

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK / REVIEW ARTICLE

CHITOSAN - PROTOTYPOVÉ POLYMERNÍ NANOČÁSTICE S TRANSPORTNÍ KAPACITOU CHITOSAN - PROTOTYPE POLYMER NANOPARTICLES WITH TRANSPORT CAPACITY

Klára Kubelková¹✉, Simona Frydrychová², Jaroslav Pejchal³

¹ Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové

² Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové

³ Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové

Přijato 17. ledna 2018.

Zrevidováno 4. dubna 2018.

Zveřejněno 8. června 2018.

Souhrn

Chitosan je málo toxický, neimunogenní a biologicky odbouratelný přírodní biopolymer. Jako deacetylovaná forma chitinu je ve velké míře používán v medicíně, zemědělství a průmyslu kvůli snadné výrobě, biokompatibilitě a antimikrobiální aktivitě. Chitosan je také široce studován jako hlavní stavební složka nanomateriálů. Četné studie prokázaly, že chitosan, kromě silných antibakteriálních účinků, lze využít jako adjuvans při konstrukci nových vakcín. Neméně významné je potenciální využití chitosanu jako nosiče xenobiotik. V tomto přehledu uvádíme základní informace o chitosanových nanočásticích, jejich přípravě, purifikaci a charakterizaci, stejně tak nová data o možnosti jejich využití pro přípravu směrovaných léčiv na bázi nanotechnologií.

Klíčová slova: chitosan; chitin; nanočástice; vakcinace; nanotechnologie

Summary

Chitosan is low toxic, non-immunogenic and biodegradable natural biopolymer. As the deacetylated form of chitin, it is extensively used in medicine, agriculture and industry for easy production, biocompatibility and antimicrobial activity. Chitosan is also widely studied as the main structural unit of nanomaterials. Numerous studies have shown the strong antimicrobial activity of chitosan including its efficacy as an adjuvant for construction of new vaccines. In this overview, we present the basic information on chitosan nanoparticles, their preparation, purification, and characterization as well as the new data on their utilization for the construction of targeted drugs based on nanotechnologies.

Key words: chitosan; chitin; nanoparticles; vaccination; nanotechnology

Abbreviations: NALT – nasal-associated lymphoid tissue, MALT – mucosa-associated lymphoid tissue.

✉ Univerzita Obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra molekulární patologie a biologie,
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

klara.kubelkova@unob.cz

+420 973 255 193

+420 973 253 100

Úvod

Rozvoj každého lidského organismu probíhá v interakci s potenciálně nebezpečnými patogenními mikroorganismy, které v organismu dále mohou způsobit zánětlivá onemocnění. Slizniční povrch, jako vstupní brána těchto potenciálně nebezpečných mikroorganismů, je trvale vystaven působení vlivům zevního prostředí. Jak již je z přirovnání patrné, vstup infekce touto významnou branou lze považovat za konkrétní průnik infekce do organismu. Není tedy divu, že je velká část buněk imunitního systému je lokalizována právě na úrovni sliznic a představuje tak primární „pohotovostní“ systém imunitní obrany organismu.

V současné době se vědci zabývají možnostmi využití nanočástic či mikročástic pro slizniční vakcíny podávané nasální či orální cestou (1). Zvýšený efekt těchto vakcín je dosažen právě v případě použití transportního systému nanočástic, který dopraví antigen na místo určení. Cílem intranasálně podané vakcíny je lymfoidní tkáň lokalizovaná v nosní sliznici NALT (nasal-associated lymphoid tissue), která je součástí systému mukózní lymfoidní tkáně MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). NALT je lokalizován zejména v hltanu, kde je tvořen Waldeyerovým prstencem, který zahrnuje lymfatickou tkáň na přechodu ústní dutiny v hltanovou část (*tonsilla lingualis*, *tonsilla palatina*, *tonsilla tubaria* a *tonsilla nasopharyngea*). Sliznice hltanu dále obsahuje malé subepiteliální shluky lymfoidní tkáně (2,3). Epitel NALT je tvořen řasinkovými buňkami, pohárkovými buňkami produkující hlen a dále specializovanými buňkami, které se podobají M-buňkám MALT v Peyerových placích ve střevě. NALT je lokalizován přímo pod povrchem epitelu a jeho součástí jsou shluky lymfoidních folikul s B-lymfocyty, mezifolikulární oblasti tvořené T-lymfocyty, dále obsahuje makrofágy a dendritické buňky (2,3).

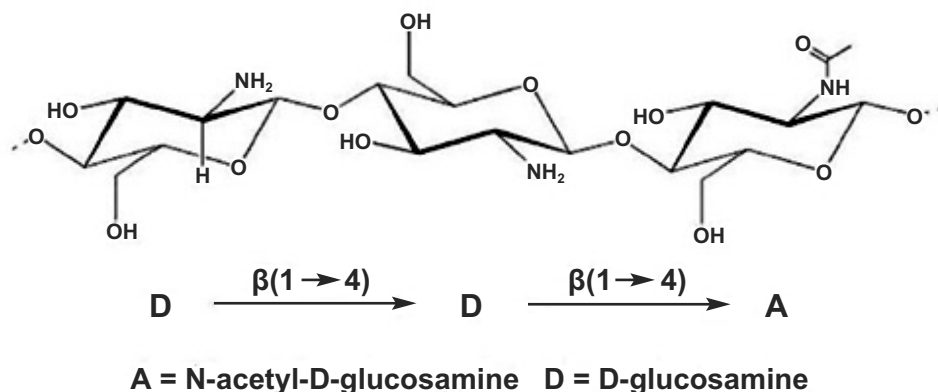
Slizniční vakcína, na rozdíl od systémově podaných (injekčních) vakcín skýtá výhody zejména v podobě bezprostřední reakce imunitního systému, což přispívá k rychlé neutralizaci patogena po jeho přestupu přes sliznici dále do organismu. Další výhodou jsou nižší finanční náklady na přípravu vakcíny, neinvazivnost metody vakcinace, jednoduchý způsob podání a minimální riziko komplikací u vakcinovaných (1,4). Intranasálně podávané vakcíny, jež efektivně stimulují jak humorální, tak buňkami zprostředkovaný imunitní systém, lze rozdělit do dvou hlavních typů. První typ je založen na částicích s funkcí transportního systému pro antigen. V tomto případě se antigen zachycuje na částicích, které následně usnadňují přestup antigenu přes epitel sliznice. Druhý typ nasálních vakcín představuje vakcíny podávané ve formě roztoku, kdy je antigen rozpuštěn nebo suspendován ve funkčně neutrálním roztoku (1,5). Interakce mezi NALT a antigenem závisí zejména na dávce, složení, frekvenci podávání antigenu a také na integritě epitelu. Typ odpovědi je pak určen povahou antigenu, jemuž je vystavena nosní sliznice, konkrétně NALT. Rozpuštěné antigeny přestupují přes epitel nosní sliznice a dostávají se do drénujících lymfatických uzlin. To stimuluje systémovou imunitní odpověď charakterizovanou produkcí imunoglobulinů, aktivací T buněčného systému a vyvoláním imunologické paměti. Částicové antigeny jsou snadno směřovány pomocí pohybu buněk řasinkového epitelu směrem ke specializovaným buňkám podobným M-buňkám. Ty dopraví antigen pod slizniční epitel a následně k NALT, kde je vyvolána slizniční imunitní odpověď (5).

Nanočástice jako možný transportní systém xenobiotik

Účinnost mnoha léků či vakcín je navíc do jisté míry limitována rychlostí jejich transportu do cílového místa působení. V mnoha případech však reaguje pouze malé množství celkové dávky xenobiotika v závislosti na rozmanitých biochemických či fyziologických vlastnostech těla hostitele. Proto se hledal vhodný nosič, který by umožnil jak ochranu, tak směřování xenobiotika do cílového místa. Jako jeden z vhodných ochranných a směřování umožňujících systémů se prezentují nanočástice (6,7). Vytvořené nanočástice mají svoji vazebnou kapacitu buď přímo na povrchu částice, nebo lze daný antigen navázat na přidanou vnější membránu, která částici obklopuje (8). Na takto připravené částice lze jednoduše chemicky navázat léčivo, antigen či adjuvans. V současné době však neexistuje žádný, plně funkční transportní systém na bázi nanočástic, který by mohl vyřešit řadu problémů spojených např. s cíleným transportem léčiv, s ochranou léčiv proti enzymům gastrointestinálního traktu, s nízkým terapeutickým indexem antifungálních léčiv, či omezenou schopností antibiotik prostupovat buněčnou stěnou (9-11).

Chitosanové nanočástice

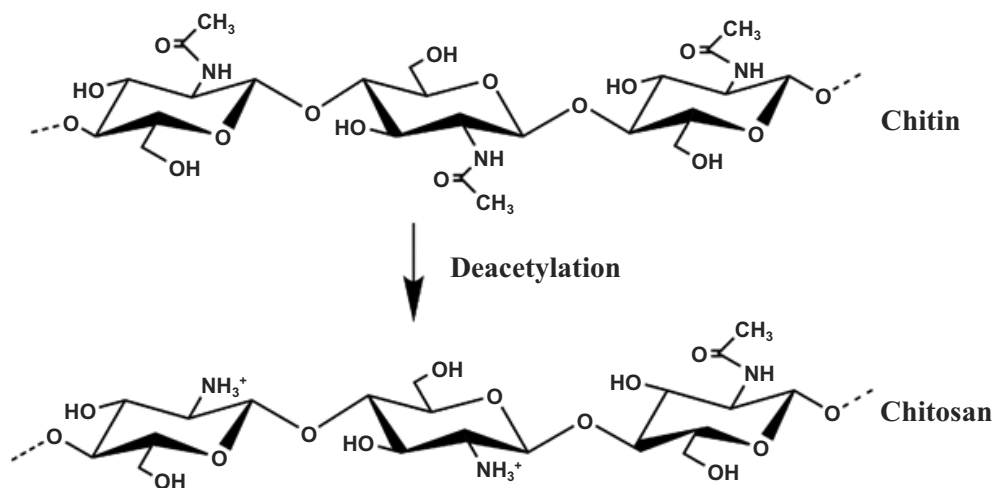
Mezi nejvíce používaný polymer pro přípravu nanočástic si stále více pozornosti získává právě chitin a z něj vyrobený chitosan (Obr. 1) v podobě nanočástic. Chitin, jako jeden z nejbohatších obnovitelných přírodních zdrojů,



Obrázek 1. Chemická struktura chitosanu, převzato z (24).

se získává především z vnějších koster koryšů, krabů, měkkýšů a hmyzu. Vnější kostry těchto živočichů byly donedávna považovány pouze za odpadní produkt, nicméně v současnosti je opak pravdou. Chitin lze také najít jako hlavní složka buněčných stěn hub. Svoji strukturou je velice příbuzný mukopeptidu, hlavnímu polymeru bakteriální stěny zodpovědného za stavební a ochrannou funkci bakterií.

Nejdůležitějším a nejznámějším derivátem chitinu je tedy chitosan [(1,4)-2-Amino-2-deoxy- D-glukan]] patřící do skupiny polysacharidů, který je vyráběn částečnou N-deacetylací chitinu [(1,4)-N-acetyl-D-glucose-2-amin] (Obr. 2). Jednotlivé polysacharidové řetězce chitosanu jsou navzájem spojeny glykosidickými vazbami, takto spojené jednotky dávají vznik lineárnímu polymeru. Velkou výhodou chitosanu je jeho schopnost na sebe vázat těžké kovy a další různé látky. A právě tato vazebná schopnost chitosanových nanočástic dává možnost jejich využití pro transport nejrozličnějších typů látek imunoaktivní povahy či charakteru xenobiotik (12,13).



Obrázek 2. Schéma deacetylace chitinu na chitosan, převzato z (24).

Historie a vývoj chitosanových nanočástic

Biomateriály odvozené od chitosanu jsou velmi jedinečnými mořskými produkty s různými fyziochemickými a biologickými vlastnostmi, což vede k použitelnosti v různých oborech lidské činnosti. Ačkoli nedávné objevy chitosanových biomateriálů zvýšily vlastní používání chitosanu v moderní medicíně, mechanismus působení

chitosanu zůstává dosud ne zcela nevysvětlen. Chitin, ze kterého se získává chitosan, byl poprvé identifikován a pozorován v buněčných složkách hub francouzským profesorem Henri Braconnotem v roce 1811. Následně poté byl pojmenován jako chitin z řeckého slova „khiton“, což vyjadřuje „obálku“. Dále byl extrahován např. z hmyzích stuktur a v roce 1859 byl poprvé identifikován produkt chitinu – chitosan, který však své označení získal po téměř 40. letech od svého objevení. Během 50-tých let 20. století byl následně chitosan získáván také z mořských produktů s tím, že došlo k potvrzení vlastní struktury chitosanu a následně byla také veškerá data prvně veřejně publikována, více v rešeršním článku Periyah a spol. (14). Od roku 1960 je vedeno mnoho rozličných studií, ve kterých je chitosan využíván v různých modifikovaných formách využitelných v biomedicinském výzkumu, medicíně, zemědělství či při výrobě bioinvasivních biodegradabilních materiálů.

Příprava a purifikace nanočástic chitosanu

V posledních letech se do popředí zájmu dostala aplikace chitosanových nanočástic jako transportního systému pro slizniční vakcíny podávané intranasální, tak orální cestou (1,4). Chitosan lze připravit částečnou deacetylací chitinu, který je v přírodě, vedle celulózy, nejrozšířenějším polysacharidem na Zemi (15, 16). Použití chitinu ve srovnání se strukturně podobným chitosanem je limitováno, jelikož chitin je chemicky inertní (16). Smícháním chitinu s koncentrovaným alkalickým roztokem dochází k deacetylaci acetamidových skupin chitinu na aminoskupiny chitosanu. Chitosan je poměrně reaktivní, lze ho připravit buď ve formě prášku, pasty nebo vlákna. Je nerozpustný v zásaditém a neutrálním pH. V kyselém prostředí pak tvoří soli, jak s anorganickými, tak organickými kyselinami, což je dáno protonizací aminoskupin. Rozpustnost chitosanu závisí na distribuci volných aminoskupin a zbývajících N-acetylových skupin. Běžně se pro rozpuštění chitosanu využívá 1-3% vodný roztok kyseliny octové (16). Průměrná molekulární hmotnost chitosanu je 3 800 až 2 miliony a podíl deacetylace činí 66–95 % (17). Chitosan ve své chemické struktuře obsahuje kopolymery glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu. Primární aminoskupiny mají zásadní význam pro strukturu chitosanu a určují jeho vlastnosti využívané ve farmaceutickém průmyslu (15). Kladně nabitě soli chitosanu se tedy mohou silně vázat k záporně nabitým materiálům, k sliznici či buněčným povrchům. Chitosan je tudíž mukoadhezivní (2). Jeho biokompatibilita a možnost použití ve vysokých dávkách, vyplývající z jeho nízké toxicity, činí chitosan, a z něho připravené nanočástice, velmi vhodné pro použití jako transportní systém léků (17).

Pro výrobu chitosanových nanočástic bylo vyvinuto a publikováno několik metod. Výběr vhodné metody závisí na konkrétních faktorech, jako jsou požadovaná velikost nanočástic, teplotní či chemická stabilita, stabilita konečného produktu, zbytková toxicita spojená s konečným produktem a další (16). Byly popsány následující metody přípravy chitosanových nanočástic:

1) Zesít'ovací emulgace

V rámci této metody se využívá funkčních aminoskupin chitosanu k zesít'ování s aldehydovými skupinami zesít'ovacího činidla. Je nutné připravit emulzi vody v oleji (w/o) emulgací vodného roztoku chitosanu v olejové fázi. Pro stabilizaci vodných kapiček se přidává surfaktant. Jako zesít'ovací činidlo lze používat např. glutaraldehyd, jehož účinkem se z vodných kapiček během míchání vytvoří mikročástičky. Ty se následně vhodně separují (16).

2) Metoda precipitace/koacervace

Tato metoda využívá nerozpustnosti chitosanu v alkalickém pH. Pokud chitosan přijde do kontaktu s alkalickým roztokem, dochází k jeho precipitaci/koacervaci. Částice se tvoří při vstřikování roztoku chitosanu do alkalického roztoku, jakým je např. hydroxid sodný nebo hydroxid sodný-metanol, s použitím vzduchové trysky, což vede ke vzniku kapiček. Následná separace a purifikace částic se provádí centrifugací či filtrací s dostatečným promytím v horké vodě (18). Druhá technika využívající metody precipitace/koacervace byla popsána Dr. Berthodem. V rámci této techniky se chitosan (0,25% w/v) rozpustí ve vodném roztoku kyseliny octové (2% v/v), který obsahuje 1% polysorbát 80. Během míchání a ultrasonikace je po kapkách (5 ml/min) přidáván roztok síranu sodného (20% w/v). Směs je míchána a sonifikována po dobu 1 hod., po ukončení je celá směs centrifugována. Vzniklý supernatant je odstraněn, získaný sediment částic chitosanu je resuspendován ve vodě a následně lyofilizován (17).

3) Metoda odpaření rozpouštědla

Metoda je založena na sušení aerosolových částic v proudě horkého vzduchu. Chitosan je nejprve rozpuštěn ve vodném roztoku kyseliny octové, poté je do tohoto roztoku rozpuštěn nebo rozptýlen antigen či léčivo a nakonec je přidáno zesíťovací činidlo. Takto vytvořená směs je následně nebulizována (rozprašována) v proudě horkého vzduchu. Aerosolizace dochází ke vzniku malých kapiček, ze kterých je vypařováno rozpouštědlo, čímž dochází ke vzniku volných nanočástic (19).

4) Iontová gelace

V tomto případě je chitosan rozpuštěn ve vodném roztoku kyseliny octové za účelem získání kladně nabitého chitosanu. Roztok je následně po kapkách přidáván za stálého míchání k roztoku tripolyfosfátu, což je polyanion, který účinkem elektrostatických sil interaguje s opačně nabitým chitosanem. Tímto postupem dojde k tvorbě chitosan-tripolyfosfátového komplexu. Chitosan díky tomu podstoupí iontovou gelaci a precipituje za vzniku sférických částic (16).

5) Termická metoda

Jedná se o další z metod pro přípravu chitosanových částic, která však, jako jednu ze svých výhod, postrádá zdlouhavé procesy přípravy nanočástic, jako jsou např. emulgaci či sprejování. Chitosan, v odpovídajícím množství, je v rámci termické analýzy rozpuštěn v 4% roztoku kyseliny octové. Vytvoří se gelovitá hmota, ke které se následně přidá zesíťovací činidlo, v tomto případě glutaraldehyd. Vznikne tak zesíťovaný gel. Ten následně projde sítím s velikostí póru odpovídající nanočásticím. Částice jsou poté promyty 0,1M NaOH, aby se odstranil přebytečný glutaraldehyd a finálně sušeny přes noc při 40 °C (20).

6) Metoda reverzních micel

Příprava polymerních nanočástic může být dosažena také použitím reverzního micelárního média. Reverzní micely jsou monodisperzní sférické agregáty molekul povrchově aktivních látek (dodecylsírán sodný, lecitin, cetrimoniumbromid apod.) o velikosti nanometrů (1-10 nm) obsahující mikroskopická polární jádra. Hydrofilní sloučeniny, jako jsou biomolekuly, jsou tedy solubilizovány uvnitř polárního jádra reverzních micel a jsou stabilizovány v organickém rozpouštědle vrstvou pláště povrchově aktivních látek, která je chrání před denaturací vlivem organické fáze (21). Nanočástice chitosanu mohou být připraveny například za použití reverzního micelárního systému složeného z cetrimoniumbromidu jako povrchově aktivní látky a izooktanu jako rozpouštědla. Chitosan je polyanion, zatímco cetrimoniumbromid je kationtové, povrchově aktivní činidlo. V rámci podobného systému mohou být také porovnány účinky elektrostatické interakce mezi chitosanem a povrchově aktivním činidlem (16,21).

Charakteristika chitosanových nanočástic

Deacetylovaná chitosanová kostra glukosaminových jednotek má vysokou hustotu nabitých aminoskupin, které mohou elektrostaticky interagovat s antigeny (proteiny či geny). Vlastní vazbu antigenu na nanočástice lze charakterizovat několika parametry. Mezi zjišťované charakteristiky nanočástic patří zejména jejich morfologie, velikost a zeta potenciál (povrchový náboj).

Velikost chitosanových nanočástic může být měřena metodou fotonové korelační spektroskopie pod úhlem 90°, při teplotě 25°C a za použití 30 mW helium-neonového laseru.

Druhý způsob měření velikosti může být proveden užitím centrifugační fotosedimentace na centrifugačním automatickém částicovém analyzátoru (14). Nejjednodušší způsob pro zjišťování velikosti, tvaru a povrchových charakteristik nicméně nabízí využití skenovacího elektronového mikroskopu. V tomto případě se na zlatem pokrytou destičku napipetuje kapka suspenze částic a na více jak 12 hodin se uchovává při pokojové teplotě v desikátoru do úplného vyschnutí vzorku. Suchý vzorek nanočástic se převrství tenkou vrstvou zlata a nechá skenovat (15).

Zeta potenciál se vyskytuje v elektrické dvojvrstvě každé částice, charakterizuje tendenci ke shlukování částic a potenciální stabilitu celého vazebného systému. Nulová hodnota zeta potenciálu je vyjádřena hodnotou izoelektrického bodu. Proto musí být posouzena také hodnota izoelektrického bodu vybraného antigenu před vlastní vazbou na nanočásticový nosič (15). Vědecká skupina pod vedením Dr. Borges využívala pro vyhodnocení velikosti částic a zeta potenciálu přístroj Zetasizer Nano s použitím dynamického světelného skenování (15). Jiná vědecká skupina pod vedením Dr. Bertholda použila pro měření zeta potenciálu Lazer Zee Meter. Měření bylo provedeno v 0,02M fosfátovém pufru v rozsahu pH 2 – 11 po půlhodinové sonifikaci (17).

Další technika, kterou lze charakterizovat nanočástice, je diferenční skenovací kalorimetrie. Výsledkem je graf zobrazující křivku závislosti signálu diferenční skenovací kalorimetrie (mW) na teplotě (°C). Vzniklé píky v oblasti konkrétních teplot odpovídají určitým dějům, jako je vypařování vodného roztoku, rozpad nespecifických elektrostatických vazeb, atd. Křivky se výrazně liší u skenovaných obalených (př. alginátem sodným) či neobalených chitosanových částic (15).

Další možnost charakterizace nanočástic poskytuje infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, při které se zjišťují infračervená spektra jednotlivých vzorků částic s užitím Fourierovy transformace. Obalené částice se promyjí vodou, centrifugují a sediment se přes noc účinkem mrazu vysuší a ponechá v desikátoru (15).

Pro účinné navazování antigenu na nanočástice je také nutné vyhodnotit další parametry částic, jako je např. vazebná kapacita a vazebná účinnost. Samotné navázání antigenu na vyrobené chitosanové nanočástice se provádí jednoduchým krokem, a to inkubací roztoku antigenu se suspenzí částic rozptýlených ve fosfátovém pufru o pH 7,4 za mírného míchání při pokojové teplotě po dobu 120 minut. Ověření vazebné účinnosti se provádí nepřímou metodou, kdy se kvantifikuje nenavázaný antigen, který zůstal v roztoku. Po inkubaci částic s antigenem a případném obalením částic alginátem sodným se směs centrifuguje a následně zjišťuje koncentrace bílkoviny. Vazebná účinnost představuje hodnotu podílu celkového množství antigenu bez hodnoty nenavázaného antigenu k celkovému množství antigenu (22,23). Vazebnou kapacitu lze získat jako podíl celkového množství antigenu bez hodnoty nenavázaného antigenu k celkové hmotnosti nanočástic (22,23).

Začlenění a uvolňování antigenu/léčivé látky v systému nanočástic

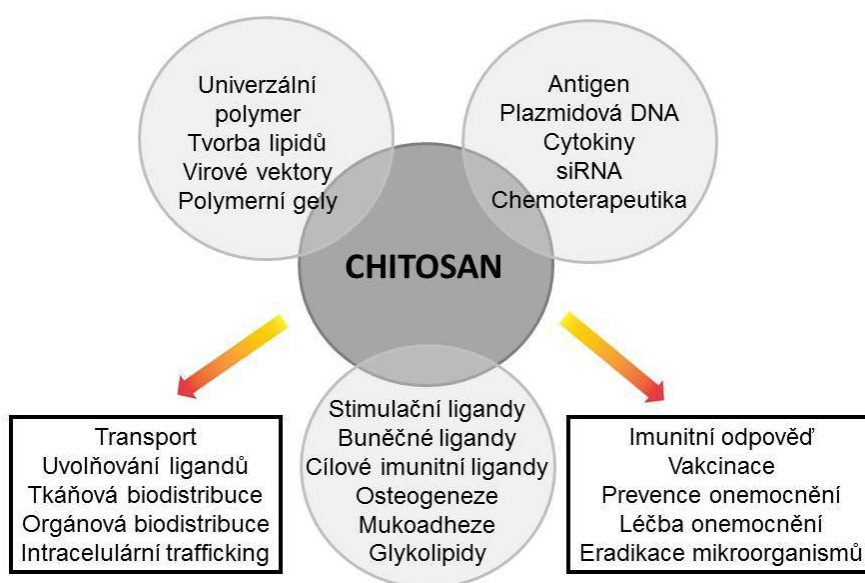
V systému nanočástice-antigen či nanočástice-xenobiotikum existuje předpoklad navázání co největšího množství antigenu/léčivé látky na nosič, kterým je zvolená nanočástice a zároveň tak omezit množství zvoleného nosiče. Obecným problémem cíleného transportu nanočástic je vlastní obranný systém organismu, kam lze uvést např. filtraci nanočástic plicemi či pohlcení nanočástic makrofágy. Dalšími důležitými požadavky při návrhu nosičového systému na bázi nanočástic je zabezpečení připojení antigenu/léčivé látky k nanočástici a opětovné uvolnění této látky v požadovaném místě. Antigen/léčivá látka je tedy nejprve farmakologicky neúčinnou, účinek se projeví až po uvolnění látky z nosiče za předpokladu optimální rychlosti, která zabezpečí optimální účinek.

Vlastní začlenění antigenu/léčivé látky do nosičového systému lze uskutečnit jednak souběžně s přípravou a vznikem nanočástic a také inkubací předem vytvořených nanočástic v roztoku daného antigenu/léčivé látky. V rámci porovnání efektivity vazby látky na nanočástice nicméně dominuje přístup začlenění zvolené látky již během přípravy nanočástic (24). Pro celý systém směřovaných léčiv je pak významné i uvolňování léčiva/antigenu z nosiče. Vlastní průběh uvolňování antigenu/léčivé látky z nanočástic a následná biodegradabilita nosiče jsou nejdůležitějšími faktory pro úspěšné použití tohoto systému. Průběh uvolňování zvolené látky, kromě biodegradability nosiče, závisí i na mnoha dalších faktorech jako např. na desorpci látky z povrchu nanočástic nebo na difúzi látky přes matici nanočástic (24). Následný profil uvolňování látky z nanočástic závisí na charakteru biodistribučního systému. Distribuce antigenu/léčivé látky v organismu je tedy závislá především na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech. Pro použití v humánní medicíně musí být všechny složky nosiče biokompatibilní a biodegradabilní tak, aby se vyloučily po doručení antigenu/léčivé látky bez vyvolání nežádoucích účinků, jako jsou toxicita, zánět, alergie nebo hematologické problémy (25-27).

Modifikace navázaného antigenu/léčivé látky na nanočástice

Pokud je antigen/léčivá látka špatně rozpustná, náchylná k enzymatickému rozkladu nebo toxická pro irelevantní tkáň, musí být chemicky modifikována nebo doručena do místa jejího působení pomocí speciálního nosiče nebo

transportního systému (25,26). Vědecký tým Dr. Borges (University of Coimbra, Portugal) se zabýval technikami vazby antigenů na nanočástice a studiem efektivity účinku takto připravených biopreparátů (15). Chitosanové nanočástice byly připraveny precipitací/koacervací a následně byla provedena vlastní vazba antigenu (např. albuminu). Nanočástice s navázaným antigenem byly navíc obaleny alginátem sodným. V rámci studie byl sledován vliv takto obalených nanočástic na jejich účinnost. Alginát je, podobně jako chitosan, v přírodě se vyskytující polysacharid ovšem opačného náboje (15). Alginát sodný zvyšuje stabilitu chitosanových nanočástic s antigenem adsorbovaných na jejich povrchu. Jak už bylo zmíněno, chitosanové částice jsou nabitě kladně, jejich zeta potenciál odpovídá hodnotě + 37 mV. Po navázání antigenu na částici zůstává náboj stále kladný s hodnotou zeta potenciálu větším než + 30 mV. Při následném obalení částic alginátem, dochází ke změně náboje z kladných do záporných hodnot. Po kompletní adsorpci alginátu na povrch částice má náboj nanočástic hodnotu – 35 mV. Změnou povrchového náboje je možné usměrňovat distribuci částic v organismu (15). Studie rovněž prokázala, že postup obalení nanočástic je vhodný v případě podání vakcíny orální cestou, kdy hrozí rychlá degradace antigenu navázaného na nanočástici v důsledku působení enzymů gastrointestinálního traktu (15).



Obrázek 3. Schématická ilustrace různých modifikací nanočástic s jejich možným využitím.

Užití chitosanu jako jednoho z moderních úspěchů biomedicínského výzkumu

Přírodní chitosanové nanočástice jsou netoxické, biokompatibilní, biologicky odbouratelné a lze je nazvat biologickou celulórou. Komerčně dostupný chitosan je obvykle nabízen v podobě šupin, prášku, kuliček, kapslí, vláken či jako mikrokrytalický chitosan. Veškeré tyto formy se liší čistotou, stupněm acetylce, průměrnou molární hmotností, rozpustností či samotnou barvou. Chitosan nabízí široké uplatnění jak v medicíně, tak v potravinářském průmyslu (Obr. 3) (28-31). Díky nerozpustné gelotvorné složce chitosanu, kterou nelze štěpit trávicími enzymy, působí v žaludku jako velmi silný absorbent snižující vstřebávání škodlivých složek potravy (těžké kovy), zlepšuje peristaltiku střevního traktu, zvětšuje objem stolice a snižuje tlak ve střevech. Tím dochází k normalizaci trávicího procesu (32). Díky snížení vstřebávání toxických produktů může navíc působit proti vzniku nádorového bujení trávicího traktu. Chitosan je také považován za jeden z nejlepších druhů dietetických vláknin zabraňujících vstřebávání cholesterolu a tuků do organismu.

V případě rozpustné složky chitosanu dochází ke vstřebání příslušné části chitosanu do krve. Chitosan snižuje krevní tlak, hladinu tuků krvi, zlepšuje funkci jater či snižuje hladinu cukru v moči, čímž preventivně působí proti vzniku cukrovky. Další nespornou a nepřehlédnutelnou výhodou chitosanu je jeho alkalické pH, díky kterému se v organismu vytváří vhodné prostředí k aktivaci imunitního systému, zejména lymfocytů s cytotoxickou aktivitou.

Konstrukty na bázi chitosanových částic mají také antibakteriální účinky, ovšem za předpokladu, že každá částice je schopna transportovat několik molekul léčiva, které se následně cíleně uvolní do bakterie a zničí ji (33). Výsledkem může být např. mast nebo náplast na zevní potírání akné bez vedlejších účinků léčby jako je tomu v případě antibiotik či kortikoidů. Podobně mohou být likvidovány i vůči antibiotikům odolné bakteriální kmeny, jako jsou některé druhy *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus* (34,35).

Souhrnně lze říci, že v případě chitosanu hovoříme o přírodním produktu vysoké čistoty, jehož hlavním úkolem není vyléčit určitá onemocnění, ale působit na homeostázu organismu regulací různých biologických procesů vedoucích k nastolení rovnováhy organismu (36). Navíc umožňuje, díky svým fyzikálně chemickým charakteristikám, využití v transportních systémech antigenů či xenobiotik a umocnit tak imunogenicitu antigenů svojí adjuvantní funkcí.

Závěr

Systém nanočástic a nanotechnologie, která byla před lety považována za pouhou vědeckou utopii, přináší revoluci v přístupu k diagnostice i léčbě lidského organismu. Pomocí nanočástic lze cíleně a úspěšně aplikovat různé druhy farmak, inzulínu, chemoterapeutik či antigenů zaměřených především na stimulaci slizniční imunity s předpokladem rozvoje cílené a robustnější imunitní odezvy. V rámci diagnostických, léčebných nebo antimikrobiálních aplikací poskytují nanočástice široké pole působnosti. Důkazem je například vývoj tzv. nanohub, které dokáží úspěšně absorbovat toxické látky a vylučovat je z krevního oběhu nebo vývoj různých nanosenzorů schopných detekovat i minimální množství rakovinných buněk v organismu. V současnosti několik bioaktivních produktů z mořských živočichů či rostlin, včetně chitosanu, vykazuje v laboratorních podmínkách neuroprotektivní, antioxidační, imunomodulační, anti-HIV a protizánětlivé účinky s nízkou toxicitou (37-40). Systém nanočástic, v různých formách výsledných produktů, tedy poskytuje slibné uplatnění v různých odvětvích výzkumu, vývoje a klinické medicíny. V tomto směru nestojí ani chitosanové nanočástice v pozadí zájmu vývoje prakticky použitelných biomedicínských technologií.

Poděkování (Acknowledgement)

Práce byla vytvořena za podpory Ministerstva obrany České republiky – dlouhodobého záměru rozvoje organizace Zdravotnická problematika zbraní hromadného ničení Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. / This work was supported by a Ministry of Defence of the Czech Republic - long-term organization development plan Medical Aspects of Weapons of Mass Destruction of the Faculty of Military Health Sciences, University of Defence.

Podíl autorů (Author Contributions)

KK a JP se stejnou měrou podíleli na zpracování tohoto přehledového článku. / KK and JP wrote this review article.

Střet zájmů (Conflict of interest)

Autoři prohlašují, že nemají střet zájmů. / The authors declare no conflict of interest.

Literatura

1. Jesus S, Soares E, Borges O. Poly-ε-caprolactone/Chitosan and Chitosan Particles: Two Recombinant Antigen Delivery Systems for Intranasal Vaccination. *Methods Mol Biol.* 2016;1404:697-713.
2. Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher AN, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;51(1-3):81-96.
3. Sminia T, Kraal G. Nasal-associated lymphoid tissue. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal Immunology*. 2. San Diego: Academic Press; 1999:357-64.
4. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(2):139-44.

5. Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers DM, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, van Breda Vriesman PJ, Sminia T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today*. 1992;13(6):219-24.
6. Bodmeier R, Chen HG, Paeratakul O. A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm. Res.* 1989;6:413-417.
7. Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.* 1997;14:1431-1436.
8. Alemann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1993;39:173-191.
9. Bender AR, von Briesen H, Kreuter J, Duncan IB, Rubsamens-Waigmann H. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocyte/macrophages in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40: 1467-1471.
10. Page-Clisson ME, Pinto-Alphandary H, Ourevitch M, Andremont A, Couvreur P. Development of ciprofloxacin-loaded nanoparticles: physicochemical study of the drug carrier. *J. Control. Release.* 1998;56:23-32.
11. Soma CE, Dubernet C, Bentolila D, Benita S, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials.* 2000;21:1-7.
12. Peniston QP, and Johnson E. Process for the manufacture of chitosan. US Patent 4, 195, 175.
13. LeHoux JG, Grondin F. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology.* 1993;132:1078-1084.
14. Periyah MH, Halim AS, Saad AZM. Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research. *Pharmacognosy Reviews.* 2016;10(19):39-42.
15. Borges O, Borchard G, Verhoef JC, de Sousa A, Junginger HE. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm.* 2005;299(1-2):155-66.
16. 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.
17. Berthold A, Cremer K, Kreuter J, De Sousa A, Junginger HE. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release.* 1996;39(1):17-25.
18. Nishimura K, Nishimura S, Seo H, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin. *J Biomed Mater Res.* 1986;20(9):1359-72.
19. Díaz AG, Quinteros DA, Llabot JM, Palma SD, Allemandi DA, Ghersi G, Zylberman V, Goldbaum FA, Estein SM. Spray dried microspheres based on chitosan: A promising new carrier for intranasal administration of polymeric antigen BLSOmp31 for prevention of bovine brucellosis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;62:489-96.
20. Agnihotri SA, Aminabhavi TM. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *J Control Release.* 2004;96(2):245-59.
21. Kafshgari MH, Khorram M, Mansouri M, Samimi A, Osfour A. Preparation of alginate and chitosan nanoparticles using a new reverse micellar system. *Iranian Polymer Journal.* 2012;2(21):99-107.
22. Borges O, Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Santarém N, de Sousa A, Borchard G, Junginger HE. Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69(2):405-16.
23. van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Coos Verhoef J, Junginger HE. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine.* 2003;21(13-14):1400-8.
24. Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård KT. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers.* 2015;7:552-579.
25. Xing L, Fan YT, Zhou TJ, Gong JH, Cui LH, Cho KH, Choi YJ, Jiang HL, Cho CS. Chemical Modification of Chitosan for Efficient Vaccine Delivery. *Molecules.* 2018 Jan 25;23(2). pii: E229.
26. Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2017 Nov 20;9(4). pii: E53.
27. Otrisal P, Florus S. Current and perspectives in personal and collective protection against effects of toxic compounds. *Chemické listy;*108(12):1168-1171.
28. Regiel-Futrya A, Kus-Liśkiewicz M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Kyzioł A, Stochel G. Development of noncytotoxic silver-chitosan nanocomposites for efficient control of biofilm forming microbes. *RSC Adv.* 2017;7(83):52398-52413.

29. Dhanapal J, Balaraman Ravindran M. Chitosan/poly (lactic acid)-coated piceatannol nanoparticles exert an in vitro apoptosis activity on liver, lung and breast cancer cell lines. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018 Jan 3:1-9.
30. Sami AJ, Khalid M, Jamil T, Aftab S, Mangat SA, Shakoori AR, Iqbal S. Formulation of novel chitosan guar gum based hydrogels for sustained drug release of paracetamol. *Int J Biol Macromol.* 2017;108:324-332.
31. Tamburaci S, Tihminlioglu F. Novel poss reinforced chitosan composite membranes for guided bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;29(1):1.
32. Li A, Lin R, Lin C, He B, Zheng T, Lu L, Cao Y. An environment-friendly and multi-functional absorbent from chitosan for organic pollutants and heavy metal ion. *Carbohydr Polym.* 2016;148:272-80.
33. Singh B, Maharjan S, Cho KH, Cui L, Park IK, Choi YJ, Cho CS. Chitosan-based particulate systems for the delivery of mucosal vaccines against infectious diseases. *Int J Biol Macromol.* 2017 Oct 18, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.101.
34. Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 1999;62(3):239-43.
35. Escarcega-Galaz AA, Lopez-Cervantes J, Sanchez-Machado DI, Brito-Zurita OR and Campas-Baypoli ON. Antimicrobial activity of chitosan membrane against *Staphylococcus aureus* of clinical origin. In: *The rise of virulence and antibiotic resistance, Immunology and Microbiology*, ISBN 978-953-51-2984-4, 2017, doi: 10.5772/65980.
36. <https://www.tiens-tianshi.com/chitosan-capsules.html>
37. Barakat KM, Gohar YM. Nanosilver-marine fungal chitosan as antibiotic synergizers against sepsis fish bacteria. *Iran J Microbiol.* 2015;7(6):324-32.
38. Ouyang QQ, Zhao S, Li SD, Song C. Application of Chitosan, Chitoooligosaccharide, and Their Derivatives in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Mar Drugs.* 2017;15(11).
39. Jazaeri EO, Mahdavi A, Abdoli A. Formulation of chitosan with the polyepitope HIV-1 protein candidate vaccine efficiently boosts cellular immune responses in mice. *Pathog Dis.* 2017;75(8).
40. Khan FI, Rahman S, Queen A, Ahamad S, Ali S, Kim J, Hassan MI. Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(9):3513-3536.