

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA LENARDIČ

**VPLIV FLUORESCENTNO OZNAČENEGA HITOSANA NA
PERMEABILNOST STENE PRAŠIČJEGA SEČNEGA
MEHURJA**

THE INFLUENCE OF FITC-LABELED CHITOSAN ON THE
PERMEABILITY OF PIG URINARY BLADDER WALL

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Mojci Kerec Kos za mentorstvo in vso pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

Anja Lenardič

Ljubljana, 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD	1
1.1. SEČNI MEHUR.....	1
1.1.1. UROTELIJ	2
1.1.2. PLAKI	4
1.2. HITOSAN	6
1.2.1. SPLOŠNE ZNAČILNOSTI	6
1.2.2. POVEČANJE PERMEABILNOSTI RAZLIČNIH TKIV	7
1.2.2.1. CACO-2 CELICE	7
1.2.2.2. SEČNI MEHUR.....	10
1.2.2.3. OSTALA TKIVA	12
1.2.3. FLUORESCENTNO OZNAČEVANJE HITOSANA	13
1.2.3.1. OZNAČEVANJE S FLUORESCEIN IZOTIOCIANATOM	13
1.2.3.2. OZNAČEVANJE Z RODAMINOM	14
1.3. MOKSIFLOKSACIN	15
2. NAMEN DELA	17
3. MATERIALI IN METODE.....	18
3.1. MATERIALI IN APARATURE	18
3.1.1. MATERIALI	18
3.1.2. APARATURE	19
3.2. METODE DELA.....	20
3.2.1. PRIPRAVA UPORABLJENIH PUFROV, RAZTOPIN IN DISPERZIJ	20
3.2.2. PRIPRAVA FLUORESCENTNO OZNAČENEGA HITOSANA	23
3.2.3. PRIPRAVA TKIVA ZA POSKUS	26
3.2.4. IZVEDBA PERMEABILNOSTNIH ŠTUDIJ	27
3.2.5. DOLOČANJE KONCENTRACIJE MOKSIFLOKSACINA V TKIVU (HPLC ANALIZA)....	28
3.2.6. STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	30
3.2.7. SLIKANJE S FLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM	30

4. REZULTATI	32
4.1. PRIPRAVA FITC-HITOSANA.....	32
4.2. PREHAJANJE MOKSIFLOKSACINA V STENO SEČNEGA MEHURJA.....	33
4.2.1. PRVA SERIJA POSKUSOV	33
4.2.2. DRUGA SERIJA POSKUSOV	38
4.3. REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE	47
4.4. SLIKANJE S FLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM	49
5. RAZPRAVA	54
5.1. PRIPRAVA FITC-HITOSANA.....	55
5.2. PREHAJANJE MOKSIFLOKSACINA V STENO SEČNEGA MEHURJA.....	55
5.2.1. PRVA SERIJA POSKUSOV	56
5.2.2. DRUGA SERIJA POSKUSOV	57
5.2.3. PRIMERJAVA REZULTATOV OBEH SERIJ POSKUSOV	58
5.3. SLIKANJE S FLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM	60
6. SKLEP	62
7. LITERATURA.....	63

POVZETEK

Hitosan je kationski polimer, ki se široko uporablja v biofarmacevtske namene in za katerega je znano, da poveča permeabilnost različnih sluznic. Namen dela je bil pripraviti hitosan označen s fluorescein izotiocianatom (FITC-hitosan), ki bi omogočal opazovanje polimera na sluznici sečnega mehurja prašiča. Preučevali smo, ali vezava FITC-a na hitosan vpliva na njegovo sposobnost povečanja absorpcije hidrofilnih učinkovin. Porazdelitev FITC-hitosana po sluznici izoliranega sečnega mehurja smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom.

Pripravili smo FITC-hitosan in na izoliranem sečnem mehurju prašiča izvedli dve seriji poskusov. V prvi seriji smo na koščke tkiva, vpete v difuzijske celice, za 60 minut nanesli kontrolno raztopino moksifloksacina, 0,05% (ut/vol) disperzijo hitosana ali 0,05% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana. V drugi seriji smo na koščke tkiva nanesli kontrolno raztopino moksifloksacina, 0,25% (ut/vol) hitosana, 0,25% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana, 0,005% (ut/vol) disperzijo hitosana ali 0,005% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana. V obeh serijah je bila v vseh uporabljenih raztopinah in disperzijah enaka koncentracija moksifloksacina. Koncentracijo moksifloksacina, ki je prešla v tkivo, smo določili z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). S fluorescenčnim mikroskopom smo opazovali koščke tkiva, ki so bili tretirani s kontrolno raztopino FITC-a ter 0,05%, 0,25% ali 0,005% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana. Posneli smo slike površine sluznice in prečnega prereza stene sečnega mehurja prašiča.

Ugotovili smo, da hitosan in FITC-hitosan v vseh treh uporabljenih koncentracijah značilno povečata prehajanje moksifloksacina v tkivo v primerjavi s kontrolno raztopino moksifloksacina. Pokazali smo, da med delovanjem označenega in neoznačenega polimera enake koncentracije ni značilnih razlik. Pri slikanju površine in prečnega prereza tkiva smo opazili, da se hitosan porazdeli na površino sluznice in v sluznične gube in da je sloj polimera na sluznici debelejši pri višji koncentraciji hitosana. Učinkovitost vezave FITC-a na hitosan je bila zadostna, da smo FITC-hitosan lahko opazovali s fluorescenčnim mikroskopom. Pri uporabljenih pogojih kovalentna vezava FITC-a na proste aminske skupine hitosana ne vpliva na sposobnost hitosana za povečanje absorpcije moksifloksacina v steno sečnega mehurja.

ABSTRACT

Chitosan is a cationic polymer which increases permeability of different types of mucosae and is widely used for biopharmaceutical purposes. The aim of research work was to prepare chitosan labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) which facilitates observation of the polymer on the urinary bladder mucosa. We researched whether this modification of chitosan affected its ability to enhance absorption of hydrophilic molecules. Distribution of FITC-chitosan on the mucosa of isolated urinary bladder of a pig was observed using a fluorescence microscope.

We prepared FITC-chitosan and on isolated pig urinary bladder performed two series of experiments. In the first series a control solution of moxifloxacin, a 0,05% (w/v) dispersion of chitosan or a 0,05% (w/v) dispersion of FITC-chitosan were applied to shreds of tissue mounted into diffusion cells, for a time of 60 minutes. In the second series control solution of moxifloxacin, 0,25% (w/v) dispersions of chitosan and FITC-chitosan and 0,005% (w/v) dispersions of chitosan and FITC-chitosan were used. The concentration of moxifloxacin in solutions and dispersions of both series was the same. We determined the concentration of moxifloxacin which penetrated into the tissue by high-performance liquid chromatography (HPLC). Tissue shreds which were previously treated with a control solution of FITC and 0,05%, 0,25% and 0,005% (w/v) dispersions of FITC-chitosan were observed using a fluorescence microscope. We took photos of the mucosa surface and of cross-sections of the urinary bladder wall.

Our findings show that both chitosan and FITC-chitosan significantly increase permeation of moxifloxacin into the tissue compared to the control solution of moxifloxacin in all used concentrations. We showed there are no significant differences in activity of FITC-chitosan compared to unmarked chitosan. Using the photos of mucosa surface and of the cross sections we could determine chitosan is distributed onto the mucosal surface and into the mucosal folds. The thickness of the polymer layer increases with increasing concentration of chitosan in the dispersions used. The binding efficiency of FITC to chitosan was sufficient to enable analysis by fluorescence microscopy. In the conditions used binding of FITC to free amino groups of chitosan had no effect on the ability of chitosan to enhance absorption of moxifloxacin into the urinary bladder wall.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP – adenozin trifosfat

cAMP – ciklični adenozin monofosfat

DNK – deoksiribonukleinska kislina

ER – endoplazmatski retikulum

FITC – fluorescein-5-izotiocianat

GA – Golgijev aparat

GAG – glikozaminoglikani

HIT – hitosan

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*high-performance liquid chromatography*)

LDH – laktat dehidrogenaza

MOX – moksifloksacin

PB – razredčen fosfatni pufer

PBS – izotoničen fosfatni pufer

TEER – transepiteljska električna upornost (*transepithelial electrical resistance*)

UP – uroplakin

ZO-1 – protein testnih stikov (*zonula occludens*)

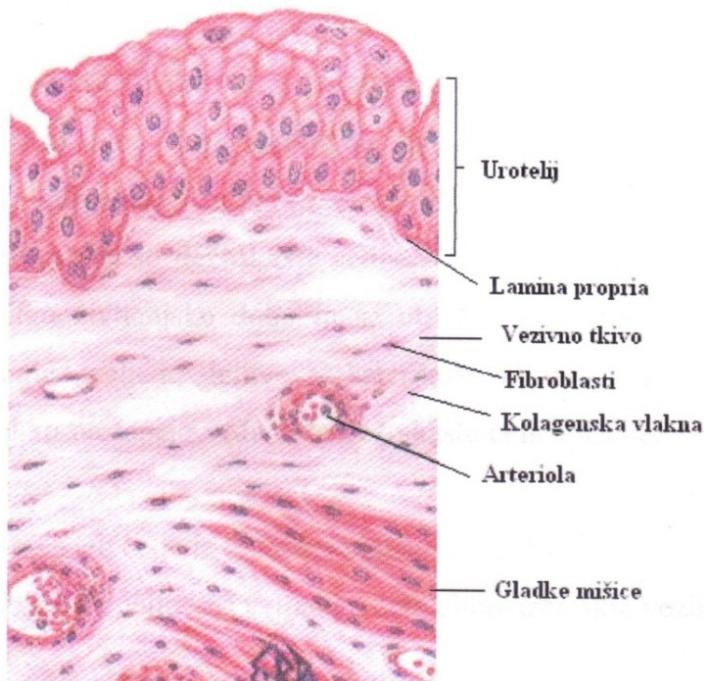
1. UVOD

1.1. SEČNI MEHUR

Sečni mehur (vesica urinaria) leži v sprednjem delu male medenice. Pri mehurju opisujemo telo (corpus), ki zavzema večji del mehurja, vrh (apex), ki leži zgoraj, ter dno (fundus), ki je spodnji del, iz katerega izhaja sečnica. Poln mehur je okrogel, prazen ima obliko tetraedra s štirimi stenami in štirimi vogali. Zgornja in obe spodnji stranski steni se pri polnjenju močno širita. Predel, ki leži med obema ustjema sečevodov zgoraj in notranjim ustjem sečnice spodaj, imenujemo trigonum vesicae. Sluznica tega predela ni nagubana in ima konstantno debelino (1, 2).

Naloga mehurja je kratkotrajno shranjevanje urina in ohranjanje njegove sestave (3). Kapaciteta mehurja znaša 400-600 mL, vendar že 150-300 mL seča sproži potrebo po uriniranju (4). Okrogla oblika organa zagotavlja minimalno izpostavljenost epitelijske površine urinu, kar zmanjša količino prenesenih snovi med urinom in krvjo (3).

Stena sečnega mehurja je sestavljena (od zunanjosti proti notranjosti) iz serozne, mišične in mukozne plasti (slika 1) (2).



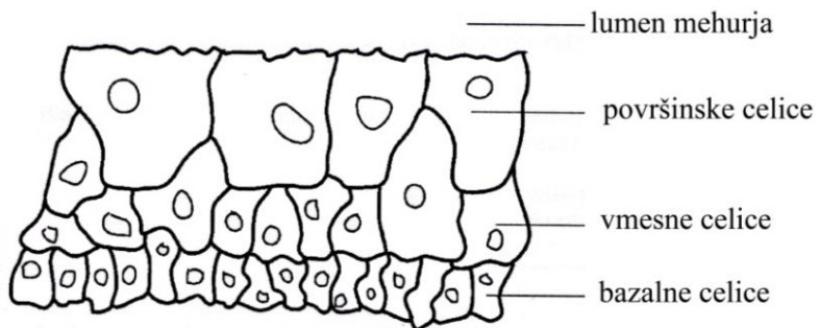
Slika 1: Zgradba stene sečnega mehurja (2).

Serozno plast sestavlja predvsem vezivno tkivo (omogoča prosto raztezanje pri polnjenju (1)), obdano s tankim slojem mezotelijskih celic. Mišična plast je zgrajena iz treh plasti gladkih mišic: notranje in zunanje vzdolžne ter krožne srednje plasti (detruzorska mišica (4)). Mukozna plast obsega lamino proprio in epitelij, ki leži na bazalni lamini. Epitelij imenujemo urotelij in ima značaj prehodnega epitelija (5). Nanj je adheriran sloj glikozaminoglikanov. V steni so tudi krvožilni sistem ter senzorni in motorični nevroni, ki izhajajo iz simpatičnega in parasimpatičnega avtonomnega živčnega sistema (2).

1.1.1. UROTELIJ

Urotelij sestavlja notranji del votlega mehurja, sečevodov, ledvičnih čašic ter zgornjega območja sečnice in je v neposrednem stiku z urinom. Njegova naloga je zagotavljanje krvno-urinske pregrade (5).

Epitelij debeline 200 µm (6) je sestavljen iz treh različnih celičnih skladov: bazalnega, vmesnega (intermediarnega) in površinskega (slika 2) (3).



Slika 2: Struktura urotelija (5).

Vsaka plast celic ima značilno morfološko strukturo (3). Najbolj diferencirane so površinske celice, število slojev celic pa je odvisno od napolnjenosti oziroma raztegnjenosti mehurja (8). Z raztezanjem se spreminja število plasti celic v vmesnem skladu (od 1 do 4) (7) in velikost površinskih celic (3).

Bazalne celice so nediferencirane, majhne celice kubične oblike (5-10 µm v premeru). S hemidezmosomi so pritrjene na basalno lamino (5) in tvorijo zarodno plast, ki služi kot prekurzor za ostale plasti celic (2). Imajo nespecifično znotrajcelično strukturo. Vsebujejo nekaj mitohondrijev, proste ribosome, slabo razvit endoplazmatski retikulum (ER),

Golgijev aparat (GA) pa je sestavljen iz skladovnic kratkih cistern, ki se nahajajo tesno ob jedru (5).

Nad bazalnimi celicami so vmesne celice, ki so večje ($20 \mu\text{m}$ v premeru) in med seboj povezane z dezmosomi. So delno diferencirane. Vsebujejo proste ribosome, mitohondrije, prehodni GA, precej nerazvit ER, mnogo citoplazemskih veziklov in avtofagne vakuole (5).

Tretji sklad urotelija gradijo visoko diferencirane dežnikaste celice. So velike ploščate površinske celice (5) heksagonalne oblike (3). Njihova velikost se spreminja z raztezanjem mehurja (premer znaša $50-120 \mu\text{m}$). Celice se med seboj povezujejo z dezmosomi, adherentnimi stiki. Na meji med apikalno in lateralno plazmalemo pa se nahajajo dobro razviti tesni stiki. Mnoge celice so večjedrne, vsebujejo veliko mitohondrijev, kompleksni GA in dobro razvit ER (5). Imajo dolgo življensko dobo in se ob poškodbi urotelija hitro regenerirajo. Regeneracija je posledica celične delitve v katerikoli od treh celičnih plasti. S fuzijo vmesnih celic lahko nastanejo večjedrne dežnikaste celice (24). Celice na površini imajo tudi dve unikatni morfološki značilnosti:

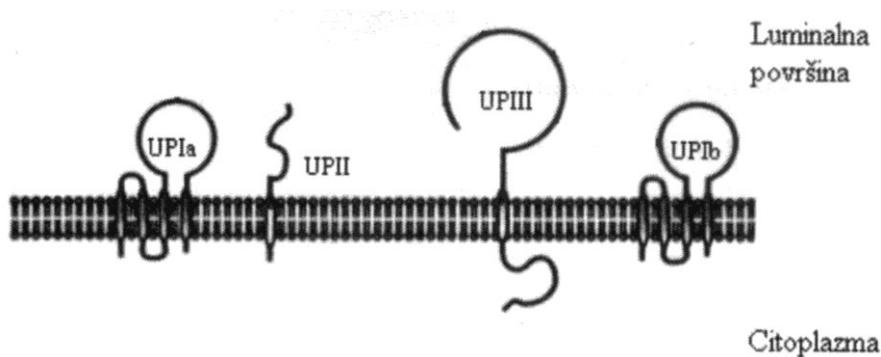
- apikalna membrana celic je pokrita s plaki, kar povzroči nastanek asimetrične membrane – membrana je debelejša na apikalni in tanjša na bazolateralni strani celice,
- citoplazma celic ima veliko gostoto citoplazemskih fuziformnih veziklov, ki so povezani s fibrilno mrežo citoskeleta (3).

Skozi urotelij se snovi večinoma prenašajo z aktivnim transportom. Zelo občutljiv parameter, s katerim določamo prepustnost epitelija, je merjenje transepitelijске električne upornosti (TEER). TEER je obratnosorazmerna s permeabilnostjo epitelija za ione. Epitelij mehurja spada med tesne epitelije in njegove vrednosti TEER daleč presegajo vrednosti ostalih vrst tkiv. Upornost urotelija znaša med $10000 \Omega\text{m}^2$ in $100000 \Omega\text{m}^2$ (vsota upornosti apikalne in bazolateralne membrane, upornost bazolateralne membrane je konstanta in znašala okoli $1500 \Omega\text{m}^2$) (3), medtem ko upornost epitelija v tankem črevesju znaša le $100 \Omega\text{m}^2$ (8). Tesnost epitelija zagotavljajo tesni stiki med površinskimi dežnikastimi celicami, prisotnost plakov na apikalni strani membrane in tanek sloj glikozaminoglikanov (GAG) na površini celic (3). Približno 85 % GAG je kovalentno vezanih na proteine, ki so

vgrajeni v celično membrano. 55 % na proteine vezanih GAG sestavlja heparin sulfat in 29 % hondroitin sulfat. Na površini celice je tudi veliko število glikoproteinov in nekaj GAG, ki so le rahlo vezani na membrano. Glikozaminoglikani imajo zaradi velikega števila sulfatnih skupin na površini visok negativni naboj (9). Po naravi so hidrofilni in tvorijo tanek vodni sloj (mucinski sloj). Preprečijo adhezijo tujih delcev (na primer bakterij in kancerogenov (10)) in penetracijo raztopin in topljencev do celic (4).

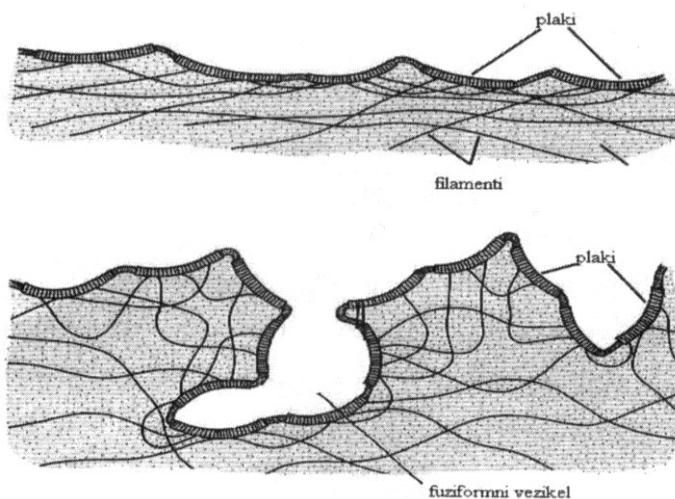
1.1.2. PLAKI

Apikalna membrana dežnikastih celic je sestavljena iz odebelenih in neodebeljenih predelov. Odebela področja, ki zavzemajo 70-90 % površine, so iz poligonalno oblikovanih plakov, katerih premer znaša približno 0,5 µm, debelina pa 12 nm. Neodebeljena področja debeline 8 nm obkrožajo posamezne plake. Vsak urotelijski plak je zgrajen iz približno 1000 podenot (3), ki so heksagonalno urejene v polkristalne strukture (5). Uroplkinsko podenoto tvorijo ekstracelularne domene štirih transmembranskih proteinov, imenovani uroplakini (UP I-IV), ki med seboj interagirajo. UPIII je edini med uroplakinimi, ki ima značilno citoplazemske domene. Preko te domene poteka interakcija med membrano in citoskeletom (2). Struktura uroplakinov je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Struktura uroplakinov (2).

Urotelijski plaki delujejo kot prepustna pregrada, stabilizirajo apikalno površino mehurja in predstavljajo molekularni mehanizem, ki omogoča spremenjanje površine plazmaleme med polnjenjem oziroma praznjenjem mehurja (2, 5). Luminalna površina urotelija v polnem in praznem sečnem mehurju je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Luminalna površina urotelija v polnem (zgoraj) in v praznem (spodaj) sečnem mehurju (2).

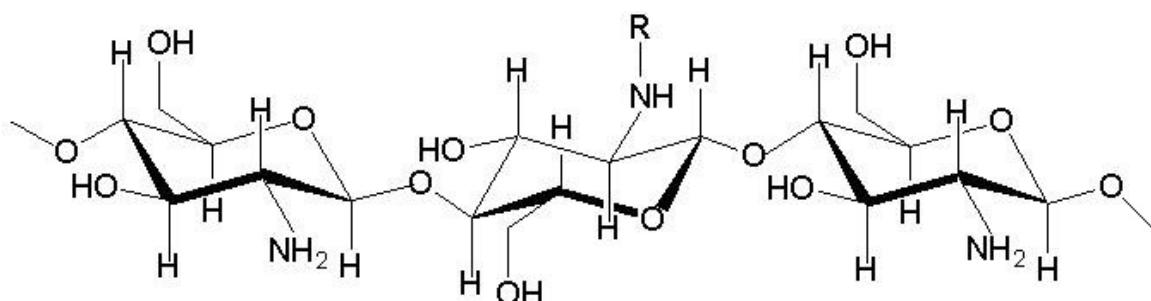
Pri polnjenju mehurja pride najprej do odvijanja apikalne membrane in reorientacije citoplazemskih filamentov. Ko je apikalna membrana gladka, nadaljnjo polnjenje mehurja povzroči raztezanje filamentov, pritrjenih na tesne stike. Ti filamenti potegnejo fuziformne citoplazemske vezikle v apikalno membrano. Vezikli se umestijo v neodebeljena področja med plaki. Spremenijo se tudi dežnikaste celice, ki se raztegnejo in sploščijo. Krčenje gladkih mišic pri praznjenju sproži vrnitev celic v prvotno obliko. Sprememba v obliki celic povzroči premik bazalne membrane stran od apikalne in zvijanje membrane proti celični notranjosti. Del apikalne membrane s plaki se tako ugrezne navznoter, nastanejo fuziformni vezikli, ki se odstranijo iz membrane v citoplazmo (3).

Sinteza in izražanje uroplakinov še ne pomenita visoke oziroma dokončne diferenciacije uroteljskih celic. Uroplakini se namreč izražajo že pri slabo diferenciranih površinskih celicah in tudi pri posameznih vmesnih celicah. Vsekakor pa je odebeljena apikalna membrana najbolj prepoznaven morfološki znak, ki ločuje normalni urotelij od spremenjenega urotelija in od drugih epitelijev pri sesalcih (5).

1.2. HITOSAN

1.2.1. SPLOŠNE ZNAČILNOSTI

Hitosan je linearji kopolimer. Sestavljen je iz 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoznih in 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoznih enot, povezanih z β -(1-4) vezjo (slika 5). Zaradi ponavljajoče amino skupine v glukozidnem ostanku ga uvrščamo med polikationske polimere (11).



Slika 5: Struktura hitosana (R je H ali $COCH_3$).

Hitosan pridobivamo z deacetilacijo hitina ob prisotnosti baze. Naravno je prisoten v nekaterih mikroorganizmih in glivah vrste *Mucoraceae*. Hitin je naravni polisaharid, ki je po pogostosti v naravi na drugem mestu, takoj za celulozo. Najdemo ga v zunanjem skeletu rakov (lupinarjev), insektov in gliv (12).

S spremjanjem pogojev pri reakciji deacetilacije vplivamo na molsko maso hitosana in na stopnjo deacetiliranja. Stopnja deacetiliranja vpliva na pKa vrednost hitosana in s tem na njegovo topnost. Izvorni hitin je netopen v večini organskih topil, medtem ko je hitosan (s stopnjo deacetiliranja približno 50 %) open v kislih vodnih raztopinah z vrednostjo pH manj kot 6. Aminske skupine v D-glukozaminskem ostanku (pKa 6,2-7,0), se v kislem protonirajo, nastane kvarterna amonijeva sol (RNH_3^+). Pri dvigu pH nad 6 pride do deprotonizacije, polimer izgubi naboj in postane netopen (12, 13).

Hitosan izkazuje veliko dobrih lastnosti, zato ga pogosto uporabljamo na biomedicinskem in biofarmacevtskem področju (preglednica I).

Preglednica I: Lastnosti in uporaba hitosana (11, 12, 14).

Lastnost	Uporaba
pospeševanje absorpcije	povečan transport učinkovine skozi intestinalno, bukalno, vaginalno in nazalno sluznico, Caco-2 celice in steno sečnega mehurja
sposobnost tvorbe gela	prirejeno sproščanje
biokompatibilnost in biorazgradljivost	nadomestki sklepov, kosti, zobni implantati
mukoadhezivne lastnosti	prirejeno sproščanje
inhibicija fibroplazije in spodbujanje rasti tkiva	celjenje ran, kožni nadomestki

Hitosan se uporablja tudi kot kelator težkih ionov pri čiščenju vode in kot prehransko dopolnilo za pomoč pri hujšanju, saj naj bi vezal maščobe in zniževal holesterol. V kozmetiki se uporablja kot vlažilno sredstvo, v kmetijstvu pa za zaščito rastlin pred paraziti zaradi protibakterijskega, protivirusnega in fungicidnega učinka (12, 14).

Največja prednost hitosana je vsekakor njegova netoksičnost, ki so jo dokazali z *in vitro* in *in vivo* študijami. *In vitro* študije so izvedli na Caco-2 in HT29-H celicah ter izoliranem podganjem jejunumu. *In vivo* študije so potekale na podganah, miših, zajcih in morskih prašičkih. Pokazale so, da hitosan ne povzroča draženja kože in oči, ne deluje pirogeno in nima toksičnega učinka po peroralnem zaužitju (12).

1.2.2. POVEČANJE PERMEABILNOSTI RAZLIČNIH TKIV

Pri aplikaciji hitosana na različne sluznice pride do bio- oziroma mukoadhezije. Pozitivno nabite amino skupine na C-2 poziciji hitosana (15) tvorijo ionske interakcije z negativno nabitim sulfatnim skupinama in ostanki sialične kisline v mukusu ali na površini celic (16). Sam mehanizem povečanja permeabilnosti tkiv je specifičen za posamezno sluznico. Pri Caco-2 celicah interakcija hitosana s celično membrano povzroči reorganizacijo proteinov, povezanih s tesnim stiki. Posledično se poveča paracelularni transport (17). Pri sečnem mehurju pa pride do luščenja zgornjih plasti urotelija (8).

1.2.2.1. CACO-2 CELICE

Mehanizem delovanja hitosana so preučevali na monosloju kultiviranih intestinalnih epitelnih celic (Caco-2 celice) (16). Kot modelno učinkovino so uporabili ¹⁴C-manitol, ki je metabolično inerten in zelo hidrofilen. Ne porazdeljuje se v celične membrane v velikem

obsegu. Absorbira se paracelularno, zato je njegova bazna permeabilnost zelo nizka, kar omogoča zaznavo zelo majhnih sprememb v permeabilnosti. Povečanje permeabilnosti tega hidrofilnega markerja je odvisno od pH vrednosti hitosanskih raztopin. Transport manitola skozi membrano se je povečeval z nižanjem pH. Pri vrednostih pH nižjih od pKa polimera, se hitosan protonira in molekula se razvije, kar zagotavlja boljši stik z apikalno membrano (18). Na gostoto naboja vpliva tudi stopnja acetiliranja, saj so pozitivno nabiti le glukozaminski ostanki (16). Hitosan z višjo stopnjo acetiliranja ima nižjo gostoto pozitivnega naboja, hkrati pa številne acetilne skupine predstavljajo tudi sterično oviro pri vezavi polimera na površino celic. Da je delovanje hitosana pogojeno s pozitivnimi naboji, so dokazali z dodatkom negativno nabitega heparina, ki je popolnoma inhibiral povečanje absorpcije (19).

Tesni stiki imajo dve pomembni fiziološki funkciji: predstavljajo glavno bariero za pasivni transport tekočin, elektrolitov, makromolekul in celic preko paracelularne poti (20) (prepustni so le za dovolj majhne molekule (15)), poleg tega z vzdrževanjem epitelijske celične polarnosti sodelujejo pri transcelularnem transportu snovi (20). Na njihovo prepustnost lahko vplivamo s spremembami v koncentraciji kalcija ter cAMP, vrednosti pH in vplivanjem na organizacijo proteinov citoskeleta, ki so povezani s tesnimi stiki (15).

Dober indikator tesnosti tesnih stikov je merjenje TEER (17). Padec TEER za 50 % pomeni, da so se tesni stiki odprli (20). Dodane in sodelavci (21) so raziskovali vpliv hitosana na spremjanje vrednosti TEER in ugotovili, da je 0,01% (ut/vol) raztopina (pH 6,0-6,5), aplicirana na apikalno stran Caco-2 celic, povzročila padec TEER za 50 % po 15 minutah in za 75 % po 1 uri. Padec TEER je spremljal tudi povečan paracelularni transport ¹⁴C-manitola. Ugotovili so, da je učinek hitosana koncentracijsko odvisen, saj je koncentracija polimera vplivala na padec TEER in na transport markerja. Dodatne študije pa so pokazale, da ni razlike v padcu TEER in povečanju navideznega permeabilnostnega koeficiente za manitol pri uporabi 0,1% ali 0,5% (ut/vol) disperzije, kar pomeni, da že pri 0,1% (ut/vol) koncentraciji dosežemo maksimalni učinek. Vrednosti TEER so se vrnilе na normalno vrednost v roku 24 ur po odstranitvi polimera, kar nakazuje, da se je ponovno vzpostavila funkcionalna integriteta monosloja. To so dokazali z uporabo barvila tripan modro, ki ga celice niso privzele, kar pomeni, da integriteta membrane ni bila porušena. Preverili so tudi aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH), citosolnega encima, ki se sprosti ob poškodbi celic. Zasledili so rahlo povečano ekstracelularno aktivnost encima pri vseh

uporabljenih koncentracijah polimera, vendar so se vrednosti vrnilne na normalno raven (enako kontroli) že 8 ur po odstranitvi testnih raztopin. Z uporabo cikloheksaimida, inhibitorja proteinske sinteze, so testirali, ali je za povrnitev integritete membrane potrebna proteinska sinteza. Ugotovili so, da je ta nujna le pri tretiranju celic z 0,5% (ut/vol) raztopino hitosana.

Z uporabo konfokalnega mikroskopa so ugotavljali vpliv hitosana na proteine v samih tesnih stikih. Opazovali so tri proteine: okludin, ki je transmembranski protein tesnih stikov, s tesnimi stiki povezani protein ZO-1 in aktin, protein citoskeleta. Ugotovili so, da po inkubaciji z 0,1% (ut/vol) disperzijo hitosana pride do sprememb v razporeditvi okladina in proteina ZO-1 v citoplazmi, zmanjšala se je tudi intenziteta fluorescentnega obarvanja obeh proteinov. Pri aktinu so opazili skrajšanje filamentov in aktinskih agregatov, spremenil se je tudi vzorec fluorescentnega obarvanja. Po odstranitvi raztopine hitosana in preteklu 24 ur so tretirane celice izkazovale enake vzorce okladina, ZO-1 proteina in aktina kot kontrolne celice (21). Spremembra v razporeditvi aktina je pomembna, saj je aktin direktno ali indirektno povezan s proteinimi v tesnih stikih (17) in je pomemben pri regulaciji paracelularnega prenosa snovi (21). Nadalje so Smith in sodelavci (22) preverili, ali hitosan vpliva na tesne stike preko zmanjšanja koncentracije znotrajceličnega ATP, kar tudi povzroči premik ZO-1 in okladina v citoskeletalno frakcijo. Ugotovili so, da hitosan ne povzroči signifikantnih sprememb v ravni ATP v Caco-2 celicah.

Največja omejitev delovanja hitosana je njegova topnost v raztopinah. Sol hitosana s klorovodikovo kislino in sol hitosana z glutaminom v pufru z vrednostjo pH 6,2 povzročita takojšen in dalj časa trajajoč padec TEER. Pri pH 7,4 ne pride do značilne spremembe TEER. Enak vpliv je opazen tudi pri transportu ^{14}C -manitola. Pri pH 6,2 se navidezni permeabilnostni koeficient ^{14}C -manitola poveča 36-krat oziroma 25-krat ob dodatku 1,5% oziroma 0,5% (ut/vol) disperzije hitosana, spremembe pri pH 7,4 pa so neznačilne (17). Problem s topnostjo so rešili s pripravo N-trimetil hitosana, ki poveča absorpcijo različnih učinkov in tudi pri fizioloških vrednostih pH (20).

Schipperjeva in sodelavci (16) so raziskovali vpliv molekulske mase in stopnje acetiliranja hitosana na toksičnost in sposobnost povečanja absorpcije. Ugotovili so, da hitosani z nizko molekulsko maso (22 kDa) in visoko stopnjo acetiliranja ($\geq 35\%$) ne delujejo kot

pospeševalci absorpcije. Hitosani z nizko stopnjo acetiliranja in/ali visoko molekulsko maso povečajo epiteljsko permeabilnost. Dokazali so tudi, da imajo hitosani z nizko stopnjo acetiliranja bolj škodljiv vpliv na strukturo membrane celice, kot tisti z visoko stopnjo acetiliranja. Najbolj uporabni so hitosani s srednjo stopnjo acetiliranja in visoko molekulsko maso, na primer hitosan s stopnjo acetiliranja 35 in molekulsko maso 170 kDa.

1.2.2.2. SEČNI MEHUR

Mukozna sloja na površini intestinalnega epitelija in urotelija imata različno strukturo in debelino. Vseeno med njima obstajajo podobnosti: pri obeh so prisotne sladkorne verige, ki so popolnoma ali delno pritrjene na proteine in površini obeh imata negativni naboj, ki pa verjetno ni enak. Zaradi teh podobnosti lahko sklepamo, da bodo polimeri, ki izkazujejo dobre mukoadhezivne lastnosti na intestinalni sluznici, imeli podobno delovanje tudi na sluznici sečnega mehurja (9).

Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko so preučevali učinek hitosana na permeabilnost izolirane stene sečnega mehurja prašiča. Prve študije so pokazale, da hitosan $2,7 \pm 2,9$ -krat in $2,8 \pm 2,0$ -krat (srednja vrednost \pm SD) poveča navidezno permeabilnost pipemidne kisline pri koncentraciji 0,5 % in 0,1 % (ut/vol). Povečala se je difuzija v urotelij, ne pa tudi v nižje plasti stene mehurja (6). Ugotovili so, da hitosan tvori močnejše oziroma dodatne interakcije z mukusom v primerjavi z negativno nabitimi polimeri, ki se sicer uporablajo kot pospeševalci absorpcije (na primer karboksimetil celuloza in polikarbofil). Potrdili so tudi vpliv gostote naboja na moč adhezije; večja kot je gostota, močnejše se hitosan veže. Z odstranitvijo mukusa s spiranjem z 0,6 M HCl (histološke študije so pokazale nepoškodovane celice) se je adhezija polimera značilno zmanjšala, iz česar so sklepalni, da pri mukoadheziji pride do interakcij med sulfatnimi skupinami mukusa in nabitimi aminskimi skupinami hitosana (10).

V nadalnjih študijah so preverjali vpliv različnih koncentracij hitosana, časa stika hitosana z urotelijem in koncentracije kalcijevih ionov na absorpcijo moksifloksacina v steno sečnega mehurja prašiča. Uporabili so 7 različnih koncentracij hitosana v območju 0,0001 %-0,5 % (ut/vol). Vse disperzije so bile v stiku s tkivom 60 min. Ugotovili so, da 0,0001% (ut/vol) disperzija hitosana ni značilno vplivala na prehajanje moksifloksacina,

medtem ko je 0,0005% (ut/vol) koncentracija povzročila značilno povečanje absorpcije modelne učinkovine. Učinek je bil maksimalen pri uporabi 0,001% (ut/vol) disperzije, pri tej koncentraciji so torej dosegli plato absorpcije moksifloksacina. Pri raziskovanju vpliva trajanja stika epitelija s hitosanom so na sluznico nanesli disperzije s tremi različnimi koncentracijami (0,5%, 0,005% in 0,0005% (ut/vol)). Količino absorbiranega moksifloksacina so merili po 15, 30, 60 in 90 minutah. Ugotovili so, da daljši čas stika poveča celotno količino moksifloksacina, ki preide v tkivo, plato učinka pa je dosežen po 60 minutah (13). Dodatek kalcija zmanjša učinek hitosana na permeabilnost sluznice za moksifloksacin. Prisotnost 0,5 M raztopine kalcijevih ionov značilno zmanjša vpliv 0,5% (ut/vol) disperzije hitosana. Pri dodatku 0,1 M raztopine kalcijevih ionov pa učinek hitosana na permeabilnost urotelija ni več statistično dokazan. Dodatek kalcija vpliva tudi na zmanjšan obseg poškodb tkiva (8).

Z uporabo vrstične in transmisijске elektronske mikroskopije so ugotavljeni mehanizem delovanja hitosana na permeabilnost stene sečnega mehurja. Ugotovili so, da hitosan na urotelij deluje drugače kot na epitelij Caco-2 celic, v višjih koncentracijah namreč povzroči luščenje dežnikastih celic. Enourna izpostavitev sluznice mehurja kontrolni kisli raztopini moksifloksacina ($\text{pH} = 4,5$) ni povzročila opaznih sprememb na površini. Površinske celice so bile dobro diferencirane, tesni stiki med njimi intaktni, luščenja urotelija pa ni bilo. Iz tega so sklepali, da kisel pH raztopin ne poškoduje epitelija. Po nanosu 0,0001% (ut/vol) hitosana za 60 min so bile celice podobne kontrolnim, površino je prekrival tanek sloj hitosanskega gela. Enako je bilo po 15 min izpostavitvi sluznice 0,0005% in 0,005% (ut/vol) disperziji. Luščenja epitelija niso opazili, vendar so bile pri uporabi 0,005% (ut/vol) hitosana površinske celice rahlo napihnjene. Občasno luščenje urotelija in razgaljene vmesne celice so odkrili že po 15 min delovanja 0,5% (ut/vol) disperzije hitosana. Po 60 min delovanju pa je prišlo do masovnega luščenja. Na površini epitelija ni bilo sloja polimera in dežnikastih celic, vidne so bile le vmesne in tudi bazalne celice. Morfološke študije so pokazale, da pri 15 min izpostavitvi 0,0005% (ut/vol) hitosanu ni prišlo do nekroze celic, tesni stiki med celicami pa so bili delno odprtih. 15 minutno delovanje 0,005% (ut/vol) disperzije je že povzročilo nekrozo dežnikastih celic, poškodbe mitohondrijev in organelov. Na površini so bile občasno vidne intermediarne celice. Tesni stiki med nekrotičnimi celicami so bili večinoma uničeni, vendar so bili nekateri med njimi morfološko normalni. Po 60 min izpostavitvi epitelija 0,0001% (ut/vol) hitosanu je bilo

tkivo morfološko enako kontroli, čeprav so opazili občasne spremembe v strukturi tesnih stikov. Pri nanosu 0,001% ali 0,0005% (ut/vol) disperzije so opazili nekrozo urotelijskih celic. Po inkubaciji z 0,5% (ut/vol) hitosanom je prišlo do velikih morfoloških sprememb v uroteliju. Vmesne in bazalne celice so bile vidne na površini. Opazni so bili jasni znaki njihove nekroze s poškodovano membrano in otečenimi organeli, ni pa bilo znakov apoptoze. Med celicami tudi ni bilo tesnih stikov. Posledica luščenja urotelija je odstranitev vseh permeabilnostnih barier: plasti GAG, membranskih plakov in tesnih stikov. Spodaj ležeče celične plasti ne vsebujejo nobene od teh pregrad, zato ne preprečujejo transporta snovi v steno sečnega mehurja (13).

V novejših *in vitro* študijah so testirali uporabo nanodelcev s hitosanom za povečan privzem mitomicina C, cisplatina in paklitaksela v tumorske celice mehurja in večji vnos 5-amino salicilne kisline v steno sečnega mehurja podgane za zdravljenje cistitisa. Vse izpeljane *in vitro* študije so pokazale obetajoče rezultate, pravzem oz. vnos učinkovin se je v vseh primerih povečal (4).

1.2.2.3. OSTALA TKIVA

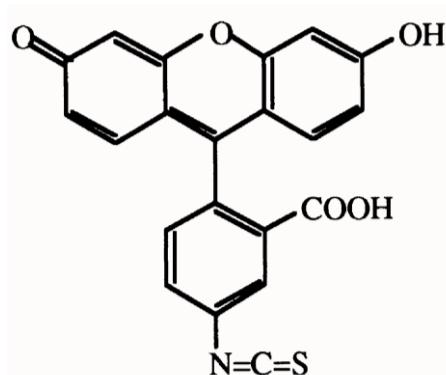
Hitosan poveča tudi permeabilnost učinkovin skozi nosno, bukalno in vaginalno sluznico. V *in vitro* študijah na zajcih in *in vivo* poskusih na podganah so dokazali, da aplikacija disperzij hitosana različnih koncentracij poveča absorpcijo inzulina (23), kalcitonina in morfinskih derivatov skozi nosno sluznico (24). Aplikacija hitosanskega gela na bukalno sluznico prašiča je povečala permeabilnost sluznice za hidrokortizon in transformirajoči rastni faktor β. Učinek hitosana je posledica njegove bioadhezije in s tem povečanega časa zadrževanja učinkovine na mestu aplikacije ali pa direktnega vpliva na intercelularne lipidne lamele, ki gradijo permeabilne bariere epidermisa in oralnega epitelija (25). Z uporabo Franzevih difuzijskih celic in prašičje vaginalne sluznice so preverjali vpliv hitosana na permeabilnost vaginalne sluznice. Na sluznico so nanesli gele hitosana. Ugotovili so, da soli hitosana s klorovodikovo kislino in citronsko kislino povečata absorpcijo ciprofloksacina, aciklovirja in fluorescein izotiocianat dekstrana (26).

1.2.3. FLUORESCENTNO OZNAČEVANJE HITOSANA

Fluorescentno označevanje hitosana omogoča hitro, enostavno in občutljivo opazovanje mukoadhezije, porazdelevanja in razgradnje hitosana v organizmu, ter privzema nanodelcev z označenim hitosanom v celice (19, 27, 28).

1.2.3.1. OZNAČEVANJE S FLUORESCEIN IZOTIOCIANATOM

Kovalentna vezava fluorescein-5-izotiocianata (FITC) (struktura je predstavljena na sliki 6) na hitosan vodi v nastanek stabilne molekule, ki služi kot vodotopni makromolekularni fluorofor (27).



Slika 6: Struktura FITC-a (27).

Quaqish in Amiji sta z uporabo fluorescenčne polarizacijske metode raziskovala interakcije hitosana z mucinom. Ugotovila sta, da poleg elektrostatskih interakcij verjetno pride tudi do tvorbe vodikovih vezi in/ali hidrofobnih interakcij med hitosanom in glikoproteinskimi ostanki v mukusu. Pokazala sta tudi, da ima visoko molekularni hitosan več mest za vezavo na mucin, kot nizko molekularni hitosan (27).

Huang in sodelavci (28) so z uporabo fluorometrije raziskovali privzem molekul FITC-hitosana in nanodelcev iz FITC-hitosana v človeške celice pljučnega raka (A549 celice). Ugotovili so, da je privzem hitosana bistveno večji v obliki nanodelcev. Celice privzamejo nanodelce preko adsorptivne endocitoze, ki jo sprožijo nespecifične interakcije med nanodelci in celično membrano.

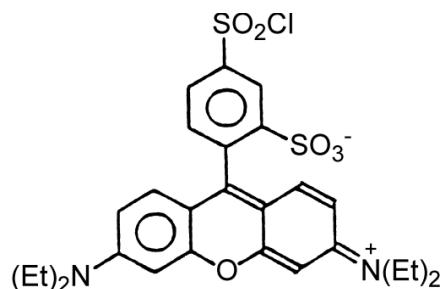
Druga raziskovalna skupina je z uporabo konfokalne laserske mikroskopije opazovala interakcije med nanodelci FITC-hitosana in epitelijem tankega črevesa podgane. Močan

pas fluorescence širine 3 μm ali več je bil prisoten po celotnem tkivu ileuma. Fluorescentni delci so bili razporejeni na različnih globinah tkiva: med intestinalnimi vilji, na površini enterocitov, med nižje ležečimi sloji enterocitov in v tkivu, ki leži pod absorptivnimi celicami. Iz razporeditve delcev so sklepali, da je prišlo do močne interakcije med nanodelci in epitelijem (29).

1.2.3.2. OZNAČEVANJE Z RODAMINOM

Težava pri označevanju hitosana s FITC-em je variabilna učinkovitost vezave fluorofora na polimer. Problem predstavlja predvsem dejstvo, da izotiocianat reagira z nevtralnimi aminskimi skupina pri pH vrednosti okoli 9, večina hitosanov pa je netopna, če je znatna količina aminskih skupin nevtralnih (to je pri pH vrednosti večji od 6,5). Ma je s sodelavci ugotovil, da je primeren alternativni fluorofor rodamin B izotiocianat. Ugotovili so, da lahko natančno dosežejo stopnjo molarne derivatizacije hitosana, če upoštevajo stopnjo protonizacije hitosana, začetno koncentracijo fluorofora in reakcijski čas (30).

Tudi Schipper in sodelavci (19) so za označevanje hitosana uporabili derivat rodamina B, in sicer LissamineTM-rodamin B sulfonil klorid (struktura je predstavljena na sliki 7).

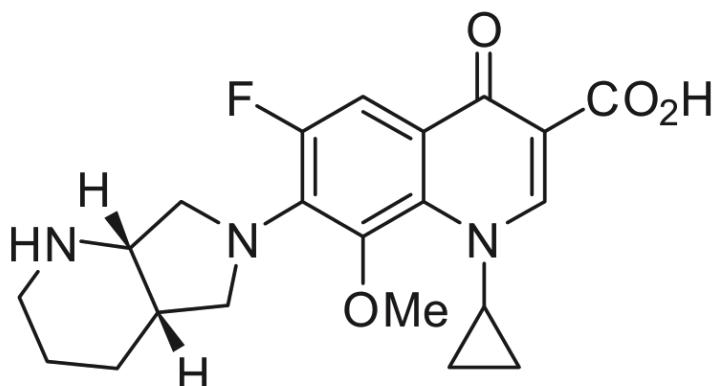


Slika 7: Struktura LissamineTM-rodamin B sulfonil klorida (31).

Halogensi derivati sulfonil rodamina so stabilni, vodotopni, imajo močno fluorescenco in reagirajo s prosto aminsko skupino (31). Z uporabo konfokalne laserske mikroskopije so opazovali vezavo označenega hitosana na monosloj Caco-2 celic. Celice so za 60 minut izpostavili disperziji polimera. Ugotovili so, da je hitosan v tesnem stiku z apikalno membrano. Majhni agregati fluorescentnega hitosana so bili razporejeni po celotnem monosloju. Hitosana niso zaznali intracelularno, opazili pa so rahlo fluorescenco v intercelularnem prostoru. Po inkubaciji monosloja s samim barvilom niso zaznali nikakršne fluorescence na površini celic (19).

1.3. MOKSIFLOKSACIN

Moksifloksacin (*1-ciklopropil-6-fluoro-7-((4aS,7aS)-heksahidro-1H-pirolo[3,4-b]piridin-6(2H)-il)-8-metoksi-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kislina*) spada v četrto generacijo fluorokinolonskih protimikrobnih učinkovin in je učinkovit proti širokem spektru Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij. Njegova strukturna formula je prikazana na sliki 8 (32, 33).



Slika 8: Struktura moksifloksacina (32).

Fluorokinoloni delujejo baktericidno in specifično. Inhibirajo dva encima, ki jih v človeških celicah ni: bakterijsko topoizomerazo II (DNK giraza) in topoizomerazo IV (33). Oba encima sta nujno potrebna pri podvajjanju, prepisovanju in obnavljanju bakterijske DNK (34). DNK giraza nadzira vijačenje in odvijanje DNK. Pri podvajjanju mora biti DNK odvita. Topoizomeraza IV povzroči ločitev hčerinskih kromosomov, s tem omogoči njuno segregacijo v dve hčerinski celici na koncu vsake replikacije. Učinkovina interagira s kompleksom encim-DNA, kar povzroči konformacijske spremembe in inhibicijo normalnega delovanja encima. Novo nastali kompleks topoizomeraza IV-DNK-učinkovina blokira napredovanje replikacijskih vilic, kar vodi v hitro smrt bakterijske celice. Kompleks giraza-DNK-učinkovina ustavi uvajanje dodatnih negativnih zavojev v molekulo DNK, kar inducira sintezo encimov, ki popravljajo DNK. Nekoordinirano popravljanje pa vodi v ireverzibilne poškodbe DNK in celično smrt. Pri starejših generacijah fluorokinolonov je primarna tarča Gram-negativnih organizmov DNK giraza, pri Gram-pozitivnih pa topoizomeraza IV. Moksifloksacin v Gram-pozitivnih bakterijah inhibira oba encima (33).

Moksifloksacinijev klorid se peroralno (Avelox[®]) uporablja za zdravljenje akutnega bakterijskega vnetja obnosnih votlih, akutne eksacerbacije kroničnega bronhitisa, pljučnice in blage do zmerne medenične vnetne bolezni (34). V obliki kapljic za oko (Vigamox[®]) se uporablja topikalno za zdravljenje purulentnega bakterijskega konjunktivitisa (35).

Po peroralni aplikaciji se moksifloksacin hitro in skoraj popolnoma absorbira, zelo hitro se tudi razporedi po tkivih. Njegova biološka uporabnost je približno 91 %, razpolovna doba pa 12 ur. V poskusih *in vivo* in *ex vivo* se je na plazemske beljakovine vezalo od 40 do 42 % učinkovine, ne glede na koncentracijo. Večinoma se veže na serumske albumine. Biotransformira se v reakcijah II. faze. Izloča se s sečem, žolčem in blatom in sicer kot nespremenjena učinkovina, v obliki sulfata in glukuronida. To sta edina pomembna presnovka pri ljudeh, ki pa sta mikrobiološko neaktivna. S sečem se izloči približno 19 % nespremenjene učinkovine, okoli 2,5 % v obliki sulfata in 14 % v obliki glukuronida. Z blatom se izloči približno 25 % nespremenjene učinkovine in okoli 36 % v obliki sulfata. Skupaj se tako iz telesa odstrani približno 96 % peroralno zaužitega odmerka (34).

Neželeni stranski učinki moksifloksacina so najpogosteje slabost, bruhanje, driska ter bolečine v prebavilih in trebuhu. Med bolj pogostimi so tudi infekcije z odpornimi bakterijami ali glivicami (npr. kandidoza v ustih in vaginalna kandidoza), glavobol, omotica, povečane vrednosti transaminaz in podaljšanje intervala QT pri bolnikih s hipokaliemijo. Vendar se te učinki pojavijo pri manj kot 3 % bolnikov (34).

Rezistenza bakterijskih celic na fluorokinolone se razvije po dveh mehanizmih: pride do spremembe v tarčnem encimu, do oviranja prepustnosti celice ali do spremembe mehanizma prehoda v celico. Mutacije v genih, ki kodirajo DNK girazo oziroma topoizomerazo IV, povzročijo zmanjšanje afinitete učinkovine za spremenjen kompleks encim-DNK. Pri drugem načinu razvoja rezistence pride do razvoja črpalk na membrani celice, ki aktivno črpajo učinkovino iz celice. Pri Gram-negativnih organizmih lahko pride tudi do znižanja nivoja proteinov, ki so odgovorni za difuzijo učinkovine v celico (difuzijski porini), kar še dodatno zmanjša akumulacijo zdravila v celici. Opazili so navzkrižno odpornost na moksifloksacin z drugimi kinoloni (33, 34). Navzkrižna odpornost z drugimi skupinami protibakterijskih učinkovin ni znana (32).

2. NAMEN DELA

Hitosan je polikationski polimer, ki se na široko uporablja v biofarmacetske in biomedicinske namene, tudi kot pospeševalec absorpcije hidrofilnih učinkovin. Poveča permeabilnost različnih sluznic, deluje tudi na sluznico sečnega mehurja. Prisotnosti hitosana na tkivu ne moremo opazovati s svetlobnim mikroskopom, uporabiti je potrebno elektronski mikroskop. Fluorescentno označen hitosan predstavlja eno izmed možnosti za lažje oziroma hitrejše mikroskopsko opazovanje dostavnih sistemov s hitosanom na tarčnem tkivu.

Namen diplomskega dela je pripraviti FITC-hitosan in preveriti ali delno blokiranje prostih aminskih skupin polimera z vezavo fluorofora vpliva na njegovo sposobnost povečanja permeabilnosti stene sečnega mehurja. Prisotnost fluorescentno označenega hitosana na tkivu bomo spremljali s fluorescenčnim mikroskopom.

Po pripravi in čiščenju FITC-hitosana bomo izvedli poskuse na tkivu. V prvi seriji poskusov bomo na koščke izoliranega sečnega mehurja prašiča, vpete v difuzijske celice, za 60 minut aplicirali 0,05% (ut/vol) disperzijo hitosana, 0,05% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana ali kontrolno raztopino moksifloksacina. V drugi seriji bomo na mehur nanesli kontrolno raztopino moksifloksacina, 0,005% (ut/vol) disperziji hitosana in FITC-hitosana ter 0,25% (ut/vol) disperziji hitosana in FITC-hitosana. V kontrolni raztopini in v vseh uporabljenih disperzijah bo enaka koncentracija moksifloksacina. Prehod moksifloksacina v tkivo bomo vrednotili z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).

S fluorescenčnim mikroskopom bomo opazovali površino urotelija in prečni prerez stene sečnega mehurja po nanosu kontrolne raztopine FITC-a in disperzije vseh treh preiskovanih koncentracij FITC-hitosana (0,005%, 0,05% in 0,25% (ut/vol)).

Pričakujemo, da bosta hitosan in FITC-hitosan v vseh treh uporabljenih koncentracijah povečala prehajanje moksifloksacina v tkivo v primerjavi s kontrolno raztopino moksifloksacina, ter da med delovanjem označenega in neoznačenega hitosana enake koncentracije ne bo značilnih razlik. Pričakujemo tudi, da bo vezava FITC-a na hitosan uspešna in nam bo omogočala opazovanje prisotnosti hitosana na sluznici sečnega mehurja prašiča.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI IN APARATURE

3.1.1. MATERIALI

Modelna učinkovina:

- Moksifloksacinijev klorid, Bayer AG, Leverkusen, Nemčija

Polimer:

- Hitosanijev klorid, Protasan UP CL 213, NovaMatrix, Drammen, Norveška

Tkivo:

- Sečni mehur prašiča, Celjske mesnine d.d., Celje, Slovenija

Kemikalije:

- Fluorescein izotiocianat izomer I, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, ZDA
- Metanol, za preparativno tekočinsko kromatografijo, Chromosol V®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemčija
- Acetonitril, za tekočinsko kromatografijo, Chromosol V®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemčija
- Demineralizirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
- Ultračista voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10 (specifična upornost 18,2 MΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) 5), Millipore Corp., Billerica, ZDA
- Ocetna kislina, JT Baker, Deventen, Nizozemska
- Natrijev klorid, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev hidrogen fosfat, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
- Dinatrijev hidrogen fosfat, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalcijev karbonat, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
- Triklorocetna kislina, p.a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, ZDA
- Tekoči dušik, Messer Group GmbH, Bad Soden, Nemčija
- Tekočina za kriostat, Jung, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Nemčija
- Puferske raztopine pH = 4, pH = 5, pH = 7, pH = 8, Kefolab, Ljubljana, Slovenija

3.1.2. APARATURE

Aparature in pribor:

- Tehnica, H 54 AR, Mettler, Greinfansee, Švica
- Tehnica, AG 245, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
- Hladilnik, LTH, Škofja Loka, Slovenija
- Zamrzovalnik (-20°C), Gorenje, Velenje, Slovenija
- Elektromagnetno mešalo, RO5 power, IKA-Werke GmgH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- Mešalnik, Vibromix 10, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Stresalnik, Vibromix 403 EVT, Tehnica, Železniki, Slovenija
- pH meter, MA 5750, Iskra, Kranj, Slovenija
- Polavtomatske pipete (2-20 µl, 20-200 µl in 200-1000 µl), Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Difuzijske celice, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
- Centrifuga, Centrifuge 5415 R, Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Kriostat, LEICA CM 1850, Leica Microsystems, Nussloch, Nemčija
- Spektroskop, Tecan Safire 2, Tecan Austria GmbH, Grödig, Avstrija
- Liofilizator, Beta 1-8K, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Nemčija
- Ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- Fluorescenčni mikroskop, Olympus BX 50, Olympus America Inc., Center Valley, ZDA
- HPLC sistem, Agilent technologies 1100 series z UV detektorjem, Agilent technologies, Santa Clara, ZDA
 - Predkolona PRP-1, Hamilton, Reno, ZDA
 - Kolona PRP-1 (150 mm x 4,1 mm, 5 µm delci), Hamilton, Reno, ZDA
- Plastične epice (1,5 mL), Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Filter, Rundfilter Ø 90 mm, Schleicher & Schnell GmbH, Dassel, Nemčija
- Membrane za dializo, Spectra/Por 3 Membrane, Spectrum Medical Industries Inc., Laguna Hills, ZDA

- Celulozno acetatni filter ($0,45 \mu\text{m}$), Sartorius AG, Göttingen, Nemčija
- Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viale, inserti za viale, presesalna buča, lij za presesalno bučo
- Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, palčke za mešanje, Parafilm® M

3.2. METODE DELA

3.2.1. PRIPRAVA UPORABLJENIH PUFROV, RAZTOPIN IN DISPERZIJ

0,1 M raztopina ocetne kisline

V 100 mL bučko smo odpipetirali $575 \mu\text{L}$ 100 % ocetne kisline ($M = 60,05 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,05 \text{ g/mL}$) in z demineralizirano vodo dopolnili do oznake.

Izotoničen fosfatni pufer (PBS)

PBS smo pripravili po predpisu Ph. Eur. 7th Ed. V 1 L bučko smo natehtali 8 g natrijevega klorida, 2,38 g dinatrijevega hidrogenfosfata dodekahidrata in 0,19 g kalijevega dihidrogen fosfata ter z demineralizirano vodo dopolnili do oznake. Pripravljeno raztopino smo premešali, nato pa z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali pH na 7,4.

Razredčen fosfatni pufer (PB)

V 1 L bučko smo natehtali 1,6 g natrijevega klorida, 1,19 g dinatrijevega hidrogen fosfata dodekahidrata in 0,095 g kalijevega dihidrogen fosfata ter z demineralizirano vodo dopolnili do oznake. Pripravljeno raztopino smo premešali, nato pa z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali pH na 4,5.

0,2% (ut/vol) raztopina triklorocetne kisline (TCA)

V 1 L bučki smo raztopili 2,0 g TCA v bidestilirani vodi in z njo dopolnili do oznake. Raztopino smo dobro premešali in prefiltrirali z vodno črpalko in celuloznim acetatnim filtrom z velikostjo por $0,45 \mu\text{m}$.

Mobilna faza (MF)

Pripravili smo mobilno fazo z volumskim razmerjem TCA/acetonitril/metanol = 67/29/4. V 1 L bučko smo z merilnim valjem odmerili 290 mL acetonitrila, 40 mL metanola in 670 mL 0,2% (ut/vol) raztopine triklorocetne kisline. Pred uporabo smo mobilno fazo premešali in razplinili z uporabo ultrazvočne kadičke.

Raztopina moksifloksacina (MOX)

V 100 mL bučko smo natehtali 160 mg moksifloksacina in s PB-jem (pH = 4,5) dopolnili do oznake. Raztopino smo mešali z elektromagnetnim mešalom, dokler se ni ves moksifloksacin raztopil. Koncentracija moksifloksacina je bila 1,6 g/L oz. 0,004 mol/L. Pred poskusom smo pH raztopine z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali na 4,5.

0,05% (ut/vol) disperzija hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT 0,05)

V 25 mL bučko smo natehtali 12,5 mg hitosana in z raztopino moksifloksacina ($\gamma = 1,6 \text{ g/L}$) dopolnili do oznake. Bučko smo zavili v folijo in čez noč mešali z elektromagnetnim mešalom. Pred poskusom smo pH disperzije z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali na 4,5.

0,05% (ut/vol) disperzija FITC-hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT-FITC 0,05)

V 25 mL bučko smo natehtali 12,5 mg FITC-hitosana in z raztopino moksifloksacina ($\gamma = 1,6 \text{ g/L}$) dopolnili do oznake. Bučko smo zavili v folijo in čez noč mešali z elektromagnetnim mešalom. Pred poskusom smo pH disperzije z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali na 4,5.

0,25% (ut/vol) disperzija hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT 0,25)

V 20 mL bučko smo natehtali 50 mg hitosana in z raztopino moksifloksacina ($\gamma = 1,6 \text{ g/L}$) dopolnili do oznake. Bučko smo zavili v folijo in čez noč mešali z elektromagnetnim mešalom. Pred poskusom smo pH disperzije z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali na 4,5.

0,25% (ut/vol) disperzija FITC-hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT-FITC 0,25)

V 20 mL bučko smo natehtali 50 mg FITC-hitosana in z raztopino moksifloksacina ($\gamma = 1,6 \text{ g/L}$) dopolnili do oznake. Bučko smo zavili v folijo in čez noč mešali z elektromagnetnim mešalom. Pred poskusom smo pH disperzije z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali na 4,5.

0,005% (ut/vol) disperzija hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT 0,005)

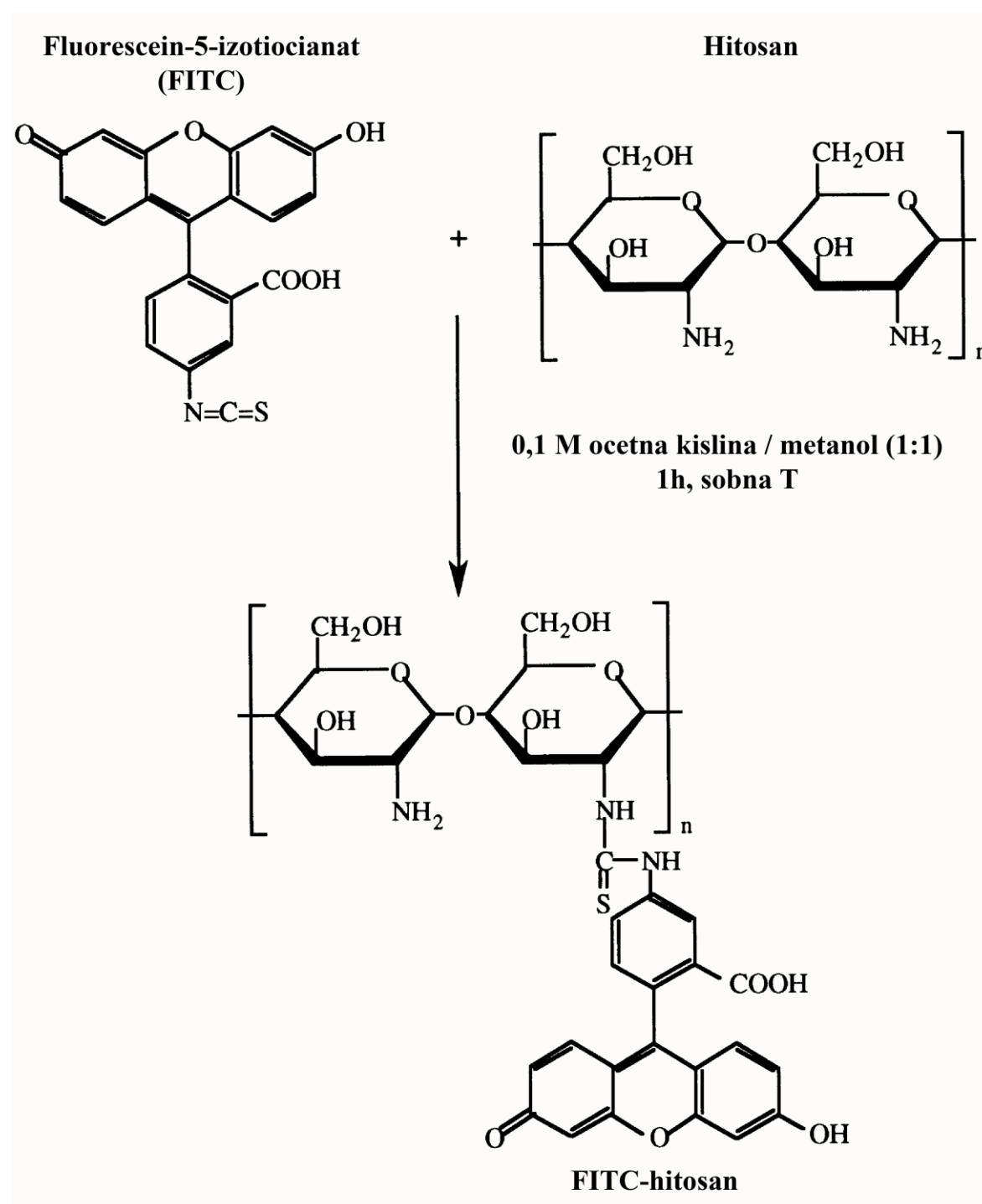
Pripravili smo 0,05% disperzijo hitosana v raztopini moksifloksacina ($\gamma = 1,6 \text{ g/L}$). Pripravljeno disperzijo smo pred poskusom 10-krat redčili in njen pH z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali na 4,5.

0,005% (ut/vol) disperzija FITC-hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT-FITC 0,005)

Pripravili smo 0,05% disperzijo FITC-hitosana v raztopini moksifloksacina ($\gamma = 1,6 \text{ g/L}$). Pripravljeno disperzijo smo pred poskusom 10-krat redčili in njen pH z 1 M NaOH in 1 M HCl uravnali na 4,5.

3.2.2. PRIPRAVA FLUORESCENTNO OZNAČENEGA HITOSANA

Pri vezavi fluorofora na hitosan je aktivna izotiocianatna skupina fluorescein-5-izotiocianata reagirala s primarno aminsko skupino D-glukozaminskega ostanka hitosana. Med njima se je tvorila kovalentna vez. Shema reakcije je predstavljena na sliki 9 (27).



Slika 9: Reakcija med FITC-em in hitosanom (27).

V 100 mL bučko smo natehtali 1 g hitosana in z 0,1 M ocetno kislino dopolnili do oznake. Pripravljeno raztopino smo čez noč mešali z elektromagnetnim mešalom, da se je ves hitosan raztopil. Disperzijo smo zjutraj prelili v čašo in ji ob konstantnem mešanju počasi dodali 100 mL brezvodnega metanola. V 50 mL bučko smo natehtali 100 mg FITC-a in z brezvodnim metanolom dopolnili do oznake. Bučko smo ovili v folijo in s tem preprečili bledenje fluorescence. Pripravljeno raztopino FITC-a smo ob mešanju počasi dodali v čašo z raztopino hitosana, ki smo jo prav tako ovili v folijo. Pripravljeno zmes smo mešali 3 ure v temi pri sobni temperaturi. Nato smo FITC-hitosan oborili z uporabo 0,2 M raztopine NaOH in dvigom pH na približno 10. Oborino, ki je bila sicer gelaste strukture, smo spirali z demineralizirano vodo (kateri smo pH uravnali na 8-9) in izolirali z uporabo presesalne buče. Postopek smo ponavljali dokler ni bilo več vidne fluorescence v matičnici (približno 6-krat). Da bi še bolj odstranili nevezan FITC smo oborino prenesli v celulozne membrane za dializo in dializirali v 2 L vode (v temi) 3 dni, vodo smo zamenjali vsakih 24 ur (29). Postopek priprave označenega hitosana smo zaradi potrebe po večji količini polimera ponovili dvakrat.

Učinkovitost spiranja nevezanega FITC-a smo preverili spektrofotometrično z merjenjem fluorescence v vodi za dializo. Pripravili smo standardne raztopine FITC-a v demineralizirani vodi. Najprej smo pripravili osnovno raztopino (C0) iz nje smo z redčenjem z vodo dobili štiri standardne raztopine. Postopek priprave standardnih raztopin je prikazan v preglednici II. Na črno mikrotitrsko ploščico smo nanesli po 100 µL vsakega standarda in 100 µL vzorca, ki ga je predstavljala voda za dializo, vsem smo dodali tudi 100 µL 0,025 M NaOH. Fluoresenco smo merili na spektrofotometru Tecan Safire 2 pri valovni dolžini eksitacije 494 nm in emisije 518 nm. Fluoresanca našega vzorca je bila manjša od standarda z najnižjo koncentracijo FITC-a. Iz tega smo sklepali, da je v oborini FITC-hitosana ostalo zanemarljivo malo nevezanega FITC-a.

Preglednica II: Postopek priprave standardnih raztopin FITC-a pri preverjanju učinkovitosti spiranja nevezanega FITC-a.

Osnovna raztopina	Faktor redčenja	Oznaka standarda	Koncentracija (mg/mL)
CO 0,5 mg FITC / 100 mL H ₂ O $\gamma = 5,0 \cdot 10^{-3}$	100	C1	$5,0 \cdot 10^{-5}$
	200	C2	$2,5 \cdot 10^{-5}$
	500	C3	$1,0 \cdot 10^{-5}$
	1000	C4	$5,0 \cdot 10^{-6}$

Po končani dializi smo oborino izolirali. Označen hitosan smo nato raztopili v 0,05 mM HCl (porabili smo samo toliko HCl, da se je ves FITC-hitosan raztopil), zamrznili in liofilizirali (29).

Pripravljenemu FITC-hitosanu smo spektorfotometrično določili učinkovitost vezave FITC-a na hitosan. Natehtali smo 2,5 mg FITC-hitosana, ga raztopili v 100 mL 0,5 mM HCl in razredčili z demineralizirano vodo (kateri smo pH uravnali na približno 8) do koncentracije vzorca 0,5 µg/mL. Pripravili smo standarde FITC-a v koncentracijskem območju od 0,0005 do 0,01 µg/mL. Postopek priprave standardov je prikazan v preglednici III.

Preglednica III: Postopek priprave standardnih raztopin FITC-a pri določanju učinkovitosti vezave FITC-a na hitosan.

Osnovna raztopina	Faktor redčenja	Oznaka standarda	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)
FO 5 mg FITC / 50 mL MeOH $\gamma = 0,1 \text{ mg/L}$	10.000	F1	$1,0 \cdot 10^{-2}$
	20.000	F2	$5,0 \cdot 10^{-3}$
	50.000	F3	$2,0 \cdot 10^{-3}$
	100.000	F4	$1,0 \cdot 10^{-3}$
	200.000	F5	$5,0 \cdot 10^{-4}$

Na črno mikrotitrsko ploščico smo nanesli po 100 µL vsakega standarda in 100 µL vzorca. Vsem smo dodali tudi 100 µL 0,025 M NaOH. Fluorescenco smo merili na spektrofotometru Tecan Safire 2 pri valovni dolžini ekscitacije 494 nm in emisiji 518 nm. Iz koncentracij standardov in odčitanih fluorescenc smo narisali umeritveno premico. Pearsonov koeficient je bil večji od 0,995, kar je pomenilo, da je bila naša metoda linearna v območju merjenih koncentracij. Enačbo umeritvene premice smo določili z metodo linearne regresije.

Z uporabo enačbe umeritvene premice smo določili koncentracijo FITC-a v našem vzorcu. Po spodnji enačbi (enačba 1) smo izračunali učinkovitost vezave FITC-a na hitosan in jo izrazili v µg FITC-a na 1 mg hitosana (28).

$$\text{učinkovitost vezave} = \frac{\text{konzc FITC}}{\text{konzc FITC-hitosan}} \quad [1]$$

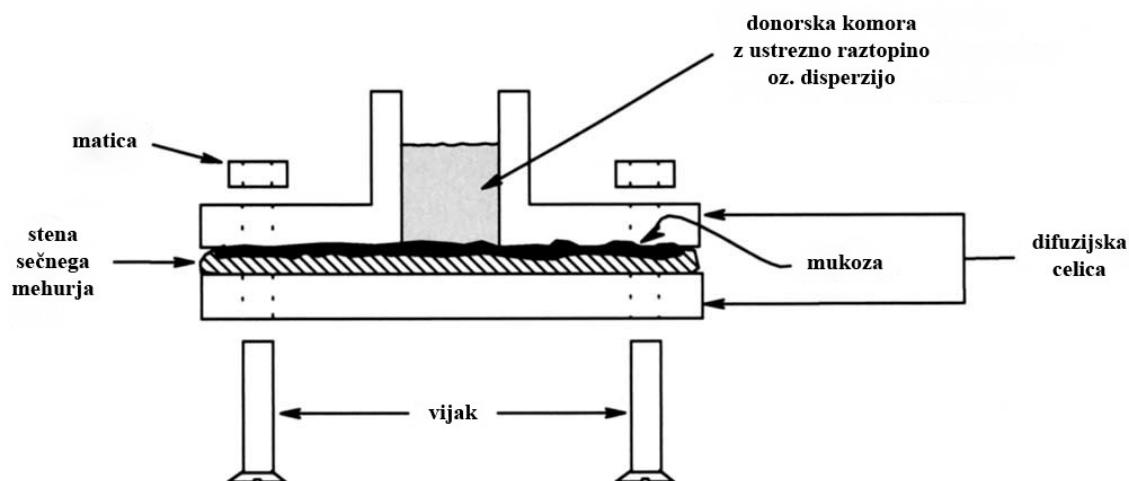
konzc FITC ... koncentracija FITC-a v vzorcu, določena z uporabo enačbe umeritvene premice ($\mu\text{g/mL}$)

konzc FITC-hitosan ... koncentracija vzorca ($\mu\text{g/mL}$)

3.2.3. PRIPRAVA TKIVA ZA POSKUS

Iz klavnice smo, po zakolu prašiča, tkivo prenesli v laboratorij v posodi napolnjeni s PBS-om ($\text{pH} = 7,4$) pri sobni temperaturi. Vse poskuse smo izvedli v roku 4 ur po zakolu.

V laboratoriju smo sečni mehur dali v petrijevko in ga prelili s PBS-om ($\text{pH} = 7,4$, sobna temperatura), tako da je bilo tkivo ves čas potopljeno v pufer. Mehurju smo odrezali apeks, fundus in odvečno tkivo. Korpus mehurja smo razrezali po dolžini in razprli, nato pa izrezali koščke (velikosti približno $25 \times 25 \text{ mm}$) in vsak košček vpeli v difuzijsko celico s sluznično stranjo navzgor (slika 10).



Slika 10: Difuzijska celica (36).

V donorsko komoro smo odpipetirali 10 mL v prvi seriji in 8 mL preiskovane raztopine oz. disperzije v drugi seriji poskusov, katere pH smo predhodno uravnali na $4,5$. Površina stika sluznice z raztopino je bila $4,5 \text{ cm}^2$. Vse poskuse smo izvedli pri sobni temperaturi.

3.2.4. IZVEDBA PERMEABILNOSTNIH ŠTUDIJ

V prvi seriji poskusov smo iz korpusa mehurja izrezali po tri koščke tkiva in v donorsko komoro odpipetirali po 10 mL raztopine in disperzij, ki so navedene v preglednici IV. Poskuse smo izvedli na 5 mehurjih.

Preglednica IV: Raztopine in disperzije, ki smo jih nanesli na tkivo v prvi seriji poskusov.

Košček tkiva	Preiskovana raztopina oz. disperzija
1	MOX
2	MOX + HIT 0,05
3	MOX + HIT-FITC 0,05

V drugi seriji smo iz korpusa mehurja izrezali po pet koščkov tkiva in nanesli po 8 mL raztopine in disperzij, ki so navedene v preglednici V. Tudi v tej seriji smo poskuse izvedli na 5 mehurjih.

Preglednica V: Raztopine in disperzije, ki smo jih nanesli na tkivo v drugi seriji poskusov.

Košček tkiva	Preiskovana raztopina oz. disperzija
1	MOX
2	MOX + HIT 0,25
3	MOX + HIT-FITC 0,25
4	MOX + HIT 0,005
5	MOX + HIT-FITC 0,005

Preiskovano raztopino oz. disperzijo smo po 60 min odlili, tkivo pa trikrat sprali s PB (pH = 4,5). Po spiranju smo difuzijske celice razstavili in izrezali tkivo, ki je bilo v stiku z naneseno raztopino oz. disperzijo. Tkivo smo dali med dve kovinski ploščici. Razmik med njima smo določili glede na debelino tkiva, tako da sta se tkiva dotikalni, nista pa ga preveč stisnili. Nato smo tkivo na hitro zamrznili v tekočem dušiku, zamrznjene koščke pa še enkrat obrezali z vseh strani. Do analize smo jih hranili v ustrezno označenih epruvetah v zamrzovalniku pri -20°C.

3.2.5. DOLOČANJE KONCENTRACIJE MOKSIFLOKSACINA V TKIVU (HPLC ANALIZA)

Priprava vzorcev:

Zamrznjene koščke tkiva smo z luminalno stranjo navzgor s pomočjo raztopine za zamrzovanje tkiva pritrdili na kovinski nosilec v kriostatu in jih razrezali pri -20°C. Tkivo smo rezali na sluznični strani vzporedno z luminalno površino. Rezine so bile debele 20 µm (8). Po tri zaporedne rezine smo prenesli v 1,5 mL epice in jih združili v en vzorec, ki je predstavljal 60 µm globine tkiva. Rezali smo do globine 1,2 mm in iz enega koščka mehurja dobili 20 vzorcev. Maso tkiva v posameznem vzorcu smo določili z diferenčnim tehtanjem. Za ekstrakcijo smo k vsakemu vzorcu dodali 500 µL mobilne faze in mešali na mešalniku dokler ni vse tkivo potonilo v mobilno fazo. Vse epice skupaj smo nato prestavili v plastično stojalo, ki smo ga vpeli na stresalnik in pustili stresati 2 uri pri 225 stresljajih/min. Po koncu stresanja smo vzorce še centrifugirali 20 min pri 13000 rpm (16000 x g) in 10°C. Iz vsake epice smo nato v inserte odpipetirali po 120 µL supernatanta, ki je bil naš vzorec za analizo. Inserte smo vstavili v viale.

Določanje koncentracije moksifloksacina v vzorcih s HPLC analizo:

Pred merjenjem smo HPLC sistem vsaj 30 minut spirali z mobilno fazo, ki smo jo predhodno razplinili na ultrazvočni kadički. Pretok mobilne faze je bil 1 mL/min, volumen z avtomatskim vzorčevalnikom injiciranega vzorca pa 50 µL v prvi seriji in 30 µL v drugi seriji. Koncentracijo moksifloksacina smo določali s fluorescentnim detektorjem pri valovni dolžini ekskcitacije 296 nm in emisije 500 nm. Kromatograme smo snemali 5 minut, retencijski čas moksifloksacina je bil približno 3 minute (8).

Pred vsako analizo smo pripravili sveže raztopine standardov v mobilni fazi. Najprej smo pripravili dva osnovna standarda iz dveh različnih nateht moksifloksacina, nato pa smo z redčenjem le-teh z mobilno fazo dobili šest standardnih raztopin. Postopek priprave standardnih raztopin v prvi seriji poskusov je prikazan v preglednici VI, v drugi seriji pa v preglednici VII.

Preglednica VI: Priprava standardnih raztopin moksifloksacina v mobilni fazi v prvi seriji poskusov.

Osnovni raztopini	Faktor redčenja	Oznaka standarda	Koncentracija (mg/L)
OS 1 4 mg MOX / 25 mL MF $\gamma = 160 \text{ mg/L}$	10	S6	16
	20	S4	8
	100	S2	1,6
OS 2 5 mg MOX / 50 mL MF $\gamma = 100 \text{ mg/L}$	10	S5	10
	20	S3	5
	250	S1	0,4

Preglednica VII: Priprava standardnih raztopin moksifloksacina v mobilni fazi v drugi seriji poskusov.

Osnovni raztopini	Faktor redčenja	Oznaka standarda	Koncentracija (mg/L)
OS 1 8 mg MOX / 25 mL MF $\gamma = 320 \text{ mg/mL}$	20	S5	16
	100	S3	3,2
	1000	S1	0,32
OS 2 10 mg MOX / 50 mL MF $\gamma = 200 \text{ mg/mL}$	10	S6	20
	20	S4	10
	250	S2	0,8

Standarde po naraščajoči koncentraciji smo analizirali pred in po analizi vsake serije vzorcev. Na vsakih 10 vzorcev smo dodatno injicirali standardno raztopino S4 (sredinska koncentracija standardov) in izračunali koeficient variacije, ki je bil v vseh primerih manjši od 2 %. Iz tega smo sklepali, da je bila naša metoda dobro ponovljiva.

Iz koncentracij standardov in površin vrhov v HPLC kromatogramu smo narisali umeritveno premico. Enačbo umeritvene premice smo določili z metodo linearne regresije. Pearsonov koeficient je bil večji od 0,995, kar pomeni, da je bila naša metoda linearna v območju merjenih koncentracij.

Koncentracije moksifloksacina v posameznem vzorcu smo izračunali iz enačbe umeritvene premice. Tkivne koncentracije učinkovine na določeni globini tkiva smo izračunali po enačbi 2.

$$c_t = \frac{c \cdot V}{m_t} [2]$$

c_t ... tkivna koncentracija moksifloksacina (ng moksifloksacina/mg tkiva)

c ... izračunana koncentracija moksifloksacina v posameznem vzorcu (mg/L)

V ... volumen mobilne faze, ki smo ga uporabili za ekstrakcijo (500 µL)

m_t ... masa posameznega vzorca (mg)

Celotno (kumulativno) količino moksifloksacina, ki je prešel v posamezen košček tkiva, smo izračunali po enačbi 3.

$$c_k = \sum \frac{c \cdot V}{m_t} [3]$$

c_k ... celotna količina moskifloksacina v vseh 20 vzorcih (ng moksifloksacina/mg tkiva)

c ... izračunana koncentracija moksifloksacina v posameznem vzorcu (mg/L)

V ... volumen mobilne faze, ki smo ga uporabili za ekstrakcijo (µL)

m_t ... masa tkiva posameznega vzorca (mg)

3.2.6. STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Rezultate, ki smo jih dobili z eksperimentalnim delom, smo statistično obdelali s pomočjo programa SPSS 19.0 za Windows, Microsoft Corporation, ZDA. Za analizo rezultatov znotraj posamezne serije poskusov smo uporabili ANOVA test za odvisne vzorce ter post hoc (Bonferroni) test. Za analizo rezultatov, pridobljenih v obeh serijah poskusov pa smo najprej uporabili Levenov test homogenosti varianc, nato pa še univariatno analizo varianc. Pri dvostranski stopnji tveganja $\alpha = 0,05$, smo razlike sprejeli kot statistično značilne, ko je bil $p < 0,05$.

3.2.7. SLIKANJE S FLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM

Za slikanje s fluorescenčnim mikroskopom smo uporabili raztopino FITC-a in disperzije vseh treh koncentracij FITC-hitosana (0,005%, 0,05% in 0,25% (ut/vol)) v pufru s pH vrednostjo 4,5. Koncentracija FITC-a v kontrolni raztopini je bila približno dvakrat večja kot določena povprečna količina FITC-a, ki se je vezala na hitosan pri najvišji koncentraciji disperzije FITC-hitosana (0,25% (ut/vol)). Pripravljeno raztopino in disperzije smo zavili v aluminijasto folijo in jih do samega poskusa hranili v temi, da smo

preprečili izpostavljanje fluorofora svetlobi. Tkivo smo pripravili na enak način kot pri izvedbi permeabilnostnih študij. Poskus smo izvedli na dveh mehurjih, iz vsakega smo izrezali štiri koščke. Difuzijske celice smo med samim poskusom prav tako pokrili s folijo. Po 60 minutah smo tkivo trikrat sprali s PB. Po spiranju smo difuzijske celice razstavili in izrezali tkivo, ki je bilo v stiku z naneseno raztopino oz. disperzijo. Koščke tkiva smo nato prečno rezali na pol in eno polovico na hitro zamrznili s tekočim dušikom. Nezmrzljeno polovico smo poslikali z vrha, da smo dobili sliko površine tkiva. Iz druge polovice smo izrezali prečno rezino in posneli sliko prečnega prereza. Na mikroskopu smo uporabili filter, ki prepušča svetlobo, ki ustreza ekscitacijski (450-480 nm) in emisijski (515 nm) (37) valovni dolžni FITC-a.

4. REZULTATI

4.1. PRIPRAVA FITC-HITOSANA

Postopek priprave označenega hitosana smo zaradi potreb po večji količini označenega polimera ponovili dvakrat. Učinkovitost vezave FITC-a na hitosan smo preverjali s fluorimetrijo po prvi in po drugi pripravi FITC-hitosana. V preglednici VIII so zbrane meritve standardov (za izračun enačbe umeritvene premice) in naših vzorcev pri prvi (meritve 1–4) in pri drugi pripravi FITC-hitosana (meritve 5–7).

Preglednica VIII: Izmerjene fluorescence v odvisnosti od koncentracije standardov FITC-a in FITC-hitosana (vzorec) pri prvi (meritve 1–4) in pri drugi (meritve 5–7) pripravi FITC-hitosana.

Konc. st. 1 ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	3	4	Konc. st. 2 ($\mu\text{g/mL}$)	5	6	7
0,01152	818,5	830,5	1084	1105,5	0,00519	347	360,5	343,5
0,00576	407	451	519,5	572,5	0,002076	164,5	161,5	164,5
0,002304	176	196,5	209	264	0,001038	83,5	84	87,5
0,001152	172	100	171	138	0,000519	56	65	60
Konc. vz. 1 ($\mu\text{g/ml}$)					Konc. vz. 2 ($\mu\text{g/mL}$)			
0,554	137	160,5	162,5	170	0,49	63,5	66	73,5

V preglednici IX so zbrani rezultati določanja učinkovitosti vezave pri prvi in drugi pripravi FITC-hitosana, izračunani z uporabo enačbe umeritvene premice in enačbe 1.

Preglednica IX: Določene vrednosti učinkovitosti vezave FITC-a na hitosan, izražene v $\mu\text{g FITC/mg hitosana}$.

Prva priprava	Druga priprava
2,743	1,513
3,572	1,529
2,875	1,765
2,786	

Učinkovitost vezave je bila v območju 1,513–3,572 $\mu\text{g FITC/mg hitosana}$. Povprečna učinkovitost vezave je znašala 2,398 $\mu\text{g FITC/mg hitosana}$.

4.2. PREHAJANJE MOKSIFLOKSACINA V STENO SEČNEGA MEHURJA

4.2.1. PRVA SERIJA POSKUSOV

V prvi seriji smo na tkivo aplicirali:

- raztopino moksifloksacina (MOX),
- 0,05% (ut/vol) disperzijo hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT 0,05),
- 0,05% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT-FITC 0,05).

Koncentracija moskifloksacina je bila enaka v kontrolni raztopini moksifloksacina in v obeh uporabljenih disperzijah.

V preglednicah X-XII so podane mase tkiva (mg), tkivne koncentracije moksifloksacina izražene v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini posameznega koščka tkiva v prvi seriji poskusov.

Preglednica XIII prikazuje povprečne tkivne koncentracije moksifloksacina (c_p) (ng moksifloksacina/mg tkiva) na posamezni globini stene sečnega mehurja in njihove standardne deviacije ($n = 5$) za prvo serijo poskusov.

Preglednica XIV prikazuje celotno (kumulativno) količino moksifloksacina (c_k), ki je prešel v posamezen košček tkiva (ng moksifloksacina/mg tkiva) v prvi seriji poskusov.

Preglednica X: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji kontrolne raztopine moksifloksacina v prvi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (μm)	I			II			III			IV			V		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	1,43	0,60	209,64	2,20	0,94	213,99	4,06	7,27	895,57	4,57	8,24	901,30	4,00	2,17	271,08
90	2,53	0,56	110,03	3,32	1,16	175,20	6,15	10,20	829,23	4,81	5,82	604,97	5,17	1,98	191,89
150	2,96	0,67	113,07	4,96	1,61	162,67	5,42	7,84	723,61	4,48	4,59	511,74	6,14	1,66	134,99
210	4,18	1,18	140,61	3,81	1,06	139,36	5,72	7,68	671,09	5,17	4,90	474,25	5,96	1,53	128,47
270	5,40	1,55	143,90	5,92	1,60	135,40	5,62	6,91	615,20	5,63	4,86	431,91	6,59	1,45	110,34
330	4,82	1,40	145,20	6,16	1,52	123,56	5,61	6,24	556,05	6,05	4,69	387,29	6,73	1,45	108,05
390	2,91	0,79	135,82	6,13	1,73	141,05	5,47	5,97	545,68	5,88	4,49	381,57	6,69	1,33	99,15
450	5,53	1,89	170,78	6,17	1,23	99,94	4,67	4,50	481,27	6,10	4,40	361,00	6,89	1,18	85,63
510	4,99	1,76	176,60	6,23	1,02	82,06	5,61	5,03	448,75	6,52	4,47	342,81	6,79	1,09	79,93
570	7,93	2,78	175,31	6,16	0,85	69,39	5,35	4,22	394,27	6,65	4,33	325,36	7,12	0,99	69,54
630	6,86	2,35	170,93	6,03	0,72	59,56	5,35	4,50	420,88	6,74	4,19	310,58	7,23	0,89	61,58
690	7,25	2,19	150,83	5,76	0,61	53,18	5,25	3,58	340,80	7,00	3,90	278,73	7,33	0,75	50,89
750	7,40	1,97	133,06	5,96	0,51	43,15	5,15	2,95	286,71	6,65	3,54	265,88	6,90	0,72	52,37
810	7,46	1,77	118,55	6,07	0,44	36,00	5,20	2,54	244,34	6,89	3,30	239,71	7,13	0,62	43,79
870	7,53	1,60	106,07	6,11	0,37	29,96	5,31	2,30	216,47	6,92	3,11	224,74	7,48	0,55	36,84
930	7,13	1,38	96,75	3,70	0,16	21,08	5,37	2,05	190,73	3,42	1,50	219,14	7,52	0,46	30,81
990	7,41	1,17	79,10	6,27	0,23	18,35	5,40	1,72	159,14	7,06	2,49	176,04	6,71	0,36	26,76
1050	7,20	0,89	61,91	5,80	0,33	28,12	5,16	1,58	153,45	7,15	2,22	155,24	7,02	0,30	21,16
1110	7,39	0,80	54,16	6,06	0,15	12,65	5,53	1,30	117,68	6,65	1,93	145,18	7,15	0,25	17,76
1170	7,26	0,65	44,43	5,85	0,08	6,86	5,39	1,08	100,04	7,30	1,73	118,31	7,64	0,24	15,68

Preglednica XI: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji 0,05% (ut/vol) disperzije hitosana v prvi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (μm)	I			II			III			IV			V		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	1,74	3,47	996,52	1,48	8,12	2742,43	1,69	4,86	1438,94	3,73	7,09	950,02	2,34	4,83	1033,02
90	2,18	4,43	1016,02	5,68	15,67	1379,53	2,76	7,49	1357,43	3,17	5,34	842,22	3,15	4,65	737,87
150	2,83	6,47	1142,93	5,43	13,02	1199,32	3,41	8,66	1269,44	2,56	3,86	754,71	4,23	5,17	610,68
210	4,17	7,98	956,68	6,82	14,30	1048,34	3,41	7,63	1118,19	3,70	5,33	719,79	4,54	4,93	542,42
270	4,19	7,43	886,68	6,15	12,12	985,21	4,30	8,79	1022,11	4,58	5,87	640,78	5,69	5,66	497,02
330	4,45	6,94	779,97	6,17	11,64	943,57	4,60	8,60	934,29	4,66	6,11	655,13	6,05	5,78	477,57
390	4,89	7,02	717,30	5,40	10,40	963,04	5,07	8,73	860,60	5,59	6,68	597,70	6,22	5,83	469,01
450	4,86	6,63	682,18	5,72	9,69	847,38	4,90	7,96	811,76	5,77	6,58	569,83	6,40	5,28	412,65
510	4,92	6,27	636,78	6,19	8,94	722,05	4,95	7,32	739,36	5,66	6,33	559,01	5,84	4,73	405,24
570	5,00	5,82	582,43	6,10	7,15	586,30	5,07	6,91	681,27	6,08	6,37	523,59	5,29	3,97	375,50
630	4,94	5,13	519,71	6,06	6,11	504,19	5,12	6,55	639,49	4,77	5,06	530,80	5,90	3,73	316,18
690	5,01	4,50	449,49	6,06	4,61	380,58	5,41	5,91	545,85	6,06	6,28	518,33	6,89	3,69	267,95
750	3,71	2,85	383,70	5,86	3,88	330,93	5,27	5,32	505,20	6,39	6,09	476,24	6,24	3,14	251,84
810	4,56	3,19	350,22	6,18	3,17	256,82	5,33	4,67	438,48	6,09	5,82	478,14	5,49	2,47	224,97
870	4,72	2,66	281,65	5,97	2,71	226,65	5,35	4,10	383,24	5,16	4,68	453,11	5,95	2,26	189,67
930	5,07	2,32	228,78	6,02	2,18	181,12	5,27	3,51	332,88	6,92	5,85	422,47	6,65	2,22	166,58
990	4,62	1,95	210,89	6,07	1,79	147,21	5,18	3,09	298,39	5,50	4,46	405,39	6,44	1,89	146,54
1050	4,95	1,76	178,24	6,54	1,44	109,99	4,97	2,51	252,99	7,12	4,87	342,07	5,63	1,38	122,85
1110	4,91	1,47	149,75	6,05	1,07	88,33	5,26	2,09	198,55	7,20	4,61	320,30	6,01	1,60	133,19
1170	4,83	1,22	125,90	6,08	0,92	75,57	5,36	1,82	170,13	5,11	2,90	283,59	6,53	1,11	84,91

Preglednica XII: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji 0,05% (ut/vol) disperzije FITC-hitosana v prvi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (μm)	I			II			III			IV			V		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	0,81	3,36	2073,76	1,15	4,46	1938,54	3,15	10,40	1651,26	3,05	6,09	997,64	1,70	2,57	754,98
90	1,94	5,51	1420,84	3,38	9,99	1477,56	3,75	11,36	1514,94	2,85	5,18	909,11	3,26	4,13	633,33
150	2,81	6,36	1131,02	5,08	13,19	1298,65	4,56	11,34	1243,29	4,25	7,51	883,42	2,82	2,62	463,84
210	3,88	8,30	1070,10	5,66	13,60	1201,32	4,44	10,52	1185,14	3,85	5,97	774,69	3,92	3,83	488,13
270	4,01	7,78	970,59	5,63	12,61	1120,03	5,83	12,15	1042,19	4,50	6,62	736,00	4,73	4,46	471,18
330	4,19	7,56	901,76	5,95	12,23	1027,43	5,60	10,90	973,34	5,71	7,52	658,90	5,16	4,37	423,64
390	6,35	10,45	822,79	5,87	11,98	1020,03	5,98	10,58	884,61	5,99	7,43	620,31	4,08	3,80	465,84
450	4,91	7,95	809,21	5,74	11,93	1039,61	5,37	9,31	867,17	4,81	6,10	634,54	5,93	4,78	403,17
510	5,01	7,90	788,31	5,06	9,79	967,05	5,71	9,13	799,49	5,71	6,49	568,27	5,13	4,15	404,90
570	5,10	7,87	771,24	5,93	10,15	856,01	5,56	8,57	771,02	6,02	6,84	567,72	5,55	4,68	421,65
630	5,44	7,81	717,59	5,65	9,07	803,05	5,99	8,00	667,76	6,34	6,96	549,18	5,63	4,25	377,60
690	4,13	5,28	639,69	5,99	8,01	668,87	6,16	7,36	597,49	6,08	6,51	535,41	5,85	4,19	358,23
750	5,56	6,81	612,13	5,88	6,68	568,28	6,07	6,59	542,82	6,80	6,92	509,06	5,48	3,50	319,38
810	3,64	3,66	502,87	5,97	5,99	501,27	6,20	5,84	470,78	6,72	6,45	479,79	5,94	3,45	290,00
870	3,81	3,18	417,14	5,70	4,68	410,19	6,05	5,08	419,75	7,08	6,39	451,56	6,19	3,05	246,48
930	5,67	4,43	390,78	5,75	3,91	339,73	6,27	4,30	342,77	6,93	5,98	431,23	5,41	2,52	233,33
990	5,72	3,93	343,31	5,86	3,33	284,48	6,35	3,76	296,07	6,45	5,22	404,83	6,34	2,57	202,86
1050	6,04	4,08	337,95	6,10	2,90	237,97	6,20	3,14	252,93	7,07	5,12	362,13	5,95	2,31	194,30
1110	4,29	2,47	287,33	5,92	2,51	212,09	6,17	2,66	215,87	6,54	4,35	332,91	6,07	2,00	164,56
1170	5,14	2,75	267,74	6,07	1,85	152,01	6,04	2,34	193,31	6,47	3,85	297,54	6,12	1,83	149,45

Preglednica XIII: Povprečne tkivne koncentracije moksifloksacina (c_p) (ng moksifloksacina/mg tkiva) na posamezni globini stene sečnega mehurja in njihove standardne deviacije ($n = 5$) za prvo serijo poskusov.

Globina (μm)	MOX		MOX+HIT 0,05		MOX+HIT-FITC 0,05	
	c_p	st. dev.	c_p	st. dev.	c_p	st. dev.
30	498,31	366,06	1432,19	758,03	1483,24	581,04
90	382,26	317,26	1066,61	293,04	1191,16	396,97
150	329,22	274,34	995,42	293,42	1004,04	341,51
210	310,76	249,06	877,09	240,07	943,88	306,90
270	287,35	225,49	806,36	228,08	868,00	264,23
330	264,03	199,16	758,10	196,99	797,01	251,81
390	260,65	194,83	721,53	197,98	762,72	219,71
450	239,72	173,99	664,76	178,77	750,74	242,24
510	226,03	164,13	612,49	136,47	705,60	219,83
570	206,77	148,25	549,82	112,64	677,53	178,12
630	204,70	158,61	502,07	116,81	623,04	165,11
690	174,89	131,41	432,44	112,11	559,94	123,41
750	156,23	115,28	389,58	104,07	510,33	113,18
810	136,48	101,61	349,73	110,18	448,95	89,91
870	122,82	94,15	306,86	109,58	389,02	81,26
930	111,70	90,51	266,37	108,89	347,57	74,16
990	91,88	73,18	241,68	110,62	306,31	74,77
1050	83,98	66,06	201,23	96,84	277,06	70,54
1110	69,49	59,57	178,02	88,77	242,55	66,88
1170	57,06	49,98	148,02	84,54	212,01	67,61

Preglednica XIV: Celotna količina moksifloksacina (c_k), ki je prešel v posamezen košček tkiva v prvi seriji poskusov.

Mehur	c_k (ng MOX/mg tkiva)		
	MOX	MOX+HIT 0,05	MOX+HIT-FITC 0,05
I	2536,75	11275,81	15276,15
II	1651,52	13718,56	16124,20
III	8390,94	13998,58	14932,00
IV	6855,77	11043,24	11704,23
V	1636,70	7465,66	7466,85

4.2.2. DRUGA SERIJA POSKUSOV

V drugi seriji smo na tkivo aplicirali:

- raztopino moksifloksacina (MOX),
- 0,25% (ut/vol) disperzijo hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT 0,25),
- 0,25% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT-FITC 0,25),
- 0,005% (ut/vol) disperzijo hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT 0,005),
- 0,005% (ut/vol) disperzijo FITC-hitosana v raztopini moksifloksacina (MOX + HIT-FITC 0,005).

Koncentracija moskifloksacina je bila enaka v kontrolni raztopini moksifloksacina in v vseh uporabljenih disperzijah.

V preglednicah XV-XVII in XVIII-XX so podane mase tkiva (mg), tkivne koncentracije moksifloksacina, izražene v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini posameznega koščka tkiva v drugi seriji poskusov po uporabi 0,25 % (ut/vol) oziroma 0,005% (ut/vol) disperzij polimera.

Preglednici XXI in XXII prikazujeta povprečne tkivne koncentracije moksifloksacina (c_p) (ng moksifloksacina/mg tkiva) na posamezni globini stene sečnega mehurja in njihove standardne deviacije ($n = 5$) za drugo serijo poskusov po nanosu 0,25% (ut/vol) oziroma 0,005% (ut/vol) disperzij polimera.

Preglednici XXIII in XXIV prikazujeta celotno (kumulativno) količino moksifloksacina (c_k), ki je prešel v posamezen košček tkiva (ng moksifloksacina/mg tkiva) v drugi seriji poskusov po aplikaciji 0,25% (ut/vol) oziroma 0,005% (ut/vol) disperzij polimera.

Preglednica XV: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji kontrolne raztopine moksifloksacina v drugi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (µm)	VI			VII			VIII			IX			X		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	4,45	4,36	489,64	2,69	2,54	472,67	1,83	2,40	655,88	3,44	1,51	219,93	4,31	2,31	268,49
90	2,24	2,03	452,93	3,77	3,35	443,66	3,81	4,40	577,72	4,35	1,83	209,93	4,75	2,30	241,68
150	3,82	3,15	411,71	5,16	4,48	434,54	2,97	3,29	554,04	4,92	2,32	236,09	7,32	2,67	182,36
210	4,32	3,30	382,22	6,33	4,96	391,44	4,32	4,39	507,94	4,98	2,20	221,28	7,32	2,30	157,00
270	5,88	4,56	387,75	6,73	4,51	335,41	5,64	5,36	475,08	7,02	2,72	193,83	7,84	2,22	141,84
330	6,64	4,32	325,62	7,31	4,63	316,97	7,78	6,66	428,09	7,54	2,77	183,56	7,44	2,02	135,59
390	5,30	3,19	301,16	7,55	4,77	315,78	8,15	6,03	369,81	8,17	2,77	169,46	8,30	2,00	120,63
450	6,88	3,91	284,19	7,22	4,37	302,64	7,86	5,17	328,75	8,03	2,65	164,89	7,75	1,71	110,53
510	5,64	3,02	267,78	7,33	4,16	283,96	6,66	4,13	310,29	8,83	2,57	145,28	8,61	1,57	91,19
570	6,70	3,31	246,74	7,35	3,88	263,83	8,67	4,83	278,55	8,92	2,35	131,71	8,25	1,27	77,12
630	7,41	3,42	230,84	7,56	3,61	238,81	8,64	4,60	266,20	8,60	2,34	136,03	8,29	0,99	60,01
690	7,48	3,20	213,65	7,14	3,05	213,72	8,46	4,11	243,12	8,73	2,09	119,64	8,53	0,83	48,76
750	5,80	2,20	189,66	7,19	2,73	189,64	7,27	3,46	237,96	8,55	1,84	107,49	7,87	0,63	39,89
810	6,60	2,23	169,16	7,20	2,33	161,90	7,63	3,17	207,87	9,11	1,84	100,79	8,26	0,48	29,35
870	7,29	2,34	160,59	7,24	1,98	136,72	8,40	3,16	188,06	9,48	1,63	85,91	8,13	0,39	23,81
930	6,27	1,85	147,74	7,26	1,72	118,17	8,15	2,83	173,36	9,63	1,37	71,21	7,97	0,31	19,41
990	4,66	1,27	136,55	7,00	1,48	105,36	6,51	2,02	154,77	9,73	1,24	63,67	7,84	0,24	15,30
1050	7,03	1,60	113,67	7,08	1,27	89,78	8,79	2,44	138,62	8,49	0,95	55,69	7,81	0,15	9,53
1110	5,47	1,16	105,63	7,15	1,11	77,41	8,51	2,18	128,27	7,95	0,87	54,86	7,80	0,11	7,34
1170	4,98	0,88	88,28	7,79	1,38	88,88	8,82	2,10	119,00	9,24	0,78	42,24	8,38	0,10	5,99

Preglednica XVI: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji 0,25% (ut/vol) disperzije hitosana v drugi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (µm)	VI			VII			VIII			IX			X		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	2,53	5,51	1088,47	2,34	4,17	890,79	5,66	12,99	1147,42	3,43	6,26	912,62	3,86	6,62	857,67
90	2,76	4,99	903,58	4,14	7,99	964,57	4,84	11,22	1158,62	4,07	7,56	928,92	2,76	4,96	898,67
150	4,45	7,27	816,45	6,10	10,05	824,07	8,00	15,72	982,38	4,63	7,66	827,01	3,99	6,39	800,28
210	4,22	6,82	807,77	5,62	8,39	746,51	8,37	14,67	876,32	5,08	7,55	743,58	4,94	7,89	798,54
270	5,66	8,58	758,11	5,90	9,35	791,96	9,13	14,12	773,02	6,31	8,51	673,98	5,88	8,43	716,96
330	4,47	6,57	735,35	7,17	9,78	682,09	8,81	12,68	719,82	6,24	7,63	611,16	6,90	8,95	648,48
390	6,40	8,48	662,77	7,28	9,32	640,42	9,12	11,51	630,89	7,32	8,52	582,07	6,76	8,11	600,06
450	5,73	7,19	627,60	7,31	8,90	608,45	8,84	10,02	566,47	7,56	8,13	537,90	7,05	7,81	553,97
510	7,01	8,37	597,02	7,15	8,27	578,11	8,61	9,08	527,22	6,71	7,08	527,74	7,73	7,32	473,66
570	7,04	7,89	560,71	6,93	7,92	571,27	8,39	7,84	467,29	6,92	6,67	482,04	7,93	6,33	399,29
630	5,49	5,97	543,34	6,53	7,12	544,91	8,48	7,43	438,35	7,28	6,91	474,57	7,71	5,44	352,50
690	6,92	6,68	482,62	6,93	6,65	479,46	8,39	6,87	409,16	6,25	5,39	431,51	7,99	4,67	292,43
750	6,90	6,22	450,75	6,69	5,50	410,87	3,49	2,99	428,68	7,79	5,49	352,41	7,51	3,63	241,93
810	6,86	5,44	396,71	7,03	4,57	325,19	9,39	5,97	317,94	7,49	4,65	310,34	7,32	2,82	192,81
870	4,70	3,75	398,90	7,12	3,74	262,63	9,07	5,26	289,80	7,78	4,16	267,28	7,73	2,52	163,17
930	6,04	3,30	273,24	7,27	3,16	217,35	9,05	4,73	261,37	7,70	3,57	231,86	7,04	2,02	143,11
990	6,73	2,99	221,97	7,12	4,21	295,96	9,61	3,98	206,96	7,62	3,07	201,15	7,78	1,72	110,32
1050	6,54	2,54	194,34	6,44	1,95	151,77	9,36	3,35	179,07	7,38	2,59	175,18	8,02	1,36	84,76
1110	7,35	2,19	149,24	7,00	1,97	140,67	9,38	2,69	143,25	5,51	1,93	174,74	7,70	1,03	67,11
1170	6,53	1,69	129,73	7,63	1,45	94,97	9,85	2,13	108,06	7,39	1,81	122,39	7,75	0,89	57,23

Preglednica XVII: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji 0,25% (ut/vol) disperzije FITC-hitosana v drugi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (µm)	VI			VII			VIII			IX			X		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	2,59	5,68	1096,86	4,64	8,54	920,39	4,15	11,84	1426,13	3,34	6,29	941,46	3,45	5,88	851,51
90	2,86	4,70	821,35	6,77	12,09	893,09	5,28	12,91	1222,60	5,00	7,93	793,39	5,83	9,45	810,73
150	5,11	7,13	697,33	7,27	11,06	760,70	5,43	11,82	1088,15	6,16	7,57	614,77	6,61	8,80	665,92
210	5,95	8,15	685,02	7,85	11,50	732,32	7,10	12,86	905,56	6,65	7,56	568,15	6,97	8,51	610,53
270	6,18	7,81	632,05	8,18	11,12	679,96	7,30	11,78	807,08	6,89	7,12	516,79	7,56	8,65	572,18
330	7,21	8,59	595,78	7,24	9,80	676,92	7,78	11,07	711,62	7,82	7,40	473,08	7,42	7,99	538,57
390	7,25	7,88	543,77	5,48	7,00	638,49	7,64	9,95	651,22	7,83	7,23	461,51	7,83	8,18	522,49
450	7,60	7,26	477,49	8,64	10,28	594,65	7,67	8,98	585,69				7,86	7,57	481,41
510	6,35	6,34	499,38	6,76	7,70	569,42	7,01	7,44	530,58	8,17	6,78	414,87	8,50	7,47	439,26
570	7,67	7,05	459,80	8,36	8,18	489,39	7,29	6,71	460,36	8,37	6,63	396,29	7,92	6,08	383,91
630	7,96	6,21	390,14	7,82	6,70	428,68	5,58	4,38	392,64	7,99	6,25	390,84	6,65	4,82	362,48
690	7,63	4,89	320,15	7,27	5,46	375,43	7,13	5,13	359,73	7,48	5,66	378,33	7,23	4,70	325,14
750	7,59	4,29	282,45	7,11	4,34	305,51	6,20	3,69	297,85	8,12	5,73	352,61	6,52	3,77	289,18
810	6,69	3,20	239,52	7,10	4,15	292,25	7,62	4,21	275,99	7,53	4,45	295,30	7,66	3,57	233,10
870	8,11	3,14	193,44	8,35	3,70	221,27	7,47	3,58	239,43	3,73	1,71	229,86	7,96	3,26	204,51
930	7,68	2,60	169,51	8,66	3,21	185,30	7,66	2,95	192,27	7,84	3,45	220,17	7,96	2,67	167,75
990	7,92	2,19	138,06	8,34	2,68	160,55	8,51	3,58	210,17	7,30	2,60	178,18	8,01	2,21	137,84
1050	6,97	1,66	119,35	7,82	2,04	130,49	7,89	2,14	135,72	7,94	2,31	145,71	7,98	1,94	121,64
1110	7,73	1,47	95,25	7,95	1,92	120,67	6,72	1,49	110,84	8,11	2,00	123,44	7,62	1,57	103,31
1170	7,16	1,17	81,46	7,73	1,11	71,88	7,95	1,10	69,34	7,45	1,48	99,59	7,73	1,15	74,69

Preglednica XVIII: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji kontrolne raztopine moksifloksacina v drugi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (µm)	VII			VIII			IX			X			XI		
	m (mg)	c (mg/L)	c_t (ng/mg)												
30	2,69	2,54	472,67	1,83	2,40	655,88	3,44	1,51	219,93	4,31	2,31	268,49	3,73	3,44	460,74
90	3,77	3,35	443,66	3,81	4,40	577,72	4,35	1,83	209,93	4,75	2,30	241,68	8,33	6,34	380,85
150	5,16	4,48	434,54	2,97	3,29	554,04	4,92	2,32	236,09	7,32	2,67	182,36	6,84	4,05	295,98
210	6,33	4,96	391,44	4,32	4,39	507,94	4,98	2,20	221,28	7,32	2,30	157,00	7,59	4,05	266,47
270	6,73	4,51	335,41	5,64	5,36	475,08	7,02	2,72	193,83	7,84	2,22	141,84	7,61	3,54	232,68
330	7,31	4,63	316,97	7,78	6,66	428,09	7,54	2,77	183,56	7,44	2,02	135,59	7,66	3,19	208,44
390	7,55	4,77	315,78	8,15	6,03	369,81	8,17	2,77	169,46	8,30	2,00	120,63	5,47	2,09	191,18
450	7,22	4,37	302,64	7,86	5,17	328,75	8,03	2,65	164,89	7,75	1,71	110,53	7,66	2,30	150,18
510	7,33	4,16	283,96	6,66	4,13	310,29	8,83	2,57	145,28	8,61	1,57	91,19	7,58	1,84	121,57
570	7,35	3,88	263,83	8,67	4,83	278,55	8,92	2,35	131,71	8,25	1,27	77,12	7,40	1,62	109,24
630	7,56	3,61	238,81	8,64	4,60	266,20	8,60	2,34	136,03	8,29	0,99	60,01	5,14	0,91	88,78
690	7,14	3,05	213,72	8,46	4,11	243,12	8,73	2,09	119,64	8,53	0,83	48,76	7,77	1,10	70,50
750	7,19	2,73	189,64	7,27	3,46	237,96	8,55	1,84	107,49	7,87	0,63	39,89	7,15	0,86	60,46
810	7,20	2,33	161,90	7,63	3,17	207,87	9,11	1,84	100,79	8,26	0,48	29,35	6,98	0,70	49,81
870	7,24	1,98	136,72	8,40	3,16	188,06	9,48	1,63	85,91	8,13	0,39	23,81	7,12	0,64	45,06
930	7,26	1,72	118,17	8,15	2,83	173,36	9,63	1,37	71,21	7,97	0,31	19,41	7,30	0,45	30,55
990	7,00	1,48	105,36	6,51	2,02	154,77	9,73	1,24	63,67	7,84	0,24	15,30	7,35	0,33	22,70
1050	7,08	1,27	89,78	8,79	2,44	138,62	8,49	0,95	55,69	7,81	0,15	9,53	7,35	0,30	20,57
1110	7,15	1,11	77,41	8,51	2,18	128,27	7,95	0,87	54,86	7,80	0,11	7,34	7,63	0,19	12,72
1170	7,79	1,38	88,88	8,82	2,10	119,00	9,24	0,78	42,24	8,38	0,10	5,99	7,61	0,15	9,91

Preglednica XIX: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji 0,005% (ut/vol) disperzije hitosana v drugi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (µm)	VII			VIII			IX			X			XI		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	3,10	7,48	1207,17	3,87	10,99	1419,30	2,29	5,66	1236,85	2,24	6,89	1538,61	4,25	11,23	1321,40
90	3,75	6,89	919,05	4,54	10,08	1109,62	3,88	8,59	1107,57	5,42	13,68	1262,28	6,29	15,16	1205,32
150	4,73	8,66	915,15	5,75	14,18	1232,81	5,22	9,80	938,28	6,24	13,17	1055,27	7,78	14,65	941,50
210	4,70	9,95	1058,66	6,66	13,72	1030,39	6,18	10,22	827,18	7,32	13,31	909,22	8,09	12,19	753,56
270	5,92	9,67	817,10	7,48	13,56	906,71	6,23	9,42	755,87	7,38	12,13	821,90	7,12	9,54	669,87
330	6,25	10,05	804,09	7,50	13,68	912,33	5,80	8,43	726,70	8,11	11,65	718,33	7,94	9,51	598,57
390	6,30	9,65	766,11	8,01	13,29	829,44	6,61	8,25	623,97	8,63	11,09	642,49	8,45	8,33	492,79
450	7,11	10,12	711,55	8,35	13,27	794,45	6,64	8,24	620,15	8,72	9,59	549,66	8,27	7,23	436,90
510	7,75	10,16	655,39	7,55	11,73	776,81	7,63	8,58	562,51	9,03	8,60	476,25	8,29	6,59	397,68
570	7,21	8,88	615,51	7,56	11,07	732,11	6,77	7,21	532,42	8,70	7,16	411,48	8,08	5,37	332,14
630	6,53	7,55	577,76	7,85	10,65	678,19	7,28	7,35	504,62	8,68	5,96	343,12	7,49	4,56	304,07
690	6,66	7,19	539,43	5,98	7,31	611,11	7,46	6,88	461,28	8,81	5,01	284,43	6,18	3,07	248,44
750	7,62	6,46	423,57	7,45	8,91	597,81	6,95	6,30	453,40	8,66	3,98	229,74	6,47	2,95	227,76
810	6,35	5,35	421,08	8,01	8,41	525,17	5,98	4,73	395,26	8,89	3,43	192,99	8,09	2,54	156,77
870	6,57	4,67	355,75	6,61	6,51	492,50	7,45	5,24	351,94	7,62	2,60	170,68	8,76	2,26	128,99
930	6,88	4,34	315,53	5,85	5,27	450,55	7,27	4,57	314,52	8,46	2,03	120,18	8,58	1,75	101,98
990	6,74	3,76	278,65	8,15	6,39	391,94	6,97	3,79	271,92	8,10	1,59	98,22	8,30	1,42	85,42
1050	6,60	3,36	254,86	7,96	5,64	354,11	7,28	3,56	244,55	8,10	1,39	85,78	8,68	1,21	69,67
1110	6,88	2,81	203,93	7,66	5,06	330,07	7,27	2,91	199,89	7,12	0,74	52,02	8,81	0,98	55,67
1170	6,34	2,36	185,77	5,08	4,13	406,64	7,48	2,48	166,04	5,93	0,65	54,42	8,82	0,88	49,60

Preglednica XX: Masa tkiva (m) in tkivna koncentracija moksifloksacina, izražena v mg/L (c) in kot ng moksifloksacina/mg tkiva (c_t) na določeni globini tkiva pri aplikaciji 0,005% (ut/vol) disperzije FITC-hitosana v drugi seriji poskusov. Rimske številke označujejo sečne mehurje.

Globina (µm)	VII			VIII			IX			X			XI		
	m (mg)	c (mg/L)	c _t (ng/mg)												
30	3,39	8,27	1219,82	4,32	10,92	1263,99	2,90	5,75	990,91	4,54	9,01	992,29	4,72	11,50	1218,36
90	2,85	7,55	1324,68	3,85	9,93	1289,31	4,98	9,72	976,30	5,25	9,95	948,00	4,77	10,02	1050,33
150	5,24	11,23	1071,23	4,65	11,67	1254,71	5,17	9,93	960,65	4,70	10,19	1084,55	4,42	8,44	954,25
210	5,74	11,05	962,12	6,20	12,98	1046,94	6,25	10,94	874,91	6,43	10,37	806,34	7,18	12,26	853,64
270	8,70	14,77	848,70	7,27	14,05	966,18	6,33	10,12	799,55	6,66	10,20	765,56	6,54	10,23	781,95
330	8,74	13,27	759,17	6,75	12,12	897,68	7,07	10,56	747,04	7,26	10,02	689,97	6,02	7,94	659,20
390	8,70	11,78	677,13	7,51	12,61	839,62	7,03	9,55	678,98	7,25	9,48	653,61	7,74	9,49	612,90
450	8,47	10,69	631,05	7,59	12,21	804,09	7,01	9,31	664,27	7,38	8,69	588,91	7,86	8,60	547,27
510	7,62	8,35	547,92	5,62	8,75	778,19	6,92	8,80	635,76	7,58	8,04	530,30	7,55	7,38	488,92
570	8,45	8,02	474,26	4,54	7,16	788,02	8,08	9,35	578,63	7,27	7,22	496,55	7,81	6,73	430,54
630	8,27	7,10	429,01	7,73	10,99	710,73	7,88	8,81	559,15	7,51	6,73	447,95	7,98	6,10	382,33
690	8,33	5,91	354,54	6,65	8,26	621,28	7,92	8,38	529,24	6,71	5,81	432,64	7,73	5,28	341,27
750	9,56	7,85	410,70	7,56	8,72	576,98	7,77	7,85	505,03	7,02	4,89	348,26	8,48	4,80	282,85
810	8,19	4,30	262,75	7,40	7,88	532,67	7,98	7,20	451,22	6,83	3,97	290,38	8,14	4,45	273,19
870	8,08	3,68	228,02	5,25	5,18	493,31	8,03	6,72	418,21	7,10	3,50	246,18	8,42	3,59	213,06
930	7,94	2,71	170,59	7,80	6,77	434,23	8,28	5,75	347,21	6,90	2,74	198,85	8,02	2,87	178,74
990	8,48	2,24	132,09	7,98	6,07	380,40	8,08	4,75	293,97	6,89	2,41	174,87	8,12	2,51	154,61
1050	7,10	1,37	96,37	7,48	5,03	336,09	8,19	3,99	243,47	6,84	1,90	138,98	8,39	2,17	129,09
1110	8,54	1,34	78,36	7,68	5,68	370,06	7,59	3,22	212,33	6,87	1,49	108,50	7,94	1,78	112,11
1170	8,66	1,01	58,11	7,94	4,09	257,39	7,55	2,77	183,65	6,78	1,29	95,26	7,47	1,42	95,28

Preglednica XXI: Povprečne tkivne koncentracije moksifloksacina (c_p), izražene kot ng moksifloksacina/mg tkiva in njihove standardne deviacije ($n = 5$) po nanosu kontrolne raztopine in 0,25% disperzij v drugi seriji poskusov.

Globina (μm)	MOX		MOX+HIT 0,25		MOX+HIT-FITC 0,25	
	c_p	st. dev.	c_p	st. dev.	c_p	st. dev.
30	268,49	421,32	857,67	979,40	851,51	1047,27
90	241,68	385,18	898,67	970,87	810,73	908,23
150	182,36	363,75	800,28	850,04	665,92	765,37
210	157,00	331,98	798,54	794,54	610,53	700,32
270	141,84	306,78	716,96	742,81	572,18	641,61
330	135,59	277,97	648,48	679,38	538,57	599,19
390	120,63	255,37	600,06	623,24	522,49	563,50
450	110,53	238,20	553,97	578,88	481,41	534,81
510	91,19	219,70	473,66	540,75	439,26	490,70
570	77,12	199,59	399,29	496,12	383,91	437,95
630	60,01	186,38	352,50	470,74	362,48	392,96
690	48,76	167,78	292,43	419,04	325,14	351,75
750	39,89	152,93	241,93	376,93	289,18	305,52
810	29,35	133,82	192,81	308,60	233,10	267,23
870	23,81	119,02	163,17	276,36	204,51	217,70
930	19,41	105,98	143,11	225,39	167,75	187,00
990	15,30	95,13	110,32	207,27	137,84	164,96
1050	9,53	81,46	84,76	157,02	121,64	130,58
1110	7,34	74,70	67,11	135,00	103,31	110,70
1170	5,99	68,88	57,23	102,48	74,69	79,39

Preglednica XXII: Povprečne tkivne koncentracije moksifloksacina (c_p), izražene kot mg moksifloksacina/mg tkiva in njihove standardne deviacije ($n = 5$) po nanosu kontrolne raztopine in 0,005% (ut/vol) disperzij v drugi seriji poskusov.

Globina (μm)	MOX		MOX+HIT 0,005		MOX+HIT-FITC 0,005	
	c_p	st. dev.	c_p	st. dev.	c_p	st. dev.
30	415,54	175,33	1344,67	136,25	1137,07	134,06
90	370,77	150,64	1120,77	130,54	1117,72	177,22
150	340,60	151,94	1016,60	132,58	1065,08	122,03
210	308,83	140,52	915,80	130,15	908,79	95,67
270	275,77	132,09	794,29	87,86	832,39	81,02
330	254,53	117,61	752,00	115,90	750,61	91,85
390	233,37	104,86	670,96	131,28	692,45	86,47
450	211,40	97,70	622,54	138,97	647,12	98,17
510	190,46	99,68	573,73	148,77	596,22	114,97
570	172,09	92,67	524,73	159,08	553,60	141,66
630	157,97	90,99	481,55	157,41	505,84	131,66
690	139,15	86,07	428,94	158,04	455,79	119,04
750	127,09	84,60	386,45	158,33	424,76	118,11
810	109,95	74,97	338,26	157,39	362,04	122,43
870	95,91	67,16	299,97	149,02	319,76	127,50
930	82,54	63,91	260,55	147,38	265,92	118,45
990	72,36	58,48	225,23	130,87	227,19	106,04
1050	62,84	52,79	201,79	121,20	188,80	99,09
1110	56,12	49,81	168,32	116,88	176,27	119,53
1170	53,20	49,56	172,49	144,99	137,94	81,20

Preglednica XXIII: Celotna količina moksifloksacina (c_k), ki je prešel v posamezen košček tkiva po nanosu kontrolne raztopine in 0,25% (ut/vol) disperzij v drugi seriji poskusov.

Mehur	c_k (ng MOX/mg tkiva)		
	MOX	MOX+HIT 0,25	MOX+HIT-FITC 0,25
VI	4640,75	10798,68	8538,16
VII	2751,18	10222,02	9247,35
VIII	14333,48	10632,10	10672,97
IX	11693,52	9568,46	7594,36
X	2675,44	8452,95	7896,14

Preglednica XXIV: Celotna količina moksifloksacina (c_k), ki je prešel v posamezen košček tkiva po nanosu kontrolne raztopine in 0,005% (ut/vol) disperzij v drugi seriji poskusov.

Mehur	c_k (ng MOX/mg tkiva)		
	MOX	MOX+HIT 0,005	MOX+HIT-FITC 0,005
VII	2751,18	12026,12	10736,61
VIII	14333,48	14582,05	14641,86
IX	11693,52	11294,92	11650,46
X	2675,44	10017,06	10037,96
XI	8856,71	8578,07	9759,89

4.3. REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

Z uporabo ANOVA testa za odvisne vzorce smo ugotovili, da vrsta uporabljeni raztopine oz. disperzije vpliva na količino moksifloksacina, ki preide v steno sečnega mehurja. V prvi seriji, v kateri smo preverjali vpliv 0,05% (ut/vol) disperzij hitosana in FITC-hitosana smo dobili vrednost p ($F = 21,191$; d.f. = 2) = 0,005. V drugi seriji, v kateri smo testirali 0,005% in 0,25% (ut/vol) disperzije hitosana in FITC-hitosana pa smo dobili vrednost p ($F = 76,155$; d.f. = 4) < 0,0001. V obeh primerih je bil $p < 0,05$, kar pomeni, da ima vrsta uporabljeni raztopine oz. disperzije značilen vpliv na prehajanje moksifloksacina.

S post hoc (Bonferroni) testom smo med seboj primerjali celotne količine moksifloksacina, ki so prešle v tkivo, za vse možne pare raztopin ozziroma disperzij, ki smo jih uporabili znotraj vsake serije poskusov. Rezultati so prikazani v preglednici XXV za prvo serijo poskusov in v preglednici XXVI za drugo serijo poskusov.

Preglednica XXV: Rezultati post hoc (Bonferroni) testa za prvo serijo poskusov (n je število mehurjev, p je verjetnost, S pomeni značilno in NS neznacilno razliko).

Raztopina oz. disperzija (par)		n	p	S/NS
MOX	MOX + HIT 0,05	5	0,020	S
	MOX + HIT-FITC 0,05	5	0,032	S
MOX + HIT 0,05	MOX	5	0,020	S
	MOX + HIT-FITC 0,05	5	0,268	NS
MOX + HIT-FITC 0,05	MOX	5	0,031	S
	MOX + HIT 0,05	5	0,268	NS

Preglednica XXVI: Rezultati post hoc (Bonferroni) testa za drugo serijo poskusov (n je število mehurjev, p je verjetnost, S pomeni značilno in NS neznačilno razliko).

Raztopina oz. disperzija (par)		n	p	S/NS
MOX	MOX + HIT 0,005	5	0,002	S
	MOX + HIT-FITC 0,005	5	0,016	S
	MOX + HIT 0,25	5	0,025	S
	MOX + HIT-FITC 0,25	5	0,015	S
MOX + HIT 0,005	MOX	5	0,002	S
	MOX + HIT-FITC 0,005	5	1,000	NS
	MOX + HIT 0,25	5	0,280	NS
	MOX + HIT-FITC 0,25	5	0,041	S
MOX + HIT-FITC 0,005	MOX	5	0,016	S
	MOX + 0,005 HIT	5	1,000	NS
	MOX + 0,25 HIT	5	0,678	NS
	MOX + 0,25 HIT-FITC	5	0,178	NS
MOX + HIT 0,25	MOX	5	0,025	S
	MOX + HIT 0,005	5	0,280	NS
	MOX + HIT-FITC 0,005	5	0,678	NS
	MOX + HIT-FITC 0,25	5	1,000	NS
MOX + HIT-FITC 0,25	MOX	5	0,015	S
	MOX + HIT 0,005	5	0,041	S
	MOX + HIT-FITC 0,005	5	0,178	NS
	MOX + HIT 0,25	5	1,000	NS

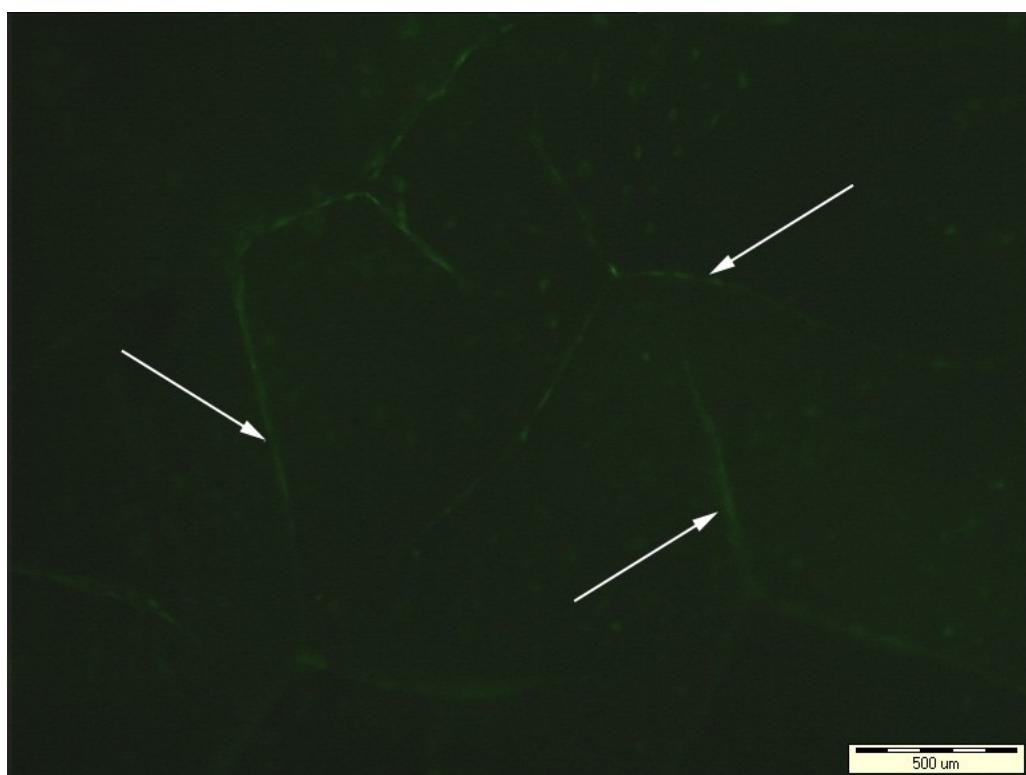
Z upoštevanjem rezultatov iz prve in druge serije smo preverili tudi vpliv flurescentno označenega hitosana v primerjavi z neoznačenim. Z Levenovim testom homogenosti varianc smo najprej dokazali, da variance med skupinami niso značilno različne. Nadalje smo uporabili univariatno analizo variance, s katero smo preverili vpliv dodatka polimera raztopini moksifloksacina in primerjali flurescentno označeni polimer z neoznačenim. V preglednici XXVII so zbrani rezultati univariatne analize variance.

Preglednica XXVII: Rezultati univariatne analize varianc obeh serij (df so prostostne stopnje, p je verjetnost, S pomeni značilno in NS neznačilno razliko).

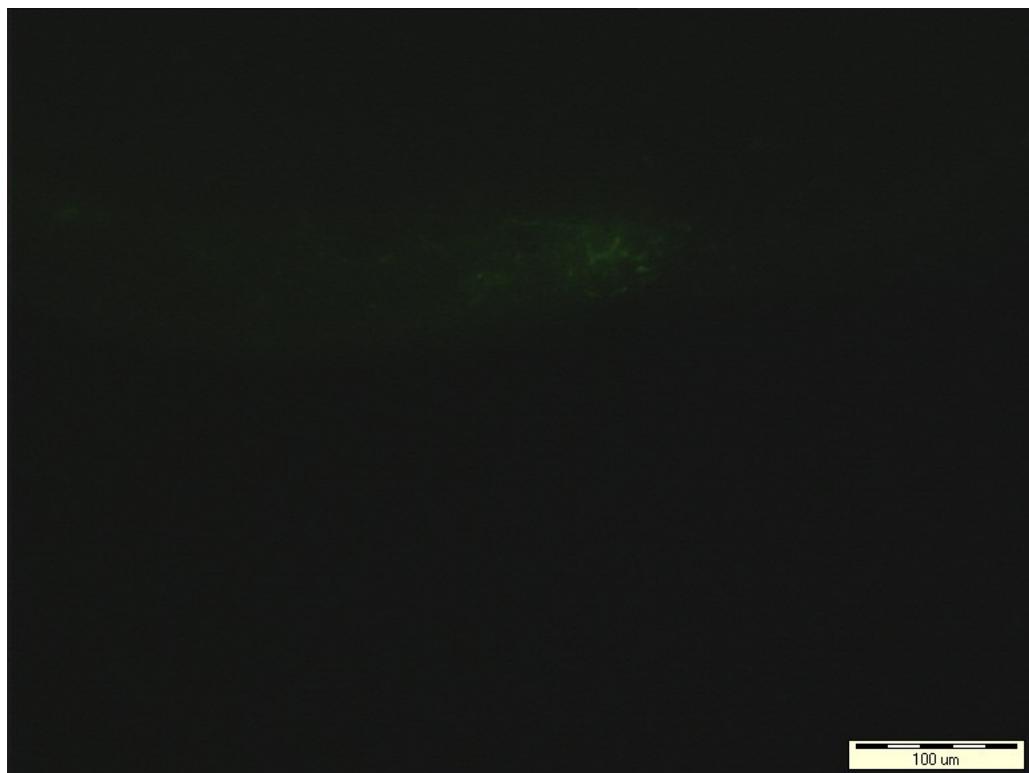
Preiskovan parameter	df	p	S/NS
dodatek polimera raztopini moksifloksacina	3	< 0,0001	S
flurescentno označen polimer v primerjavi z neoznačenim	1	0,706	NS

4.4. SLIKANJE S FLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM

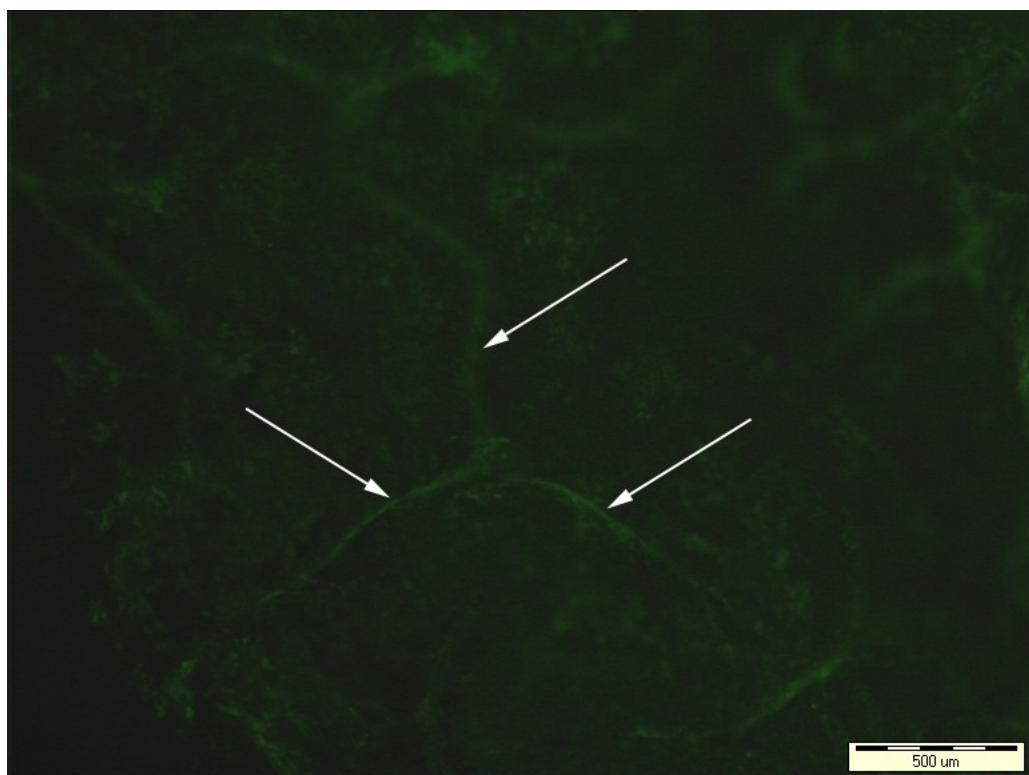
S fluorescenčnim mikroskopom smo posneli slike stene sečnega mehurja po tretiranju tkiva z raztopino FITC-a in vsemi tremi preiskovanimi koncentracijami FITC-hitosana (0,005%, 0,05% in 0,25% (ut/vol)). Posneli smo slike površine sluznice (slike 11, 13, 15, 17) in prečnega prerezja stene od apikalne (na sliki zgoraj) do bazolateralne strani (slike 12, 14, 16, 18). Zeleno obarvanje je posledica fluorescence po tkivu porazdeljenega FITC-a oziroma FITC-hitosana.



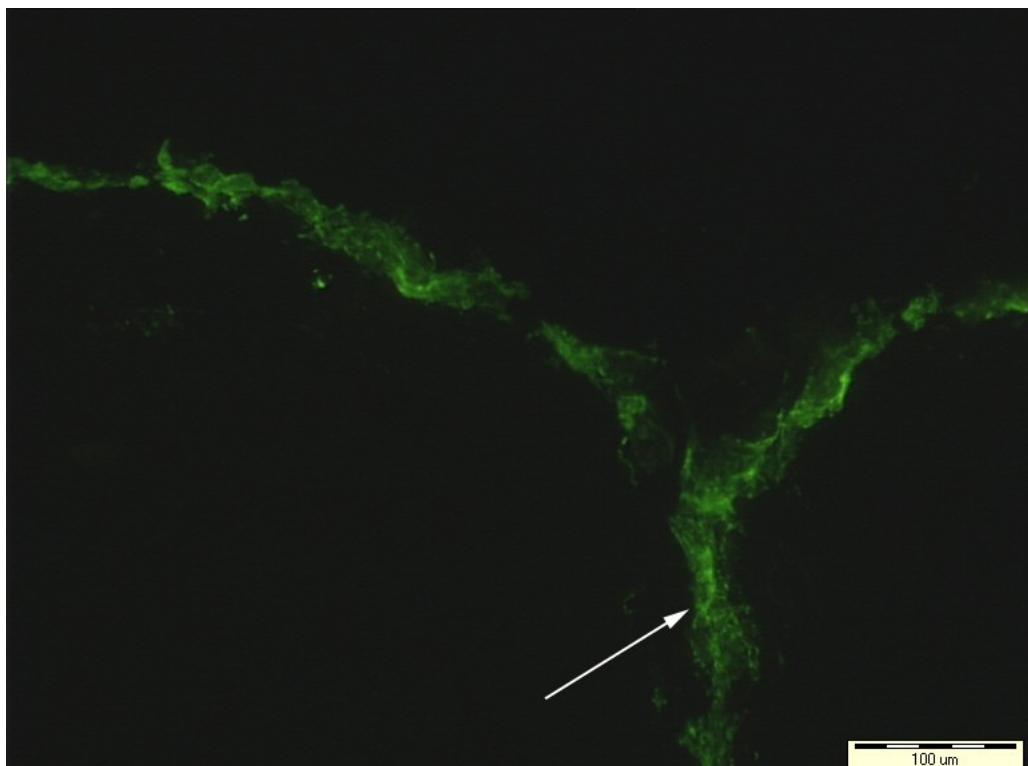
Slika 11: Površina sluznice sečnega mehurja prašiča po nanosu kontrolne raztopine FITC-a. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence FITC-a. Puščice označujejo sluznične gube.



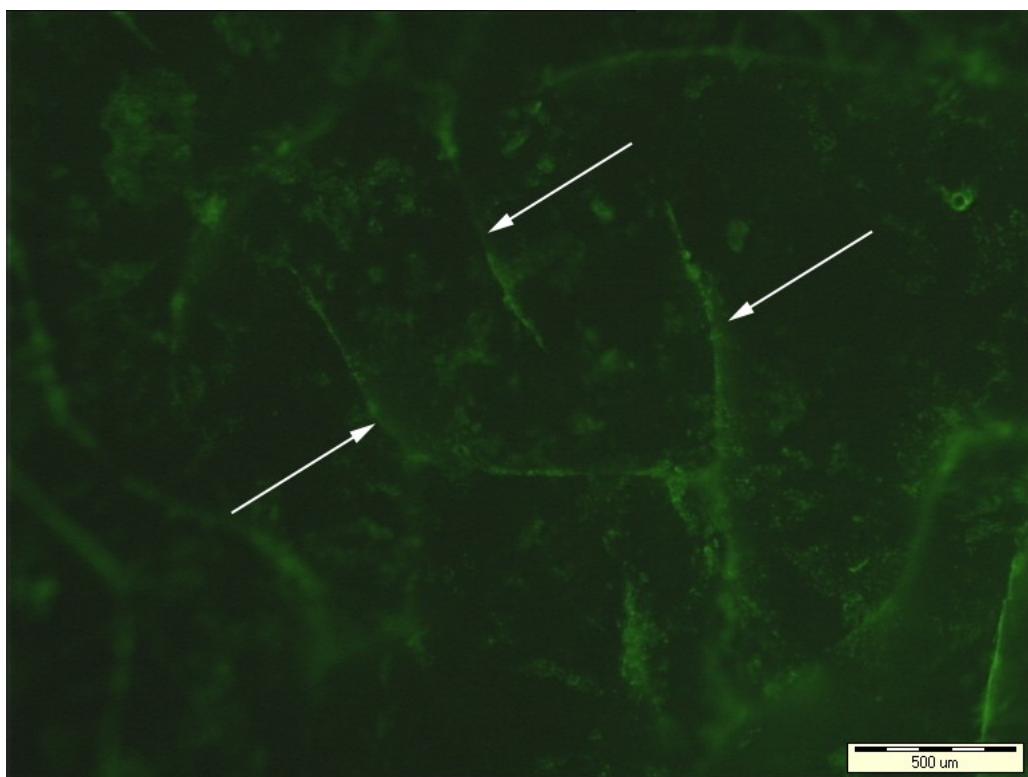
Slika 12: Prečni prerez stene sečnega mehurja po nanosu kontrolne raztopine FITC-a. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence FITC-a na površini sluznice.



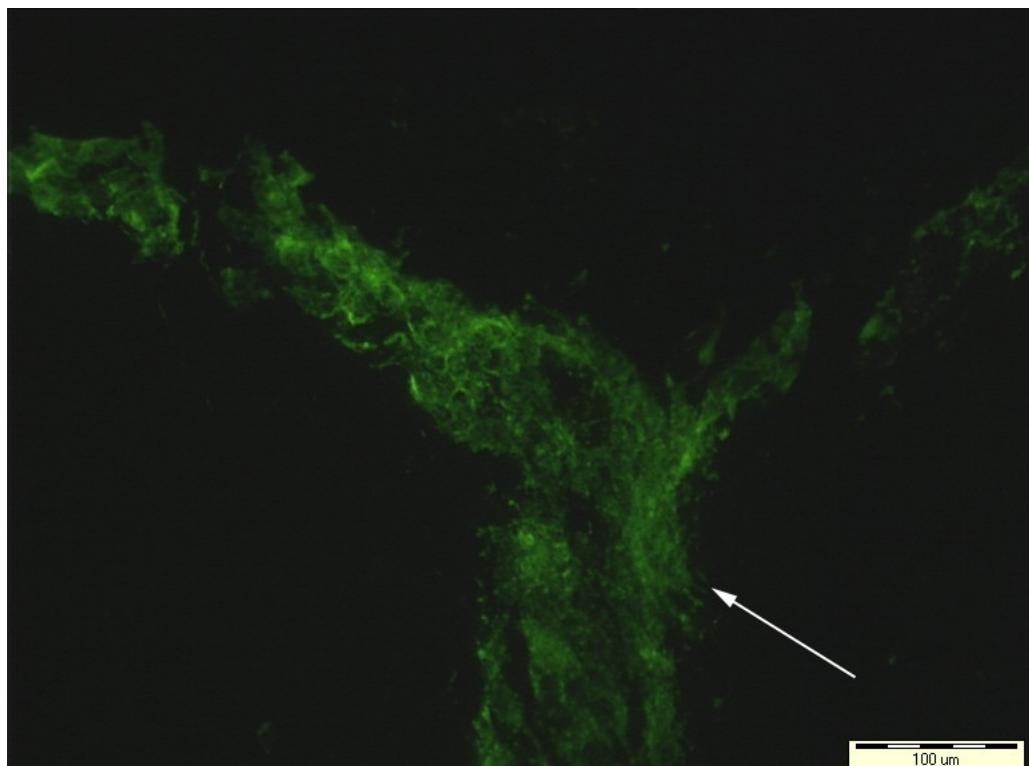
Slika 13: Površina sluznice sečnega mehurja prašiča po nanosu 0,005% (ut/vol) disperzije FITC-hitosana. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence po sluznici porazdeljenega FITC-hitosana. Puščice označujejo sluznične gube.



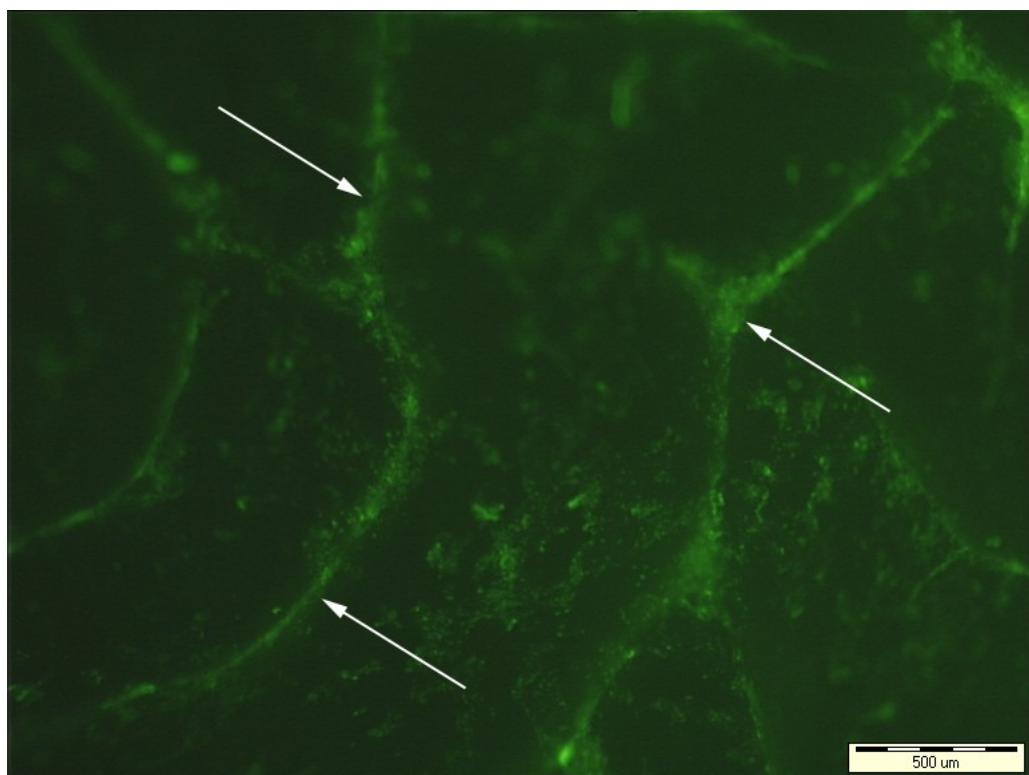
Slika 14: Prečni prerez stene sečnega mehurja po nanosu 0,005% (ut/vol) disperzije FITC-hitosana. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence po sluznici porazdeljenega FITC-hitosana. Puščica označuje sluznično gubo.



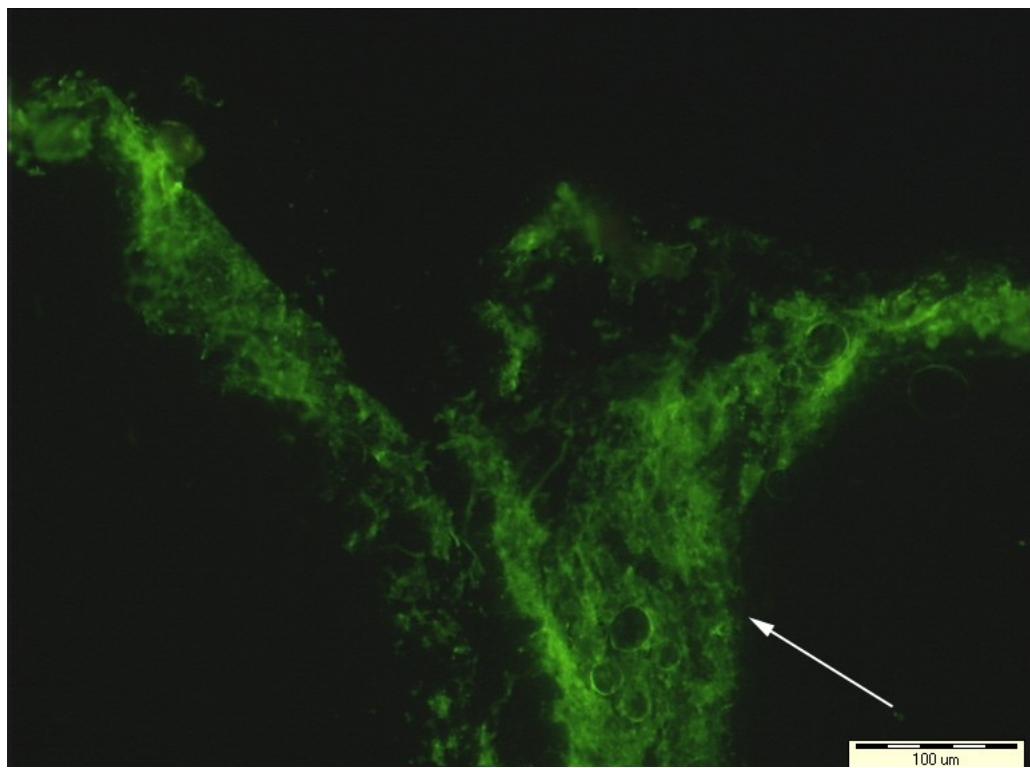
Slika 15: Površina sluznice sečnega mehurja prašiča po nanosu 0,05% (ut/vol) disperzije FITC-hitosana. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence po sluznici porazdeljenega FITC-hitosana. Puščice označujejo sluznične gube.



Slika 16: Prečni prerez stene sečnega mehurja po nanosu 0,05% (ut/vol) disperzije FITC–hitosana. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence po sluznici porazdeljenega FITC–hitosana. Puščica označuje sluznično gubo.



Slika 17: Površina sluznice sečnega mehurja prašiča po nanosu 0,25% (ut/vol) disperzije FITC–hitosana. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence po sluznici porazdeljenega FITC–hitosana. Puščice označujejo sluznične gube.



Slika 18: Prečni prerez stene sečnega mehurja po nanosu 0,25% (ut/vol) disperzije FITC–hitosana. Zeleno obarvanje je posledica fluorescence po sluznici porazdeljenega FITC–hitosana. Puščica označuje sluznično gubo.

5. RAZPRAVA

Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko proučujejo pospeševanje absorpcije s hitosanom, za katerega je znano, da poveča permeabilnost različnih sluznic. V *in vitro* študijah na izoliranem sečnem mehurju prašiča so pokazali, da z 0,001% (ut/vol) disperzijo hitosana že dosežemo maksimalen učinek povečanja absorpcije hidrofilne modelne učinkovine v steno sečnega mehurja. Ugotovili so tudi, da do povečanja permeabilnosti učinkovine pride zaradi bioadhezije hitosana in posledičnega luščenja zgornjih plasti urotelija (13). Vendar je opazovanje hitosana na tkivu zahtevno, mogoče je le z uporabo elektronskega mikroskopa, ker hitosan ni viden pod optičnim mikroskopom. Vezava FITC-a na hitosan omogoča enostavno vrednotenje porazdelitve hitosana po tkivu z uporabo fluorescenčnega mikroskopa. Tkivo smo pod mikroskopom opazovali po odlitju aplicirane disperzije FITC-hitosana, brez predhodnih priprav vzorcev.

Sečni mehurji, na katerih so potekali poskusi, so bili različnih velikosti, z različno debelino stene in nagubanostjo urotelija. Poškodovane mehurje smo zavrgli. Izbrali smo mehurje, ki so bili dovolj veliki, da smo iz njih lahko izrezali 3 oziroma 5 koščkov tkiva in so imeli enakomerno obarvano in nagubano sluznico. Tako smo zmanjšali variabilnost med mehurji. Za poskuse smo uporabili le srednji del mehurja, ker sluznica nima enakih lastnosti po celotni površini. Po končanem poskusu smo koščke tkiva, ki so bili v stiku s preiskovano raztopino oz. disperzijo na hitro zamrznili v tekočem dušiku. S tem smo ustavili difuzijo učinkovine v tkivo. Pri zamrzovanju lahko skupaj s tkivom zamrznemo tudi manjšo količino fosfatnega pufra, s katerim smo tkivo spirali. S prvo rezino bi tako lahko odrezali le plast zamrznjenega pufra, brez tkiva. Vir napak je lahko tudi neravna luminalna površina mehurja. Prve odrezane rezine v tem primeru ne bi vsebovale celotne površine koščka tkiva in koncentracija učinkovine, ki jih določimo s HPLC analizo, ne bi bile realne. Predvidevamo, da to ni imelo bistvenega vpliva na naše rezultate.

5.1. PRIPRAVA FITC-HITOSANA

FITC smo kovalentno vezali na proste aminske skupine hitosana. Učinkovitost vezave je bila v našem primeru nižja, kot jo navaja literatura. Pri uporabi enakega postopka priprave FITC-hitosana literatura poroča o učinkovitosti vezave $7,5 \pm 0,53 \mu\text{g}$ FITC/mg hitosana (35), kar je še enkrat višje od naše maksimalne dobljene vrednosti vezave ($3,57 \mu\text{g}$ FITC/mg hitosana).

Vzroki za dobljeno manjšo učinkovitost vezave v primerjavi z literaturo so lahko različni. Možno je, da reakcija med FITC-em in hitosanom, kljub ustreznemu času in neprestanemu mešanju, ni potekla do konca. Pri spiranju nevezanega FITC-a je lahko prišlo tudi do razpada vezanega fluorofora na svetlobi, posledično smo določili manjšo vezavo. Poleg tega na učinkovitost vezave lahko vpliva tudi vrsta uporabljenega hitosana, saj je število prostih aminskih skupin, s katerimi reagira FITC, odvisno od stopnje acetiliranja in molske mase polimera.

5.2. PREHAJANJE MOKSIFLOKSACINA V STENO SEČNEGA MEHURJA

Moksifloksacin smo kot modelno učinkovino uporabili, ker je hidrofilna molekula, za hitosan pa je znano, da poveča absorpcijo hidrofilnih molekul v različne sluznice. Poleg tega spada med fluorokinolone, med katerimi se na primer ciprofloksacin in norfloksacin uporablja za zdravljenje vnetja sečil (38, 39). Ob uporabi svetlobe ustrezne valovne dolžine ekscitacije in emisije moksifloksacina fluorescira. Njegovo koncentracijo v tkivu smo tako lahko enostavno določili z uporabo fluorescenčnega detektorja in ustreznih standardov.

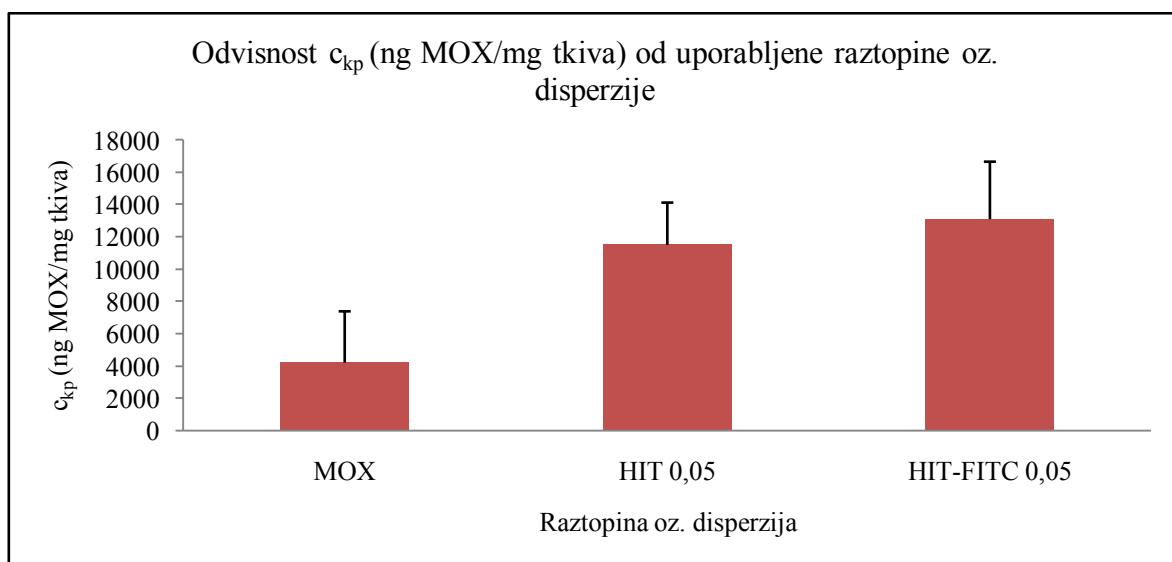
Pred izvedbo HPLC analize naših vzorcev smo preverili ali fluorescanca FITC-a vpliva na fluorescenco samega moksifloksacina. Površina vrha v HPLC kromatogramu se je spremenila le za 1,5 % ob dodatku FITC-a raztopini moksifloksacina. To je skladno z našimi predvidevanji, da FITC ne vpliva značilno na HPLC analizo, saj se valovni dolžini ekscitacije in emisije moksifloksacina in FITC-a razlikujeta (moksifloksacin: $\lambda_{\text{eks}} = 290 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ems}} = 500 \text{ nm}$ (40); FITC: $\lambda_{\text{eks}} = 490 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ems}} = 512 \text{ nm}$ (37)).

5.2.1. PRVA SERIJA POSKUSOV

V predhodnih študijah je bilo dokazano, da 0,05% (ut/vol) disperzija hitosana poveča permeabilnost stene prašičjega sečnega mehurja za moksifloksacin (13).

V prvi seriji poskusov smo želeli dokazati, da vezava FITC-a na hitosan ne spremeni sposobnosti hitosana za povečanja permeabilnosti.

Na sliki 19 je prikazana povprečna celotna količina moksifloksacina, c_{kp} (ng MOX/mg tkiva), ki je prešla v tkivo pri uporabi posamezne raztopine oziroma disperzije v prvi seriji poskusov. Koncentracija moksifloksacina je bila v vseh uporabljenih raztopinah oz. disperzijah enaka.



Slika 19: Graf odvisnosti c_{kp} (ng MOX/mg tkiva) in njihovih standardnih deviacij ($n = 5$) od uporabljene raztopine moksifloksacina oz. 0,05% (ut/vol) disperzij.

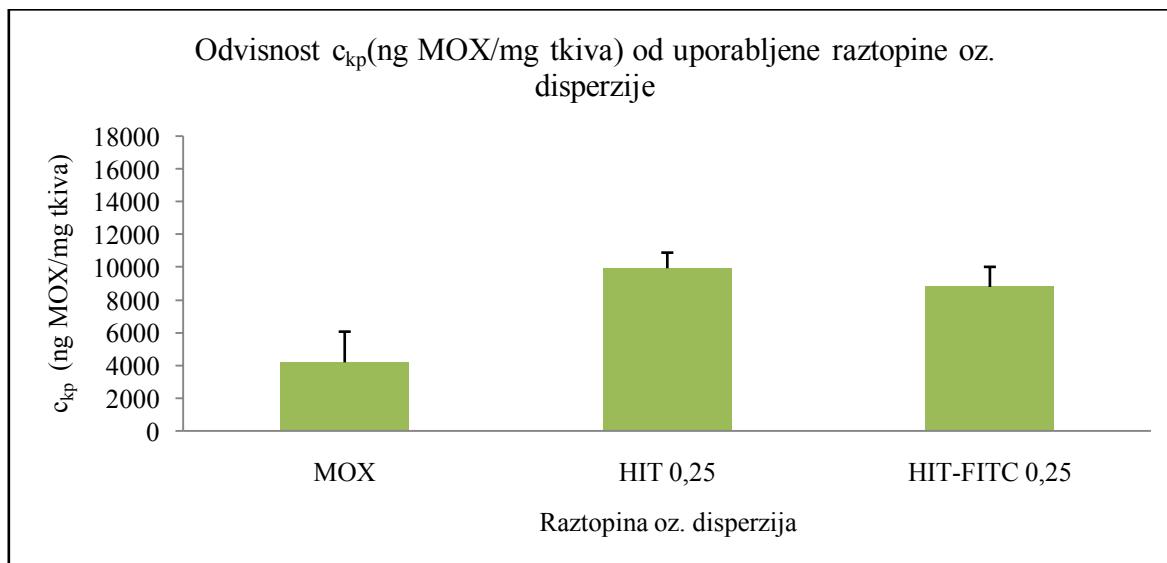
Iz grafa je razvidno, da je povprečna kumulativna količina moksifloksacina, ki je prešla v tkivo ob uporabi raztopine moksifloksacina, bistveno manjša, kot pri nanosu 0,5% (ut/vol) disperzije hitosana oziroma FITC-hitosana.

S statistično analizo smo ugotovili, da dodatek 0,05% (ut/vol) hitosana ali 0,05% (ut/vol) FITC-hitosana k raztopini moksifloksacina značilno poveča prehod učinkovine v tkivo (preglednica XXV). Med vplivom označenega in neoznačenega polimera ni značilnih razlik. Vezava FITC-a na hitosan ne vpliva na njegovo sposobnost povečanja permeabilnosti moksifloksacina v tkivo.

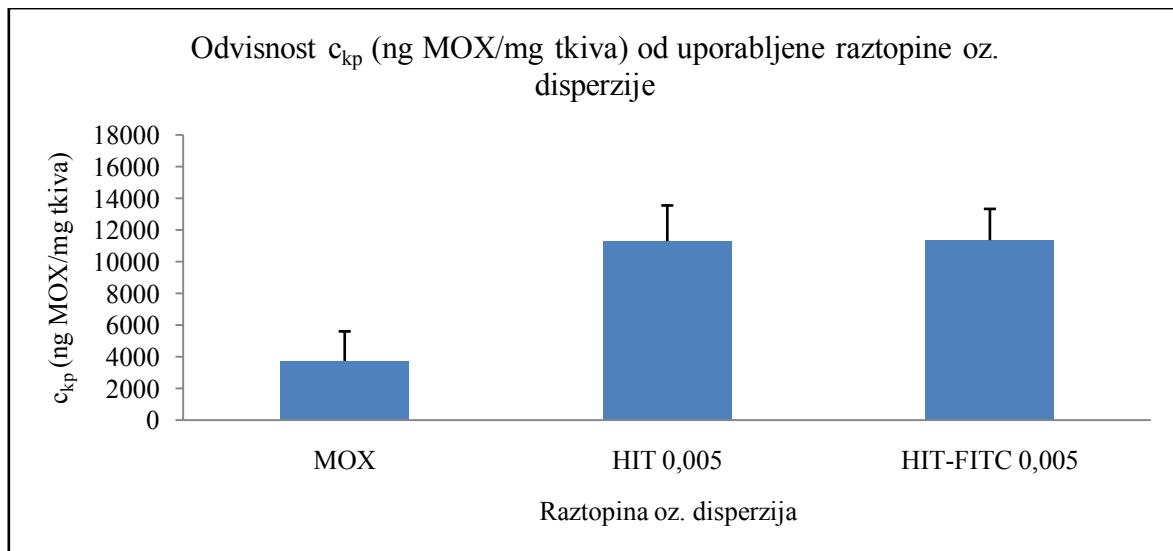
5.2.2. DRUGA SERIJA POSKUSOV

V prvi seriji smo dokazali, da ni značilnih razlik med delovanjem 0,05% (ut/vol) disperzije označenega in neoznačenega hitosana. V drugi seriji poskusov smo nato želeli pokazati, da vezava FITC-a ne vpliva na delovanje hitosana tudi pri drugih koncentracijah polimera. Uporabili smo dve dodatni koncentraciji hitosana, eno nižjo in eno višjo od koncentracije, uporabljeni v prvi seriji poskusov (0,05% (ut/vol)), in sicer 0,005% (ut/vol) in 0,25% (ut/vol). Za obe koncentraciji je bilo v študijah že dokazano, da značilno povečata absorpcijo moksifloksacina v steno prašičjega sečnega mehurja (13). Na tkivo smo zaradi omejene količine FITC-hitosana nanesli po 8 mL (v prvi seriji smo aplicirali po 10 mL) vsake preiskovane raztopine oz. disperzije. Tudi v tem primeru je bila v testirani raztopini oz. disperziji zadostna količina moksifloksacina, poleg tega zmanjšan volumen aplicirane raztopine ne vpliva na količino moksifloksacina, ki preide v tkivo. Iz slik 19, 20 in 21 lahko vidimo, da sta količini moksifloksacina, ki sta prešli v tkivo v obeh serijah poskusov, po nanosu kontrolne raztopine, enaki. Rezultate druge serije smo lahko primerjali z rezultati prve serije.

Na slikah 20 in 21 je prikaz odvisnosti povprečne celotne količine moksifloksacina (ng MOX/mg tkiva), ki je prešla v tkivo, od uporabljeni raztopine oziroma disperzije v drugi seriji poskusov. Koncentracija moksifloksacina je bila v vseh uporabljenih raztopinah oz. disperzijah enaka.



Slika 20: Graf odvisnosti c_{kp} (ng MOX/mg tkiva) in njihovih standardnih deviacij ($n = 5$) od uporabljeni raztopine moksifloksacina oz. 0,25% (ut/vol) disperzij.



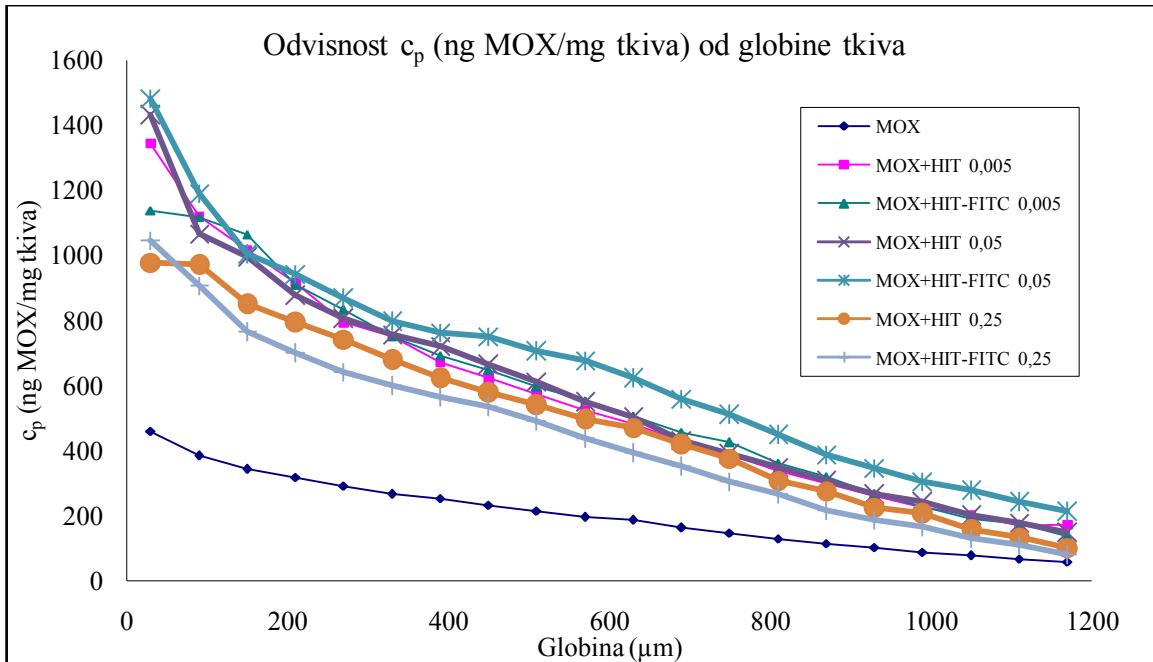
Slika 21: Graf odvisnosti c_{kp} (ng MOX/mg tkiva) in njihovih standardnih deviacij ($n = 5$) od uporabljene raztopine moksifloksacina oz. 0,005% (ut/vol) disperzij.

Iz grafov na slikah 20 in 21 lahko razberemo, da je povprečna kumulativna količina moksifloksacina, ki je prešla v tkivo, bistveno večja pri nanosu 0,005% (ut/vol) in 0,25% (ut/vol) disperzij hitosana oz. FITC-hitosana kot pri aplikaciji kontrolne raztopine moksifloksacina. Hkrati tudi pri teh koncentracijah ne opazimo bistvenih razlik med delovanjem označenega in neoznačenega polimera.

Iz rezultatov statistične analize (preglednica XXVI) smo razbrali, da obe koncentraciji hitosana in FITC-hitosana značilno povečata absorpcijo učinkovine v tkivo. Med neoznačenim in označenim hitosanom enake koncentracije ni bilo značilnih razlik.

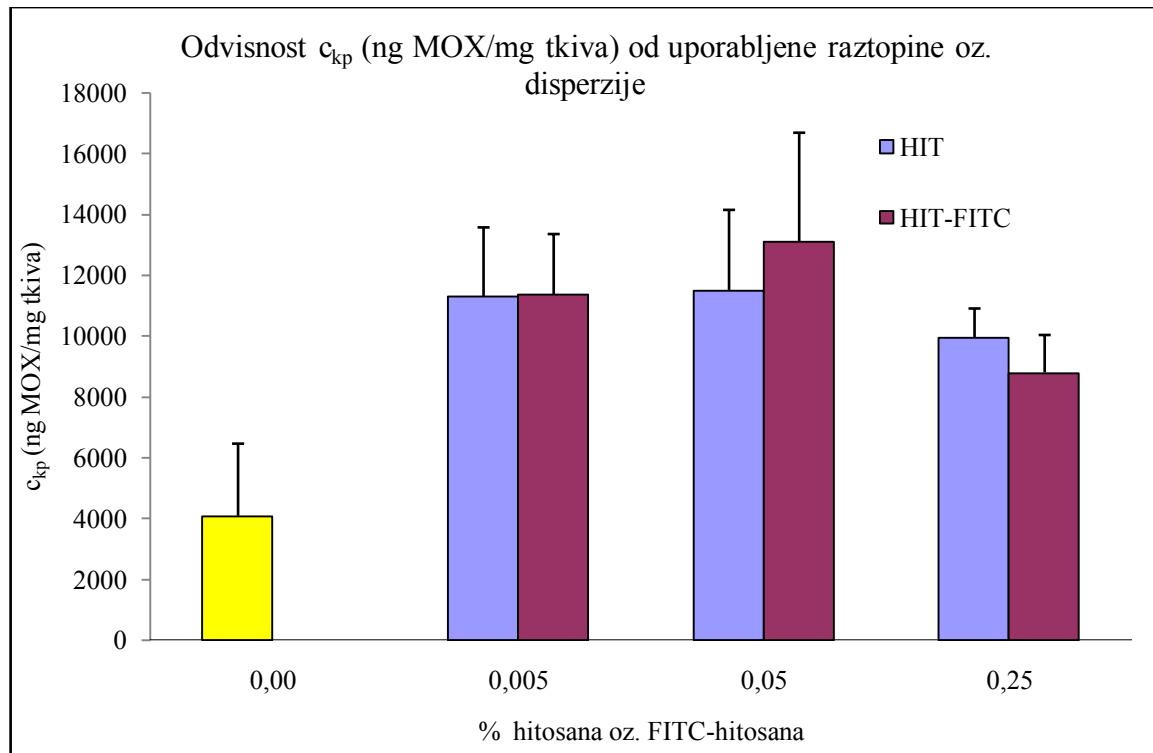
5.2.3. PRIMERJAVA REZULTATOV OBEH SERIJ POSKUSOV

Na sliki 22 je prikazan profil odvisnosti povprečnih tkivnih koncentracij moksifloksacina pri uporabi polimerov v prvi in drugi seriji poskusov ter kontrolne raztopine moksifloksacina od globine tkiva. Na grafu vidimo, da koncentracija moksifloksacina v tkivu pada z globino tkiva.



Slika 22: Graf odvisnosti c_p (ng MOX/mg tkiva) od globine tkiva.

Na sliki 23 je podana povprečna celotna količina moksifloksacina, ki je prešla v tkivo v obeh serijah poskusov v odvisnosti od uporabljenih disperzij in kontrolne raztopine učinkovine (obarvano rumeno).



Slika 23: Graf odvisnosti c_{kp} (ng MOX/mg tkiva) od uporabljene raztopine oz. disperzije v obeh serijah poskusov.

Iz obeh grafov (slika 22 in slika 23) lahko vidimo, da hitosan in FITC-hitosan povečata permeabilnost tkiva za moksifloksacin pri vseh treh uporabljenih koncentracijah v primerjavi s kontrolno raztopino moksifloksacina. Naše ugotovitve se skladajo z zaključki prejšnjih raziskav, v katerih so ugotovili, da pride do značilno povečane absorpcije moksifloksacina pri uporabi disperzij hitosana z minimalno koncentracijo 0,0005 % (ut/vol) (13). Ugotovili smo, da uporaba višjih koncentracij hitosana, v našem primeru 0,25 % (ut/vol), povzroči zmanjšanje učinka hitosana na povečanje absorpcije modelne učinkovine. To se sklada s podatki iz literature, kjer so opazili padec v kumulativni količini moksifloksacina, ki je prešla v tkivo, pri uporabi koncentracij hitosana višjih od 0,1 % (ut/vol) (13). Do zmanjšanja verjetno pride zaradi tvorbe gostega hitosanskega gela na površini tkiva, skozi katerega moksifloksacin težje prodira, posledično pa je koncentracija učinkovine v tkivu nižja. Vendar je statistična razlika med delovanjem 0,005%, 0,05% in 0,25% (ut/vol) disperzije neznačilna.

Z univariantno analizo varianc smo pokazali, da dodatek polimera v raztopino moksifloksacina značilno vpliva na prehajanje moksifloksacina, medtem ko fluorescentno označevanje polimera ne vpliva značilno (preglednica XXVII). Vezava FITC-a na hitosan bi lahko zmanjšala njegov učinek na pospeševanje absorpcije, ker se FITC kovalentno veže na proste NH₂ skupine polimera. Aminske skupine so odgovorne za bioadhezijo hitosana na urotelij, ki je nujno potrebna za njegovo delovanje.

5.3. SLIKANJE S FLUORESCENČNIM MIKROSKOPOM

S fluorescenčnim mikroskopom smo spremljali porazdelitev FITC-hitosana po sluznici izoliranega sečnega mehurja prašiča. Kot kontrolo smo uporabili raztopino FITC-a s približno dvakrat večjo koncentracijo fluorofora, kot je bila njegova koncentracija v 0,25% (ut/vol) disperziji FITC-hitosana.

Iz primerjave vseh slik (slike 11-18) razberemo, da sama raztopina FITC-a sicer obarva tkivo, vendar bistveno manj kot vse tri uporabljeni koncentracije FITC-hitosana, kljub temu, da je koncentracija FITC-a v kontrolni raztopini višja. Iz tega lahko sklepamo, da obarvanje tkiva po nanosu označenega polimera ni posledica prostega FITC-a, ampak fluorescence FTIC-a, ki je dejansko vezan na hitosan.

Iz slik 13, 15, 17 vidimo, da se FITC-hitosan po spiranju ne spere s tkiva, ampak ostane razporejen po celotni površini sluznice. Nekaj FITC-a ostane na sluznici tudi pri nanosu kontrolne raztopine, vendar je fluorescensa v tem primeru zelo šibka (slika 11). Pričakovali smo, da bo prosti FITC prehajal v tkivo, ker je majhna hidrofilna molekula, ki bi lahko prehajala paracelularno. Vendar na sliki 11 ne opazimo fluorescence globlje v tkivu, kar pomeni, da prosti FITC ne prehaja v steno sečnega mehurja v večjih količinah.

Iz slik površine in prečnega prerezha po nanosu FITC-hitosana (slike 13-18) je razvidno, da je sloj označenega polimera na površini sluznice debelejši pri uporabi disperzije z višjo koncentracijo, večja je tudi fluorescensa. Dodatno lahko na sliki prečnega prerezha vidimo, da se FITC-hitosan porazdeli v gube (slike 14, 16, 18, označeno s puščicami), česar pri kontrolni raztopini pri prečnem prerezu ni (slika 12). Opazimo le rahlo fluorescenco na površini sluznice. Na sliki površine sluznice pri kontrolni raztopini lahko opazimo tudi močnejšo fluorescenco v gubah (slika 11, označeno s puščicami).

Pri pripravi fluorescentno označenega polimera smo dobili relativno nizko učinkovitost vezave FITC-a na hitosan. Povprečno se je vezalo $2,398 \mu\text{g}$ FITC na mg hitosana, kar pomeni, da je bilo molsko razmerje vezanega FITC-a na glukozaminske enote 1:966, pri upoštevani 86% stopnji deacetiliranja. Vezalo se je dovolj FITC-a za opazovanje pod mikroskopom, pri uporabljenih pogojih pa vezava fluorofora ni vplivala na sposobnost delovanja hitosana na sluznico sečnega mehurja.

6. SKLEP

Glede na rezultate, ki smo jih dobili z eksperimentalnim delom, njihovo obdelavo in statistično analizo, smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Uspešno smo kovalentno vezali FITC na hitosan.
- Hitosan in FITC-hitosan v vseh uporabljenih koncentracijah (0,005%, 0,05% in 0,25% (ut/vol)) značilno povečata prehod moksifloksacina v steno prašičjega sečnega mehurja.
- Med vplivom označenega in neoznačenega hitosana enakih koncentracij na absorpcijo moksifloksacina ni značilnih razlik.
- Pri nanosu 0,25% (ut/vol) disperzije hitosana oziroma FITC-hitosana se na površini sečnega mehurja prašiča tvori gost gel, ki deloma ovira prehajanje učinkovine v tkivo.
- Z mikroskopskim opazovanjem površine in prečnega prerezha tkiva po nanosu vseh treh koncentracij FITC-hitosana smo ugotovili, da se hitosan porazdeli na površino sluznice in v sluznične gube in da je sloj polimera na sluznici debelejši pri višji koncentraciji polimera.
- Vezava FITC-a na hitosan je zadostna, da lahko porazdelevanje FITC-hitosana po tkivu opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom. Pri uporabljenih pogojih vezava FITC-a na proste aminske skupine hitosana ne vpliva na njegovo sposobnost povečanja prehajanja modelne učinkovine moksifloksacina v steno sečnega mehurja prašiča.

7. LITERATURA

1. Dahmane R: Ilustrirana anatomija, druga izdaja. Tehniška založba Slovenije, d.d., Ljubljana, Slovenija, 2005: 128.
2. Podobnik B: Povečanje permeabilnosti stene sečnega mehurja prašiča s hitosanom in vpliv kalcijevih ionov, Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005.
3. Lewis SA: Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278: F867-F874.
4. Shruti GS, Banerjee R: Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies, Review. J Control Release 2010; 148: 147-159.
5. Višnjar T: Fiziološke in strukturne spremembe v urotelijskih celicah *in vitro* med diferenciacijo, Diplomska naloga. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2009.
6. Grabnar I, Bogataj M, Mrhar A: Influence of chitosan and polycarbophil on permeation of a model hydrophilic drug into the urinary bladder wall. Int J Pharm 2003; 256: 167-173.
7. Jost SP, Goslink JA, Dixon JS: The morphology of normal human bladder urothelium. J Anat 1989; 167: 103-115.
8. Kerec M, Bogataj M, Veranič P, Mrhar A: Permeability of pig urinary bladder wall: the effect of chitosan and the role of calcium. Eur J Pharm 2005; 25: 113-121.
9. Bogataj M, Mrhar A, Korošec L: Influence of physicochemical and biological parameters on drug release from microspheres adhered on vesical and intestinal mucosa. Int J Pharm 1999; 177: 211-220.
10. Burjak M, Bogataj M, Velnar M, Grabnar I, Mrhar A: The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. Int J Pharm Sci 2001; 224: 123-130.
11. Majeti NV, Kumar R: A review of chitin and chitosan applications. React Funct Polym 2000; 46: 1-27.
12. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E: Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, Review. Prog Polym Sci 2011; 36: 981-1014.
13. Kerec Kos M, Bogataj M, Veranič P, Mrhar A: Permeability of pig urinary bladder wall: time and concentration dependent effect of chitosan. Biol Pharm Bull 2006; 29 (8): 1658-1691.
14. Rinaudo M: Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog Polym Sci 2006; 31: 603-632.

15. Kotzé AF, de Leeuw BJ, Lueßen HL, de Boer AG, Verhofer JC, Juninger HE: Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 monolayers. *Int J Pharm* 1997; 159: 243-253.
16. Schipper NGM, Vårum KM, Arturson P: Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res* 1996; 13 (11): 1686-1692.
17. Kotzé AF, de Leeuw BJ, Lueßen HL, de Boer AG, Verhofer JC, Juninger HE: Chitosans for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci* 1998; 7: 145-151.
18. Artursson P, Lindmark T, Davis SS, Illum L: Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1994; 11 (9): 1358-1361.
19. Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, de Boer A, Vårum KM, Arursson P: Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drug 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res* 1997; 14 (7): 923-929.
20. Thanou M, Verhoef JC, Juninger HE: Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Del* 2001; 52: 117-126.
21. Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR: Effect of Chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm* 199; 182: 21-32.
22. Smith J, Wood E, Dornish M: Effect of chitosan on epithelial tight junctions. *Pharm Res* 2004; 21 (1): 43-49.
23. Yu S, Zhao Y, Wu F, Zang X, Lü W, Thang H, Zhang Q: Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies. *Int J Pharm* 2004; 281: 11-23.
24. Aspden TJ, Illum L, Skaugrud Ø: Chitosan as a nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *Eur J Pharm Sci* 1996; 4: 23-31.
25. Şenel S, Hıncal AA: Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *J Control Rel* 2001; 72: 133-144.
26. Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Gibin S, Caramella C: Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery. Evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. *Eur J Pharm Sci* 2008; 33: 166-176.
27. Qaqish RB, Amiji MM: Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interaction. *Carbohydr Polym* 1999; 38: 99-107.

28. Huang M, Ma Z, Khor E, Lim L-Y: Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharm Res* 2002; 19 (10): 1488-1494.
29. Ma Z, Lim TM, Lim L-Y: Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int J Pharm* 2005; 293: 271-280.
30. Ma O, Lavertu M, Sun J, Nguyen S, Buschmann MD, Winnik FM, Hoemann CD: Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. *Carbohyd Polym* 2008; 72: 616-624.
31. Smith SN, Steer RP: The photophysics of Lissamine rhodamine-B sulphonyl chloride in aqueous solution: implications for fluorescent protein-dye conjugates. *J Photochem Photobiol Chem* 2001; 139: 151-156.
32. Moxifloxacin. *Tuberculosis* 2008; 88 (2): 127-131.
33. Blondeau JM: Fluoroquinolones: mechanism of action, classification and development of resistance. *Survey of Ophthalmology* 2004; 49 (2): S73-S78.
34. Smpc: Avelox 400mg filmsko obložene tablete (Bayer AG, Nemčija); Baza podatkov o zdravilih. <http://www.zdravila.net>. Dostopano: 24-1-2011.
35. Smpc: Vigamox 5 mg/ml kaplice za oko, raztopina (S.A. Alcon-Couvreur N.V., Belgija); Baza podatkov o zdravilih. <http://www.zdravila.net>. Dostopano: 24-1-2011.
36. Kerec M, Švigelj V, Bogataj M, Mrhar A: The enhancement of pipemidic acid permeation into the pig urinary bladder wall. *Int J Pharm* 2002; 240: 33-36.
37. Santra S, Liesenfeld B, Bertolino C, Dutta D, Cao Z, Tan W, Moudgil BM, Meride RA: Fluorescence lifetime measurement to determine the core-shell nanostructure of FITC-doped silica nanoparticles: an optical approach to evaluate nanoparticle photostability. *J Luminescence* 2006; 117: 75-82.
38. Smpc: Cipro bay 250 mg filmsko obložene tablete (Bayer AG, Nemčija); Baza podatkov o zdravilih. <http://www.zdravila.net>. Dostopano: 12-3-2011.
39. Smpc: Nolicin 400 mg filmsko obložene tablete (Krka, tovarna zdravil, d.d., Slovenija); Baza podatkov o zdravilih. <http://www.zdravila.net>. Dostopano: 12-3-2011.
40. Leban-Djurdjević A, Jelikić-Stankov M, Djurdjević P: Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma. *J Chromatography B* 2009; 877: 961-967.