Uloga kitozana u regeneraciji tkiva

Štefan, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:149:702279

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ PRIMIJENJENE KEMIJE

Lucija Štefan

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ PRIMIJENJENE KEMIJE

Lucija Štefan

ULOGA KITOZANA U REGENERACIJI TKIVA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:
Prof. dr. sc. Marica Ivanković
Dr. sc. Anamarija Rogina, poslijedoktorand
Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, rujan 2018.

Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Marici Ivanković na stručnom vodstvu i predloženoj temi završnog rada.

Veliko hvala dr. sc. Anamariji Rogini na vodstvu, strpljivosti i pomoći tijekom izrade završnog rada.

Također hvala mojim roditeljima na podršci tijekom studiranja.

Sažetak

Inženjerstvo tkiva je obećavajuća alternativa konvencionalnim metodama u medicini. U sklopu tog interdisciplinarnog polja, nastoje se naći biomaterijali kompatibilni s tkivom kojeg će zamijeniti i popraviti. Kitozan je često korišten materijal povoljnih svojstava koji se lako oblikuje u različite oblike ili modificira proteinima kao što je fibronektin, sekvencama poput RGD ili umreživanjem s drugim polimerima.

Cilj ovog rada bio je dati kratki pregled svojstava kitozana, njegove primjene i uloge u inženjerstvu tkiva. U ovom radu pripremljene su porozne strukture na temelju kitozana visoke (HC) i srednje (MC) molekulske mase metodama liofilizacije (FD) i toplinski induciranog faznog razdvajanja uz geliranje i ekstrakciju (FG). Uzorci su karakterizirani pretražnim elektronskim mikroskopom te im je određen stupanj bubrenja testiranjem u vodenom mediju 24 sata pri temperaturi od 37 °C. Liofilizirani uzorci pokazali su visoko poroznu strukturu s međusobno povezanim porama duž cijelog volumena uzorka. Dobiveni su slojevi s različitim stupnjem homogenosti strukture.

Površina membrana pripremljenih toplinski induciranim faznim razdvajanjem uz geliranje i ekstrakciju prekrivena je tankim filmom. Svi uzorci pokazali su znatnu moć bubrenja, a strukture pripremljene FD metodom su bile superiorne u odnosu na one pripremljene FG metodom. Provođenjem ANOVA statističke analize utvrđena je značajna razlika među uzorcima unutar podskupine I i II za obje molekulske mase kod prve metode, dok se kod druge razlika primjećuje između uzoraka različitih molekulskih masa.

Ključne riječi: kitozan, porozne strukture, regeneracija tkiva, inženjering tkiva .

The role of chitosan in tissue regeneration

Summary

Tissue engineering is a promising alternative to conventional methods in medicine. Within this interdisciplinary field, the goal is to find biomaterials compatible with the tissue targeting to replace and heal. Chitosan is a frequently used material with favorable properties, and it is easily transformed into various shapes or modified by proteins such as fibronectin, sequences such as RGD or cross-linking with other polymers.

The goal of this work was to give a short review on chitosan's properties, its application and role in tissue engineering. Chitosan porous structures of high (HC) and medium (MC) molecular weight were prepared using freeze drying (FD) and freeze gelation (FG) methods. Samples were characterized by scanning electron microscopy, while swelling test was done in aqueous media for 24 hours at 37 °C. Freeze dried sponges were highly porous with interconnected pores throughout the whole volume of the sample. The lyophilized samples were additionally cut into two sections based on their structure – I (homogenous), II (non-homogenous).

The membranes prepared by freeze gelation showed the existence of thin film on their surface, even though they seemed porous based on visual examination. All samples demonstrated good swelling degree, while the structures obtained by FD method were superior comparing to FG ones. ANOVA statistical analysis indicated that there was a significant difference between the samples within sections I and II of both molecular weights for the first method, while in the second, a difference between samples of various molecular weights has been noted.

Key words: chitosan, porous structures, tissue regeneration, tissue engineering.

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 Biomaterijali 1

1.1.1 Metali 2

1.1.2 Polimeri 2

1.1.3 Keramika 2

2 REGENERATIVNA TERAPIJA 4

2.1 Uloga 4

2.2 Područja primjene 4

2.3 Izbor biomaterijala 5

3 KITOZAN 9

3.1 Struktura 9

3.2 Svojstva 10

3.2.1 Hidrofilnost 10

3.2.2 Mukoadhezija 10

3.2.3 Hemostatsko djelovanje 10

3.2.4 Antimikrobno djelovanje 11

3.2.5 Ostalo 11

3.3 Metode priprave kitozanskih nosača 11

3.4 Najčešća primjena 13

3.4.1. Hrskavica 13

3.4.2. Kost 15

3.4.3. Koža 17

3.4.4 Živci 18

4 PROCESI NA MOLEKULARNOJ RAZINI 19

5 EKSPERIMENTALNI DIO 24

5.1 Materijali 24

5.2 Priprava poroznih struktura 24

5.2.1 Liofilizacija 24

5.2.2 Toplinski inducirano fazno razdvajanje uz geliranje i ekstrakciju 25

5.3 Karakterizacija 26

5.3.1 Pretražna elektronska mikroskopija 26

5.3.2 Bubrenje 26

5.4 Statistička obrada 26

6 REZULTATI I RASPRAVA 27

6.1 Mikrostruktura poroznih nosača 27
6.2 Bubrenje 31
7 ZAKLJUČAK 33
***8* SIMBOLI KORIŠTENI U RADU** 34
9 LITERATURA 36

1 UVOD

Sve je veća potreba za materijalima pogodnijima za okoliš, kao i njihovim lakšim prihvaćanjem u ljudskom tijelu. Inženjerstvo tkiva, kao dio regenerativne terapije, interdisciplinarno je polje koje nastoji pronaći biomaterijale kompatibilne s tkivom koje će zamijeniti i popraviti. Za razliku od tradicionalnog pristupa, kombiniraju se znanja iz više područja (fizike, kemije, biologije, medicine i inženjerstva materijala) kako bi se razumjela interakcija materijala, stanica i faktora rasta koji omogućavaju vezanje na biomaterijal, te rast, razvoj i diferencijaciju stanica ciljanog tkiva. Bilo da se radi o sintetskim ili prirodnim biomaterijalima, oni moraju biti visoko porozni te omogućavati normalno srastanje tkiva i interakciju sa stanicama, a da se pri tome potpuno razgrade i uklone iz tijela bez štetnih posljedica. Postoje dva glavna pristupa pri dizajnu željenog tkiva:

1) Stanični

U ovom pristupu se stanice nasađuju na nosač *in vitro* gdje se očekuje da će doći do stvaranja staničnog okoliša koji će stvoriti pogodne uvjete za stvaranje tkiva za daljnju transplantaciju *in vivo* [1-3].

2) Nestanični

Ovaj pristup se temelji na modifikaciji nosača s faktorima rasta (engl. *growth factor*, GF) koji bi trebali potaknuti vezanje stanica na biomaterijal te njihovo umnažanje i srastanje s nosačem [1-3].

1.1 Biomaterijali

Današnja definicija biomaterijala prema Europskom društvu za biomaterijale (engl. *European Society for Biomaterials*) glasi da je to "materijal koji reagira s biološkim sustavima kako bi procijenio, liječio, poboljšao ili zamijenio bilo koje tkivo, organ ili funkciju u tijelu". Neki biomaterijali koriste se već stoljećima u zubarstvu ili oftalmologiji pri zamjeni leća, ali se polje primjene znatno proširilo razvojem novih tehnologija.

Česta podjela biomaterijala uključuje svrstavanje u metale, polimere (koji mogu biti sintetski ili prirodni) i keramiku.

1.1.1 Metali

Uključuju nehrđajući čelik i titanij. Problem im je što nisu biorazgradivi i podložni su koroziji pa se stoga rjeđe koriste [1].

1.1.2 Polimeri

A) Sintetski

Često istraživani biorazgradivi polimeri su poli(etilenglikol) (PEG), poli(vinil-alkohol) (PVAL), polikaprolakton (PCL), poli(mliječna kiselina) (PLA), poli(glikolna kiselina) (PGA) i kopolimeri PLA i PGA (PLGA).
Vrlo su praktični zbog mogućnosti kemijske prilagodbe samog materijala. Postepenim razgrađivanjem umjetnog materijala, tkivo preuzima mehaničku i metaboličku funkciju ispunjavanjem prostora čime se smanjuje rizik od atrofije. Nedostatak uključuje proces razgradnje i smanjenu bioaktivnost što bi moglo rezultirati odbacivanjem tkiva. PGA i PLA u procesu razgradnje otpuštaju ugljikov dioksid koji snižava pH što može dovesti do nekroze.

B) Prirodni

Atraktivni zbog visoke biokompatibilnosti s izvanstaničnom matricom (engl. extracellular matrix, ECM) i efektivne razgradnje pri čemu sav polimer izlazi iz tijela prirodnim metaboličkim procesima. Uključuju polisaharide poput kitozana (CS), hijaluronske kiseline (HA), alginata, svilu, škrob i celulozu, te proteine kao što su kolagen, elastin, fibronektin (FN) i fibrinski gelovi. Takvi nosači imaju slabija mehanička svojstva i ne mogu izdržati velika opterećenja pa su pogodniji za uporabu u inženjerstvu mekog tkiva kao što su hrskavice. Zbog toga se radi na kompozitnim materijalima gdje se nastoje poboljšati mehanička svojstva miješanjem s keramikom [1-3].

1.1.3 Keramika

Glavni predstavnici su hidroksiapatit (HAp) i β-trikalcij fosfat (β-TCP). Ne koriste se toliko u inženjerstvu mekog tkiva već su pogodniji za primjenu u regeneraciji kostiju zbog

kemijske sličnosti u strukturi. Karakterizira ih visoka čvrstoća, mala elastičnost i krta površina. Keramika potiče umnažanje i diferencijaciju osteoblasta (koštanih stanica) što je još jedan od faktora zašto je dobar izbor za primjenu u regeneraciji kostiju [1,2].

2 REGENERATIVNA TERAPIJA

2.1 Uloga

Regenerativna terapija ili često nazivana i regenerativna medicina je široko polje koje obuhvaća i inženjerstvo tkiva, a cilj joj je pronaći pogodan materijal i pristup za liječenje proučavajući procese regeneracije tkiva [4]. Temelji se na sposobnosti tijela da zacijeli samo ili uz pomoć biomaterijala. U ovakvim terapijama se biomaterijal razgrađuje s vremenom ostavljajući prostor za zarastanje tkiva, što je razlika u odnosu na tretiranje većih defekata titanijem ili plastičnim materijalima.

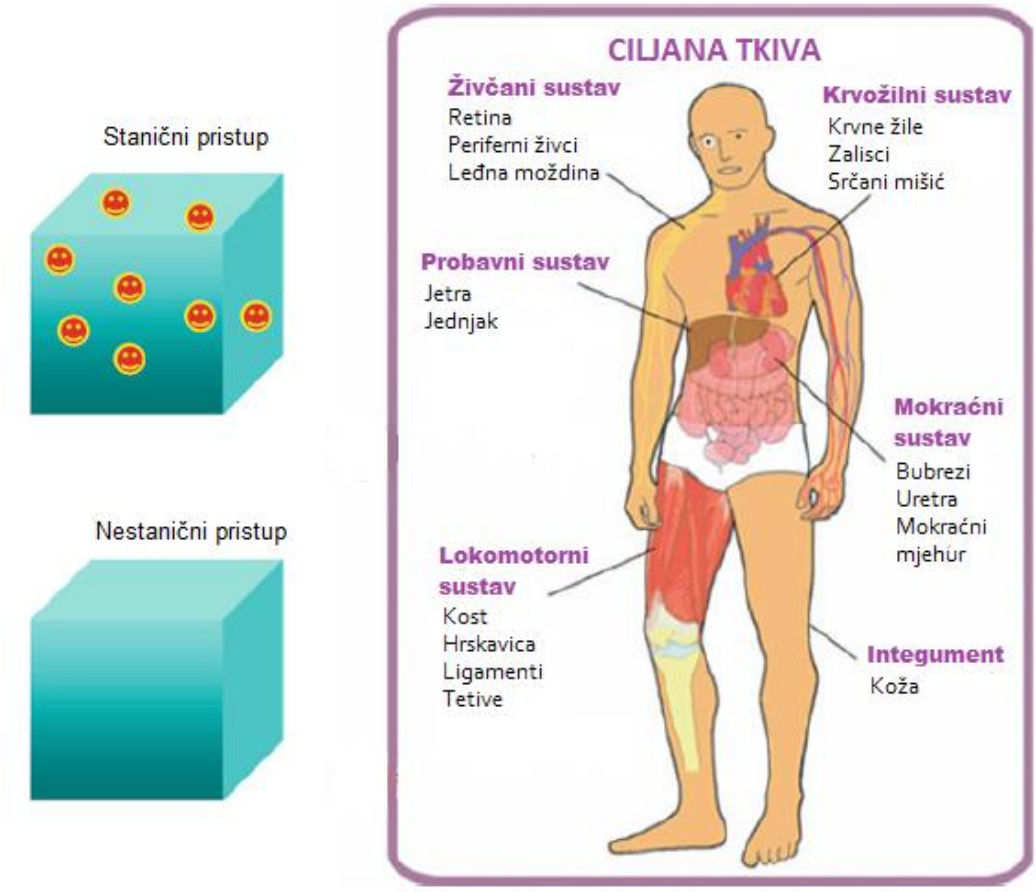
Glavni faktori koji se pri tome trebaju uzeti u obzir su:

1) Prikladne stanice za regeneraciju ciljanog tkiva;
2) Prikladan nosač kompatibilan s tim stanicama;
3) Bioaktivne molekule poput faktora rasta koje bi mogle potpomoći proces regeneracije;
4) Uvjeti koji vladaju u okolišu gdje se žele nasaditi stanice.

Osim istraživanja novih terapija, jedna grana se bavi proučavanjem tkiva kao biosenzora pomoću čega bi se mogla utvrditi toksičnost određenih lijekova ili spojeva [4].

2.2 Područja primjene

Iako još uvijek ima relativno malu ulogu u aktivnoj primjeni u medicini, razvijeni su umjetni mokraćni mjehuri, manje arterije, presadci kože, pa čak i dušnik [4]. Inženjerstvom tkiva tretiraju se i manji zahvati kao regeneracija kosti ili hrskavice, ali svoju je primjenu našlo i u drugim dijelovima tijela kao što je mrežnica oka, živci, mišići, bubrezi i jetra [3].



Slika 1. *Prikaz ciljanih tkiva za regenerativnu terapiju korištenjem staničnog ili nestaničnog pristupa (modificirana slika iz [3]).*

Kitozan je posebno zanimljiv materijal za primjenu zbog svojih izvrsnih karakteristika biokompatibilnosti, biorazgradivosti i antimikrobne aktivnosti. Kao materijal koji podupire tkivo i kompatibilan je s izvanstaničnom matricom primjenjuje se kao dodatak prehrani, u zacjeljivanju rana i kao sustav za dostavu lijekova (engl. *drug delivery system*) [3].

2.3 Izbor biomaterijala

Kako bi materijal bio pogodan izbor pri regeneraciji tkiva, mora zadovoljiti određene uvjete. Prirodno, medij koji podupire biomaterijale pri zacjeljivanju rana i regeneraciji tkiva je izvanstanična matrica. To je medij koji podupire biološke stanične funkcije (rast, razvoj, umnažanje i diferencijaciju stanica) te olakšava biomaterijalu-nosaču lakšu interakciju sa susjednim stanicama. ECM se sastoji od različitih proteina i glikana koji daju stanici oblik,

omogućavaju vezanje s drugim stanicama i služe kao receptori signala na površini [5]. Neovisno o kojem se tipu tkiva radi, neki opći kriteriji za izbor biomaterijala uključuju:

A) *Biokompatibilnost*

Prvi kriterij za razmatranje bilo kojeg nosača kao potencijalnog kandidata za primjenu je biokompatibilnost. Stanice moraju dobro prianjati, zadržati svoje osnovne funkcije te povoljno reagirati s nosačem i infiltrirati se u strukturu kako bi došlo do umnažanja za lučenje pogodnog staničnog okoliša [2]. Naposljetku, nosač ne smije uzrokovati upalu koja bi mogla rezultirati odbacivanjem tkiva ili smanjiti učinak regeneracije. Produkti razgradnje ne bi smjeli izazivati nikakve neželjene efekte i trebali bi u potpunosti izaći iz tijela [1]

B) *Biorazgradivost*

Nosač nije zamišljen kao nešto što trajno ostaje u tijelu, već se razgrađuje s vremenom omogućavajući lokalnom tkivu da se samostalno obnavlja pružajući potporu u procesu. Zato, biomaterijal treba biti potpuno razgradiv bez toksičnih produkata [2]. Veliku ulogu igra i brzina same razgradnje materijala koja bi trebala biti podešena tako da jednom kad je sav materijal razgrađen, tkivo je potpuno regenerirano. Faktori koji utječu na kinetiku razgradnje su prisutnost makrofaga (stanica „čistača“), poroznost, struktura i sama geometrija nosača [1,2].

C) *Bioaktivnost*

Bioaktivnost je svojstvo materijala da reagira s okolnim biološkim medijem [6]. Biomaterijali mogu reagirati s dijelovima stanica regulirajući biokemijske reakcije. Nosači se često modificiraju s ECM proteinima poput kolagena, fibronektina i laminina ili malim sekvencama peptida poput arginin-glicin-aspartat (RGD) sekvenca i faktorima rasta kako bi se poboljšala svojstva samog nosača, a time i interakcija s tretiranim tkivom. Nosač se pri tome također može koristiti i kao sustav za dostavu lijekova [3,6,7].

D) *Mehanička svojstva*

Mehanička svojstva nosača bi trebala odgovarati lokalnom tkivu, a materijal opet biti dovoljno izdržljiv i čvrst kako bi mogao podnijeti implantaciju. Najveći izazov predstavljaju kardiovaskularni i ortopedski zahvati pri kojima je nužno da tkivo održi dobru prokrvljenost kako ne bi došlo do nekroze, a s druge strane ima dovoljnu mehaničku stabilnost kako bi nosač podupirao tkivo dovoljno dugo prije nego što u potpunosti zacijeli. Pošto su živi organizmi dinamični, brzina kojom nečije rane zarastaju neće uvijek biti ista. To je još jedan od zahtjeva na koje se treba pripaziti, posebice pri inženjerstvu kosti i hrskavica. Generalno, stariji ljudi imaju manju sposobnost regeneracije tkiva od mlađih [2]. Pri dizajnu željenog tkiva, treba imati na umu da se idealan biomaterijal dobiva balansiranjem poroznosti, koja omogućava jednostavnije i efektivnije vezanje stanica na nosač, vaskularizaciju i njihovo umnažanje, te mehaničkih svojstva koja omogućavaju izdržljivost materijala [6].

Slika 2. *Odnos poroznosti biomaterijala – nosača, bioaktivnosti i mehaničkih svojstava* [6].

E) *3D struktura*

Kako je već u prethodnom kriteriju objašnjeno, idealan nosač mora biti visoko porozan kako bi infiltracija i vezanje stanica na nosač bili što uspješniji jer se tako omogućava velika aktivna površina za njihovo prianjanje i difuziju nutrijenata. Ujedno je i omogućen odlazak otpadnih tvari i razgradnja nosača. Glavni problem koji može nastati

je odumiranje srži nosača te urušavanje same konstrukcije zbog nedostatka prokrvljenosti i nedovoljnog odvođenja otpadnih tvari što dovodi do apoptoze stanica [1]. Interakcija nosača i stanica prvenstveno se odvija preko kemijskih grupa tj. liganada. Neki biomaterijali već imaju ligande (npr. kolagen ima RGD sekvencu) dok je drugima potrebna modifikacija (kitozan). Pri tom je bitna prosječna veličina pora nosača. One trebaju biti toliko male da se postigne minimalna gustoća liganda po aktivnoj površini za efektivno vezanje i kritičnu koncentraciju stanica, a opet dovoljno velike da se stanice infiltriraju i povežu s ligandima [2].

F) *Površinska svojstva*

Trebala bi biti pogodna za vezanje stanica, njihov intenzivni rast i razvoj tj. umnažanje i mogućnost transformacije stanice iz jednog tipa u drugi – diferencijaciju. Direktno utječu na bioaktivnost, a neka od svojstava uključuju hidrofobnost, hrapavost i kemijski sastav [1]. Jednom kad stanice stupe u kontakt s nosačem, dolazi do odašiljanja niza signala za vezanje preko integrina – transmembranskih receptora tipične strukture s „glavom“ i „repovima“ koji potiču adheziju tvari iz ECM-a i omogućuju brz odgovor na procese na površini stanice [8].

G) *Proizvodnja i mogućnost sterilizacije*

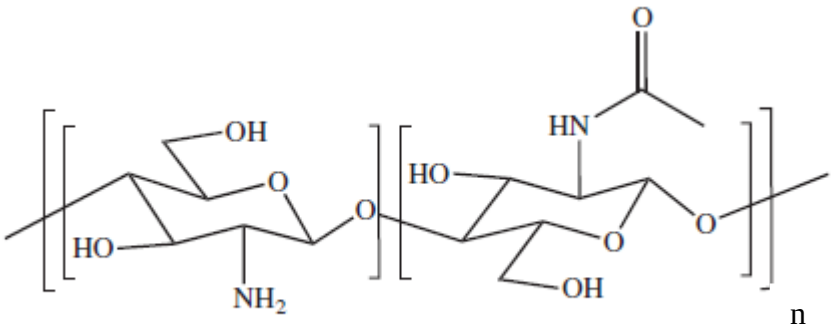
Nosač bi trebao biti ekonomski isplativ s mogućnosti prelaska iz laboratorijskog na industrijsku proizvodnju. Ovisno o vremenu koje je potrebno da se materijal dostavi bira se način skladištenja [2]. Postupak sterilizacije ne smije utjecati na bioaktivnost ili mijenjati sastav, biokompatibilnost ili mogućnost razgradnje, a pri tome mora učinkovito ukloniti rizik od infekcije i biti relativno jednostavan. Neke od metoda koje se primjenjuju su sterilizacija parom, sterilizacija etilen oksidom, γ-zračenje, izlaganje UV zračenju i sterilizacija u autoklavu [1].

3 KITOZAN

Izazov inženjerstva tkiva je da imitira ono što se događa u prirodi korištenjem raznih materijala. Zašto je kitozan pri tome dobar materijal? Često je korišten u inženjerstvu tkiva zbog svoje bioaktivnosti, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i mogućnosti da se oblikuje u različite strukture kao što su porozne spužve, hidrogelovi, vlakna, filmovi i dr. Strukturno je analogan ECM glikozaminoglikanima (GAG) i ima mogućnost enzimske razgradnje kao prirodni polimer. Pri tome ne reagira štetno na organizam domaćina, biorazgradiv je i stoga pogodan za korištenje u farmaceutske i medicinske svrhe u inženjerstvu tkiva kostiju, hrskavice, živčanog sustava, kože, jetre, kao sustav za dostavu lijekova ili u nekim procesima zelene kemije i tretiranja otpadnih voda [9,10,12].

3.1 Struktura

Kitozan (CS) je linearan, polikristaliničan *D*-glukozaminski polisaharid povezan *β*(1→4) O-glikozidnom vezom s promjenjivim brojem *N*-acetil *D*-glukozaminskih skupina raspoređenih u strukturi [11]. Prirodno nije toliko rasprostranjen pa ga se dobiva deacetilacijom hitina (CH) koji je čest u ljušturama rakova i ostalih člankonožaca kao i hifama gljiva, staničnim stjenkama zelenih algi ili nekim vrstama kvaščevih gljivica [12]. Deacetilacija se može provesti enzimskom hidrolizom uz pomoć hitin deacetilaze ili kemijski u lužnatim uvjetima [10]. Kitozan se obično može naći na tržištu sa stupnjem deacetilacije (SD) između 50 – 95%. SD se definira kao omjer *D*-glukozamina i zbroja *D*-glukozamina i *N*-acetil *D*-glukozamina. Stupanj kristalnosti je u direktnoj korelaciji sa SD-om. Kristalnost je maksimalna za hitin (SD=0%) i kitozan (SD=100%). Tipična molekulska masa varira između 50 i 1000 kDa [10-13].



Slika 3. *Kemijska struktura kitozana [12].*

3.2 Svojstva

Zbog stabilne strukture kitozan je obično netopiv u neutralnim vodenim otopinama pri pH=7, međutim otapa se u razrijeđenim vodenim otopinama kiselina pri pH<6, najčešće octenoj kiselini. Slobodne se amino grupe protoniraju pri čemu CS postaje topivi polikationski polimer koji može tvoriti komplekse s polianionima poput GAG-a, alginatima i DNA molekulama [3,11-13]. Kinetika razgradnje kitozana obrnuto je proporcionalna stupnju kristalnosti koji je primarno ovisan o SD. Brojna istraživanja su pokazala da što je SD veći, a molekularna masa manja, razgradnja će biti sporija [9-12,14]. Većina svojstava direktno ovisi o SD tj. o koncentraciji amino grupa koje se mogu protonirati.

3.2.1 Hidrofilnost

Kitozanska hidrofilna površina poboljšava interakciju stanica, njihovo umnažanje i diferencijaciju. Zbog velikog kapaciteta bubrenja, može zadržati i „privući“ tekućinu i stanice na mjestu ozljede ubrzavajući time proces regeneracije [10-12].

3.2.2 Mukoadhezija

Definira se kao mogućnost prianjanja na membranu. Što je veći SD, bit će i veći udio protoniranih amino skupina koji reagiraju s negativnim dijelovima stanice stvarajući stanični okoliš, te se čvršće vežu na staničnu membranu poboljšavajući kitozanovu biokompatibilnost i bioaktivnost. Mukoadhezija je direktno povezana s permeabilnosti stanice. Veća koncentracija pozitivnog naboja će reagirati s negativno nabijenim površinskim proteinima što dovodi do reorganizacije i otvaranja membranskih proteina za izmjenu tvari [10-12].

3.2.3 Hemostatsko djelovanje

Još jedno od svojstava koje se može pripisati polikationskoj strukturi, zaslužno za stvaranje krvnog ugruška, a posljedično sprječavanje krvarenja. U ovom području posebno pogodan se pokazao CS niske molekularne mase. Pošto su krvne stanice negativno nabijene, vrlo lako reagiraju s pozitivno nabijenim CS. Diljem Europe i SAD-a u primjeni su kožni nadomjesci poput HemCon®-a za brzo sprječavanje krvarenja [10-12].

3.2.4 Antimikrobno djelovanje

Odnosi se na antibakterijska i antifungalna svojstva. Predložena su dva mehanizma kako CS djeluje na mikrobe. Prvi mehanizam podrazumijeva promjenu permeabilnosti stanice dok druga teorija predlaže vezanje CS-a na staničnu DNA inhibirajući sintezu RNA mikroba [10-12].

3.2.5 Ostalo

Još neka od svojstava koje je vrijedno spomenuti je CS antitumorsko te analgetičko djelovanje, biorazgradivost i mehanička svojstva – koja su direktno ovisna o strukturi samog nosača tj. njegovoj poroznosti i samoj geometriji pora. Zbog mogućnosti razgradnje lizozimom koji je prisutan u ljudskom tijelu, biorazgradivost *in vivo* mu je pogodna pri čemu se potpuno razgrađuje na manje lance, a metaboliti lako izlaze iz tijela [10-12, 15].

3.3 Metode priprave kitozanskih nosača

Ovisno o metodi priprave i SD kitozana ovisit će i njegova biokompatibilnost. Generalno vrijedi da su ta dva svojstva u direktno proporcionalnom odnosu. Pri pripravi nosača treba skrenuti dodatnu pozornost na detekciju zaostalih proteina koji mogu prouzrokovati alergijske reakcije [12].

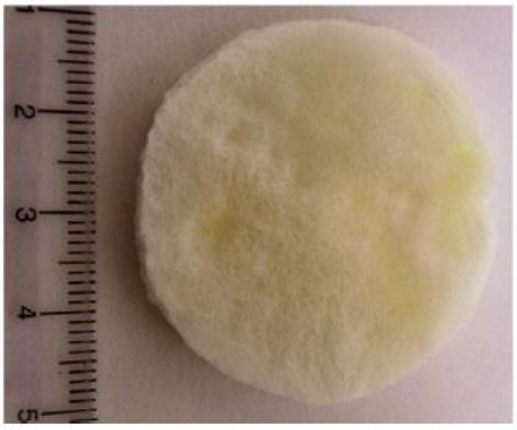
CS se može oblikovati u 2D oblike kao što su filmovi i membrane od nanovlakana ili 3D strukture poput hidrogelova i spužvi [3,6,10,12]. Sporo je topiv materijal u fiziološkom okruženju što mu omogućava prolongiranu upotrebu. Nekad se kombinira s drugim tvarima kako bi mu se poboljšala svojstva. To uključuje faktore rasta poput TGF-*β* (engl. *transforming growth factor*) ili bioaktivne molekule poput proteina koji sadrže RGD sekvencu ili BMP (engl. *bone morphogenic protein*) [3,6,11].

Neke od metoda koje se koriste za pripravu su liofilizacija, agregacija čestica, toplinski inducirano fazno razdvajanje uz geliranje i ekstrakciju, mokro predenje, metode primjenom porogena, elektropredenje, sloj-po-sloj (engl. *layer-by-layer*, LBL) tehnika i korištenje superkritičnog CO_2 za induciranje poroznosti koja se smatra novijim pristupom zelene kemije [3,12,15].

U ovom radu detaljnije će biti opisane metoda liofilizacije i toplinski induciranog faznog razdvajanja uz geliranje i ekstrakciju koje se poslije i koriste u laboratorijskim ispitivanjima.

1) Liofilizacija

Uobičajena je i jednostavna metoda, u stranoj literaturi znana kao „*freeze drying*“ (FD), a zasniva se na smrzavanju uzorka u pogodnom kalupu te potom sušenju tj. sublimaciji otapala pri sniženom tlaku i temperaturi, čime se dobiva porozna struktura [3,12,15-17]. Za smrznute otopine kitozana, fazno razdvajanje se događa između viskozne polimerne komponente i razrijeđenog otapala (najčešće octene kiseline). Na proces utječe koncentracija, temperatura, aditivi te sami kalupi za otopine. Primijećeno je kako se uz nižu temperaturu i više koncentracije povećava poroznost i dobivaju pravilnije strukture usred bolje nukleacije i rasta kristala [15,17]. Prema podacima iz Tuzlakoglu i sur. [15] veličina pora nosača pripremljenih liofilizacijom je između 1 i 250 μm, ovisno o uvjetima smrzavanja. Glavni problem metode je uklanjanje preostalog otapala što troši energiju i vrijeme. Tako pripremljeni nosači često sadrže topive CS-acetat soli zbog kojih lako bubre i otapaju se u neutralnom mediju zbog čega je potrebna temeljita neutralizacija s NaOH te potom ispiranje destiliranom ili deioniziranom vodom kako bi se postigao neutralni pH [15,17].



Slika 4. *CS spužva dobivena procesom liofilizacije (preuzeto iz [17]).*

2) Toplinski inducirano fazno razdvajanje uz geliranje i ekstrakciju

Vrlo slična liofilizaciji, razvila se kao alternativa kako bi se uklonio problem zaostalog otapala. U stranoj literaturi postupak je opisan pod terminom „*freeze gelation*“ (FG). U procesu se koriste lužnati uvjeti kako bi došlo do geliranja materijala. Pri tom medij mora biti ispod točke geliranja tj. neutralizacija se događa ispod točke ledišta tretirane otopine [15]. Neutralizacija i geliranje se događaju u jednom koraku pri čemu se koristi NaOH/EtOH neutralizirajući medij pri uvjetima snižene temperature tijekom 24 sata. Nakon toga, nosači se ispiru etanolom te suše [18,19]. U istraživanju T. Ikeda i sur.. [20] je primijećeno kako povećanjem koncentracije CS zidovi pora su bili deblji, a raspodjela homogenija. Također je primijećeno da porastom koncentracije CS opada poroznost.

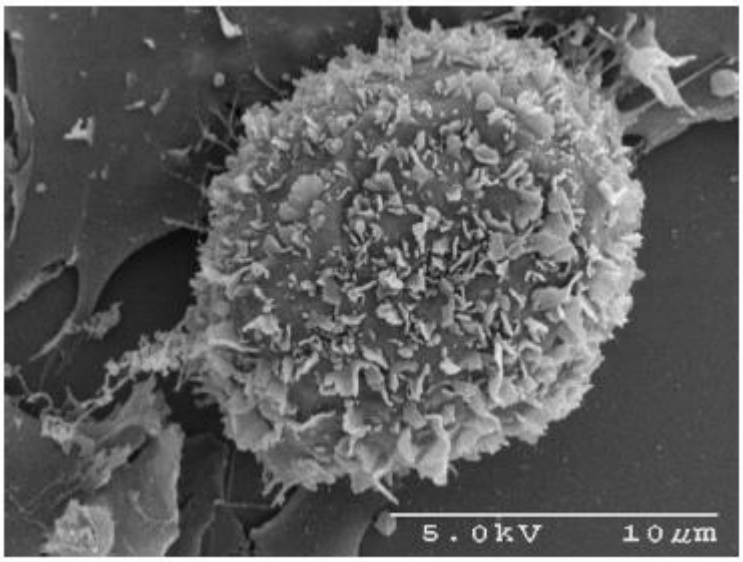
Najčešće otapalo koje se koristi je octena (HAc) ili mravlja kiselina, ali pošto su obje neugodna mirisa, radilo se na istraživanju alternativnih opcija. Chen i sur. [13] su ispitivali utjecaj glikolne, jabučne i askorbinske kiseline kao potencijalnih otapala i njihov utjecaj na svojstva kitozana. Istraživanje je pokazalo kako je glikolna kiselina najsličnija HAc. Viskoznost CS pri tome je najveća i bubrenje u vodenom mediju pojačano. Kod askorbinske kiseline je uočeno povećanje čvrstoće membrana. Struktura askorbinske kiseline se pri tom mijenja oksidirajući hidroksilne u karbonilne skupine koje reagiraju s amino skupinama CS-a pri čemu dolazi do umreživanja strukture.

3.4 Najčešća primjena

3.4.1. Hrskavica

Jednom oštećena, hrskavica ima malu sposobnost da se sama obnovi zbog odsutnosti krvnih žila i limfnog sustava [2,3,10,11,15,21]. Ciljane stanice koje grade hrskavicu zovu se hondrociti, a isprobano je više vrsta u njenom inženjerstvu. Za razliku od klasičnog kirurškog pristupa, novije metode temelje se na liječenju stanicama koje su imobilizirane na biomaterijalu. Pristup je slijedeći: izolirani se hondrociti nasade *in vitro* u biokompatibilni stanični okoliš gdje se uzgajaju kako bi se mogli implantirati *in vivo* [11]. CS podupire stvaranje specifičnih ECM proteina u ljudskim hondrocitima poput kolagena tipa II koji daje čvrstoću, agrekana koji amortizira udarce i ostalih GAG-a. Pri tome se potiče hondrogeneza,

a hondrociti zadržavaju karakterističnu okruglu morfologiju stanica i imaju normalan fenotip.



Slika 5. *SEM mikrograf hondrocita vezanog za površinu kitozana (preuzeto iz [11]).*

Pri poticanju hondrogeneze CS-nosači su se također koristili kao sustavi za dostavu faktora rasta, proteina, citokina ili određenih gena koji pospješuju proces. CS kompleksi efektivnije i brže regeneriraju hrskavicu [3,10,11,15,21].

U jednom istraživanju [21] uspoređivani su kompleksi CS-alginat-hijaluronska kiselina pripremljeni s ili bez RGD kovalentno vezanog proteina. Uzgojeni graftovi s hondrocitima implantirani u hrskavice zečjih koljena pokazali su djelomičnu regeneraciju u roku od mjesec dana. CS-alginat nosači daju dobre rezultate i često su korišteni zbog sličnosti s GAG-ima poput hondroitin-6-sulfata i hijaluronske kiseline (HA) [10]. Moguća je priprema CS-HA nosača upotrebom mokrog predenja. Takvi nosači mogu doprinijeti boljem međusobnom prianjanju stanica i sintezi agrekana. Još neki od kompleksa koji su u primjeni uključuju CS-hondroitin-6-sulfat-dermatan sulfat kompleks, CS-kolagen tipa II-hondroitin-sulfat-TGF-β1 i CS-alginat-HA-RGD kompleks. Testirano na zečjim hondrocitama, potpuni oporavak tkiva je primijećen nakon 6 mjeseci od implantacije materijala [15].

U liječenju osteoartritisa preporučena je metoda injektiranja gela u oštećeni zglob. CS se pokazao kao mogući kandidat. Pripremljena su CS-alginat zrnca u hidrogelu te injektirana u zglobove zečeva nakon čega se primijetilo smanjenje upale i sprječavanje dodatne razgradnje hrskavice. Također se radilo i na staničnom pristupu transplantacije matičnih stanica pomoću nosača. Stanice mezenhima su inkapsulirane u kompleks hondroitin sulfata i CS pokazale su pozitivan utjecaj na diferencijaciju i regeneraciju hrskavice. Između 14. i 28.

dana od injektiranja primijećen je porast koncentracije GAG-a i ukupnog kolagena. U pripravi nestaničnih nosača priređen je CS-alginat na principu kontroliranog smrzavanja slojeva kako bi se postigla struktura nosača što sličnija hrskavici. Orijentacija pora je utjecala na kolagenska vlakna i njihovu raspodjelu po površini nosača što bi potencijalno moglo potaknuti hondrogenezu i poboljšati prokrvljenost okružujuće kosti [22].

3.4.2. Kost

U odraslom ljudskom tijelu ima 206 kosti koje podupiru tijelo i služe kao mjesto vezivanja mišića. Pohranjuju ione poput Ca^{2+}, PO_4^{3-} i drugih koji se koriste u metabolizmu i proizvode krvne stanice u koštanoj srži. Kad kost pukne, tijelo šalje citokine i faktore rasta kako bi se potaknula infiltracija osteoprogenitorskih stanica na mjesto ozljede te započne njihov rast i razmnožavanje. Iz njih se poslije razvijaju osteoblasti koji će služiti kao građevne stanice nove kosti. Dosadašnja metoda popravka kostiju primjenjivala je autologni presadak (graft) i može biti bolna, oštetiti živce u procesu i sl. Stoga se usmjerilo na alternativni pristup inženjerstva koštanog tkiva (engl. *bone tissue engineering*, BTE) [1,3,10,21]. Tri su glavna pristupa BTE-a:

1) pristup usmjeren na stanični okoliš;
2) pristup usmjeren na faktore rasta;
3) pristup usmjeren na stanice.

U 1) pristupu nosač se implantira u oštećenu kost i regeneracija ovisi o infiltraciji osteoprogenitorskih stanica u pore nosača tj. njihovoj sposobnosti da luče faktore rasta. Prednost je što su takvi nosači odmah spremni za upotrebu i prigodni su kao sustavi za dostavu faktora rasta i matrica za transplantaciju, ali ih je teško same koristiti zbog smanjene osteokonduktivnosti – sposobnosti stvaranja koštanog tkiva.

Kada je pristup usmjeren na faktore rasta nosači se najčešće kombiniraju s BMP ili TGF-β faktorima. GF se uvode kao potencijalno rješenje za problem vaskularizacije. Glavni problem takvih nosača je održavanje visoke koncentracije GF i njihovo kontrolirano otpuštanje kako bi se postigla željena osteokonduktivnost.

U staničnom pristupu 3) kombiniraju se stanice kosti izolirane iz donora sa staničnim okolišem nosača kako bi se dizajnirali nosači za implantaciju koštanih presadaka (graftova) [1,6,10].

CS se u BTE može koristiti sam ili u kombinaciji s drugim polimerima kao što je svila, kolagen, elastin i dr. te s kalcij-fosfatnom biokeramikom. CS poboljšava osteokondukciju i regeneraciju kosti potičući umnažanje osteoblasta i depoziciju minerala te ima antimikrobna svojstva. Koštani ECM se sastoji od organske (kolagenske) i anorganske faze koja sadrži HAp. Osteokonduktivnost omogućuje angiogenezu – stvaranje novih krvnih žila iz već postojećih i infiltraciju osteoprogenitorskih stanica [1,10,15,21]. U BTE-u, veličina zrna materijala jedan je od kritičnih parametara. Što je veličina manja, materijal pokazuje bolje mogućnosti prianjanja stanica, njihove sposobnosti umnažanja i diferencijacije. Zbog toga je sve češća upotreba CS nanovlakana [6]. Idealna veličina pora za BTE je između 200 i 600 μm [10]. Iako je kitozanova fleksibilnost jedno od poželjnih svojstava, također u BTE može predstavljati problem zbog nedovoljne mehaničke stabilnosti tj. čvrstoće. Zato se često koriste kompoziti CS i biokeramike. Pri tome se nastoji pronaći ravnotežni omjer CS i HAp-a u kompozitu jer povećanjem udjela HAp-a smanjuje se sposobnost bubrenja nosača, ali je također i čvršći i sporije se razgrađuje. U primjeni su još i CS-CH-$CaCO_3$, CS-HAp ili $Ca_3(PO_4)_2$, CS-HAp-β-TCP i fosforilirani CS biokeramički nosači za poboljšanje mehaničkih svojstava [10,15,21]. Kalcijeva komponenta ubrzava regeneraciju jer su osteoblasti osjetljivi na Ca^{2+} koji je inače sadržan u koštanoj ECM. CS-HAp pasta je korištena za regeneraciju oštećene cjevanice. Nakon tjedan dana, kost se počela regenerirati što je trajalo narednih 20 tjedana, na temelju čega se zaključilo kako je pasta pogodan materijal za ispunu kosti [21].

Druga značajna primjena CS kompozita u BTE je vezana za njegovo djelovanje kao sustava za dostavu tvari ili za modifikaciju strukture koja poboljšava prianjanje stanica i regeneraciju. Rađena su istraživanja na bedrenim kostima zečeva s CS-brušit nosačem koji je imao vezane VEGF i PDGF faktore rasta. Rezultati su pokazali kako se PDGF puno brže otpuštao nego VEGF. Na temelju histološke i morfološke analize zaključeno je da oba potiču stvaranje kosti [3]. Zabilježeno je kako su CS-TCP spužve korištene kao sustavi za dostavu GF-a, konkretnije PDGF [15]. Još neki od korištenih sustava uključuju CS-nanoHAp/kolagen/PLA, CS-mikročestice s govođim albuminskim serumom-BMP-2, CS-PLGA-mikročestice heparina, CS-kolagen-BMP-7-PDGF ili CS-kolagen-BMP-2-PDGF [10,21]. RGD sekvenca je od najvećeg značaja u BTE-u. U jednom istraživanju CS je modificiran s RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) sekvencom. Rezultati su ukazali na veću biokompatibilnost CS nosača za regeneraciju kosti [15]. Prema podacima iz Muzzarelli i sur. [21], primjenom CS-RGD-HA kompleksa, nosač je razgrađen u roku od 5 tjedana s ili bez aktivnosti lizozima.

Još neki od interesantnih sustava za spomenuti su CS-imidazol koji je kovalentno vezan, a djeluje kao antioksidans potičući mineralizaciju, što ima pozitivni učinak na zarastanje kosti. Upotrebom vijaka od nehrđajućeg čelika premazanih CS na koji su naneseni antibiotici moguće je regenerirati zaražene i oštećene kosti pri čemu je CS pogodan zbog antimikrobnih svojstava. Od kompozita s metalima pripravljen je titanij s premazom od CS-silan-glutaraldehida koji djeluje kao promotor osteogeneze i vezanja osteoblasta. Vrijeme razgradnje premaza bilo je 8 tjedana [21].

3.4.3. Koža

Gubitak kože ili neke od njenih funkcija prouzrokovan ozljedom, opeklinom ili bolešću je učestali problem u svakodnevnom tretiranju ozljeda. Do sada, za popravak takvih stanja su se koristili različiti tipovi presadaka-graftova (ksenograft, alograft, autograft) ili kožni nadomjesci [3]. Ksenogeni presadak (ksenograft) podrazumijeva donorski graft koji potječe od druge vrste (životinjske), alogeni presadak (alograft) kada se tijelo donora i tijelo primatelja razlikuju, a samopresadak (autograft) kada transplantirani dio potječe od donora te se transplantira na neki drugi dio njegova tijela tj. on je ujedno i primatelj [1]. Međutim, pošto je problematično naći odgovarajućeg donora i može doći do brojnih imunoloških komplikacija, alternativna metoda je primjena inženjerstva tkiva. Nosači u inženjerstvu tkiva trebaju imati dobru raspodjelu mikro i makro pora. Mikropore su neophodne za komunikaciju između stanica dok stanice koriste makropore za rast i migraciju.

CS nosači koriste se kao kožni nadomjesci jer su netoksični, čuvaju ranu od vanjskih utjecaja, imaju antibakterijska svojstva, a održavaju vlažan okoliš s dovoljnom opskrbom kisika za ubrzanu regeneraciju. Neki od primjera uključuju CS-nanokolagen tipa I sastavljen od dva sloja. Gornji, orijentiran prema zraku služi za drenažu upijenih tvari dok donji upija tvari iz rane pri tome održavajući vlažnost. Ovakav nadomjestak poboljšava prianjanje fibroblasta, a *in vivo* studije su pokazale da se može upotrebljavati u medicinske svrhe jer potiče epitelizaciju [3,10].

CS-fukoidan kožni nadomjestak je korišten za tretiranje opeklina. Pokazao se korisnim jer značajno ubrzava zatvaranje rana i obnavljanje kože. Liu i sur. [3] također navode primjer CS-nanoTiO_2 nosača koji služi kao umjetna koža. Nosač je testiran na životinjskom uzorku te je pokazao bržu i bolju regeneraciju tkiva. Nedostatak CS je u mehaničkim svojstvima i činjenici da se brzo razgrađuje, pogotovo u kiselom mediju ili uz prisustvo lizozima. To se nastoji poboljšati umreživanjem s drugim materijalima. Jedno istraživanje je

opisalo proces pripreme CS-želatine metodom liofilizacije u kojoj su uzgojeni keratinociti i fibroblasti *in vitro* kako bi stvorili zamjenu za kožni dvosloj. Želatina pri tome može poboljšati hidrofilnost nosača [3,10].

Još neki od CS nosača koji su istraživani uključuju kombiniranje s alginatom, kolagenom, hondroitin sulfatom, heparinom, derivatima dekstrana, bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*) i dr. [3,10].

3.4.4 Živci

Regeneracija živaca je dosta problematično područje. Živčani sustav se dijeli na centralni (CNS) i periferni (PNS). CNS uključuje mozak i leđnu moždinu, a PNS ganglije i živčano tkivo van CNS-a. Pošto su testni primjerci u laboratoriju miševi, čiji su aksoni kraći i manji nego ljudski, modeli često nisu pogodni. Dodatni problem predstavlja atrofija ciljanih tkiva što otežava regeneraciju. Zato se testiranje *in vivo* mora obavljati na većim životinjama [6].

Pri inženjerstvu živaca, ciljane su Schwannove stanice koje pružaju potporu i doprinose stvaranju mijelinske ovojnice oko aksona. 3D nosači korišteni u regeneraciji živaca bi trebali poticati mijelinaciju i rast preko Schwannovih stanica pri čemu su često korištena nanovlakna. Stratton i sur. navode rezultate istraživanja s CS hidrogelovima koji sadrže neuroprogenitorske stanice CNS. Inovativnost eksperimenta je u tom da je to jedan od rijetkih samo-zacjeljujućih hidrogelova i efektivan je za regeneraciju živaca *in vivo* [6].

Za laminin je poznato kako pomaže rast živaca *in vivo*. U jednom istraživanju pripremljene su CS cjevčice omotane peptidima laminina koje bi služile za usmjeravanje regeneracije živaca [21]. Trenutno se proizvode dodavanjem određenih proteina koji podržavaju popravak živaca i regeneraciju podešavanjem bioloških svojstava. Faktor rasta deriviran iz glija stanica (od kojih su glavne Schwannove) i laminin su uklopljeni s CS u cjevčice. Uz to je priređena i testna grupa sa samim CS. Rezultati su pokazali povećanje regeneracije koristeći modificirani CS u odnosu na testnu grupu. Nakon 12 tjedana primijećen je i povratak osjetilne funkcije kod modificiranog CS [21].

4 PROCESI NA MOLEKULARNOJ RAZINI

Većina termina spomenutih u prijašnjim poglavljima poput glikozaminoglikana, RGD sekvence, integrina i izvanstanične matrice pokušat će biti detaljnije objašnjena u ovom poglavlju kako bi se jasnije dočarala slika i kompleksnost samog procesa koji se zbiva u tkivima prilikom regeneracije. Od tvari koje sastavljaju stanice do specifičnih molekula na koje se kitozan veže, te utjecaj nekih pomoćnih molekula poput fibronektina koje omogućavaju bolju primjenu i uspjeh pri tim procesima.

Sve stanice luče specifičnu ECM koja je zapravo skup molekula u određenom mikro okruženju. Sastoji se od vode, kolagena, GAG i proteoglikana te služi kao rezervoar faktora rasta [24,25]. Daje potporu i oblik tkivu i omogućava migraciju stanica *in vivo* dok *in vitro* omogućava rast životinjskih stanica pričvršćenih na površinu. ECM igra ulogu u signalizaciji stanica uz pomoć raznih površinskih faktora rasta i prianjajućih molekula, pri čemu su glavni receptori za raspoznavanje stanica integrini i proteoglikani [25].

Glikozaminogikani (GAG) su dugi nerazgranati polisaharidi koji sadrže ponavljajuću jedinicu disaharida. Ponavljajuća jedinica sadrži *N*-acetilgalaktozamin (GalNAc) ili *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) i šećernu uronsku kiselinu kao što je glukuronska (GlcA) ili iduronska (IdoA) kiselina. Iznimno su negativno nabijene molekule koje lako reagiraju s polikationskim molekulama poput CS, a nalaze se na površini stanice ili ECM. Vrlo su viskozni i otporni na tlak što je razlog zašto se i prirodno nalaze u zglobovima kao lubrikanti, a zbog rigidne strukture pružaju potporu stanici i omogućavaju migraciju tvoreći kanale između stanica [26].

Od biološke važnosti su: hijaluronska kiselina (nekad nazivana i hijaluronan ili hijaluronat), hondroitin sulfat, dermatan sulfat, heparin, heparan sulfat i keratan sulfat. Kovalentno vezani s proteinima tvore proteoglikane poput agrekana, brevikana, dekstrana itd., osim HA koja se ne veže, ali može tvoriti nekovalentne komplekse s proteinima [26].

Tablica 1. *Prikaz glavnih funkcija biološki važnih GAG (modificirano iz [26]).*

GAG	Lokacija u tijelu	Biološka važnost
Hijaluronska kiselina	Sinovijalna tekućina, umjetna hrskavica, koža, ECM vezivnog tkiva	Praktički sve stanice u tijelu mogu je sintetizirati. Važna u razvoju i organizaciji tkiva te transdukciji signala.
Hondroitin sulfat	Hrskavica, kosti, srčani zalisci	Najčešći GAG, vezan s proteinom stvarajući proteoglikane poput agrekana i brevikana. Značajna komponenta ECM-a. Manjak u hrskavici uzrokuje osteoartritis.
Heparan sulfat	Dijelovi površine stanica	Tvori brojne proteoglikane koji se vežu na GF poput VEGF. Djeluju kao antikoagulansi.
Heparin	Unutrašnjost arterija pluća, jetre i kože	Koristi se kao antikoagulans, dok *in vivo* ima antibakterijski potencijal
Dermatan sulfat	Koža, krvne žile, srčani zalisci, tetive, pluća	Ima funkciju u koagulaciji i zacjeljivanju rana.
Keratan sulfat	Rožnica, kost, hrskavica	Obično povezivan s proteoglikanima koje tvori poput lumikana, keratokana itd.

Druga važna komponenta su različiti proteini koji sačinjavaju ECM, a za glavni protein ECM-a se smatraju različite vrste kolagena od kojih primarno tip I, III, IV, V i GAG tip XI. Svi ti proteini zajedno su zaslužni za potporu i razne biokemijske funkcije poput vezanja za druge ECM proteine, GF, signalne receptore i molekule što je regulirano specifičnim domenama svakog proteina [8,25].

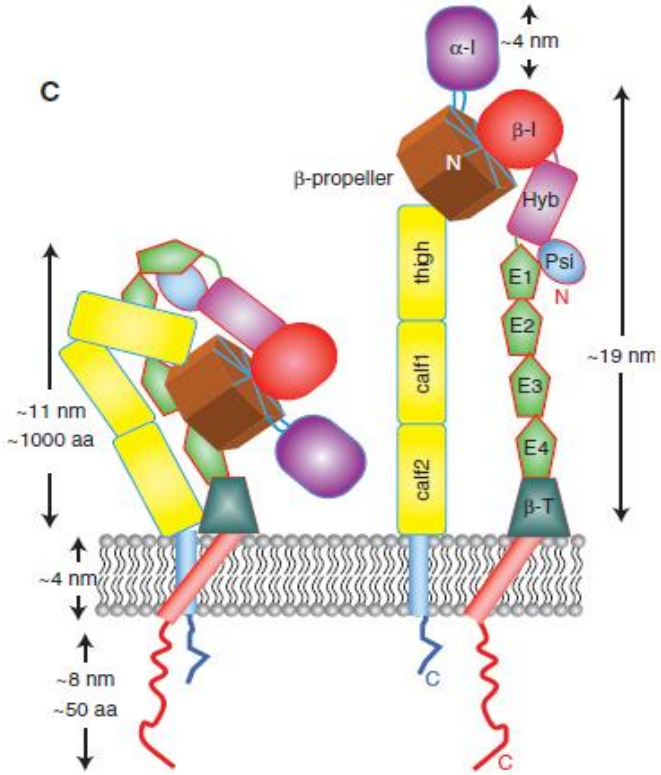
Dobar primjer je fibronektin kojeg proizvode, između ostalih stanica, i fibroblasti. FN je dimer koji se može vezati na GAG poput kolagena i neke vrste proteoglikana. Jedna od velikih funkcionalnih domena je FNIII koja sadrži RGD sekvencu odgovornu za vezanje integrina [8,25].

Kao što je već spomenuto, prianjanje stanica na ECM događa se interakcijama transmembranskih proteina – integrina sa specifičnim slijedom aminokiselina poput RGD,

IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) sekvence ili proteinima koje ih sadrže kao što su FN i laminin. Male sekvence takvih proteina se imobiliziraju na biomaterijal – u ovom slučaju CS što dovodi do povećanja bioaktivnosti, boljeg prianjanja stanica i njihovog rasta i umnažanja. Pri tome, najlakša je metoda fizikalne adsorpcije zbog svoje reverzibilnosti i činjenice da proteini zadržavaju svoju biološku aktivnost, nasuprot kovalentnog vezanja koje je ireverzibilno, ali imobilizacija je bolja i nosač je stabilniji. To je upravo nedostatak fizikalne adsorpcije – postojanje opasnosti da se proteini lako desorbiraju s površine. Provedeno je jedno komparativno istraživanje na ljudskim dentalnim stanicama uspoređujući CS-nosač na koje je vezana RGD sekvenca ili FN, što je rezultiralo boljim vezanjem integrina na FN izolirane RGD sekvence [27].

Integrini su transmembranski heterodimeri sastavljeni od 18α i 8β podjedinica koje se mogu nekovalentno povezati u 24 kombinacije. Vežu se na razne ECM molekule pri čemu raspoznaju RGD sekvencu i omogućuju brz odgovor na procese na površini stanice kao što je npr. signalizacija trombocitima. Karakterističnog su oblika s „glavom“ koja veže ligande i citoplazmatskim „repovima“. Ovisno koji protein integrin veže, takvi će biti i specifični signali tj. odziv stanice. Iz toga proizlazi svojstvo da utječu na molekulski sastav i svojstva ECM-a i odašilju sukladne mehaničke i kemijske signale. To u koordinaciji s aktinskim citoskeletom stanice koja se veže određuje koji tip integrina će biti korišten u procesu. RGD služi kao mjesto vezanja α i β podjedinice, dok aminokiseline koje ju okružuju određuju specifičnost vezanja koje se događa na kationskim mjestima, pri čemu je proces ovisan o divalentnim Mg^{2+}, Ca^{2+} ili Mn^{2+} ionima [8,25].

Pošto integrini sami po sebi nisu katalitički aktivni, za prevođenje u aktivnu konformaciju koriste se enzimski kompleksi u citoplazmi. Kada su neaktivni tj. savinuti i disulfidno vezani, integrini se ne mogu vezati ni za ECM ni za druge receptore (što je bitno za kruženje stanica kao što su limfociti). Kako bi integrin prešao u aktivnu – ispruženu konformaciju, treba pomoć talina čiji amino kraj reagira s „repovima“ integrina β podjedinice u citoplazmi, dok se C-kraj veže na aktinski citoskelet tj. mikrofibrile [8,25]. Kako kitozan sam po sebi nema RGD sekvencu, modificira ga se s FN kako bi ostvario bolje vezanje sa stanicama.



Slika 6. *Prikaz integrina u neaktivnoj i aktivnoj konformaciji [8].*

Brojna istraživanja provedena su na temu adsorpcije FN na kitozanski nosač i staničnog odgovora. Amaral i sur. [28] proveli su istraživanje o adsorpciji FN na CS nosač sa 85% i 96% deacetiliranosti na koje su nasađene stanice endotelija. Vezanje proteina je praćeno obilježavanjem radioaktivnim izotopima. Adsorpcija je praćena u periodu od 12 sati i primijećeno je da najveća koncentracija FN je adsorbirana u prva 3 sata nakon čega se proces značajno usporio. Također, na 85% deacetiliranog CS nosača bilo je adsorbirano manje FN što je pokazalo slabiju adheziju stanica. FN potiče vezanje na $\alpha_5\beta_i$ i $\alpha_v\beta_3$ integrine. U dodatnom istraživanju [9], 96% deacetilirani CS-nosač pokazao je dvostruko bolju sposobnost adsorpcije i zadržavanja adsorbiranog FN. Treba napomenuti kako, jednom kada se nosač izložio u kulturu stanica, došlo je do desorpcije dijela FN zbog kompeticije s drugim prisutnim proteinima. Nosač 2 (SD=96%) je otporniji na enzimsku razgradnju što je uzrokovalo blagu upalu, dok se nosač 1 (SD=85%) brže razgradio, ali je okupirao više imunoloških stanica za zbrinjavanje upale. Amaral i sur. [14] su također radili na FN-CS imobilizaciji nosača rekombinantnim fragmentom ljudskog fibronektina rhFNIII$_{7\text{-}10}$. Nastojalo se razviti porozne CS-nosače u obliku cjevčica za primjenu kod ozljeda leđne moždine. Nosač

sa SD od 96% se pokazao boljim u adsorpciji rekombinantnog FN i imao je više domena za vezanje stanica što tumači hipoteza da ima manji udio slobodnih amino grupa.

5 EKSPERIMENTALNI DIO

5.1 Materijali

Za pripravu kitozanskih nosača korišteni su:

- Kitozan velike molekulske mase (HC), M_r = 310 000 – 375 000 (Sigma-Aldrich, SAD), SD > 75%;
- Kitozan srednje molekulske mase (MC), M_r = 190 000 – 210 000 (Sigma-Aldrich, SAD), SD > 75%;
- Octena kiselina, CH_3COOH p.a, ≥ 99,8% (Sigma-Aldrich, SAD);
- Natrijev hidroksid u zrncima, NaOH p.a, M_r=40,00 (Gram-Mol, Hrvatska);
- Etanol, C_2H_5OH p.a, 96% (Kefo, Slovenija);
- Destilirana voda.

5.2 Priprava poroznih struktura

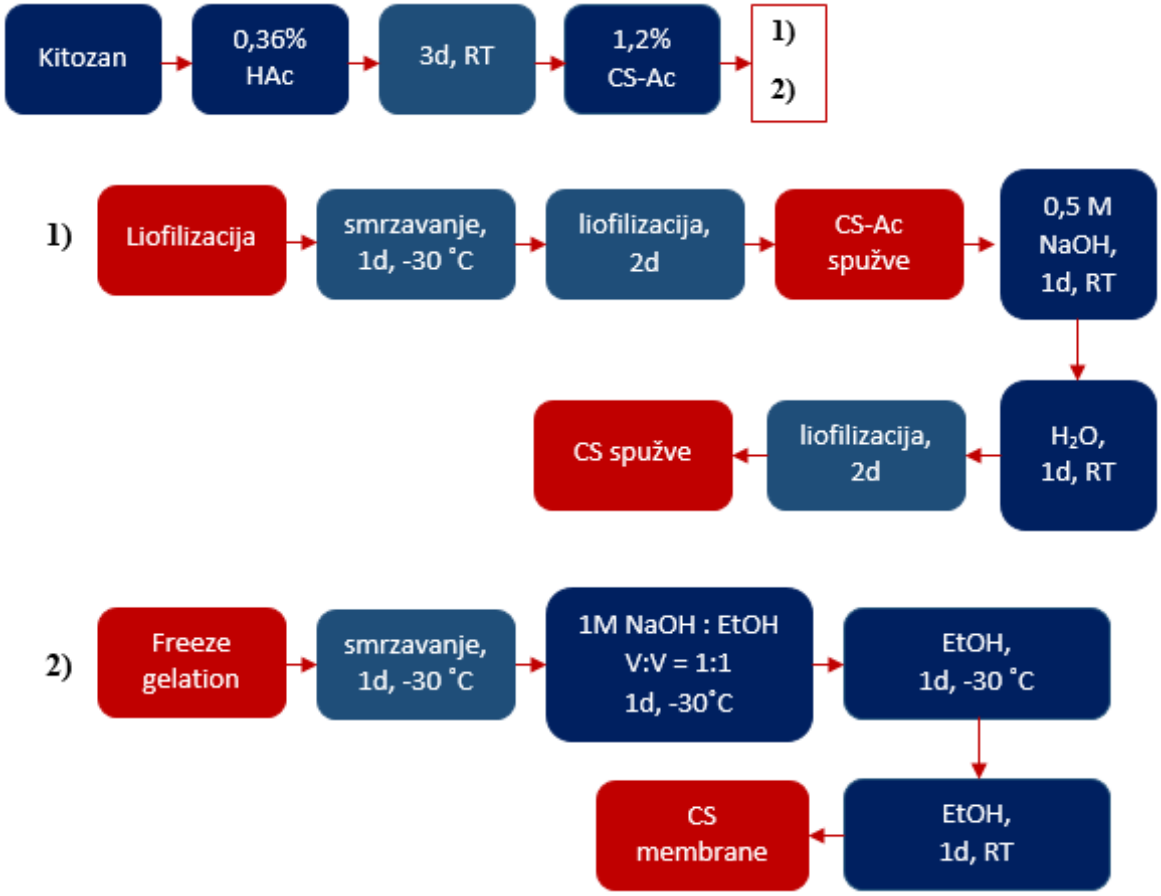
Pripremljene su 1,2%-tne otopine kitozana velike (HC) i srednje (MC) molekulske mase u 0,5%-tnoj octenoj kiselini (HAc). Otopina se miješala 3 dana na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi te se potom filtrirala. Porozne strukture dobivene su pomoću dvije metode priprave (slika 7).

5.2.1 Liofilizacija

HC i MC otopine stavljene su u mikrotitarske pločice s 24 bunarčića i opterećene staklom obloženim aluminijskom folijom te smrznute. Nakon smrzavanja od 24 sata na temperaturi od -30 °C, pločice su prebačene u liofilizator na 2 dana sublimacije pri čemu se dobivaju CS-Ac spužvice. Suhi uzorci su potom neutralizirani 0,5 M otopinom NaOH 24 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon neutralizacije, slijedi višekratno ispiranje destiliranom vodom do neutralnog pH. Tako isprani uzorci su podvrgnuti novom tretmanu liofilizacije kako bi se dobile potpuno suhe spužve.

5.2.2 Toplinski inducirano fazno razdvajanje uz geliranje i ekstrakciju

Otopine HC i MC pripremljene prema poglavlju 5.2 ulivene su u aluminijske kalupe te opterećene staklom. Nakon 24 h smrzavanja pri temperaturi od -30 °C, uzorci su uronjeni u neutralizirajući medij 1 mol/dm^3 NaOH i EtOH u volumnom omjeru 1:1 na 24 h pri temperaturi od -30 °C. Potom, gelirane strukture su uronjene u EtOH na 24 sata pri istoj temperaturi. Konačno, uzorci su uronjeni u EtOH pri sobnoj temperaturi preko noći te ostavljeni da se suše pri atmosferskim uvjetima.



Slika 7. *Dijagram toka priprave kitozanskih nosača*

5.3 Karakterizacija

5.3.1 Pretražna elektronska mikroskopija

Uzorci su karakterizirani pretražnim elektronskim mikroskopom (engl. *scanning electron microscope* – SEM) TESCAN Vega3SEM Easyprobe pri energiji elektronskog snopa od 10 keV. Neposredno prije snimanja uzorci su napareni zlatom i paladijem u trajanju od 120 sekundi.

5.3.2 Bubrenje

Bubrenje kitozanskih poroznih struktura ispitano je u vodenom mediju tijekom 24 sata pri temperaturi od 37 °C. Stupanj bubrenja (*SB*) određen je gravimetrijski na temelju razlika mase suhog i mokrog uzorka, izračunat prema sljedećoj formuli:

$$SB = \frac{m(mokri) - m(suhi)}{m(suhi)} \quad (1)$$

5.4 Statistička obrada

Rezultati eksperimentalnih mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. Provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) dviju grupa uzoraka uz kriterij za značajnu razliku $p < 0.05$.

6 REZULTATI I RASPRAVA

6.1 Mikrostruktura poroznih nosača

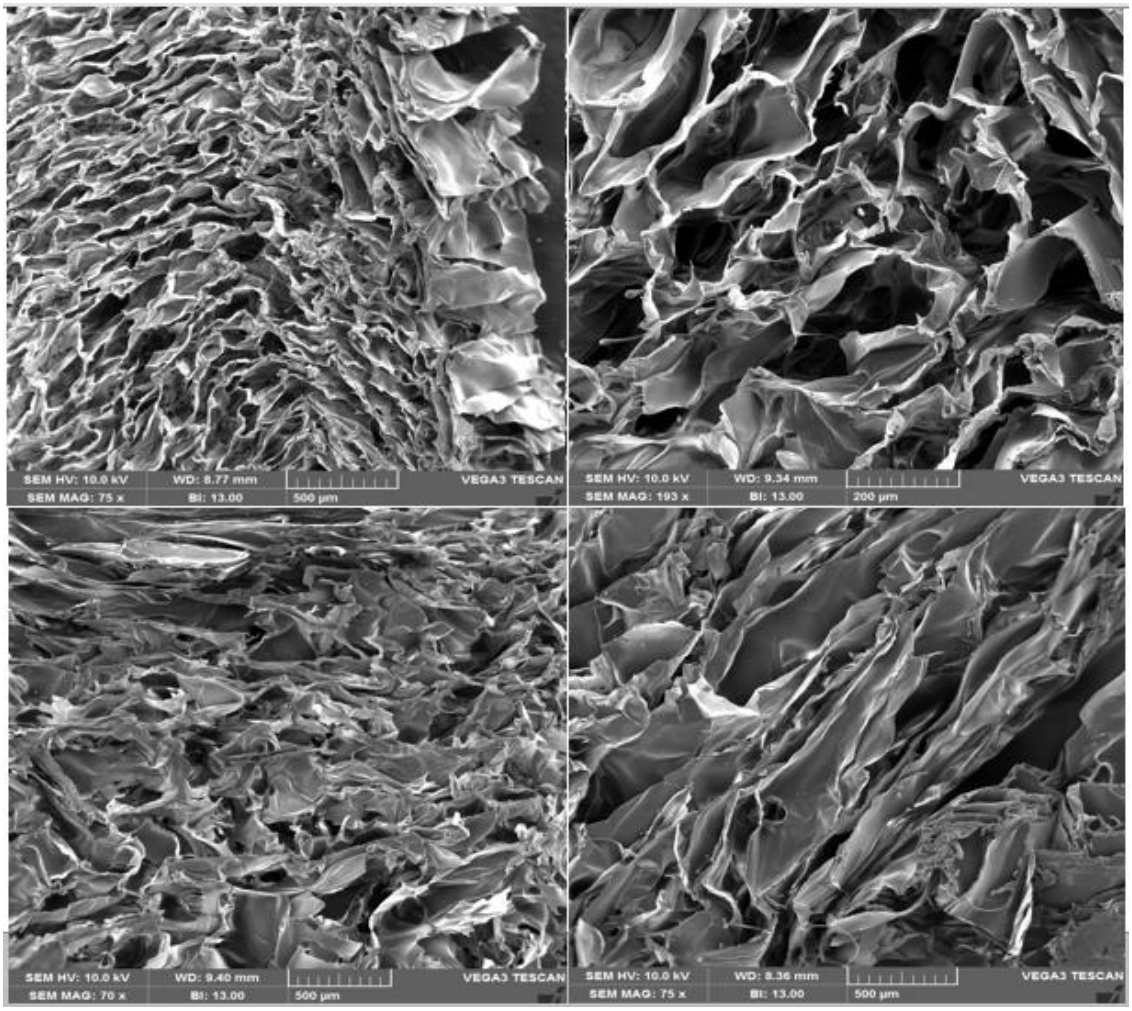
Mikrostrukture poroznih nosača pripremljene prema metodama opisanima u poglavljima 5.2.1 i 5.2.2, karakterizirane pretražnim elektronskim mikroskopom prikazane su slikama 8 – 10.

MC i HC spužve pripremljene metodom liofilizacije pokazuju dva različita tipa struktura kojima su dodijeljeni brojevi I (homogena struktura) i II (nehomogena struktura). Do razlike u strukturi najvjerojatnije je došlo zbog različitih uvjeta nukleacije kristala otapala (leda) na površini nosača i kalupa [29]. Iz danih mikrografa (slika 9 i 10), kod spužvi tipa MC-I i HC-I uočava se visoko porozna struktura, s međusobno povezanim porama kroz cijeli volumen uzorka. Homogenije su u odnosu na tip II kod kojeg je struktura listasta i nehomogenija zbog različitih smjerova rasta leda tijekom procesa smrzavanja. Ne uočava se značajnija razlika između HC i MC struktura u odnosu na molekulsku masu. Vizualno procijenjena veličina pora nosača pripremljenih liofilizacijom prikazana je u tablici 2:

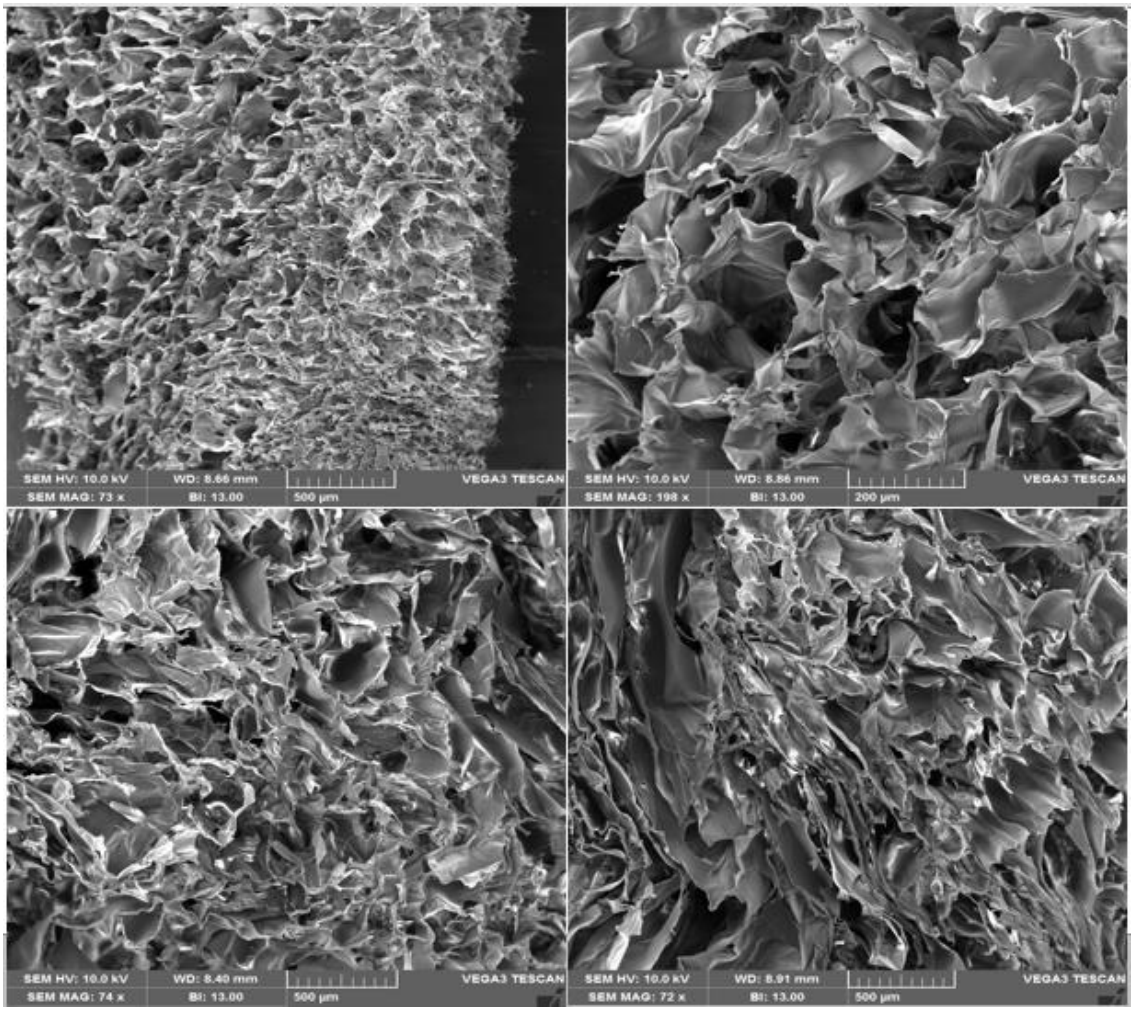
Tablica 2. *Veličina pora nosača pripremljenih liofilizacijom.*

Tip nosača	Veličina pora /μm
MC-I	150-300
MC-II	100-225
HC-I	100-350
HC-II	150-250

Prema literaturi, optimalna veličina pora odgovarajuća za uzgoj stanica u inženjerstvu koštanog tkiva iznosi 200-600 μm [10], hrskavice 200-400 μm [32], a za inženjerstvo kožnog tkiva je preporučljiva veličina pora 20-125 μm [33]. Pri regeneraciji živaca ovisno o mjestu regeneracije se određuje željena veličina: za aksone su primjereniji nosači 200-750 μm ili čak par milimetara, dok za same neurone oko 100 μm [32]. Pore nosača bi trebale biti dovoljno velike omogućavajući neometan dotok hranjivih tvari, a dovoljno male kako bi se spriječila migracija stanica. S druge strane, povoljan omjer veličine samih stanica i pora nosača osigurava da stanice mogu lako prelaziti s nosača na oštećeno tkivo [32].

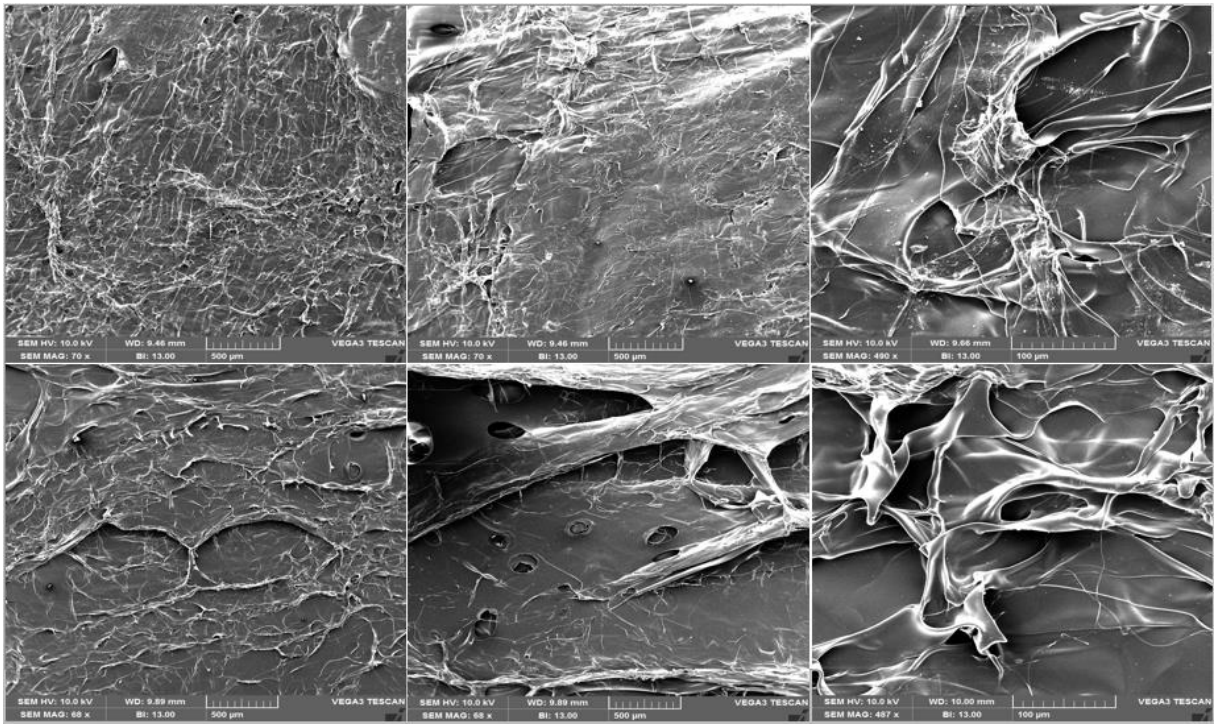


Slika 8. *SEM mikrograf MC kitozanskih poroznih nosača strukture I (gornji red) i II (donji red) pripremljenih liofilizacijom pri različitom uvećanju.*



Slika 9. *SEM mikrograf HC kitozanskih poroznih nosača strukture I (gornji red) i II (donji red) pripremljenih liofilizacijom pri različitom uvećanju.*

Prema danim mikrografima (slika 10) MC i HC površina membrana pripremljenih „*freeze gelation*“ metodom prekrivena je tankim filmom, iako su pore vidljive golim okom na svjetlosti (slika 11). Zrnca primijećena u strukturi potencijalno potiču od zaostalog NaOH nakon neutralizacije ili se uzorak mrvio pri rukovanju. HC membrane izgledom su slične MC uz nešto izraženije nabore što ukazuje da su slojevi nastali faznom separacijom. Uspoređujući poroznost nosača pripremljenih dvjema različitim metodama, spužve imaju značajno izraženiju poroznu strukturu.



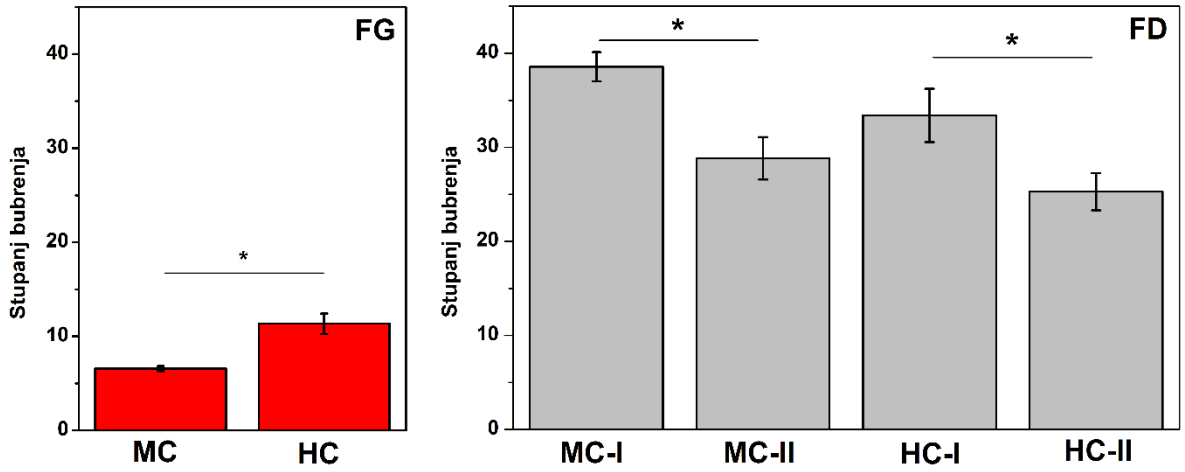
Slika 10. *SEM mikrograf MC (gornji red) i HC (donji red) kitozanskih poroznih nosača pripremljenih „freeze gelation“ metodom pri različitom uvećanju.*

Slika 11. *MC i HC porozne membrane.*

Povećanje poroznosti utjecat će na bolje vezanje stanica za nosač, dovod kisika te odvođenje metabolita i produkata razgradnje [1,20]. Međutim, povećanjem poroznosti također dolazi i do smanjenja mehaničke stabilnosti pa treba voditi računa o primjeni [6].

6.2 Bubrenje

Rezultati bubrenja podijeljeni su prema metodama priprave poroznih struktura (FG i FD). Za freeze-gelation metodu, uspoređivane su strukture membrana visoke (HC) i srednje (MC) molekulske mase, dok je bubrenje struktura dobivenih liofilizacijom ispitivano na podskupinama MC i HC kitozana (slika 12).



Slika 12. *Prikaz stupnja bubrenja poroznih struktura pripremljenih FG i FD metodom.*

Membrane dobivene FG metodom ukazuju na značajnu razliku bubrenja s obzirom na molekulsku masu, odnosno HC membrana pokazuje dvostruko veću sposobnost apsorpcije vode u odnosu na MC. Bubrenje kitozana ovisi o nekoliko čimbenika kao što su hidrofilnost, temperatura, pH, ionska jakost i priroda medija za bubrenje, stupanj deacetilacije i molekulska masa [30]. Osim karakteristika samog kitozana i medija, bubrenje također ovisi i o samoj mikrostrukturi, poroznosti, veličini i raspodjeli veličina pora te homogenosti uzorka. S obzirom na isti stupanj deacetilacije MC i HC kitozana, bubrenje će ovisiti o molekulskoj masi te mikrostrukturi membrane. Prema literaturi [31], kitozanske tablete visoke molekulske mase pokazuju veću sposobnost bubrenja u odnosu na nisku. Ovakva pojava može biti posljedica lakše difuzije vode kroz kraće kitozanske lance i samim time narušavati stabilnost strukture. Međutim, prema vizualnoj analizi strukture (slika 11), HC membrana posjeduje vlaknastu strukturu u odnosu na MC što može dodatno utjecati na povećanje apsorpcije vode. Ovakva struktura osigurava veći prostor za otapalo te moguću veću stabilnost nabubrene membrane.

Ispitivanje bubrenja poroznih struktura dobivenih FD metodom pokazalo je da MC I podskupina uzoraka ukazuje na blago povećanje sposobnosti bubrenja u odnosu na HC I podskupinu. Ovakvo ponašanje bi se moglo pripisati veličini pora nosača. Prema slikama 8 i 9 vidljivo je da MC-I ima veće pore u odnosu na HC-I što može utjecati na apsorpciju veće količine otapala tijekom inkubacije. S druge strane, obje podskupine II (MC i HC) pokazale su 20 – 30% niži kapacitet bubrenja što može biti posljedica nehomogene strukture.

7 ZAKLJUČAK

Pripremljeni su kitozanski porozni nosači visoke (HC) i srednje (MC) molekulske mase metodama liofilizacije (FD) i toplinski induciranog faznog razdvajanja uz geliranje i ekstrakciju (FG).

- Može se pretpostaviti da su nosači pripremljeni FD metodom prikladniji za vezanje stanica ili proteina poput fibronektina (FN). Veća poroznost mogla bi osigurati bolju infiltraciju i umnažanje stanica kao i veću aktivnu površinu.
- Veći stupanj bubrenja omogućava bolju infiltraciju stanica te zadržavanje tekućine što može ubrzati regeneraciju tkiva.
- Podskupina I je homogenije, visoko porozne strukture što osigurava veći kapacitet bubrenja.
- Povećana poroznost može dovesti do smanjenja čvrstoće pa je u daljnjim istraživanjima moguće ispitati otpornost na deformaciju.

Prilikom priprave ovakvih uzoraka potrebno je pronaći balans između fizičkih, mehaničkih i bioloških svojstava. Faktori na koje pri tom treba misliti su stupanj deacetilacije, molekulska masa, hidrofilnost i sposobnost bubrenja, mikrostruktura (definirana poroznošću, veličinom i oblikom pora kao i njihovom međusobnom povezanošću), mehanička izdržljivost (koja je u direktnoj ovisnosti s poroznošću) te biokompatibilnost s ciljanim tkivom. Svi ti čimbenici u konačnici će odrediti koliko je neki nosač prikladan za regeneraciju određenog tkiva.

8 SIMBOLI KORIŠTENI U RADU

Ac	acetat, CH_3COO^-
bFGF	engl. *basic fibroblast growth factor*
BMP	engl. *bone morphogenic factor*
BTE	inženjerstvo koštanog tkiva (engl. *bone tissue engineering*)
CH	hitin (engl. *chitin*)
CNS	centralni živčani sustav
CS	kitozan (engl. *chitosan*)
ECM	izvanstanična matrica (engl. *extracellular matrix*)
EtOH	etanol
FD	liofilizacija
FG	toplinski inducirano fazno razdvajanje uz geliranje i ekstrakciju
FN	fibronektin
GAG	glikozaminoglikani
GF	faktori rasta
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GlnAc	N-acetilglukozamin
HA	hijaluronska kiselina
HAc	octena kiselina
HAp	hidroksiapatit
HC	kitozan velike molekulske mase
IKVAV	Ile-Lys-Val-Ala-Val
LBL	engl. *layer by layer*
MC	kitozan srednje molekulske mase
PCL	polikaprolakton
PDGF	engl. *platelet-derived growth factor*
PEG	poli(etilen-glikol)
PGA	poli(glikolna kiselina)
PLA	poli(mliječna kiselina), polilaktid
PLGA	poli(lakton- ko-glikolna kiselina)
PNS	periferni živčani sustav
PU	poliuretan

PVAL	poli(vinil-alkohol)
RGD	arginin-glicin-aspartat
RGDS	arginin-glicin-aspartat-serin
SD	stupanj deacetilacije
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscopy*)
TCP	trikalcij fosfat
TGF-β1	engl. *transforming growth factor*
VEGF	engl. *vascular endothelial growth factor*

9 LITERATURA

[1] Milovac D., Synthesis and characterization of hydroxyapathite-biodegradable polymer composite material, FKIT, Zagreb, 2014., str. 4, 13-19, 22.

[2] O'Brien F.J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materials Today, 14 (2011) 88-95.

[3] Liu X., Ma L., Mao Z., Gao C., Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration, Advanced Polymer Science, 244 (2011) 81-128.

[4] https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine (pristup 25. travnja 2018.)

[5] Keane T.J., Badylak S.F., Biomaterials for tissue engineering applications, Seminars in Pediatric Surgery, 123 (2014) 112-118.

[6] Stratton S., Shelke N.B., Hoshino K., Rudraiah S., Kumbar S.G., Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering, Bioactive Materials, 1 (2016) 93-108.

[7] Chan B.P., Leong K.W., Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, European Spine Journal, 17 (2008) 467-479.

[8] Campbell I.D., Humphries M.J., Integrin Structure, Activation and Interactions, Cold Spring Harbour Perspectives Biology, 3:a004994, 2011.

[9] Amaral I.F. a, Unger R.E., Fuchs S., Mendonça A.M., Sousa S.R., Barbosa M.A., Pego A.P., Kirkpatrick C.J., Fibronectin-mediated endothelisation of chitosan porous matrices, Biomaterials, 30 (2009) 5465-5475.

[10] Oryan A., Sahvieh S., Effectivenes of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing, International Journal of Biological Macromolecules, 104 (2017) 1003-1011.

[11] Francis Suh J.K., Matthew H.W.T., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, Biomaterials, 21 (2000) 2589-2598.

[12] Croisier F., Jerome C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, European Polymer Journal, 49 (2013) 780-792.

[13] Chen P.H., Hwang Y.H., Kuo T.Y., Liu F.H., Lai J.Y., Hsieh H.J., Improvement in the properties of chitosan membranes using natural acid organic solutions as solvents for chitosan dissolution, Journal of Medical and Biological Engineering, 27(1) (2007) 23-28.

[14] Amaral I.F., Neiva I., Ferreira da Silva F., Sousa S.R., Piloto A.M., Lopes C.D.F., Barbosa M.A., Kirkpatrick C.J., Pego A.P., Endothelialization of chitosan porous conduits via immobilization of a recombinant fibronectin fragment (rhFNIII7-10), Acta Biomaterialia, 9 (2013) 5643-5652.

[15] Tuzlakoglu K., Reis R.L., 13 – Chitosan-based scaffolds in orthopedic applications, u: R.L. Reis, N.M. Neves, J.F. Mano, M.E. Gomes, A.P. Marques, H.S. Azevedo, Natural-based polymers for natural applications, Woodhead Publishing, 2008. 357-373.

[16] https://www.thebalance.com/lyophilization-preserving-biological-material-375590 (pristup 2. svibnja 2018.).

[17] Berretta J., Bumgardner J.D., Jennings J.A., Lyophilized chitosan sponges, u: J.D., Jennings, Bumgardner J.D, Chitosan based biomaterials fundamentals,Volume 1, Woodhead publishing (2016) 239-253.

[18] Hao R., Wang D., Yao A., Huang W., Preparation and characterization of β-TCP/CS scaffolds by freeze-extraction and freeze-gelation, Journal of Wuhan University of Technology - Materials Science Ed., 26 (2011) 371-375.

[19] Ho M., Kuo P., Hsieh H., Hsien T., Hou L., Lai J., Wang D., Preparation of porous scaffold by using freeze-extraction and freeze-gelation methods, Biomaterials 25 (2004) 129-138.

[20] Ikeda T., Ikeda K., Yamamoto K., Ishizaki H., Yoshizawa Y., Yanagiguchi K., Yamada S., Hayashi Y., Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold, BioMed Research International, 2014 (2014) 1-8.

[21] Muzzarelli R.A.A., Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, Carbohydrate Polymers, 76 (2009) 167-182.

[22] Comblain F., Rocasalbas G., Gauthier S., Henrotin Y., Chitosan: A promising polymer for cartilage repair and viscosupplementation, BioMedical Materials and Engineering, 28 (2017) 209-215.

[23] https://biotextiles2012.wordpress.com/nerve-guides/ (pristup 12. svibnja 2018.).

[24] Poveda-Reyes S., Moulisova V., Sanmartín-Masiá E., Quintanilla-Sierra L., Salmerón-Sánchez M., Gallego Ferrer G., Gelatin – Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterballance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation, Macromolecular Bioscience, Macromolecular Bioscience 16 (2016) 1311-1324.

[25] Kim S.H., Turnbull J., Guimond S., Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor, Journal of Endocrinology, 209 (2011) 139-151.

[26] https://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php (pristup 13. svibnja 2018.).

[27] Sana F.A., Yurtsever M. C., Bayrak G.K., Tuncay E.O., Kiremitci A.S., Gumusderelioglu M., Spreading, proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells on chitosan scaffolds immobilized with RGD or fibronectin, Cytotechnology, 69 (2017) 617-630.

[28] Amaral I., Sousa S., Neiva I., Marcus-Silva L., Kirkpatrick C., Barbosa M., Pêgo A., Kinetics and isotherm of fibronectin adsorption to three-dimensional porous chitosan scaffolds explored by 125I-radiolabelling. Biomatter 2013; 3:e24791.

[29] Madihally S.V., Matthew H.W.T., Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, Biomaterials, 20 (1999) 1133-1142.

[30] Thein-Han W.W., Kitiyanant Y., Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering, Journal of Biomedical Materials Research Part B, 80 (2007) 92-101.

[31] Huanbutta K., Cheewatanakornkool K., Terada K., Nunthanid J., Sriamornsak P., Impact of salt form and molecular weight of chitosan on swelling and drug release from chitosan matrix tablets, Carbohydrate Polymers, 97 (2013) 26-33.

[32] Bružauskaite I., Bironaite D., Bagdonas E., Bernontiene E., Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes – different cell effects, Cytotechnology, 68 (3) (2016) 355-369.

[33] Mohd Hilmi A.B., Halim A.S., Hassan A., Lim C.K., Noorsal K., Zainol I., *In vitro* characterization of a chitosan skin regenerating template as a scaffold for cells cultivization, Springerplus, (2013) 2: 79.

ŽIVOTOPIS

[redacted] završila IV. gimnaziju u sklopu svog srednjoškolskog obrazovanja. Iste godine, 2015. upisujem studij *Primijenjena kemija* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Stručnu praksu tijekom studiranja odrađujem na Institutu Ruđer Bošković, u laboratoriju za biomimetičku kemiju na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju.