

Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima

Bojan Čalija^{1*}, Jela Milić¹, Danina Krajišnik¹, Anđelka Račić²

¹Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11 221 Beograd

²Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, Odsjek – Farmacija, Save Mrkalja 14, 78 000 Banja Luka

* Autor za korespondenciju: e-mail: bojanc@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Hitozani su linearni, binarni heteropolisaharidi dobijeni parcijalnom deacetilacijom hitina. Kao katjonski polisaharidi prirodnog porekla imaju veliki potencijal za primenu u oblasti farmacije i biomedicine. Tome dodatno doprinosi njihova strukturna raznovrsnost u pogledu molekulske mase i stepena deacetilacije, ali i mogućnost hemijske derivatizacije.

Specifična polikatjonska priroda ovih biopolimera odgovorna je za njihova brojna biološka svojstva poput mukoadhezivnosti, hemostatičnog, antimikrobnog i hipoholesterolemičnog delovanja.

Zahvaljujući gelirajućim sposobnostima, mogućnosti umrežavanja i građenja reverzibilnih polielektrolitnih kompleksa sa polianjonima, hitozani se koriste za izradu koloidnih nosača lekovitih supstanci poput dendrimera, liposoma, micela, mikro- i nanočestica.

Hitozani i njihovi derivati ulaze u sastav komercijalno dostupnih preparata/sredstava za zarastanje rana zahvaljujući stimulaciji proliferacije ćelija i obnavljanja tkiva, hemostatskom i blagom lokalnom analgetičkom delovanju.

Upotreba hitozana kao dodatka ishrani odobrena je u mnogim zemljama, a potvrđen je njihov uticaj na održavanje normalnog nivoa serumskog LDL holesterola.

Derivati hitozana, poput N-karboksimetilhitozana koriste se u kozmetičkim proizvodima jer poseduju sposobnosti geliranja i formiranja filma, stvaraju prijatan osećaj na koži, omekšavaju, vlaže i štite kožu od spoljašnjih uticaja.

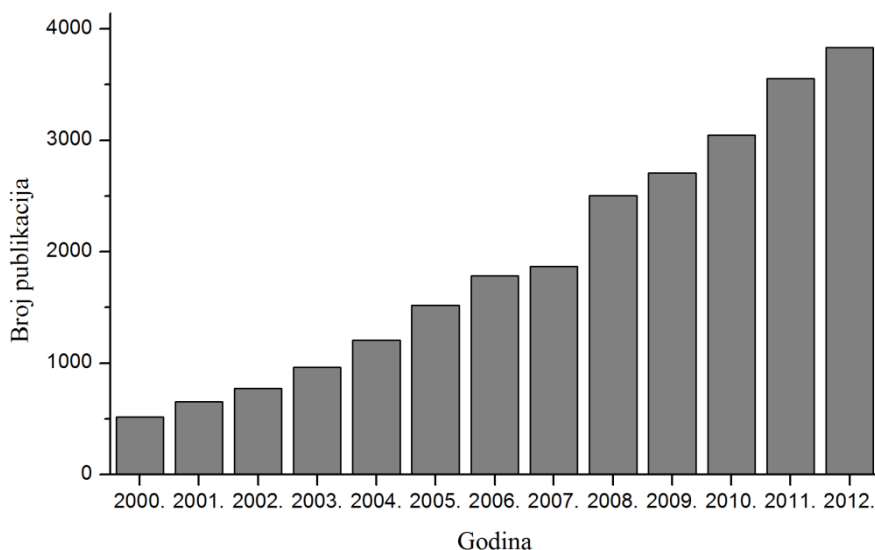
Posebnu pažnju hitozani privlače u oblasti tkivnog inženjerstva zahvaljujući mogućnosti obrazovanja biokompatibilnih poroznih trodimenzionalnih mreža čiju je poroznost i brzinu degradacije u *in vivo* uslovima moguće kontrolisati.

Širu primenu hitozana trenutno ograničava nerešen regulatorni status, jer strukturna raznovrsnost hitozana ima za posledicu razlike u biodistribuciji, biodegradaciji i toksikološkim profilima, što značajno otežava dobijanje GRAS statusa.

Ključne reči: hitozan, hitin, polikatjon, farmaceutski/biomedicinski preparati

Uvod

Hitozan je prvi put opisan 1859. godine, kao jedinjenje dobijeno parcijalnom deacetilacijom hitina – gradivnog polisaharida prirodnog porekla (1). Istraživanje potencijalne primene hitozana doživljava naglu ekspanziju tokom protekle tri decenije sa stalnom tendencijom porasta (Slika 1). U oblasti farmacije/biomedicine posebno se ispituje mogućnost primene hitozana za izradu koloidnih nosača lekovitih supstanci sa modifikovanim oslobađanjem, preparata/sredstava za zarastanje rana i tkivnu regeneraciju. Tome su naročito doprineli biokompatibilnost, biodegradabilnost i specifična polikatjonska priroda hitozana. Osim toga, strukturna raznovrsnost ovog polimera, posebno u pogledu molekulske mase i stepena deacetilacije, kao i hemijska derivatizacija, pružaju mogućnost da se osobine hitozana, odnosno njegovih derivata, prilagode potencijalnoj primeni. Rastućem interesovanju za hitozan doprinosi njegovo poreklo iz obnovljivih izvora (hitin), što ga čini relativno jeftinim i lako dostupnim ekscipijensom.

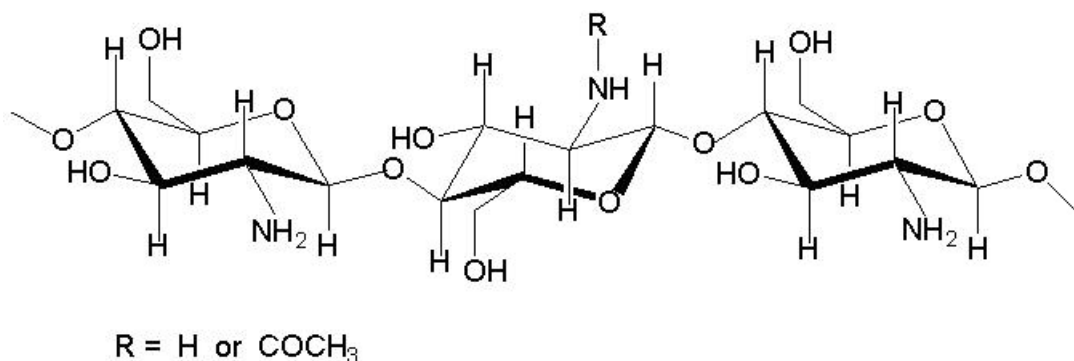


Slika 1 Broj publikacija koje se odnose na hitozan (naslov rada, sažetak, ključne reči). Podaci preuzeti sa Scopus-a 29.4.2013.

Figure 1 Number of articles related to chitosan (article title, abstract, keywords). Data obtained from Scopus on 29.4.2013.

1. Hemijska struktura hitozana

Hitozan je linearni, binarni heteropolisaharid građen iz 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze i 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze povezanih β (1-4) glikozidnim vezama (Slika 2). Stepen deacetilacije, odnosno udeo slobodnih amino grupa, komercijalno dostupnih hitozana je uobičajeno veći od 60 % (2,3). Na osnovu molekulske mase dele se na hitozane male (< 150 kDa), srednje i velike molekulske mase (700 – 1000 kDa) (4). U poslednjih nekoliko godina raste interesovanje istraživača za hitozane kratkog lanca, koji se nazivaju oligohitozani (oligosaharidni hitozani). Molekulska masa ovih oligomera hitozana je manja od 50 kDa, a dobijaju se postupkom hidrolize lanaca visokomolekularnih hitozana (5).



Slika 2 Hemijska struktura hitozana
Figure 2 Chemical structure of chitosan

2. Karakteristike hitozana

2.1 Fizičko-hemijske karakteristike hitozana

Na sobnoj temperaturi hitozani su semikristalni polimeri koji pokazuju polimorfizam (6). Kao većina polisaharida koji imaju izraženu sposobnost obrazovanja vodoničnih veza, zagrevanjem se razgrađuju pre nego što počnu da se tope (7).

Rastvorljivost hitozana u vodi zavisi od njihove molekulske mase i stepena deacetilacije, pa su oligohitozani molekulske mase 2 – 3 kDa lako rastvorni u vodi čak i pri neutralnoj pH vrednosti (8), dok su hitozani većih molekulske masa kao katjonski polisaharidi, čija se pKa vrednost obično kreće u granicama od 6,2 do 7,0, praktično nerastvorni u vodi, fiziološkim uslovima (pH 7,4) i višim pH vrednostima (4,9). Sa dodatkom kiselina povećava se rastvorljivost hitozana usled protonovanja slobodnih –NH₂ grupa na položaju C-2 glukozaminskih jedinica. Stepenn deacetilacije u direktnoj je vezi sa brojem slobodnih –NH₂ grupa, pa indirektno utiče na rastvorljivost hitozana.

Tako su hitozani sa stepenom deacetilacije oko 40 % rastvorljivi u vodenim medijumima pH vrednosti do 9,0, dok se hitozani stepena deacetilacije oko 85 % rastvaraju u medijumima pH vrednosti do 6,5 (9). Jonska jačina medijuma, odnosno prisustvo elektrolita, takođe ima veliki uticaj na rastvorljivost hitozana. U odsustvu elektrolita, lanci hitozana su maksimalno izduženi usled repulzije pozitivno naelektrisanih grupa monomernih jedinica, dok se u prisustvu elektrolita repulzija smanjuje, dolazi do uvijanja lanaca hitozana i efekta isoljavanja, odnosno taloženja hitozana (9, 10).

Niska rastvorljivost hitozana pri pH vrednostima iznad pKa, osnovni je faktor koji ograničava njihovu primenu, naročito kada se koriste u cilju poboljšanja resorpcije/apsorpcije lekovitih supstanci preko sluzokoža (mukoznih membrana).

Viskozitet rastvora hitozana je još jedna osobina koju je neophodno razmotriti prilikom njihove biomedicinske primene. Na viskozitet rastvora hitozana, pored koncentracije, utiču i molekulska masa hitozana, jonska jačina, pH vrednost i temperatura. Sa porastom molekulske mase hitozana raste viskozitet njihovih rastvora, te je pored dobre rastvorljivosti u vodi, nizak viskozitet još jedna prednost oligohitozana u odnosu na hitozane velike molekulske mase (8). Viskozitet rastvora hitozana raste i sa porastom stepena deacetilacije. Sa povećanjem stepena deacetilacije raste i broj slobodnih $-NH_2$ grupa, što dovodi do konformacionih promena, odnosno istežanja lanaca polimera usled repulzije protonovanih $-NH_2$ grupa, a time i porasta viskoziteta (9). Suprotno, povećanje temperature i pH vrednosti imaju za posledicu smanjenje viskoziteta rastvora hitozana (4,10).

Zahvaljujući slobodnim $-NH_2$ grupama u strukturi hitozana, ovi polimeri poseduju sposobnost građenja kompleksa sa jonima metala. Sposobnost kompleksiranja jona metala zavisi od fizičkog stanja hitozana, stepena deacetilacije, distribucije slobodnih $-NH_2$ grupa, pH vrednosti okolnog medijuma, vrste i sadržaja katjona (4). Uzimajući u obzir da su u mehanizam kompleksiranja uključene $-NH_2$ grupe, sposobnost kompleksiranja jona metala raste sa porastom stepena deacetilacije, odnosno sa porastom slobodnih $-NH_2$ grupa. Oligohitozani građeni od najmanje 6 monomernih jedinica takođe poseduju ovo svojstvo. Afinitet hitozana za dvo- i trovalentne jone metala iz njihovih hloridnih soli opada prema sledećem redosledu: $Cu^{2+} \gg Hg^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} \sim Ca^{2+} > Nd^{3+} > Cr^{3+} \sim Pr^{3+}$ (6).

Kao polikatjoni, hitozani mogu da stupaju u elektrostatičku interakciju sa suprotno naelektrisanim jonima, poput anjonskih surfaktanata (npr. natrijum-dodecilsulfat) i polianjonima tipa karboksimetilceluloze, pektina, heparina, ksantana, karagena, hijalouronana, dekstran-sulfata, hondroitin-sulfata i natrijum-alginata (4,6,11,12) gradeći tzv. polielektrolitne komplekse (13).

2.2 Biološke karakteristike hitozana

Mukoadhezivnost kao sposobnost vezivanja za biološke membrane prekrivene mukusom je najznačajnije biološko svojstvo hitozana. U sastav mukusa ulazi glikoprotein mucin, čije negativno naelektrisanje potiče od ostataka sijalinske kiseline. Kada se hitozani nađu u kiseloj sredini (npr. želudac), dolazi do protonovanja slobodnih $-NH_2$ grupa, što im omogućava da stupaju u elektrostatičku interakciju sa negativno naelektrisanim sluzokožama. Sa porastom stepena deacetilacije raste i broj slobodnih $-NH_2$ grupa koje mogu biti protonovane, a time i mukoadhezivnost (14,15). I molekulska masa hitozana ima uticaj na mukoadhezivnost, pa je tako kod hitozana veće molekulske mase (oko 1400 kDa) ovo svojstvo izraženije u odnosu na hitozane male molekulske mase (500 do 800 kDa) (1,16). Ovo se može objasniti uticajem molekulske mase na viskozitet, jer hitozani veće molekulske mase obrazuju viskoznije rastvore koji bolje adheriraju na sluzokožu i imaju duže vreme zadržavanja. Pored naelektrisanja i molekulske mase, na mukoadhezivnost hitozana značajno utiče i mogućnost građenja vodoničnih veza (17), fleksibilnost polimernih lanaca (14), kao i odgovarajuća površinska energija koja favorizuje adheziju hitozana za površinu mukoznih membrana (18).

Hipoholesterolemično delovanje. Hipoholesterolemično delovanje hitozana je jedan od osnovnih razloga za njihovu komercijalizaciju na globalnom tržištu. Međutim, kada se govori o hipoholesterolemičnom delovanju hitozana, potrebno je praviti razliku između efekata koji su zabeleženi u studijama sprovedenim na humanim dobrovoljcima i životinjama. Naime, aktivnost hitozana kod različitih životinjskih vrsta i čoveka se bitno razlikuje, a time i sposobnost hitozana da nakon *per os* primene ostvari ovo delovanje (3). Prva studija kojom je potvrđen hipoholesterolemični efekat hitozana kod odraslih muškaraca, sprovedena je 1993. godine. Rezultati su pokazali da nakon dve nedelje unosa keksa sa hitozanom (3 g/dnevno tokom prve nedelje, 6 g/dnevno tokom druge nedelje) dolazi do smanjenja ukupnog serumskog holesterola sa 189 mg/dl na 177 mg/dl, uz istovremeno povećanje serumskog HDL holesterola sa 51 mg/dl na 56 mg/dl, u odnosu na kontrolni period tokom koga su ispitanici unosili keks bez hitozana (19).

Predloženo je nekoliko mehanizama kojima se objašnjava hipoholesterolemično delovanje hitozana. Najznačajniji mehanizam je zasnovan na interakciji hitozana sa žučnim kiselinama i spontanom formiranju nerastvornih soli koje se hidrofobnim interakcijama vezuju za holesterol i lipide čime se otežava njihovo varenje. Interakcija hitozana sa anjonskim surfaktantima (lipazama, žučnim kiselinama) odvija se preko slobodnih $-NH_2$ grupa, primarnih i sekundarnih $-OH$ grupa na položajima C-3 i C-6, redom (20). Osim toga, nakon vezivanja za hitozan žučne kiseline gube sposobnost da kao površinski aktivne materije obrazuju emulzije neophodne za varenje lipida (21). Utvrđeno je da u *in vitro* uslovima hitozan predstavlja nespecifičan supstrat za brojne lipaze, pa se pretpostavlja da kao alternativni supstrat za lipaze smanjuje razgradnju

lipida posredovanu ovim enzimima (3). Jedan od mogućih mehanizama koji objašnjava hipoholesterolemično delovanje hitozana je njihova adsorpcija na površinu emulgovanih masti i obrazovanje zaštitnog omotača koji otežava pristup lipazama (22).

Hemostatičko delovanje. Iako je hemostatično delovanje hitozana potvrđeno brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama, još uvek ne postoji dovoljno preciznih podataka o mehanizmu njihovog delovanja. Veći broj sprovednih istraživanja ukazuje da hitozani i hitin ovo delovanje ostvaruju posredno, preko trombocita, pojačavajući sintezu faktora njihovog rasta (3). Međutim, hemostatsko delovanje hitozana je izraženije od hitina, koji ima veći uticaj na agregaciju trombocita nego hitozani. Ovo upućuje na zaključak da stimulacija rasta trombocita, a time i njihove agregacije, nije jedini mehanizam delovanja hitozana na zaustavljanje krvarenja, nego najverovatnije hitozani imaju uticaj i na agregaciju eritrocita (23). Interakcija hitozana kao polikatjona sa eritrocitima je posledica elektrostatičkog privlačenja protonovanih $-NH_2$ grupa hitozana i negativno naelektrisanih membrana eritrocita (24).

Antimikrobno delovanje. Hitozani poseduju širok spektar antimikrobnog delovanja koje uključuje gram-pozitivne, gram-negativne bakterije i gljivice. Generalno, bakterije su nešto manje osetljive na dejstvo hitozana u odnosu na gljivice. Antifungalno dejstvo hitozana je zasnovano na supresiji sporulacije i germinacije spora (25). U literaturi su opisani brojni mehanizmi na kojima se zasniva antibakterijsko delovanje hitozana, a koji zavise od građe mikroorganizama (26). Jedan od najbolje istraženih mehanizama zasnovan je na interakciji hitozana sa negativno naelektrisanim grupama strukturnih molekula lociranih na površini ćelija mikroorganizama (lipopolisaharidi i proteini) (26). Na taj način dolazi do formiranja omotača koji otežava ulazak supstanci iz okruženja u ćeliju (20). Sa porastom broja slobodnih $-NH_2$ grupa i ukupnog pozitivnog naelektrisanja hitozana, raste njegovo antimikrobno delovanje, što je u skladu sa predloženim mehanizmom delovanja (26,27). Drugi predloženi mehanizam odnosi se na inhibiciju sinteze RNK i proteina nakon permeacije u jedro ćelije, a ograničen je na hitozane male molekulske mase (oligohitozani). Antibakterijsko delovanje hitozana može se pripisati i heliranju jona metala koji su neophodni za normalan ćelijski rast (28).

Olakšavanje resorpcije supstanci kroz ćelijske membrane i humani intestinalni epitel je još jedno biološko svojstvo hitozana zasnovano na njegovoj polikatjonskoj prirodi. Ono je najverovatnije posledica interakcije hitozana sa ćelijskom membranom i strukturne reorganizacije proteina koji učestvuju u formiranju tesnih međućelijskih veza (17,29). Pokazano je da sa porastom molekulske mase i stepena deacetilacije hitozana raste njihova sposobnost da poboljšaju permeabilnost epitela (30).

Lokalno analgetičko delovanje. Lokalno analgetičko delovanje hitozana vezuje se za njihovu baznu prirodu i sposobnost vezivanja protona koji se oslobađaju u području zahvaćenim inflamatornim procesom (23). Time se može objasniti jače analgetičko delovanje hitozana u odnosu na hitin, njihov prekursor sa manje izraženim baznim osobinama, odnosno slabijom sposobnosti za vezivanje protona nakupljenih u

inflamacijom zahvaćenom području (20,23). Određene studije ukazuju na lokalni analgetički, umirujući i hladeći efekat hitozana nakon primene na kožu zahvaćenu ulceracijama, opekotinama i mehaničkim oštećenjima (31,32).

Antitumorsko delovanje. Iako antitumorsko delovanje hitozana nije dovoljno istraženo, pojedini istraživači ukazuju da je ono posledica imunostimulišćeg delovanja (20,33). Posebno je ispitivano antitumorsko delovanje oligohitozana *in vitro*, koje je posledica stimulacije makrofaga i produkcije limfokina aktivacijom limfocita (34-36). Iako većina studija ukazuje na postojanje uticaja molekulske mase na antitumorsko delovanje oligohitozana *in vivo*, podaci o načinu na koji se menja antitumorsko delovanje sa promenom molekulske mase su kontradiktorni (37).

Antioksidativno delovanje. Antioksidativno delovanje hitozana se pripisuje sposobnosti „hvatanja” slobodnih radikala (hidroksil, superoksid i alkil radikala) i heliranja jona metala (jon gvožđa), eliminišući njihovu prooksidativnu aktivnost (38,39).

Veza između najznačajnijih bioloških svojstava hitozana i njegovih strukturnih karakteristika predstavljena je u Tabeli I.

Tabela I Veza između bioloških svojstava hitozana i njihovih karakteristika (20)

Table I Relationship between chitosans biological properties and their characteristics (20)

Biološko svojstvo	Karakteristike hitozana koje imaju uticaj na njegova biološka svojstva			
	Mr	Stepen deacetilacije	Distribucija – NH ₂ grupa	Viskozitet
Biodegradabilnost	+	–	+	+
Biokompatibilnost	+	–	–	–
Mukoadhezivnost	+	+	–	–
Hemostatično delovanje	+	+	–	–
Lokalno analgetičko delovanje	–	+	–	–
Pojačavanje resorpcije	+	+	–	–
Antimikrobno delovanje	+	+	–	–
Hipoholesterolemično delovanje	+	+	–	+
Antioksidantno delovanje	+	+	–	–

2.3 Biodegradabilnost hitozana i regulatorni aspekt

Hitozan je biokompatibilan i biodegradabilan polimer u čijoj biodegradaciji učestvuju enzimi poput lizozima, di-N-acetilhitobiazaze, N-acetil- β -D-glukozaminidaze i hitiotrizidaze koji su prisutni u mukoznim i drugim fiziološkim tečnostima (40). Hitozani i njihovi degradacioni proizvodi mogu da izazovu aktivaciju humanih makrofaga i proliferaciju limfocita, ali bez prateće zapaljenjske reakcije (40), pri čemu brzina degradacije hitozana *in vivo* raste sa porastom stepena deacetilacije (41).

Toksikološkim studijama je potvrđeno da toksičnost hitozana zavisi od puta primene, pa se nakon subkutane primene prvi znaci citotoksičnosti kod zečeva i pasa javljaju nakon primene doza u opsegu 5 – 50 mg/kg/dnevno (42,43), dok se nakon *per os* primene prvi klinički znaci trovanja kod miševa i pacova javljaju tek nakon unošenja 5 – 15 g/kg/dnevno (44). *Per os* unošenje dnevne doze hitozana od 6,75 g kod zdravih dobrovoljaca nije dovelo do vidljivih znakova intoksikacije (45). Nakon primene na koži hitozan ne ispoljava iritantno delovanje, čak ni ukoliko je koža oštećena, niti izaziva alergijske reakcije (1).

Upotreba hitozana kao dodatka ishrani odobrena je u mnogim evropskim, američkim i azijskim zemljama (SAD, Finska, Italija, J. Koreja, Japan i dr.) (9,20). Najčešće je reč o dodacima ishrani sa hitozanom čija se primena preporučuje u cilju smanjenja telesne mase (Chitosan Plus, Chitosan LipoSan Ultra 250, Vitacost Chitosan i dr.), iako o tom efektu hitozana postoje oprečna naučna mišljenja. EFSA¹ je usvojila zdravstvenu izjavu kojom se potvrđuje uticaj hitozana na održavanje normalnog nivoa LDL holesterola, a koji se postiže prilikom unosa 3 g hitozana dnevno. Međutim, ovo regulatorno telo nije potvrdilo zdravstvenu izjavu kojom se hitozan dovodi u vezu sa smanjenjem telesne mase (46). FDA² je odobrila primenu dodataka ishrani i medicinskih sredstva na bazi hitozana namenjenih za ubrzano zarastanje rana (Tabela II) (40,47-49), a od 2002. godine so hitozana, hitozan-hidrohlorid u zemljama Evropske unije ima farmakopejski status (50). Dodeljivanje GRAS³ statusa hitozanu dodatno otežava njegova strukturna raznolikost (stepen deacetilacije i molekulska masa) koja može uticati na njegovu biodistribuciju, *in vivo* i *in vitro* toksičnost (51). Zbog ovoga su sve češći zahtevi da studije toksičnosti prate detaljni podaci o strukturi hitozana na koji se odnose.

3. Derivati hitozana

Hemijska derivatizacija hitozana primenjuje se sa ciljem prilagođavanja osobina (rastvorljivost, hidrofилnost, reaktivnost i dr.) ovog polimera potencijalnoj primeni.

¹ European Food Safety Authority (Evropska uprava za bezbednost hrane)

² US Food and Drug Administration (Američka agencija za hranu i lekove)

³ Generally Recognized As Safe (generalno prihvatljivi kao bezbedni)

Derivatizacija se najčešće vrši specifičnim reakcijama u kojima učestvuje $-NH_2$ grupa na položaju C-2 ili nespecifičnim reakcijama $-OH$ grupa na položajima C-2 i C-3. Od hemijskih reakcija u kojima učestvuje $-NH_2$ grupa, najzastupljenije su reakcije kvaternerizacije ove grupe i reakcije sa $-HCO$ grupama, dok se $-OH$ grupe najčešće modifikuju reakcijama eterifikacije i esterifikacije (6).

Karboksimetilhitozani. U reakciji karboksilacije hitozana, zavisno od uslova, mogu učestvovati pojedinačno $-NH_2$ grupe, $-OH$ grupe, odnosno i $-NH_2$ i $-OH$ grupe istovremeno, pa se karboksimetilhitozani dele na N-karboksimetilhitozane, O-karboksimetilhitozane i N,O-karboksimetilhitozane (52). N-karboksimetilhitozan spada u najznačajnije derivate hitozana. To je amfoterni polimer pH-zavisne rastvorljivosti, koji nastaje u reakciji hitozana sa glioksilnom kiselinom u prisustvu redukujućeg agensa (6,53).

N-karboksimetilhitozan ima gelirajuću sposobnost i sposobnost formiranja filma, stvara prijatan osećaj na koži, omekšava, vlaži i štiti kožu od spoljašnjih uticaja, na čemu se najčešće zasniva njegova primena u kozmetičkim proizvodima (Aquatrix II™, Maximum Moisture Complex® i dr.) (3). Zahvaljujući antibakterijskom dejstvu i mogućnosti korekcije pH vrednosti (slaba baza), ovaj derivat hitozana ima određeni doprinos u prevenciji karijesa, pa se koristi i u proizvodima za oralnu higijenu (Aloe Fresh® Whitening, Aloe Fresh® Sensitive, Aloement® Mouthwash i dr.).

Kvarternerni hitozani. Najznačajniji predstavnik ove grupe derivata hitozana je N, N, N-trimetilhitozan (trimetilhitozan amonijum). Dobija se kvarternerizacijom hitozana sa metiljodidom pod kontrolisanim uslovima u prisustvu natrijum-hidroksida (54). Osnovna prednost ovih derivata u odnosu na hitozan je njihova rastvorljivost u vodi. Poseduju dobra antistatička svojstva, koriste se kao antiflokulanti, a zahvaljujući izraženoj katjonskoj prirodi intenzivno se ispituje mogućnost primene kvarternernih hitozana u genskoj terapiji (3,6,55).

Sulfonovani hitozani. Slično karboksilaciji i sulfatacija hitozana se može odvijati preko $-NH_2$ grupe, $-OH$ grupe, odnosno i $-NH_2$ i $-OH$ grupe istovremeno, na osnovu čega se sulfonovani hitozani mogu klasifikovati na: N-sulfonovane hitozane, O-sulfonovane hitozane i N, O-sulfonovane hitozane (6,56). Ispitana je i potvrđena sposobnost ovih derivata hitozana da adsorbuju jone metala, kao i njihovo antimikrobno i antikoagulantno delovanje (56).

Alkilovani hitozani. Specifičnost ovih derivata hitozana ogleda se u njihovoj amfifilnoj prirodi. Alkilovani hitozani rastvorni u kiseloj sredini ($pH < 6$) pokazuju površinsku aktivnost, obrazuju viskozne rastvore, a pod odgovarajućim uslovima (koncentracija, pH vrednost, prisustvo soli) formiraju gelove. Njihova prednost ogleda se u mogućnosti kombinovanja sa nejonskim i katjonskim surfaktantima (6).

Kopolimeri hitozana. Kopolimeri hitozana dobijaju se najčešće postupkom „graftovanja” odnosno bočnog vezivanja molekula za osnovni lanac polimera. „Graftovanje” hitozana se postiže u prisustvu slobodnih radikala, γ -zračenja,

cerijumovih jona i enzima (3,57). Osobine ovih kopolimera zavise od strukturnih karakteristika prekursora (hitozana), broja, strukture i rasporeda bočnih lanaca. Predmet su brojnih istraživanja u oblasti farmacije/biomedicine (zarastanje rana, tkivno inženjerstvo, napredni nosači lekova, antimikrobna sredstva i dr.) (57).

4. Farmaceutska/biomedicinska primena hitozana

4.1 Nosači lekovite supstance na bazi hitozana

Izborom hitozana odgovarajućih karakteristika za izradu nosača lekovite supstance sa modifikovanim oslobađanjem moguće je poboljšati njihovu terapijsku efikasnost i komplijansu. Tokom protekle dve decenije intenzivno se istražuje mogućnost primene hitozana za izradu koloidnih nosača lekovitih supstanci (micele, liposomi, dendrimeri, mikro- i nanočestice) (2,40). Osim za modifikovano oslobađanje, koloidni nosači na bazi hitozana koriste se za postizanje zaštite inkapsulirane lekovite supstance od nepovoljnog delovanja okruženja u *in vivo* uslovima i povećanja biološke raspoloživosti zahvaljujući mukoadhezivnosti hitozana i poboljšanju transmukozne resorpcije (40).

Izrada koloidnih nosača na bazi hitozana najčešće je zasnovana na:

- polikatjonskoj prirodi hitozana i mogućnosti da stupaju u elektrostatičke interakcije sa anjonima male (tripolifosfat, pirofosfat, tetrapolifosfat, oktapolifosfat, heksametafosfat) i velike molekulske mase gradeći polielektrolitne komplekse (alginat, karagen, ksantan, karboksimetilceluloza, hijalurnoska kiselina, kopolimeri etilakrilata i metakrilne kiseline, proteini i molekuli DNK) i
- na formiranju kovalentnih veza sa sredstvima za umrežavanje (glutaraldehyd i genipin) (6,40,58-60).

Među najviše ispitivanim koloidnim nosačima na bazi hitozana su alginat-hitozan, hitozan-tripolifosfat, hitozan-genipin i hitozan-glutaraldehyd mikro- i nanočestice. Ovi nosači su namenjeni za različite puteve primene uključujući peroralni, transdermalni, oftalmološki, parenteralni, vaginalni, bukalni i nazalni (2,20,61). Opsežna istraživanja sprovedena su sa ciljem da se ispituju mogućnost i prednosti inkapsulacije citotoksičnih lekova (doksorubicin, 5-fluorouracil, paklitaksel i dr), antigena (vakcina protiv influence, pertusisa, difterije i dr.), gena, proteina (goveđi serumski albumin) i peptida (insulin, buserelin, kalcitonin i dr.) u koloidne nosače na bazi hitozana (40).

4.2 Preparati/sredstva za zarastanje rana na bazi hitozana

Zarastanje rana je složen proces koji obuhvata simultani odgovor različitih vrsta ćelija i faktora rasta, sa ciljem da se postigne brza regeneracija strukture i funkcije oštećene kože. Idealno sredstvo za zarastanje rana treba da pomogne u zaustavljanju

krvarenja, zaštiti oštećenu kožu od mikroorganizama i iritansa iz okruženja, obezbedi razmenu gasova, stimuliše faktore rasta, adsorbuje eksudate istovremeno sprečavajući da dođe do preteranog isušivanja (62). Potrebno je da poseduje i zadovoljavajuću fleksibilnost, postojanost i sposobnost adheriranja za kožu (63).

Hitozani poseduju brojna biološka svojstva zbog kojih ulaze u sastav komercijalno dostupnih medicinskih sredstava za zarastanje rana, od kojih su neka registrovana i u Srbiji (Tabela II): stimulišu proliferaciju ćelija i obnavljanje tkiva, pokazuju hemostatsko delovanje te pomažu u zaustavljanju krvarenja i blokiraju nervne završetke ublažavajući osećaj bola. Postepeno se razgrađuju stvarajući N-acetil-β-D-glukozamin koji stimuliše proliferaciju fibroblasta, sintezu hijaluronske kiseline na mestu oštećenja i pomaže u nakupljanju kolagena (64).

Tabela II Pregled komercijalno dostupnih medicinskih sredstava za zarastanje rana na bazi hitozana i njegovih derivata

Table II An overview of commercially available wound dressing devices based on chitosan and its derivatives

Zaštićeno ime medicinskog sredstva	Prozodač	Aktivni sastojak
Chitodine [®]	IMS	Hitozan/jod
ChitoFlex [®] Hemostatic dressing ¹	HemCon Medical Technologies	Hitozan-acetat
ChitoPack [®] C	Eisai Co.	Hitozan-acetat
ChitoSeal ^{®1}	Abbott Vascular Devices	Hitozan
Clo-Sur [®] PAD ^{1,2}	Scion Cardio-Vascular	Hitozan
HemCon [®] Bandage ^{1,2}	HemCon Medical Technologies	Hitozan-acetat
TraumaDEX [®]	Medafor	
Traumastat ^{®1}	Ore-Medix	Hitozan/porozni silicijum-dioksid
Vulnsorb [®]	Tesla	Hitozan/kolagen

¹ Odobreni od FDA

² Nalaze se na spisku medicinskih sredstava registrovanih u R. Srbiji (izvor: Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije)

Zahvaljujući ovakvom delovanju hitozan ubrzava zarastanje rane i sprečava pojavu ožiljka (65). U sredstvima za zarastanje rana hitozani i njihovi derivati se najčešće nalaze u obliku fibroznih i sunderastih (spužvastih) materijala, hidrogelova, membrana i filmova. Fibrozni materijali na bazi hitozana su postojani, biokompatibilni, netoksični, dobro apsorbuju tečnosti i pokazuju antimikrobno delovanje. Membrane na bazi hitozana i kolagena poseduju dobru antimikrobnu aktivnost, ubrzavaju zarastanje rana podstičući migraciju i proliferaciju ćelija. Hidrogelovi hitozana deluju okluzivno

stimulišući kontrakciju na ozleđenom mestu, ali su istovremeno propustljivi za vlagu, sprečavajući preterano nakupljanje eksudata. Membrane na bazi hitozana najčešće sadrže i dodatni polimer poput alginata, hijaluronske kiseline, polietilenglikol diakrilata, polivinilalkohola i dr. (64).

4.3 Primena hitozana u tkivnom inženjerstvu

Osnovna strategija tkivnog inženjerstva zasnovana je na obnavljanju oštećenog ili patološki izmenjenog tkiva transplantacijom ćelija inkorporiranih u potporne mreže sa biološki aktivnim sredstvima koja podstiču rast transplantiranih ćelija (66,67). Veliki potencijal hitozana za primenu u oblasti tkivnog inženjerstva zasnovan je na njihovoj biodegradabilnosti, biokompatibilnosti, antibakterijskom delovanju, a posebno na gelirajućim sposobnostima, poroznosti i lakoći oblikovanja gelova (67,68). Porozni matriksi na bazi hitozana dobijaju se najčešće jednostavnim postupkom liofilizacije rastvora hitozan-acetata izlivenih u kalupe odgovarajuće veličine i oblika (69). Poroznost nastalih gelova od značaja je ne samo za inkorporiranje ćelija, nego i za lakoću i način na koji se odvija ćelijska migracija (66). Histološkim istraživanjima je potvrđen minimalni inflamatorni potencijal mreža na bazi hitozana, kao i nizak imunološki potencijal (3). Utvrđeno je da se mehanička stabilnost ovih matriksa, lakoća sa kojom ćelije adheriraju na njih i brzina ćelijskog rasta povećavaju sa porastom stepena deacetilacije (70). Pобољšanje mehaničkih svojstava i biološke aktivnosti moguće je postići i hemijskom derivatizacijom hitozana, a naročito izmenama na primarnoj $-NH_2$ grupi (71). Uzimajući u obzir gotovo neograničenu mogućnost hemijske derivatizacije hitozana, potencijal ovih mreža za primenu u tkivnom inženjerstvu je izuzetan. Posebno se istražuje mogućnost primene hitozana i njegovih derivata za obnavljanje koštanog i nervnog tkiva, tkiva jetre i hrskavice (3,49,67,71).

5. Zaključak

Specifična polikatjonska priroda, biodegradabilnost i biokompatibilnost hitozana su osnovna svojstva na kojima se zasniva njihov veliki potencijal za primenu u oblasti biomedicine i farmacije. Posebnu pažnju privlači mukoadhezivnost, hemostatično i antimikrobno delovanje hitozana, što je od značaja za njihovu primenu za ubrzano zarastanje rana i obnavljanje tkiva. Velikom interesovanju za hitozane doprinosi strukturalna raznovrsnost u pogledu stepena deacetilacije i molekulske mase, ali i mogućnost hemijske derivatizacije i dobijanje iz hitina, drugog gradivnog polisaharida po zastupljenosti u prirodi.

Zahvaljujući gelirajućoj sposobnosti, mogućnosti umrežavanja i građenja reverzibilnih polielektrolitnih kompleksa, intenzivno se ispituje mogućnost primene hitozana za izradu koloidnih nosača sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance. Posebnu pažnju hitozani privlače u oblasti tkivnog inženjerstva zahvaljujući

možnosti obrazovanja biokompatibilnih trodimenzionalnih mreža, čiji je porozitet i brzinu degradacije u *in vivo* uslovima moguće kontrolisati.

Širu primenu hitozana trenutno ograničava nerešen regulatorni status, jer njihova strukturna raznovrsnost ima za posledicu razlike u biodistribuciji, biodegradaciji i toksikološkim profilima, što značajno otežava dobijanje GRAS statusa. U toku su brojne toksikološke studije, kojima se detaljno proučavaju mehanizmi delovanja i ispituje bezbednost hitozana u cilju ispunjavanja regulatornih zahteva.

6. Literatura

1. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technol To*. 1998;1(6):246-53.
2. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 2004;100(1):5-28.
3. Kumar MNVR, Muzzarelli R, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*. 2004;104(12):6017-84.
4. Wong TW. Chitosan and Its Use in Design of Insulin Delivery System. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2009;3(1):8-25.
5. Casettari L, Vllasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L. PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Progr Coll Pol Sci*. 2012;37(5):659-85.
6. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006;31(7):603-32.
7. Srinivasa PC, Tharanathan RN. Chitin/chitosan - safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Rev Int*. 2007;23(1):53-72.
8. Jeon YJ, Kim SK. Production of chitooligosaccharides using ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr Polym*. 2000;41(2):133-41.
9. Illum L. Chitosan and its use as pharmaceutical excipient. *Pharm Res*. 1998;15(9):1326-31.
10. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53(8):1047-67
11. Kubota N, Kikuchi Y. Macromolecular complexes of chitosan. In: Dumitriu S, editor. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. Marcel Dekker, New York; 1998. p. 595-628.
12. Vasiliu S, Popa M, Rinaudo M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *Eur Polym J*. 2005;41(5):923-32.

13. Thongngam M, McClements DJ. Characterization of interactions between chitosan and an anionic surfactant. *J Agric Food Chem.* 2004;52(4):987-91.
14. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm* 1998;166(1):75-88.
15. Wang YZ, Zheng JH, Bao DC, Lin JZ, Sun ZJ, Liu XD, Ma XJ. Mucoadhesive property of chitosan. *J Clin Rehab Tissue Eng Res.* 2007;11(26):5140-3.
16. Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm.* 1992;78(1):43-8.
17. Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, deBoer AG, VÍrum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res.* 1997;14(7):923-9.
18. Luessen HL, Lehr CM, Rentel CO, Noach ABJ, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. *J Control Rel.* 1994;29(3):329-38.
19. Maezaki Y, Tsuji K, Nakagawa Y, Kawai Y, Akimoto M, Tsugita T., et al. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993;57(9), 1439-44.
20. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol.* 2009;3(2):203-30.
21. Kim CH, Chun HJ. A synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro. *Polym Bull.* 1999;42(1):25-32.
22. Ogawa S, Decker EA, McClements DJ. Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *J Agr Food Chem.* 2003;51(9):2806-12.
23. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohyd Polym.* 2003;53(3):337-42.
24. Rao S, Sharma CP. Use of chitosan as biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34(1):21-8.
25. Hernandez-Lauzardo AN, Bautista-Banos S, Velazquez-del Valle MG, Mendez- Montevalvo MG, Sanchez-Rivera MM, Bello-Perez LA. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohyd Polym.* 2008;73(4):541-547.
26. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 2010;144(1):51-63.
27. Xie YJ, Liu XF, Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohyd Polym.* 2007;69(1):142-47.
28. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules.* 2003;4(6):1457-65.

29. Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm Res* 2004;21(1):43-9.
30. Schipper NGM, Vlrum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (caco-2) cells. *Pharm. Res.* 1996;13(11):1686-92.
31. Okamoto Y, Kawakami K, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohyd Polym.* 2002;49(3):249-52.
32. Ohshima Y, Nishino K, Yonekura Y, Kishimoto S, Wakabayashi S. Clinical application of chitin non-woven fabric as wound dressing. *Eur J Plastic Surg.* 1987;10(2):66-9.
33. Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohyd Polym.* 2005;62(8):357-68.
34. Suzuki K, Tokoro A, Okawa Y. Effect of N-acetylchitoooligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol Immunol.* 1986;30(8):777-87.
35. Seo WG, Pae HO, Kim NY, Oh GS, Park IS, Kim YH et al. Synergistic cooperation between water-soluble chitosan oligomers and interferon- γ for induction of nitric oxide synthesis and tumoricidal activity in murine peritoneal macrophages. *Cancer Lett.* 2000;159(2):189-95.
36. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(2):105-15.
37. Qin C, Du Y, Xiao L, Li Z, Gao X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int J Biol Macromol.* 2002;31(1):111-7.
38. Park PJ, Je JY, Kim SK. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohyd Polym.* 2004;55(1): 17-22.
39. Yen MT, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohyd Polym,* 2008;74(4):840-4.
40. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ, Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *J Control Release.* 2012;161(2):496-504.
41. Kofuji K, Qian CJ, Nishimura M, Sugiyama I, Murata Y, Kawashima S. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *Eur Polym J.* 2005;41(11):2784-91.
42. Carreño-Gómez B, Duncan R. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *Int J Pharm.* 1997;148(2):231-40.
43. Minami S, Oh-Oka M, Okamoto Y, Miyatake K, Matsushashi A, Shigemasa Y, Fukumoto Y. Chitosan-inducing hemorrhagic pneumonia in dogs. *Carbohyd Polym.* 1996;29(3):241-6.
44. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;56(3):290-9.
45. Tapola NS, Lyyra ML, Kolehmainen RM, Sarkkinen ES, Schauss AG. Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of chitosan tablets. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(1):22-30.

46. EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499) , maintenance of normal blood LDL - cholesterol concentrations (ID 4663) , reduction of intestinal transit time (ID 466 4) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 1. EFSA Journal 2011;9(6):2214.
47. Wedmore I, McManus JG, Pusateri AE, Holcomb JB. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J Trauma*.2006;60(3):655-8.
48. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM.Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):2892-923.
49. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2011;36(8):981-1014.
50. European Pharmacopeia fourth Edition, Strasbourg: Council of Europe, 2002.
51. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliver Rev*. 2010;62(1):3-11.
52. Mourya VK, Inamdar NN, Tiwari A. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Adv Mat Lett*. 2010;1(1):11-33.
53. Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. In: Heinze T, editor. *Polysaccharides I* Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 151-209.
54. Domard A, Rinaudo M, Terrassin C. A new method for the quaternization of chitosan. *Int J Biol Macromol*. 1986;8(2):105-7.
55. Suzuki K, Oda D, Shinobu T, Saimoto H, Shigemasa Y. New selectively N-substituted quaternary ammonium chitosan derivatives. *Polym J*. 2000;32(4):334-8.
56. Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol*. 2007;40(3):175-81.
57. Sonia TA, Sharma CP. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. *Chitosan for Biomaterials I*. Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 23-53.
58. Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr Polym*. 2009;77(1):1-9.
59. Čalija B, Milić J, Cekić N, Krajišnik D, Daniels R, Savić S. Chitosan oligosaccharide as prospective crosslinking agent for naproxen-loaded Ca-alginate microparticles with improved pH-sensitivity. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(1):77-88.
60. Čalija B, Cekić N, Savić S, Daniels R, Marković B, Milić J. pH-sensitive microparticles for oral drug delivery based on alginate/oligochitosan/Eudragit® L100-55 "sandwich" polyelectrolyte complex. *Colloid Surface B*. 2013;110:395-402.
61. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012; 81(3):463-9.

62. Kokabi M, Sirousazar M, Hassan ZM. PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *Eur Polym J.* 2007;43(3):773-81.
63. Choi YS, Lee SB, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH. Studies on gelatin-based sponges. Part III: A comparative study of cross-linked gelatin/alginate, gelatin/hyaluronate and chitosan/hyaluronate sponges and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. *J Mater Sci-Mater M.* 2001;12(1):67-73.
64. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(3):322-37.
65. Paul W, Sharma CP. Chitin and alginates wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs* 2004;18(1):18-23.
66. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 2003;24(13):2339-49.
67. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials.* 2005;26(30):5983-90.
68. Ho MH, Wang DM, Hsien HJ, Liu HC, Hsien TY, Lai JH, Hou LT. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26:3197-206.
69. Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 1999;20(12):1133-42.
70. Amaral IF, Lamghari M, Sousa SR, Sampaio P, Barbosa MA. Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation. *J Biomed Mater Res.* 2005;75(2):387-97.
71. Suh, JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials.* 2000;21(24): 2589-98.

Characteristics and application of chitosan in pharmaceutical/biomedical preparations

Bojan Čalija^{1*}, Jela Milić¹, Danina Krajišnik¹, Anđelka Račić²

¹University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11 221 Belgrade

²University of Banja Luka – Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Save Mrkalja 14, 78 000 Banja Luka

*Corresponding author: e-mail: bojanc@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Chitosans are binary linear heteropolysaccharides derived from chitin by its partial deacetylation.

Due to unique cationic nature these biopolymers have enormous potential in pharmacy and biomedicine. This potential is improved by their chemical versatility (molecular mass and degree of deacetylation) and possibility of chemical derivatisation.

Numerous biological activities of chitosans such as mucoadhesivity, hemostatic, hypocholesterolemic and antimicrobial activity are based on their specific polycationic nature.

Gel-forming, cross-linking and polyelectrolyte complex forming ability make chitosans suitable for design of colloidal drug delivery systems, such as dendrimers, liposomes, micelles, micro- and nanoparticles.

Chitosans as well as their derivatives are used in commercially available wound dressings due to their hemostatic activity and ability to stimulate cell proliferation, tissue regeneration process and mild local analgesic effect.

The use of chitosans as dietary supplements has been approved in many countries since their effect on maintenance of normal blood LDL cholesterol concentrations has been confirmed.

Chitosan derivatives, such as N-carboxymethyl chitosan are commonly used in cosmetics, due to their gel and film forming ability, pleasant, hydrating, softening, and protecting effect on skin.

There is a special interest for use of chitosans in tissue engineering due to their ability to form biocompatible porous tridimensional gel networks, whose porosity and *in vivo* degradation can be controlled.

Lack of registered chitosan based products is a consequence of its unsolved regulatory status. Namely, its chemical versatility may affect biodistribution, biodegradation and toxicological profiles, thus making regulatory approval of chitosans as GRAS materials quite difficult.

Keywords: chitosan, chitin, polycation, pharmaceutical/biomedical preparations
