

# Doku Mühendisliğinde Kitozanın Kullanım Alanları

Bahar Uslu<sup>1</sup>, Serap Arbak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Van Kadın ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Androloji Laboratuvarı, Van, Türkiye

<sup>2</sup>Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

## ÖZET

Doku mühendisliği günümüzde ve gelecekte tıbbın en önemli tedavi stratejisini oluşturacaktır. Günümüzde rejeneratif tıpta süregelen araştırmaların çoğu doku mühendisliğinde biyomateryellerle oluşturulan destek ve yapı malzemesinin (scaffold) geliştirilmesi üzerinedir. Bir biyomateryal olan kitozanın doğal bir polimer olması, gözenkli bir yapıya sahip oluşu, kimyasal modifikasyonlara uygunluğu, jel formunda kullanılabilirlik özelliği, biyouyumlu olması ve metabolitlerinin toksik olmaması; doku mühendisliğinde ilgi odağı olmuştur. Kitin ve kitozan türevi bileşiklerin, biyomateryal olarak çok çeşitli alanlarda kullanıldığı bilinmektedir. Kitozan türevlerinin hücre uyumlu oluşu ve lizozimler tarafından yıkılabilmesi bu alanda kullanımını oldukça arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda kitozanın in vitro kültür ortamlarında dokuların büyüme hızı ve doku tabakalanması üzerine olumlu bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Kitozanın, dokuların matrisi içerisinde bulunan glikozaminoglikanlara benzerliği nedeniyle bağ dokusu tamirinde ve organogeneziste oldukça uygun bir biyomateryal olduğu belirtilmektedir. In vivo çalışmalarda da kitozanın deri fibroblastlarında sayısal bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Kitozanın membran formu değişik doku kültürlerinde hücre tutunması ve hücreye penetrasyonu üzerine olumlu bir etkiye sahiptir. Kitozanın doku mühendisliğindeki önemli derecedeki mitojenik aktivitesinin yüksek oranda deasetile olabilmesine bağlanmaktadır. Organik bir biyomateryal olan kitozanın güncelliğini önemli derecede koruması kuvvetli ölçüde şartlara göre değiştirilebilen formuna dayanmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** kitozan, doku mühendisliği, polimer

## APPLICATION FIELDS OF CHITOSAN IN TISSUE ENGINEERING

### ABSTRACT

Tissue engineering will provide the most therapeutical strategy of medicine currently and in future. Most of the current investigations concerning regenerative medicine involves development of supporting and structural materials (scaffold). Chitosan, as a biomaterial, is a focus of interest in tissue engineering by presenting the following features such as being a natural polymer, having a porous structure, being reliable to chemical modifications, easy-to-use in gel form, being biocompatible, and crating non-toxic metabolites. Derivatives of chitin and chitosan are widely used as biomaterials in many fields. Being cell friendly and easy-to-be degraded by lysosomal activity results in its wide usage in bioengineering. Investigations pointed out its positive effect on tissue growth and tissue layering rates. Possesing a similarity to glycosaminoglycans in tissue matrix, chitosan is defined as a highly suitable biomaterial in connective tissue regeneration and organogenesis. In vivo studies represented its effects on increasing number of skin fibroblasts. Membranous form of chitosan has a positive impact on the cellular attachment and penetration. Considerable mitogenic activity of chitosan in tissue engineering is related to its high degree of deacetylation. Chitosan, as an organic biomaterial, is strongly preserving its current importance strongly based on its flexibility according to different conditions.

**Keywords:** chitosan, tissue engineering, polymer

**D**oku mühendisliği; amaca uygun doku ve organ oluşturmak üzere canlı hücrelerin, genellikle polimerlerden oluşan destek, iskelet tabaka (scaffold) üzerinde bu hücrelerin ve dokunun biyolojik işleyiş ve organizasyonunun oluşturulmasına yönelik bir multidisipliner bilim dalıdır. Genel görüş bu bilimdalının gelecekte ihtiyaca yönelik yaşayan vücut par-

çalarının üretilmesi şeklinde planlanacağı şeklindedir (1). Bu bilimdalının temelini oluşturan hücre kültürü çalışmalarında olduğu gibi canlı hücreler; matrisi oluşumundan, hücre proliferasyonu ve differansiyasyonundan sorumludur. Bu alandaki çalışmalar, insan genom projesinin tanımlanması, gen ekspresyonunu kontrol eden hücre içi ve dışı sinyal mekanizmalarının aydınlatılması, gelişim biyolojisi ve patoloji dallarında ilerlemenin sağlanmasına büyük katkılarda bulunmuşlardır. Ayrıca moleküler gene-

tik, immünoloji, cerrahi, biyomühendislik ve monoklonal antikor ve aşı üretimi alanlarında temel destek sağlamıştır (2).

Rejeneratif tıptaki bu yeni yaklaşım üç boyutlu proliferatif organ çalışmalarına önemli bir ivme kazandırmıştır. En başarılı örnek yapay deri modellerinin geliştirilmesidir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, yapay deri oluşturulmak üzere kullanılan organotipik kültürler; epidermal keratinositler, dermal fibroblastlar; polimer ve kollajen esaslı özel filtreler üzerinde üretilmektedir. Elde edilen sentetik deri örnekleri greftleme işlemleri için uygun özellik taşımaktadır. Bunun dışında deri örnekleri irritasyon ve inflamasyon testleri için de kullanılmaktadır. (3,4).

Konunun esasını oluşturan doku ve hücre kültürleri bilimin pek çok alanında kullanılan bir teknoloji haline gelmiştir. Bu yeni teknoloji gen terapisi, organ/doku transplantasyon çalışmaları ve klonlama çalışmalarının ilerlemesine paralel olarak hızla gelişmektedir. Doku ve hücre kültür tekniklerindeki ilerlemeler hayvan deneylerinin de yerini almaya başlamıştır. Örneğin eskiden hayvanlar üzerine yapılan yeni ilaçların denenmesi ve yeni tedavilerin geliştirilmesi amacıyla yapılan in vitro farmakotoksikolojik çalışmalar artık hücre ve doku kültürlerinde gerçekleştirilmektedir (5).

Doku ve hücre kültürünün dinamik özellikleri olan çoğalma, göç, besin kullanımı ve ürün sağlanması kontrol edilmesi güç olaylardır. Bu nedenle in vivo koşullardaki hücre etkileşimlerinin karmaşıklığını in vitro koşullarda yaratmak çok güç olabilmektedir. Bu konuyu destekleyici nitelikte orijinal dokudaki yapısal bütünlüğü sağlamaya yönelik çok sayıda çalışmalar ve eğilimler geliştirilmektedir. Bu amaçla organotropik kültürlerde farklı nesil hücreler kombine olarak çoğaltılmaya çalışılmaktadır. Bu hususta, amniyotik fibroblastların oluşturduğu hücrelerden 'besleyici tabaka' oluşturup üzerinde embriyonik hücre kültürlerinin yapılması ya da yapay deri geliştirilmesi gibi örnekler verilebilir (2).

## 2. Kitozan ve türevlerinin genel özellikleri

Organ kültürlerinde tercihen kullanılan organik bir biyomateryal olan kitozan ve türevleri, karides ve yengeç gibi Crustacea'lerin kabuklarında doğal olarak bulunan kitinin, deasetilasyonu ile elde edilen yüksek moleküler ağırlıklı mukoadhezif bir katyonik polisakkaritlerdir. Kitin Yunanca zırh kaplaması anlamına gelen "kiton" kelimesinden türetilmiştir ve ilk olarak 1811 yılında Bracconnot tarafından mantarlarda keşfedilmiştir. 1859 yılında ise Rouget kitozani keşfederek çok sayıda araştırmacının önünü açmıştır. Yeni uygulamalar ve yoğun çalışmalar 1930-1940'lı yıllarda ağırlık kazanmıştır (6).

Kitozanın yapısı, glukozamin ve N-asetil glukozamin monomerlerinin  $\beta$ -1,4 pozisyonunda bağlanması ile oluşan bir polimer şeklindedir. Bazı mantar ve maya türlerinde de bulunmakla birlikte ticari kitozan, Crustacea (eklembacaklı kabuklular) familyasına ait deniz kabuklularında bulunan kitinden elde edilmekte olup, doğada selülozdan sonra en bol bulunan polisakkarittir.

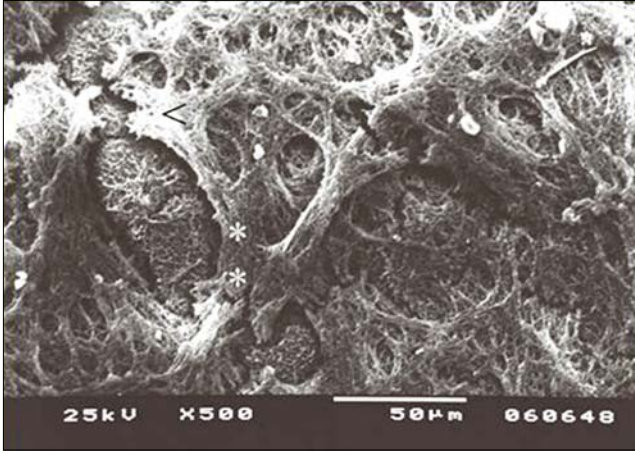
Endüstriyel kitozan üretimi; eklembacaklıların kabuklarının ekstraksiyonu ve ardışık olarak deasetilasyon işlemini takiben kitinden kitozanın elde edilmesi şeklindedir. Kabuklardaki kitinin ekstraksiyonundaki temel işlemler; kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat gibi minerallerin ve proteinlerin alkali ve asit muamelesi ile uzaklaştırılmasıdır. Elde edilen kitinin yüksek sıcaklıkta (120 °C'da) % 40 NaOH ile işlem görmesi sonucu, deasetillenmiş kitozan elde edilir (7,8).

Kitozan, katyonik yapıya boyalar, nişastalar, yüzey etken maddeler ve dört değerlikli amonyum tuzları gibi organik bileşikler ile olduğu gibi birçok anyonik ve noniyonik polimerlerle de uyumludur. Çok değerlikli anyonlarla ise, çapraz bağlanarak jel ve çökeltili oluşturur. Kitozan, cıva, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, krom, bakır, demir, mangan, gümüş, altın ve platin gibi metal iyonlarına karşı yüksek düzeyde afinite gösterir ve kompleks oluşturur (9). Bu özellikleri ile, scaffold yapı oluşturmak için ideal bir biyomateryal özelliği taşımaktadır. Kitozanın vizkozitesi, yara iyileşmesi, hücre proliferasyon hızı gibi olaylarda önem kazanmaktadır. Bu vizkozite, ısının azalması, artan kitozan konsantrasyonu, deasetilasyonun artma derecesi gibi nedenlerle artış göstermektedir (6). Özellikle yüksek oranda deasetile olan kitozanın mitojenik aktivitesinin yüksek olduğu belirtilmektedir (10-13). Bu özellikleri kitozana organogenezde aranan bir biyomateryal özelliği kazandırmıştır.

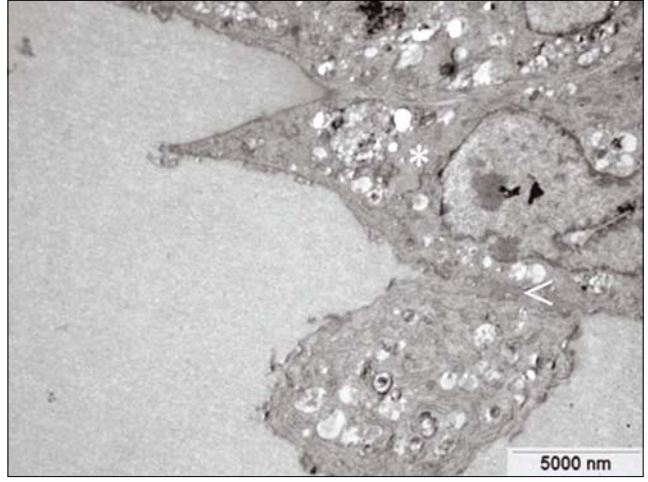
## 3. Kitozan ve türevlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

1960'lı yıllardan itibaren kitinin deasetilasyon türevi olan kitozan ile ilgili çalışmalar oldukça yoğunluk kazanmıştır (14-16). Kitin, beyaz renkte, suda çözünmeyen, sert, elastik olmayan ve azot bakımından zengin (deasetilasyon derecesine bağlı olarak % 5-8 arasında değişmektedir) bir bileşiktir. Kitinin, hidrofobik, suda ve bir çok organik çözücüde çözünmeyen bir yapısı olmasına karşın, kitinin deasetilasyon türevi olan kitozan, asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünür. Asit ortamda amino gruplarının protonasyona uğraması sonucunda ise suda çözünebilir bir özellik kazanır (17).

Kitozanın deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı, en önemli özelliklerindedir. Katyonik yapıda olan kitozanın, molekül ağırlığı (25 -2000 kD) ve deasetilasyon derecesi (% 40-98) üretim koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Kitozanın çözünürlüğü, moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesine bağlıdır. Düşük deasetilasyon derecesine sahip kitozanın, sadece pH 9.0 ve üzerinde çözünebilir olduğu, buna karşın yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitozanın, pH 6.5 ve altında çözünür olduğu, nötral ve alkali pH değerlerinde ise çözünmediği gösterilmiştir. Yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitozanlar; glutamik asit, hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi organik ve inorganik asitlerle tuz oluşturarak çözünür. Kitozan, asitlerde çözüldüğünde lineer polielektrolit bir özellik kazanır ve pozitif yüklü kitozan, polianyonlarla ve negatif yüklü yüzeylerle kuvvetli bir etkileşim gösterir. Bu nedenle, negatif yüklü proteinler, anyonik polisakkaritler ve nükleik asitler gibi moleküller ile etkileşime girip çökeltili oluşturabilir (18). Bu özellikleri ile ideal bir scaffold materyalidir.



**Şekil 1.** embriyonik fare fibroblastlarının % 2 'lik kitozan membran formunun üzerinde üretildiği deneysel çalışmada taramalı elektron mikrografta hücrelerin, tabanda bulunan kitozan membranına sıkıca yapışarak doku oluşumunu hızlandırdıkları, üç boyutlu forma ulaştıkları (\*\*\*) ve fibroblastik karakterle uyumlu bir yapı (<) kazandıkları izlenmektedir. x 500



**Şekil 2.** embriyonik fare fibroblastlarının % 2 'lik kitozan membran formunun üzerinde üretildiği deneysel çalışmada geçirimsiz elektron mikrografta belirgin doku oluşumunu yansıtır nitelikte sıkı bağlantıların son derece iyi geliştiği (<) ve fibroblast formunun korunduğu (\*) izlenmektedir. x 5000

Kitozanın çözünürlüğü üzerinde etkili bir diğer faktör de, çözüldüğü tuzların bulunmasıdır. Çözünürlük, ortama tuzların eklenmesi ile değişir ve iyonik kuvvetin artmasıyla çözünürlük azalır. Kitozan tuzları, (kitozan glutamat, kitozan klorid vb.) genellikle suda çözünebilir (18).

Kitozan çözültüsünün viskozitesi, kitozan konsantrasyonuna, sıcaklığa ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak değişir. Viskozite, kitozan konsantrasyonu ve deasetilasyon derecesi ile doğru orantılı, sıcaklık ile ise ters orantılı olarak artar. Kitozan, yüksek moleküler ağırlığı ve doğrusal dallanmamış yapısı nedeni ile asidik ortamlarda ideal bir viskozite arttırıcı olarak kullanılabilir (19).

Kitin ve kitozan türevleri, hem tek hücreli canlılarda hem de yüksek organizasyonlu ökaryotik organizmalarda enzimatik olarak yıkıma uğrayabilmektedir (20). Mikroorganizmalarda bulunan kitinaz ve kitozinaz enzimleri ve yüksek organizasyonlu canlılardaki lizozomal enzimler, kitin ve kitozanı parçalarlar. Enzimler, kitin ve kitozanı oluşturan monomerler arasındaki N-asetil-β-(1-4) glukozamin bağlarını koparır. Yıkım ürünü, yüksek organizasyonlu canlılarda enerji kaynağı olarak da kullanılabilen ve doğal bir monosakkarid olan glukozamindir. Kitozanın, lizozomal enzimlerin etkisi ile parçalanabilmesi ve yıkım ürününün de zararlı bir monomer içermemesinin sonucu olarak fizyolojik olarak güvenilir olması, bu polimerin hücre ve doku kültürü çalışmaları yanında farmasötik alanda da kullanımı açısından büyük önem taşımaktadır (21,22).

Kitin ve kitinin deasetilasyon ürünü olan kitozanın; mutajenite, pirojenite, hemoliz, sub-akut, akut ve kronik toksisite testleri ile biyolojik olarak uyumlu ve düşük toksisiteye sahip bir polimer olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kitozanın allerjik ve iritan etkisinin olmadığı bu nedenle de hem sağlıklı hem de hasta bireylerde dermal olarak kullanılabilceği belirtilmektedir. Kitozanın, farelerde

oral uygulama sonrası LD<sub>50</sub> değerinin 16 g/kg, intraperitoneal uygulama sonrası ise LD<sub>50</sub> değerinin 350 mg/kg olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu değerler şeker ve tuzun LD<sub>50</sub> değerine çok yakındır (22).

#### 4. Kitozanın biyomedikal ve farmasötik kullanımı

Kitozanın, dokuların matrisi içeriğinde bulunan glikozaminoglikanlara benzerliği nedeniyle bağ dokusu tamirinde çok uygun bir biyomateryal olduğu belirtilmektedir (6,24-26). Aynı zamanda kitozanın büyüme faktörlerini de uyardığı bildirilmektedir (26). Bu özellikleri nedeniyle kitozanın, yara epitelizeasyonunu arttırdığı ve dermiste sinir ve kan damarı rejenerasyonunu hızlandırdığı, dolayısı ile yanık ve önemli deri hasarlarının tedavisinde örtü materyali olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (16, 27, 28). Kitozan, hücre proliferasyonunu arttırarak bağ dokusu oluşumunu hızlandırmaktadır (25, 29). In vitro kültür ortamlarında dokuların büyüme hızı üzerine etkisi olduğu bilinen kitozan, hücre sayısını ve dokuda tabaka sayılarının artışını hızlandırır (2, 30, 31). Yapılmış olan in vivo çalışmalarda kitozanın deri fibroblastlarında sayısal bir artışa neden olduğu, keloid oluşumunu ise azalttığı belirtilmektedir (32).

Kitozanın, membran şeklinde kullanıldığında değişik doku kültürlerinde tutunmayı arttırıcı bir özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (29,33). 3T3 embriyonik fare fibroblastlarının % 2 'lik kitozan membran formunun üzerinde üretildiği deneysel çalışmada taramalı ve geçirimsiz elektron mikroskopik incelemelerde fibroblast hücrelerinin uzantılarında belirgin artış, hücre membranlarının korunması ve hücrelerarası bağlantıların sıkı konumu şeklindeki bulgular dikkati çekmiştir (Şekil 1 ve 2 ) (2) . Aynı çalışmada, Kitozanın kollajen salgılanmasında da belirgin bir artışa neden olduğu belirtilmektedir (Uslu 2008). Bu bulguyu destekleyen görüşler benzer çalışmalarda da belirtilmiştir (28).

Kitozan sahip olduğu fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeni ile tarımsal amaçlı olarak; çeşitli tahıl, meyve ve sebzelerin mantar ve benzeri mikroorganizma enfeksiyonlarına karşı korunmasında; kağıt endüstrisinde selüloz gibi destek materyali olarak; tekstilde boya bağlama özelliğinden dolayı ağartıcı olarak; kozmetik endüstrisinde saç ve cilt bakım ürünlerinde; medikal alanda hemostatik ajan olarak yara ve yanıkların tedavisinde; antimikotik etkisi nedeni ile antifungal ajan olarak; diyet programlarında yağ asitlerini bağlayıcı özelliğinden dolayı zayıflatıcı, kolesterol düşürücü diyet ürün olarak; antikolesterik ve antiaterosklerotik özelliği nedeni ile hiperbilirubinemi, hiperkolesteronemi, dermatit ve pürülan hastalıkların (ülserasyon, pododermatit, flegmon) tedavisinde ilaç olarak; oftalmolojide kontak lens yapımında; cerrahide greft, stent ve sütür materyali olarak kullanılmaktadır. Biyoteknolojik alanda ise kitozan dolgu materyali olarak kromatografik çalışmalarda, hücre ve enzim enkapsülasyonunda ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (19,34).

Kitozanın, en önemli kullanım alanlarından bir diğeri de ilaç endüstrisidir. Farmasötik amaçla, ilaç taşıyıcı temel ve/veya yardımcı materyal olarak tabletler, granüller, hidrojeller, nano ve mikropartiküller sistemlerin hazırlanmasında kitozan kullanımı oldukça yaygındır (21,35). Vücutta ani ilaç serbestleşmesinin önüne geçmek amacıyla uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik olarak, biyolojik olarak yıkıma uğrayabilen ve toksik etkileri düşük polimerlerin kullanımı oldukça önemlidir (36). Bu kapsamda, kimyasal ve biyolojik özellikleri iyi bilinen kitin ve kitozan türevleri ile polimerizasyon, iyonotropik jelleşme vb. yöntemleri sonrası oluşturulan nano-mikroküre, nano-mikrokapsül ve boncuklar, ilaç taşıyıcı sistem olarak büyük bir potansiyele sahiptirler. Bu yapılar arasında etkenliği en fazla bilinen form olan hidrojel formu, yüksek miktarda ilaç taşınmasına ve kontrollü salıma uygun bir oluşum olarak bilinmektedir (32,37).

Kitin ve kitozan türevi polimerlerin kullanımında, mevcut uygulamalar dışında ideal kontrollü salım formülasyonlarının geliştirilmesi yönünde çok sayıda araştırma yapılmaktadır (38).

### 5. Taşıyıcı sistem olarak kitozan

Doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryallerden oluşan yapı iskeleti bazı temel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler biyoyumlu olması, biyoyıkılabilir olması, sinyal moleküllerine ve matris yayılımına izin verecek ölçüde poröz yapıya sahip morfolojide olması, toksik ve immunojenik olmaması, optimal mekanik destekte olması şeklinde özetlenebilir (Yin 2009). Bu özellikleri ile öne çıkan kitin ve kitozan türevi bileşiklerin, biyomateryal olarak çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Bu kapsamda tıpta cerrahi malzemededen, yapay deri ve organ uygulamalarına kadar çok geniş bir yelpazede kullanılmaktadır (40).

Sadece küçük molekül ağırlıklı aktif maddelerin değil, aynı zamanda peptid, protein, genetik materyal (DNA ve RNA) ve oligonükleotidler gibi kompleks moleküllerin vücuda verilmesinde de taşıyıcı sistem olarak kitin ve kitozan türevleri önemli bir po-

tansiyele sahiptir. Kitozan, topikal oküler uygulamalar, implantasyon veya enjeksiyon gibi çeşitli uygulamalara izin veren bir biyo-uyumluluğa sahiptir. Vücutta lizozim enzimi ile metabolize olur ve biyolojik olarak yıkıma uğrayabilir özelliktedir (41). Bu nedenle, özellikle genetik materyalin tedavi amaçlı kullanımını hedefleyen çalışmalarda, taşıyıcı olarak kitozan ve kitozan türevli sistemler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Gen tedavisi amaçlı çalışmalarda gen taşıyıcı sistem olarak, kitin ve kitozan türevi polimerlerin farmasötik endüstride kullanımını çok eskiye dayanmamaktadır. Plazmid vektörler için kitozanın taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesine dair ilk çalışma, 1995 yılında yılında gerçekleştirilmiştir (42). In vivo koşullarda yıkıma uğrayabilen, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumluluğu yüksek ve düşük düzeyde immün yanıt oluşturan polimerler, genlerin ökaryotik hücrelere transfer edilmesi çalışmalarında, ideal bir taşıyıcı sistem geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Doğal yapıda katyonik bir polisakkarit olan kitozan, biyolojik olarak uyumlu olması, düşük immünojenitegöstermesi, toksik etkiye sahip olmaması ve diğer polimerlerle karşılaştırıldığında çok daha ucuz olması nedeniyle, viral ve lipid aracılığı ile oluşturulan gen transferi çalışmalarına iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Son yıllarda, non-viral taşıyıcı sistem olarak kitin ve kitozan türevi polimerlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar oldukça artmıştır. Kitin ve kitozan türevleri gibi doğal polimerler ile oluşturulacak gen taşıyıcı sistemler, hem DNA molekülünü dış etkenlere karşı vücutta korumaları, hem de hücreye girişte temel problem olan bariyerlerden geçişi kolaylaştırmaları bakımından büyük bir potansiyele sahiptirler. Gen taşıyıcı sistem olarak kitozan kullanılarak, DNA-kitozan kompleksleri ve kitozan mikroküreler ile in vitro ve in vivo transfeksiyon-ekspresyon çalışmalarında olumlu sonuçlar alınmıştır (43). Kitozan, bu özelliği ile doku ve hücre kültürü çalışmalarında gen taşıyıcı sistem olarak kullanım kolaylığı sağlamıştır (psöriazis, tek gen hastalıkları, kistik fibrozis, kanser araştırmaları, nörodejeneratif hastalıklar vs).

### 6. Doku mühendisliği ve yapay organ uygulamalarında kitozan türevleri

Doku mühendisliği aracılığı ile gerçekleşen doku rejenerasyonu, rejenere olan dokuların organize olması, takviye edilmesi ve desteklenmesi biyolojik olarak yıkılabilen polimerlerin kullanımı ile çok yakın bir paralellik göstermektedir. Polimer yapı, biyoaktif maddeler için taşıyıcı bir matris olarak rol alırken, ortamdaki hücrelerle işbirliği oluşturulması aşamasında da rol oynar. Biyomateryallerin biyoaktif moleküller ve hücreler için önemli bir taşıyıcılık görevi vardır. Taşıyıcı matrislerde aranan özellikler arasında, ekstrasellüler matris elemanları, büyüme faktörleri ve hücre yüzeyi reseptörleri ile spesifik etkileşimleri içermesi ön planda gelebilir (21).

Bu özellikleri taşıyan kitin ve kitozan türevi bileşiklerin, biyomateryal olarak çok çeşitli alanlarda ve doku mühendisliğinde kullanıldığı bilinmektedir (27,44).



Kitozan ve kitin türevlerinin in vivo ve in vitro ortamlarda çok farklı türde ve değişik yapıdaki hücre tipleriyle ilişkilerini içeren yayınlara sıklıkla rastlamaktayız. Son dönemlerde doku iskeleti olarak çok sayıda doğal ve sentetik polimer esaslı materyaller kullanılmaktadır. Kong ve arkadaşları çalışmalarında kitozan biyopolimerlerinin doku mühendisliğinde en etkin materyal olduğunu savunmuşlardır (45). Son zamanlarda genelde sinir hücreleriyle yapılan çalışmalar oldukça fazla sayıdadır. Bununla birlikte, vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri, keratinoitler, kondrosit hücreleri, hepatositler, fare fibroblastları ve deri fibroblastları kullanılarak da çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda kitin türevleri ve özellikle kitozanın her hücre tipi için farklı sonuçlar doğurduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca her fenotipik özellik için kitozanın farklı bir destekleyici özellik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Kitozanın, hücre proliferasyonunu destekleyerek bağ dokusu oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir (6,25). Kitozanın aynı zamanda büyüme faktörlerini de stimüle ettiği yapılan çalışmalarda saptanmıştır (34,46).

In vitro kültür ortamlarında dokuların büyüme hızı üzerine kitozanın önemli bir etkisi vardır. Kitozanın doku kültürlerinde tabaka sayısını artırıcı etkisi önemle vurgulanmaktadır (Kitozanın, membran şeklinde kullanıldığında değişik doku kültürlerinde tutunmayı artırıcı bir özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (29,47). Biyomateriyal uygulamalarında hücreyel yanıt, deneyin en önemli basamağıdır. Biyomateriyal üzerine tutunan hücrelerin biyoyumulu olan materyal ile temasından hemen sonra ortaya çıkacak olan hücreyel davranış, deneyin gidişatının habercisi olmaktadır. Hücreyel temastan hemen sonra ortaya çıkan hücreyel bazdaki değişiklikler bu etkileşimin sonucunda meydana gelir. Bu hücreyel değişim hücre ile biyomateriyal arasındaki etkileşimin boyutunu gösterir (27,48). In vitro ortamda hücrelerin membran üzerinde tutunabilirliği yüzey özellikleri ile ilgili olup, membran yüzeyinde oluşan protein alan tarafından yönlendirilir (12). Bir başka deyişle, membranın protein absorpsiyon oranı hücre tutunmasında önemlidir. Membran yüzeyindeki bu protein alanı, yüzey yük miktarı (serbest yüzey enerjisi) ve kimyasal yapı ile ilgilidir (49).

Yapılan diğer bir çalışmada kitozanın solüsyon formunun da membran kadar olmasa dahi, belli bir oranda hücre proliferasyonunu arttırdığı taramalı ve geçirimli elektron mikroskopik yöntemlerin yanısıra MTT, bromodeoksiüridin (BrdU) gibi çeşitli analiz teknikleri ile de gösterilmiştir (2).

Minoura ve arkadaşları PVA (polivinil alko)-kitozan hidrojel ile yaptıkları in vitro çalışmada kitozan konsantrasyonunun L-929 fibroblast hücre sayısına ve canlılığına olan etkilerini incelemişlerdir. % 99,85 deasetilasyonlu kitozan ile hazırlanan hidrojelere liyofilize edildikten sonra % 2,0, 5,0, 10, 15, 20, 30 ve 40'lık konsantrasyonlarındaki kitozan sonuçlarını karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre %15 ve %40'lık konsantrasyon oranındaki PVA-kitozan hidrojellerde fibroblastlar birbirine çok yakın sonuçlar çerçevesinde canlı kalabilmişler ve çoğalabilmişlerdir. Bu sonucun temel nedeni olarak; homojen %15 ve heterojen %40 PVA-kitozan hidrojelinin yüzey kon-

santrasyonlarının birbirine yakın olması belirtilmiştir. Ayrıca hücrelerin yaşayabilme ve çoğalabilmeleri için karışımdaki kitozan konsantrasyonu arttıkça hücre sayısının da arttığı sonucuna varılmıştır. Bu etkileşimin; kitozan molekülünün  $NH_2$  grubuyla, hücrelerarasındaki elektrostatik etkileşimden ve kitozan molekülünün N-asetil glikozamin ünitesi ile hücredeki bir reseptör arasında biyospesifik etkileşimden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Chuang ve arkadaşları polivinil alkol (PVA) ile kitozanın % 4,0'lük karışımı ile hazırlanan membran ile sadece PVA'dan hazırlanan membranın, insan fibroblast (L-929) kültürü üzerindeki etkilerini karşılaştırmışlardır. Sonuçlar taramalı elektron mikroskopisi ve MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PVA/kitozan membranın PVA'ya kıyasla daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, kitozanın eklenmiş olduğu membrana, PVA ile hazırlanmış olan membrana kıyasla daha fazla fibroblastın tutunduğu ve daha hızlı fibroblast proliferasyonunun gerçekleştiği, tutunan hücrelerin canlılığını daha sağlıklı sürdürdüğü, poröz yapısı nedeniyle hücrelerin daha iyi tutunabileceği ideal membran yüzeyinin olduğu, fibroblastların iyi dağılım ve yayılım göstermiş olduğu ve tüm bu farklılıkların kitozandan kaynaklandığı görüşü bildirilmiştir. Kitozanlı membranda daha iyi sonuç alınmasının sebebi olarak, PVA içeren membranda kitozan içeren membranda yer alan protein bağlama bölgelerinin olmaması, dolayısıyla fibroblast gelişiminin engellenmesi şeklinde vurgulanmıştır (50).

Germershaus ve arkadaşları da çalışmalarında gen taşıyıcı sistem olarak kullanılan trimetil kitozanın bu amaca yönelik olarak en uygun materyal olarak seçildiğini ve bu bağlanma bölgelerinin 'taşıyıcı molekül' işlevi açısından başarılı sonuçlar alınmasında etkin olduklarını göstermişlerdir (5).

İdeal bir biyomateriyalin antijenik özelliğinin olmaması, hastalık taşıyıcı olmaması (mikrobiyal özellik taşımaması) ve doku iyileşmesini teşvik edebilmesi, ancak uygun bir sterilizasyon yöntemi ile sağlanabilmektedir (15,52). Yan ve arkadaşları da çalışmalarında greft teknolojisi ve sterilizasyon arasındaki ilişkinin önemini vurgulamışlardır. (53). Ancak sterilizasyon için uygun olan yöntem, bu özellikleri sağlarken hem materyale hem de hücrelere zarar vermemelidir. Tıpta greft materyallerin sterilizasyonu sırasında karşılaşılan en önemli sorun, işlem sırasında materyalin bazı özelliklerinin sterilizasyon yöntemine bağlı olarak kaybedilmesidir. Bu nedenle her biyomateriyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerine en uygun sterilizasyon yöntemi tercih edilmelidir. Literatür verileri incelendiğinde kitozan materyalin sterilizasyon yöntemleri ile ilgili farklı görüşler vardır. Kitozanın sterilizasyonunda filtre sterilizasyonu (46), otoklav sterilizasyonu alkol sterilizasyonu kuru hava (37), gluteraldehit eklenmesi metodu ile sterilizasyon (37), gaz sterilizasyonu-etilen dioksit (46), gama ışınması (34) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Khor ve ark. (37), yaptıkları çalışmada kuru hava, doymuş buhar basıncı ve gama ışınması yöntemlerinin kitozan materyali üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada etilen oksit artık bırakması nedeni ile değerlendirmeye alınmamış, kuru hava sterilizasyonuna maruz kalan kitozanın daha az çözündüğü hatta daha ileri durumlarda asidik ortamda bile çözünmediği saptanmış, otoklav sterilizasyonu uygu-

landığında ise kitozanın içinde büyük çaplı termal olayların gerçekleştiği bunun sonucunda da suda çözünememe, orijinal gerilme direncinin % 80'inin kaybedilmesi gibi durumların ortaya çıktığı belirtilmiştir. Gama ışımalarının ise kitozan içinde zincirin kırılmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Bir başka görüşe göre asidik pH'lı kitozan çözeltiler otoklav ile steril edilmek istendiğinde, polimer zincirde asidik hidroliz oluşabileceği bildirilmiştir. Diğer taraftan nötral pH'lı (6,8-7,2) kitozan çözeltisinde ise yüksek pH derecesine bağlı olarak biyolojik yıkımın daha az gerçekleşebileceği ileri sürülmüştür. Zahraoui ve arkadaşları ise iyonizasyon ışımalarının vizkozite ve moleküler ağırlık kaybına yol açabileceğini belirtmişlerdir (52). Mekanik duyarlılığın kritik öneme sahip olmadığı uygulamalarda 10 dakikalık otoklav sterilizasyonunun yeterli olacağı öne sürülmüştür.

Yapılan araştırmalarda kitozanın pH'sının da hücre tutunması üzerine etkisinin çok önemli olduğu vurgulanmaktadır. Kitozan biyomateryalinin asetik asitten kaynaklanan asidik ortamını nötralize etmek amacıyla çalışmalarda çeşitli derecelerde ve oranlarda NaOH kullanıldığı ve bu şekilde sodyum hidroksit eklenmesi ile pH'sı ayarlanan kitozan membranların üzerinde daha fazla sayıda hücre tutunduğu gösterilmiştir. Kullanılan membranın fiziksel özelliklerinin, sterilizasyon metodunun, serum varlığının, formülde yer alan diğer maddelerin, çözücünün toksik değerinin, kitozan maddesinin moleküler ağırlığının ve konsantrasyonunun çalışmanın sonuçlarına etki ettiği düşünülmektedir (6).

Doku mühendisliğinde, hücrelerin tutunmasını, beslenmesini, yayılmasını kolaylaştıracak ve oksijenlenmesini arttıracak üç boyutlu yapıların oluşturulması açısından por oluşumu oldukça önem kazanmaktadır. Ayrıca membranların süngerimsi poröz yapıda oluşturulmasının, in vitro ortamda hücrelerin bu yapıya tutunarak sıvıyı emmeleri açısından uygun ortamı yaratacağı yolunda bir görüş bulunmaktadır. Zhu ve arkadaşları bu konudaki çalışmalarında doku mühendisliği alanındaki çalışmalarda kullanılan organik biyomateryallerin ekstrasellüler matriks bileşenleri ile kombine edildiği takdirde daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğini göstermişlerdir (54). Ayrıca biyomateryallerin kollajen ile kombine edilmiş olduğu çalışmalar mevcuttur (24,54). Wang ve arkadaşları biyomedikal amaçlı olarak düşük toksisiteli çözeltilerle hazırladıkları poliglikolid-(PGA)-kitozan karışımlarından yeni, poröz, modifiye edilebilen, biyoyumlu ve biyolojik olarak yıkılabilen hibrid matriksler hazırlamışlardır. Kültür ortamında fibroblast hücrelerinin PGA-kitozan matriksiyle biyoyumlu olduğu ve bu nedenle fibroblastların daha yoğun proliferasyon gösterdikleri bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar fibroblast hücrelerinin canlılıklarını korumalarının yanı sıra, aynı zamanda morfolojik yapılarında da herhangi bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Araştırmacılar hücre sayılarındaki bu farklılığın, başlan-

gıçta matrikslere tutunan hücrelerin sayısındaki farklılıktan kaynaklandığını, farklı proliferasyon oranlarının buna etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bu hususu da, bu matrikslerdeki iki katına çıkma süresi miktarlarının yaklaşık olarak aynı olduğunu (~24 saat) belirtmişlerdir (24).

Biyoyumlu olan kitozanın hücre adhezyonunun viabilitesini ve vitalitesini arttırması, proteoglikanlara benzeyen kimyasal özellikleriyle ilişkilendirilmiştir (2). Wang ve arkadaşları, kemik ve doku mühendisliği alanındaki çalışmalarında kollajen ve kitozan içeren materyalleri kombine olarak kullanmışlardır (24). Benzer bir araştırmada ise Kong ve arkadaşları nanohidroksiapatit/kitozan kullanarak, kemik üretiminde kitozan materyalin hücre uyumunu araştırmışlar ve çalışmalarının sonucunda en iyi doku mühendisliği membran materyalinin kitozan olduğunu vurgulamışlardır. Aynı araştırmacılar daha sonraki yıllarda kitozanın yalnızca hücre proliferasyonunda değil, preosteoblast kültürlerinin diferansiyasyonunda da kullanılmasının mümkün olduğunu göstermişlerdir (45).

Genel olarak hücrelerin tutunabilmesinde, membranın yapısı, membranın yüzey yükü, yüzeyin protein bağlama kapasitesi, membranın kombine edildiği materyal tipi ve hücre uyumluluğu önemli faktörler arasında sayılmaktadır. Bununla birlikte, kitozanın hücreler üzerindeki farklı destekleyici özelliği, donör hücre fenotipi ve yükü, kitozanın deasetilasyonu, moleküler ağırlığı ve sterilizasyon yöntemi sonuçlar üzerinde etkili olabilmektedir (3,27).

Kitozan esaslı materyallerin minimal düzeyde immun reaksiyonlara sebep olduğu, biyoyumlu bir materyal olduğu görüşü hakimdir (2,23). Bu görüşü destekler şekilde Uslu ve arkadaşlarının bir diğer çalışmasında da elde edilen sonuçlar beklentiler doğrultusunda kitozanın toksik olmayan bir materyal olduğunu göstermiştir (2).

Sonuç olarak yapılan çalışmalar ve taranan literatür bilgileri ; kitozanın hücre ve doku mühendisliğinde güvenli, hazırlanışı ve kullanımı kolay, ucuz ve etkili bir biyomateryal olduğu görüşünü kuvvetli derecede desteklemektedir. Ayrıca doku mühendisliğinde özellikle kitozanın, ticari membran formlara iyi bir alternatif oluşturduğuna dair başarılı çalışma sonuçları elde edilmiştir. Araştırma gurubumuz tarafından da hücre kültürü ve ileriye yönelik doku mühendisliği -yapay organ- amaçlı gerçekleştirilen çalışmalar ve projeler ile nanoteknoloji çağında, kitozanın biyomateryaller arasında önemli bir yer alması gerektiği inancı ile yapılanları destekliyor ve bu konudaki çalışmalarımızla bu teknolojiye katkıda bulunmayı hedefliyoruz.

## Kaynaklar

1. Kim In-Yong, Seog-Jin Seo, Hyun-Seuk Moon, Mi-Kyong Yoo, In-Young Park, Bom-Chol. Kim, Chong-Su Cho: Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*, 2008; 26: 1-21.
2. Uslu B, Arbak S, Biltekin B, Deniz S, Özbaş-Turan S, Akbuğa J, Bilir A. Farklı Kitozan Formlarının Fibroblast Hücre Aktivitesi Üzerine Proliferatif Etkisinin In vitro Karşılaştırması, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi, 2008.
3. Wang YC, Lin MC: Fabrication of novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering. *Biomaterials*, 2003; 24:1047-1057.
4. Çakar N. Primer Hücre Kültürü: Temel Hücre Kültürü Teknikleri Kursu Kitapçığı. Hacettepe Üniversitesi yayınları, 2006.
5. Kaş H S: Chitosan properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul*, 1997; 14: 689-711.
6. Güvercin M. Kitozanın yumuşak doku iyileşmesindeki etkisinin deneysel olarak incelenmesi ve hücre kültürü ile değerlendirilmesi, Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları, 2004.
7. Vårum KM, Ottøy MH, Smidsrød O: Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydr Polym*, 2001; 46: 89-98.
8. Okuyama K, Noguchi K, Kanenari M, Egawa T, Osawa K, Ogawa K: Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydr Polym*, 2000; 41: 237-247.
9. Bhatia SC, Ravi NA: Mossbauer Study of the interaction of chitosan and d-glucosamine with iron and relevance to other metalloenzymes. *Biomacromolecules*, 2003; 4: 723-727.
10. Şenel S, Mc Clure S J: Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004; 56,10: 1467- 1480.
11. Kiyozumi T, Kanatani Y, Ishihara M, Saitoh D, Shimizu J, Yura H, Suzuki S, Okada Y, Kikuchi M: The effect of chitosan hydrogel containing DMEM/F medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn. *Burns*, 2007; 33: 642-648.
12. Ding SJ: Biodegradation behavior of chitosan /calcium phosphate composites. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2007; 353: 24-25, 2367-2373.
13. Wafa IAF, Tao J, Gehan EB, Cato TL: Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microspherematrixes for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2007; 4: 503-514.
14. Cheng M, Deng J: Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 2003; 24: 2871-2880.
15. Khor E, Lim LY: Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 2003; 24: 2339-2349.
16. Koide SS: Chitin-Chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, 1998; 18: 1091-1101.
17. Kurita K: Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polym Deg Stab*, 1998; 59: 117-120.
18. Singla A K, Chawla M: Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *J Pharm Pharmacol*, 2001; 53: 1047-1067.
19. Chen M, Deng J: Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 1998; 24: 2871-2880.
20. Kurita K: Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polym Deg Stab*, 2001; 59: 117-120.
21. Akbuğa J, Aral C, Özbaş-Turan S, Kabasakal L, Keyer-Uysal M: Transfection efficiency of chitosan microspheres: effect of DNA topology. *STP Pharm Sci*, 2003; 13: 99-103.
22. Shigemasa Y, Minami S: Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol. Genet Eng Rev*, 1998; 13: 383-420.
23. Akbuğa JA Biopolymer: Chitosan. *Int J Pharm Adv*, 1995; 1: 3-18.
24. Wang X, Ye J, Chen L, Wang Y: Microstructure and properties of a calcium phosphate cement tissue engineering scaffold modified with collagen and chitosan. *Engineering Materials*, 2007; 983-986.
25. Muzarelli R, Conti F, Ferrara P: Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials*, 1988; 9: 247-252.
26. Yao F, Chen W, Wang H, Liu H, Yao K, Sun P, Lin H: A study on cytocompatible poly (chitosan-g-L-lactic acid). *Polymer*, 2003; 44: 6435-6441.
27. Wan Y, Wu H, Wen D: Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering: preparation and characterization. *Macromol Biosci*, 2004; 16: 882-890.
28. Stone CA, Wright H, Clarke T, Powell R, Devaraj V S: Healing skin graft donor sites dressed with chitosan. *British Journal of Plastic Surgery*, 2000; 53: 601-606.
29. Graeme IH, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Michael D, Edward J Wood: The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 2001; 22: 2959-2966.
30. Poon YF, Zhu YB, Shen JY, Siu Choon Ng, Mary B, Chan-Park: Cytocompatible hydrogels based on photocrosslinkable methacrylated O-Carboxymethylchitosan with tunable charge: synthesis and characterization. *Advanced Functional Materials*, 2007; 17 (13): 2139-2150.
31. Shen JY, Pan XY, Lim CH, Chan-Park, Zhu X, Beuerman RW: Synthesis, Characterization, Photocuring Characteristics, In Vitro Degradation and Biocompatibility of Biodegradable Liquid Photocurable PCLGA Copolymers. *Biomacromolecules*, 2007; (2): 376-385.
32. Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, Isik F: Contribution of bone marrow derived cells to skin, collagen deposition and wound repair. *Stem Cells*, 2004; 22, 5: 812-822.
33. Mayumi M, Yuichi K, Yoko W, Kozue K: Laminin-1 peptide –conjugated chitosan membrans as a novel approach for cell engineering. *The FASEB Journal*, 2003; 17: 875-877.
34. Ueno H, Yamada H, Tanaka W, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T: Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 1999; 20: 1407-1414.
35. Illum L: Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*, 1998; 15: 1326-1331
36. Langer R: New methods of drug delivery. *Science*, 1990; 249: 1527-1533 Cui W, Kim D H, Imamura M, Hyon SH, Inoue K: Tissue –engineered pancreatic islets, culturing rat islets in the chitosan sponge. *Cell Transplant*, 2001; 5: 499-502.
37. Khor E, Lim LY: Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 2003; 24: 2339-2349.

38. Shu XZ, Zhu KJ: Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int J Pharm*, 2002; 233: 217-225
39. Yin J, Song Z, Kun L, Zheng Y, Yan Y, Qiong L, Shifeng Y, Xuesi C. Buildup of L-b-L Multilayer Film Based on PGA and Chitosan for Biologically Active Coating. *Macromolecular Bioscience* 2009; 9: 268-278
40. Dureja H, Tiwary AK, Gupta S: Stimulation of skin permeability in chitosan membranes. *Int J Pharm*, 2001; 213: 193-198.
41. Thanou M, Verhoef JC, Junginger H E: Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv Drug Del Rev*, 2001; 50: 91-101.
42. Mumper RJ, Wang JJ, Claspell JM, Rolland AP: Novel polymer condensing carriers for gene delivery. *Proc. Int. Symp Control Rel Bioact Mater*, 1995; 22: 178-179.
43. Aral C, Özbağ-Turan S, Kabasakal L, Keyer-Uysal M, Akbuğa J: Studies of effective factors of plasmid DNA-loaded chitosan microspheres I. plasmid size, chitosan concentration and plasmid addition techniques. *STP Pharm Sci*, 2000; 10: 83-88.
44. Kiyozumi T, Kanatani Y, Ishihara M, Saitoh D, Shimizu J, Yura H, Suzuki S, Okada Y, Kikuchi M: The effect of chitosan hydrogel containing DMEM/F medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn. *Burns*, 2007; 33: 642-648.
45. Kong J, Qiang AO, Xi J, Zang L, Gong YZ, Zhang X, Nan M: Proliferation and Differentiation of MC 3T3-E1 Cells Cultured on Nanohydroxyapatite/chitosan Composite Scaffolds. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001; 23: 262-267.
46. Mori T, Okumora M, Matsuura M, Ueno K: Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 1997; 18: 947-951.
47. Malette WG, Quigley H, Gaines RD: Chitosan : A new hemostatic. *Annals Thorac Surg*, 1983; 36: 55-58.
48. Wafa IAF, Tao J, Gehan EB, Cato TL: Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microspherematrices for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2007; 4: 503-514.
49. Payne JM, Cobb CM, Rapley JW: Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J. Periodontology*, 1996; 67: 236-244.
50. Chuang WY, Young TH, Yao CH: Properties of the poly (vinyl alcohol) / chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. *Biomaterials*, 1999; 20: 1479-1487.
51. Germershaus O, Mao S, Sitterberg J, Bakowsky U, Kissel T: Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethylenglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: Establishment of structure-activity relationships in vitro. *J Control Release* 2008; 125:145-154.
52. Zahraoui C, Sharrock P: Influence of sterilization on injectable bone biomaterials. *Bone*, 1999; 25(2): 63-65.
53. Yan YH, Cui J, Chan-Park MB, Wang X, Wu QY: Systematic studies of covalent functionalization of carbon nanotubes via argon plasma-assisted UV grafting. *Nanotechnology*, 2007; 11: 115-712.
54. Zhu Y, Mary B, Chan-Park MB: Density quantification of collagen grafted onto biodegradable polyester: its application to esophageal smooth muscle cell. *Annal Biochem*, 2007; 363: 119-127.