

## CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE

EVA VAVŘÍKOVÁ A JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05  
Hradec Králové  
jarmila.vinsova@faf.cuni.cz

Došlo 11.10.07, přepracováno 3.6.08, přijato 11.9.08.

Klíčová slova: chitosan, antibakteriální aktivita, protinádorová aktivita, antioxidační aktivita

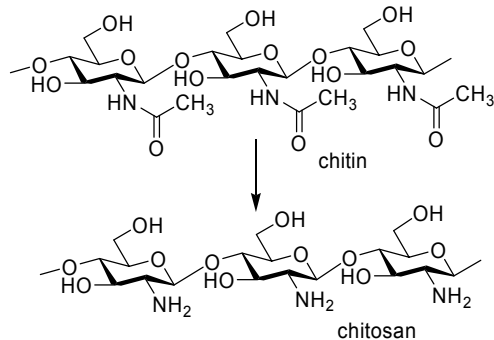
### Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika chitosanu
3. Farmaceutické aplikace chitosanu
  - 3.1. Antibakteriální aktivita
  - 3.2. Protinádorová aktivita
  - 3.3. Antioxidační aktivita
4. Závěr

### 1. Úvod

Polymery jsou v dnešní době stále častěji využívány jako vhodné biodegradabilní nosiče léčiv. Používají se k pomalému uvolňování účinné složky, tedy jako depotní formy, ke zvyšování rozpustnosti a lepší možnosti cíleného podání.

Mezi přírodní polymery typu polysacharidů patří chitosan (poly-D-glukosamin), odvozený od přírodního chitinu, druhého nejrozšířenějšího polysacharidu po celulóse. Získává se alkalickou deacetylací chitinu, několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným nebo enzymaticky působením *N*-deacetylasy (EC 3.5.1.41)<sup>1</sup>, (obr. 1).



Obr. 1. Deacetylace chitinu

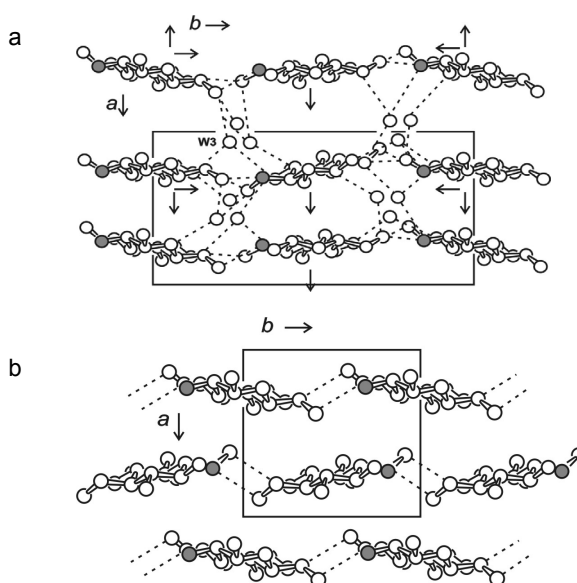
Stupeň deacetylace chitinu se udává v procentech, obvykle v rozmezí 60–100 %. Chitosan se v přírodě vyskytuje pouze v malém množství u několika typů hub rodu *Aspergillus* a *Mucor*<sup>2</sup>.

Chitosan má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní<sup>3</sup>. Pro své výjimečné vlastnosti se používá v různých oborech zahrnujících především biomedicínu, kosmetiku, agrochemii, fyzikální chemii, konzervaci potravin, čištění vody a impregnaci textilií<sup>4</sup>. Používá se také jako potravní doplněk pro snížení hladiny cholesterolu a redukci hmotnosti. Váže na sebe tuky a cholesterol a odvádí je ze zažívacího traktu dříve, než jsou zpracovány<sup>5</sup>. Jako vláknina zlepšuje činnost tlustého střeva a snižuje pocit hladu, proto se používá k hubnutí. Někdy se mu přičítá přílišný redukční účinek, který však nebyl vědecky prokázán.

### 2. Charakteristika chitosanu

Chitosan neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan patří mezi méně časté kationové polymery. V porovnání s chitínem má větší chemickou a biochemickou reaktivitu.

Rentgenostrukturní analýzou<sup>6,7</sup> byly objeveny 4 krystalické polymorfy chitosanu, tři hydratované (tendonová forma, forma II a L2), které snadno vytvářejí ve vodě rozpustné soli s organickými a minerálními kyselinami a jedna nehydratovaná forma, která vzniká zahříváním hydratovaného chitosanu na teplotu 200 °C (cit.<sup>3</sup>). Dehydratací se



Obr. 2. a) Hydratovaný chitosan, b) nehydratovaný chitosan

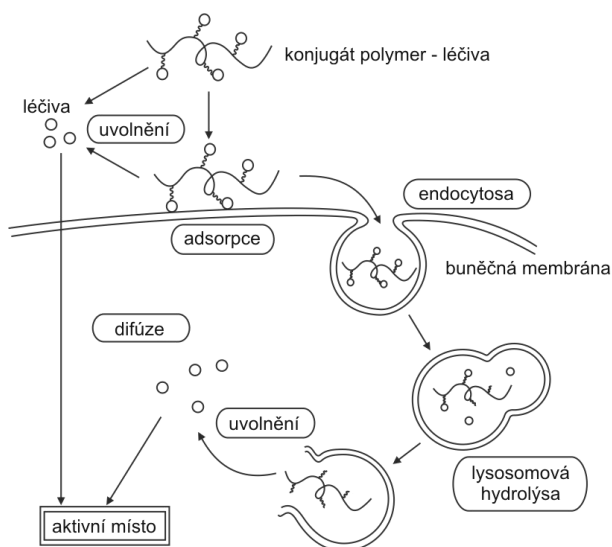
zkracují vzdálenosti vrcholů struktury „cik-cak“ a oddálení jednotlivých řetězců, (obr. 2, cit.<sup>8</sup>). Tato změna je ireversibilní. Nehydratované krystaly jsou nerozpustné v kyselinách, s kovovými ionty tvoří komplexy. Krystaly bezvodé formy ztrácí funkci biomateriálů a mohou být použity jako inertní pryskyřice.

Molekula chitosanu má tři reaktivní centra: primární aminoskupinu, primární a sekundární hydroxyskupinu. Aminoskupina snadno podléhá kvarternizaci, čímž lze zvýšit rozpustnost chitosanu ve vodě a tvoří komplexy s ionty kovů. Primární hydroxyskupina bývá nejčastěji substituována spojovacími články „spacery“, na které se váže aktivní složka – léčivo nebo skupina, která je zodpovědná za cílení léčiva nebo zvýšení rozpustnosti ve vodě. Sekundární hydroxyskupina je modifikována především za účelem zvýšení rozpustnosti ve vodě.

### 3. Farmaceutické aplikace chitosanu

Pro své výjimečné vlastnosti je chitosan velmi zajímavý materiál a bioaktivní činitel ve farmaceutických a biomedicinských odvětvích. Lze jej použít jako systém pro transport léčiv, jehož hlavním znakem je řízené uvolňování a cílení léčiva. Vyžaduje se též optimální odpověď receptoru, minimální vedlejší účinky a prodloužený efekt léčiva.

Polymer může být léčivem, pokud sám vykazuje farmakologickou aktivitu, i když jeho monomerní jednotky jsou neaktivní. Polymerní proléčivo je makromolekulární látka, která slouží nejčastěji jako nosič léčiva, sama může mít i nemusí biologickou aktivitu. Je obvykle složeno z polymerního nosiče, biodegradabilní vazby mezi nosičem a léčivem a mívá skupinu, která způsobuje cílení, např. specifický peptid pro cílovou buňku.



Obr. 3. Cesty léčivé látky k aktivnímu místu

Použití makromolekulárních proléčivových konjugátů s nízkou molekulovou hmotností je jednou z metod transportu léčiv, který je zaměřen na zlepšení pohybu látky změnou rozpustnosti a molekulární velikosti, udržení vhodných koncentrací léčiv pomalu se uvolňujících z nosičů, cílený transport léčiv do cílových buněk, podporu inkorporace léčiv do buněk endocytózou a hybridizací dvou druhů léčiv nebo léčiva s bioaktivním polymerním nosičem. Design konečné molekuly konjugátu musí být také v souladu s fyzikálními vlastnostmi konjugátu a biochemickými vlastnostmi polymerního nosiče. Polymerní nosiče (jejich velikost, elektrický náboj, hydrofilnost nebo lipofilnost a specifická transmembránová transportní schopnost) mohou změnit farmakologické a imunologické aktivity látek, které roznášejí.

Průnik makromolekulárního proléčiva do buňky může probíhat difúzí uvolněného léčiva do buňky nebo endocytózou konjugátu polymer-léčivo (obr. 3). Nejideálnější cestou pro polymery je endocytóza, kdy je celý konjugát vpraven do buňky a v lysosomech se z něho léčivo postupně uvolňuje působením lysosomových enzymů.

#### 3.1. Antibakteriální aktivita

Samotný chitosan vykazuje antibakteriální účinnost vůči mnoha grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*) i gramnegativním bakteriím (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*)<sup>9</sup> a houbám při pH < 6. Přesný mechanismus antimikrobiální účinnosti sice není plně znám, ale předpokládá se, že kladně nabitě aminoskupiny glukosaminových jednotek interagují s negativně nabitými komponentami mikrobiálních buněčných membrán, tím mění propustnost a způsobují únik intracelulárního obsahu<sup>10,11</sup>, což vede k rozpadu buněk<sup>12–14</sup>. Další návrh mechanismu působení se týká penetrace nízkomolekulárního chitosanu do buňky, kde se váže na DNA a způsobuje částečnou inhibici RNA a proteinové syntézy<sup>15</sup>. Chitosan rovněž chelatuje s kovy potřebnými pro růst mikroorganismů<sup>16</sup>. Biologická aktivita chitosanu závisí na mnoha faktorech (molekulové hmotnosti, stupni deacetylace chitinu, derivatizaci, typu substituce, velikosti a poloze substituentů na chitosanovém skeletu, rozpustnosti, pH roztoku), které vedou k rozsáhlému studiu jeho modifikací ve snaze o přípravu vhodné aplikační formy, zlepšení účinku a cíleného působení.

Důležitým faktorem je velikost molekuly chitosanu a jeho koncentrace<sup>17</sup>. Obecně lze konstatovat, že optimální velikost aktivního chitosanu se pohybuje v rozmezí 2 až 200 kDa.

Tokura a spol.<sup>18</sup> objevili, že chitosan s vyšší molekulovou hmotností (9300) téměř úplně inhibuje aktivitu *E. coli*, zatímco chitosan s nízkou molekulovou hmotností (2200) je inaktivní. K objasnění tohoto pozoruhodného faktu bylo použito chitosanu značeného pomocí fluorescein isothiokyanátu (FITC). Vysokomolekulární chitosan zaplní vnější stranu buněčné stěny a inhibuje pronikání živin dovnitř, zatímco chitosan s nízkou molekulovou

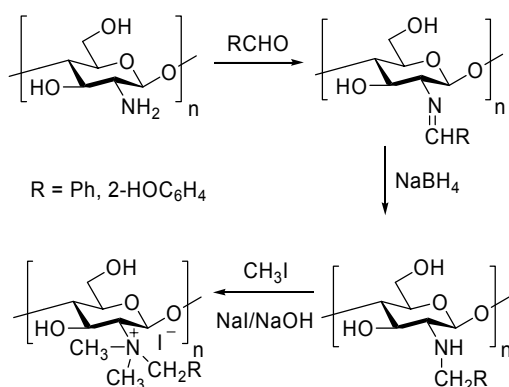
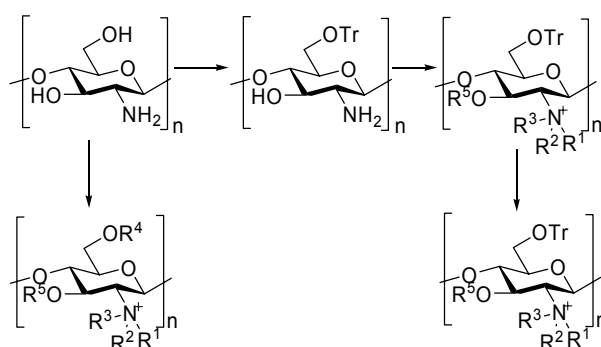


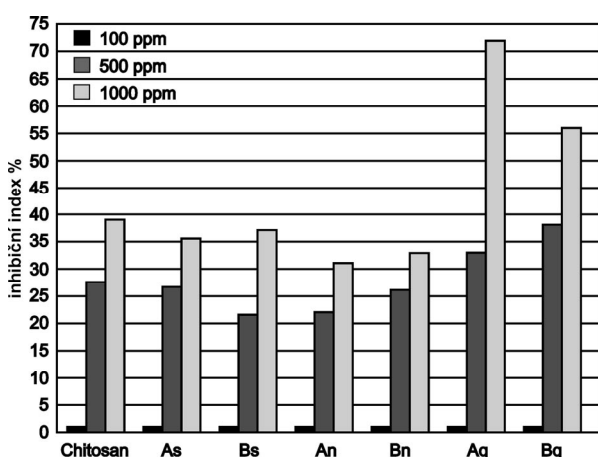
Schéma 1. Příprava Schiffových a kvarterních bází


 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = \text{H}, \text{CH}_3$   
 $\text{Tr} = \text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ 
Schéma 2. *N*-methylace oligochitosanu a chitosanu

hmotností se akumuluje uvnitř buňky, což ukazuje na to, že *E. coli* metabolizuje tento chitosan jako potravu.

Další důležitou podmínkou je pH. Antimikrobiální účinnost chitosanu vzrůstá s klesajícím pH<sup>19,20</sup>. Je-li pH < 6,5, dochází k ionizaci za vzniku pozitivně nabitě části. Nemodifikovaný chitosan je při pH 7 nerozpustný a antibakteriálně neúčinný<sup>19,21</sup>, proto je velká pozornost směřována na přípravu jeho rozpustných solí. Rozpustnost se zvyšuje jak kvarternizací<sup>9,22</sup>, tak hydrofilní substitucí, např. u (2-hydroxypropyl)chitosanu<sup>23</sup>, *N*-(karboxybutyl)chitosanu<sup>24</sup>, (karboxymethyl)chitosanu<sup>25,26</sup> a sulfatovaného chitosanu<sup>27,28</sup>, která navíc zvyšuje antibakteriální vlastnosti. Pro tento efekt se také syntetizují deriváty chitosanu větvené na uhlíku C6 monomerní jednotky<sup>29</sup>.

Kvarternizace dusíku aminoskupiny patří k nejčastějším modifikacím. Volná aminoskupina byla kondenzována s benzaldehydem (A) a salicylaldehydem (B) za vzniku Schiffových bází, které byly dále redukovány tetrahydridoboritanem sodným a v posledním stupni kvarternizovány



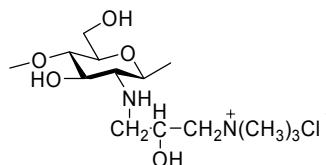
Obr. 4. Antifungální účinnost proti *Colletotrichum lagenarium*; As, Bs – Schiffovy báze; An, Bn – redukované formy; Aq, Bq – kvarterní báze

methyljodidem (schéma 1). U všech produktů byla sledována antifungální účinnost. Nejúčinnější byly právě kvarterní báze<sup>30</sup> (viz obr. 4).

Methylace chitosanu vedla k syntéze *N,N,N*-trimethylchitosanu (schéma 2). Postupně byly methylovány vedle aminoskupin také hydroxyskupiny chitosanu a jeho oligomerů a sledována jejich antibakteriální účinnost vůči *Staphylococcus aureus* při pH 5,5 a 7,2. Oligomery chitosanu se ukázaly jako neaktivní, zatímco methylované deriváty chitosanu vykazovaly jistou účinnost. Kvarternizace je potřebná pro účinnost při pH 7,2. Náboj kvarterní amoniové skupiny chitosanu umožňuje jeho rozpustnost v dolních částech gastrointestinálního traktu za neutrálních nebo alkalických podmínek<sup>31</sup>. Vedle *N*-methylovaných kvarterních amoniových solí byl připraven i analogický *N*-ethylderivát, který se používá jako perorální nosič<sup>32</sup>.

Kvarternizací lze zavést do chitosanu substituent s aminoskupinou, jako je např. při přípravě (2-hydroxypropyl)trimethylamoniového derivátu (obr. 5) reakcí chitosanu s glycidyltrimethylammonium-chloridem<sup>33</sup>, který vykázal antioxidační a biocidní účinnost proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, a *Candida albicans*.

Hydrochlorid (ethylamino)-2-(hydroxyethyl)chitosanu byl nejprve hydroxyetylován na primární hydroxyskupině a poté alkylován (2-chlorethyl)amin-hydrochloridem (schéma 3, cit.<sup>34</sup>). Vznikl ve vodě lépe rozpustný, antibakteriálně účinný derivát proti *Escherichia coli*.



Obr. 5. Modifikovaný chitosan

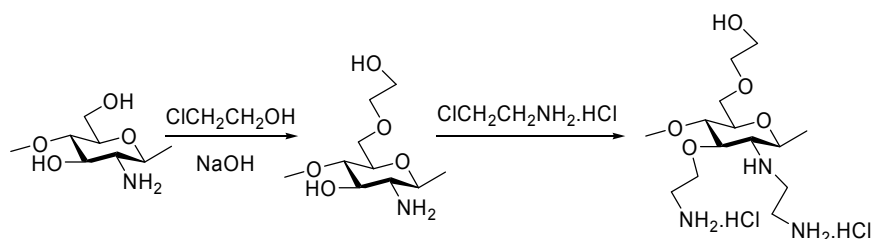


Schéma 3. Syntéza ethylamino(hydroxyethyl)chitosanu

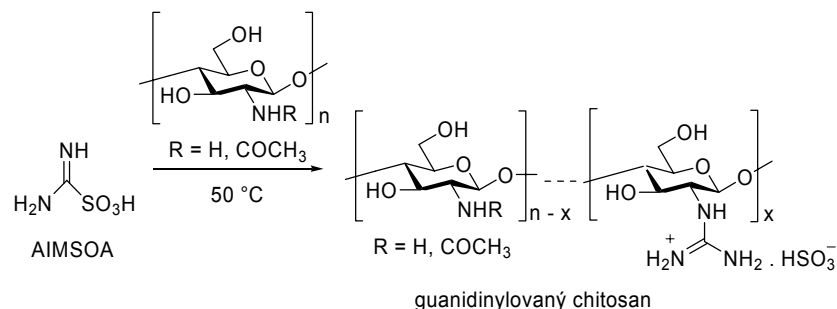


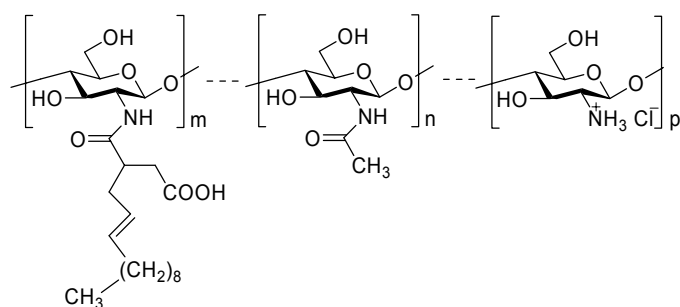
Schéma 4. Guanidinylace chitosanu

Poly(1-vinylimidazol) je znám jako ve vodě dobře rozpustný antibakteriálně účinný polymer<sup>35</sup>. Byl připraven reakcí s chitosanem ve zředěné kyselině octové působením iontů ceru. Kombinace těchto sloučenin vedla k účinnosti proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Protonace vinylimidazolových jednotek zvyšuje rozpustnost ve vodě<sup>36</sup>.

Guanidinylace chitosanu o různých molekulových hmotnostech vedla ke zvýšení počtu aminoskupin v molekule. Byla provedena aminoiminomethansulfonovou kyselinou (schéma 4). Tyto deriváty vykázaly čtyřikrát nižší hodnoty MIC než samotný chitosan. Zvýšená aktivita je způsobena vyšší hustotou pozitivního náboje guanidinových derivátů, které snadněji asociují na negativním povrchu buněk a vykazují vyšší antibakteriální účinnost proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*<sup>37</sup>.

Cílení do jaterních buněk vedlo k syntéze galaktosylovaného chitosanu s vysokou afinitou k HepG2 (buněčná linie rakovinných jaterních buněk). Po zavedení lysinového spojovacího článku na chitosan následovalo kovalentní spojení 4-*O*-β-D-galaktopyranosyl-D-glukonové kyseliny s více vaznými galaktosovými jednotkami. β-D-Galaktosové jednotky jsou významné právě pro cílenou dopravu do jaterních buněk<sup>38</sup>. Tyto glykokonjugátové molekuly vykázaly aktivitu vůči *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.

*N*-Alkylace chitosanu disacharidy vedla ke zvýšení antibakteriální účinnosti proti *E. coli* a *S. aureus*. Typ disacharidu spojeného s molekulou chitosanu, stupeň substituce disacharidu a pH ovlivňovalo antibakteriální účinnost. Maltosové deriváty chitosanu (stupeň deacetylce chitinu 30–40 %) vykázaly nejvyšší antibakteriální účinnost proti *S. aureus*, zatímco proti *E. coli* byly neúčinnější cello-

Obr. 6. Příprava nízkomolekulárních *N*-[2-(dodec-2-en-1-yl)succinoyl]chitosanů

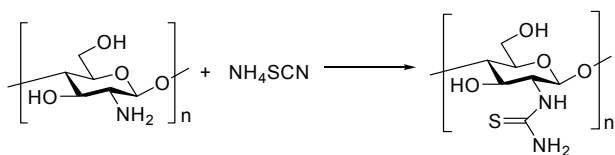


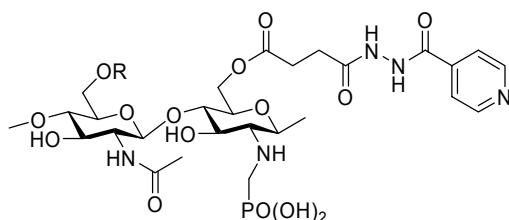
Schéma 5. Thioamocovinový derivát chitosanu

biosové deriváty (stupeň deacetylace chitinu 30–40 %). *N*-Alkylované disacharidové deriváty chitosanu vykázaly vyšší aktivitu než samotný chitosan při pH 7,0 (cit.<sup>39</sup>).

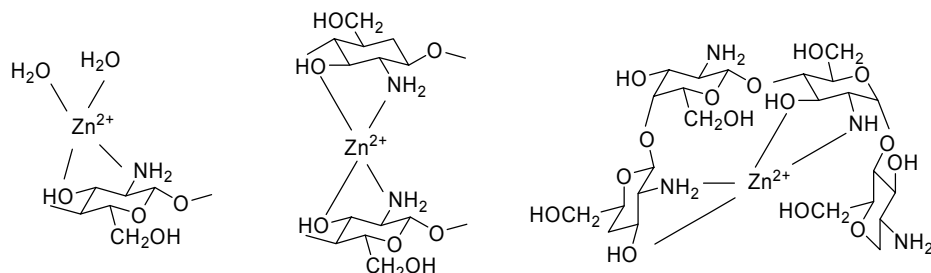
Dále byla připravena série nízkomolekulárních *N*-[2-(dodec-2-en-1-yl)sukcinoyl]chitosanů reakcí chitosanu (4,6 kDa), s 2-(dodec-2-en-1-yl)sukcinanhydridem (obr. 6). Tyto deriváty s dlouhým alifatickým řetězcem a různým stupněm *N*-substituce jsou účinné proti *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Candida kruisei* a *Fusarium oxysporum*<sup>40</sup>.

Antibakteriální vlastnosti chitosanu mohou významně zvýšit stříbrné ionty, až o 98 % (cit.<sup>20</sup>). Samotné stříbro a jeho ionty jsou známy svou antibakteriální účinností<sup>41</sup>. Proto byly připraveny komplexy thioamocovinového chitosanu připraveného reakcí chitosanu s thiokyanátem amonným v ethanolu (schéma 5). Je zajímavé, že se stříbrem koordinuje svými volnými elektrony síra, nikoliv dusík. Tyto komplexy vykázaly široké spektrum antimikrobiální účinnosti. Minimální inhibiční koncentrace byly 20× nižší než u samotného chitosanu, komplex měl vyšší antibakteriální než antifungální účinnost<sup>42</sup>.

Mnoho výzkumů se zabývá kombinací chitosanu a jiného antibakteriálního činidla. Např. konjugáty s tetra-



Obr. 7. Chitosan-isoniazid-hemisukcinát



Obr. 8. Struktury zinečnatých komplexů

cyklinem a karminomycinem si plně zachovaly antibakteriální účinnost<sup>43</sup>. Tablety nebo tobolky metronidazolu se používají k léčbě *Helicobacter pylori*. Pro lepší uvolňování z žaludku byl zabudován do chitosanových tobolek<sup>44</sup>.

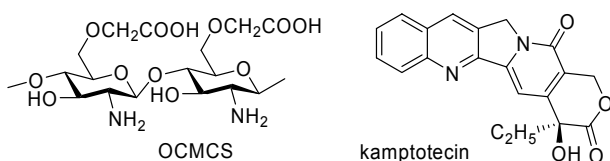
Chitosan byl použit k syntéze polymerního proléčiva isoniazidu (INH), důležitého antituberkulotika, pro prodloužení doby působení. Díky své rozpustnosti ve vodě se může podávat intravenózně. Kondenzace s INH vyžadovala dvoustupňovou syntézu. Nejprve byla provedena funkcionalizace chitosanu kyselinou fosforitou a částečná formylace volných aminoskupin. Isoniazid byl substituován sukcinanhydridem na sukcinyl isoniazid, který pak reakcí s chitosanem poskytl chitosan-isoniazid-hemisukcinát (obr. 7, cit.<sup>45</sup>).

Monomerní alginát sodný byl pospojován chloridem vápenatým a poté pokryt chitosanem. Tento materiál se používá k léčbě ran i popálenin. Použití chitosanu při léčbě ran podporuje růst fibroblastů a působí na aktivitu makrofágů, což urychluje léčebný proces<sup>46</sup>. Z dalších léčiv, která byla navázána na tento komplex, lze jmenovat ciprofloxacin<sup>46</sup>, norfloxacin<sup>47</sup> a gatifloxacin<sup>48</sup>.

Pokud chitosan reaguje s roztokem chloridu zinečnatého, vytváří cheláty s aminoskupinami různým způsobem (obr. 8). Tyto komplexy vykazují široké spektrum antimikrobiální účinnosti, jsou 2–8 krát účinnější než chitosan<sup>49</sup>.

### 3.2. Protinádorová aktivita

Protinádorová účinnost chitosanu závisí na jeho molekulové hmotnosti, rozpustnosti a obsahu acetylových skupin. Vysokomolekulární chitosan je neúčinný, proto je třeba připravit chitosan o nižší molekulové hmotnosti. Ke štěpení polymerů chitosanu jsou nejčastěji používány přirozené enzymy chitosanasy a chitinasy<sup>3</sup>. Pro hydrolyzu lze využít i několika dalších levnějších hydrolytických enzymů, např. lysozymu<sup>50</sup>, pektinasy<sup>51</sup>, hemicellulasy<sup>52</sup> a papainu<sup>53</sup>. Pro přípravu chitosanu rozpustného ve vodě byl použit také *Bacillus amyloliquefaciens* V656 obsahující chitinasu<sup>54</sup>. Získané hexamery vykázaly protinádorovou aktivitu, inhibovaly růst buněk adenokarcinomu CT26 u myši a indukovaly apoptózu. Hydrolyzáty indukují charakteristickou DNA fragmentaci buněk CT26. Po částečné hydrolyze *N*-acetylovaného chitosanu celulósou<sup>55</sup> se změnila krystalová struktura, termostabilita a zvýšila se rozpustnost ve vodě bez změny chemické struktury. Částečně



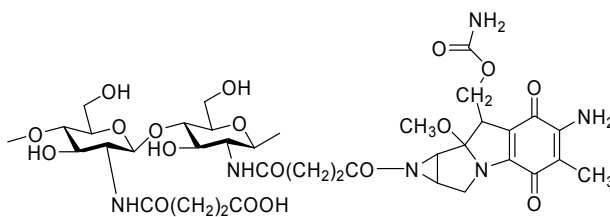
Obr. 9. Chitosan-kamptotecin

acetylovaný nízkomolekulární chitosan, hexamery a heptamery chitosanu a chito oligosacharidy vykazují protinádorovou účinnost u sarkomu 180 po intraperitoneálním a perorálním podání. Hlavním cílem výzkumu v této oblasti je objasnění vlastností nízkomolekulárních chitosanů, jejich působení na inhibici angiogeneze a indukce apoptózy u Erichova ascitického tumoru u myši. Po intraperitoneální injekci buňky tohoto nádoru ztrácejí v důsledku indukce apoptózy až 90 % kapalné fáze<sup>56</sup>.

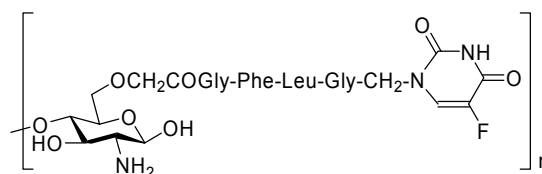
Na buněčné linii 293 a HeLa byly testovány různé poměry chitosanu a pentahydrátu síranu měďnatého (1:1.56, 1:0.8, a 1:0.4). Měďnatý komplex interaguje s DNA, což způsobí rozštěpení DNA a protinádorovou účinnost. Chelatace měďnatých iontů vede k zesílení pozitivního náboje na aminoskupině chitosanu. Komplex inhibuje rozmnožování buněk v S fázi růstového cyklu obou linií. K buňkám linie 293 byl komplex selektivnější než k buňkám HeLa; na normální plicní buněčné linii HLF nepůsobí. Nejvyšší aktivitu vykázal při poměru 1:0,4. Účinnost tedy závisí na koncentraci iontů v komplexu<sup>57</sup>.

Chitosan se používá především jako nosič protinádorové látky na místo účinku. Kamptotecin je alkaloid a protirakovinné léčivo. Je velmi účinný při léčbě nádoru žaludku, tlustého střeva a močového měchýře, jeho nevýhodou je špatná rozpustnost a toxicita. Kamptotecinové alkaloidy blokuji topoisomerasu I, enzym důležitý pro replikaci DNA. Při inhibici topoisomerasy I je zablokováno rozpletení dvojitého vlákna DNA a řetězec DNA se rozpadá. Agregací s *O*-(karboxymethyl)chitosanem (OCMCS) byl připraven biokompatibilní a amfifilní systém pro řízené uvolňování látky v cílové tkáni, (obr. 9, cit.<sup>58</sup>).

Dalším známým léčivem proti leukemii P388, leukemii L1210 a melanomu B16 je mitomycin C. Poškozuje DNA způsobem podobným alkylačním cytostatikům. Jako nosič byl použit *N*-sukcinylochitosan, který je netoxický při koncentraci 2 g kg<sup>-1</sup> i.p. a protinádorově neaktivní. Reakcí *N*-sukcinylochitosanu a mitomycinu C za použití vodního karbodiimidu byl připraven konjugát, který není nutné podávat i.p. (obr. 10, cit.<sup>59,60</sup>).

Obr. 10. Konjugát *N*-sukcinylochitosanu a mitomycinu C

5-Fluoruracil (5FU) patří do skupiny antimetabolitů, který je používán již řadu let. Má však nepříjemné vedlejší účinky. Pro jejich snížení za zachování protinádorové aktivity byl navázán na chitosan přes hexamethylenový můstek a močoviny zbytek. Konjugát chitosan/močovina/C6/močovina/5FU a chitosan-oligosacharid/močovina/C6/močovina/5FU konjugát vykazovaly silnou inhibiční aktivitu vůči Meth-A fibrosarkomu a MH-134Y hepatomu. Ve vodě rozpustné makromolekuly se do buňky dostávají endocytózou a fagocytózou. Nádorové buňky přijímají více těchto makromolekul. V lysosomech nádorových buněk je přítomno zvýšené množství lysosomové proteasy – kathepsinu B. Bylo zjištěno, že tetrapeptidový spojovací článek Gly-Phe-Leu-Gly umožňuje specifické uvolňování léčiva v lysosomech tímto enzymem, a proto byl 5FU konjugován s částečně acetylovaným *O*-(methoxykarbonyl)chitosanem (obr. 11, cit.<sup>61</sup>).

Obr. 11. Konjugát *O*-(karboxymethyl)chitosanu a Gly-Phe-Leu-Gly-5-fluoruracilu

Doxorubicin je antracyklinové protinádorové antibiotikum s širokým spektrem protinádorové aktivity. Působí blokádu enzymu topoisomerasy II, který se podílí na změnách v prostorovém uspořádání DNA při její replikaci před dělením buňky. Při blokadě topoisomerasy II se nespojují jednotlivé části DNA a ta se rozpadá. Pro velmi silné vedlejší účinky (kardiotoxicita), nízkou stabilitu a špatnou rozpustnost ve vodě byl připraven jako několikvrstvé mikrotobolky obsahující chitosan a alginát vázané na (karboxymethyl)celulose dotované koloidními částicemi uhličitanu vápenatého<sup>62</sup>. Enkapsulace léčiva efektivně indukuje apoptózu HepG2 nádorových buněk.

### 3.3. Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky, které zpomalují nebo brání oxidaci oxidovatelných buněčných substrátů. Zachytávají radikály a ROS (reaktivní kyslíkové species) obsahující reaktivní kyslíkové atomy, zahrnující hydroxylový radikál •OH, superoxidový radikál •O<sub>2</sub><sup>-</sup> a peroxid vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tyto radikály jsou velmi nestabilní a reagují rychle s jinými látkami v těle, což vede k poškození buněk a tkání. Antioxidanty působí proti tvorbě volných radikálů a ROS nebo aktivují celou řadu detoxikujících proteinů.

V posledních letech je věnována velká pozornost také antioxidační účinnosti chitosanu. Tato účinnost rovněž závisí na velikosti molekuly a stupni acetylace<sup>63–65</sup>. Nízkomolekulární, částečně *N*-acetylovaný chitosan rozpustný ve vodě je možné považovat za přírodní antioxidant. I když přesný mechanismus jeho antioxidační účinnosti

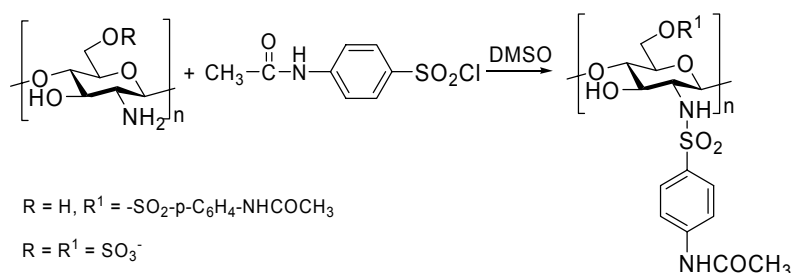


Schéma 6. Sulfatované deriváty chitosanu o molekulové hmotnosti 4000 Da a 20 000 Da

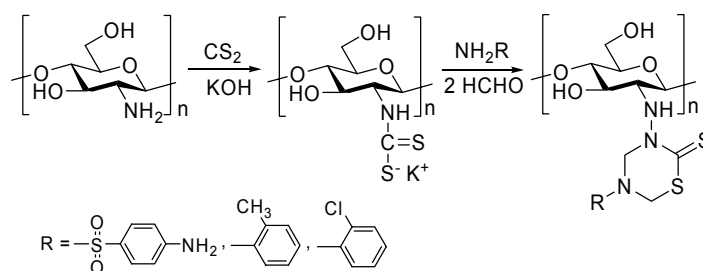


Schéma 7. Příprava 1,3,5-thiadiazin-2-thionových derivátů chitosanu

není znám, předpokládá se, že amino a hydroxyskupiny vázané na C-2, C-3 a C-6 pyranosového cyklu reagují s radikály za tvorby stabilnějších polymerních radikálů. Účinnost pravděpodobně souvisí s chelatačními vlastnostmi chitosanu, které vedou ke zpomalení oxidace lipidů<sup>66</sup>. Chitosan inhibuje peroxidaci linolenové kyseliny, vykazuje vysokou aktivitu vůči hydroxylovým radikálům (83,7 %, cit.<sup>67</sup>).

Xing a spol.<sup>68</sup> publikovali antioxidační aktivitu různých druhů sulfatovaných chitosanů při reakci s radikály. Byly připraveny sulfáty a sulfanilamidové deriváty chitosanu o různých molekulových hmotnostech (schéma 6). Výsledky ukázaly, že zavedení sulfanilamidové skupiny zvyšuje nejenom rozpustnost, ale i antioxidační aktivitu<sup>69</sup>.

Glutathion jako známý přírodní antioxidační peptid obsahující síru inspiroval přípravu celé řady sirných obměn. Do chitosanu byly zavedeny 1,3,5-thiadiazin-2-

-thionové deriváty obsahující dva typy síry s potenciální antioxidační aktivitou<sup>70</sup> (schéma 7).

Eugenol (4-allyl-2-methoxy-fenol) byl zabudován do molekuly chitosanu (schéma 8), aby zvýšil jeho antioxidační účinnost svými fenolickými hydroxyskupinami. Zavedením objemného substituentu se snížila citlivost na pH a zvýšila se inhibice iniciace a propagace oxidačních řetězových reakcí<sup>71</sup>.

Částečně kvarternizované deriváty chitosanu s kyselinou gallovou vykazovaly účinnost proti superoxidům<sup>72</sup>. Superoxidový anion  $\cdot\text{O}_2^-$  vzniká téměř ve všech buňkách a je hlavní příčinou toxicity kyslíku. V porovnání s ostatními kyslíkovými radikály má superoxidový radikál dlouhou životnost a je tedy mnohem nebezpečnější.

Stejně jako u antibakteriálně účinných derivátů chitosanu byla kvůli zvýšení antioxidační účinnosti aminoskupina chitosanu alkylována ethylem, 2-(dimethylamino)

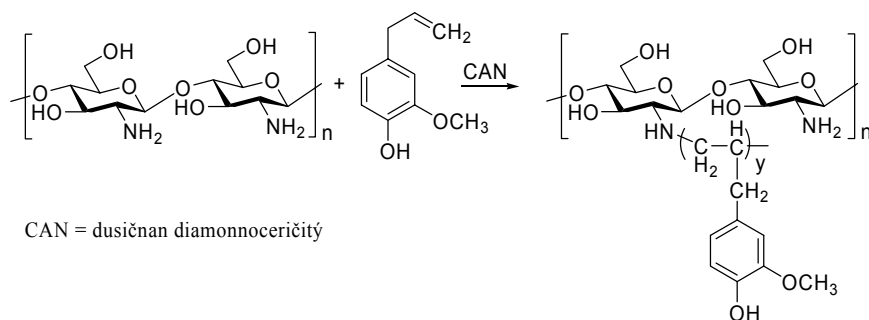
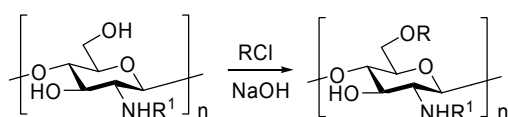


Schéma 8. Eugenolový polymer chitosanu



AEC: R =  $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ ; R<sup>1</sup> = H, COCH<sub>3</sub>  
 DMAEC: R =  $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ; R<sup>1</sup> = H, COCH<sub>3</sub>  
 DEAEC: R =  $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ; R<sup>1</sup> = H, COCH<sub>3</sub>

Schéma 9. Alkylace chitosanu

ethylem a 2-(diethylamino)ethylem<sup>73</sup>. Antioxidační účinnost závisí na stupni deacetylace chitinu a typu substituce. Nejúčinnější lapač ROS volných radikálů se ukázal AEC90, což je 90% deacetylovaný *N*-aminoethylovaný chitosan mající nejvyšší procento volných aminoskupin (schéma 9).

5-Chlor-2-hydroxybenzaldehyd a 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyd byly použity pro přípravu Schiffových bází s aminoskupinami chitosanu a (karboxymethyl)chitosanu (schéma 10, cit.<sup>74</sup>). Přestože byla do molekuly vnesena fenolická hydroxyskupina, antioxidační účinnost vůči superoxidovému a hydroxylovému radikálu se nezvýšila. Z toho vyplývá, že pro tuto účinnost je nezbytná především volná aminoskupina, i když hydroxyskupiny u předchozích derivátů působily stimulačně.

#### 4. Závěr

Chitosan vykazuje celou řadu biologických aktivit. Podle narůstajícího počtu publikací v posledních letech lze usuzovat, že jde o velice perspektivní polykationtový polysacharid s širokým potenciálem využití v nejrůznějších aplikacích. V oblasti farmacie je jeho budoucnost především v roli biodegradabilního nosiče léčiv různých farmakologických skupin s možností jejich modifikace pro cílovou tkáň, odstranění některých nežádoucích vlastností léčiva a zvýšení biodostupnosti léčiva.

*Tato práce byla podpořena projekty MSM 0021620822 a GAUK 76807/2007.*

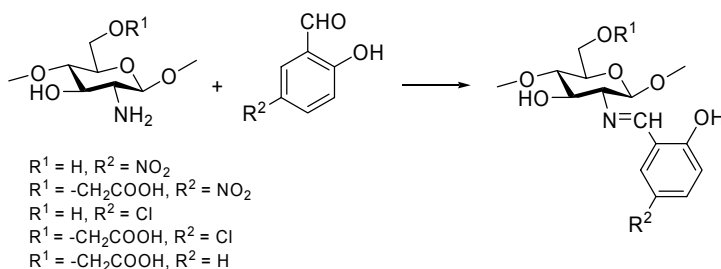


Schéma 10. Příprava Schiffových bází

#### LITERATURA

1. Tokuyasu K., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi K.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 60, 1598 (1996).
2. Hu K. J., Hu J. L., Ho K. P., Yeung K. W.: *Carbohydr. Polym.* 58, 45 (2004).
3. Uraganu T., Tokata S. (ed.): *Material Science of Chitin and Chitosan*. Springer, New York 2006.
4. Vinšová J., Vavříková E.: *Chem. Listy* 101, 978 (2007).
5. Koide S. S.: *Nutr. Res. (N. Y.)* 18, 1091 (1998).
6. Clark G. L., Smith A. F.: *J. Phys. Chem.* 40, 863 (1937).
7. Okuyama K., Noguchi K., Miyazawa T., Yui T., Ogawa K.: *Macromolecules* 30, 5849 (1997).
8. Yui T., Imada K., Okuyama K., Obata Y., Suzuki K., Ogawa K.: *Macromolecules* 27, 7601 (1994).
9. Chun H. K., Jang W. C., Heung J. C., Kyu S. C.: *Polym. Bull.* 38, 387 (1997).
10. Fernandez-Saizn P., Ocio M. J., Lagaron J. M.: *Biopolymers* 83, 577 (2006).
11. Tsai G. J., Su W. H.: *J. Food Prot.* 62, 239 (1999).
12. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L.: *Int. J. Food Microbiol.* 95, 147 (2004).
13. Chen Y. L., Chou C. C.: *Food Microbiol.* 22, 29 (2005).
14. Helander I. M., Nurmiäho-Lassila E. L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller, S.: *Int. J. Food Microbiol.* 71, 235 (2001).
15. Zheng L. Y., Zhu J. F.: *Carbohydr. Polym.* 54, 527 (2003).
16. Jia G., Wang H. L., Wu J. C. G., Lin J. G.: *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 932 (2004).
17. Liu N., Chen X. G., Park H. J., Liu C. G., Liu C. S., Meng X. H., Yu L. J.: *Carbohydr. Polym.* 64, 60 (2006).
18. Tokura S., Ueno K.: *Macromol. Symp.* 120, 1 (1997).
19. Yang T. C., Chou C. C., Li C. F.: *Int. J. Food Microbiol.* 97, 237 (2005).
20. No H. K., Park N. Y., Lee S. H., Meyers S. P.: *Int. J. Food Microbiol.* 74, 65 (2002).
21. Chung Y. C., Kuo C. L., Chen C. C.: *Bioresour. Technol.* 96, 1473 (2005).



22. Jia Z., Shen D., Xu W. *Carbohydr. Res.* 333, 1 (2001).
23. Xie W., Xu P., Wang W., Liu Q.: *Carbohydr. Polym.* 50, 35 (2002).
24. Muzzarelli R., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., Varaldo P. E.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2019 (1990).
25. Liu X. F., Guan Y. L., Yang D. Z., Li Z., Yao K. D.: *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324 (2001).
26. Wang L. C., Chen X. G., Zhoní D. Y., Xu Q. C.: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 18, 1125 (2007).
27. Jayakumar R., Nwe N., Tokura S., Tamura H.: *Int. J. Biol. Macromol.* 40, 175 (2007).
28. Huang R., Du Y., Zheng L., Liu H., Fan L.: *React. Funct. Polym.* 59, 41 (2004).
29. Kurita K., Kojima T., Nishiyama Y., Shimojoh M.: *Macromolecules* 33, 4711 (2000).
30. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P.: *Carbohydr. Res.* 342, 1329 (2007).
31. Runarsson O. V., Holappa J., Nevalainen T., Hjalmarsson M., Jarvinen T., Loftsson T., Einarsson J. M., Jonsdottir J., Valdimarsdottir M., Massona M.: *Eur. Polym. J.* 43, 2660 (2007).
32. Avadi M. R., Sadeghi A. M. M., Tahzibi A., Bayati Kh., Pouladzadeh M., Zohuriaan-Mehr M. J., Rafiee-Tehrani M.: *Eur. Polym. J.* 40, 1355 (2004).
33. Chi W., Qin C., Zeng L., Li W., Wang W.: *J. Appl. Polym. Sci.* 103, 3851 (2007).
34. Xie Y., Liu X., Chen Q.: *Carbohydr. Polym.* 69, 142 (2007).
35. Saravanan S., Selvan P. S., Gopal N., Gupta J. K., De B.: *Arch. Pharm.* 338, 488 (2005).
36. Caner H., Yilmaz E., Yilmaz O.: *Carbohydr. Polym.* 69, 318 (2007).
37. Hu Y., Du Y., Yang J., Kennedy J. F., Wang X., Wang L.: *Carbohydr. Polym.* 67, 66 (2007).
38. Mi F. L., Yu S. H., Peng C. K., Sung H. W., Shyu S. S., Liang H. F., Huang M. F., Wang C. C.: *Polymer* 47, 4348 (2006).
39. Yang T. C., Chou C. C., Li C. F.: *Int. J. Food Microbiol.* 97, 237 (2005).
40. Tikhonov V. E., Stepnova E. A., Babak V. G., Yamskov I. A., Palma-Guerrero J., Jansson H. B., Lopez-Llorca L. V., Salinas J., Gerasimenko D. V., Avdienko I. D., Varlamov V. P.: *Carbohydr. Polym.* 64, 66 (2006).
41. Kang H. Y., Jung M. J., Jeong Y. K.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15, 521 (2000).
42. Chen S., Wu G., Zeng H.: *Carbohydr. Polym.* 60, 33 (2005).
43. Krysteva M., Todorova N. P., Maneva K., Todorov D., Dimnitrov C.: *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 14, 178 (1999).
44. Ishak R. A. H., Awad G. A. S., Mortada N. D., Nour S. A. K.: *J. Controlled Release* 119, 207 (2007).
45. Rando D. G., Brandt C. A., Ferreira E. I.: *Braz. J. Pharm. Sci.* 40, 335 (2004).
46. Ozturk E., Agalar C., Kececi K., Denkbaz E. B.: *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 1602 (2006).
47. Denkbaz E. B., Ozturk E., Ozdemir N., Kececi K., Agalar C.: *J. Biomater. Appl.* 18, 291 (2004).
48. Zhu A., Jin W., Juan L., Yang G., Yu H., Wu H.: *Carbohydr. Polym.* 68, 693 (2007).
49. Wang X., Du Y., Liu H.: *Carbohydr. Polym.* 56, 21 (2004).
50. Varum K. M., Holme H. K., Izume M., Stokke B. T., Smidsrod X.: *Biochim. Biophys. Acta* 1291, 5 (1996).
51. Shin-ya Y., Lee M. Y., Hinode H., Kajiuchi T.: *Biochem. Eng. J.* 7, 85 (2001).
52. Qin C., Du Y., Xiao L., Li Z., Gao X.: *Int. J. Biol. Macromol.* 31, 111 (2002).
53. Pantaleone D., Yalpani M., Scollar M.: *Carbohydr. Res.* 237, 325 (1992).
54. Liang T. W., Chen Y. J., Yen Y. H., Wang S. L.: *Process Biochem.* 42, 527 (2007).
55. Qin C., Zhou B., Zeng L., Zhang Z., Liu Y., Du Y., Xiao L.: *Food Chem.* 84, 107 (2004).
56. Prashanth K. V. H., Tharanathan R. N.: *Biochim. Biophys. Acta* 1722, 22 (2005).
57. Zheng Y., Yi Y., Qi Y., Wang Y., Zhang W., Du M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4127 (2006).
58. Aiping Z., Jianhong L., Wenhui Y.: *Carbohydr. Polym.* 63, 89 (2006).
59. Song Y., Onishi H., Machida Y., Nagai T.: *J. Controlled Release* 42, 93 (1996).
60. Song Y., Onishi H., Nagai T.: *Int. J. Pharm.* 98, 121 (1998).
61. Ouch T., Tada M., Ohya Y., Hasegawa K., Arai Y., Kadowaki K., Akao S., Matsumoto T., Suzuki S., Suzuki M.: *React. Funct. Polym.* 37, 235 (1998).
62. Zhao Q., Han B., Wang Z., Gao C., Peng C., Shen J.: *Nanomedicine NBM* 3, 63 (2007).
63. Kim K. W., Thomas R. L.: *Food Sci.* 101, 308 (2007).
64. Chien P. J., Sheu F., Juany W. T., Su M. S.: *Food Chem.* 102, 1192 (2007).
65. Koryagin A. S., Erofeeva E. A., Yakimovich N. O., Aleksandrova E. A., Smirnova L. A., Malkov A. V.: *Pharmacol. Toxicol.* 142, 444 (2006).
66. Peng C., Wang Y., Tang Y.: *J. Appl. Polym. Sci.* 70, 501 (1998).
67. Feng T., Du Y., Wei Y., Yao P.: *Eur. Food Res. Technol.* 225, 133 (2007).
68. Xing R. E., Yu H. H., Liu S., Zhang W. W., Zhang Q. B., Li Z. E., Li P. C.: *Bioorg. Med. Chem.* 13, 1387 (2005).
69. Zhong Z., Ji X., Xing R., Liu S., Guo Z., Chen X., Li P.: *Bioorg. Med. Chem.* 15, 3775 (2007).
70. Ji X., Zhong Z., Chen X., Xing R., Liu S., Wang L., Li P.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4275 (2007).
71. Jung B. O., Chung S. J., Lee S. B.: *J. Appl. Polym. Sci.* 99, 3500 (2006).
72. Sun T., Xie W., Xu P.: *Carbohydr. Polym.* 58, 379 (2004).
73. Je J. Y., Kim S. K.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5989 (2006).
74. Guo Z., Xing R., Liu S., Yu H., Wang P., Li C., Li P.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 4600 (2005).

**E. Vavříková and J. Vinšová** (*Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Chitosan and Its Pharmaceutical Applications**

Chitosan is a prospective cationic polysaccharide which shows a number of functions in many fields, including biomedical, pharmaceutical, preservation, microbial

and others. In this review, we have summarized three main areas of its biomedical applications due to its antimicrobial, anticancer, and antioxidant effects. The applications are influenced by a number of factors such as its polymerization degree, the degree of chitin deacetylation and some other physicochemical properties. The biodegradable, non-toxic and non-allergenic nature of chitosan suggests its use as a carrier in drug delivery systems.

---

---

## **Děkan přírodovědecké fakulty UK vypisuje konkurs na přijetí do doktorského studia**

v následujících oborech:

analytická chemie, anorganická chemie, biochemie, fyzikální chemie, makromolekulární chemie, modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie a vzdělávání v chemii.

Studium bude zahájeno 1. 10. 2009. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém studijním oboru. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PřF UK, oddělení doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel.. 221951162, 221951163. Přihlášky se přijímají do 30. 4. 2009.

---

---