

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



RENATA ROŽMAN

**ADHEZIJA FLUORESCENTNO OZNAČENEGA  
HITOSANA NA SLUZNICO PRAŠIČJEGA SEČNEGA  
MEHURJA**

ADHESION OF FITC-LABELLED CHITOSAN ON PIG  
URINARY BLADDER WALL

Ljubljana, 2012

Diplomska naloga je zaključek univerzitetnega študija farmacije. Opravljala sem jo na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

## **Zahvala**

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila mentorici, doc. dr. Mojci Kerec Kos, za prav vse strokovne in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge ter vsem na Katedri, ki so mi nesebično pomagali, kadar sem jih potrebovala.

Največja zahvala pa gre vsekakor obema od staršev, ki sta mi med študijem potrpežljivo stala ob strani, me vzpodbjala v želji po znanju in vame zaupala tudi v najtežjih trenutkih.

Nazadnje pa hvala tudi tebi, Gregor, za razumevanje in za vso izkazano podporo med izdelavo diplomske naloge.

## **Izjava**

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

Renata Rožman

Ljubljana, junij 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Matej Sova, mag. farm.

# VSEBINA

<b>VSEBINA .....</b>	I
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	III
<b>POVZETEK .....</b>	IV
<b>ABSTRACT .....</b>	V
<b>1. UVOD .....</b>	1
1.1. Sečni mehur .....	1
1.2. Urotelij .....	2
1.3. Bioadhezija .....	4
1.4. Hitosan .....	7
1.4.1. Splošne lastnosti hitosana .....	7
1.4.2. Biorazgradljivost hitosana .....	8
1.4.3. Toksičnost hitosana .....	9
1.4.4. Bioadhezivne lastnosti hitosana .....	9
1.4.5. Vpliv hitosana na permeabilnost sluznice .....	11
1.5. Fluorescein izotiocianat .....	11
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	13
3.1. Materiali .....	13
3.2. Aparature in pribor .....	14
3.3. Metode dela .....	14
3.3.1. Priprava pufrov, raztopin in disperzij .....	14
3.3.2. Označevanje CH s FITC-em .....	17
3.3.3. Izvedba poskusa bioadhezije .....	19
3.3.4. Izračun sile .....	21
3.3.5. Določanja hidratacije polimernih filmov .....	21
3.3.6. Merjenje zeta potenciala .....	22
3.3.7. Statistično vrednotenje rezultatov .....	22
3.3.8. Slikanje s svetlobnim in fluorescenčnim mikroskopom .....	22
<b>4. REZULTATI .....</b>	23

4.1.	Optimizacija mase filmov.....	23
4.2.	Rezultati bioadhezije .....	23
4.2.1.	Rezultati označenega hitosana (uporaba PB) .....	24
4.2.2.	Rezultati neoznačenega hitosana (uporaba PB + 0,2 M Ca) .....	25
4.2.3.	Rezultati označenega hitosana (uporaba PB + 0,2 M Ca).....	25
4.2.4.	Rezultati neoznačenega hitosana (uporaba PB + 0,4 M Na).....	26
4.2.5.	Rezultati označenega hitosana (uporaba PB + 0,4 M Na).....	27
4.3.	Rezultati hidratacije .....	27
4.3.1.	Hidratacija brez dodanega pufra .....	27
4.3.2.	Rezultati hidratacije (uporaba 50 µL pufra, neoznačen hitosan).....	28
4.3.3.	Rezultati hidratacije (uporaba 50 µL pufra, označen hitosan) .....	30
4.3.4.	Rezultati hidratacije (uporaba 100 µL pufra, neoznačen hitosan).....	31
4.3.5.	Rezultati hidratacije (uporaba 100 µL pufra, označen hitosan) .....	33
4.4.	Rezultati merjenja zeta potenciala .....	34
<b>5.</b>	<b>STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV .....</b>	<b>38</b>
5.1.	Bioadhezija .....	38
5.2.	Hidratacija .....	38
5.2.1.	Filmi brez dodanega pufra.....	38
5.2.2.	Filmi z dodatkom 50 µL pufra .....	39
5.2.3.	Filmi z dodatkom 100 µL pufra .....	39
<b>6.</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>41</b>
6.1.	Optimizacija pogojev dela pri poskusu bioadhezije .....	41
6.2.	Optimizacija pogojev dela pri spremljanju hidratacije polimernih filmov.....	43
6.3.	Vpliv fluorescein izotiocianata na tvorbo stika med hitosanom in tkivom .....	43
6.4.	Vpliv označitve CH s FITC-em na hidratacijo.....	45
6.5.	Vpliv označitve CH s FITC-em na zeta potencial .....	49
6.6.	Mikroskopiranje.....	49
<b>7.</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>VIRI IN LITERATURA.....</b>	<b>52</b>

## SEZNAM OKRAJŠAV

**UP** – uroplakin

**CH** – hitosan

**FITC** – fluorescein-5-izotiocianat

**FITC-CH** – fluorescein-5-izotiocianat, ki je kovalentno vezan na hitosan

**PB** – fosfatni pufer

**PB + Na** – fosfatni pufer z dodanimi natrijevimi ioni

**PB + Ca** – fosfatni pufer z dodanimi kalcijevimi ioni

**PBS** – izotonični fosfatni pufer

**SD** – standardna deviacija

**KV** – koeficient variacije

## POVZETEK

Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko že vrsto let proučujejo bioadhezivni polimer hitosan, poudarek pa je na iskanju primernih farmacevtskih oblik za intravezikalno aplikacijo. Hitosan poveča permeabilnost številnih sluznic in ima dokazane bioadhezivne lastnosti.

V diplomski nalogi smo preverili, ali vezava fluorescein izotiocianata (FITC-a) na hitosan vpliva na jakost adhezije hitosana na sluznico izoliranega prašičjega sečnega mehurja. Poskus smo izvedli s tenziometrično metodo merjenja sile ločevanja med označenim (FITC-CH) oziroma neoznačenim (CH) polimerom ter izolirano sluznico prašičjega sečnega mehurja. Pred vzpostavitvijo bioadhezivne interakcije smo sluznico hidratirali s pufri različne sestave. Spremljali smo tudi, ali vezava FITC-a na hitosan povzroči spremembe v hidrataciji in zeta potencialu polimera.

Rezultati so pokazali, da vezava FITC-a na hitosan in izbira pufra značilno vplivata na jakost adhezije hitosana na sluznico izoliranega prašičjega sečnega mehurja. Označevanje hitosana s FITC-em je najbolj vplivalo na jakosti bioadhezije v primeru, ko smo za hidratacijo sluznice uporabili pufer brez dodanih ionov. FITC delno zasede proste amino skupine hitosana. Tako pride do manj interakcij z negativno nabitimi skupinami glikozaminoglikanov na površini sluznice, kar prispeva k zmanjšanju jakosti bioadhezije. Pri uporabi pufrov z dodanimi kalcijevimi oziroma natrijevimi ioni med neoznačenim in označenim hitosanom ni bilo pomembnih razlik v jakosti bioadhezije. Vzroke smo iskali v hidrataciji polimernih filmov. Hidratacija polimernih filmov (označenih in neoznačenih) je bila značilno večja, če smo na filme predhodno nanesli 50 ali 100  $\mu\text{L}$  pufra z večjo ionsko močjo (pufer z dodanimi natrijevimi oziroma kalcijevimi ioni), odstotek vezane vode pa je naraščal z večanjem volumna nanesenega pufra. V večji meri so vodo vezali filmi z neoznačenim hitosanom. Med filmi neoznačenega in označenega hitosana, ki jim predhodno nismo nanesli pufra, ali pa smo jim nanesli pufer brez dodanih ionov, ni bilo značilnih razlik v hidrataciji, prav tako je bil odstotek vezane vode manjši kot pri uporabi pufra z večjo ionsko močjo. Iz rezultatov lahko sklepamo, da ima hidratacija polimera pomembno vlogo v bioadhezivni interakciji, vendar pa so za jakost bioadhezije v testiranih pogojih pomembni še drugi dejavniki. Označevanje hitosana s FITC-em ni imelo bistvenega vpliva na zeta potencial polimernih disperzij.

FITC-CH omogoča opazovanje polimera hitosana na tkivu pod fluorescenčnim mikroskopom. V našem primeru ostane hitosan po ločitvi bioadhezivnega stika deloma prisoten na površini sluznice sečnega mehurja, predvsem v gubah sluznice.

## ABSTRACT

Chitosan (CH) is a polymer which increases permeability of different types of mucosae and has proven bioadhesive properties. At the Chair of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics chitosan has been included in the research as a component of pharmaceutical forms suitable for intravesical application.

The aim of this research work was to evaluate the influence of chitosan labelling with fluorescein isothiocyanate (FITC) on the polymer's mucoadhesion strength to the isolated pig urinary bladder mucosa. A tensiometric method was used for the evaluation. The force used to separate the labelled (FITC-CH) and non-labelled (CH) polymer film from the mucosa was measured and compared. Before establishing bioadhesive interaction between the polymer and mucosa, the mucosa was hydrated with buffers of different compositions. The effects of chitosan labelling with FITC on hydration and zeta potential of chitosan were also investigated.

Our findings show that both labelling of chitosan with FITC and the composition of buffer used for the hydration of the tissue significantly influence the mucoadhesion strength of the polymer to isolated pig urinary bladder mucosa. Labelling of chitosan with FITC had the greatest influence when the buffer with no additional ions was used (PB). FITC binds to free amino groups of chitosan and consequently reduces the number of interactions between polymer and negatively charged residues of glycosaminoglycans on the surface of mucosa. There were no major differences between FITC-CH and CH when buffers with higher ionic strength (added calcium or sodium ions) were used. Further on we researched hydration of polymer films. Hydration of FITC-CH and CH was significantly higher when 50 or 100 µL of buffer with higher ionic strength was applied in advance on the surface of the films. The percentage of the bound water was higher when bigger volumes of buffers were used. Films consisting of non-labelled polymer bounded water to a greater extent. There were no significant differences in mucoadhesion between films with FITC-CH or CH when buffers with higher ionic strength or PB were not applied in advance. Furthermore the percentage of the bound water was higher when buffers with higher ionic strength were used instead of PB. Our findings show that hydration of polymer is important for mucoadhesive interaction, however there are additional factors affecting chitosan's strength of adhesion in the given conditions. Labelling chitosan with FITC did not have any significant influence on zeta potential values of polymer dispersions.

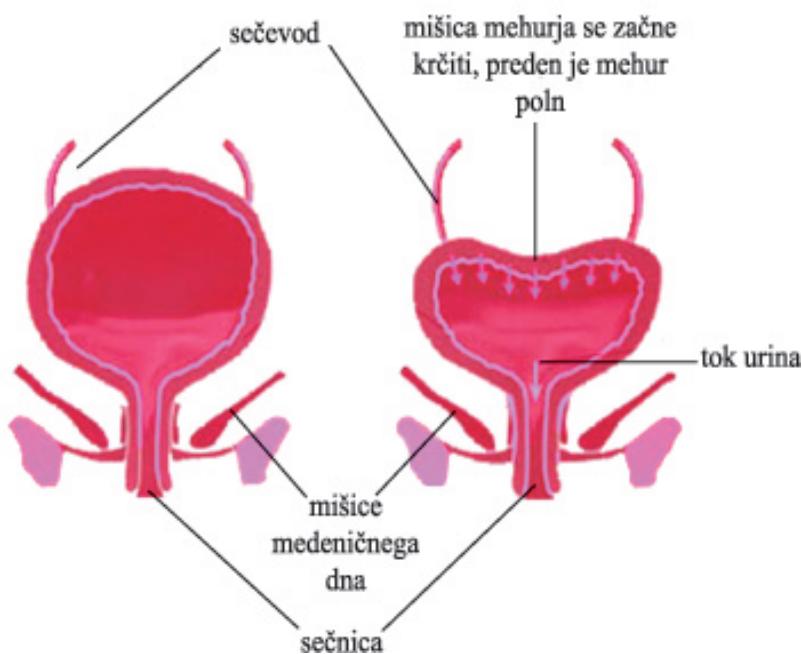
Distribution of FITC-CH on the mucosa of isolated pig urinary bladder was observed with a fluorescence microscope. In the given conditions some chitosan stayed on the bladder mucosa, especially in mucosal folds, after the mucoadhesive interaction was disrupted.

# 1. UVOD

## 1.1. Sečni mehur

Sečni mehur (vesica urinaria) je organ sečil, ki služi kot kratkoročni rezervoar za urin, s svojim krčenjem pa omogoča uriniranje. Leži v spodnjem delu trebušne votline v mali medenici, v prostoru tik za simfizo; imenujemo ga Retziusov prostor. To je prostor pred peritonejem, med trebušnimi mišicami in simfizo na sprednji strani ter parietalnim peritonejem na zadnji strani (1).

Seč iz ledvic teče v sečnik po sečevodu. Iz ledvičnega meha vsake od obih ledvic izhaja po en sečevod. Je mišično izvodilo, ki lahko poganja seč s pomočjo peristaltičnega gibanja. Iz sečnega mehurja izhaja ozka cevka, sečnica, ki odvaja seč iz telesa (slika 1). Posebna krožna mišica stiskavka cevko zapira in odpira (2, 3).



Slika 1: Sečni mehur s sečnico in sečevodom (levo - sečni mehur se polni s sečem, desno - iztis seča iz mehurja v sečnico) (4).

Oblika in položaj sečnega mehurja sta odvisni od njegove trenutne funkcionalne faze kakor tudi od funkcionalne faze sosednjih organov za njim, to je od danke pri moškem in od maternice pri ženski. Prazen mehur je kolabiran, ohlapen in skrit za simfizo. Ko se pa polni,

se širi v vse smeri, dobiva okroglo obliko in se dviga tako, da poln mehur lahko otipljemo nad simfizo (1).

Pri mehurju opisujemo:

- ***corpus vesicae*** – to je telo mehurja,
- ***fundus vesicae*** – spodnji, zadnji del mehurja, v katerega se odpirata sečevoda in iz katerega izhaja sečnica,
- ***apex vesicae*** – zgornji del ali vrh mehurja (1).

Stena mehurja je močna in kaže **tri plasti**:

- **notranjo plast – sluznica**

Sluznica je notranja, zaščitna plast nekaterih votlin in cevastih organov. Je sočna in bledorožnate barve, na podlago pa jo pripenja rahla *tunica submukosa*. Sestavljena je iz *lamina propria* in epitelija, ki leži na bazalni lamini. Prazen mehur ima debelo steno in nagubano sluznico, poln pa razpotegnjeno in tanko steno ter gladko notranjo površino. Sluznico vseh notranjih traktov v organizmu (respiratornega, gastrointestinalnega, urogenitalnega trakta in očesno sluznico) prekriva sluz, ki sodeluje pri bioadheziji kot biološka komponenta.

- **srednjo plast – mišična plast**

*Tunica muscularis* je krepka gladka muskulatura, ki je razporejena v treh plasteh. Sestavlja jo longitudinalne in cervicalne vitre, ki so pomešane z elastičnim vezivom.

- **zunanjo plast – seroza**

Veže sečnico z okoljem. Sestavljena je predvsem iz vezivnega tkiva, ki ga obdaja tanek sloj mezotelijskih celic (1, 2, 3, 5).

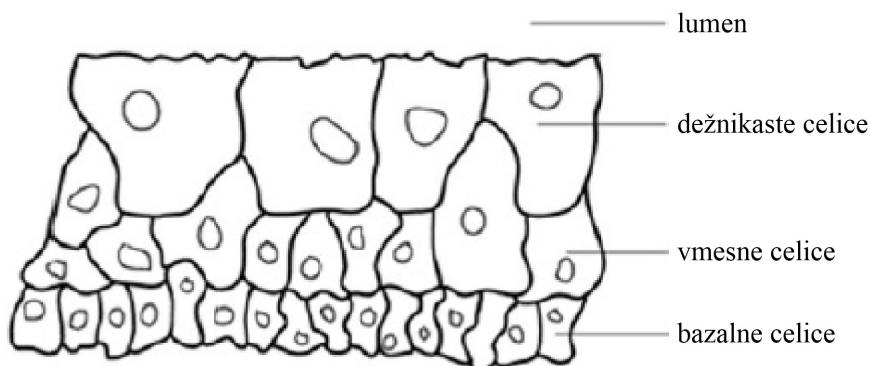
## 1.2. Urotelij

Sečni mehur in ostala sečila na notranji luminalni površini pokriva urotelij. Njegova primarna fiziološka funkcija je ta, da zmanjša reabsorbcijo škodljivih komponent urina ter da ohranja njegovo sestavo in koncentracijo takšno, kot so ga izločile ledvice. Funkcija urotelija kot fiziološke ovire je odvisna od lastnosti, izraženih na molekularnem nivoju in pridobljenih med procesom celične diferenciacije. Urin je pogosto hipertoničen, zato je nizka prepustnost urotelija za neelektrolite z nizko molekulsko maso, kot na primer za sečnino in amoniak, ključnega pomena (5).

Urotelij imenujemo tudi prehodni epitelij, ki ga sestavljajo tri do štiri plasti celic (slika 2). Je endodermalnega izvora in leži na lamini propria. Na površini ga prekriva sluz, ki sodeluje pri bioadheziji kot biološka komponenta. Pomembna sestavina sluzi sečnega mehurja so glikozaminoglikani. **Glikozaminoglikani** so polisaharidi, ki so negativno nabiti. Lahko so prosti ali vezani na proteoglikane, najdemo pa jih tudi v urinu in v steni sečnega mehurja. V svojo strukturo vključujejo sledeče sulfate: heparan sulfat, hondroitin sulfat, dermatan sulfat in keratan sulfat. Glikozaminoglikanske molekule preko **negativnega naboja sulfatnih skupin** pomembno vplivajo na lastnosti sluzi kot na primer na bioadhezivno sposobnost. Sluz sečnega mehurja vsebuje malo glikoproteinov, so pa pomembna sestavina sluzi v prebavnem traktu. Glikoproteinom dajejo negativni nabolj sulfatne skupine, pomembna pa je tudi sialična kislina (6).

### Plasti celic urotelija:

- **nediferencirane bazalne celice** (premer = 5-10 µm)  
So celice, ki imajo močno bazofilno citoplazmo. Lahko so kubične ali stebričaste oblike in ležijo na tanki basalni lamini, na katero so pritrjene s hemidezmosomi.
- **delno diferencirane vmesne celice** (premer = 20 µm)  
Vsebujejo več lizosomov kot basalne celice, zato njihova citoplazma zgleda manj bazofilna. Z ostalimi celicami so povezane z dezmosomi.
- **visoko diferencirane dežnikaste celice** (premer je odvisen od napolnjenosti mehurja z urinom)  
So ploščate celice, katerih citoplazma ni več tako močno bazofilna. Vsebujejo veliko število lizosomov. Celice so med seboj povezane z dezmosomi ali s tesnimi oziroma adherentnimi stiki (5).



Slika 2: Prikaz plasti celic urotelija (3)

Bazalne in vmesne celice nimajo morfoloških posebnosti, medtem ko jih dežnikaste celice imajo. Posebnost je ta, da je apikalna membrana prekrita s plaki. Ti v premeru merijo ~ 0,5 µm, njihova debelina je 12 nm in zavzemajo kar 70–90 % apikalne površine celic. Zgrajeni so iz podenot (~1000) in imajo šestkotno obliko. Vsaka podenota ima notranji (vsebuje šest velikih proteinov) in zunanji obroč (vsebuje šest majhnih proteinov). Proteini, ki sestavljajo plake, se imenujejo uroplakini. Opisani so štirje uroplakini, in sicer UP1a, UP1b, UPII in UPIII z molekulsko maso 27, 28, 15 in 47 kDa. UP1a in 1b imata visoko stopnjo homologije in pripadata skupini proteinov s štirimi transmembranskimi domenami. UPII in UPIII spadata v skupino beljakovin s samo eno transmembransko domeno. Plaki tvorijo v citoplazmi dežnikastih celic veliko citoplazemskih mehurčkov, kar pomembno vpliva na permeabilnost urotelija in fizikalno stabilnost apikalne površine sluznice (3, 7).

### 1.3. Bioadhezija

Bioadhezija je zapleten pojav. V ožjem pomenu jo opisujemo kot sposobnost snovi, da se veže na biološko komponento za daljši čas. Kadar gre za adhezijo bioadhezivnega pripravka (polimera) na sluz ali sluznico, govorimo o mukoadheziji. Pri tem ima pomembno vlogo voda, ki omogoča hidratacijo, razširitev in prepletanje verig obeh komponent. Bioadhezivne farmacevtske oblike imajo številne prednosti pred drugimi klasičnimi dostavnimi sistemi: omogočajo lokalizacijo oblike na želenem mestu, kar izboljša biološko uporabnost, podaljšajo čas zadrževanja oblike na mestu adhezije in omogočajo tesen stik oblike z membrano, skozi katero se lahko učinkovina absorbira. Bioadhezivne farmacevtske oblike se lahko aplicira na različne sluznice v organizmu. Aplikacija je lahko peroralna, oralna, nazalna, rektalna, cervikalna, vaginalna, okularna in intravezikalna (v sečni mehur) (8, 9).

Mehanizmi, odgovorni za interakcije pri procesu bioadhezije, niso v celoti poznani, vendar večina raziskav nakazuje, da se le-ti odvijajo v **več stopnjah**.

1. V prvi fazi pride do tvorbe stika med bioadhezivom in tkivom. Da je le-ta ustrezno tesen, mora polimer dobro močiti površino tkiva, kar je pomembno predvsem pri tekočih farmacevtskih oblikah. Pri trdnih farmacevtskih oblikah pa je ključnega pomena prisotnost vode, ki omogoča nabrekanje polimera.

Na interakcijo med polimerom in tkivom pa vplivajo tudi drugi dejavniki. Povezani so:

- s polimerom (molekulska masa, koncentracija, fleksibilnost verige) ali
- z okoljem (pH tkiva, patološko stanje tkiva) (9, 10).

**2.** V naslednji fazi molekule polimera penetrirajo v gube tkiva, pride pa lahko tudi do interpenetracije verig pripravka in glikoproteinov. Tu je pomembno, kakšno je razmerje med največjo globino in širino gube; večje kot je, boljši je proces bioadhezije (10).

**3.** Temu sledi tvorba kemijskih vezi. Lahko pride do tvorbe ionskih, kovalentnih, vodikovih vezi ali hidrofobnih ter Van der Waalsovih interakcij. Slednji sta pri bioadheziji najpogosteje (10).

**4.** Na koncu bioadhezije pride do ločitve površin (10).

Vezavo polimera na površino sluznice delimo v **tri kategorije**:

- **adhezija s pomočjo hidratacije:**

Nekateri hidrofilni polimeri vežejo veliko količino vode, postanejo adhezivni in s tem pokažejo bioadhezivne lastnosti.

- **adhezija preko tvorbe kemijskih vezi:**

V bioadheziji so napogosteje sekundarne kemijske vezi (Van der Waalsove, vodikove).

- **adhezija preko receptorjev:**

Nekateri polimeri se vežejo na specifične receptorje na celični površini.

### **Adhezija s pomočjo hidratacije**

Ko pride polimer v stik s sluzjo, ki vsebuje veliko vode, nabrekne in tvori gel. Ob prisotnosti vode najprej bioadheziv hidratira, nato se njegove verige razširijo, kar omogoča medsebojno interpenetracijo verig polimera in glikoproteinov na površini sluznice. Pri tem je pomembno, katere vrste in koliko hidrofilnih skupin vsebuje bioadhezivni polimer, ključno vlogo pa igrata tudi pH ter ionska moč vodnega medija. Vse to vpliva na količino vode, ki jo je sposoben vezati polimer, in tudi na hitrost, s katero jo veže (10).

Uspešnost bioadhezije je odvisna od stopnje hidratacije, njen maksimum pa je dosežen pri optimalni stopnji hidratacije. V primeru, da je na razpolago premalo vode, pride le do delne hidratacije bioadheziva. Sprosti se le del polimerih verig, zato ne pride do interakcij na vseh mestih, ki imajo sicer sposobnost tvoriti bioadhezivne vezi. Kadar pa je na razpolago večja količina vode, bioadhezivne vezi postanejo šibkejše oziroma se popolnoma prekinejo, saj se poveča razdalja med aktivnimi skupinami polimera in substrata. Ustrezna količina vode med polimerom in sluzjo omogoča, da pride do popolnega prekrivanja med skupinami na

polimeru, ki so primerne za bioadhezijo in mestih na substratu. Takrat je proces bioadhezije najuspešnejši (9, 10).

### Adhezija preko tvorbe kemijske vezi

- **ionske vezi**

To so močne vezi in nastanejo kot privlak med nasprotno nabitimi ioni.

- **kovalentne vezi**

Nastanejo med atomi kot skupni oziroma vezni elektronski par. So prav tako močne vezi.

- **vodikove vezi**

Vodikova vez je elektronski privlak med elektropozitivnim vodikovim atomom in neveznimi elektronskimi pari elektronegativnega atoma. Je šibkejša od ionskih in kovalentnih vezi.

- **Van der Waalsove interakcije**

So šibke privlačne sile med molekulami, ki jih povzroča neenakomerna razporeditev in gibanje elektronov v atomih molekul. Delujejo na zelo kratkih razdaljah in so bistveno šibkejše od kovalentnih in ionskih vezi.

- **hidrofobne interakcije**

Gre za težnjo, da ogljikovodiki tvorijo medmolekulse skupke v polarnih topilih oziroma vodi (11, 12).

### Lastnosti bioadhezivnih polimerov:

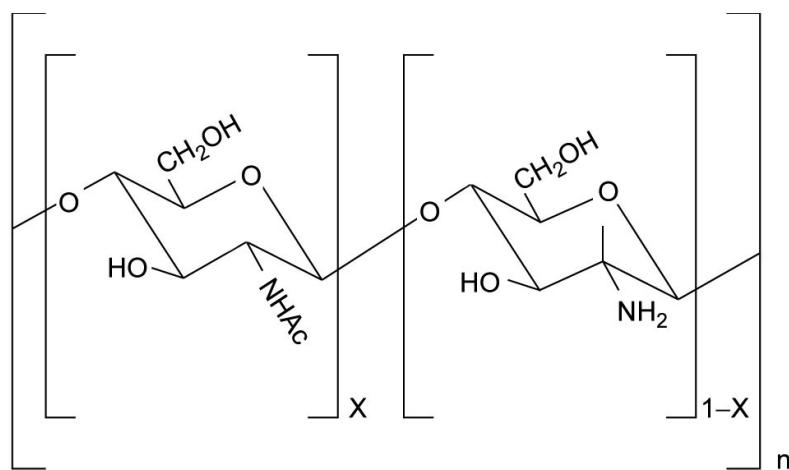
- **fleksibilnost** – je pomembna, ker kontrolira obseg interpenetracije med polimerom in sluznico;
- **hidrofilnost** – hidrofilni polimeri so sposobni tvoriti bioadhezivne vezi s plastjo sluznice, ravno tako pa pride do hidratacije. Najprimernejši so polimeri, ki imajo naslednje funkcionalne skupine, in sicer karboksilne, hidroksilne, aminske in sulfatne;
- **tvorba vodikovih vezi** – omogočajo dobro adhezijo, za kar so potrebne ustrezenne funkcionalne skupine (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH);
- **visoka molekulska masa** – zmožnost bioadhezije narašča z molekulsko maso polimera, vendar pa je maksimum bioadhezivne vezi od 450 kDa do 750 kDa. Daljše verige so namreč slabo gibljive in se slabo prepletajo;
- **površinska napetost** – potrebna je, saj omogoča širjenje polimera v sluznično plast epitelija (10).

Najbolj raziskana skupina mukoadhezivov so hidrofilne polimerne molekule, ki lahko tvorijo vodikove vezi. Pravimo jim prva generacija mukoadhezivov. Na začetku so se uporabljali v prahu za fiksno pritrdiritev protez ali v pastah. Prisotnost hidroksilnih, karboksilnih in amino skupin prispeva k adheziji. Pravijo jim tudi »mokri« adhezivi, ker se aktivirajo ob prisotnosti vlage in se adherirajo na številne površine. Tipični predstavniki so karbomeri, **hitosan**, natrijev alginat in derivati celuloze (9, 10).

## 1.4. Hitosan

### 1.4.1. Splošne lastnosti hitosana

Hitosan je naravni linearji kopolimer 2-acetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranove (*N*-acetil-D-glukozamin) in 2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranove (D-glukozamin), ki sta povezani preko  $\beta$ -(1-4) vezi (slika 3). Veriga ogljikovih hidratov je zelo podobna celulozi, ki je sestavljena iz D-glukozamina (povezanega z  $\beta$ -(1-4) vezjo). Najdemo ga v nekaterih mikroorganizmih ter glivah (kvasovke), vendar pa se v glavnem uporablja hitosan, pridobljen z delnim deacetiliranjem hitina. V zadnjih dvajsetih letih mu posvečajo veliko pozornosti predvsem zaradi biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, nizke toksičnosti in vsestranske biološke uporabnosti (13–16).

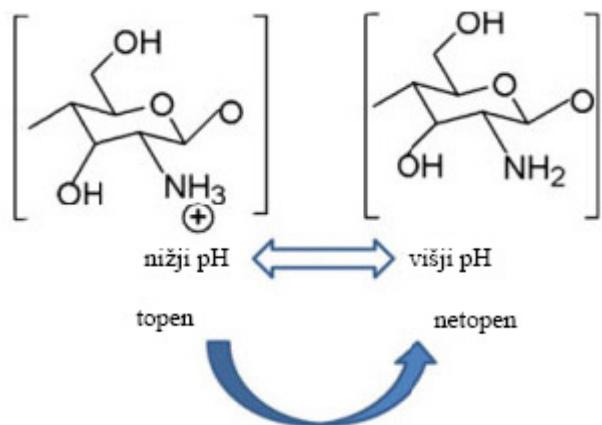


Slika 3: Struktura hitosana; X pomeni stopnjo acetiliranja, n pa število sladkornih enot polimera (13).

Predlaganih je bilo kar nekaj metod hidrolize acetata, nekatere izmed njih vključujejo natrijev in kalijev hidroksid, spet druge zmes brezvodnega hidrazina ter hidrazin sulfata in tretje

encimsko hidrolizo ob prisotnosti hitin deacetilaze. Ob razpadu se amino skupine polimera protonirajo in tako postanejo aktivne (13–16).

Hitosan je šibka baza (njegov pKa je od 6,2–7,0) in izkazuje občutljivost na pH zaradi velikih količin amino skupin na svoji verigi (slika 4). Prične se raztopljaliti, ko se na mestu C2 v ponavljajoči enoti D-glukozamina protonirajo  $-\text{NH}_2$  funkcionalne skupine. Polisaharid se tako pretvori v polielektrolit. Za razliko od hitina, ki je slabo topen v vodnih raztopinah, je hitosan topen v razredčenih raztopinah kislin do pH 6 (pri teh pH-jih je namreč velik delež amino skupin protoniran), pri pH nad 6,5 (nevtralen in bazičen medij) so amino skupine neprotonirane in polimer postane netopen. Prehod med topnostjo in netopnostjo tako nastopi med pH 6,0 in 6,5. Topnost pa ni odvisna samo od pH, temveč tudi od stopnje in metod deacetiliranja in tudi drugih parametrov kot na primer od molekulske mase. Hitosan z relativno nizko stopnjo deacetiliranja (40 %) je topen do pH 9, medtem ko je hitosan s stopnjo deacetiliranja (približno 85 %), topen do pH 6,5. Na topnost vpliva tudi dodatek soli k raztopini. Pri višji ionski moči je topnost manjša (13–16).



Slika 4: Prikaz hitosana v odvisnosti od pH (14)

#### 1.4.2. Biorazgradljivost hitosana

Zelo malo je podatkov o *in vivo* razgradnji hitosana. Narejen je bil poskus pri kuncu, ki so mu intravensko aplicirali hitosan. Opazili so, da je encim lizocim cepil  $\beta$ -1-4-glikozidno vez. Študija, kjer so hitosan uporabili peroralno, je pokazala, da je prišlo do encimske hidrolize povezav glukozamin-glukozamin, glukozamin-*N*-acetil-glukozamin in *N*-acetil-glukozamin-*N*-acetil-glukozamin (14).

### 1.4.3. Toksičnost hitosana

Hitosan je označen kot netoksičen biokompatibilen polimer. Do teh ugotovitev so prišli v številnih *in vitro* in *in vivo* študijah.

- ***In vitro* toksičnost**

Schipper (17) je izvedel serijo študij na Caco-2 celicah. Spremljal je intracelularno aktivnost encima dehidrogenaze. Kadar so celice poškodovane ali odmrejo, se aktivnost encima zmanjša oziroma je ni več. Uporabil je hitosan z različno stopnjo acetiliranja. Ugotovil je, da je pri visoki stopnji acetiliranja ( $> 35\%$ ) toksičnost nizka; aktivnost encima se ni spremenila, pri nizki stopnji acetiliranja ( $< 35\%$ ) pa je toksičnost večja; aktivnost encima se je bistveno zmanjšala. Kljub temu se je izkazalo, da je uporaba hitosana varna. To so dokazali s testom hemolize rdečih krvnih celic. Hemolize niso opazili ( $< 10\%$ ) niti po eni niti po petih urah inkubacije celic v disperziji hitosana (z molekulsko maso 5 kDa, 5-10 kDa in  $>10$  kDa) s koncentracijo do 5 mg/mL.

- ***In vivo* toksičnost**

V številnih študijah, ki so bile opravljene na miših, podganah, kuncih, morskih prašičkih itd., ni bilo ugotovljenih škodljivih učinkov hitosana. Nima vpliva na povečanje telesne teže, ne povzroča alergij, draženj, večjih sprememb na sluznicah in je sprejet kot varen material za dostavo zdravil (14).

### 1.4.4. Bioadhezivne lastnosti hitosana

Pri fiziološkem pH imajo sulfatne skupine glikozaminoglikanov negativen naboj, kar omogoča ionske interakcije s pozitivno nabitimi molekulami. To je najverjetneje glavni princip za bioadhezijo pri hitosanu, kationskemu bioadhezivnemu polimeru. Nasprotno pa so polimeri poliakrilne kisline, znani kot karbomeri in karbopoli (so negativno nabiti-anionski polimeri), prav tako bioadhezivni, saj ostali fizikalno-kemijski procesi, kot hidrofobne, van der Waalsove in vodikove interakcije, prispevajo k bioadheziji (8).

V študiji, ki sta jo izvedla Amiji in Qaqish (18), sta s polarizacijsko metodo proučevala interakcije med fluorescenčno označenim hitosanom in govejim mucinom. Hitosan sta označila s FITC-em zaradi lažjega razumevanja mehanizma bioadhezivne interakcije. Uporabila sta hitosan z različnimi molekulskimi masami ter z različnimi pH vrednostmi in ionsko močjo raztopin. Ugotovila sta, da je za sposobnost bioadhezije primarnega pomena interakcija med amino skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino sluzi. Poleg

tega pa naj bi prišlo tudi do tvorbe vodikovih in hidrofobnih interakcij med D-glukozaminom in sialično kislino. Opazila pa sta tudi to, da pride do več povezav z mucinom pri uporabi visoko molekularnega kot nizko molekularnega hitosana.

Da hitosan izkazuje dobre bioadhezivne lastnosti, potrjujejo številne raziskave. Precej jih je bilo opravljenih na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. V eni izmed njih (19) so izdelali mikrosfere, namenjene intravezikalni aplikaciji. Vlogo zdravilne učinkovine je imela pipemidna kislina, ogrodne snovi Eudragit RS, mukoadhezivnih polimerov pa hitosanijev klorid (CH), natrijeva sol karboksimetil celuloze (CMC) ali polikarbofil (PC). Spremljali so sproščanja pipemidne kisline iz mikrosfer, ki so jih adherirali na zdravo ali poškodovano sluznico izoliranega sečnega mehurja. Ko so mikrosfere adherirali na zdravo sluznico je bila stopnja sproščanja pipemidne kisline sledeča: PC > CMC > CH, ko pa na poškodovano pa: PC = CH > CMC. Dobljeni rezultati kažejo na pomembnost interakcije med glikozaminoglikani na površini sluznice in polimerom CH; pri patološko spremenjenem modelu sluznice je le-te torej bistveno manj, ker je na razpolago manj glikozaminoglikanov. Dobljene rezultate so razložili še s poskusom merjenja jakosti bioadhezije. Ugotovili so, da je bila le-ta največja pri uporabi CH filmov, zato je bila tudi stopnja sproščanja učinkovine pri uporabi tega bioadhezivnega polimera najmanjša (20).

Bioadhezivne lastnosti hitosana so ovrednotili tudi pri naslednji študiji. Spremljali so čas adhezije mikrosfer na izoliranem prašičjem tankem črevesu z uporabo različnih polimerov – karbopola, hitosana in metil celuloze. Čas mukoadhezije je bil najdaljši pri hitosanu zaradi elektrostatske privlačnosti med pozitivno nabitim hitosanom in negativno nabito sialično kislino sluzi. Metil celuloza in karbopol sicer izkazujeta mukoadhezivne lastnosti, vendar so le-te slabše, ker v njuni strukturi ni pozitivno nabitih funkcionalnih skupin, ki bi lahko vstopale v interakcije z negativno nabito sluzjo in tako izboljšale adhezijo nanjo (20).

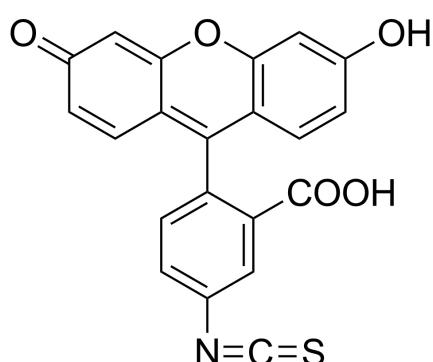
V zadnjih letih je bilo opravljenih veliko raziskav s hitosanom. Zaradi njegovih dobrih bioadhezivnih lastnosti se povečuje težnja po njegovi uporabi za farmacevtske namene. Varshosaz in sodelavci (21) so pri transdermalni dostavi lokalnega anestetika lidokaina, ki je bil v obliki soli, želeti podaljšati njegov anestetični učinek. Poskus so naredili na koži podgane. S tenziometrično metodo so merili jakost bioadhezije in spremljali razlike pri uporabi navadnega gela (vseboval je le lidokain) in gela, ki je poleg lidokaina vseboval še hitosan. Rezultati so pokazali, da hitosan podaljša čas zadrževanja farmacevtske oblike na mestu aplikacije.

### 1.4.5. Vpliv hitosana na permeabilnost sluznice

Za sluznico sečnega mehurja je značilna nizka permeabilnost. Neprepustna je za substance, ki so prisotne v urinu, kar je za organizem v osnovi pozitivno. Za nizko permeabilnost so odgovorni uroplakini, glikozaminoglikani in tesni stiki urotelija. Intravezikalno zdravljenje okužb ali drugih patoloških stanj sečnega mehurja pa je zaradi slabega prehajanja učinkovine iz lumna v steno sečnega mehurja oteženo, še bolj jo pa otežuje kratek čas ohranjanja zdravilne učinkovine v lumnu mehurja. Koncentracija zdravilne učinkovine v steni sečnega mehurja je tako pogosto pod terapevtsko. Ta problem so poskusili rešiti z uporabo mukoadhezivnih polimerov. V raziskavi (22), ki je potekala na prašičjem sečnem mehurju, so uporabili polimera hitosan in polikarbofil. V obeh primerih so opazili, da se je ob prisotnosti polimera povečal prehod učinkovine (pipemidne kisline) v steno mehurja. Vzrok za povečano permeabilnost stene sečnega mehurja je v tem, da hitosan povzroči luščenje dežnikastih celic, polikarbofil pa odpira tesne stike urotelija.

## 1.5. Fluorescein izotiocianat

Fluorescein izotiocianat je derivat fluoresceina. Z njim se pogosto srečamo v (bio)organski kemiji. Najpogosteje se uporablja za označevanje spojin, ki se jih nato opazuje s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa. Je oranžno rdeče barvilo, ki fluorescira zeleno. V njegovi strukturi je pomembna reaktivna izotiocianatna skupina ( $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ), ki lahko reagira z amino in sulfhidrilno skupino proteinov (slika 5). V zelo kislem okolju ( $\text{pH} < 2$ ) je v obliki kationa. Pri  $\text{pH}$ , približno 3,3, je praviloma v nevtralni obliki, pri  $\text{pH}$ , približno 5,5, v monoanionski obliki in pri bazičnih pogojih ( $\text{pH} > 8$ ) v obliki dianiona (23, 24).



Slika 5: Strukturna formula fluorescein izotiocianata

## 2. NAMEN DELA

V zadnjem času se hitosanu posveča veliko pozornosti za farmacevtske namene. Glavni razlogi za povečanje zanimanja so njegova biorazgradljivost, biokompatibilnost in netoksičnost. Tudi na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko se že nekaj časa ukvarjajo z raziskovanjem farmacevtskih oblik s hitosanom za intavezikalno aplikacijo, poudarek pa je predvsem na izboljšanju jakosti adhezije in permeabilnosti.

Označevanje hitosana s FITC-em omogoča opazovanje porazdeljevanja polimera na površini sluznice tkiva. Namenski del je ugotoviti, ali vezava FITC-a na hitosan vpliva na jakost adhezije hitosana na sluznico izoliranega prašičjega sečnega mehurja. Za poskus bomo uporabili tenziometrično metodo, pri čemer bomo merili silo, ki je potrebna za ločitev polimernega filma neoznačenega ozziroma označenega hitosana od izolirane sluznice. Pred vzpostavitvijo bioadhezivne interakcije bomo sluznico hidratirali s pufri različne sestave, da bomo ugotovili, ali morda ionska moč vpliva na jakost bioadhezije. Spremljali bomo tudi, ali pride pri vezavi FITC-a na hitosan do sprememb v hidrataciji in zeta potencialu.

Predvidevamo, da konjugacija hitosana s FITC-em zmanjša jakost bioadhezije. FITC se namreč veže na primarno amino skupino hitosana. Tako jih je na razpolago manj za interakcije z glikozaminoglikani na površini sluznice prašičjega sečnega mehurja.

Med filmi neoznačenega in označenega hitosana naj ne bi bilo večjih razlik v hidrataciji. FITC sicer zasede proste amino skupine na hitosanu, zaradi česar se lahko zmanjša količina vezane vode na teh polimernih filmih, vendar pa ima FITC v svoji strukturi hidrofilne skupine, ki prispevajo k hidrataciji.

Domnevamo, da bo pri merjenju zeta potenciala prišlo do razlik med polimeroma, saj ima neoznačen hitosan v primerjavi z označenim več prostih  $-NH_2$  skupin, ki se lahko protonirajo v kislem mediju, kar pomembno vpliva na vrednost zeta potenciala.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1. Materiali

- ❖ Polimer:
  - Hitosanijev klorid, Protasan UP CL 213 (stopnja deacetiliranja 86 %), Novamatrix, Drammen, Norveška
- ❖ Topila:
  - Demineralizirana voda, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija
- ❖ Tkivo:
  - Sečni mehur prašiča, Celjske mesnine, d. d, Celje, Slovenija
- ❖ Material za potrebe zamrzovanja:
  - Tekoči dušik, Messer Group GmbH, Bad Soden, Nemčija
  - Medij za zamrzovanje tkiva, Jung, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Nemčija
- ❖ Druge snovi:
  - Klorovodikova kislina, Titrisol za 1 mol/L, Merck, Darmstadt, Nemčija
  - Natrijev hidroksid, Titrisol za 1 mol/L, Merck, Darmstadt, Nemčija
  - Natrijev klorid, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
  - Pufrna raztopina pH = 4, Kefolab, Ljubljana, Slovenija
  - Pufrna raztopina pH = 7, Kefolab, Ljubljana, Slovenija
  - Kalcijev karbonat, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
  - Dinatrijev hidrogen-fosfat dodekahidrat, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
  - Kalijev dihidrogen-fosfat, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
  - 100 % ocetna kislina, Merck, Darmstadt, Nemčija
  - Fluorescein izotiocianat izomer I, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, ZDA

### 3.2. Aparature in pribor

- Analitska tehnica, Mettler Toledo H 54 AR, Zürich, Švica
- Elektronska tehnica, Mettler Toledo AB 54-S, Zürich, Švica
- Elektromagnetno mešalo, R05 power, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemčija
- Zetasizer Nano, Malvern Instruments, Velika Britanija
- pH meter, Mettler Toledo MP 220, Zürich, Švica
- Optični mikroskop, Olympus BX 50, Olympus America Inc., Center Valley, ZDA
- Liofilizator, Beta 1-8K, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Nemčija
- Hladilnik, LTH, Škofja Loka, Slovenija
- Štoparica Casio W-732H, Tokio, Japonska
- Zamrzovalnik, Gorenje, Velenje, Slovenija
- Filter, Rundfilter Ø 70 mm, Schleicher & Schnell GmbH, Dassel, Nemčija
- Polavtomatske pipete (2–20 µL, 20–200 µL), Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Plastične epice (2,5 mL), Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Membrana za dializo, Spectra/Por® Membrane, MWCO: 3.500, Spectrum Medical Industries Inc., Houston, ZDA
- Stekleni inventar: merilni valji, čaše, merilne bučke, lij za vakuumsko filtriranje, palčke za mešanje, objektna stekelca, polnilna pipeta (5 mL)
- Ostali inventar: Parafilm® M, spatule, tehtalni čolnič

### 3.3. Metode dela

#### 3.3.1. Priprava pufrov, raztopin in disperzij

- **Izotonični fosfatni pufer (PBS)**

En liter izotoničnega fosfatnega pufra smo pripravili tako, da smo v merilno bučko kvantitativno prenesli 8,0 g NaCl, 2,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O in 0,19 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ter dodali demineralizano vodo do oznake. Vse skupaj smo dobro premešali, da so se vse snovi raztopile. S pomočjo 1,0 M NaOH ali 1,0 M HCl smo pH umerili na 7,4 (Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed.).

- **Fosfatni pufer (PB)**

En liter fosfatnega pufra smo pripravili tako, da smo v merilno bučko kvantitativno prenesli 1,6 g NaCl, 1,19 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  in 0,095 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ter dodali demineralizirano vodo do oznake. Vse skupaj smo premešali, da so se snovi raztopile, in z 1,0 M NaOH ali 1,0 M HCl pH umerili na 4,5 (Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed.).

- **Fosfatni pufer z dodanimi kalcijevimi ioni (PB + 0,2 M Ca)**

V čašo smo natehtali 10,0 g  $\text{CaCO}_3$  in počasi dodajali 1 M HCl (200 mL). Pustili smo nekaj časa, da se je vse premešalo na magnetnem mešalu, nato pa vse skupaj kvantitativno prenesli v 0,5 L merilno bučko. V drugo čašo smo natehtali 0,8 g NaCl, 0,595 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  in 0,0475 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dodali malo demineralizirane vode in dobro premešali, da so se vse snovi raztopile. Nato smo še to prenesli v merilno bučko in dopolnili do oznake z demineralizirano vodo. Z uporabo 1 M NaOH ali 1 M HCl smo umerili pH na 4,5.

- **Fosfatni pufer z dodanimi natrijevimi ioni (PB + 0,4 M Na)**

V čašo smo natehtali 12,5 g NaCl, 0,595 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 0,0475 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Vse skupaj smo kvantitativno prenesli v 0,5 L merilno bučko ter jo dopolnili do oznake. Nato smo dobro premešali, in ko so se vse snovi raztopile, z 1 M NaOH ali 1 M HCl umerili pH na 4,5.

- **0,1 M raztopina acetne kisline**

Raztopino 0,1 M acetne kisline smo pripravili tako, da smo v 100 mL merilno bučko odpipetirali 575  $\mu\text{L}$  100 % acetne kisline in dopolnili do oznake z demineralizirano vodo.

- **Priprava raztopine FITC-a s koncentracijo 2 mg/mL**

V 25 mL merilno bučko smo natehtali 50 mg FITC-a in z brezvodnim metanolom dopolnili do oznake. Raztopino smo dali na magnetno mešalo, da se je dobro razmešala.

- **Priprava 1,0 % (ut/vol) disperzije CH v acetni kislini**

V 50 mL erlenmajerico z obrusom smo natehtali 500 mg CH in z 0,1 M acetno kislino dopolnili do oznake. Pustili smo čez noč, da se je ves hitosan ob mešanju na magnetnem mešalu razmešal in raztopil.

- **Priprava 2,5 % (ut/vol) disperzije CH za vlivanje filmov**

V erlenmajerico z obrusom smo odpipetirali 2,5 mL demineralizirane vode, kamor smo počasi med mešanjem na magnetnem mešalu dodali še 125 mg CH, nato pa še preostalo vodo (2,5 mL). Pustili smo čez noč, da se je CH raztopil. Nastalemu disperznemu sistemu smo izmerili pH, ki je bil od 4,4 do 4,7. Pri takšnem pH je disperzija primerno viskozna in omogoča lažje vlivanje filmov. Tako pripravljeno disperzijo smo hranili v hladilniku (vendar ne več kot dva dni) pri 4 °C, dodatno zaščiteno pred izhlapevanjem vode s parafilmom.

- **Priprava 2,5 % (ut/vol) disperzije FITC-CH za vlivanje filmov**

Priprava disperzije FITC-CH je identična pripravi disperzije CH. Razlika je le v tem, da moramo imeti tako pripravljen disperzni sistem ves čas ustrezno zaščiten pred svetlobo (na primer z aluminijasto folijo). Tudi tu moramo preveriti pH, ki mora biti primerljiv s pH disperzije navadnega CH. Če le-ta ni bil 4,4–4,7, smo ga uravnali s pomočjo 1 M NaOH oziroma 1 M HCl.

- **Priprava 0,05 % (ut/vol) disperzije CH v PB za merjenje zeta potenciala**

V 25 mL merilno bučko smo natehtali 62,5 mg CH in s pufrom dopolnili do oznake. Bučko smo postavili na magnetno mešalo in pustili čez noč, da se je hitosan raztopil in razmešal. Naslednji dan smo 5 mL disperzije s polnilno pipeto prenesli v 25 mL bučko in s pufrom dopolnili do oznake ter dobro premešali. Če pH disperzije ni bil 4,4–4,7, smo ga uravnali z 1 M NaOH oziroma 1 M HCl.

- **Priprava 0,05 % (ut/vol) disperzije FITC-CH v PB za merjenje zeta potenciala**

Priprava 0,05 % (ut/vol) disperzije označenega CH v PB je identična pripravi 0,05 % (ut/vol) disperzije CH v PB. Poskrbeti pa moramo še za to, da je disperzija zaščitena pred svetlobo in da je pH primerljiv s pH 0,05 % (ut/vol) disperzije CH v PB. Če pH disperzije FITC-CH ni bil 4,4–4,7, smo ga uravnali z 1 M NaOH oziroma 1 M HCl.

- **Priprava 0,5 % (ut/vol) disperzije CH v PB za merjenje zeta potenciala**

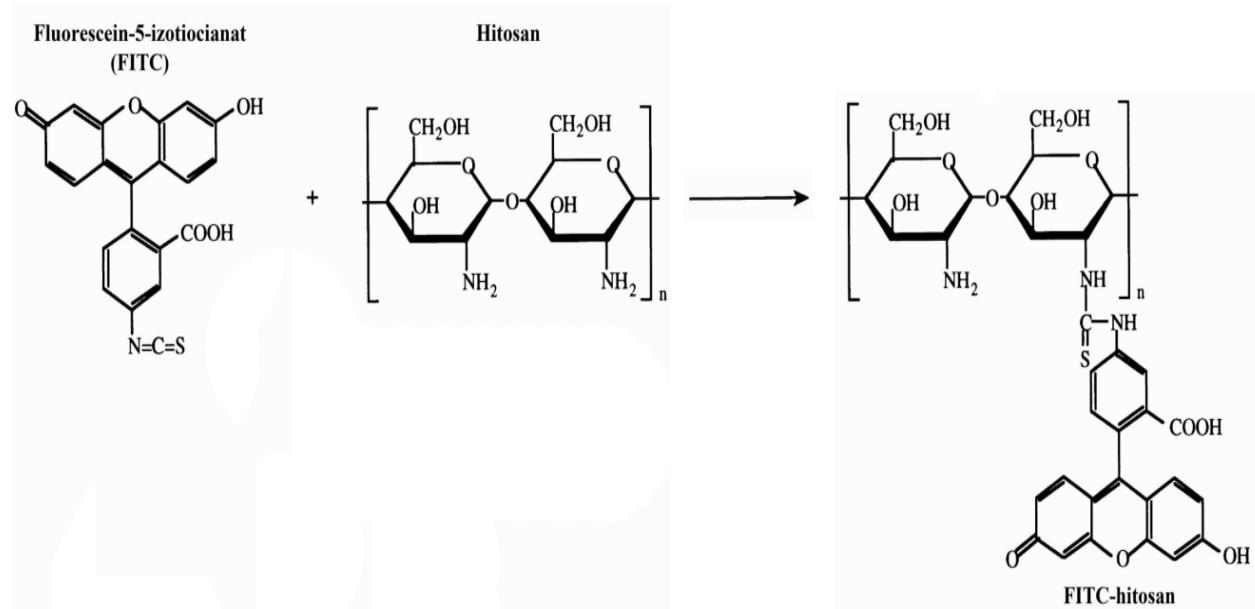
V 5 mL merilno bučko smo natehtali 25 mg CH in dopolnili do oznake s pufrom. Pustili smo čez noč, da se je CH ob mešanju na magnetnem mešalu raztopil. Če pH disperzije ni bil 4,4–4,7, smo ga uravnali z 1 M NaOH oziroma 1 M HCl.

- Priprava 0,5 % (ut/vol) disperzije FITC-CH v PB za merjenje zeta potenciala**

Priprava 0,5 % (ut/vol) disperzije označenega hitosana v PB je identična pripravi 0,5 % (ut/vol) disperzije CH v PB. Poskrbeti pa moramo še za to, da je disperzija zaščitena pred svetlobo in da je pH primerljiv s pH 0,5 % (ut/vol) disperzije CH v PB. Če pH disperzije ni bil 4,4–4,7, smo ga uravnali z 1 M NaOH oziroma 1 M HCl.

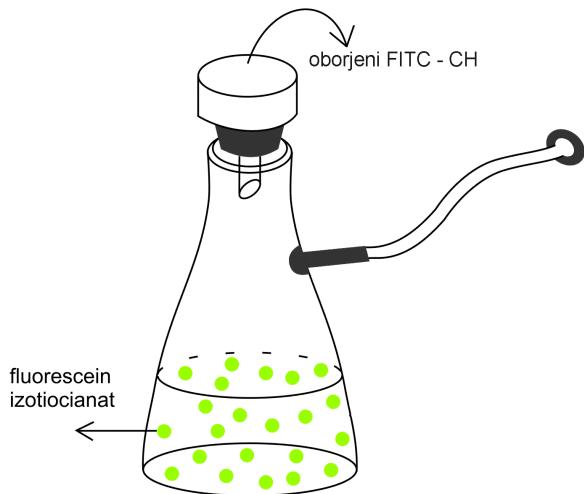
### 3.3.2. Označevanje CH s FITC-em

V čašo, ki je vsebovala 50 mL 1,0 % (ut/vol) disperzije CH v ocetni kislini, smo počasi med konstantnim mešanjem dodajali 25 mL raztopine FITC-a s koncentracijo 2 mg/mL. Tako pripravljeno zmes smo pustili mešati 3 ure v temi pri sobni temperaturi, da je potekla reakcija (slika 6). Po 3 urah smo nastali FITC-CH oborili z dodatkom 0,2 M NaOH, ki smo ga predhodno pripravili iz 1M NaOH. Nastala oborina je bil pravzaprav gel.



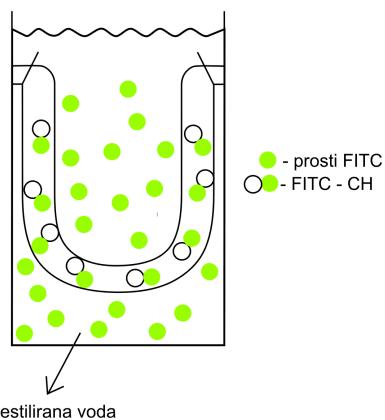
Slika 6: Nastanek FITC-CH iz fluorescein izotiocianata in hitosana (18)

Nato smo oborino izolirali s pomočjo vakuumskega filtriranja (slika 7). Velikost por filter papirja je bila takšna, da je prepuščal prosti FITC, ne pa tistega, ki se je vezal na hitosan. Oborino smo dodatno spirali z 0,2 M NaOH, da smo vzdrževali alkalen pH. V kislem mediju bi se namreč FITC-CH raztopil in ne bi imeli več oborine. Postopek smo ponovili tolikokrat, da v matičnici ni bilo več opazne rumeno-zelene barve oziroma prostega FITC-a, ki se ni vezal na CH.



Slika 7: Vakuumsko filtriranje oborine

S tem postopkom smo grobo ločili nevezan FITC in FITC-CH. Sledila je boljša ločitev z dializo (slika 8). Celulozno membrano smo čez noč pustili v hladilniku v destilirani vodi. Naslednji dan smo oborino (FITC-CH) vlili v dializno membrano, ki je v obliki cevi in potopili v čašo s 4 L vode. Vodo smo morali zamenjati vsakih 24 ur. Dializa je potekala 3 dni v temi. V tem času je nevezan FITC prešel skozi pore celulozne membrane kar prikazuje tudi slika 8.



Slika 8: Ločitev prostega in označenega hitosana z dializo

Po končani dializi smo oborini dodali toliko 0,05 mM HCl, da se je le-ta raztopila. Sledilo je zamrzovanje s tekočim dušikom, nato pa liofilizacija FITC-CH, s čimer smo iz vzorca odstranili vodo, hkrati pa nam ta postopek omogoča ohranitev njegove strukture in sestave. Tako je bil FITC-CH pripravljen za nadaljnje delo.

### **3.3.3. Izvedba poskusa bioadhezije**

#### **3.3.3.1. Priprava ploščic za polimerne filme**

Ploščice smo pripravili tako, da smo vzeli objektna stekelca za mikroskopiranje. Nanje smo na sredini narisali kvadrat v velikosti 2,0 x 2,0 cm, nanj pa nalepili objektno stekelce v velikosti 2,5 x 2,5 x 0,5 cm. Vse ploščice smo oštreviličili in jih stehtali ter si zapisali njihove mase. Nanje smo nato vlivali ustrezno maso disperzije CH oziroma FITC-CH.

#### **3.3.3.2. Vlivanje in sušenje polimernih filmov**

Preden smo pričeli z vlivanjem filmov, smo morali poskrbeti za ravno površino, kamor smo nato dajali vlike filme, da se posušijo. Le tako smo si lahko zagotovili enakomerno debelino polimernega filma na celi površini narisanega kvadratka na objektnem stekelcu. V prvi seriji smo s pomočjo kapalke nanesli 180 mg disperzije neoznačenega hitosana in pazili, da ni bilo prisotnih zračnih mehurčkov. FITC-CH filme smo morali ustrezno zaščititi pred svetlobo. Naslednji dan smo preverili njihovo ustreznost, tiste, katerih nanos je segal čez rob narisanega kvadratka, smo izločili, ostale pa stehtali. Od te mase smo nato odšteli maso prazne ploščice in tako dobili maso filma. Povprečna masa filmov neoznačenega hitosana je bila 5,1 mg. Dovoljeno pa je bilo 10 % odstopanje, torej smo uporabili vse tiste filme, katerih masa je bila 4,6–5,6 mg. Tudi pri FITC-CH smo izbrali mase filmov omenjenih mej. Pri nadalnjem delu s CH ali FITC-CH smo znotraj posamezne serije ali med serijami morali optimizirati vlivanje filmov, da smo dobili mase filmov, primerljive z masami v prvi seriji z neoznačenim CH. Vlivali smo večjo maso disperzije, in sicer 230–250 mg, odvisno tega, koliko vode je izhlapelo iz erlenmajerice, v kateri smo shranjevali polimerno disperzijo.

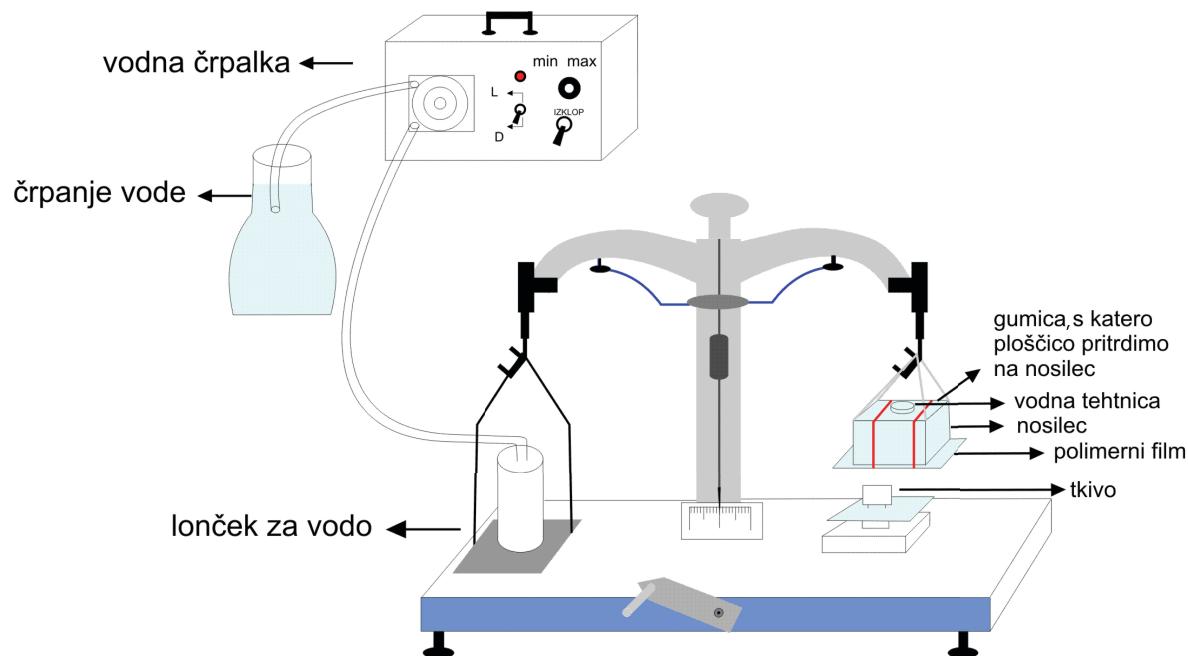
#### **3.3.3.3. Potek priprave tkiva**

Tkivo, ki smo ga uporabili pri poskusu, je bilo sveže in vedno porabljen na dan zakola. Po zakolu smo ga prenesli v posodo s PBS, nato pa smo ga shranili v hladilno posodo, ki je imela primerno temperaturo (4 °C). Mehurje, ki jih nismo mogli takoj uporabiti, smo med našim poskusom še naprej shranjevali pri teh pogojih. Mehur smo nato prenesli v petrijevko, v kateri je bil tudi PBS, kjer smo mu odstranili sečnico, oba sečevoda ter odvečno vezivno in maščobno tkivo, nato pa odrezali še zgornji in spodnji del mehurja ter ga vzdolžno prerezali. Pregledali smo, ali je naše tkivo primerno. Izognili smo se uporabi tkiva, ki bi imelo prisotne razne patološke spremembe na sluznici (vnetje), saj bi le-to lahko vplivalo na naše nadaljnje rezultate. Tako smo uporabili le zdravo tkivo in za vsako meritev odrezali majhen del tkiva, ki

ni bil poškodovan. Z bucikami smo ga pritrdili na pluto, ga napeli ter s pomočjo skalpela ločili sluznico od mišičnega tkiva. Paziti smo morali, da je bila sluznica enakomerne debeline. Tako pripravljen košček tkiva smo potopili v pufer (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na)) za 30 sekund, nato pa ga hitro namestili na nastavek aparature, ki se uporablja pri določanju bioadhezivne sile. Za lažjo namestitev smo uporabili nit, ki smo jo privezali okoli nastavka, na katerem je bilo tkivo. Za to smo imeli na razpolago 2 minuti in 30 sekund. Sledila je še enominutna hidratacija tkiva z  $20 \mu\text{L}$  izbranega pufra. Tako pri neoznačenem CH kot pri FITC-CH smo v prvi seriji za hidratacijo uporabili PB, v drugi pufer z dodanimi kalcijevimi ioni (PB + 0,2 M Ca) in v tretji z dodanimi natrijevimi (PB + 0,4 M Na) ioni. Nato smo za dve minuti izvedli stik med našim biološkim materialom in bioadhezivom. Površina, kjer je potekal proces bioadhezije med obema komponentama, je bila  $0,5 \text{ cm}^2$ .

#### 3.3.3.4. Tenziometrično merjenje sile ločevanja

Da smo določili silo, ki je potrebna za ločitev polimernega filma CH oziroma FITC-CH od tkiva, smo potrebovali spodaj prikazano aparaturo (slika 9). Najprej smo morali preveriti, da v cevki vodne črpalki ni bilo prisotnih mehurčkov, nato pa smo stehtali prazen lonček za vodo in ga postavili na levo stran spodaj prikazane tehnice. Ploščico s posušenim filmom smo namestili (s pomočjo dveh plastičnih gumic) na desno stran pod površino nosilca, ki je imel na zgornji strani nameščeno vodno tehntico. Poskrbeti smo morali, da je mehurček na vodni tehntici kazal vodoravni položaj, saj smo tako lahko omogočili, da je bil polimerni film vzporeden s celo površino sluznice. Sledilo je uravnovešenje tehntice, pri čemer smo si pomagali z dodajanjem uteži na levo stran. Ko je kazalec pokazal položaj uravnovešenosti tehntice, smo lahko s poskusom nadaljevali. Tkivo smo pripravili po že zgoraj opisanem postopku in izvedli stik med polimerom in sluznico, takoj za tem pa smo na površino vodne tehntice s pomočjo pincete postavili 10-gramske utež (da je bil stik boljši). Proses bioadhezije je potekal dve minuti. Nato smo vklopili vodno črpalko, katere hitrost je bila  $33 \text{ mL/min}$ . Voda je dotekala v lonček toliko časa, dokler se polimerni film in tkivo nista ločila. Nato smo stehtali lonček z vodo in ta podatek uporabili pri izračunu sile.



Slika 9: Prikaz modificirane analitske tehtnice, ki smo jo uporabili pri poskusu.

### 3.3.4. Izračun sile

Za izračun sile ( $F$ ), potrebne za ločitev bioadhezivnega polimera od izolirane sluznice prasičjega sečenega mehurja, je potrebna naslednja enačba:

$$(enačba 1) \quad \frac{F}{S} = \frac{(m_{izmerjena} - m_{lončka} - m_{utež}) \cdot g}{S}$$

oznaka	obrazložitev
$m_{izmerjena}$	masa lončka z vodo
$m_{lončka}$	masa pravnega lončka
$m_{utež}$	masa uteži, ki smo jo dodali na površino vodne tehtnice (= 10 g)
$g$	težnostni pospešek (= 9,81 m/s <sup>2</sup> )
$S$	površina stika (= 0,5 cm <sup>2</sup> )

### 3.3.5. Določanja hidratacije polimernih filmov

Posušenih filmov s CH oziroma FITC-CH nismo uporabili samo pri bioadheziji, temveč tudi zato, da smo preverili, ali kovalentna vezava FITC-a na hitosan vpliva na hitrost hidratacije

polimera. V prvi seriji smo posušene filme dali v eksikator s 100 % vlažnostjo. Po 2, 4 in 24 urah smo jih stehtali, nato pa od končne mase odšteli maso same ploščice in suhega filma. Naslednjim serijam polimernih filmov pa smo nanesli različne količine PB oziroma PB z dodanimi ioni, preden smo jih dali v eksikator. V ločenih serijah smo dodali 50 µL PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na), jih položili na vodoravno površino, da so se posušile, nato pa stehtali. Po istem principu smo v ločenih serijah dodali 100 µL PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na). Posušena objektna stekelca s polimerom smo nato dali v eksikator s 100 % vlažnostjo in ponovili postopek kot pri polimernih filmih brez dodanega pufra.

### **3.3.6. Merjenje zeta potenciala**

0,05 % (ut/vol) in 0,5 % (ut/vol) disperziji s CH in FITC-CH smo izmerili zeta potencial. Različno koncentrirani disperziji smo pripravili z namenom, da vidimo, ali pride do spremembe v vrednosti zeta potenciala. Vsak vzorec smo pomerili 10-krat z Zetasizerjem Nano pri enaki temperaturi, in sicer pri 25 °C.

### **3.3.7. Statistično vrednotenje rezultatov**

Eksperimentalno dobljene rezultate smo tudi statistično obdelali, pri čemer smo si pomagali s programom SPSS. Pri rezultatih bioadhezije in hidratacije (le pri polimernih filmih, ki smo jim dodatno nanesli 50 oziroma 100 µL pufra; statistiko smo delali za rezultate po 24 urah) smo uporabili test ANOVA za neodvisne vzorce. Še prej pa smo s pomočjo Levenovega testa preverili, ali so variance homogene. V primeru, da so, smo po testu ANOVE lahko uporabili test post hoc Bonferoni, če pa je bila hipoteza o homogenosti varianc zavrnjena, smo morali izbrati drug test (Games-Howell). Pri statističnem vrednotenju so bile razlike značilne v primeru, ko je bil  $p < 0,05$ . Za analizo rezultatov poskusa hidratacije s polimernimi filmi, ki jim nismo dodali pufra, smo najprej s F-testom preverili homogenost varianc med vzorcema, za nadaljnjo obdelavo pa uporabili neodvisni t-test.

### **3.3.8. Slikanje s svetlobnim in fluorescenčnim mikroskopom**

S svetlobnim in fluorescenčnim mikroskopom smo pogledali filme neoznačenega in označenega hitosana pred in po prekinitvi stika s površino sluznice prašičjega mehurja. Poleg tega smo s fluorescenčnim mikroskopom poslikali površino sluznice izoliranega sečnega mehurja po prekinitvi stika s FITC-CH.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Optimizacija mase filmov

V spodaj navedeni preglednici so prikazane mase filmov, ki smo jih pridobili z vlivanjem 180 mg disperzije CH. Dobili smo jih tako, da smo od končne mase filmov odšteli maso prazne ploščice. Izračunali smo še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije. Od povprečja mas filmov je bilo dovoljeno 10 % odstopanje. Če so bile mase zunaj teh meja, smo jih morali izločiti.

Preglednica I: Dobljene mase filmov po vlivanju 180 mg disperzije CH. Izračunali smo še njihove povprečne mase, standardno deviacijo in koeficient variacije.

Mase filmov [mg]			
1.	5,4	11.	5,2
2.	4,9	12.	4,8
3.	4,8	13.	5,2
4.	5,5	14.	5,6
5.	5,4	15.	5,2
6.	4,8	16.	5,0
7.	4,8	17.	5,6
8.	4,5	18.	5,3
9.	5,3	19.	5,3
10.	4,6	20.	5,4

$\bar{x} = 5,1 \text{ mg}$   
 $SD = 0,33$   
 $KV = 6,5 \%$

### 4.2. Rezultati bioadhezije

#### 4.2.1 Rezultati neoznačenega hitosana (uporaba PB)

Preglednica II: Izračunane sile, ki so potrebne za ločitev polimernega filma od tkiva. Uporabili smo filme z neoznačenim hitosanom in pufer brez dodanih ionov (PB). Podane so še mase uporabljenih polimernih filmov, masa vode, ki je bila potrebna za prekinitev stika, ter zaporedna številka mehurja. Izračunali smo še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije sil.

mehur	m(filma)[mg]	m(vode)[g]	F/S [mN/cm <sup>2</sup> ]
1	5,2	25,21	298,42
1	5,1	25,27	299,60
2	5,1	24,13	277,23
2	5,0	23,13	257,61
3	4,6	23,58	266,44
3	5,1	22,48	244,86
4	5,2	25,25	299,21
4	5,1	26,94	332,36

$\bar{x} = 284,47 \text{ mN/cm}^2$
$SD = 28,29$
$KV = 9,9 \%$

#### 4.2.1. Rezultati označenega hitosana (uporaba PB)

Preglednica III: Izračunane sile, ki so potrebne za ločitev polimernega filma od tkiva. Uporabili smo filme z označenim hitosanom in pufer brez dodanih ionov. Podane so še mase uporabljenih polimernih filmov, masa vode, ki je bila potrebna za prekinitve stika, ter zaporedna številka mehurja. Na koncu smo izračunali še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije sil.

mehur	m(filma)[mg]	m(vode)[g]	F/S [mN/cm <sup>2</sup> ]
1	4,7	19,12	178,93
1	4,7	20,53	206,60
2	4,7	19,76	191,49
2	4,6	19,82	192,67
3	4,9	20,65	208,95
3	5,0	18,51	166,97
4	4,7	18,43	165,40
4	4,6	20,99	215,62

$\bar{x} = 190,83 \text{ mN/cm}^2$
$SD = 19,10$
$KV = 10,0 \%$

#### 4.2.2. Rezultati neoznačenega hitosana (uporaba PB + 0,2 M Ca)

Preglednica IV: Izračunane sile, ki so potrebne za ločitev polimernega filma od tkiva. Uporabili smo filme z neoznačenim hitosanom in pufer z dodanimi kalcijevimi ioni (PB + 0,2 M Ca). Podane so še mase uporabljenih polimernih filmov, masa vode, ki je bila potrebna za prekinitve stika, ter zaporedna številka mehurja. Prav tako smo izračunali še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije sil.

mehur	m(filma)[mg]	m(vode)[g]	F/S [mN/cm <sup>2</sup> ]
5	5,3	20,15	199,14
5	5,3	20,36	203,26
5	5,4	17,50	147,15
6	4,7	21,37	223,08
6	5,2	18,23	161,47
7	5,2	22,77	250,55
7	5,1	18,31	163,04
8	5,1	19,21	180,70
8	4,8	18,74	171,48
9	4,9	20,10	198,16
9	5,0	20,50	206,01

$\bar{x} = 191,28 \text{ mN/cm}^2$
$SD = 30,22$
$KV = 15,8 \%$

#### 4.2.3. Rezultati označenega hitosana (uporaba PB + 0,2 M Ca)

Preglednica V: Izračunane sile, ki so potrebne za ločitev polimernega filma od tkiva. Uporabili smo filme z označenim hitosanom in pufer z dodanimi kalcijevimi ioni (PB + 0,2 M Ca). Podane so še mase uporabljenih polimernih filmov, masa vode, ki je bila potrebna za prekinitve stika, ter zaporedna številka mehurja. Prav tako smo izračunali še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije sil.

mehur	m(filma)[mg]	m(vode)[g]	F/S [mN/cm <sup>2</sup> ]
5	4,6	19,50	186,39
5	4,6	20,36	203,26
5	4,6	18,59	168,54
6	5,0	18,24	161,67
6	4,9	18,36	164,02
7	5,0	17,69	150,88
7	5,1	18,27	162,26
8	4,7	20,98	215,43
8	4,6	20,27	201,50
9	5,0	21,19	219,55
9	4,9	22,66	248,39

$\bar{x} = 189,26 \text{ mN/cm}^2$
$SD = 30,79$
$KV = 16,3\%$

#### 4.2.4. Rezultati neoznačenega hitosana (uporaba PB + 0,4 M Na)

Preglednica VI: Izračunane sile, ki so potrebne za ločitev polimernega filma od tkiva. Uporabili smo filme z neoznačenim hitosanom in pufer z dodanimi natrijevimi ioni (PB + 0,4 M Na). Podane so še mase uporabljenih polimernih filmov, masa vode, ki je bila potrebna za prekinitev stika, ter zaporedna številka mehurja. Prav tako smo izračunali še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije sil.

mehur	m(filma)[mg]	m(vode)[g]	F/S [mN/cm <sup>2</sup> ]
10	5,3	20,03	196,79
10	4,9	19,30	182,37
11	5,2	20,82	212,29
11	5,3	20,73	210,52
12	5,5	22,00	235,52
12	5,2	19,21	180,72
13	4,9	19,84	193,06
13	4,9	20,20	200,12
14	4,8	17,70	151,07
14	4,6	23,54	265,65

$\bar{x} = 202,81 \text{ mN/cm}^2$
$SD = 31,43$
$KV = 15,5 \%$

#### 4.2.5. Rezultati označenega hitosana (uporaba PB + 0,4 M Na)

Preglednica VII: Izračunane sile, ki so potrebne za ločitev polimernega filma od tkiva. Uporabili smo filme z označenim hitosanom in pufer z dodanimi natrijevimi ioni (PB + 0,4 M Na). Podane so še mase uporabljenih polimernih filmov, masa vode, ki je bila potrebna za prekinitev stika, ter zaporedna številka mehurja. Prav tako smo izračunali še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije sil.

mehur	m(filma)[mg]	m(vode)[g]	F/S [mN/cm <sup>2</sup> ]
10	5,0	20,29	201,97
10	5,0	21,30	221,65
11	5,4	17,91	155,16
11	4,9	17,09	139,15
12	5,2	18,22	161,26
12	5,1	17,00	137,34
13	4,6	17,12	139,69
13	4,6	17,34	144,01
14	5,2	19,89	194,04

$\bar{x} = 166,03 \text{ mN/cm}^2$
$SD = 31,69$
$KV = 19,1\%$

#### 4.3. Rezultati hidratacije

##### 4.3.1. Hidratacija brez dodanega pufra

Za ugotavljanje razlik v hidrataciji med neoznačenim in označenim hitosanom smo ploščice s polimeroma dali v eksikator s 100 % vlažnostjo in spremljali mase filmov po 2, 4 in 24 urah.

Preglednica VIII: Mase filmov neoznačenega in označenega CH po 2, 4 in 24 urah brez dodanega pufra.

	mase filmov [mg]				mase filmov [mg]				
	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h	
CH	5,05	12,34	13,6	15,95	CH-	5,37	11,44	13,71	19,22
	5,19	10,36	12,31	16,92		5,44	11,24	13,59	18,54
	5,21	12,28	12,99	16,56		4,79	12,00	13,19	15,51

Preglednica IX: Količina vezane vode na filme z neoznačenim in označenim CH po 2, 4 in 24 urah hidratacije.

količina vezane vode [mg]					količina vezane vode [mg]				
CH	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h	CH- FITC	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
	0	7,29	8,55	10,9		0	6,07	8,34	13,85
	0	5,17	7,12	11,73		0	5,80	8,15	13,10
	0	7,07	7,78	11,35		0	7,21	8,40	10,72

Preglednica X: Odstotek vezane vode na filme z neoznačenim in označenim CH po 2, 4 in 24 urah hidratacije.

odstotek vezane vode					odstotek vezane vode				
CH	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h	CH- FITC	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
	0	144,4	169,3	215,8		0	113,0	155,3	257,9
	0	99,6	137,2	226,0		0	106,6	149,8	240,8
	0	135,7	149,3	217,9		0	150,5	175,4	223,8

Preglednica XI: Izračun povprečja, SD in KV odstotka vezane vode pri obeh polimerih.

CH	t = 2 h    t = 4 h    t = 24 h			CH- FITC	t = 2 h    t = 4 h    t = 24 h			
	$\bar{x}$ [%]	126,6	151,9	219,9	$\bar{x}$ [%]	123,4	160,2	240,8
	SD	23,7	16,2	5,4	SD	23,7	13,4	17,1
	KV	18,8	10,7	2,4	KV	19,2	8,4	7,1

#### 4.3.2. Rezultati hidratacije (uporaba 50 $\mu$ L pufra, neoznačen hitosan)

Preglednica XII: Preglednica prikazuje spremenjanje mase filmov in količino vezane vode na filme neoznačenega hitosana po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Pred poskusom smo nanje nanesli 50  $\mu$ L pufra (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na)).

pufer	masa filma [mg]				količina vezane vode [mg]			
	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
PB	4,76	12,81	14,04	17,20	0	8,05	9,28	12,44
PB	4,84	11,54	14,3	24,64	0	6,70	9,46	19,80
PB	4,95	11,26	13,55	20,45	0	6,31	8,60	15,50
PB	4,88	11,28	12,05	18,88	0	6,94	7,17	14,00
PB + 0,2 M Ca	5,09	21,57	27,16	44,89	0	16,48	22,07	39,80
PB + 0,2 M Ca	4,64	21,73	26,01	51,80	0	17,17	21,45	47,24
PB + 0,2 M Ca	5,12	19,40	23,41	49,53	0	14,28	18,29	44,41
PB + 0,4 M Na	4,80	24,18	31,91	58,60	0	19,38	27,11	53,80
PB + 0,4 M Na	5,26	22,22	28,27	61,29	0	16,96	23,01	56,03
PB + 0,4 M Na	4,98	16,70	21,09	56,37	0	11,72	16,11	51,39

Preglednica XIII: Preglednica prikazuje odstotek vezane vode na filme z neoznačenim CH po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Filmom smo pred poskusom nanesli 50 µL pufra (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M)). Na koncu smo izračunali povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije odstotka vezane vode po 2, 4 in 24 urah, kar prikazuje druga preglednica.

pufer	odstotek vezane vode			
	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
PB	0	169,1	195,0	261,3
PB	0	138,4	195,5	409,1
PB	0	127,5	173,7	313,1
PB	0	142,2	146,9	286,9
PB + 0,2 M Ca	0	323,8	433,6	781,9
PB + 0,2 M Ca	0	376,5	470,4	1036,0
PB + 0,2 M Ca	0	278,9	357,2	867,4
PB + 0,4 M Na	0	403,8	564,8	1120,8
PB + 0,4 M Na	0	322,4	437,5	1065,2
PB + 0,4 M Na	0	235,3	323,5	1031,9

pufer		$t = 0 \text{ h}$	$t = 2 \text{ h}$	$t = 4 \text{ h}$	$t = 24 \text{ h}$
<b>PB</b>	$\bar{x} [\%]$	0	144,3	177,8	317,6
	<b>SD</b>	0	17,7	22,9	64,5
	<b>KV [%]</b>	0	12,3	12,9	20,3
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	$\bar{x} [\%]$	0	326,4	420,4	895,1
	<b>SD</b>	0	48,9	57,7	129,3
	<b>KV [%]</b>	0	15,0	13,7	14,4
<b>PB + 0,4 M Na</b>	$\bar{x} [\%]$	0	320,5	441,9	1072,7
	<b>SD</b>	0	84,2	120,7	44,9
	<b>KV [%]</b>	0	26,3	27,3	4,2

### 4.3.3. Rezultati hidratacije (uporaba 50 $\mu\text{L}$ pufra, označen hitosan)

Preglednica XIV: Preglednica prikazuje spreminjanje mase filmov in količino vezane vode na filme označenega hitosana po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Pred poskusom smo nanje nanesli 50  $\mu\text{L}$  pufra (PB, (PB+ 0,2 M Ca) ali (PB+ 0,4 M Na)).

pufer	masa filma [mg]				količina vezane vode [mg]			
	$t = 0 \text{ h}$	$t = 2 \text{ h}$	$t = 4 \text{ h}$	$t = 24 \text{ h}$	$t = 0 \text{ h}$	$t = 2 \text{ h}$	$t = 4 \text{ h}$	$t = 24 \text{ h}$
<b>PB</b>	5,46	14,78	14,81	22,13	0	9,32	9,35	16,67
<b>PB</b>	5,23	12,76	16,20	33,14	0	7,53	10,97	27,91
<b>PB</b>	4,97	11,41	12,16	23,27	0	6,44	7,19	18,30
<b>PB</b>	4,60	9,31	10,46	17,56	0	4,75	5,9	13,00
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	5,44	24,12	28,57	63,70	0	18,68	23,13	58,26
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	5,45	18,13	21,29	42,15	0	12,68	15,84	36,70
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	4,94	18,36	22,56	42,04	0	13,42	17,62	37,10
<b>PB + 0,4 M Na</b>	4,86	23,81	30,95	58,88	0	18,95	26,09	54,02
<b>PB + 0,4 M Na</b>	5,41	22,28	30,87	74,03	0	16,87	25,46	68,62
<b>PB + 0,4 M Na</b>	5,47	19,69	24,06	48,63	0	14,22	18,59	43,16
<b>PB + 0,4 M Na</b>	5,02	19,11	24,34	47,22	0	14,09	19,32	42,20

Preglednica XV: Preglednica prikazuje odstotek vezane vode na filme z označenim CH po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Filmom smo pred poskusom nanesli 50  $\mu\text{L}$  pufra (PB, (PB+ 0,2 M Ca) ali (PB+ 0,4 M Na)). Na koncu smo izračunali povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije odstotka vezane vode, kar prikazuje druga preglednica.

pufer	odstotek vezane vode			
	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
<b>PB</b>	0	170,7	171,2	305,3
<b>PB</b>	0	144,0	209,8	533,7
<b>PB</b>	0	129,6	144,7	368,2
<b>PB</b>	0	104,2	129,4	285,1
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	343,4	425,2	1071,0
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	232,7	290,6	673,4
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	271,7	356,7	751,0
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	389,9	536,8	1111,5
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	311,8	470,6	1268,4
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	260,0	339,9	789,0
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	280,7	384,9	840,6

pufer		t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
<b>PB</b>	$\bar{x}$ [%]	0	137,1	163,8	373,1
	SD	0	27,8	35,2	112,8
	KV [%]	0	20,3	21,5	30,2
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	$\bar{x}$ [%]	0	282,6	357,5	831,8
	SD	0	56,2	67,3	210,7
	KV [%]	0	19,9	18,8	25,3
<b>PB + 0,4 M Na</b>	$\bar{x}$ [%]	0	310,6	433,0	1002,4
	SD	0	57,0	87,9	226,8
	KV [%]	0	18,4	20,3	22,6

#### 4.3.4. Rezultati hidratacije (uporaba 100 $\mu$ L pufra, neoznačen hitosan)

Preglednica XVI: Preglednica prikazuje spreminjanje mase filmov in količino vezane vode na filme neoznačenega hitosana po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Pred poskusom smo nanje nanesli 100  $\mu$ L pufra (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na)).

pufer	masa filma [mg]				količina vezane vode [mg]			
	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
PB	4,70	13,26	15,95	24,85	0	8,56	11,25	20,15
PB	5,10	15,40	16,89	26,70	0	10,30	11,79	21,60
PB	4,64	12,60	14,78	20,65	0	7,96	10,14	16,01
PB	4,95	12,98	14,66	22,85	0	8,03	9,71	17,90
PB	4,96	12,57	12,61	24,26	0	7,61	7,65	19,30
PB + 0,2 M Ca	5,13	26,05	35,78	77,08	0	20,92	30,65	71,95
PB + 0,2 M Ca	4,84	24,94	34,73	66,23	0	20,10	29,89	61,39
PB + 0,2 M Ca	4,72	25,63	31,57	71,55	0	20,91	26,85	66,83
PB + 0,4 M Na	5,29	31,14	36,80	79,17	0	25,85	31,51	73,88
PB + 0,4 M Na	5,02	31,45	38,63	81,05	0	26,43	33,61	76,03
PB + 0,4 M Na	4,87	28,94	39,56	70,52	0	24,07	34,69	65,65
PB + 0,4 M Na	4,69	24,65	32,51	80,48	0	19,96	27,82	75,79

Preglednica XVII: Preglednica prikazuje odstotek vezane vode na filme z neoznačenim hitosanom po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Filmom smo pred poskusom nanesli 100 µL pufra (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na)). Na koncu smo izračunali povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije odstotka vezane vode, kar prikazuje druga preglednica.

pufer	odstotek vezane vode			
	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
PB	0	182,1	239,4	428,7
PB	0	202,0	231,2	423,5
PB	0	171,6	218,5	345,0
PB	0	162,2	196,2	361,6
PB	0	153,4	154,2	389,1
PB + 0,2 M Ca	0	407,8	597,5	1402,5
PB + 0,2 M Ca	0	415,3	617,6	1268,4
PB + 0,2 M Ca	0	432,0	554,8	1380,8
PB + 0,4 M Na	0	488,7	595,7	1396,6
PB + 0,4 M Na	0	526,5	669,5	1514,5
PB + 0,4 M Na	0	494,3	712,3	1348,0
PB + 0,4 M Na	0	425,6	593,2	1616,0

pufer		$t = 0 \text{ h}$	$t = 2 \text{ h}$	$t = 4 \text{ h}$	$t = 24 \text{ h}$
<b>PB</b>	$\bar{x} [\%]$	0	174,3	207,9	389,6
	<b>SD</b>	0	18,8	34,1	36,9
	<b>KV [%]</b>	0	10,8	16,4	9,5
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	$\bar{x} [\%]$	0	418,4	589,9	1350,6
	<b>SD</b>	0	12,4	32,1	72,0
	<b>KV [%]</b>	0	3,0	5,4	5,3
<b>PB + 0,4 M Na</b>	$\bar{x} [\%]$	0	483,7	642,7	1468,8
	<b>SD</b>	0	42,2	58,4	120,5
	<b>KV [%]</b>	0	8,7	9,1	8,2

#### 4.3.5. Rezultati hidratacije (uporaba 100 $\mu\text{L}$ pufra, označen hitosan)

Preglednica XVIII: Preglednica prikazuje spremenjanje mase filmov in količino vezane vode na filme označenega hitosana po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Pred poskusom smo nanje nanesli 100  $\mu\text{L}$  pufra (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na).

pufer	masa filma [mg]				količina vezane vode [mg]			
	$t = 0 \text{ h}$	$t = 2 \text{ h}$	$t = 4 \text{ h}$	$t = 24 \text{ h}$	$t = 0 \text{ h}$	$t = 2 \text{ h}$	$t = 4 \text{ h}$	$t = 24 \text{ h}$
<b>PB</b>	4,83	13,63	18,55	31,65	0	8,80	13,72	26,82
<b>PB</b>	5,21	12,68	17,57	22,44	0	7,47	12,36	17,23
<b>PB</b>	5,36	11,81	13,98	31,93	0	6,45	8,62	26,57
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	5,27	25,95	33,48	67,56	0	20,68	28,21	62,29
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	4,61	29,49	33,29	73,74	0	24,88	28,68	69,13
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	5,25	26,12	34,15	61,97	0	20,87	28,90	56,72
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	5,37	24,42	29,1	49,75	0	19,05	23,73	44,38
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	4,65	22,73	28,57	60,55	0	18,08	23,92	55,90
<b>PB + 0,4 M Na</b>	5,46	27,99	36,76	74,67	0	22,53	31,30	69,21
<b>PB + 0,4 M Na</b>	5,17	22,46	31,19	61,10	0	17,29	26,02	55,93
<b>PB + 0,4 M Na</b>	5,23	28,05	40,03	77,92	0	22,82	34,80	72,69
<b>PB + 0,4 M Na</b>	5,48	23,95	30,17	65,85	0	18,47	24,69	60,37

Preglednica XIX: Preglednica prikazuje odstotek vezane vode na filme z označenim hitosanom po 2, 4 in 24 urah hidratacije. Filmom smo pred poskusom nanesli 100  $\mu\text{L}$  pufra (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na). Na koncu smo izračunali povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije odstotka vezane vode, kar prikazuje druga preglednica.

pufer	količina vezane vode v %			
	t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
<b>PB</b>	0	182,2	284,1	555,3
<b>PB</b>	0	143,4	237,2	330,7
<b>PB</b>	0	120,3	160,8	495,7
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	392,4	535,3	1182,0
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	539,7	622,1	1311,8
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	397,5	550,5	1076,3
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	354,7	441,9	842,1
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	0	388,8	514,4	1060,7
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	412,6	573,3	1267,6
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	334,4	503,3	1081,8
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	436,3	665,4	1389,9
<b>PB + 0,4 M Na</b>	0	337,0	450,5	1101,6

pufer		t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 24 h
<b>PB</b>	$\bar{x}$ [%]	0	148,6	227,4	460,6
	<b>SD</b>	0	31,3	62,2	116,3
	<b>KV [%]</b>	0	21,0	27,4	25,3
<b>PB + 0,2 M Ca</b>	$\bar{x}$ [%]	0	414,6	532,8	1094,6
	<b>SD</b>	0	71,9	65,0	173,2
	<b>KV [%]</b>	0	17,3	12,2	15,8
<b>PB + 0,4 M Na</b>	$\bar{x}$ [%]	0	380,1	548,1	1210,2
	<b>SD</b>	0	52,2	92,9	145,9
	<b>KV [%]</b>	0	13,7	17,0	12,1

#### 4.4. Rezultati merjenja zeta potenciala

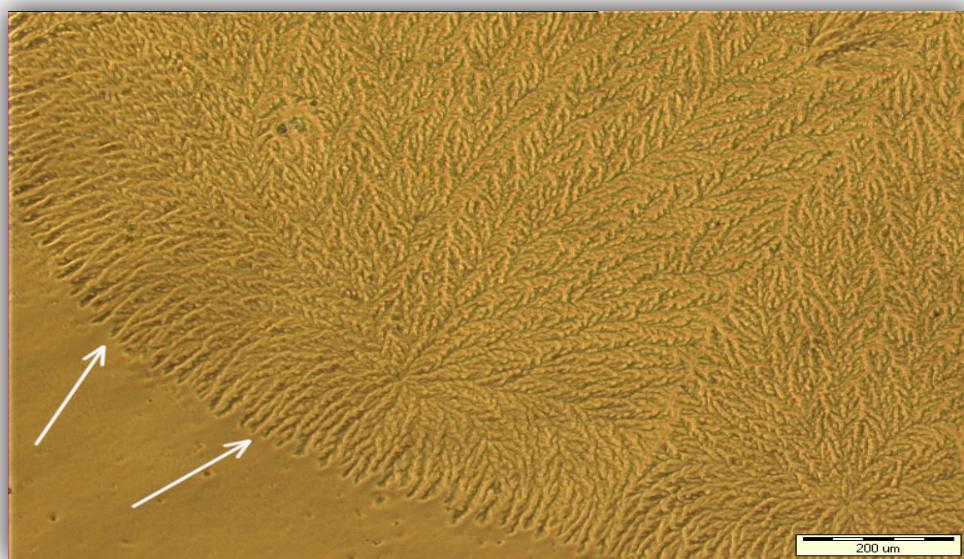
Preglednica XX: Izmerjene povprečne vrednosti ( $n = 10$ ) zeta potenciala neoznačenega in označenega hitosana v pufru (PB). Podani sta tudi koncentraciji obeh disperzij.

polimer	pufer	konz. (% [ut/vol])	ZP [mV]	pufer	konz. (% [ut/vol])	ZP [mV]
<b>CH</b>	PB	0,05	+ 45,6	PB	0,5	+ 43,4
<b>FITC-CH</b>	PB	0,05	+ 47,4	PB	0,5	+ 48,2

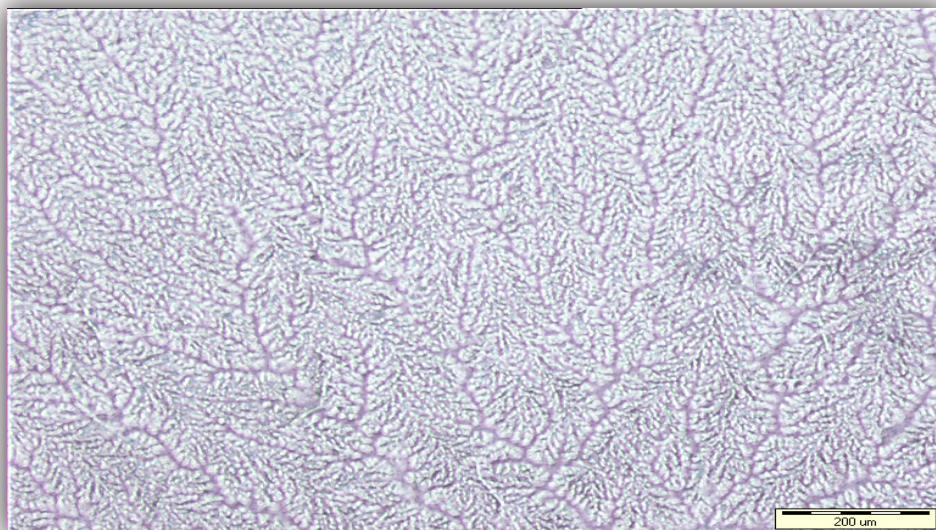
#### 4.5. Slikanje s svetlobnim in fluorescenčnim mikroskopom



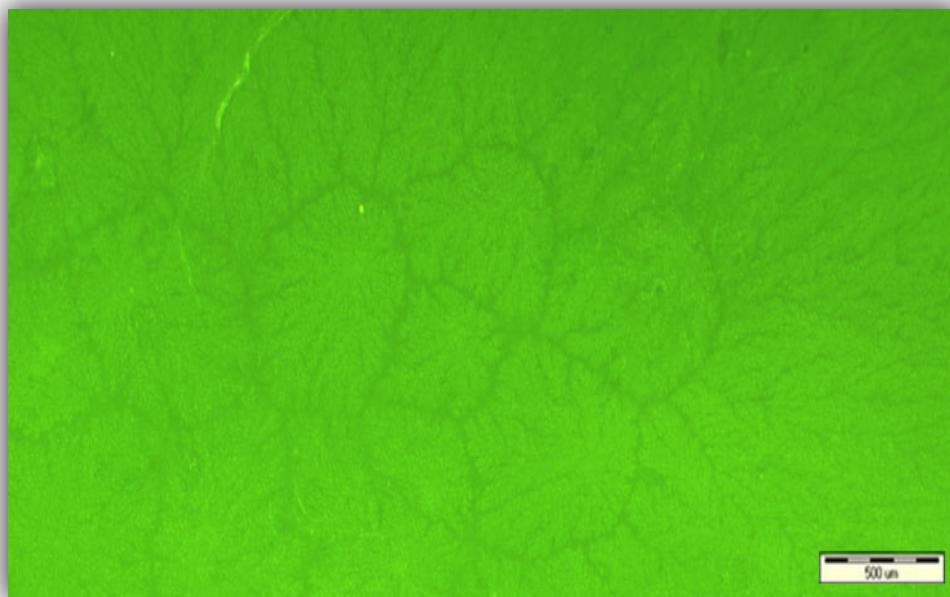
Slika 10: Polimerni film FITC-CH pred vzpostavitvijo bioadhezivne interakcije. Slika je posneta pod svetlobnim mikroskopom.



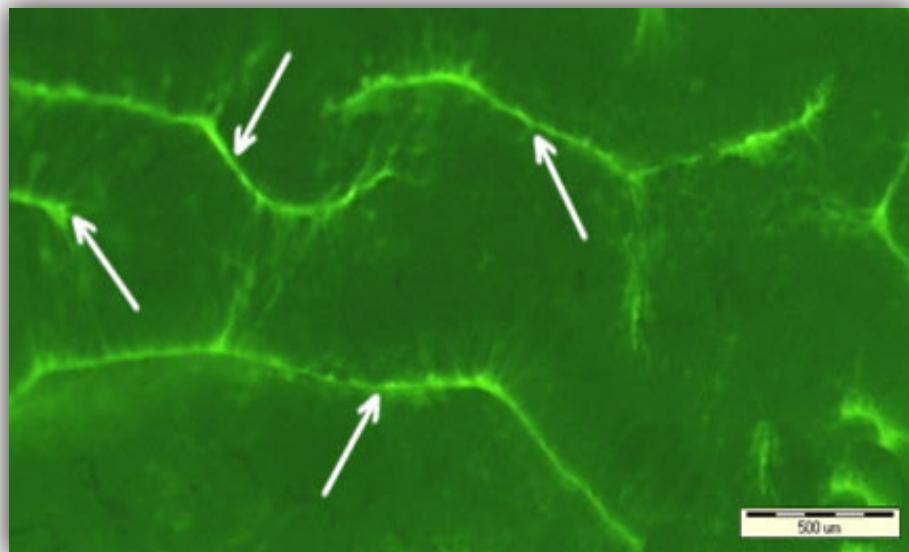
Slika 11: Slika prikazuje polimerni film FITC-CH, ki je bil v stiku s površino sluznice. Na polimernem filmu so vidni odtisi površine sluznice sečnega mehurja, s puščicama pa je označen rob stika. Uporabili smo svetlobni mikroskop.



Slika 12: Polimerni film neoznačenega hitosana po prekinitvi bioadhezivne interakcije. Na sliki, ki je posneta pod svetlobnim mikroskopom, so vidni odtisi površine sluznice sečnega mehurja.



Slika 13: Slika polimernega filma označenega hitosana po prekinitvi stika z izolirano sluznico prašičjega sečnega mehurja. Opazovali smo pod fluorescenčnim mikroskopom.



Slika 14: Površina sluznice po stiku s filmom označenega hitosana. S puščicami so označene sluznične gube, kjer se označen hitosan najbolj nabira. Zeleno obarvanje je posledica prisotnosti FITC-a. Opazovali smo pod fluorescenčnim mikroskopom.

## 5. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

### 5.1. Bioadhezija

Uporabili smo statistično metodo ANOVO. Še pred tem pa smo izvedli Levenov test. Ker je bil  $p = 0,729$ , torej večji od 0,05, hipoteze o homogenosti varianc ne moremo zavreči. Iz rezultatov testa ANOVA vidimo, da imata tako izbira pufra kot polimera ter interakcija med njima značilen vpliv na silo ločevanja med tkivom in polimerom, saj je  $p < 0,05$ .

Preglednica XXI: Rezultati testa ANOVA. Prikaz parametrov, ki značilno vplivajo na silo ločevanja med tkivom in polimerom. df pomeni število prostostnih stopenj, F razmerje varianc med skupinami in znotraj skupin, p pa verjetnost.

parameter	df	F	p
pufer	2	17,066	< 0,001
polimer	1	31,817	< 0,001
pufer * polimer	2	11,372	< 0,001

Da bi preverili, med katerimi pari pufrov so pomembne razlike, smo opravili še test post hoc (Bonferoni).

Preglednica XXII: Rezultati testa post hoc (Bonferoni) za vse možne pare pufrov – brez dodanih ionov in z dodanimi. p pomeni verjetnost, S značilno in NS neznačilno razliko.

Bonferoni	par		p	S/NS
	PB	PB + 0,2 M Ca		
	PB	PB + 0,4 M Na	< 0,001	S
	PB + 0,2 M Ca	PB + 0,4 M Na	< 0,001	S
			1,000	NS

### 5.2. Hidratacija

#### 5.2.1. Filmi brez dodanega pufra

Neodvisni t-test smo naredili za analizo razlik v hidrataciji med polimeroma za primer, ko polimernim filmom pred hidratacijo v eksikatorju s 100 % vlažnostjo nismo nanesli pufra. Najprej smo naredili F-test in dobili p-vrednost 0,181, kar pomeni, da smo sprejeli hipotezo o

enakosti varianc. Naredili smo še t-test in videli, da je dobljena p-vrednost 0,112, torej večja od 0,05, kar pomeni, da po 24-urni hidrataciji količina vezane vode pri CH in FITC-CH ni značilno različna.

### 5.2.2. Filmi z dodatkom 50 µL pufra

Za analizo razlik v hidrataciji polimernih filmov CH in FITC-CH, ki smo jim dodali 50 µL pufra z različno sestavo, smo uporabili test ANOVA. Še pred tem pa smo izvedli Levenov test. Ker je p-vrednost 0,016, torej manjša od 0,05 ovržemo hipotezo o homogenosti varianc in zato ne moremo uporabiti post hoc testa Bonferoni; izberemo test Games-Howell. Iz rezultatov testa ANOVA, ki so prikazani spodaj, vidimo, da ima v tem primeru samo izbira pufra, in ne polimera ali interakcije med polimerom in pufrom, vpliv na hidratacijo.

Preglednica XXIII: Rezultati testa ANOVA. Prikaz parametrov in njihov vpliv na hidratacijo. df pomeni število prostostnih stopenj, F razmerje varianc med skupinami in znotraj skupin, p pa verjetnost.

parameter	df	F	p
polimer	1	0,158	0,697
pufer	2	43,871	< 0,001
polimer * pufer	2	0,420	0,665

Preglednica XXIV: Rezultati testa post hoc (Games-Howell) za vse možne pare pufrov - brez in z dodanimi ioni. p pomeni verjetnost, S značilno in SN neznačilno razliko.

Games-Howell	par		p	S/NS
	PB	PB + 0,2 M Ca		
	PB	PB + 0,4 M Na	< 0,001	S
	PB + 0,2 M Ca	PB + 0,4 M Na	0,196	NS

### 5.2.3. Filmi z dodatkom 100 µL pufra

Za analizo razlik v hidrataciji polimernih filmov CH in FITC-CH, ki smo jim dodali 100 µL pufra z različno sestavo, smo uporabili test ANOVA. Še pred tem pa smo izvedli Levenov test. Ker je p-vrednost 0,145, torej večja od 0,05, hipoteze o homogenosti varianc ne moremo

zavreči. Iz rezultatov testa ANOVA, ki so prikazani spodaj, vidimo, da imata tako izbira pufra kot polimera značilen vpliv na hidratacijo.

Preglednica XXV: Rezultati testa ANOVA. Prikaz parametrov in njihov vpliv na hidratacijo. df pomeni število prostostnih stopenj, F razmerje varianc med skupinami in znotraj skupin, p pa verjetnost.

parameter	df	F	p
polimer	1	10,389	0,004
pufer	2	141,937	< 0,001
polimer * pufer	2	3,556	0,049

Preglednica XXVI: Rezultati testa post hoc (Bonferroni) za vse možne pare pufrov (brez dodanih ionov in z dodanimi). p pomeni verjetnost, S značilno in SN neznačilno razliko.

Bonferoni	par		p	S/NS
	PB	PB + 0,2 M Ca	< 0,001	S
	PB	PB + 0,4 M Na	< 0,001	S
	PB + 0,2 M Ca	PB + 0,4 M Na	0,084	NS

## 6. RAZPRAVA

Hitosan v farmaciji predstavlja velik potencial. Je biokompatibilen in biorazgradljiv polimer, ki poveča permeabilnost številnih sluznic in ima dokazane bioadhezivne lastnosti (20, 22). Številne študije so dokazale njegovo netoksičnost, zato je sprejet kot varen material za dostavo zdravil. Označevanje hitosana s FITC-em omogoča opazovanje dostavnih sistemov s hitosanom pod fluorescenčnim mikroskopom. Namen diplomske naloge je bil ta, da preverimo, ali kovalentna vezava FITC-a na hitosan vpliva na jakost bioadhezije. Poskuse smo izvedli na izolirani sluznici prašičjega sečnega mehurja. Preverili smo tudi, ali kovalentna vezava FITC-a na hitosan vpliva na hidratacijo ter zeta potencial polimera.

### 6.1. Optimizacija pogojev dela pri poskusu bioadhezije

V diplomskem delu smo za spremljanje jakosti bioadhezije uporabili metodo tenziometričnega merjenja sile ločevanja, s katero so se na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko srečali že pogosto, saj je bila uporabljena že v številnih raziskavah (25–27). Kljub temu da smo uporabili že razvito metodo, je bilo potrebno optimizirati pogoje dela. Vključena je bila optimizacija mase filmov. Predhodni poskusi (25) so pokazali, da vlivanje 360 mg disperzije CH ni primerno, saj dobljene mase (približno 10 mg) suhih polimernih filmov zelo variirajo. Prav tako je bil stik s sluznico pri težjih filmih slabši. Film na sredini ploščice se namreč ni omočil, za kar je bil najverjetneje odgovoren kapilarni premik vode iz sredinskega dela na obrobje sluznice. Pri vlivanju 180 mg disperzije pa se je izkazalo, da so bile mase filmov ponovljive. Povprečna masa filmov je bila 5,2 mg (25). Glede na navedene ugotovitve smo tudi mi v prvi seriji na ploščice nanesli 180 mg disperzije CH. Naš koeficient variacije posušenih polimernih filmov neoznačenega CH prve serije je bil 6,5 %, kar kaže na dobro ponovljivost vlivanja disperzije za filme. Na podlagi predhodnih poskusov (26, 27) smo pričakovali povprečno maso polimernih filmov približno 5 mg; naše povprečne mase filmov so bile 5,1 mg. Uporabili smo vse tiste filme, ki so odstopali do 10 % od povprečne mase, torej vse, ki so tehtali 4,6–5,6 mg. Dovoljeno odstopanje smo prav tako določili iz podatkov, navedenih v literaturi, in iz predhodnih poskusov (26–28). Pri nadalnjem delu s CH ali s FITC-CH smo znotraj posamezne serije ali med serijami morali optimizirati vlivanje filmov, da smo dobili mase filmov, primerljive s filmi prve serije navadnega CH. Vlivali smo večjo maso disperzije, in sicer 230–250 mg. Razlog za to je bil najverjetneje v slabšem tesnjenju erlenmajerice, v kateri smo shranjevali polimerno disperzijo, zaradi česar je prišlo do

izhlapevanja vode. Pri delu z označenim hitosanom smo morali disperzijo pred svetlobo zaščititi z aluminijasto folijo, saj v nasprotnem primeru pride do fotokemičnega uničenja fluorofora.

Pred pričetkom vlivanja polimernih filmov smo morali s pH-lističi še preveriti, ali je bil pH disperzije z označenem hitosanom približno enak kot pri neoznačenem CH (4,4–4,7). Pri tej vrednosti pH ima disperzija najprimernejšo viskoznost za vливanje filmov. Pozorni smo morali biti na to, da smo vlivali disperzijo le v narisan kvadrat (velikosti 2 x 2 cm). Disperzija torej ni smela segati čez robove. Definirana površina nam je omogočila, da so bili polimerni filmi enake debeline in smo zato rezultate lahko med seboj primerjali. Ko so se filmi posušili, smo jih vizualno pregledali in odstranili vse tiste, ki niso ustrezali kriterijem (pretežki oziroma prelahki filmi, film je segal čez narisan kvadrat) .

Preden smo pufre uporabili za hidratacijo sluznice, smo jih umerili na pH 4,5. Pri teh pogojih sta neoznačen in označen hitosan v ionski obliki ter se ne obarjata. Referenčne vrednosti urina so 4,5–8,0, torej pH pufra oponaša fiziološke pogoje v sečnem mehurju (29). Posebej pozorni smo morali biti pri pufru z dodanimi kalcijevimi ioni. Preverjati smo morali, ali je bila prisotna vidna oborina kalcijevega fosfata. Če smo jo opazili, smo morali pufer ponovno pripraviti.

Pri izvedbi stika med polimerno in biološko komponento smo morali delati zbrano in previdno. Tukaj pred izvedbo stika smo naše gibanje ob modifirani analitski tehnici morali čim bolj omejili, da nosilec s polimerom ni pričel nihat. Takoj po vzpostavitvi stika smo tukaj nad vodno tehnico s pomočjo pincete dodali 10 g uteži, kar izboljša stik. To nam je predstavljal problem, saj smo morali imeti zelo mirno roko in paziti, da smo postavili utež na sredino vodne tehnice ter da ni prišlo do premika nosilca. Tekom uporabe vodne črpalke je bila njena hitrost pri vseh poskusih enaka, in sicer 33 mL/min.

Razne študije so proučevale, kakšen naj bi bil najprimernejši čas, ko sta obe komponenti v stiku, da bi bila bioadhezija čim uspešnejša. Wong C. F. s sodelavci (30) je uporabil sluznice različnih živali in spremenjal čas stika (10 s, 30 s, 60 s, 180 s in 600 s) ter hitrost (0,1 mm/s, 0,3 mm/s, 0,5 mm/s in 1,0 mm/s), s katerim nosilec s polimerom odstranimo od tkiva. Jakost bioadhezije je naraščala s časom, a v primeru, ko je čas stika iz 10 s spremenil na 30 s, so bili rezultati zelo variabilni, saj takrat potekajo hidratacija, nabrekanje in interpenetracija polimera s tkivom. Po 600 s pa ni opazil večje adhezije kot po 180 s. V raziskavi je prišel do zaključkov, da mora biti čas stika daljši od 30 s ter da data daljši čas stika (najprimernejši naj

bi bil 180 s) in hitrejša ločitev polimernega filma od sluznice bolj ponovljive rezultate. V predhodnih raziskavah (30, 42), ki so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, je bil čas stika 120 s, zato smo tudi v našem poskusu uporabili takšnega.

## **6.2. Optimizacija pogojev dela pri spremeljanju hidratacije polimernih filmov**

Polimernih filmov nismo uporabili samo za določanje bioadhezije. Z njimi smo ugotavljali tudi, ali pride do razlik v hidrataciji polimera, če na hitosan vežemo FITC. Tudi tu je bilo potrebno optimizirati pogoje. Najprej smo filme postavili v komoro s 70 % vlažnostjo. Ker po 2, 4 in prav tako 24 urah ni prišlo do spremembe v masi filmov, smo jih dali v eksikator s 100 % vlažnostjo. Opazili smo, da v opazovalnih časih pride do hidratacije polimera, zato smo z delom nadaljevali pri teh pogojih.

## **6.3. Vpliv fluorescein izotiocianata na tvorbo stika med hitosanom in tkivom**

Označevanje CH s FITC-em nam omogoča, da lahko spremljamo, kako se CH porazdeli po tkivu po aplikaciji nanj. Znano je, da bioadhezivni polimer CH poveča permeabilnost sečnega mehurja. Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko so proučevali, ali označevanje CH s FITC-em spremeni sposobnost CH, da poveča permeabilnost tkiva. Poskus so izvedli na koščkih izoliranega sečnega mehurja, ki so jih vpeli v difuzijske celice. Uporabili so kontrolno raztopino učinkovine (moksifloksacin) ter 0,005, 0,05 in 0,25 % (ut/vol) disperzijo CH oziroma FITC-CH z moksifloksacinom. Ugotovili so, da neoznačen in označen CH v uporabljenih koncentracijah povečata prehajanje učinkovine v tkivo glede na kontrolno raztopino, med polimeroma enakih koncentracij pa niso opazili značilnih razlik (35).

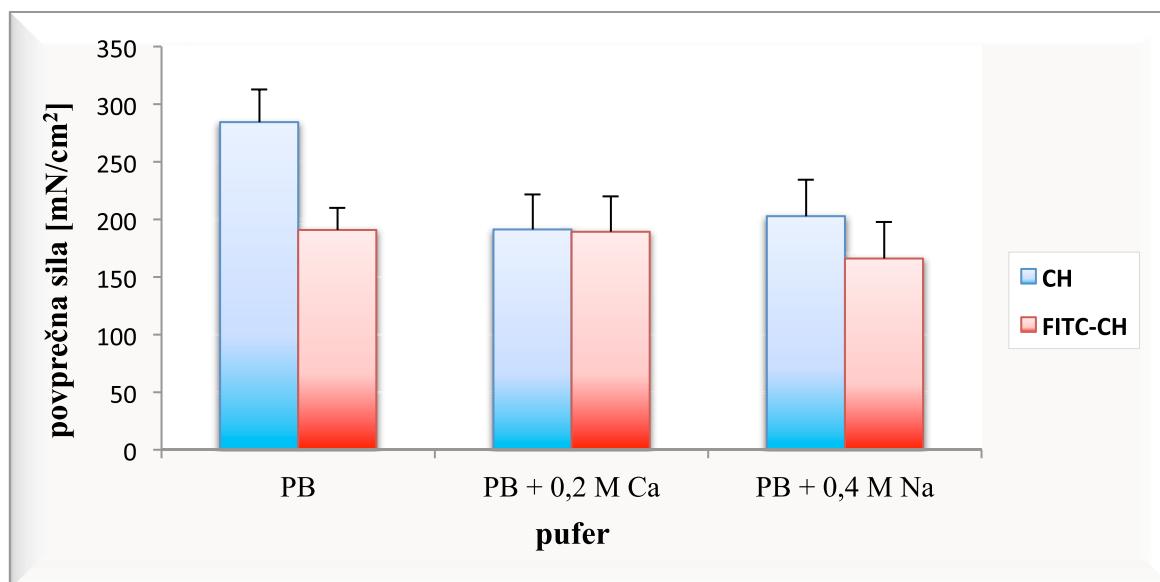
Ker študije, ki bi proučevale vpliv kovalentne vezave FITC-a na CH na bioadhezivne lastnosti CH-ja, nismo zasledili, smo v prvem delu diplomske naloge spremljali jakost bioadhezije neoznačenega in označenega CH. V primeru, ko smo za hidratacijo sluznice uporabili pufer brez dodanih ionov (PB), smo opazili, da označevanje CH s FITC-em zmanjša jakost bioadhezije (slika 15) za razliko od študije, kjer so proučevali permeabilnost. Razlog za zmanjšanje je najverjetneje v amino skupinah CH. Te v procesu bioadhezije interagirajo z

negativno nabitimi sulfatnimi skupinami glikozaminoglikanov. FITC je kovalentno (močna vez) vezan na amino skupine CH. Le-teh je na razpolago manj za vstop v interakcije s tkivom.

Jakost bioadhezije neoznačenega CH smo merili tudi v pogojih, ko smo za hidratacijo sluznice uporabili pufer z dodanimi natrijevimi ozziroma kalcijevimi ioni. Koncentracija monovalentnih natrijevih ionov (0,4 M) je bila dvakrat večja od koncentracije dvovalentnih kalcijevih ionov (0,2 M), s čimer smo zagotovili enako ionsko moč pufra. Iz slike 15 razberemo, da se jakost bioadhezije ob uporabi teh dveh pufrov ne razlikuje, kar smo potrdili tudi s statistično obdelavo rezultatov. V *in vitro* študiji (30) so spremljali vpliv dodanih kalcijevih, natrijevih in magnezijevih ionov različnih koncentracij na bioadhezivne lastnosti CH. S tenziometrično metodo so spremljali silo ločevanja med filmom neoznačenega CH in površino izolirane sluznice prašičjega sečnega mehurja. Tako kot v našem poskusu, so tudi v tej raziskavi opazili, da se zaradi dodanih ionov jakost bioadhezije zmanjša. Kationi najverjetneje vstopajo v interakcije z negativnimi sulfatnimi skupinami glikozaminoglikanov. Tako je na razpolago manj vezavnih mest za CH. Tudi v tej študiji so opazili, da je jakosti bioadhezije pri uporabi pufra z dodanimi natrijevimi in kalcijevimi ioni približno enaka takrat, ko je koncentracija natrijevih ionov dvakrat večja od koncentracije kalcijevih ionov. Naši rezultati se torej ujemajo z rezultati omenjene študije.

Zanimivo je, da je bila jakost bioadhezije FITC-CH filmov podobna, če smo za hidratacijo sluznice uporabili PB ali pa pufre z večjo ionsko močjo (pufer z dodanimi natrijevimi oz. kalcijevimi ioni (slika 15). Pri uporabi pufra z dodanimi natrijevimi ioni je bila jakost bioadhezije nekoliko manjša kot pri pufru z dodanimi kalcijevimi ioni, vendar ta razlika ni bila značilna. Primerjali smo tudi rezultate v jakosti bioadhezije neoznačenega in označenega CH, ko smo za hidratacijo sluznice uporabili pufer z dodanimi natrijevimi ioni (slika 15). Jakost bioadhezije je bila pri uporabi FITC-CH filmov nekoliko manjša, vendar ta razlika ni bila značilna.

Vezava FITC na CH torej lahko pomembno vpliva na bioadhezivne lastnosti CH, pri čemer pa ima pomembno vlogo tudi vrsta pufra, ki ga uporabimo za hidratacijo sluznice tkiva.



Slika 15: Graf prikazuje povprečne sile, ki so potrebne za ločitev filma z neoznačenim (CH) ali označenim (FITC-CH) hitosanom od površine sluznice prašičjega sečnega mehurja; podane so tudi njihove standardne deviacije ( $n = 8\text{--}11$ ). Za hidratacijo sluznice smo uporabili pufre različne sestave (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na)).

#### 6.4. Vpliv označitve CH s FITC-em na hidratacijo

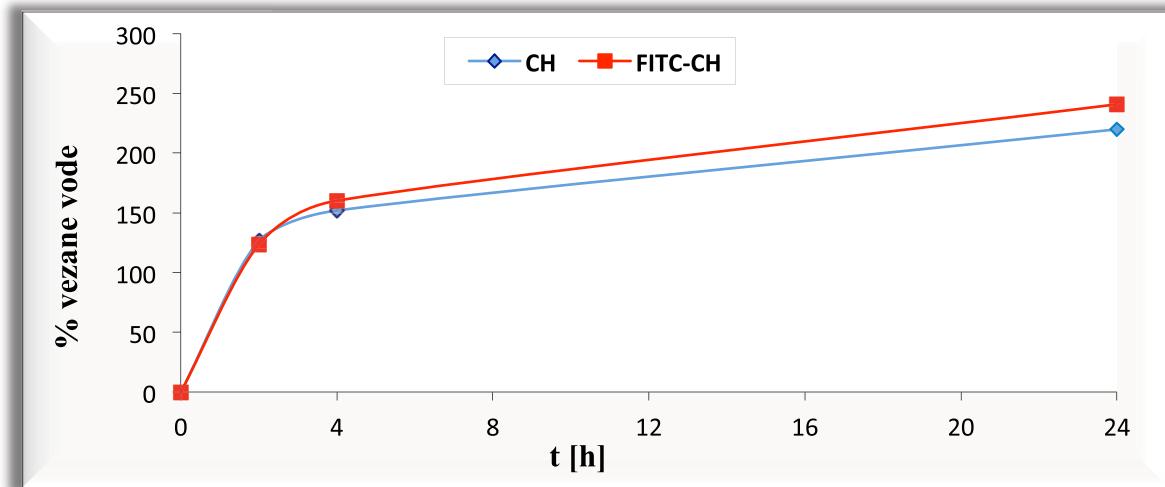
Na dobro adhezijo hitosana na tkivo ne vplivajo le interakcije med pozitivno nabitimi amino skupinami CH in negativnimi sulfatnimi skupinami glikozaminoglikanov. Pomembno vlogo ima tudi sposobnost hitosana, da veže optimalno količino vode (sluz vsebuje kar 95 % vode). Ob prisotnosti vode se CH hidratira, nato pa razširi svoje polimerne verige. To omogoča medsebojno interpenetracijo verig polimera in glikozaminoglikanov na površini sluznic, kar izboljša jakost bioadhezije. Ključno vlogo pri tem imata tudi **pH** ter **ionska moč** vodnega medija, pomembno pa je tudi to, katere vrste in koliko **hidrofilnih skupin** vsebuje bioadhezivni polimer. Vse to vpliva na količino vode, ki jo je sposoben vezati polimer, in na hitrost, s katero jo veže, ter posledično tudi na jakost bioadhezije.

V našem poskusu smo zagotovili, da je bil pH disperzije neoznačenega in označenega hitosana približno enak (4,4–4,7). Zato smo njegov vpliv na hidratacijo polimernih filmov izključili. FITC-CH glede na CH sicer vsebuje več hidrofilnih skupin, vendar pa blokira proste amino skupine CH, ki prispevajo k hidrataciji. Pri delu smo uporabili puffer brez in z dodanimi kalcijevimi oziroma natrijevimi ioni. Če pufetu dodamo ione, mu povečamo ionsko moč.

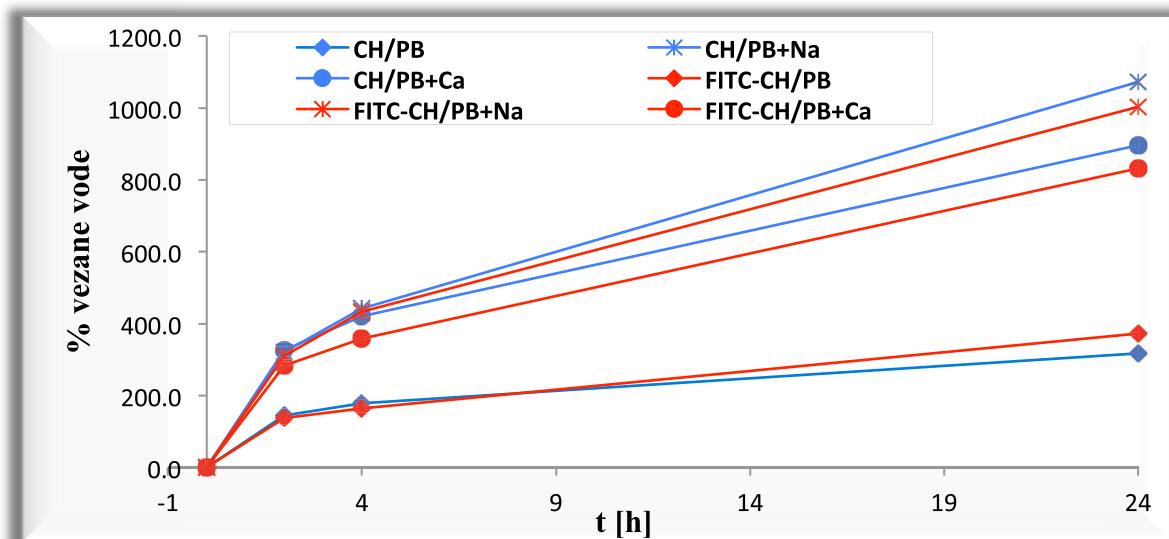
Najprej smo filme z neoznačenim in označenim CH položili v eksikator s 100 % vlažnostjo (slika 16). Količina vezane vode na filme s CH in FITC-CH je s časom naraščala. Ugotovimo, da med polimeroma ni značilne razlike v hitrosti hidratacije.

Sledil je poskus, ko smo na posušene polimerne filme označenega in neoznačenega CH v ločenih serijah nanesli 50  $\mu\text{L}$  PB, ( $\text{PB} + 0,2 \text{ M Ca}$ ) ali ( $\text{PB} + 0,4 \text{ M Na}$ ). Iz slike 17 vidimo, da se pri filmih, ki smo jim nanesli pufer z dodanimi kalcijevimi ali natrijevimi ioni, odstotek vezane vode značilno poveča glede na filme, ki smo jim nanesli pufer brez dodanih ionov. Pri uporabi pufra z dodanimi natrijevimi oziroma kalcijevimi ioni se vedno nekoliko več vode veže na CH filme kot na FITC-CH filme. Pri filmih z dodanimi natrijevimi ioni je viden trend večje količine vezave vode v primerjavi z dodanimi kalcijevimi ioni, vendar pa je statistična obdelava rezultatov hidratacije po 24 urah pokazala, da razlika v odstotku vezane vode pri uporabi obeh pufrov ni značilna.

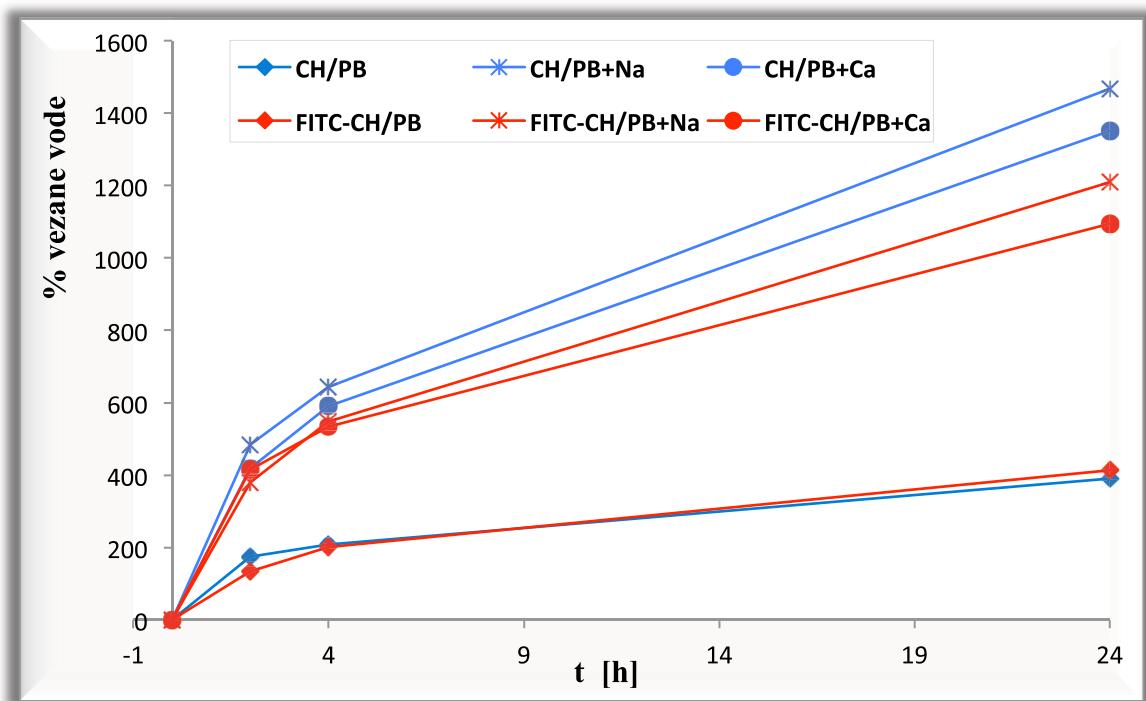
Posušenim polimernim filmom smo v ločenih serijah nanesli 100  $\mu\text{L}$  pufra PB, ( $\text{PB} + 0,2 \text{ M Ca}$ ) ali ( $\text{PB} + 0,4 \text{ M Na}$ ) (slika 18). Opazimo, da se na filme veže večja količina vode kot na filmih, ki smo jim nanesli 50  $\mu\text{L}$  pufra. Filmom smo namreč dodali večji volumen pufra, zato le-ta vsebuje več ionov, kar lahko poveča hidratacijo polimernih filmov. Tudi tu je statistična obdelava rezultatov hidratacije po 24 urah pokazala, da razlika v odstotku vezane vode na CH ali FITC-CH filme pri uporabi pufra z dodanimi natrijevimi in kalcijevimi ioni ni značilna.



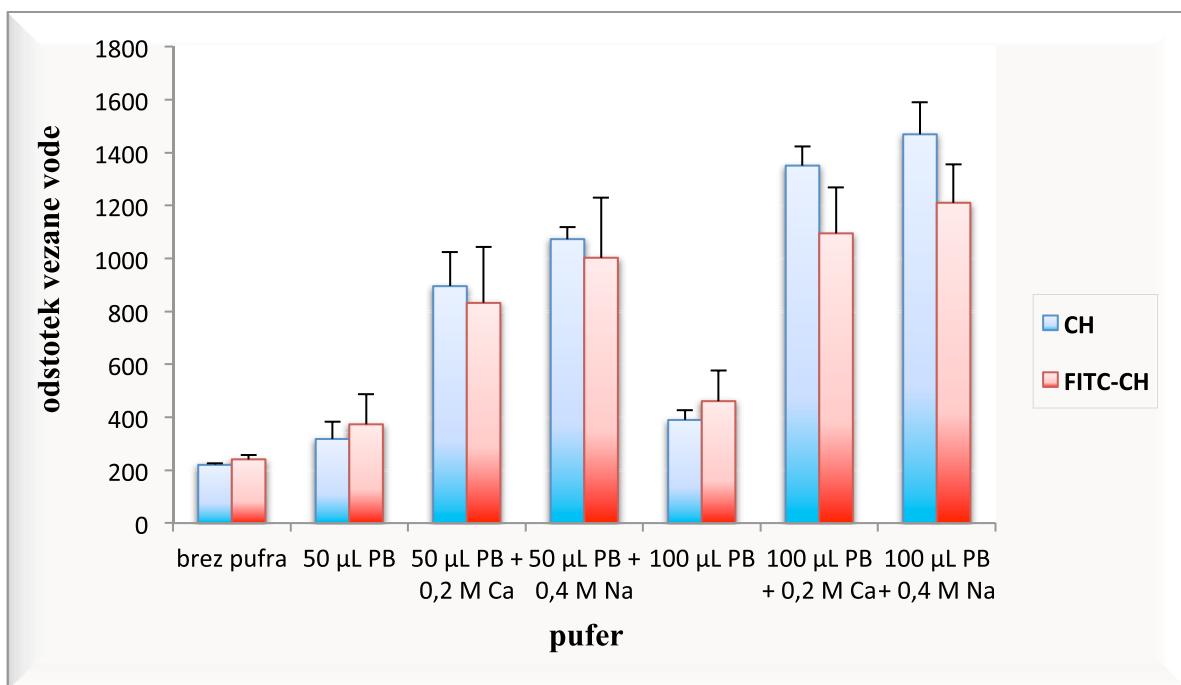
Slika 16: Spremljanje povprečne količine vezane vode v odstotkih ( $n = 3$ ) na filme z neoznačenim (CH) in označenim (FITC-CH) hitosanom. Polimernim filmom pred postavitevijo v eksikator s 100 % vlažnostjo nismo dodali pufra.



Slika 17: Spremljanje povprečne količine vezane vode v odstotkih ( $n = 3-4$ ) na filme z neoznačenim (CH) in označenim (FITC-CH) hitosanom po 2, 4 in 24 urah ob dodatku **50  $\mu$ L** PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na).



Slika 18: Spremljanje povprečne količine vezane vode v odstotkih ( $n = 3-5$ ) na filme z neoznačenim (CH) ali označenim (FITC-CH) hitosanom po 2, 4 in 24 urah ob dodatku **100  $\mu$ L** PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na).



Slika 19: Povprečna količina vezane vode na filme z neoznačenim (CH) in označenim (FITC-CH) hitosanom v eksikatorju s 100 % vlažnostjo po 24 urah in njihove standardne deviacije ( $n = 3-5$ ). Na filme smo nanesli 50 oziroma 100  $\mu\text{L}$  pufra različne sestave (PB, (PB + 0,2 M Ca) ali (PB + 0,4 M Na)).

Če dobljene rezultate hidratacije primerjamo z rezultati bioadhezije, opazimo, da je prisotnost FITC na CH najbolj zmanjšala jakost bioadhezije pri uporabi pufra brez dodanih ionov. Razlog za to je bil najverjetneje v blokadi prostih aminskih mest na CH s FITC-em. Med polimeroma ni prišlo do razlike v hidrataciji, zato le-ta očitno nima ključne vloge pri bioadhezivni interakciji.

Pri uporabi pufra z dodanimi kalcijevimi ioni izbira polimera ni pomembno vplivala na jakost bioadhezije. Najverjetneje je tudi tu FITC zasedel proste amino skupine na hitosanu, čeprav ni bilo razlike v jakosti bioadhezije. Filmi s FITC-CH so vezali manjšo količino vode kot filmi s CH (slika 19). Možno je, da se je pri teh FITC-CH filmih vezala tolikšna količina vode in da je to pomembno prispevalo k izboljšanju adhezije, vpliv označitve hitosana s FITC-em pa se je tako zmanjšal. Pričakovali bi, da do razlik v jakosti bioadhezije ne bo prišlo tudi pri uporabi pufra z dodanimi natrijevimi ioni, vendar pa opazimo manjši padec v primeru uporabe filmov s FITC-CH. To sicer statistično neznačilno zmanjšanje jakosti bioadhezije je lahko deloma posledica same variabilnosti biološkega materiala. Poleg tega FITC-CH filmi, ki so jim

dodani natrijevi ioni, vežejo večjo količino vode glede na FITC-CH filme, ki smo jim dodali kalcijeve ione. Možno je, da je količina vezane vode že tako velika, da se posledično zmanjša jakost bioadhezije.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da ima hidratacija polimera pomembno vlogo v bioadhezivni interakciji, vendar so za jakost bioadhezije v testiranih pogojih očitno pomembni še drugi dejavniki.

## 6.5. Vpliv označitve CH s FITC-em na zeta potencial

Zeta potencial izmerimo kot vsoto naboja na površini delca v disperzni fazi in torej določa stanje površinskega naboja na mejni strižni površini trdnega telesa (polimera) in tekočine (pufra). Velikost zeta potenciala je odvisna od **površinskega naboja**, vrste in koncentracije ionov v raztopini, debeline električnega dvojnega sloja, najpomembnejši dejavnik, ki vpliva nanj, pa je **pH** (39, 40).

Ker ima torej pH velik vpliv na velikost zeta potenciala, sta imeli disperziji neoznačenega in označenega hitosana, ki smo ju uporabili pri meritvah, primerljiv pH, in sicer v območju 4,4–4,7. Pri merjenju 0,05 % disperzije neoznačenega in označenega hitosana smo opazili, da je med polimeroma majhna razlika v zeta potencialu, pri 0,5 % koncentraciji disperzij pa je bila ta nekoliko večja. Neoznačen hitosan ima prosto amino skupino, ki je pri pH 4,4–4,7 protonirana. Pri označenem hitosanu pa je deloma zasedena, saj je nanjo vezan FITC. Ker nabolj pomembno vpliva na velikost zeta potenciala, bi pričakovali, da bo zeta potencial pri neoznačenem hitosanu bolj pozitiven kot pri označenem. Izmerjeni zeta potenciali disperzij obeh koncentracij so bili v nasprotju s predvidevanji, čeprav razlike v zeta potencialu med CH in FITC-CH niso bile velike. Zaradi velike ionske moči disperzij CH in FITC-CH v pufru z dodanimi natrijevimi in kalcijevimi ioni merjenje zeta potenciala teh disperzij ni bilo možno.

## 6.6. Mikroskopiranje

Pod svetlobnim (slika 11) in fluorescenčnim (slika 13) mikroskopom smo opazovali polimerne filme hitosana po vzpostavitvi bioadhezivne interakcije z namenom, da spremljamo, ali je prišlo do vzpostavite stika s površino sluznice izoliranega sečnega mehurja po celotnem filmu. Na sliki 11 je viden del filma, kjer so prisotni odtisi površine sluznice, ki so nastali po stiku filma s tkivom ter rob stika in del filma, ki ni bil v stiku s sluznico. Slika 14 prikazuje sluznico po prekinitvi stika s filmom označenega CH. Zelenoobarvanje je posledica

prisotnosti FITC-CH, ki nam omogoča dobro opazovanje pod fluorescenčnim mikroskopom. Z mikroskopom lahko torej preverimo tudi to, ali je hitosan po prekinitvi stika ostal na površini sluznice. Iz slike 14 sklepamo, da je bilo označevanje hitosana s FITC-em zadostno, ker smo ga dobro videli pod fluorescentnim mikroskopom. Fluorescentno zeleno obarvanje (slika 14) nakazuje, da se je hitosan nakopičil predvsem v gubah sluznice.

## 7. SKLEP

Na podlagi eksperimentalno pridobljenih rezultatov, ki smo jih obdelali ter statistično ovrednotili, smo prišli do sledečih ugotovitev:

- Metoda za označevanje hitosana s FITC-em je bila uspešna, saj nam pridobljen produkt omogoča opazovanje polimera na tkivu pod fluorescenčnim mikroskopom.
- Vezava FITC-a na hitosan ter izbira pufra za hidratacijo sluznice sečnega mehurja značilno vplivata na jakost adhezije hitosana na sluznico izoliranega prašičjega sečnega mehurja. Označevanje CH s FITC-em je najbolj vplivalo na jakosti bioadhezije v primeru, ko smo za hidratacijo sluznice uporabili pufer brez dodanih ionov.
- Označevanje CH s FITC-em ne vpliva bistveno na zeta potencial polimernih disperzij.
- Hidratacija polimernih filmov je značilno večja, če na filme predhodno nanesemo določeno količino pufrov z večjo ionsko močjo ((PB + 0,2 M Ca) oziroma (PB + 0,4 M Na)). Pri uporabi pufrov z dodanimi natrijevimi oziroma kalcijevimi ioni je hidratacija filmov FITC-CH manjša kot pri CH-filmih. Z večanjem volumna pufra nanesenega na polimerne filme narašča odstotek vezane vode.
- Hidratacija ima pomembno vlogo v bioadhezivni interakciji, vendar pa v testiranih pogojih ni imela ključnega pomena.

## 8. VIRI IN LITERATURA

1. Kobe V., Dekleva A., Lenart I. F., Širca A., Velepič M.: Anatomija – skripta za študente medicine, 4.del: Drobje, koža., ponatis 1. Izdaje, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 1997: 99-106.
2. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Se%C4%8Devod>, dostop 8. 5. 2012
3. Lewis S. A.: Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278: 867-874.
4. [http://www.urologija.si/gradivo.php?subaction=showfull&id=1161197362&archive=&start\\_from=&ucat=](http://www.urologija.si/gradivo.php?subaction=showfull&id=1161197362&archive=&start_from=&ucat=), dostop 8. 5. 2012
5. Hicks R. M.: The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. Biol Rev 1975; 50: 215-246.
6. Stabellini G., Calastrini C., Gilli P., Bedani P. L.: Urinary glycosaminoglycans in recurrent urinary tract infections in kidney transplant patients. Biom Pharm 1999; 53: 274-7.
7. Rubenwolf P., Southgate J.: Permeability of differentiated human urothelium in vitro. Meth Mol Biol 2011; 263: 207-222.
8. Woodley J.: Bioadhesion: new possibilities for drug administration? Clin Pharm 2001; 8: 77-84.
9. <http://www.authorstream.com/Presentation/aSGuest112579-1174673-bioadhesive-drug-delivery-systems-git/>, dostop 8. 5. 2012
10. Bogataj M., Mrhar A.: Bioadhezija. Farm Vest 1998; 49: 9-24.
11. Smart J. D.: The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. Adv Drug Del Rev 2005; 57: 1556-1568.
12. Jakoša S., Pogačnik D., Frece L., Veber M., Kerec D., Brilej R., Zupan D., Smrdú A., Jagarinc T., Ogrizek S.: Veliki srednješolski priročnik, Ataja, Ljubljana, 2001;. 608-611.
13. Dodane V., Vilivalam V. D.: Pharmaceutical applications of chitosan. PSTT 1998; 1:246-253.
14. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R. M., Chielli E.: Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progr Polym Sc 2011; 36: 981-1014.

15. Rinaudo M.: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym* 2006; 31: 603-632.
16. George M., Abraham T. E.: Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *J Cont Rel* 2006; 114: 1-14.
17. Schipper N.G.M., Vårum K. M., Artursson P.: Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res* 1996; 13 (11): 1686-1692.
18. Qaqish R. B., Amiji M. M.: Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions. *Carbo Polym Volu* 1999; 38: 99-107.
19. Burjak M., Bogataj M., Velnar M., Grabnar I., Mrhar A.: The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. *Int Pharm J* 2001; 224: 123-130.
20. Harikarnpakdee S., Lipipun V., Sutanthavibul N., Ritthidej G. C.: Spray-dried mucoadhesive microspheres: preparation and transport through nasal cell monolayer. *Pharm Sc Tech* 2006; 7(1): E12.
21. <http://www.scipharm.at/download.asp?id=194>, dostop 10. 5. 2012
22. 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.
23. <http://old.gimvic.org/projekti/timko/2002/2e/mikroskop/tipi%20mikroskopov.html>,  
dostop 8. 5. 2012
24. Casanovas J., Jacquemin D., Perpète E. A., Alemán C.: Fluorescein isothiocyanate: Molecular characterization by theoretical calculations. *Chem Phys* 2008; 354: 155-161.
25. Grosman A.: Vpliv natrijevega, kalcijevega in magnezijevega klorida na adhezijo hitosana na sluznico prašičjega sečnega mehurja. Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.
26. Trontelj J., Veržun P.: Bioadhezija mikrosfer iz zmesi polikarbofila in hitosana na sluznico sečnega mehurja prašiča. Raziskovalna naloga. Fakulteta za farmaijsko, Ljubljana, 2003; 57-65.
27. Mugerle B.: Vpliv kalcijevih in natrijevih ionov na mukoadhezivne lastnosti polikarbofila. Raziskovalna naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2000; 48-56.

28. Kerec K. M., Bogataj M., Mugerle B., Gašperlin M., Mrhar A.: Mucoadhesion on pig vesical mucosa: influence of polycarbophil/calcium interactions. *Int Pharm J* 2002; 241: 135-143.
29. [http://www.kclj.si/kikkb/preiskave/tabele\\_o/osnovna\\_urinska\\_analiza.htm](http://www.kclj.si/kikkb/preiskave/tabele_o/osnovna_urinska_analiza.htm), dostop 12.06.2012
30. Wong C. F., Yuen K. H., Peh K. K.: An in-vitro method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables. *Int J Pharm* 1999; 180: 47-57.
31. Lenardič A.: Vpliv fluorescentno označenega hitosana na permeabilnost stene prašičjega sečnega mehurja. Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012.
32. [http://en.wikipedia.org/wiki/Zeta\\_potential](http://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential), dostop 8. 5. 2012
33. <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>, dostop 8. 5. 2012
34. Carneiro-da-Cunha M. G., Cerqueira M. A., Teixeira J. A., Vicente A. A., Souza B. W. S.: Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbo Polym* 2011; 85: 522-528.