Biomaterijali u inženjerstvu tkiva temeljeni na kitozanu-literaturni pregled

Beus, Nediljko

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:630008

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nediljko Beus

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nediljko Beus

Biomaterijali u inženjerstvu tkiva temeljeni na kitozanu- literaturni pregled

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof.dr.sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

dr.sc. Sebastijan Orlić

izv. prof. dr.sc. Vanja Kosar

Zagreb, rujan 2015.

Zahvala

Mentoru prof.dr.sc. Hrvoju Ivankoviću zahvaljujem na stručnom vodstvu i savjetima za izradu završnog rada. .

Zahvaljujem se obitelji na pruženoj podršci, te prijateljima koji su mi olakšali studiranje.

SAŽETAK

Kitozan je linaearan, semikristalični polisaharid sastavljen od jedinica N-acetil D-glukozamina i D-glukozamina. Može se lako dobiti djelomičnom deacetilacijom prirodnog polimera hitina. Zahvaljujući amino skupinama D-glukozamina, kitozan je moguće protonirati, čime postaje polikation, što je jedan od uzroka jedinstvenim svojstvima kitozana kao biopolimera, kao što su topljivost u vodi, antibakterijska svojstva, biorazgradnja bez toksičnih otpada i biokompatibilnost. Kitozan je jedini poznati pozitivno nabijeni polisaharid. Zahvaljujući svojoj strukturi i kemijskom sastavu, kitozan može stvarati 3-D predloške, u obliku hidorgelova i spužvi, koji mogu zamjeniti oštećeno tkivo ili organ, te omogućavaju spajanje sa okolnim stanicama tkiva i proliferaciju.

Razvijena su tri tipa hidrogela reverzibilnim i ireverzibilnim geliranjem. Kitozan može biti fizički vezan, koordiniran sa metalnim ionima ili nepovratno/kemijski povezan sa hidrogelom.

Spužve od kitozana se koriste kao materijal za lječenje rana, jer mogu upiti izlučevine rana, te tako pomažu zacjeljenju. Ove spužve se proizvode liofilizacijom, jednostavnim učikovitim procesom smrzavanja otopine kitozana nakon čega sljedi isparavanje otapala pri sniženom tlaku.

U slučajevima kad nije pogodno koristiti 3-D predložak korise se 2-D predlošci: tanki filmovi i porozne membrane od nanovlakana.

Razvijene su dvije metode dizajniranja višeslojnih filmova kitozana: Langmuir-Blodget, u kojoj se čvrsta potpora uranja u vodu prekrivenu slojem polimera, i depozicija sloj po sloj, temeljena na izmjenjenoj adsorpciji nabijenog materijala ili nosioca funkcionalnih grupa u vodenom mediju.

Za proizvodnju nanovlakana iz kitozana koristi se metoda „elektrospininga“, u kojoj se otopina polimera injektira na ploču kroz sloj električnog polja visoke voltaže, pod čijim se utjecajem formiraju vlakna.

Ključne riječi: kitozan, hitin, biomaterijali, hidrogel, spužve, tanki slojevi, nanovlakna

ABSTRACT

Chitosan is linear, semi-crystalline polysaccharide composed of N-acetyl D-glucosamine and D-glucosamine units. It can be easily derived from partial deacetylation of natural polymer chitin. Thanks to the amino groups of D-glucosamine, chitosan can be protonated and turned into polycation, which is one of sources of unique properties of chitosan as biopolymer, like aqueous solubility, antibacterial properties, biodegradability with non-toxic residues and biocompatibility. Chitosan is only known positively charged polysaccharide.

Thanks to the strucure and chemical components, chitosan can form 3-D scaffolds, in form of hydrogels and sponges, which can replace damadged tissue or organ, and allows interaction with surrounding tissue cells and proliferation.

Three types of hydrogels have been developed, presenting either reversilbe or irreversible gelation. Chitosan can be physically associated, coordinated with metal ions or irreversibly/ chemically cross- linked into hydrogels.

Chitosan sponges are used as wound healing materials, as they can soak up the wound exudated, while helping the tissue regeneration. These sponges are mainly obtained by lyophilization, a simple efficient process consisting in freezing a solution of chitosan followed by sublimation of solvent under reduced pressure.

In some cases when it is not suitable to use 3-D scaffolds, 2-D scaffolds are used: thin films and porous nanofiber membranes.

Two methods to design chitosan thin films are developed: Langmuir-Blodgett, in which a solid support is immersed in aqueous phase covered in polymer monolayer, and the layer-by-layer deposition technique, based on the lternated adsorption of materials bearing charged or functional groups in aquous medium.

For chitosan nanofiber production elecrospinning method is used, in which polymer solution in injected onto a plate through high-voltage electric field, which formes fibers.

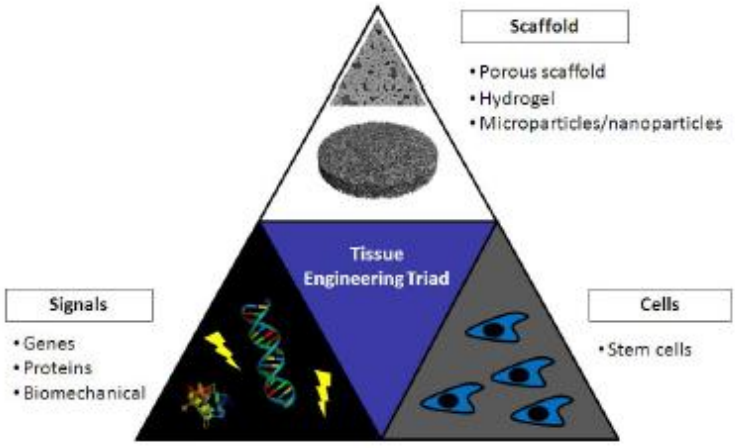
Key words: chitosan, chitin, biomaterials, hydrogel, sponges, thin films, nanofibers

SADRŽAJ

1. Uvod 1
2. Kitozan 3
2.1.Odnos strukture i svojstava 4
2.2.Svojstva kitozana kao biomaterijala 5
3. 3-D Predlošci na bazi kitozana 7
3.1.Hidrogel kitozana 7
3.1.1.Hidrogel sa fizički vezanim kitozanom 8
3.1.2.Kitozan vezan s koordinacijskim kompleksima 10
3.1.3.Hidrogel sa kemijski vezanim kitozanom 10
3.2.Spužve na bazi kitozana 11
4. 2-D predlošci na bazi kitozana za oblaganje rana 13
4.1.Filmovi na bazi kitozana 133
4.2.Porozne membrane od nanovlakana 15
5. Zaključak 18
6. Literatura 19
7. Životopis 21

1. Uvod

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje u kojem se kombiniraju polja stanične i genske terapije sa znanosti i inženjerstvom materijala, a s ciljem obnavljanja, zamjene ili poboljšanja funkcije tkiva. Istraživanja na području inženjerstva tkiva se svode na kombinaciju tri temeljna čimbenika, tkz. „triada“ inženjerstva tkiva: stanice, predlošci i signali. Predložak daje 3D potporu strukturi koja oponaša prirodnu ekstrastaničnu matricu za rast i širenje stanica. Signali mogu biti fizikalni, u obliku bioreaktora ili biokemijski, koji obuhvaćaju dodavanje faktora rasta, gene ili RNAi. Svrha signala je poboljšanje obnove stanica, privlačenje engogenske stanice na mjesto *in vivo* i podrška vaskularizaciji i integraciji predloška s domaćinskim tkivom.



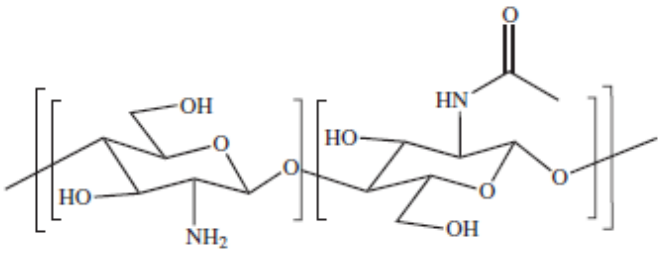
Slika 1. Shematski prikaz triade inženjerstva tkiva[1]

Idealni predložak dopušta spajanje stanica, proliferaciju, diferencijaciju i depoziciju ekstrastanične matrice. Mora dopustiti neovaskularizaciju tako da kisik s nutrientima može doprijeti u sve dijelove predloška i olakšati uklanjane toksina odnosno produkata razgradnje. Ugrađeni predložak bi trebao aktivirati unutarnje mehanizme obnavljanja i trebao bi se razgraditi proporcionalno s brzinom rasta novog tkiva bez proizvodnje toksičnih nusproizvoda. Predlošci se obično rade od prirodnih ili sintetskih polimera,

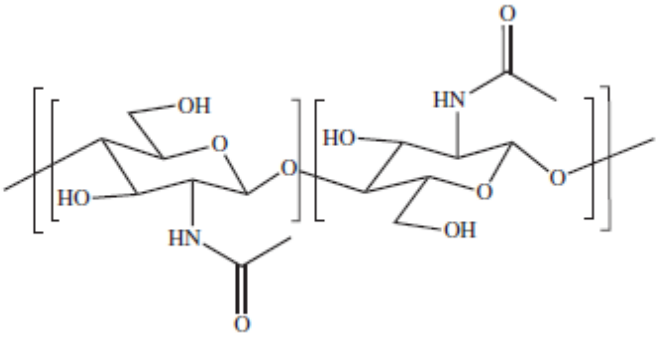
keramike ili njihovih kompozita. Glavna ograničenja prirodnih polimera su slaba mehanička svojstva i nepredvidiva brzina razgradnje. Nasuprot tomu, sintetski polimeri mogu biti dizajnirani tako da se razgrađuju kontroliranom brzinom i pokazuju mehaničku stabilnost sličnu kostima, međutim, mogu izazvati imunološku reakciju budući su nusprodukti raspada kiselog karaktera što može dovesti do upalnih procesa u organizmu.[1]

2. Kitozan

Kitozan je linaearan, semikristalični polisaharid sastavljen od jedinica 2-acetamido-2-deoksi-β-D-glukana (N-acetil D-glukozamin) i 2-amino-2-deoksi-β-D-glukana (D-glukozamin). Struktura polimera je prikazana na slici 2. Kao takav, kitozan nije raširen u prirodi, ali se može lako dobiti djelomičnom deacetilacijom prirodnog polimera hitina (slika 3)[2]. Hitin je polisaharid sastavljen od 2-acetamido-2-deoksi-β-D-glukoze. Najčešće se nalazi u egzoskeletonu rakova, škampi i jastoga. Hitin je kemijski inertan i nije topiv u vodi i organskim otapalima.[3] U industriji su dva glavna izvora hitina: rakovi i gljivične micele.[2]



Slika 2.Kemijska struktura kitozana[2]



Slika 3. Kemijska struktura hitina[2]

Stupanj deacetilacije (DD – deacetylation degree) kitozana, koji indicira broj amino skupina u lancu, se računa kao omjer D-glkozamina prema sumi D-glukozamina i N-acetil D-glukozamina. Da bi se nazvao „kitozan“, deacetilirani hitin treba sadržavati barem 60 % ostataka D-glukozamina (što odgovara stupnju deacetilacije od 60%).[7,8] Deacetilacija hitina se provodi kemijskom hidrolizom uz izrazito alkalne uvjete ili se provodi enzimskom hidrolizom u prisutnosti određenih enzima.[2]

Tokom proizvodnje kitozana teško je predvidjeti njegove karakterisitke. Zato današnji pristup u proizvodnji kitozana preferira analizu sadržaja i svojstava konačnog produkta, umjesto ciljanog pretpostavljanja karakterisitika produkta preddefiniranjem parametara procesa proizvodnje. Kako kitozan potječe iz prirodnog polimera, on može biti kontaminiran organskim i anorganskim nečistoćama, i može ima široku polidisperznost, zbog čega se često karakterizira prema viskoznosti, a ne prema raspodjeli molarnih masa. Kitozan je slabo topljiv, izuzev kiselih medija, što analizu čini teško izvodivom. [2,3,4]

2.1. Odnos strukture i svojstava

Prisutnost amino skupina u strukturi kitozana (slika 2.) razlikuje kitozan od hitina, i daje ovom polimeru jedinstvena svojstva. Amino skupine D-glukozamina omogućavaju topljivost u kiselim vodenim otopinama. Topivost je ovisna o pH otopine (pH <6), što omogućava široku primjenu.[9] Nasuprot tomu, praktična primjena hitina je ograničena zbog izrazito slabe topljivosti.[2]

Zahvaljujući amino skupinama, kitozan tvori razne vrste kompleksa s metalnim ionima, i često se koristi za tretiranje otpadnih voda.[2]

Kitozan s protoniranim amino skupinama postaje polikation koji može tvoriti ionske komplekse sa širokim rasponom prirodnih i sintetskih anionskih vrsta, kao što su lipidi, proteini, DNA, kao i s nekim negativno nabijenim sintetskim polimerima poput poli(akrilne kiseline).[8] Kitozan je jedini poznati pozitivno nabijeni polisaharid koji se javlja u prirodi. Kao polielektrolit, kitozan se može koristiti za pripravu višeslojnih filmova, koristeći tehniku depozicije sloj po sloj.[10]

Amino i alkoholne skupine na lanacu kitozana omogućuju ovom polisaharidu da tvori stabilne kovalentne veze s drugim vrstama. Eterifikacija i esterifikacija se mogu odvijati na alkoholnim skupinama, dok amino skupine D-glukozamina mogu reagirati s aldehidima.

Kitozan pokazuje i druga intrinzična svojstva, kao što su antibakterijska, antifugalna i hemostaska svojstva, biorazgradivost uz stvaranje ne-toksičnog otpada, kao i biokompatibilnost, što ga čini izvrsnim kandidatom za biomedicinsku primjenu.[2,3,4]

2.2. Svojstva kitozana kao biomaterijala

Kao što je prije spomenuto, kitozan posjeduje izvrsna svojstva koja ga svrstavaju u jedinstveni materijal za biomedicinsku primjenu.[2]

Prisutnost amino skupina D-glukozamina koje se mogu protonirati objašnjavaju većinu svojstava kitozana. Hemostatska aktvnost kitozana je povezana sa prisutnošću pozitivnog naboja na lancu kitozana. Kako su membrane krvnih stanica negativno nabijene, dolazi do interakcije sa pozitivno nabijenim kitozanom.[2]

Antimikrobialna svojstva kitozana su posljedica dvaju mogućih mehanizama. U prvom mehanizmu pozitivno nabijeni kitozan djeluje na negativno nabijene skupine na površini stanica i mijenja permeabilnost. To sprječava ulazak ključnih materijala u stanicu i uzrokuje curenje temeljnih otopljenih tvari iz stanice. Drugi mehanizam uključuje vezanje kitozana na DNA stanice, što vodi do inhibicije sinteze mikrobialne RNA.[11]

Polikationska struktura kitozana objašnjava njegova analgetska svojstva. Amino skupine se mogu protonirati u prisustvu protonskih iona koji se oslobađaju u upaljenom području, što rezultira analgetskim efektom.[2]

Da bi se objasnila biorazgradivost kitozana, treba imati na umu da kitozan nije samo polimer sa amino skupinama, nego i polisaharid, koji sadrži raskidive glukozne veze. Kitozan se može razgraditi *in vivo* djelovanjem nekoliko proteaza, i uglavnom lizozimima.[12] Biorazgradnja kitozana vodi do formiranja netoksičnih oligosaharida različitih duljina. Oligosaharidi mogu biti uključeni u meabolizam ili se mogu dalje

izlučivati. Brzina degradacije kitozana je uglavnom povezana stupnjem deacetilacije, ali također i raspodjelom produkta N-acetil D-glukozamina i molekulskom masom kitozana.[13]

Veza između biorazgradivosti kitozana i stupnja deacetilacije ogleda se preko njegove kristaličnosti. Kitozan je semikristaličan polimer; kristalnost je maksimalna (100%) za stupanj deacetilacije 0%. Kristaličnost je obrnuto proporcionalna kinetici biorazgradnje, međutim kada stupanj deacetilacije padne ispod 60%, njegova kristaličnost se počinje smanjivati, što rezultira povećanjem brzine biorazgradnje. Raspodjela acetilnih produkata, uz kitozan, također djeluje na kristaličnost, te time i na biorazgradnju. Može se pretpostaviti da se kraći lanci kitozana brže razgrađuju u oligosaharide nego kitozan s većom molekulskom masom.[2]

Ako se uzmu u obzir sva navedena svojstva, ne izneneđuje to što se kitozan primjenuje u biomedicini i farmaciji, kao implatatni materijal za kosti i umjetnu kožu.[2]

Kompatibilnost kitozana s fiziološkim medijem ovisi o metodi priprave (otpadni proteini mogu uzrokovati alergijske reakcije) i o stupnju deacetilacije. Biokompatibilnost raste s rastom stupnja deacetilacije. S povećanjem pozitivnog naboja na kitozanu raste i interakcija kitozana sa stanicama, što rezultira većom biokompatibilnošću.[14]

Neke kemijske modifikacije na strukturi kitozana mogu inducirati toksičnost.[1,2]

3. 3-D Predlošci na bazi kitozana

Prilikom proizvodnje predložaka za implantaciju, posebna pozornost se treba obratiti na kompatibilnost, mehanička svojstva, morfologiju predložaka i poroznost, kao i na zacjeljenje i kapacitet zamjene tkiva. Glavni zahtjevi na predloške u inženjerstvu tkiva su da predložak ne bi smio inducirati akutnu ili kroničnu reakciju. Trebao bi biti biorazgradiv tako da zdravo novo tkivo može zamjeniti biomaterijal, te da posjeduje površinska svojstva koja omogućavaju interakciju sa stanicama, njihovu difeencijaciju i proliferaciju. Također je nužno ima pogodna mehanička svojstva koja odgovaraju oštećenom tkivu, i konačno mora biti omogućena proizvodnja u raznim oblicima.[2,5]

Zbog navedenih svojstava kitozana, on je pogodan za proizvodnju takvih biomaterijala, koji bi mogli zamjeniti oštećeno tkivo ili organ, i omogućiti spajanje sa stanicama i proliferaciju, ukoliko se može proizvesti 3-D predložak. Razvijene su razne metode za oblikovanje hidrogelova kitozana u pjene (ili spužve) kao 3-D predlošci prigodni za inženjerstvo tkiva.[2-5]

3.1. Hidrogel kitozana

Gel se sastoji od čvrste faze, koja čini manje od 10% ukupnog volumena gela, i tekuće faze. U hidrogelu, tekuća faza je voda. Čvrsta faza osigurava konzistentnost gela i omogućava mu da upije/adsorbira velike količine vode, a da pritom ostaje netopljiv u tekućoj fazi. Hidrogel je zanimljiv biomaterijal jer veliki udio vode ga čini kompatibilnim s većinom živih tkiva. Mekani su i savitljivi, što minimalizira štetu na tkivu koje ga okružuje tijekom i nakon implantecije u pacijenta. Mehanička svojstva hidrogela imitiraju svojstva mekanih tkiva, što omogućuje gelu funkcionalne i morfološke karakteristike tkiva koje mijenja. Zbog svega toga se hidroglel koristi kao biomedicinski predložak za zamjenu tkiva, ali i za dostavu lijekova i faktora rasta.[2,15]

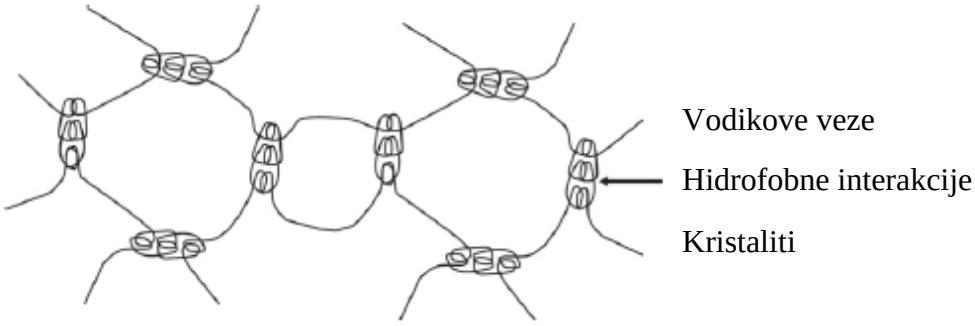
Razvijena su tri tipa hidrogela temeljena na reverzibilnom i ireverzibilnom geliranju. Kitozan može biti fizički vezan, koordiniran sa metalnim ionima ili nepovratno/kemijski povezan sa hidrogelom.[12]

3.1.1. Hidrogel s fizički vezanim kitozanom

Formacija „fizičkih“ hidrogelova je temeljena na povratnim interakcijama koje se odvijaju između lanaca polimera. Te interakcije nisu kovalentne prirode, već su to elektrostatske ili hidrofobne interakcije ili vodikove veze.[2,16]

Te interakcije mogu ovisiti o raznim parametrima kao što su pH, koncetracija, temperatura..., što ih čini nestabilnim, te pokazuju povratno geliranje. Bubrenje hidrogelova se može ugoditi prilagođavanjem prirode i količine svake komponenete, kako bi se povećao ili smanjio broj interakcija. Pravilo je da manje interakcija vodi mekšem gelu, dok će veći broj interakcija dati „tvrđi“ i napetiji gel.[16]

Kitozan može sam stvoriti gel, bez upotrebe aditiva. Proces se temelji na neutralizaciji amino skupina kitozana što inhibira odbojne sile između lanaca polimera. Formiranje gela se odvija preko vodikovih veza kao što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz hidrogela kitozana, bez aditiva

Nadalje, hidrogelovi kitozana se mogu formirati miješanjem kitozana s drugim ne-ioniziranim polimerima koji su topivi u vodi, kao što je poli (vinil alkohol) (PVA). Termo osjetljivi hidrogelovi kitozana se mogu dobiti mješanjem kitozana sa solima poliola, kao što

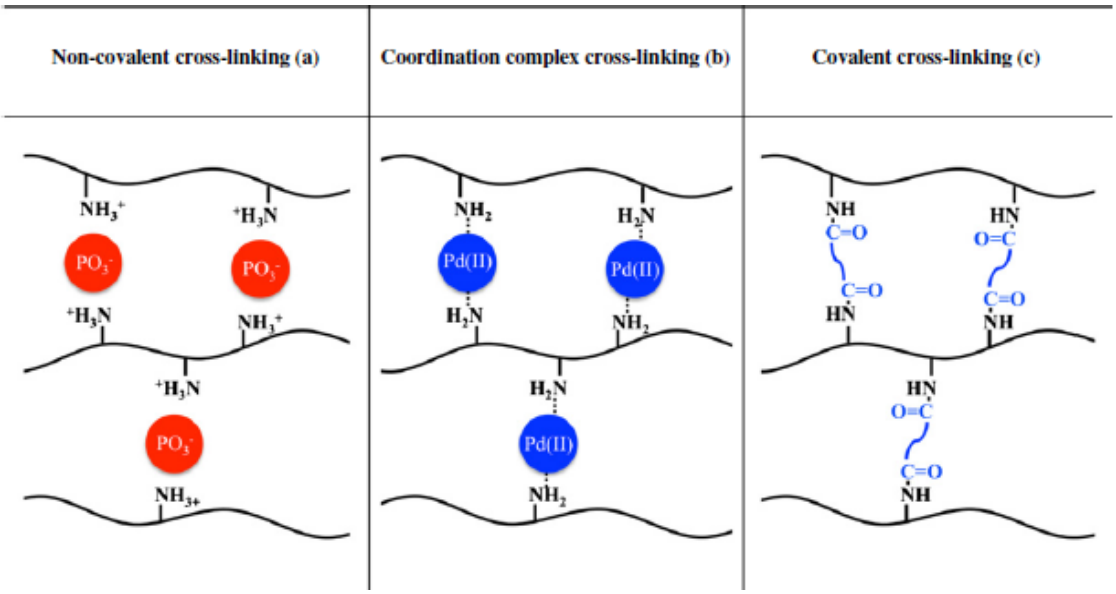
je di-natrij glicerol fosfat. Strukture kitozana se mogu modificirati da tvore fizičke hidrogelove: kitozan-g-poli (etilen glikol) (PEG) graft kopolimer može se samoorganizirati, ovisno o temperaturi stvaranja stabilnog hidrogela.[2]

Zahvaljujući polikationskoj prirodi kitozana u kiselim uvjetima, formiranje hidrogela kitozana preko elektrostatskih interakcija, koje uključuju polianione mailh veličina, je izravno(slika 5a).[2]

Pozitivno nabijeni kitozan djeluje na negativno nabijene molekule, kao što su fosfati, sulfati, tako da tvore hidrogelove. Različite koncetracije anionskih vrsta i broj D-glukozamina nasuprot N-acetil-D-glukozamina dopušta fino ugađanje sposobnosti bubrenja dobivenog hidrogela.[2,3]

Veće negativno nabijen molekule, prirodni i sintetski polianioni, također mogu dati gel s kitozanom. U kategoriji prirodnih polianiona koriste se proteini (kolagen, keratin, fibrion), anionski polisaharidi, karboksimetil celuloza i glukozaminoglikani. Sintetski polianioni – kao poli (akrilna kiselina) (PAA) – se također koriste u formiranju hidrogela. Promjena gustoće kitozana i polianiona igra važnu ulogu u bubrenju i stabilnosti formiranog hidrogela. Pravilno podešavanje pH medija je također važno. Treba primjetiti da se elektrostatske interakcije odvijaju skupa sa sekundarnim interakcijama, npr. vodikovim vezama, ali su interakcije između nabijenog kitozana i aniona ili polianiona jače od sekundarnih veza. Pri pripremi ionskog hidrogela kitozana treba izbjegavati katalizatore ili toksične reakcijske agense.[2,16]

Lakoća geliranja bez potrebe toksičnih aditiva, u slučajevima kompatibilnosti s ljudskim tijelom, dovelo je do razvoja injektivnh otopina koje pokazuju tranziciju tekuće/gel nakon injektiranja u tijelo, i nude jedinstvenu priliku da oblikuju gel na mjestu uklonjenog bolesnog tkiva, savršeno prilagođavajući predložak defektu. Međutim mehanički svojstva hidrogelova su vrlo ograničena i može se dogoditi nekontrolirani raspad hidrogela. Osim toga, teško je kontrolirati veličinu pora hidrogelova. [2,3]



Slika 5. Shematski prikaz tri tipa hidrogela kitozana: (a) ne-kovalentno povezivanje, (b) povezivanje preko koordinacijskih kompleksa, (c) kovalentno povezivanje

3.1.2. Kitozan vezan s koordinacijskim kompleksima

Koordinacijske kovalentne veze se mogu pojaviti u hidrogelu kitozana preko metalnih iona kao Pt(II), Pd(II), i Mo(IV), što vodi do stvaranja novog tipa hidrogela, ali manje primjenjivog u biomedicini. Gelacija ovog tipa je prikazana na slici 5b.[2]

3.1.3. Hidrogel sa kemijski vezanim kitozanom

Formiranje ovog hidrogela se odvija preko kovalentog vezanja polimernih lanaca (slika 5c). Takvi hidrogel je stabilniji od fizički vezanog hidrogela s obzirom da je gelacija nepovratna. Ovaj pristup zahtjeva kemijsu modifikaciju primarne strukture kitozana, što može izmjeniti njegova početna svojstva, poglavito ako su amino skupine uključene u reakciju. Također reakcija može biti izvor kontaminacije toksičnim otpadom reaktanata ili katalizatora.[2,5]

Amino i hidroksil skupine kitozana mogu stvarati različite veze, kao peptindnu vezu ili estersku vezu, što može voditi do formiranja hidrogela. Manje multifunkcionalne molekule

se mogu koristiti za reakciju s kitozanom i inducirati vezanje lanaca. Kitozan se može modificirati aktiviranjem funkcionalnih skupina prije induciranja međuveza sa foto-indukcijskom reakcijom ili enzimski kataliziranom reakcijom.

Izravan način dobivanja nepovratnog hidrogela kitozana je korištenje dialdehida za stvaranje međuveza, kao glioksal i glutaraldehid, koji brzo reagiraju s amino skupinama D-glukozamina i, u manjoj mjeri, s hidroksilnim skupinama kitozana. Tripolifosfat, etilen glikol, diglicidil eter i diizocijanat također mogu igrati ulogu u stvaranju veza, ali mogu uzrokovati toksičnost formiranog hidrogela, što otežava primjenu takovog gela kao biomaterijala.[2,5]

Svojstva dobivenih hidrogelova će ovisiti o gustoći međuveza i odnosu vezanih molekula i molova ponavljajućih jedinica polimera.

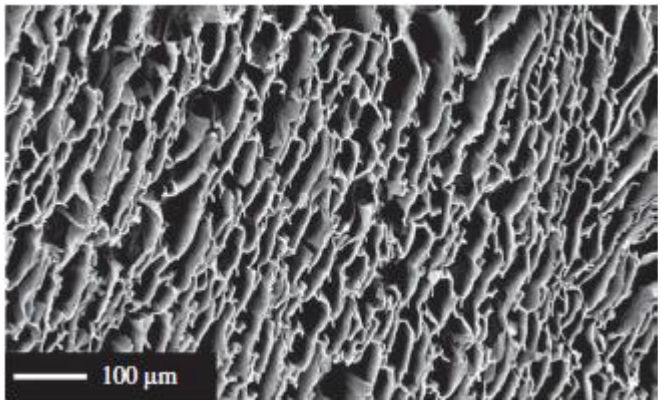
Kako se za stvaranje kovalentinh veza između lanaca polimera koriste amino skupine, u proizvodnji takvih hidrogelova se koristi kitozan s visokim stupnjem deacetilacije kao početni materijal.[2,3]

3.2. Spužve na temelju kitozana

Spužve nisu ništa drugu nego pjena sa otvorenom poroznošću. Ove čvrste strukture su sposobne absorbirati velike količine fluida (više od 20 puta težine suhe spužve), zbog njihove mikroporoznosti. Nude dobru inetrakciju sa stanicama, mekane su i fleksibilne.[17]

Spužve od kitozana se koriste kao materijal za liječenje rana, jer mogu upiti izlučevine rana i tako pomažu zacjeljenju. Također se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva, kao materijal za ispunu.[2,6]

Ove spužve se proizvode liofilizacijom, jednostavnim učinkovitim procesom smrzavanja otopine kitozana nakon čega slijedi isparavanje otapala pod sniženim tlakom.



Slika 6. SEM snimak spužve kitozana pripremljenog liofilizacijom[2]

Na primjer, spužve kitozan/trikalcij fosfat (TCP) i kitozan/kolagen su pripremljene ovom tehnikom i korištene kao predložak za regeneraciju kosti. Spužve od kitozan-ZnO kompozita su pokazale dobro bubrenje, antibakterijska i hemostatska svojstva.

Spužve punjene antibioticima se pripremaju tehnikom isparavanja otapala. Vlaknaste strukture takvih spužvi su se pokazale dobrim za oblaganje rana.

U novije vrijeme za induciranje poroznosti spužve kitozana koristi se superkritični ugljikov dioksid ($scCO_2$) kao medij. Ta metoda dopušta pripremu poroznih spužvi pogodnih za usađivanje kulture stanica direktno nakon uklanjanja s niskog tlaka.[2,6]

4. 2-D predlošci na bazi kitozana za oblaganje rana

U posebnim slučajevima za oblaganje rana, moraju se ispuniti posebni uvjeti da se osigura uspješnost postupka. Oblozi za rane ne smiju biti toksični i uzrokovati alergijske reakcije, moraju dopustiti izmjenu plinova, održavati vlažno okruženje, štititi ranu od mikrobialnih organizama i absorbirati izlučevine rana. Iako spužve kitozana ispunjavaju ove uvjete, za liječenje tkiva kože pribjegava se korištenju 2-D predložaka, kao što su filmovi i porozne membrane.[2]

4.1. Filmovi na bazi kitozana

Filmovi kitozana se mogu lako pripremiti mokrim oblaganjem iz otopina soli kitozana, nakon čega slijedi sušenje (koristi se IR sušenje).[18]

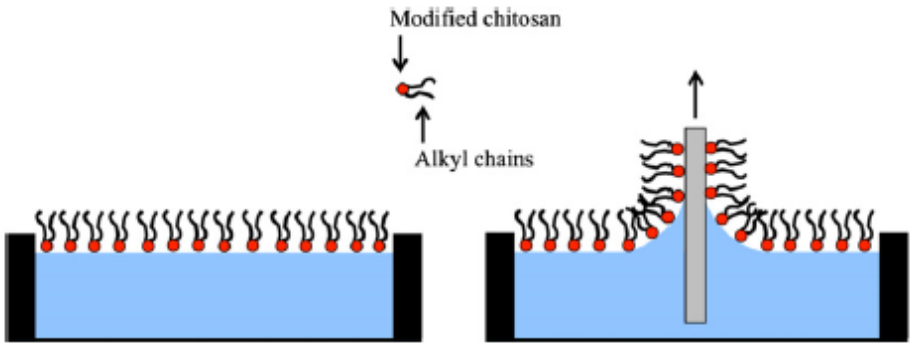
Testirani su fizikalno-kemijski procesi u svrhu unapređivanja svojstava filmova. Na primjer, tretiranje membrana kitozana sa plazmom argona ili dušika je povećalo hrapavost i unaprijedilo je adheziju stanica i proliferaciju, zatim izlaganje kitozana UV ili ozonskoj radijaciji je modificiralo filmove kitozana vodeći do depolimerizacije, te uvođenje silika čestica ili poli(etilen glikola) u filmove kitozana može modificirati poroznost.[18]

Što se tiče mehaničkih svojstava, miješanje i kemijska modifikacija kitozana su se pokazale uspješnim metodama za unapređenje tih svojstava. Da se popravi duktilnost filmova, kitozan se može miješati (ili kopolimerizirati) sa poli (etilen glikolom) (PEG), što rezultira smanjenjem modula elastičnosti i povećanjem konačnog istezanja (za 50/50 kitozan/PEG mješavine modul se smanjio 56% dok je povećanje konačnog istezanja bilo 125%, u odnosu na čisti kitozan). Sa termalnim tretiranjem filma kitozana može doći do amidizacije, što vodi do ojačavanja filma i smanjenja topljivosti u vodenim medijima. Filmovi kitozana koji su pripremljeni u prisutnosti dialdehidnog škroba su pokazali bolja mehanička svojstva i bolje bubrenje u vodi.[2,18]

Uključivnje anorganskih čestica koje posjeduju antimikrobialna svojstva mogu odvesti do povećanja antimikrobialnih svojstava filma i uspješnijeg liječenja rane. Na primjer, čestice srebra i ZnO se mogu dodati filmu kitozana, da bi se spriječila proliferacija mikroorganizama.[2]

Svojstva površine obloga za rane u kontaktu s ozljedom su vrlo važna za osiguravanje učinkovitog liječenja. Višeslojni oblozi i tanki filmovi s nanostrukturom su istraživani da bi se ugodila svojstva površine. Razviijene su dvije metode dizajniranja filmova kitozana u svrhu modificiranja površine substrata: Langmuir-Blodget (LB) i depozicija sloj po sloj (layer-by-layer, LBL). Oba procesa omogućavaju kontrolu parametara kao što je debljina filma, kompozicija, morfologija i hrapavost.[2]

Da bi se formirao Langmuirov monosloj na zaslonu zrak-voda, otopina amfifilne makromolekule netopive u vodi s hlapljivim organskim otapalom se raširi po površini vode. Isparavanjem organskog otapala, hidrofilni dio amfofila je usidren u vodenoj fazi, dok je hidrofobni dio orijentiran prema zraku. Langmuir-Blodgettov procese se sastoji od prenošenja Langmuirovog monosloja na čvrstu potporu. To se može izvesti uranjanjem čvrste potpore u vodenu fazu. Ponavljanjem postupka se može dobiti višeslojni film.[19]



Slika 7. Prikaz Langmuirovog filma (lijevo) i Langmuir-Blodgettovog procesa (desno)

Kako je kitozan slabo topiv u organskim otapalima, potrebno je provesti kemijske modifikacije za korištenje ovog procesa. Kitozan modificiran s dugim alkilnim lancima pričvršćenim na primarne hidroksilne i amino skupine je topiv u kloroformu. Derivati pentamera kitozana se korišteni u pripravi LP filmova, kao i drugi amfifilni kitozani, pogavito N,N.dialkil-kitozani.[2]

Na drugu stranu, tehnika LBL depozicije je temeljena na izmijenjenoj adsorpciji nabijenog materijala ili nosioca funkcionalnih grupa u vodenom mediju. Može se koristiti veliki broj molekula, uključujući sintetske i prirodne polielektrolite, nanocijevi i biomolekule. Takvi polielektrolitni višeslojni filmovi imaju široku primjenu na području senzora, filtera ali i kao biomaterijal u inženjerstvu tkiva.[19]

Polikationska priroda kitozana ga čini prigodnim za LBL proces. Kao posljedica toga, LBL filmovi na bazi kitozana su uključeni u primjenu kao senzori, za dostavu lijekova, kao koštani implantanti i za oblaganje rana.[2]

Da bi se unaprijedila mehanička svojstva kitozanskih LBL filmova, kitozan može biti kombiniran u filmu sa glinama kao Na-montmorilonit, sa ugljikovim nanocijevima ili sa celulozom.[2]

LBL filmovi koji su u potpunosti sastavljeni od polisaharida imaju veliku primjenu u oblaganju rana, jer ubrzavaju zacjeljivanje rane.[2]

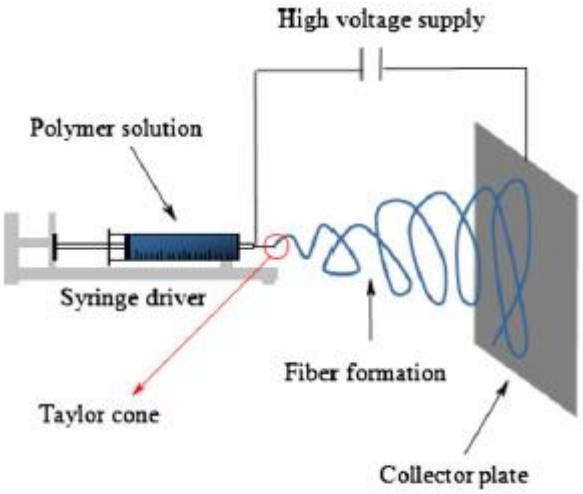
4.2. Porozne membrane od nanovlakana

Postoji nekoliko načina proizvodnje vlakana kitozana; prvi primjer je proizvodnja vlakana korištenjem suhog i mokrog izvlačenja vrtnjom iz kiselih otopina. Litij klorid/N,N-dimetilacetamid se koristi kao otapalo. U svrhu smanjivanja troškova proizvodnje i poboljšanja svojstava vlakana, korištene su smjese kitozana s drugim polimerima: celulozom, tropokolagenom, natrijevim heparinom i poli(akrilnom kiselinom).[20]

Zadnjih godina sve se više koristi metoda „elektospininga“ (eng. electrospinning) ,ESP, koja se pokazala kao raznovrsna tehnika za pripremu polimernih vlakana promjera nekoliko

nanometara, ovisno o uvjetima procesa. EPS koristi visku voltažu za stvaranja električno nabijene otopine ili taline polimera što vodi do stvaranja vlakana (slika 9.). Pokrivači od vlakana proizvedeni ovom metodom posjeduju visoku poroznost, veliku specifičnu površinu i sposobni su imitirati prirodnu vanstaničnu matricu, što ih čini izvrsnim za primjenu kao biomaterijal. Nanovlakna kitozana nalaze primjenu u oblaganju rana i inženjerstvu tkiva.[2,21]

Kako je kitozan polielektrolit u kiselom mediju, njegov „elektrospining“ je otežan. Tijekom ESP, odbojne sile između nabijenih vrsta unutar polimera rastu kao posljedica primjene električnog polja. Ovaj fenomen ograničava formiranje kontinuiranih vlakana i često vodi do stvaranja čestica.[21]



Slika 8. Shema uređaja za ESP

Postoji nekoliko primjera čistih vlakana kitozana dobivenih ESP-om; nanovlakna kitozana su uspješno proizvedena iz smjese trifluoracetatne kiseline (TFA) i diklormetana (DCM). Amino skupine kitozana tvore soli sa TFA, koje uništavaju interakciju između molekula kitozana i pospješuju proces ESP-a. Uz to, korištenje DCM popravlja homogenost proizvedenih vlakana. [21]

Da bi se pospješio „elektrospining“ kitozana, može se koristiti modificirani kitozan, kao heksanoil kitozan i PEGlicirani kitozan. Najlakši način za proizvodnju nanovlakana kitozana je „elektrospining“ kitozana kao smjesa s drugim polimerom. Uobičajene smjese su kitozan u kombinaciji sa poli (etilen oksidom) (PEO), poli (vinil alkoholom) (PVA) i poli (etilen teraftalatom) (PET).[2]

Kitozan/PEO nanovlakna pripremljena s ESP-om imaju staničnu biokompatibilnost. Struktura vlakana promiče spajanje s ljudskim stanicama, dok čuvaju svoju morfologiju. Zajednička uporaba kitozana i PVA dopušta proizvodnju vlakana bez defekata. Kitozan/PET vlakna uz biokompatibilnost, posjeduju i pojačana antibakterijska svojstva u usporedbi sa čistim PET vlaknima.[2]

Dodavanje drugog polimera u svrhu pospješenja ESP-a, je i način da se poprave svojstva rezultirajućih vlakana, kao što su mehanička svojstva, biokompatibilnost i antibakterijska svojstva.[2,4]

5. Zaključak

Kitozan je jedinstven prirodni polimer kojega karakteriziraju amini uzduž lanca polimera. Takva struktura daje ovom polisaharidu ne samo vrijedna fizikalno-kemijska svojstva, već i omogućavaju interakciju sa proteinima, stanicama i živim organizmima. Uz to, ovaj polikation (nakon protoniranja u kiselim uvjetima) pokazuje dobru topljivost u vodenim medijima što omogućuje preradu ovog materijala u blagim uvjetima u široki raspon oblika. Meki gelovi i tanki filmovi, jake spužve i nanovlakna se mogu napraviti lako uz dostupnu dobru kontrolu njihove kompozicije, funkcije i morfologije. Široki raspon svojstava kitozana i slijednih materijala čini ovaj polimer pogodnim za biomedicinsku primjenu, poglavito u inženjerstvu tkiva.

6. Literatura

1. Rosanne Raftery,Fergal J. O'Brien, Sally- Ann Cryan , Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineernig applications Molecules 2013,18,5611-5647
2. Florence Crosier, Christine Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineerng, European Polymer Journal 49 (2013) 780-792
3. Julie Nilsen-Nygaard,Sabina P. Strand, Chitosan: Gels and Interfacial Properties, Polymers 2015,7,522-579
4. Jayachandran Venkatesan, Se-Kwon-Kim, Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering- An Overview,Mar.Drugs 2010,8,2252-2266
5. Kangde Yao, Junjie Li, Fanglian Yao, Yuji Yin, Chitosan-Based Hydrogels,Functions and Applications, 2012, Taylor & Francis group,20010602,
6. Takeshi Ikeda, Kahori Ikeda, Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold, BioMed Research International, Volume 2014 ID 786892
7. Acosta N, Jimenz C, Borau V, Heras A, Extraction and characterization of chitin from crustanceas, Biomass Bioenergy, 1993;5:145-53
8. Madihally SV, Matthew HWT. Porous chitosan saffolds for tissue engineering, Biomaterials,1999;20 1133-42
9. Leedy M, Martin H, Norowski P, Jennings J, Use of chitosan as a bioactive impalnt coating for bone-implant applications, Chitosan for biomateials II, Springer Berlin; 2001.fdf
10. Decher G. Fuzzy nanoassambiles; toward layered polymeric multicomposites, Science 1997;277:1232-7
11. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D, Antibacterial action of chitosan, Food Biotechnol 1992;6:257-72

12. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E., Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical application, Prog Polym Sci 2011;36:981-1014
13. Aliba S. Studies on chitosan:4. Lysozimic hydrolysis of partialy N-acetylated chitosans, Int Biol Macromol 1992;14:225-8
14. Thanou M, Verhoel JC, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivates. Adv Drug Delivery rev 2001;52:117-26
15. Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan chemistry:relevance to the biomedical sciences, Adv Polym Sci 2005;186:151-209
16. Boucard N, Viton C, New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic mediom, Biomacromolecules 2005;6:3227-37
17. Costa-Pinto ar,Reis RL, Sacffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan, Tissue Eng 2011;17:311-47
18. Jayakumar R, Prabaharian M, Biomaterial based on chitin and chitosan in wound dressing applications, Biotechnl Adv 2011;29:322-37
19. Blodgett KB. Films built by depositing successive unimolecular layers on a solid surface, J Am Chem Soc 1935;57:1007-22
20. Formhals A, Artificial threads and method of producing same, 1940;US2187306
21. Jayajumar R, Prabaharian M, Novel chitin and chitosan nanofibres in biomedical applications, Biotechnol Adv 2010;28;142-50

7. Životopis

Rođen sam u Makrskoj 16.7.1989. godine. Svoje školovanje sam započeo 1996. Godine u OŠ oca Petra Perice u Makarskoj. Opću gimnaziju u SŠ fra Andrije Kačića Miošića sam upisao 2004 godine, koju sam završio maturalnim ispitom 2008. godine. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije sam upisao 2010. godine studij kemija i inženjerstvo materijala. Tokom studiranja odradio sam stručnu praksu u INA- industrija nafte d.d. pod mentorstvom dipl. ing. Dijane Keškić.