kwasu asparaginowego produkowanego przez enzym natywny [17].

Granulki chitozanowe

Proces LDL-aferezy

Chitozan wykazuje również selektywną sorpcję w stosunku do cholesterolu. Korzystne własności otrzymano dla hydrożelowego złoża chitozanowego zawierającego jony Mg(II), gdzie spadek aterio-gennej frakcji LDL wynosił około 25%, a poziom HDL pozostawał niezmienny oraz po degradacji chitozanu wywołanej promieniowaniem γ – po obniżeniu masy cząsteczkowej polimeru do 120 kD – adsorpcja wynosiła 12%. Istotne jest również źródło pochodzenia chitozanu – chitozan z grzybów charakteryzuje się wyższą adsorpcją LDL-u – 17% [18].

Immobilizacja enzymów

Hydrożelowe granulki chitozanowe są dobrym nośnikiem w procesie immobilizacji lipaz. Lipaza *M.circinelloides* immobilizowana w ich strukturze wykazuje aktywność hydrolityczną i syntetyczną. Reakcja syntezy oleinianu butylu w środowisku eteru naftowego przebiega z wysoką sprawnością prowadząc do 90% estryfikacji kwasu oleinowego. Granulki wykazują dobre parametry mechaniczne, a pory matrycy chitozanowej nie ulegają zasklepieniu podczas inkubacji w apolarnych rozpuszczalnikach organicznych [19, 20].

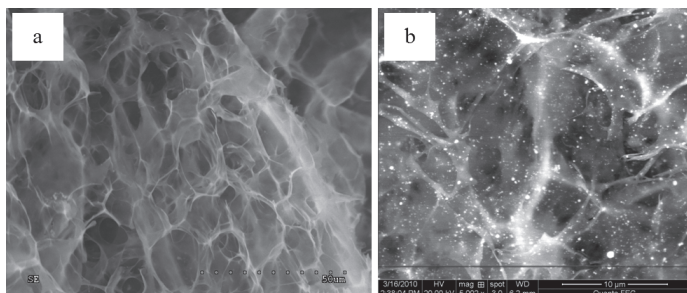
Termowrażliwe żele chitozanowe

Nośniki leków

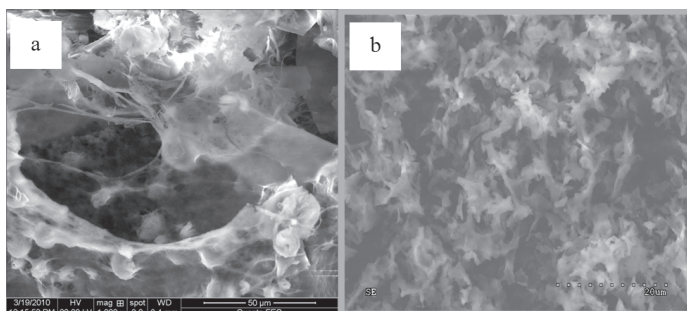
Termowrażliwe hydrożele chitozanowe stanowią nośnik nowej generacji, który zakwalifikowany może być do systemu *acid-triggered systems*, czyli uwalniające substancje czynną pod wpływem bodźców zewnętrznych ($pH < 6$). Wytwarzano się je z roztworów soli chitozanowych (chlorku, glutaminianu chitozanu) przy użyciu β -glicerofosforanu. Taka forma nośnika pozwala na wprowadzenie go w postaci iniekcji w trudnodostępne miejsca.

Opracowano układy zawierające albuminę i wankomycynę i nanosrebro. Opisano kinetykę uwalniania albuminy i wankomycyny modelem potęgowym Peppasa i modelem dyfuzyjnym.

Zaproponowano również własny model, który zakłada, że proces uwalniania środka farmakologicznego zawartego w strukturze hydrożelu kontrolowany jest przez proces dyfuzji i desorpcji składnika znajdującego się na powierzchni ciała stałego, procesy te przebiegają szeregowo-równolegle. Złożony proces uwalniania jest opisany dwoma stałymi parametrami fizykochemicznymi (współczynnikiem dyfuzji oraz stałą kinetyczną). W przypadku albuminy parametry te wynoszą: $D_{AB} = 2,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, $k = 1,02 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$ [21, 26].



Rys. 1. a) Struktura termozelu pod mikroskopem skaningowym, b) Termozel zawierający nanosrebro



Rys. 2. a) Struktura termozelu pod mikroskopem skaningowym, b) Termozel zawierający wapń i fosfor Ca/P = 1

Scaffoldy

Termowrażliwe żele chitozanowe mogą być interesującym materiałem na *scaffoldy*. Po suszeniu liofilizacyjnym żele te wykazują interesującą strukturę. Charakteryzują się wysoką porowatością (makropory – kilkadziesiąt μm) oraz są stosunkowo elastyczne. Z uwagi na obecność fosforanu możliwe jest wprowadzenie do struktury wapnia i uzyskanie układów chitozan-hydroksyapatyt [27].

Wnioski

Płaskie hydrożelowe membrany chitozanowe stanowić mogą interesujący materiał na opatrunki. Membrany kapilarne z chitozanu służą do separacji składników krwi.

Możliwa jest sorpcja cholesterolu frakcji LDL na hydrożelowych granulkach.

Hydrożele chitozanowe (membrany i granulki) z unieruchomionym enzymem służą jako bioreaktory.

Hydrożele chitozanowe w postaci membran oraz żele formujące się w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego stanowią mogą nośniki leków o przedłużonym działaniu.

Żele formujące się w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego mogą zawierać w strukturze środki wspomagające hodowlę komórkowe (Ca, P) czy nanosrebro i być wykorzystane jako *scaffoldy*, bądź struktury o własnościach antybakteryjnych.

LITERATURA

- [1] E. Wylon, Z. Modrzejewska, E. Andrzejewska, R. Zarzycki: Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives edited by H. Struszczyk, V IX, 205-216, 2003.
- [2] J. K. Francis Suh, W. T. Howard, J. K. Matthew: Biomaterials **21**, 2589 (2000).
- [3] Z. Modrzejewska: New Aspects in Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives, Łódź 2001.
- [4] G. M. Luz, J. F. Mano: Composites Sci. Techn. **70** 1777 (2010).
- [5] Z. Modrzejewska, I. Korus, P. Owczarz: J. Membrane Sci. **181**, 229 (2001).
- [6] Z. Modrzejewska: Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives – w druku 2011.
- [7] Z. Modrzejewska, W. Maniukiewicz: Advances in Chitin Science, Poznań 253 (2005).
- [8] E. Wylon, Z. Modrzejewska, P. Owczarz, R. Zarzycki: Engineering of Biomaterials /Inżynieria Biomateriałów 129 (2004).
- [9] Z. Modrzejewska, D. Paluch: Engineering of Biomaterials /Inżynieria Biomateriałów, w druku 2011.
- [10] Z. Modrzejewska, R. Zarzycki, G. Rogacki: Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk **22**, 341 (2004).
- [11] Z. Modrzejewska, W. Maniukiewicz: Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk (2006).
- [12] Z. Modrzejewska, H. Stobińska: Engineering of Biomaterials/Inżynieria Biomateriałów, 167 (2005).
- [13] Z. Modrzejewska, H. Stobińska, E. Wylon: Advances in Chitin Science, Poznań 258 (2005).
- [14] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska, E. Wylon: X Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives – edited by H. Struszczyk, 2004.
- [15] Z. Modrzejewska, G. Rogacki, R. Zarzycki: Inż. Chem. Proces. **25**, 1321 (2004).
- [16] Z. Modrzejewska, W. Eckstein: Biomaterials, **73**, 61 (2004).
- [17] Z. Modrzejewska, A. Chmiel, B. Sobierajski, D. Platak, W. Kamiński: Biotechnologia **3**, 121 (1998).
- [18] Z. Modrzejewska, R. Zarzycki, J. Hartwich, A. Dembińska-Kieć, J. Wojciechowska: Inż. Ap. Chem. **41**, nr 3, 106 (2002).
- [19] T. Antczak, M. Szczęsna-Antczak, M. Rzyska, Z. Modrzejewska, J. Patura, H. Kalinowska, S. Bielecki: J. Molecular Catalysis B: Enzymatic **29**, 163 (2004).
- [20] T. Antczak, M. Szczęsna-Antczak, S. Bielecki, Z. Modrzejewska, J. Patura: Patent nr 204826 (2010).
- [21] Z. Modrzejewska, P. Owczarz: Inż. Ap. Chem. **45**, nr 6s, 157 (2006).
- [22] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska, A. Wojtasz-Pająk: Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives **13**, 35 (2008).
- [23] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska: Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, **47**, 77 (2008).
- [24] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska, P. Owczarz: XIII Konferencja Naukowo-Techniczna: Budowa i Eksploatacja Maszyn Przemysłu Spożywczego – BEMS, Olsztyn 2008.
- [25] Z. Modrzejewska, K. Nawrotek R. Zarzycki: Polymers – w druku (2011).
- [26] Z. Modrzejewska, R. Zarzycki, G. Rogacki, K. Nawrotek: Ind. Eng. Chem. Res. **50**, 5866 (2011).
- [27] Z. Modrzejewska, R. Zarzycki, J. Sielski: Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives **15**, 63 (2010).
- [28] Z. Modrzejewska, A. Skwarczyńska, R. Zarzycki, J. Sielski: Inż. Ap. Chem. **49**, nr 4, 54 (2010).