

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA PREGLAV

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA PREGLAV

**VPLIV MIKROSFER S HITOSANOM NA BARIERNE
LASTNOSTI STENE SEČNEGA MEHURJA**

Influence of chitosan microspheres on barrier properties of urinary
bladder wall

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Raziskave in poskusi so bili opravljeni na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, ter na Inštitutu za biologijo celice, Medicinska fakulteta pod mentorstvom doc.dr. Mojce Kerec Kos in v sodelovanju z doc.dr. Simonom Žakljem mag.farm., prof.dr. Odonom Planinškom mag.farm., izr.prof.dr. Marijo Bogataj mag.farm. ter doc.dr. Andrejo Erman.

Zahvala:

Hvala vsem, ki so mi tukaj dela kakorkoli pomagali. Najprej hvala Mojci za mentorstvo, Greti za pomoč pri malih in velikih težavah ter ostalim iz Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko. Hvala moji družini za veliko podporo med študijem ter mojim prijateljem brez katerih bi bila študentska leta pusta in dolgočasna.

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

Ana Preglav

Ljubljana, 2013

Povzetek

Sečni mehur gradijo tri plasti, serozna, mišična in mukozna, ki jo gradita lamina propria in epitelij (urotelij). Med najpogostejsa obolenja sečnega mehurja spadajo bakterijske infekcije in površinski rak. Z intravezikalno aplikacijo mukoadhezivne farmacevtske oblike se podaljša čas zadrževanja učinkovine na mestu delovanja in tako poveča učinkovitost zdravljenja.

Namen diplomske naloge je bila priprava mukoadhezivnih mikrosfer s hitosanom za intravezikalno terapijo hujših infekcij sečnega mehurja, ki jih s sistemsko aplikacijo kemoterapevtikov ne uspemo pozdraviti. Z metodo odparevanja topila smo pripravili mikrosfere s hitosanom in fluorokinolonskim kemoterapevtikom ciprofloksacinom. Hitosan je kationski biopolimer, ki že sam deluje blago protibakterijsko in protitumororno ter zaradi bioadhezivnosti podaljša zadrževanje farmacevtske oblike na mestu delovanja, prav tako poveča permeabilnost sluznice sečnega mehurja, tako da povzroči luščenje dežnikastih celic urotelija. Z luščenjem bi se lahko odstranile tudi inficirane in rakave celice. Najprej smo optimizirali postopek priprave mikrosfer in njihove lastnosti. Po vrednotenju mikrosfer smo za nadaljnje delo izbrali serijo hitosanskih mikrosfer z dodanim Mg-stearatom. Ugotovljali smo vpliv hitosana v disperziji in hitosana vgrajenega v mikrosfero na transepiteljsko električno upornost (TEER) sečnega mehurja podgan. Prav tako pa smo izvedli *in vivo* poskus na miših, kjer smo jim intravezikalno aplicirali disperzijo hitosana in suspenzijo mikrosfer ter površino urotelija, po izolaciji mehurja, opazovali z elektronsko vrstično mikroskopijo.

Ugotovili smo, da med lastnostmi posameznih serij mikrosfer ni bistvenih razlik. Večina ciprofloksacina se iz mikrosfer sprosti že v prvih desetih minutah poskusa. Značilne razlike med disperzijo hitosana in suspenzijo mikrosfer so prisotne v spremembji TEER sečnega mehurja po 60 minutni izpostavljenosti tkiva vzorcema. Pri *in vivo* poskusu na miših smo ugotovili, da že po 20 minutah delovanja mikrosfere s hitosanom in disperzija hitosana različno vplivata na morfologijo površine urotelija. Pri disperziji je bilo luščenje urotelija enakomerno, v obliki značilnega satovja in večinoma omejeno le na dežnikaste celice. Hitosan v mikrosferah pa je deloval celo na posamezne spodaj ležeče vmesne celice, območja odluščenih dežnikastih celic pa so bila velika.

Tako naše mikrosfere s hitosanom predstavljajo dobro izhodišče za nadaljne raziskave.

Summary

Urinary bladder's wall is built from three layers: serosa, smooth muscles and mucosa, that is built from lamina propria and epithelium (urothelium). Bacterial infections and a superficial cancer are among the most frequent illnesses of urinary bladder. Intravesically applied mucoadhesive pharmaceutical form prolongs the retention of a drug at the site of action, which increases the efficiency of a treatment.

Main intention of this thesis was to prepare mucoadhesive microspheres with chitosan for intravesical treatment of severe infections of urinary bladder that cannot be cured with systemic use of antibiotics. Microspheres containing chitosan and synthetic fluoroquinolone ciprofloxacin were prepared with evaporation technique. Chitosan is a cationic biopolymer with mild antibacterial and antitumor activity, and because of its bioadhesion, retention of pharmaceutical form on the place of activity is prolonged. It also increases permeability of urothelium by desquamation of superficial umbrella cells. With desquamation infected cells or cancer cells can also be removed. We optimised preparation procedure of microspheres and their properties. After evaluation of the results microspheres containing magnesium stearate were used for further procedures. We determined the influence of suspension of microspheres with chitosan and chitosan dispersion on TEER of ratty urinary bladder. At the end we performed *in vivo* experiment on mice, where dispersion of chitosan and suspension of microspheres were intravesically applied into mice. After their urinary bladder was isolated it was observed under electronic scanning microscope.

Separate series of microspheres didn't differentiate significantly in their properties. After a 60-minute exposure of the tissue to the samples, there was a significant difference between effects on TEER of urinary bladder, if chitosan is incorporated in microspheres or dispersed in PBS 6. We noticed also a considerable difference within morphology of urothelium by using both samples. In the case of chitosan dispersion the desquamation was less prominent and through entire surface in a distinctive honeycomb pattern, limited only on umbrella cells. Chitosan in microspheres had effect also on intermediate cells and the extent of desquamation was larger.

Our chitosan microspheres presents promising starting point for further research.

Seznam okrajšav

PBS 6 – izotoničen fosfatni pufer (pH=6)

HPMC – hidroksipropil metil celuloza

HIT – disperzija hitosana

M – mikrosfere

MS – suspenzija mikrosfer

MS s5/20/60 – supernatant po 5/20/60-minutnem suspendiranju mikrosfer v PBS 6

UP - uroplakin

TEER – transepiteljska električna upornost

GAG – glikozaminglikani

P – verjetnost

df – število prostostnih stopenj

SD – standardna deviacija

KV% – koeficient variacije

Mr – relativna molekulska masa

Caco-2 celice – monosloj kultiviranih intestinalnih epitelijskih celic

SEM – elektronski vrstični mikroskop

Kazalo vsebine:

1	Uvod.....	1
1.1	Sečni mehur	1
1.1.1	Urotelij	2
1.1.1.1	Transport skozi epitelij sečnega mehurja	4
1.2	Bakterijske infekcije sečil in rak sečnega mehurja	4
1.2.1	Infekcije sečil	4
1.2.2	Zdravljenje okužbe sečil	6
1.2.3	Rak sečnega mehurja	7
1.3	Hitosan	7
1.3.1	Mukoadhezivnost hitosana.....	9
1.3.2	Povečanje permeabilnosti sluznic	9
1.3.2.1	Sečni mehur	10
1.3.2.2	Ostala tkiva	11
1.4	Ciprofloksacin.....	11
1.4.1	Terapevtske indikacije	12
1.4.2	Neželeni učinki in kontraindikacije	12
1.4.3	Rezistenca bakterij	13
1.5	Mikrosfere.....	13
1.5.1	Vpliv hitosana na lastnosti mikrosfer	13
1.5.2	Vplivi procesnih pogojev na lastnosti mikrosfer	14
2	Namen dela	15
3	Materiali in metode	16
3.1	Materiali	16
3.1.1	Lastnosti uporabljenih polimerov	17
3.2	Aparature.....	17
3.3	Metode dela.....	19
3.3.1	Priprava pufrov, raztopin in disperzij	19
3.3.2	Priprava in analiza mikrosfer	20
3.3.2.1	Priprava mikrosfer	20
3.3.2.2	Sejalni preizkus.....	21
3.3.2.3	Gravimetrično določanje količine flotiranih in sedimentiranih mikrosfer	22
3.3.2.4	Gostota mikrosfer	22
3.3.2.5	Nabrekanje mikrosfer	22
3.3.2.5.1	Opazovanje pod mikroskopom.....	22
3.3.2.5.2	Vrednotenje z analizatorjem velikosti delcev Mastersizer.....	23
3.3.2.6	Vsebnost ciprofloksacina v mikrosferah	23
3.3.2.7	Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer po metodi USP XXIII	23
3.3.3	Izvedba študij transepitelijske upornosti (TEER) podganjega mehurja	24
3.3.3.1	Priprava elektrod.....	24
3.3.3.2	Priprava pretočnih celic	24
3.3.3.3	Merjenje TEER	24
3.3.4	Vrstična elektronska mikroskopija	26

3.3.4.1	Opazovanje mikrosfer.....	26
3.3.4.2	Opazovanje sluznice sečnega mehurja	26
4	Rezultati	27
4.1	Sejalna analiza	27
4.2	Gravimetrično določanje količine flotiranih in sedimentiranih mikrosfer	29
4.3	Gostota mikrosfer.....	29
4.4	Določanje nabrekanja mikrosfer	30
4.4.1	Opazovanje mikrosfer pod mikroskopom.....	30
4.4.2	Vrednotenje z analizatorjem velikosti delcev Mastersizer	31
4.5	Vsebnost ciprofloksacina v mikrosferah.....	32
4.6	Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer po metodi USP XXIII.....	33
4.7	TEER podganjega mehurja	34
4.7.1	Statistična obdelava	37
4.8	Vrstična elektronska mikroskopija	40
4.8.1	Opazovanje mikrosfer.....	40
4.8.2	Opazovanje sluznice sečnega mehurja.....	41
5	Razprava	44
5.1	Izdelava in vrednotenje mikrosfer	44
5.2	Vpliv mikrosfer na vrednotenje TEER podganjega mehurja.....	50
5.3	Vpliv mikrosfer na morfologijo sečnega mehurja miši	54
6	Sklep	56
7	Literatura.....	57

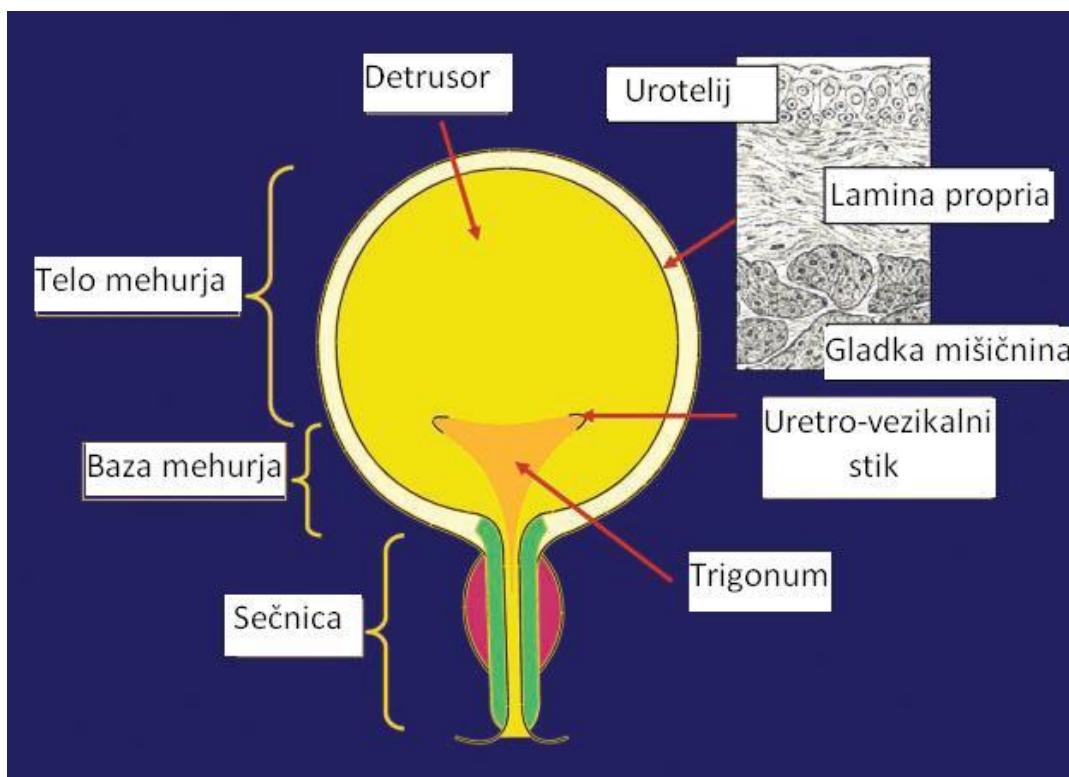
1 Uvod

1.1 Sečni mehur

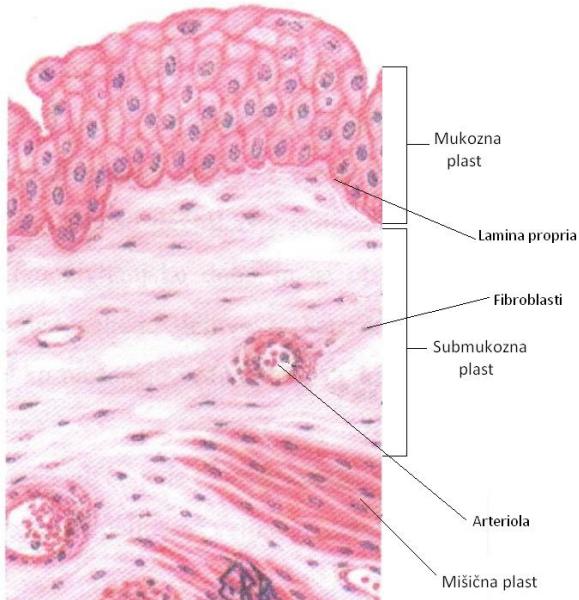
Del sečil predstavlja sečni mehur, katerega glavna funkcija je kratkotrajno shranjevanje in vzdrževanje sestave sekundarnega seča. Ko je mehur poln, je sferičen votel organ, ki s svojo idealno obliko omogoča čim manjšo površino s katero je seč v kontaktu in tako zmanjša prenos snovi med urinom in krvjo, prazen pa ima obliko tetaedra.⁽¹⁾⁽²⁾ Povprečna kapaciteta mehurja pri moških je 700 mL (maks. 1500 mL), pri ženskah pa 650 mL (maks. 1100 mL).⁽³⁾ Sečni mehur leži v sprednjem delu medenice in je obdan z ekstraperitonealno maščobo ter vezivnim tkivom.⁽⁴⁾

Steno sečnega mehurja gradijo tri plasti:

- serozna, ki je sestavljena iz vezivnega tkiva in je obdana s slojem mezotelijskih celic;
- mišična, ki je zgrajena iz gladkih mišic (zunanja in notranja vzdolžna plast ter srednja krožna plast)
- mukozna, ki jo gradita lamina propria in epitelij (urotelij).⁽⁵⁾



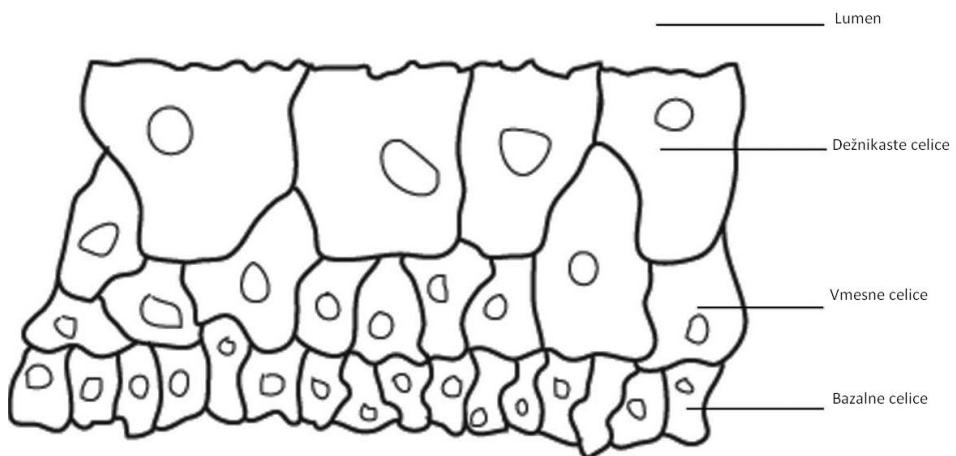
Slika 1: Shema zgradbe sečnega mehurja. (slika pritegnjena po⁽⁶⁾)



Slika 2: **Zgradba stene sečnega mehurja.** (slika pripadajoča po ⁽¹⁾)

1.1.1 Urotelij

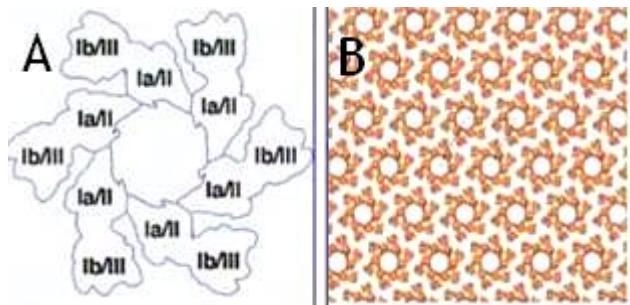
Urotelij ima značaj prehodnega epitelija in je prisoten v sečnem mehurju, sečevodu, ledvičnih čašicah in zgornjem območju sečnice.⁽⁵⁾



Slika 3: **Struktura urotelija.** (slika pripadajoča po ⁽⁷⁾)

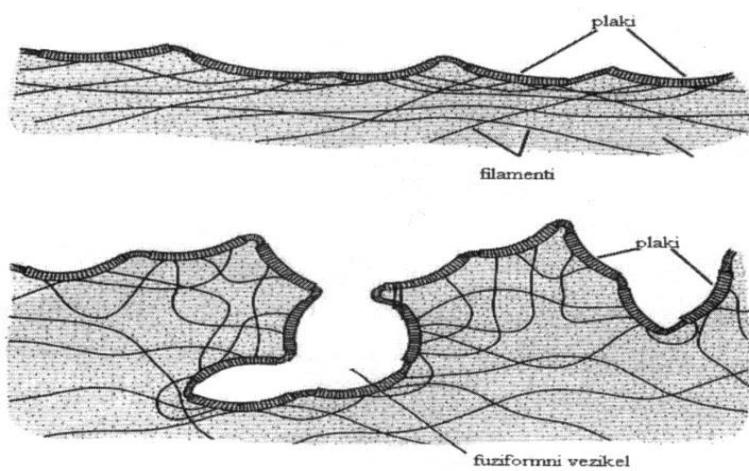
Sestavlja ga trije sloji celic. Bazalno plast sestavlja zarodne celice premera 5-10 μm . Vmesne (intermediarne) celice so večje, njihov premer je 20 μm . Največje so površinske heksagonalne dežnikaste celice, ki so v stiku z lumnom mehurja. Njihova velikost (med 50 in 120 μm) je odvisna od raztegnjenosti mehurja. Luminalna površina urotelija je prekrita s

plastjo glikozaminglikanov (GAG), ti imajo zaradi velikega števila sulfatnih skupin močan negativen površinski naboj, so po naravi hidrofilni in tvorijo tanek hidratacijski sloj. Preprečijo adhezijo organizmu tujih delcev (npr. bakterij) ter penetracijo raztopin in topljencev do celic.⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ Dežnikaste celice imajo dve specifični morfološki lastnosti. Prva so tako imenovani plaki, s katerimi je prekrita apikalna membrana. Plaki so ločeni s plazemskimi membranskimi domenami, kar daje vtis različne debeline posameznih delov membrane. Membrana je debelejša na apikalni in tanjša na bazolateralni strani celice. Plaki zasedajo 70-80% apikalne površine in so sestavljeni iz podenot, vsak plak sestavlja ~1000 podenot. Te sestavljajo štirje tipi proteinskih transmembranskih domen, uroplakini (UP).



Slika 4: **Zgradba podenote plaka (A) in razporeditev le-teh (B).** (slika pritejena po⁽⁸⁾) Po 12 molekul UP tvori notranji in zunanji krog proteinov in sicer v parih UPIa ($Mr=27\text{kDa}$)/UPII ($Mr=15\text{kDa}$) in UPIb ($Mr=28\text{kDa}$)/UPIII ($Mr=47\text{kDa}$), kjer UPIa in UPIb tvorijo notranji, UPII in UPIII pa zunanjji krog.⁽²⁾⁽⁸⁾

Druga morfološka značilnost površinskih celic je visoka gostota citoplazemskih fuziformnih veziklov s pripadajočo fibrilno mrežo citoskeleta.⁽²⁾



Slika 5: **Shema luminalne površine celic urotelija** v raztegnjenem (zgoraj) in skrčenem, praznem (spodaj) mehurju.⁽¹⁾

V uroteliju se delijo bazalne celice, do delitve vmesnih celic pride le izjemoma (npr. pri poškodbah). Pri obnavljanja urotelija se bazalne celice pretvorijo v vmesne, te celice pa se pretvorijo v dežnikaste. Na površini lahko celice preživijo več kot 200 dni, za prehod od bazalnega do površinskega sklada pa potrebujejo več kot 11 tednov.⁽²⁾⁽⁵⁾

1.1.1.1 Transport skozi epitelij sečnega mehurja

Z izjemo aktivnega transporta, urotelij ne bi smel biti prepusten za nobeno substanco, ki je prisotna v urinu ali krvi. Kljub temu pa minimalen transport poteka po dveh poteh, transcelularno (skozi celice) in paracelularno (med tesnimi stiki in lateralnimi medceličnimi prostori. Različni vplivi na ti dve poti lahko zmanjšajo ali povečajo učinkovitost epitelijske bariere. Ena najbolj občutljivih metod za merjenje prepustnosti za ione je merjenje transepitelijске električne upornosti (TEER). Epitelij sečnega mehurja ima najvišjo zabeleženo TEER ($10000-100000\Omega m^2$), ki jo omogoča plast GAG, tesni stiki in epitelijske celice. Celična upornost je seštevek upornosti apikalne in bazolateralne membrane.⁽²⁾

1.2 Bakterijske infekcije sečil in rak sečnega mehurja

1.2.1 Infekcije sečil

Okužba sečil pomeni vdor mikroorganizmov v sečila, kjer se v sečniku, prostatu, votlemu sistemu ali ledvičnemu parenhimu namnožijo in povzročijo vnetje. Okužba je lahko akutna ali kronična, locirana v spodnjih (uretritis, cistitis, prostatitis) ali zgornjih sečilih (akutni pielonefritis, ledvični ali obledvični absces). Vnetje sečnega mehurja (cistitis) je klinični sindrom za katerega je značilno nenasadno, pogosto in pekoče odvajanje majhnih količin seča (dizurija). Seč je moten in neprijetnega vonja, včasih krvav. Navzoče so bolečine v predelu sečnega mehurja nad simfizo. O ponavljanju cistitisu govorimo takrat, kadar ženska vsaj trikrat v zadnjem letu preboli akutni cistitis. Te ponavljanje okužbe so zelo pogoste pri mladih ženskah, pojavljajo se pri več kot 20% žensk po prvi epizodi okužbe spodnjih okužb in so običajno odraz reinfekcije. Okužbe se pogosteje ponavljajo, če so imele bolnice okužbe sečil že v mladosti in če so imele pogoste okužbe sečil že njihove matere.⁽¹²⁾⁽¹³⁾

Infekcije opredelimo tudi glede na njihovo zapletenost. Med zapletene okužbe štejemo tiste, kjer zdravljenje ni učinkovito in tiste pri skupinah ljudi s povišanim tveganjem za obstoj

vnetnega žarišča v sečilih ali s prisotnimi dejavniki, za katere je značilno, da je okužba težje ozdravljiva in lahko povzroči hude zaplete (izguba ledvice, akutna ledvična odpoved, sepsa in celo smrt).

Pogostost okužb sečil se razlikuje glede na starost in spol. Pred okužbo nas ščitijo anatomske značilnosti sečil, tok in sestava urina ter lokalna in sistemski imunost. Kljub temu pa bakterije kolonizirajo distalni del sečnice, tkivo, ki ga obdaja, in pri ženskah nožnico. Bakterijska kolonizacija je odvisna od genetskih lastnosti posameznika in od lastnosti bakterij. Okužba nastane, ko je porušeno ravnovesje med obrambnimi sposobnostmi telesa in virulenco povzročitelja.

Najpogosteje zbolevajo mlajše, spolno aktivne ženske, incidenca pri njih je 0,5 epizode letno. Pri več kot tretjini žensk se akutni nezapleteni cistitis kljub normalnim sečilom ponavlja. Moški zbolijo redkeje, ker je sečnica anatomsko oddaljena od anusa, daljša kot pri ženskah in ker so izločki prostate baktericidni.⁽¹²⁾

Če zdravljenje ocenujemo glede na uspešnost, govorimo o ozdravitvi (ko bolnik že po prvem zdravljenju s kemoterapeutiki nima več simptomov in znakov bolezni), neuspešnem zdravljenju (ko simptomi, kljub zdravljenju ne pojedajo) in rekurenci (če se po končanem zdravljenju in izginotju simptomov po določenem času bakteriurija in težave povezane z njo spet ponovijo). Zdravljenje je največkrat neuspešno zaradi rezistence povzročitelja na uporabljeni kemoterapeutik. Glede na čas, ki preteče med končanim zdravljenjem in rekurenco ločimo relaps (nastane v prvih dveh tednih zaradi nepopolno ozdravljenje okužbe, v urinokulturi izoliramo isto bakterijo kot pri predhodni infekciji) in reinfekcijo (pomeni okužbo z istim ali drugim povzročiteljem po dveh tednih ali več in lahko nastane zaradi slabše obrambne sposobnosti telesa ali večje virulence povzročitelja).⁽¹³⁾

Najpogostejši povzročitelji okužb so *Escherichia coli* v približno 80%, koagulaza negativni stafilocoki, *Proteus mirabili* in *Enterococcus faecalis*. Zapletene okužbe povzročajo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.*, *Proteus vulgaris...*⁽¹²⁾

Poleg zunajcelične kolonizacije površine sečnega mehurja pa je uropatogenost *E. coli* težavna tudi zaradi kompleksne intracelularne kaskade, ki služi kot obramba pred gostiteljevim imunskim odgovorom in vodi k vztrajni naselitvi znotraj epitelija.⁽¹⁵⁾

1.2.2 Zdravljenje okužbe sečil

Bakterijske okužbe sečil zdravimo z uporabo ustreznega kemoterapeutika. Pri izbiri smo pozorni na njegovo učinkovitost, neželene učinke, način in pogostost aplikacije ter učinek na normalno črevesno in nožnično bakterijsko floro. Tako predstavljajo trimetoprim (kombiniran s sulfametoksazolom) in fluorokinoloni prvo linijo zdravljenja pri bakterijskih okužbah sečil. Za zdravljenje s fluorokinoloni (ciprofloksacin, perfloksacin, norfloksacin) se odločimo predvsem pri alergijah na trimetoprim, pri akutnem pielonefritisu ali recidivnih okužbah, pri poznani predhodni odpornosti povzročitelja na trimetoprim, pri sumu na zapleteno okužbo ali sumu, da okužbo povzročata *Pseudomonas spp.* in *Serratia spp.*. Nitrofurantoin je eden najstarejših kemoterapeutikov za zdravljenje infekcij sečil. V 90% se izloča s sečem, serumska koncentracija pri terapevtskih odmerkah pa je nizka, zato se uporablja le za zdravljenje okužb v spodnjih sečilih. Pri okužbah zgornjih sečil lahko uporabljamo cefalosporine 2. in 3. generacije. Zaradi velike bakterijske odpornosti se uporaba amoksicilina in ampicilina ne priporoča več. Pri zapletenih okužbah zgornjih sečil uporabljamo še aminoglikozide in kombinacijo imipenema s cisplatinom.⁽¹³⁾

Kot eden od naravnih načinov zdravljenja se uporablja tudi D-manoza, ki prepreči vezavo *E. coli* na urotelij, bakterije se izločijo s sečem in tako se zmanjša možnost da bi se namnožile.⁽¹⁴⁾

Preglednica I: **Odmerki trimetoprim-sulfametoksazola in fluorokinolonov** pri zdravljenju simptomatskih okužb sečil in normalnem ledvičnem delovanju.⁽¹³⁾

Kemoterapeutik	Peroralni dnevni odmerek
trimetoprim-sulfametoksazol	160/800 mg/ 12 h
ciprofloksacin	500 mg/12 h
pefloksacin	400 mg/12h
ofloksacin	200 mg/12 h
levofloksacin	250 mg/24h
norfloksacin	400 mg/ 12 h

Okužbe sečil so večkrat povezane z uporabo katetra. Zato mora biti tehnika vstavitve katetra sterilna in zbiralni sistem zaprt. Bakteriurija nastane zaradi širjenja bakterij ob urinskom katetru ali skozi njegovo svetlino. Vsak dan kateterizacije poveča možnost bakteriurije za 10%, kljub temu pa se asimptomatska ne zdravi, saj bi tako le povečali odpornost bakterij na kemoterapeutika, incidence pa ne bi zmanjšali. Bolnik mora biti dobro hidriran, tako se prepreči mašenje katetra in se zmanjša možnost za simptomatsko okužbo sečil.⁽¹³⁾

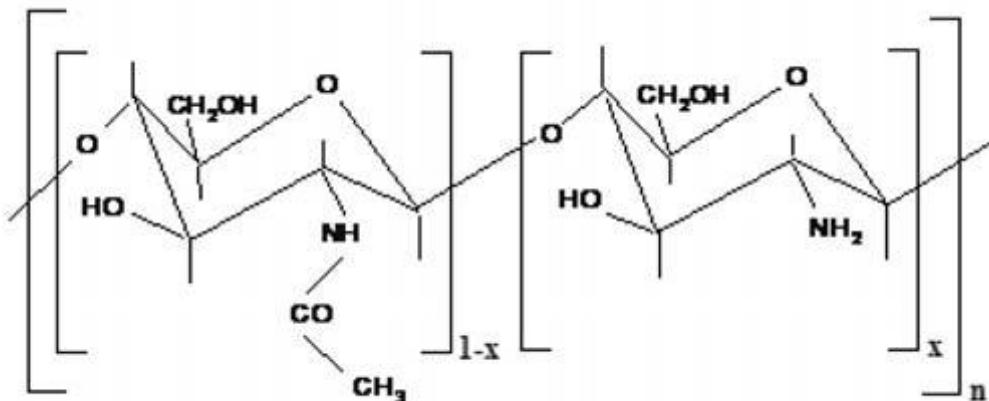
1.2.3 Rak sečnega mehurja

Na nastanek raka sečnega mehurja vplivajo tako genski dejavniki kot dejavniki okolja (kajenje, stik z aromatičnimi amini, okužba s parazitom *Shisostoma haematobium*, uživanje fenacetinskih analgetikov...). Zelenjava, ki vsebuje karotene, vitamin A, izoflavone in genestin delujejo zaščitno. Prav tako visoki odmerki vitaminov A, B6, C in E ter cinka zmanjšujejo pojav raka na mehurju. Pogosteje za to vrsto raka obolevajo moški kot ženske. Najpogosteje gre za epitelijske tumorje, kar v 90% so tumorji prehodnega epitelija, ostali so ploščatocelični karcinom, drobnocelični karcinom in tumorji neepiteljskega izvora (sarkom, feokromocitom in maligni melanom).

Pred pričetkom zdravljenja je potrebno ugotoviti, ali je rak površinski, in situ ali invazivni, saj je zdravljenje pri teh treh skupinah raka mehurja popolnoma različno. Površinski rak redko napreduje v invazivnega, cilj zdravljenja je usmerjen predvsem v preprečevanje ponovitve in napredovanje. Pri invazivnih rakih je pri večini bolnikov potrebna cistektomija. Če rak že metastazira, je mediana preživetja 13 mesecev. Najboljši uspehi so bili doseženi s kombinacijo kemoterapevtikov metotreksata, vinblastina, doksorubicina in cisplatina. Novejši kemoterapevtiki, ki se uporabljam pri metastatskem raku mehurja so gemcitabin, paklitaksel in dokatakSEL.⁽¹⁶⁾

1.3 Hitosan

Hitosan je biopolimer, pridobljen iz naravnih virov, kot so eksoskeleti insektov, rakov lupinarjev in gliv. Gre za linearen kopolimer sestavljen iz 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranove in 2-amino-2-deoksi- β -D-glikopiranove, ki sta povezani z $\beta(1\text{-}4)$ vezjo. Pridobivamo ga z deacetiliranjem hitina v alkalnem, slednji je drugi najbolj pogosto zastopen polimer v naravi (tako za polimeri glukoze). Hitosan je polianion ($pK_a=6,3$) z reaktivnimi funkcionalnimi skupinami, aminske skupine so pri $pH<6$ protonirane in pri $pH>6,5$ deprotonirane, posledično se zmanjša topnost polimera. pK_a je odvisna od stopnje N-deacetiliranja, topnost polimera pa je odvisna tudi od uporabljene metode deacetiliranja in njegove molekulske mase. Po čiščenju je hitosan v rigidni kristalinični obliki zaradi intra- in intermolekularnih vodikovih vezi.⁽¹⁷⁾



Slika 6: **Struktura hitosana.** n je št. sladkornih enot polimera, x je stopnja acetiliranja.⁽¹⁸⁾

Ima sposobnost tvorbe gela in se uporablja kot pomožna snov v farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem. Je dobro adheziven in ima visoko biološko razgradljivost. Pospešuje absorpcijo učinkov skozi intestinalno, bukalno, vaginalno in nosno sluznico ter skozi Caco-2 celice in steno sečnega mehurja. Hkrati je biokompatibilen in ne deluje škodljivo na tkiva, zaradi česar se uporablja kot sestavni del nadomestkov sklepov in kosti ter zobnih implantatov. Zaradi inhibicije fibroplazije in spodbujanja rasti tkiva pospešuje celjenje ran. Deluje tudi protibakterijsko in protiglivično, kar izkoriščajo v kmetijstvu za zaščito rastlin. Kot kelator težkih kovin se uporablja pri čiščenju vode, kot prehransko dopolnilo pa naj bi pomagal pri hujšanju, saj naj bi vezal maščobe in zniževal holesterol.⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

Ker ima hitosan visoko molekulsko maso in mu to preprečuje vstop v celico, so interakcije tako omejene le na celično membrano. Večinoma gre za vezavo pozitivnih funkcionalnih skupin z negativno nabito membrano. V študiji, ki je bila izvedena na malignih in ne-malignih človeških celicah epitelija sečnega mehurja so ugotovili, da ima membrana tumorske celice večji negativni naboj od ne-malignih, posledično so večje interakcije s hitosanom. Tako farmacevtske oblike s hitosanom predstavljam obetavno obliko tarčnega zdravljenja raka sečnega mehurja.⁽²¹⁾

1.3.1 Mukoadhezivnost hitosana

Bioadhezija je definirana kot zmožnost materiala, da se veže na biološko površino za neko daljše časovno obdobje. Biološka površina je lahko epitelij tkiva ali mukozna plast na površini tkiva. Če gre za vezavo na plast mukusa, govorimo o mukoadheziji.⁽²²⁾

Mukoadhezivne lastnosti hitosana, ki so jih proučevali v študijah, so posledica tako njegove kationske narave, ki dovoljuje elektrostatske povezave z negativno nabitimi mucini, kot vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij. Moč mukoadhezivnosti je odvisna od stopnje acetiliranja, kar izkoriščajo v razvoju raznih mukoadhezivnih dostavnih sistemov z različno acetiliranim hitosanom. Ko pride do vezave med hitosanom in mukozno plastjo, to omogoča podaljšano zadrževanje farmacevtske oblike na mestu delovanja in tako omogoči izboljšanje biološke uporabnosti.⁽²³⁾

1.3.2 Povečanje permeabilnosti sluznic

Rezultati raziskav kažejo, da so soli hitosana v kislem pH močni pospeševalci absorpcije. Pozitivno nabite amino skupine hitosana tvorijo interakcije z negativno nabitimi sulfatnimi skupinami in ostanki sialične kisline v mukusu ali na površini celic, posledica česar je bio-oziroma mukoadhezija. Sam mehanizem povečanja permeabilnosti tkiv je specifičen za posamezno sluznico (npr. pri sečnem mehurju pride do luščenja zgornjih plasti urotelija).⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽²⁷⁾

V študijah vpliva hitosana na permeabilnost tkiv so proučevali intestinalni epitelij oziroma Caco-2 celice (monosloj kultiviranih intestinalnih epitelnih celic). Kot modelno učinkovino so uporabili metabolično inerten in zelo hidrofilen ¹⁴C-manitol. Interakcija hitosana z njihovo celično membrano povzroči reorganizacijo proteinov tesnih stikov, kar vodi v povečan paracelularni transport. Povečanje permeabilnosti modelne učinkovine je odvisno od pH raztopine hitosana. Prehajanje se je povečalo z zniževanjem pH. Kljub temu, da se mukozni sloj urotelija od intestinalnega epitelija razlikuje po strukturi in debelini pa imata precej skupnih lastnosti. Pri obeh so prisotne sladkorne verige, vsaj delno vezane na proteine, in površini obeh sta negativno nabiti. Zaradi tega lahko pričakujemo, da bodo imeli polimeri, ki kažejo dobro mukoadhezijo na intestinalni sluznici, vsaj nekaj mukoadhezivnih lastnosti tudi pri stiku z sluznico sečnega mehurja.⁽⁹⁾⁽²⁶⁾⁽²⁵⁾

1.3.2.1 Sečni mehur

Za proučevanje vpliva hitosana na permeabilnost stene sečnega mehurja za modelne učinkovine (pipemidna kislina) so uporabili izolirano steno prašičjega mehurja. Rezultati so pokazali višje koncentracije učinkovine, ki je prešla v steno sečnega mehurja ob uporabi hitosana.⁽²⁸⁾

Pri 0,0005 % ut/vol disperzija hitosana po eno-urnem delovanju značilno poveča prehod modelnih učinkovin (kinolonov) v steno prašičjega sečnega mehurja, pri 0,001 % ut/vol koncentraciji pa je dosežen maksimalen učinek hitosana kot pospeševalca absorpcije, disperzije hitosana višjih koncentracij 0,005 in 0.5% ut/vol učinkovito delujejo kot pospeševalci absorpcije hitosana že pri krajšem stiku (po 15 min). Medtem ko je pri nižjih koncentracijah čas potreben za maksimalen učinek hitosana, daljši. Ugotovili so, da daljši čas stika poveča količino učinkovine, ki preide v tkivo. Tako se mehanizmi preko katerih hitosan poveča permeabilnost aktivirajo že precej zgodaj, vendar pa potrebujejo nekaj časa, da se dokončno vzpostavijo. Dodatek kalcija zmanjša učinek hitosana na permeabilnost sluznice za modelno učinkovino, vpliva pa tudi na manjši obseg poškodb tkiva.⁽²⁷⁾⁽²⁹⁾

Prav tako je učinek hitosana na togost celic in njihovo glikolitično aktivnost funkcija njegove stopnje deacetiliranja. Ta prispeva k naboju hitosana proporcionalno s številom amino skupin.⁽²¹⁾

Mehanizem pospeševanja absorpcije s hitosanom je v sečnem mehurju drugačen kot pri drugih tkivih. Z uporabo vrstične in transmisijске elektronske mikroskopije so ugotovili, da v koncentracijah, ki značilno povečajo prehod modelnih učinkovin v steno prašičjega mehurja, hitosan povzroči luščenje zgornjih dežnikastih celic urotelija. S tem se odstrani permeabilnostna bariera (plast GAG, membranski plaki in tesni stiki), ki preprečuje prehod snovi iz urina v steno mehurja. Na vmesnih in bazalnih celicah so bili jasni znaki njihove nekroze s poškodovano membrano in nabreklimi organeli, ni pa bilo znakov apoptoze. Luščenje zgornjih celic urotelija pa je tudi naravni odgovor organizma na infekcije z bakterijami, saj se tako odstranijo nanje vezane bakterije, s tem se izboljša obrambni mehanizem.⁽²⁹⁾

1.3.2.2 Ostala tkiva

Vaginalna sluznica

Teste so opravljali na prašičji vaginalni sluznici z aplikacijo 3% gela hitosana. Kot modelni učinkovini so uporabili ciprofloksacin in aciklovir, kot testno fluorescenčno učinkovino pa fluoroscein izotiocianat. Rezultati so pokazali značilno povečano permeabilnost za vse tri učinkovine.⁽³⁰⁾

Nosna sluznica

Nazalni dostavni sistemi so uporabni predvsem za proteine in druge polarne učinkovine, na primer inzulin, kalcitonin in metabolite morfina. Študije so pokazale, da hitosan poveča absorpcijo teh učinkovin preko bioadhezije in z razrahljanjem tesnih stikov membrane.⁽³¹⁾

Bukalna sluznica

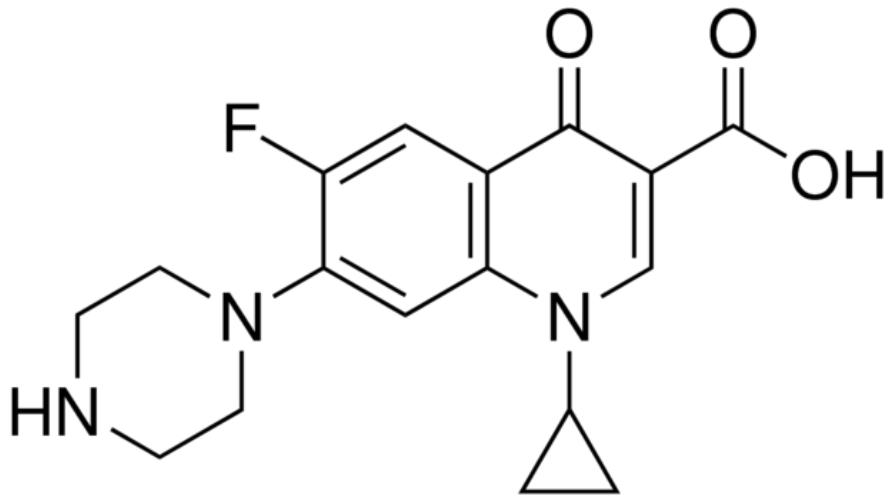
Rezultati študij kažejo, da hitosan signifikantno (6x) poveča permeabilnost hidrokortizona in transformirajočega rastnega faktorja β . Povečana absorpcija je posledica daljšega zadrževanja učinkovine na mestu delovanja in direktnega vpliva hitosana na organizirane intracelularne lipidne lamele, ki gradijo bariero v epidermisu in oralnem epiteliju.⁽³²⁾

Sluznica roženice

Vpliv hitosana na absorpcijo so dokazovali tudi pri transkornealni aplikaciji deksametazona. Rezultati so pokazali značilno povečano maksimalno plazemske koncentracije in biološko uporabnost učinkovine, kot posledica povečanega transcelularnega prenosa.⁽³³⁾

1.4 Ciprofloksacin

Ciprofloksacin (1-cikopropil-6-fluoro-4-okso-7-(piperazin-1-il)-kinolin-3-karboksilna kislina) spada med fluorokinolone, širokospektralne kemoterapevtike. Delujejo preko zaviranja bakterijskih encimov topoizomeraze II (DNA giraze) in topoizomeraze IV. Gre za encime esencialne za podvajanje, prepisovanje, popravljanje in rekombinacijo bakterijske DNK ter v humanih celicah niso prisotni. Tako delujejo specifično in baktericidno.⁽³⁴⁾ *In vitro* je učinkovit proti večini aerobnih po Gramu negativnih bakterij, vključno s *Pseudomonas aeruginosa*. Učinkovit je tudi proti aerobnim po Gramu pozitivnim bakterijam, npr. stafilokokom in streptokokom.⁽³⁵⁾



Slika 7: Struktura ciprofloksacina.⁽³⁵⁾

1.4.1 Terapevtske indikacije

Ciprofloksacin se uporablja pri zdravljenju okužb in vnetij:

- spodnjih dihal, ki jih povzročajo po Gramu negativne bakterije,
- srednjega ušesa (kronično, gnojno vnetje),
- zunanjega ušesa (maligno vnetje),
- sečil,
- trebušne votline,
- kože in mehkih tkiv, ki jih povzročajo po Gramu negativne bakterije,
- gonokoknega uretritisa in cervicitisa,
- pri bolnikih z nevtropenijo (tudi preprečevanje okužb).

Pri otrocih in mladostnikih se lahko uporablja za zdravljenje hudih okužb, kadar se presodi, da je to potrebno.⁽³⁷⁾

1.4.2 Neželeni učinki in kontraindikacije

Pogosti neželeni učinki so težave v prebavnem traktu: slabost in driska, ter pri otrocih bolečine v sklepih. Občasni neželeni učinki so glivične okužbe (vaginalna in oralna kandidoza), izguba apetita (anoreksija), glavobol, omotica, motnje spanja ali motnje okusa, bruhanje, bolečine v trebuhu, prebavne motnje (npr. slaba prebava, zgaga ali vetrovi), zvišane vrednosti

transaminaze, bilirubina in/ali alkalne fosfataze v krvi, izpuščaj, srbenje ali koprivnica, bolečine v sklepih pri odraslih, slabo delovanje ledvic, bolečine v mišicah in kosteh, slabo počutje (astenija) ali zvišana telesna temperatura.

Odmerek ciprofloksacina prilagodimo pri bolnikih z ledvično odpovedjo. Uporabi se izogibamo pri osebah z epilepsijo ali drugimi nevrološkimi težavami, z miastenio gravis in aritmijo ter pri osebah, ki imajo preobčutljivostno reakcijo na ciprofloksacin ali ostale fluorokinolone.⁽³⁷⁾

1.4.3 Rezistenca bakterij

Odpornost proti ciprofloksacincu se razvije postopno in je posledica mutacij na DNK girazi ali topoizomerazi IV. Klinično pomembno odpornost povzročajo večkratne mutacije. Poročali so tudi o odpornosti, pridobljeni s plazmidi z qnr geni.⁽³⁷⁾

Pri ženskah z nezapletenim cistitisom so v raziskavi ECO-SENS leta 2000 ugotovili, da je bila v urokultiri najpogosteje izolirana *E. Coli*, ki je bila na ciprofloksacin odporna v 3% (v primerjavi s trimetoprim-sulfametoksazolom, kjer je bila odpornost bakterije kar 15%). Zaradi široke uporabe fluorokinolonov pričakujemo, da se bo bakterijska odpornost nanje še povečala, zato mora biti njihova uporaba premišljena in ustrezna.⁽¹³⁾

1.5 Mikrosfere

Mikrosfere so oblika mikrokapsul, delcev velikih od 1 μ m do nekaj mm. Sestavljeni so iz substance, ki jo mikrokapsuliramo in nosilne substance, pri čemer sta obe razporejeni po celotnem volumnu mikrosfere. Pripravljamo jih predvsem z metodo odparevanja topila. Osnovni izhodni sistem je emulzija, kjer je v notranji fazi raztopljen polimer (npr. Eudragit®RS) in dispergirana učinkovina ter ostale pomožne snovi. V zunanji fazi ne sme biti topna nobena od uporabljenih substanc, saj lahko pride zaradi tega do izgub. Topilo notranje faze odstranimo, največkrat z odparevanjem. Tako dobimo mikrosfere suspendirane v zunanji fazi, temu sledi izolacija, spiranje in sušenje.⁽³⁸⁾

1.5.1 Vpliv hitosana na lastnosti mikrosfer

V raziskavi Eudragit® RS mikrosfer s hitosanom je bilo ugotovljeno, da pri enaki hitrosti mešanja nastajajo manjše mikrosfere, v primerjavi z mikrosferami brez hitosana. Sproščanje

modelne učinkovine (pipemidna kislina) je bilo hitrejše pri mikrosferah s hitosanom, prav tako pri njih ni bilo opaziti korelacije s Higuchijevim konstantno stopnje sproščanja. Po treh urah sproščanja je bila površina mikrosfer s hitosanom bolj porozna od površine mikrosfer brez njega. Če pa primerjamo sproščanje učinkovine iz mikrosfer s hitosanom in mikrosfer z drugimi bioadhezivnimi polimeri, na primer karboksimetil celulozo ali polikarbofilom, ugotovimo, da je sproščanje iz mikrosfer adheziranih na poškodovano membrano najpočasnejše prav pri mikrosferah s hitosanom.⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾

1.5.2 Vplivi procesnih pogojev na lastnosti mikrosfer

Študije z Eudragit® RS mikrosferami so pokazale, da pri višji temperaturi med procesom nastajajo mikrosfere z večjim premerom in s širšo distribucijo velikosti delcev. Pri višji temperaturi topilo zunanje faze hitreje izpari in se tako masa hitreje strdi. Vendar pri uporabi višje temperature med procesom nastajajo bolj pravilni in sferični delci z gladko površino.⁽³⁹⁾ Pri mikrosferah s podobno sestavo so ugotovili, da se s povečevanjem hitrosti mešanja zmanjšuje premer nastalih delcev. Povečana hitrost tudi preprečuje aglomeracijo še »ne zrelih« mikrosfer. Statistično pomembne razlike so pri hitrosti mešanja večji od 600 rpm. Z večanjem hitrosti mešanja se povečuje tudi vsebnost modelne učinkovine (pipemidna kislina), vsebnost je večja tudi v frakcijah z večjim premerom. To bi lahko razložili z dejstvom, da med pripravljanjem mikrosfer pipemidna kislina difundira iz notranje v zunano fazo. Ker se v zunano fazo izgublja tudi magnezijev stearat, je lahko dejanska vsebnost učinkovine večja od teoretične. Ugotovili so tudi, da je večja hitrost mešanja povezana s hitrejšim sproščanjem učinkovine iz mikrosfer.⁽⁴⁰⁾

2 Namen dela

Kronične infekcije in rakava obolenja sečil so pereč problem celotne populacije, saj vplivajo na kakovost življenja. Sistemsko zdravljenje z antibiotiki in drugimi kemoterapeutiki je v določenih primerih lahko neuspešno, tudi zaradi vedno večjega pojavljanja rezistence bakterij, neželenih učinkov ter nizke koncentracije učinkovine v sečnem mehurju (posledica predsistemskega metabolizma, porazdeljevanja v druga tkiva ali izločanja preko drugih poti). Tako se iščejo nove možnosti za lokalizirano zdravljenje. Hitosan že sam deluje blago protibakterijsko in protitumorno, poveča permeabilnost membran za učinkovine in s svojo bioadhezivnostjo podaljša zadrževanje farmacevtske oblike na mestu delovanja. Povzroči luščenje površinskih celic urotelija, s čemer bi se lahko odstranile inficirane ali rakave celice. Tako uporaba hitosana v farmacevtskih oblikah za intravezikalno aplikacijo predstavlja obetavno možnost lokalnega zdravljenja hujših uroinfekcij in raka sečil.

Osnovni namen naše raziskovalne naloge bo priprava mukoadhezivnih mikrosfer s hitosanom za intravezikalno terapijo hujših infekcij sečnega mehurja, ki jih s sistemsko aplikacijo kemoterapeutikov ne uspemo pozdraviti. Naš cilj je optimizirati sam postopek priprave mikrosfer in njihove lastnosti (velikost ter sposobnosti suspendiranja in nabrekanja mikrosfer, vsebnost in sproščanje učinkovine iz mikrosfer). Na podlagi rezultatov bomo izbrane mikrosfere z optimalnimi lastnostmi uporabili pri spremeljanju transepitelijске električne upornosti (TEER) sečnega mehurja podgane, ob izpostavitvi hitosanu. Tkivo bomo za 20 oz. 60 minut izpostavili disperziji hitosana ali suspenziji pripravljenih mikrosfer s hitosanom. Zanima nas, če je regeneracija sečnega mehurja odvisna od časa stika tkiva s hitosanom ter od farmacevtske oblike s hitosanom. Zadnji v seriji poskusov bo *in vivo* poskus na rjavih miših, ki ga bomo opravili na Inštitutu za biologijo celice (Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani). Po intravezikalni aplikaciji disperzije hitosana in suspenzije mikrosfer s hitosanom bomo z vrstično elektronsko mikroskopijo opazovali razlike v morfologiji epitelija. Iz rezultatov raziskovalne naloge bomo ovrednotili prednost uporabe mikrosfer za intravezikalno aplikacijo pri zdravljenju hujših infekcij ali raka sečnega mehurja v primerjavi s samo disperzijo hitosana.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

Polimeri:

- Hitosanijev hidroklorid, Kraeber & Co. CMBH, Ellerbek, Nemčija (stopnja deacetiliranja 65-95%)
- Eudragit® RL PO, Evonik industries, Essen, Nemčija
- Eudragit® RS PO, Evonik industries, Essen, Nemčija
- HPMC, metolose 65SH-400, Harke group, Nemčija

Topila in raztopine:

- Aceton (reag. po Ph. Eur.), Panreac, Barcelona, Španija
- Tekoči parafin (po Ph.Eur. V), S Pharmachem s.p., Ljubljana, Slovenija
- Heksan (pro analysi), Merck, Darmstadt, Nemčija
- Klorovodikova kislina Trisol® za pripravo 1M HCl, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidroksid Trisol® za pripravo 1M NaOH, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Medij za gojenje celic, Sigma® Dulbecco's modified eagle's medium, Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA
- Puferske raztopina pH=7, Kefolab, Ljubljana, Slovenija

Ostalo

- Natrijev klorid, Emsure®, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev dihidrogenfosfat, Emsure®, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidrogensfosfat, Emsure®, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Ciprofloksacin (Fluka analytical) Sigma Aldrich, Šanghaj, Kitajska
- Kemikalije za pripravo preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo: ketamin hidroklorid, ksilazin, 4% paraformaldehid, 2% glutaraldehid, 0,1M kakodilatni pufer, OsO₄

Tkiva in živali

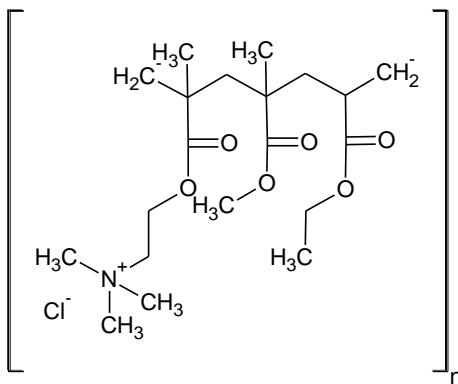
- Sečni mehurji samcev albino laboratorijske podgane vrste Sprague-Dawley (masa: 200-300g)
- Odrasle samice miši C57BL/6JOLaHsd, stare 8 tednov

Eksperimenti so bili izvedeni v skladu z Zakonom o zaščiti živali Republike Slovenije, uporaba tkiva je bila registrirana pri Veterinarski upravi Republike Slovenije.

3.1.1 Lastnosti uporabljenih polimerov

Eudragit® RS in RL

Poli(klorid etil akrilat-ko-metil metakrilat-ko-trimetilamonijevetil metakrilat) je kopolimer etil akrilata, metil metakrilata in nizke vsebnosti estra metakrilne kisline s kvarternimi amonijevimi skupinami. Pri RL so v razmerju 1:2:0.2, pri RS pa 1:2:0.1. Amonijeve skupine so v obliki soli, od količine le teh je odvisna permeabilnost polimera. Gre za trdno belo, praškasto snov, ki je netopna, ima nizko (RS) oz. dobro (RL) permeabilnost in od pH neodvisno nabreka.⁽⁴⁴⁾



Slika 8: Struktura Eudragit® RS/RL. (slika pritejena po⁽⁴⁴⁾)

HPMC

Hidroksipropil metil celuloza je semisintetičen, inerten in visokoelastičen, hidrofilen polimer, ki se uporablja pri pripravi farmacevtskih oblik s pritejenim sproščanjem. Široko se uporablja pri peroralnih, topikalnih in farmacevtskih oblikah za oko, zaradi svoje netoksičnosti in zmožnosti, da sprejme velike doze učinkovine, ne glede na njen pH.⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾

Uporabljena HPMC je visoko viskozna in jo v Ph. Eur. in USP najdemo kot HPMC 2906.⁽⁴⁷⁾

3.2 Aparature

Sistem za pripravo mikrosfer:

- Mehansko mešalo z veslom, Eurostar digital, IKA Labortechnik, Staufen, Nemčija
- Vodna kopel z grelnim sistemom in kontaktnim termometrom

Sistem za testiranje sproščanja:

- Aparatura za testiranje sproščanja, VanKel 7000, VanKel Technology Group, NC, ZDA
- Filtri za vzorčevalnik aparature za sproščanje 35 MI (Full Flow Filters), VanKel Technology Group, NC, ZDA

Sistem za določanje TEER mehurja:

- Pretočne celice EM-CSYS-6 (Easy Mount – Diffusion Chambers), Physiologic Instruments Inc., San Diego, ZDA
- Termometer, Testo 926, testo Inc., New Jersey, ZDA
- Grelec M3Lauda, Triad Scientific Inc., New Jersey, ZDA

Mikroskop s kamero:

- Optični mikroskop Olympus BX50, Olympus, Tokio, Japonska
- Kamera Sony Power Had, Sony, Tokio, Japonska

Ostalo:

- Vrstični elektronski mikroskop JSM-840A, Jeol, Tokio, Japonska
- Stresalnik za sita, F. Kurt Retsch GmbH & Co.KG, Haan, Nemčija
- Analitska tehnica AG245, Mettler toledo, Schwarzenbach, Švica
- Analitska tehnica Excellence Plus, Mettler toledo, Schwarzenbach, Švica
- Magnetno mešalo Ratamix 550 MMH, Tehnica, Slovenija
- pH meter MP 220, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
- Ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- Centrifuga, Centrifuge 5415 R, Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Mastersizer, Malvern, Worcestershire, Velika Britanija
- Vakumski sušilnik VS-50S, Kambič Anton, Semič, Slovenija

Pribor:

- Filter papir 589¹ black ribbon (Ø70mm), Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Nemčija
- Celulozno acetatni membranski filtri z 0,45µm porami, Sartorius AG, Nemčija
- Polavtomatske pipete (200-1000µl in 1000-5000µl), Eppendorf research, Hamburg, Nemčija
- Plastične mikrocentrifugirke (2mL), Eppendorf research, Hamburg, Nemčija

- Vakumska črpalka, nuča
- Kateter (notranji premer 0,28mm), Intramedic, Becon, Dickinson, Sparks, MD, ZDA
- Merilne bučke, čaše, erlenmajerice, tehtiči, viale, spatule, nastavki za pipete, plastične brizge, magneti, Parafilm® M, termometer, štoparica,

3.3 Metode dela

3.3.1 Priprava pufrov, raztopin in disperzij

Izotonični fosfatni pufer pH=6 (PBS 6)

-2,38g Na₂HPO₄ * 12H₂O

-0,19g KH₂PO₄

-8g NaCl

-do 1,0l H₂O

Raztopino smo umerili do pH=6,0 z 1M HCl.

0,2% raztopina hidroksipropil metilceluloze (HPMC) v PBS 6

-0,100 g metolose 65SH-400

-do 50mL PBS 6

Na magnetnem mešalu smo mešali, da se raztopi.

0,005% (ut/vol) disperzija hitosana (HIT) v PBS 6

-12,5mg hitosan

-do 10mL PBS 6

Mešali smo čez noč z magnetnim mešalom in redčili 1mL raztopine do 25mL s PBS 6 in pH uravnali do 6 z 1M NaOH in 1M HCl.

0,01M HCl

V 100mL bučko smo odmerili 1mL 1M HCl in do oznake dopolnili z destilirano vodo.

0,005% (ut/vol) disperzija hitosana v 0,2% HPMC

1mL disperzije hitosana v PBS 6 smo do 25mL dopolnili z 0,2% raztopino HPMC.

Suspenzija mikrosfer (MS)

Natehtali smo 0,40mg mikrosfer, ki vsebujejo ekvivalentno količino hitosana kot 2,5mL 0,005% (ut/vol) disperzija hitosana, jih prenesli v epice in jih suspendirali v 1,5mL PBS 6. Suspenzijo smo kvalitativno prenesli tako, da smo v epice še dvakrat dodali 0,5mL PBS 6 in vse skupaj združili. Končni volumen suspenzije je bil 2,5mL.

Supernatant mikrosfer v PBS 6 (MS s5, MS s20, MS s60)

Natehtali smo 0,40mg mikrosfer, ki z ekvivalentno količino hitosana kot 2,5mL 0,005% (ut/vol) disperzije hitosana, jih prenesli v epice in jih suspendirali v 1,5mL PBS 6. Po različnih časovnih intervalih (takoj, 15min in 55min) smo suspenzijo 5 min centrifugirali pri T=25°C in 4000 obratih. Supernatant smo prenesli v prazne epice, oborino mikrosfer pa zavrgli.

3.3.2 Priprava in analiza mikrosfer

3.3.2.1 Priprava mikrosfer

Mikrosfere smo pripravili po metodi z odparevanjem topila. Optimizirali smo sestavo in pogoje postopka povzetega po doktorski nalogi Matejke Burjak,⁽⁴³⁾ kjer je osnovna receptura predstavljala 0,900g Eudragita RS, 0,600g mukoadhezivnih polimerov (hitosan), 0,500g zdravilne učinkovine, 0,100g aluminijevega stearata, različne količine Spana 80 in 0,008g Sudana črno B v 6mL acetona, ki služi kot notranja faza, in v zunanji fazi, tekočem parafinu.⁽⁴³⁾ Izpustili smo Span 80 in Sudan črno B, povečali količino hitosana ter spremnili količino Eudragita®, Mg-stearata in acetona. V začetnih testnih poskusih, smo preverjali izkoristek poskusa in sejalno analizo in ponovljivost obeh, ter določili sestavo za nadaljnjo izdelavo. Sestava serij v posameznih testnih poskusih je prikazana v preglednici II.

Preglednica II: Sestava mikrosfer v testnih poskusih.

Sestava	SerijsA	SerijsB	SerijsC	SerijsD	SerijsE	SerijsF	SerijsG
Eudragit® RS [g]	1,2	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	0,7
Eudragit® RL [g]	/	/	/	/	/	/	0,7
Hitosan [g]	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Pipemidna kislina (P)/ Ciprofloksacin (C) [g]	0,5 (P)	0,5 (P)	0,5 (C)				
Mg-stearat [g]	0,2	0,1	0,1	0,1	/	/	/
Aceton [mL]	7	7	7	5	6	6	6

V nadaljevanju smo izdelali štiri serije mikrosfer (Serija 1-4) z različno sestavo, vsako v štirih ponovitvah (A-D). Kot ogrodní polimer smo uporabili Eudragit RL®, Eudragit RS® in kombinacijo obeh. V mikrosfere smo vgradili mukoadheziven polimer hitosan. Seriji 1 smo dodali magnezijev stearat, ki služi kot stabilizator. V mikrosfere smo vgradili tudi zdravilno učinkovino, ciprofloksacin. Sestava posameznih serij je prikazana v preglednici III.

Preglednica III: **Sestava različnih serij mikrosfer.**

Sestava	Serija1	Serija2	Serija3	Serija4
Eudragit® RS [g]	/	/	1,4	0,7
Eudragit® RL [g]	1,4	1,4	/	0,7
Hitosan [g]	0,9	0,9	0,9	0,9
Ciprofloksacin [g]	0,5	0,5	0,5	0,5
Mg-stearat [g]	0,1	/	/	/

V 6mL acetona smo na magnetnem mešalu raztopili Eudragit®. Medtem smo pripravili vodno kopel ($T=5^{\circ}\text{C}$), v vpeto časo smo z merilnim valjem odmerili 80mL parafina, mešali z elektronskim mešalom z veslom na 100 obratov/min, da se je tudi parafin ohladil na 5°C . Ustavili smo mešalo in obrate nastavili na 1000 obratov/min. Ko se Eudragit® raztopil smo dodali hitosan, premešali, da se je zmes homogenizirala, dodali smo učinkovino, premešali in na koncu pri Seriji 1 dodali še Mg- stearat. Vse skupaj smo mešali še 2 minuti, nato pa suspenzijo vlili v ohljen parafin, vključili elektronsko mešalo in začeli segrevati vodno kopel do 40°C . Ko se je kopel segrela, smo mešali pri 1000 obratih/min še 40 min, da je ves aceton izhlapel. Po 40 minutah smo dodali 40mL heksana, obrate zmanjšali na 250 obratov/min in mešali 2 min. Z vakumsko črpalko smo nastale mikrosfere izolirali, jih sprali s heksanom in jih čez noč sušili v vakumskem sušilniku.

3.3.2.2 Sejalni preizkus

Mikrosfere smo ločili s sejanjem na naslednje velikostne frakcije: večje od $250\mu\text{m}$, $200-250\mu\text{m}$, $160-200\mu\text{m}$, $125-160\mu\text{m}$, $100-125\mu\text{m}$, $80-100\mu\text{m}$ in manjše od $80\mu\text{m}$. Stresali smo pri 60 amplitudah 30 min. Za nadaljnjo analizo smo uporabili frakcije med 80 in $160\mu\text{m}$.

3.3.2.3 Gravimetrično določanje količine flotiranih in sedimentiranih mikrosfer

Za vrednotenje suspendiranja in sedimentacije mikrosfer smo uporabili 10mL, 8 cm visoke epruvete. Natančno smo natehtali približno 50mg ali 25 mg posamezne serije in vsaki natehti dodali 5mL PBS 6, pri sobni temperaturi.

Epruvete smo zaprli s parafilmom® in 10 s stresali. V stojalu smo jih pustili 2 min in potem še enkrat pretresli. Po 10 min od prvega stresanja smo odstranili parafilm in ločili flotirane in sedimentirane mikrosfere. Mikrosfere smo ločili od matičnice s presesavanjem skozi stehtane filtrirne papirje. Filtrirne papirje smo skupaj z mikrosferami čez noč sušili v vakuumskem sušilniku, jih naslednji dan stehtali in izračunali delež flotiranih in sedimentiranih mikrosfer. Seštevek obeh deležev pomeni masno bilanco, kjer so zajete tako izgube zaradi metode, kot raztpljanje sestavin v mikrosferah.

3.3.2.4 Gostota mikrosfer

Gostoto mikrosfer smo določali s piknometrom. Najprej smo piknometer očistili in popolnoma osušili in ga stehtali. Napolnili smo ga z destilirano vodo in poln piknometer stehtali. Iz mase vode, smo izračunali volumen piknometra. Piknometer smo ponovno osušili. Natančno smo natehtali približno 50mg mikrosfer in jih kvantitativno prenesli v piknometer, dopolnili smo ga s heksanom in ponovno stehtali. Od celotne mase smo odšteli maso mikrosfer, da smo dobili maso heksana, katerega gostoto poznamo. Izračunali smo volumen heksana in ga odšteli od volumna piknometra, da smo dobili volumen mikrosfer. Iz volumna in mase smo preračunali njihovo gostoto. Približno gostoto mikrosfer smo potrebovali pri nastavitevah analizatorja velikosti delcev Mastersizer.

3.3.2.5 Nabrekanje mikrosfer

3.3.2.5.1 Opazovanje pod mikroskopom

Mikrosfere smo suspendirali v PBS pri sobnih pogojih in suspenzijo opazovali pod mikroskopom v različnih časovnih intervalih (10 min, 1h, 2h, 3h in 24h). S kamero smo posneli fotografije pod faznim kontrastom in izmerili njihove premere. Opazovali smo različne

velikostne frakcije mikrosfer Serije 1. Izračunali smo povprečni premer in mediano posamezne frakcije.

3.3.2.5.2 Vrednotenje z analizatorjem velikosti delcev Mastersizer

Spreminjanje velikosti mikrosfer s časom smo proučevali z analizatorjem velikosti delcev Mastersizer. Eno spatulo posamezne serije mikrosfer, velikostne frakcije 80-100 μm , 100-125 μm , 125-160 μm in 160-200 μm , smo suspendirali v PBS 6 in suspenzijo prelili v vzorčno enoto. Pred tem smo posneli ozadje PBS 6. V različnih časovnih intervalih smo izmerili deleže delcev s posameznih premerom, mediano, prvi in deveti decil.

3.3.2.6 Vsebnost ciprofloksacina v mikrosferah

Vsebnosti ciprofloksacina smo določevali v 0,01M HCl. Natančno smo natehtali približno 20mg vsake serije in ponovitve mikrosfer in jih kvantitativno prenesli v 50mL merilno bučko in do oznake dopolnili z 0,01M HCl. Na magnetnem mešalu smo disperzijo mešali 24 ur, da se je sprostila vsa količina ciprofloksacina. Vzorec smo nato filtrirali skozi celulozni membranski filter 0,45 μm in ga 10x redčili. Redčenemu filtratu smo izmerili absorbanci pri valovni dolžini 277nm. Za umeritveno premico smo natančno natehtali približno 10mg standarda ciprofloksacina, ga raztopili v 0,01M HCl, vzorce smo ustrezzo redčili in pri 272nm izmerili njihove absorbance. Ob predpostavljanju linearne odvisnosti absorbance od koncentracije, smo izrisali umeritveno premico, s katero smo si pomagali pri določanju vsebnosti ciprofloksacina v mikrosferah (enačbi **1** in **2**).

n=dlež učinkovine v mikrosferah

$$n = \frac{C_U}{r \cdot x} \quad \underline{1}$$

C_U=koncentracija učinkovine v filtratu [mg/L]

x=natehta mikrosfer

r=koeficient redčenja

$$\text{vsebnost \%} = C_t / C_d * 100\% \quad \underline{2}$$

C_t=teoretična koncentracija

C_d=eksperimentalno določena koncentracija

3.3.2.7 Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer po metodi USP XXIII

Sproščanje ciprofloksacina smo določali po metodi iz USP XXIII na aparaturi za testiranje sproščanja z veslastimi mešali. Kot medij smo uporabili PBS 6. Natančno smo natehtali

približno 10mg mikrosfer in jih kvantitativno prenesli v 500mL PBS 6, ki smo ga v posodi za spremljanje sproščanja predhodno ogreli na 37°C. Med poskusom smo to temperaturo vzdrževali in disperzijo mešali s hitrostjo 100 obratov/min. Zaradi manjšega volumna medija, smo uporabili podaljške za vzorčevalnik. Prav tako smo na vzorčevalniku uporabili filter, ki zmanjša možnost njegove zamašitve, hkrati pa po vzorčenju dodatna filtracija ni bila potrebna. V določenih časovnih intervalih smo vzorčili po 5mL raztopine in pri valovni dolžini 274nm določali vsebnosti ciprofloksacina v posameznem vzorcu. Koncentracije smo določali s pomočjo umeritvene premice odvisnosti absorbance od koncentracije ciprofloksacina v PBS 6. Ker sta se zaradi vzorčenja zmanjševala volumen medija in masa učinkovine, je bilo potrebno izračunati korigirane vrednosti koncentracij po enačbi 3:

$$C' = \frac{C_n(V_z - (n-1)V_{vz}) + V_{vz}(C_1 + C_2 + \dots + C_{n-1})}{V_z} \quad 3$$

C'=korigirana koncentracija [mg/L]

C_n=izmerjena koncentracija [mg/L]

V_{vz}=volumen vzorca [5mL]

V_z=začetni volumen medija [500mL]

n=število vzorcev

3.3.3 Izvedba študij transepiteljske upornosti (TEER) podganjega mehurja

3.3.3.1 Priprava elektrod

Elektrolitski ključ predstavlja 100µL modificiran nastavek za pipeto, ki ima konico pritezano tako, da se prilega komori. Nastavke napolnimo s primerno ohlajenim agarjem v 3M raztopini KCl in jih hranimo v raztopini KCl. Na nastavek pritrdimo ustrezno elektrodo.

3.3.3.2 Priprava pretočnih celic

Pretočne celice smo očistili, sestavili sistem za merjenje transepiteljske električne upornosti, namestili in preverili delovanje tokovnih in potencialnih elektrod in termostatirali na 36 ± 1°C PBS 6 ter medij za gojenje celic.

3.3.3.3 Merjenje TEER

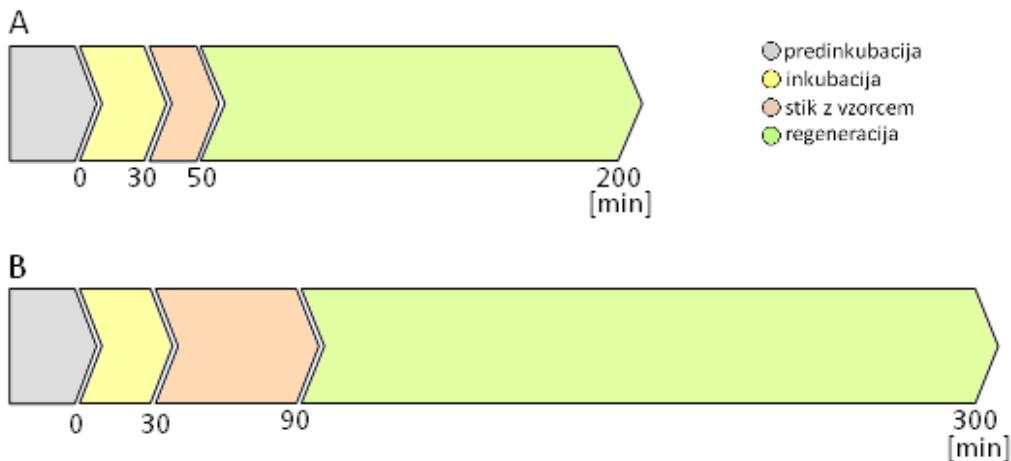
Transepiteljski potencial (PD) v mV in kratkostični tok (Isc) v µA smo spremljali pred začetkom poskusa in med samim poskusom. Iz zbranih podatkov smo na podlagi Ohmovega zakona izračunali transepiteljski električni upor (TEER v Ω×cm²), ki je merilo integritete

tkiva. Izračunani TEER predstavlja skupen upor tkiva, na katerega vplivata skupna površina epitelija ter upor posameznih celic in tesnih stikov. S trajanjem poskusa se celotna epitelijska površina zmanjšuje, tesni stiki pa se rahljajo.

Izvedli smo poskuse, kjer smo mehurje podgan izpostavili hitosanu različno dolgo, 20 min in 60 min. Za izvedbo posameznega poskusa smo uporabili tri mehurje podgan (skupno šest pretočnih celic). Mehurje smo razprli in jih prepolovili ter jih položili med inserte, ki so imeli odprtino površine $0,07\text{cm}^2$. Inserte smo nato vstavili med difuzijski celici. Sledila je prva faza, predinkubacija. Na donorsko stran, kamor je bila obrnjena sluznica mehurja smo dodali 2,5mL pufra PBS 6, na akceptorsko stran pa 2,5mL medija za gojenje celic. Sistem smo termostatirali pri $36 \pm 1^\circ\text{C}$, da smo čim bolj posnemali fiziološke pogoje. Sledila je faza inkubacije, v kateri smo začeli meriti TEER. Nato smo v pretočni celici na donorski strani PBS 6 zamenjali z 2,5mL vzorca.

V prvi seriji poskusov je bilo tkivo vzorcu izpostavljeno 20 min. Najprej smo ugotavljali, razlike v delovanj disperzije hitosana in suspenzije mikrosfer s hitosanom ob prisotnosti HPMC, ki poveča viskoznost PBS 6 in kakšen je učinek mikrosfer na urotelij po direktnem nanisu na sluznico mehurja. Vzorci so bili PBS 6 (kontrola), same mikrosfere, ki smo jih nanesli direktno na mehur (M) in pretočno celico napolnili s PBS 6, disperzija hitosana (HIT), suspenzija mikrosfer (MS), disperzija hitosana v 0,2% HPMC (HIT_{hpmc}) ter suspenzija mikrosfer v 0,2% HPMC (MS_{hpmc}). Nadalje smo uporabo HPMC opustili in smo kot vzorce uporabili disperzijo hitosana (HIT), suspenzijo mikrosfer (MS) ali 1,5mL supernatanta mikrosfer v PBS 6 po 5, 20 in 60 minutnem suspendiranju (MS s5, MS s20 in MS s60), ki smo mu dodali 1mL PBS 6.

V seriji poskusov, ko je bilo tkivo vzorcu izpostavljeno 60 min, smo kot vzorca uporabili disperzijo hitosana (HIT_{60}) in suspenzijo mikrosfer (MS_{60}). Časovni intervali postopka so prikazani na sliki 9. TEER smo merili v naprej predvidenih časovnih intervalih.



Slika 9: **Časovni potek poskusa merjenja TEER podganjega mehurja.** A predstavlja poskus, kjer je bilo tkivo vzorcem izpostavljeno 20 min, B pa predstavlja poskus z 60 minutno izpostavljenostjo.

3.3.4 Vrstična elektronska mikroskopija

3.3.4.1 Opazovanje mikrosfer

Za konico spatule mikrosfer Serije 1, frakcijo velikosti $80\mu\text{m}$ - $100\mu\text{m}$, smo prilepili na nosilec, na katerega smo prej pritrdili obojestransko lepljiv trak. Popršili smo jih z zlatom in jih posušili na zraku. Na različnih povečavah smo jih opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) na Inštitutu za biologijo celice (MF, Univerza v Ljubljani).

3.3.4.2 Opazovanje sluznice sečnega mehurja

Dve odrasli miši smo anestezirali z ketamin hidrokloridom (100mg/kg i.p.) in ksilazinom (10mg/kg i.p.). Po nekaj minutah, ko sta bili popolnoma pod vplivom anestezije in je bila vsa muskulatura sproščena, smo jima skozi sečnico vstavili kateter. V eno miš smo intravezikalno aplicirali 0,005% (ut./vol) disperzijo hitosana v PBS 6, v drugo pa suspenzijo mikrosfer v PBS 6 z ekvivalentno količino hitosana. Po 20 min smo miši evtanazirali z inhalacijo CO_2 . Po tem jima je bil, za nadaljnjo analizo odstranjen mehur. Mehur smo prerezali in ga pri 4°C fiksirali s 4% paraformaldehidom in 2% glutaradehidom v 0,1M kakodilatnem pufru ($\text{pH}=7,4$). Sledili so postfiksacija z OsO_4 , dehidracija tkiva in (na osnovi kritične točke CO_2) sušenje tkiva. Posušene koščke tkiva smo prilepili na nosilce, jih naprašili z zlatom in jih opazovali z SEM. Postopek je bil izveden na Inštitutu za biologijo celice (MF, Univerza v Ljubljani).

4 Rezultati

4.1 Sejalna analiza

Najprej smo izvedli sejalno analizo testnih vzorcev. Rezultati so podani v preglednici IV. Izkoristki so se gibali med 99 in 74%, od tega je bilo uporabnih frakcij od 37 do 68%.

Preglednica IV: **Sejalna analiza testnih poskusov.** V preglednici so prikazani deleži posamezne frakcije serije A-G, izkoristek (η) in delež uporabne frakcije (% up).

SerijaA	Sito [μm]	%	SerijaC	Sito [μm]	%	SerijaE	Sito [μm]	%	SerijaG	Sito [μm]	%
	>350	20,51		>350	18,33		>250	23,62		>250	23,37
	350-250	12,44		350-250	5,59		250-200	12,18		250-200	11,49
	250-200	12,98		250-200	7,28		200-160	13,65		200-160	14,18
	200-160	40,83		200-160	34,59		160-125	19,56		160-125	20,69
	160-125	11,63		160-125	30,55		125-100	10,70		125-100	5,75
	125-100	0,97		125-100	2,93		100-80	8,12		100-80	10,73
	100-80	0,62		100-80	0,35		<80	12,18		<80	13,79
	<80	0,04		<80	0,38						
	$\eta=$	0,91		$\eta=$	0,98		$\eta=$	0,95		$\eta=$	0,82
	% up=	54,04		% up=	54,04		% up=	52,03		% up=	51,34
SerijaB	Sito [μm]	%	SerijaD	Sito [μm]	%	SerijaF	Sito [μm]	%	SerijaG	Sito [μm]	%
	>350	16,03		>250	17,59		>250	25,82			
	350-250	3,98		250-200	5,56		250-200	11,27			
	250-200	8,84		200-160	6,94		200-160	14,91			
	200-160	13,50		160-125	9,26		160-125	22,18			
	160-125	33,58		125-100	7,87		125-100	8,00			
	125-100	15,68		100-80	12,50		100-80	8,36			
	100-80	5,53		<80	40,28		<80	9,45			
	<80	2,85									
	$\eta=$	0,99		$\eta=$	0,74		$\eta=$	0,94			
	% up=	68,29		% up=	36,57		% up=	53,45			

Glede na rezultate in majhna odstopanja med njimi smo za nadaljnjo delo izbrali recepturo serije A, E oz. F in G z 1,4 g Eudragita® (RS, RL in kombinacijo obeh), 0,9g hitosana, 0,5g ciprofloksacina in v Seriji 1 z 0,1g Mg-stearata, ki smo jih dispergirali v 6mL acetona. Izdelali smo 4 serije z različnimi recepturami (Serija 1-4) in z njimi izvedli sejalno analizo. Izkoristki so bili v intervalu od 80 do 99%. Iz rezultatov smo izračunali povprečne premere za posamezno serijo, nato pa smo s statistično obdelavo ugotavljali ali so med serijami značilne

razlike. Z ANOVO z enim faktorjem smo preverjali razlike v deležu uporabnih frakcij, z dvofaktorsko ANOVO brez ponovitev pa smo preverili razlike v povprečju povprečnega premera mikrosfer v frakcijah. Pri obeh analizah smo ugotovili, da s 5% tveganjem ne moremo dokazati statistično značilnih razlik med njimi. Rezultati povprečnih premerov, izkoristkov in statistične analize so podani v preglednicah V, VI in VII.

Preglednica V: **Sejalna analiza Serije1-4.** Prikazani so povprečni delež vsake serije (vsaka serija je imela 4 ponovitve), njihove standardne deviacije (SD) in koeficient variacije (KV%). V preglednici so podani tudi % uporabnih frakcij (80-200µm) (% up) in izkoristek postopka (η).

Sito [µm]	Serija 1	povpr.	SD	KV%	Serija 2	povpr.	SD	KV%
>250		21,41	1,96	9,18		24,18	2,63	10,87
250-200		5,73	0,52	9,13		7,14	3,35	46,93
200-160		7,98	2,15	26,98		9,34	3,04	32,61
160-125		21,49	3,54	16,46		28,92	4,27	14,78
125-100		16,15	1,38	8,54		14,09	2,16	15,36
100-80		13,07	0,57	4,35		9,29	3,27	35,15
<80		17,41	2,71	15,56		6,61	4,52	68,36
% up=		58,69	6,50	11,08		61,64	2,52	4,09
η =		0,85	0,04	4,55		0,93	0,09	9,68
povprečen premer [µm]		137,75				156,49		
Sito [µm]	Serija 3	povpr.	SD	KV%	Serija 4	povpr.	SD	KV%
>250		27,81	5,91	21,24		21,57	0,88	4,07
250-200		12,83	7,86	61,27		8,21	3,40	41,39
200-160		13,00	5,87	45,16		9,29	1,09	11,70
160-125		26,92	3,79	14,08		21,99	2,07	9,42
125-100		13,60	6,06	44,55		14,00	1,81	12,08
100-80		7,12	3,10	43,48		11,61	1,49	12,80
<80		5,53	4,41	79,73		12,24	4,20	34,35
% up=		60,64	6,37	10,51		57,88	3,41	5,89
η =		0,90	0,11	12,60		0,88	0,04	4,55
povprečen premer [µm]		167,08				146,48		

Preglednica VI: **ANOVA z enim dejavnikom, statistična obdelava deleža uporabnih frakcij.** P je večji kot 0,05, kar pomeni, da s 5% tveganjem ne moremo trditi o statistično značilnih razlikah med variancama. P je verjetnost, df je število prostostnih stopenj, S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pa, da o njih s 5% tveganjem ne moremo sklepati.

Preiskovan parameter	df	P	S/NS
Delež uporabnih frakcij	3	0,7065123	NS

Preglednica VII: ANOVA dveh dejavnikov brez ponovitev, statistična obdelava povprečnih premerov mikrosfer v posameznih frakcij. P je večji kot 0,05, kar pomeni, da s 5% tveganjem ne moremo trditi o statistično značilnih razlikah med variancami. P je verjetnost, df je število prostostnih stopenj, S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pa, da o njih s 5% tveganjem ne moremo sklepati.

Preiskovan parameter	df	P	S/NS
Povprečni premer mikrosfer v posamezni seriji	3	0,9382362	NS

4.2 Gravimetrično določanje količine flotiranih in sedimentiranih mikrosfer

Sposobnost flotacije in sedimentacije mikrosfer smo določevali z gravimetrično metodo. Rezultati so podani v preglednici VIII.

Preglednica VIII: **Gravimetrično določanje deleža flotiranih (F) in sedimentiranih (S) mikrosfer** (50mg mikrosfer v 5mL PBS 6). V preglednici je prikazana tudi masna bilanca (MB), povprečje deležev (povpr.), v posamezni seriji mikrosfer, določen v dveh paralelkah, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV%).

[%]		povpr.	SD	KV%		povpr.	SD	KV%
F	Serija 1	52,42	21,60	41,22	Serija 3	73,40	10,51	14,32
S		47,58	21,60	45,40		26,60	10,51	39,52
MB		59,92	4,89	8,17		78,15	3,13	4,00
F	Serija 2	67,83	14,24	21,00	Serija 4	71,27	8,46	11,87
S		32,17	14,24	44,28		28,73	8,46	29,43
MB		77,28	0,51	0,66		75,89	4,17	5,50

Preglednica IX: **Gravimetrično določanje deleža flotiranih (F) in sedimentiranih (S) mikrosfer** (25mg mikrosfer v 5mL PBS 6). V preglednici je prikazano povprečje deležev (povpr.) posamezne serije v štirih paralelkah, standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV%) ter masna bilanca (MB).

[%]		povpr.	SD	KV%		povpr.	SD	KV%
F	Serija 1	27,59	7,24	26,23	Serija 3	35,23	4,52	12,84
S		72,41	7,24	10,00		64,77	4,52	6,99
MB		72,46	1,31	1,81		79,20	1,01	1,27
F	Serija 2	29,15	6,49	22,26	Serija 4	29,73	12,77	42,96
S		70,63	6,49	9,19		70,27	12,77	18,18
MB		77,56	1,72	2,21		77,44	3,37	4,35

4.3 Gostota mikrosfer

Gostoto smo določali prvi seriji mikrosfer in sicer smo izvedli 6 ponovitev. Rezultati so podani v preglednici X.

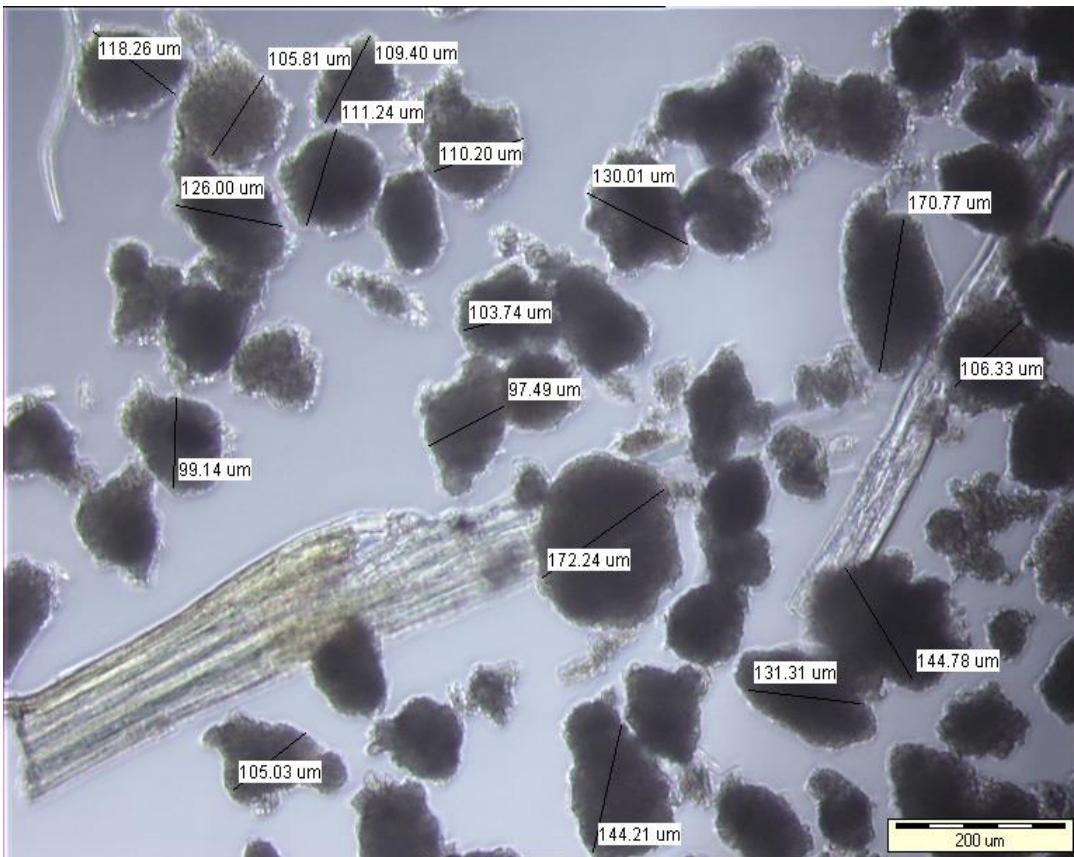
Preglednica X: **Gostote mikrosfer.** V preglednici so prikazane prave gostote mikrosfer za posamezne vzorce, povprečna gostota, standardna deviacija in relativna standardna deviacija.

	ρ (MS) [kg/l]		
1A	0,701		
1A	0,920		
1A	0,842		
1C	0,886	povprečna ρ (MS) [kg/l]	0,893
1C	0,980	SD	0,115
1C	1,027	KV %	12,850

4.4 Določanje nabrekanja mikrosfer

4.4.1 Opazovanje mikrosfer pod mikroskopom

Nabrekanje mikrosfer smo opazovali z optičnim mikroskopom s kamero. Posneli smo sliko in izmerili premere mikrosfer posameznih frakcij Serije 1, ponovitev C. Iz izmerjenih premerov smo izračunali povprečen premer in mediano premerov posamezne frakcije v določeni časovni točki. Rezultati so podani v preglednici XI.



Slika 9: Frakcija 80-100μm v PBS 6 po 24h

Preglednica XI: **Povprečni premeri in mediana (D5) posameznih frakcij mikrosfer v določenih časovnih točkah**, n je število izmerjenih premerov.

frakcija [μm] \ čas		10 min		1h		2h		3h		24h	
80-100	povpr..	118,28	n=21	115,72	n=22	113,97	n=11	110,55	n=16	123,42	n=16
	D5	116,18		114,30		115,23		108,22		114,23	
100-125	povpr.	177,82	n=5	132,78	n=16	145,94	n=8	135,39	n=14	143,56	n=17
	D5	162,86		133,80		142,90		134,22		137,95	
125-160	povpr.	176,41	n=8	169,26	n=20	185,24	n=9	186,90	n=16	197,81	n=10
	D5	176,40		166,24		181,19		191,63		196,47	

4.4.2 Vrednotenje z analizatorjem velikosti delcev Mastersizer

Za opazovanje spreminjanja velikosti mikrosfer v PBS 6 skozi določeno časovno obdobje smo uporabili aparaturo Mastersizer. Uporabili smo V preglednici XII so prikazani rezultati.

Preglednica XII: **Povprečna mediana (D5) ter prvi (D1) in zadnji (D9) decili posamezne serije v μm , njihova standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV%).** Rezultati so vrednoteni pri 1000 delcih. V preglednici je v odstotkih podana tudi sprememba premera med prvo in zadnjo časovno točko.

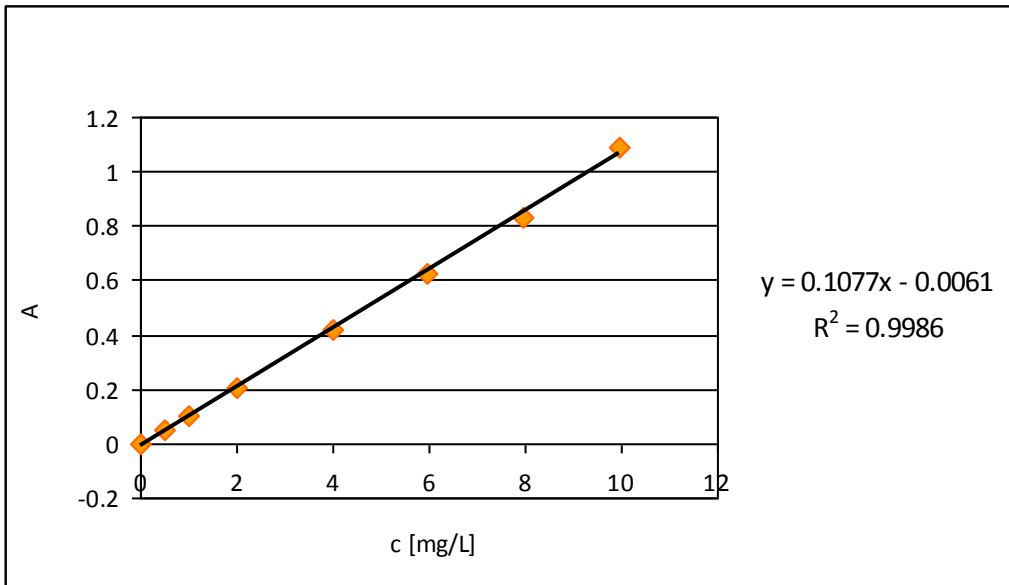
	čas	D1			D5			D9		
		povpr.	SD	KV (%)	povpr.	SD	KV (%)	povpr.	SD	KV (%)
Serija1	5 min	41,04	8,74	21,30	130,31	2,40	1,84	205,29	9,26	4,51
	15 min	39,50	9,04	22,90	130,77	1,70	1,30	211,50	6,09	2,88
	30 min	37,37	9,42	25,20	130,26	1,94	1,49	210,50	4,92	2,34
	1h	35,52	9,28	26,13	130,55	2,56	1,96	212,43	3,18	1,50
	2h	29,98	7,51	25,06	130,67	2,43	1,86	214,20	3,95	1,84
	3h	28,07	6,89	24,53	130,50	2,45	1,88	213,79	1,97	0,92
	4h	26,25	7,32	27,87	131,17	0,96	0,73	212,72	3,35	1,57
	24h	10,33	5,11	49,45	127,07	1,78	1,40	203,13	7,45	3,67
		% spremembe			2,49					
Serija2	5 min	57,48	4,72	8,21	137,34	0,93	0,67	219,05	3,23	1,48
	30 min	38,06	32,10	84,35	138,76	3,66	2,64	227,73	1,35	0,59
	1h	37,29	31,64	84,84	138,75	4,36	3,14	229,09	1,62	0,71
	2h	35,79	28,96	80,93	138,43	3,75	2,71	230,26	1,01	0,44
	4h	34,16	27,69	81,06	138,69	3,20	2,31	231,03	0,62	0,27
	24h	27,96	25,40	90,84	137,79	0,92	0,67	229,79	5,20	2,26
	% spremembe			-0,33						
Serija3	5 min	40,99	4,59	11,21	136,76	5,25	3,84	213,36	4,69	2,20
	30 min	38,98	11,12	28,53	137,91	5,53	4,01	212,58	5,36	2,52
	1h	42,24	12,61	29,85	138,81	5,33	3,84	213,58	4,96	2,32
	2h	39,81	13,56	34,07	137,83	6,45	4,68	212,84	5,38	2,53
	4h	26,42	9,25	34,99	136,27	6,63	4,86	213,26	7,94	3,72
	24h	10,81	7,81	72,24	130,71	5,25	4,02	206,21	7,00	3,39
	% spremembe			4,42						

Serija4	5 min	50,63	9,77	19,30	126,92	11,62	9,16	198,56	16,84	8,48
	30 min	50,68	10,32	20,37	128,08	11,78	9,20	200,85	18,89	9,41
	1h	51,58	10,08	19,54	128,62	10,66	8,29	202,26	17,35	8,58
	2h	49,30	8,34	16,92	127,17	9,48	7,45	199,68	15,22	7,62
	4h	49,50	8,62	17,42	127,49	10,31	8,09	200,31	16,43	8,20
	24h	24,79	16,42	66,23	123,95	10,85	8,76	197,74	17,47	8,84
	% spremembe			2,34						

Uporabili smo uporabno frakcijo posamezne serije.

4.5 Vsebnost ciprofloksacina v mikrosferah

Na grafu 1 je prikazana umeritvena krivulja, s pomočjo katere smo določili vsebnost ciprofloksacina v mikrosferah. Izračunali smo vsebnosti ciprofloksacina v vseh serijah mikrosfer. Rezultati so podani v preglednici XIII.



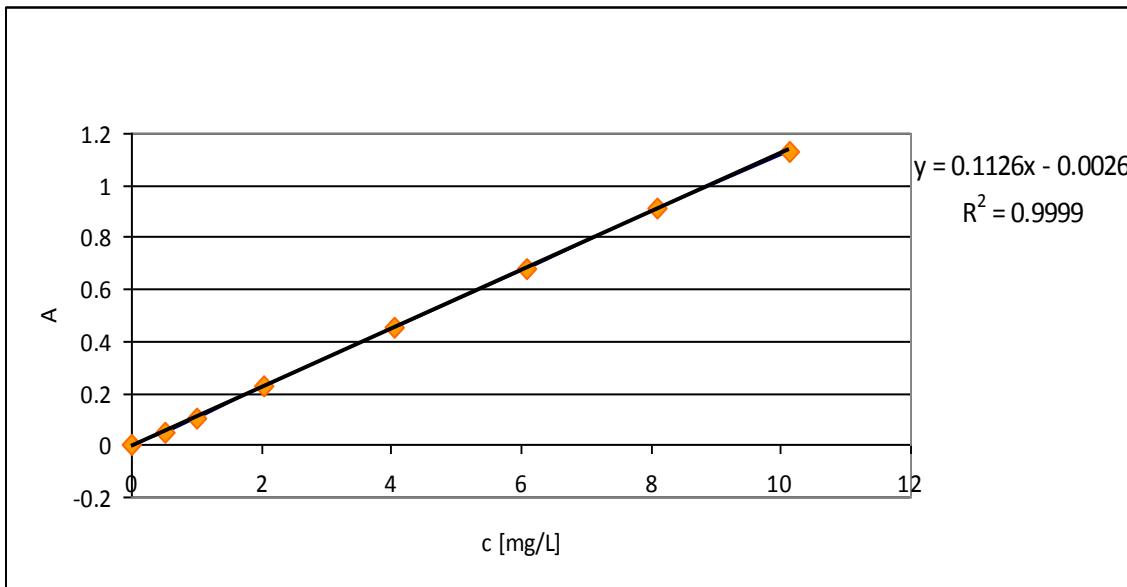
Graf 1: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti ciprofloksacina v 0,01M HCl.

Preglednica XIII: **Vsebnost ciprofloksacina v mikrosferah.** Delež pomeni povprečno vrednost ciprofloksacina prisotnega v mikrosferah, računano glede na celotno maso mikrosfer, povprečje je bilo izračunano iz štirih paralelki v posamezni seriji. Podana je tudi standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV%). Iz deleža smo izračunali povprečno vsebnost ciprofloksacina glede na teoretične vrednosti.

	delež	SD	KV%	vsebnost [%]
Serija1	0.2091	0.0031	1.48	121.35
Serija2	0.2013	0.0044	2.21	112.42
Serija3	0.2168	0.0106	4.91	121.40
Serija4	0.2281	0.0092	4.03	127.75

4.6 Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer po metodi USP XXIII

Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer so spremljali po metodi USP XXIII. Uporabili smo uporabno frakcijo mikrosfer posameznih serij. Koncentracije učinkovine smo določali na podlagi umeritvene krivulje, ki je prikazana v grafu 2. Rezultati sproščanja ciprofloksacina iz mikrosfer v PBS 6 so podani v preglednici XIV. Poleg dvournega sproščanja smo opazovali tudi sproščanje ciprofloksacina v 24 urah, rezultati so prikazani v preglednici XV.



Graf2: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti ciprofloksacina v PBS 6.

Preglednica XIV: **Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer v PBS 6.** V Preglednici so prikazane povprečne vrednosti % sproščene učinkovine (povpr.) štirih paralel, njihova standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV%). V preglednici je podana tudi maksimalna količina sproščene učinkovine.

čas [min]	Serija1			Serija2		
	povpr.	SD	KV%	povpr.	SD	KV%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	72,89	1,05	1,45	77,18	4,74	6,14
6	79,88	2,13	2,66	81,52	0,99	1,21
10	83,06	2,32	2,79	84,11	1,36	1,62
15	84,84	2,52	2,97	86,10	1,82	2,12
30	87,27	2,97	3,41	87,41	1,85	2,12
45	87,65	2,94	3,35	88,06	1,57	1,78
60	87,58	2,90	3,31	88,75	1,66	1,87
90	87,30	2,39	2,74	87,69	1,87	2,14
120	87,59	2,54	2,89	87,89	1,76	2,00
maks. sproščene U [mg]	4,20	0,09	2,08	4,02	0,08	2,08

čas [min]	Serija3			Serija4		
	povpr.	SD	KV%	povpr.	SD	KV%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	67,11	8,91	13,28	63,67	4,88	7,66
6	76,49	6,96	9,10	74,50	4,04	5,42
10	80,42	6,49	8,08	79,03	3,17	4,01
15	82,48	6,01	7,28	81,56	3,43	4,20
30	85,12	5,47	6,42	84,32	3,23	3,83
45	85,59	5,15	6,01	84,04	1,92	2,29
60	85,66	5,15	6,01	84,34	2,26	2,68
90	85,99	5,19	6,04	84,43	1,86	2,20
120	86,02	5,35	6,22	84,43	2,08	2,46
maks. sproščene U [mg]	4,33	0,22	5,02	4,57	0,18	3,95

Preglednica XV: **24-urno sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer v PBS 6.** 24 ur smo v različnih časovnih točkah preko absorbance merili koncentracijo sproščene učinkovine v vseh štirih serij. V preglednici je podana tudi maksimalna količina sproščene učinkovine.

čas[min]	Serija1	Serija2	Serija3	Serija4
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	68,58	61,44	46,66	42,77
6	77,03	77,50	68,78	70,00
10	83,74	85,88	76,28	79,99
15	88,35	86,54	81,79	82,61
30	91,77	89,00	85,35	85,11
45	91,46	88,80	85,72	85,77
60	91,20	89,37	85,70	85,77
90	91,63	89,92	85,48	86,52
120	91,15	90,22	85,53	86,70
1440	96,36	95,02	91,51	91,89
maks. sproščene U [mg]	4,16	4,08	4,30	4,44

4.7 TEER podganjega mehurja

Pri merjenju transepiteljske upornosti podganjega mehurja smo uporabili frakcijo 80-100µm mikrosfer Serije 1.

Rezultati poskusa, kjer je bila sluznica različnim vzorcem izpostavljena 20 min so podani v spodnjih preglednicah XVI in XVII. Vzorce s HPMC smo uporabili, da bi povečali viskoznost medija in bi s tem zmanjšali sedimentiranje mikrosfer.

Za primerjavo smo uporabili relativne vrednosti TEER [%], ki smo jih izračunali tako, da smo kot 100% šteli izmerjeno vrednost TEER po koncu inkubacije, pred stikom vzorca s tkivom,

ter ostale izmerjene vrednosti v različnih časovnih točkah na podlagi tega pretvorili v relativne.

Preglednica XVI: **Spreminjanje relativne vrednosti TEER [%] sečnega mehurja podgane po prvem poskusu** ob direktnem stiku sluznice z mikrosferami (M), z disperzijo hitosana (HIT), suspenzijo mikrosfer (MS), disperzijo hitosana v 0,2% HPMC (HIT_{hpmc}) ter suspenzijo mikrosfer v 0,2% HPMC (MS_{hpmc}). PBS 6 smo uporabili kot kontrolo. Sluznica je bila vzorcem izpostavljena 20 min, ta čas predstavlja obarvani del.

čas [min]	PBS	M	HIT	MS	HIT_{hpmc}	MS_{hpmc}
0	90,27	78,88	95,55	85,37	92,44	81,41
10	93,83	85,61	98,03	75,90	97,44	91,85
20	100,00	90,15	100,00	100,00	100,00	99,42
30	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
32	103,66	10,42	75,26	20,38	89,06	48,80
34	101,31	10,21	75,77	30,97	80,53	51,18
36	98,07	9,86	72,85	30,73	74,49	50,05
38	98,07	9,53	69,13	32,96	74,03	44,05
40	99,67	9,53	63,95	35,07	70,42	51,46
45	102,14	10,14	50,71	43,33	60,41	38,94
50	106,49	9,44	44,72	34,36	53,75	26,79
55	105,05	8,35	41,33	26,71	48,32	21,33
60	90,96	7,06	47,64	20,88	51,09	20,54
65	90,27	6,58	49,42	17,08	53,67	18,59
70	92,38	6,38	53,93	15,45	56,47	17,26
80	97,61	6,08	56,41	13,20	57,53	17,64
90	104,18	5,91	60,24	13,59	60,16	18,48
100	101,64	5,79	54,93	13,54	58,18	18,83
110	105,05	5,67	58,66	14,29	60,91	20,95
120	104,18	5,50	57,52	15,28	62,10	22,11
140	117,19	5,20	70,59	38,20	72,51	55,87
160	124,84	5,02	73,72	69,78	78,30	88,67
180	130,81	4,77	78,16	101,39	84,05	117,07
200	134,14	4,77	81,18	107,99	89,62	134,53

Ker med vzorcema s HPMC in brez nje ni bilo opaznih razlik smo njeno uporabo opustili.

Preglednica XVII: **Spreminjanje povprečne relativne vrednosti TEER [%] sečnega mehurja podgane v različnih časovnih točkah**, ko je bila sluznica 20 min izpostavljena PBS 6 (n=4), disperziji hitosana (HIT)(n=5), suspenziji mikrosfer (MS)(n=6), supernatantu po 5 min (MS s5)(n=7), 20 min (MS s20)(n=9) in 60 min (MS s60)(n=7) inkubaciji mikrosfer in njihove standardne deviacije (SD). Obarvani del predstavlja čas, ko je bil mukozni del sečnega mehurja v stiku z vzorcem, n pomeni število ponovitev.

čas [min]	HIT		MS		PBS		MS s5		MS s20		MS s60	
	Povpr.	SD										
0	87,51	10,05	91,06	10,70	94,80	5,12	93,94	3,69	88,15	8,45	87,14	9,91
10	91,67	8,29	89,64	12,70	98,02	4,01	95,41	3,32	91,93	7,11	91,97	5,65
20	97,22	4,01	90,73	9,10	100,45	2,10	98,72	2,72	95,97	4,17	97,64	5,11
30	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
32	68,96	11,89	38,46	22,19	101,02	4,67	102,32	4,35	83,02	21,70	85,51	26,43
34	63,57	14,24	33,51	19,38	100,99	4,65	99,60	2,12	74,61	21,98	79,54	28,57
36	60,83	14,14	32,07	22,20	100,70	4,77	98,93	3,10	72,40	23,05	75,95	29,06
38	58,35	14,50	32,35	23,36	100,70	4,46	98,45	3,70	70,00	22,22	75,14	28,76
40	54,37	14,55	30,62	22,58	100,89	3,32	97,19	3,77	68,54	21,65	75,06	29,03
45	45,63	12,81	27,19	19,21	101,84	3,84	95,37	3,79	69,49	22,66	73,33	30,24
50	42,53	12,70	24,58	15,89	102,91	3,80	93,20	4,01	66,71	23,98	68,94	32,15
55	39,08	11,56	22,98	12,27	96,69	5,75	83,92	8,36	55,76	21,92	54,76	28,49
60	45,00	16,03	23,66	11,28	95,27	4,21	85,02	6,59	55,03	22,30	55,29	28,79
65	48,05	17,11	24,60	12,06	96,49	5,79	85,36	5,50	54,02	22,51	56,90	29,39
70	51,69	18,77	26,39	12,21	97,79	6,15	85,17	4,76	52,98	22,40	58,27	29,67
80	56,50	20,44	30,87	14,35	101,04	5,16	84,09	5,26	53,43	21,59	63,54	30,31
90	62,34	22,66	36,30	16,31	103,56	3,84	84,07	6,44	55,91	20,74	69,59	28,73
100	65,71	26,07	41,39	18,63	102,59	4,18	85,46	6,96	60,13	19,95	77,01	27,36
110	69,36	27,42	48,21	19,36	103,24	3,89	86,19	7,26	64,57	19,25	83,90	23,43
120	72,62	30,78	55,04	21,76	103,70	5,48	88,11	6,59	69,53	17,89	87,40	21,79
140	80,30	30,42	69,91	18,77	108,30	9,95	90,48	8,83	78,97	12,18	95,36	16,59
160	84,94	31,14	85,49	12,95	110,55	13,25	92,97	12,40	85,71	8,62	100,21	15,66
180	91,44	28,79	101,04	12,12	113,64	17,36	94,74	15,27	89,08	10,27	105,83	16,87
200	94,14	29,61	115,50	17,31	114,90	19,29	93,11	15,56	92,03	16,18	113,46	27,20

V spodnji preglednici XVII so prikazani rezultati poskusov, ko je bila sluznica izpostavljena vzorcu disperzije hitosana (HIT₆₀) in suspenzije mikrosfer (MS₆₀) 60 min, podaljšan je tudi čas regeneracije.

Preglednica XVIII: **Spreminjanje povprečne relativne vrednosti TEER [%] sečnega mehurja podgane v različnih časovnih točkah**, ko je bila sluznica 60 min izpostavljena disperziji hitosana (HIT_{60})(n=4) in suspenziji mikrosfer (MS_{60})(n=5) in njihove standardne deviacije (SD). Obarvani del predstavlja čas, ko je bil mukozni del sečnega mehurja v stiku z vzorcem, n pomeni število ponovitev.

ČAS [min]	HIT_{60}		MS_{60}	
	Povpr.	SD	Povpr.	SD
0	74,15	12,06	89,93	3,03
10	90,30	5,35	93,51	1,89
20	96,21	1,34	98,20	0,58
30	100,00	0,00	100,00	0,00
32	74,26	8,55	65,52	21,89
34	57,16	6,24	64,34	21,26
36	54,68	10,74	62,73	23,06
38	54,12	11,74	61,17	23,55
40	49,03	10,18	57,51	22,60
45	40,43	10,65	54,69	23,11
50	34,60	9,80	49,99	19,56
55	32,43	9,77	48,19	17,81
60	32,77	9,50	48,64	15,87
70	34,99	9,44	50,95	13,19
80	35,81	9,19	53,36	12,41
90	36,08	9,30	54,63	11,56
100	31,91	10,45	47,02	16,04
110	33,12	12,46	49,57	13,78
120	35,32	12,16	54,36	11,34
140	40,57	12,83	64,53	9,82
160	44,21	14,03	69,36	9,91
180	45,33	12,92	65,77	13,28
210	52,37	20,78	79,47	15,62
240	62,54	26,71	87,14	17,65
270	75,63	37,15	96,06	21,11
300	89,33	48,95	106,27	26,85

4.7.1 Statistična obdelava

Za ugotavljanje razlik med točkami na krivulji posameznega vzorca smo uporabili parni T-test za odvisne vzorce. Primerjali smo točko pred menjavo PBS 6 z vzorcem (30min), po 20 min stika vzorca s sluznico (50min) in končno točko po regeneraciji (200min). Rezultati so podani v preglednici XIX.

Preglednica XIX: **Statistična obdelava rezultatov relativnih vrednosti TEER.** Navedeni so rezultati preizkušanja hipoteze o značilnosti razlik med TEER vzorca v različnih časovnih točkah. S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pomeni, da o razlikah ne moremo sklepati.

Vzorca	PBS		HIT		MS		MS s5		MS s20		MS s60	
	p	S/NS										
30min-50min	0,2227	NS	0,0005	S	0,0001	S	0,0042	S	0,0031	S	0,0431	S
50min-200min	0,2497	NS	0,0037	S	0,0006	S	0,9876	NS	0,0570	NS	0,0546	NS
30min-200min	0,2202	NS	0,6811	NS	0,0798	NS	0,0042	S	0,1775	NS	0,2384	NS

Za ugotavljanje razlik med vzorci v različnih časovnih točkah smo izvedli statistični test enofaktorska ANOVA. Rezultati so podani v preglednici XX.

Preglednica XX: **ANOVA z enim dejavnikom, ugotavljanje statističnih razlik med krivuljami v dveh časovnih točkah** (50min in 200min). Če je P večji kot 0,05 pomeni, da s 5% tveganjem ne moremo trditi o statistično značilnih razlikah. P je verjetnost, df je število prostostnih stopenj, S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pomeni, da o statistično značilnih razlikah s 5% tveganjem ne moremo sklepati.

Pri 50 min

Preiskovan parameter	df	P	S/NS
TEER med vzorci	5	1,57601E-06	S

Pri 200 min

Preiskovan parameter	df	P	S/NS
TEER med vzorci	5	0,104352	NS

V časovni točki pri 50 min so bile opazne statistično značilne razlike. Naprej smo izvedli F test za varianco in nato glede na enakost variance T-test za neodvisne vzorce z enako oz. različno varianco. Rezultati so podani v spodnji preglednici XXI.

Preglednica XXI: **Statistična obdelava primerjave med vzorci v časovni točki 50 min.** E pomeni enako varianco, R pa, da o enakosti variance s 5% tveganjem ne moremo sklepati. Navedeni so rezultati preizkušanja hipoteze o značilnosti razlik med TEER vzorcev v časovni točki 50 min. S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pomeni, da o statistično značilnih razlikah s 5% tveganjem ne moremo sklepati.

vzorca	enakost variance	p	S/NS	Vzorca	Enakost variance	p	S/NS
PBS - HIT	E	0,00004	S	HIT - MS s60	E	0,11547	NS
PBS - MS	E	0,00001	S	MS - MS s5	R	0,00005	S
PBS - MS s5	E	0,00347	S	MS - MS s20	E	0,00236	S
PBS - MS s20	E	0,01363	S	MS - MS s60	E	0,01083	S
PBS - MS s60	R	0,03275	S	MS s5 - MS s20	R	0,00988	S
HIT - MS	E	0,07218	NS	MS s5 - MS s60	R	0,09483	NS
HIT - MS s5	E	0,00000	S	MS s20 - MS s60	E	0,87547	NS
HIT - MS s20	E	0,06035	NS				

V nadaljevanju smo opravili še statistično analizo za podaljšan poskus, ko je bil tkivo izpostavljen vzorcu (HIT_{60} in MS_{60}) 60 min. Najprej smo s parnim t-testom za neodvisne vzorce ugotavljali razlike med časovnimi točkami 30 min, 90 min in 300 min posameznega vzorca. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXII. Nadalje pa smo uporabili F-test za enakost varianc in glede na rezultate še T-test za neodvisne vzorce z enako oz. različno varianco, s katerim smo ugotavljali razlike med vzorcema v časovnih točkah 90 min in 300 min. Rezultati so podani v preglednici XXIII.

Preglednica XXII: Statistična obdelava rezultatov relativnih vrednosti TEER pri podaljšanem poskusu.

Navedeni so rezultati preizkušanja hipoteze o značilnosti razlik med TEER vzorca (HIT_{60} in MS_{60}) v različnih časovnih točkah. S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pomeni, da o statistično značilnih razlikah s 5% tveganjem ne moremo sklepati.

vzorca	HIT_{60}		MS_{60}	
	p	S/NS	p	S/NS
30min - 90min	0,0008	S	0,0009	S
90min - 300min	0,0919	NS	0,0266	S
30min - 300min	0,6922	NS	0,6289	NS

Preglednica XXIII: Statistična obdelava primerjave med vzorci različnih časovnih točkah pri podaljšanem poskusu. E pomeni enako varianco, R pa, da o enakosti variance s 5% tveganjem ne moremo sklepati.

Navedeni so rezultati preizkušanja hipoteze o značilnosti razlik med TEER med vzorci v časovnih točkah 90 min in 300 min. S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pomeni, da o statistično značilnih razlikah s 5% tveganjem ne moremo sklepati.

časovna točka	enakost variance	p	S/NS
90 min	E	0,0356	S
300 min	E	0,5267	NS

Zadnji od statističnih analiz sta bili ugotavljanje razlik v končni točki regeneracije tkiva sečnega mehurja (200 min, 300 min) in točki pred zamenjavo vzorcev (disperzija hitosana in suspenzija mikrosfer) s pufrom (50 min, 90 min) med poskusoma, ko je bilo tkivo izpostavljen vzorcu 20 min oz. 60 min. Uporabili smo F-test za enakost varianc in glede na rezultate T-test za neodvisne vzorce z enako oz. različno varianco. Rezultati analize so predstavljeni v preglednici XXIV.

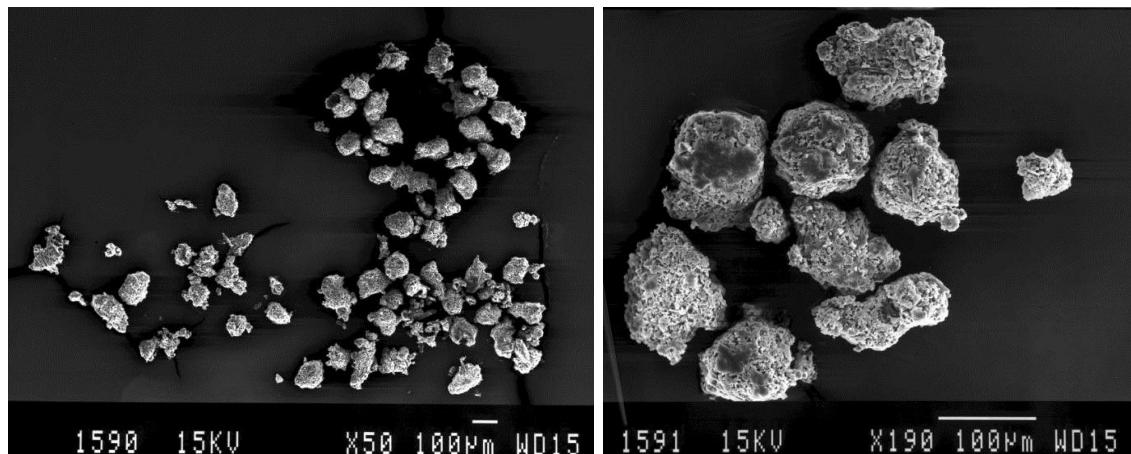
Preglednica XXIV: **Statistična obdelava primerjave v različnih časovnih točkah med poskusoma**, kjer je bilo tkivo izpostavljenu disperziji hitosana (HIT) in suspenziji mikrosfer (MS) 20 min in 60 min. E pomeni enako varianco, R pa, da o enakosti variance s 5% tveganjem ne moremo sklepati. Navedeni so rezultati preizkušanja hipoteze o značilnosti razlik med TEER vzorcev v časovnih točkah 200min oz. 300min in 50min oz. 90min. S pomeni statistično značilne razlike pri 5% tveganju, NS pa, da njih moremo sklepati.

vzorca	HIT			MS		
	enakost variance	p	S/NS	enakost variance	p	S/NS
200min - 300min	E	0,8594	NS	E	0,5072	NS
50min - 90min	E	0,4252	NS	E	0,0066	S

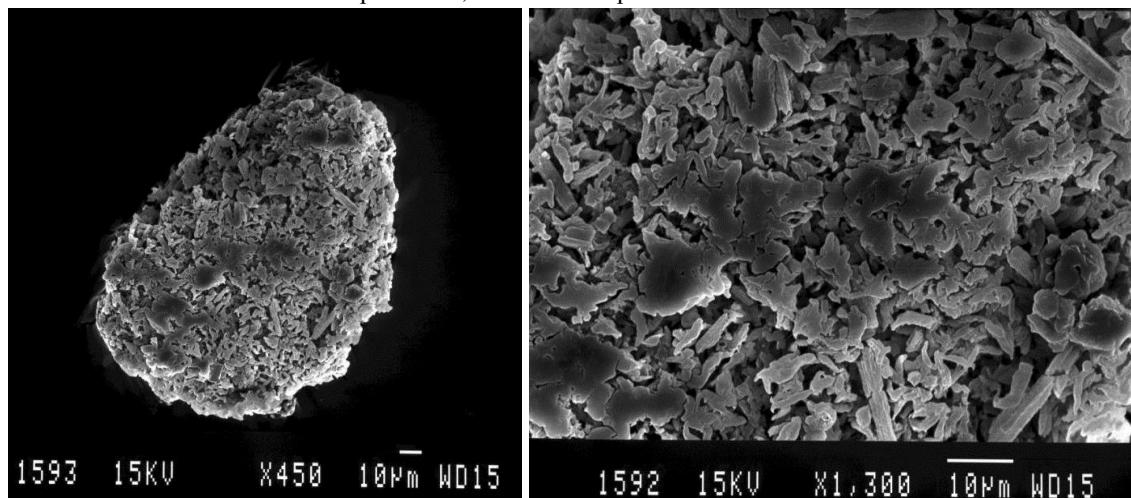
4.8 Vrstična elektronska mikroskopija

4.8.1 Opazovanje mikrosfer

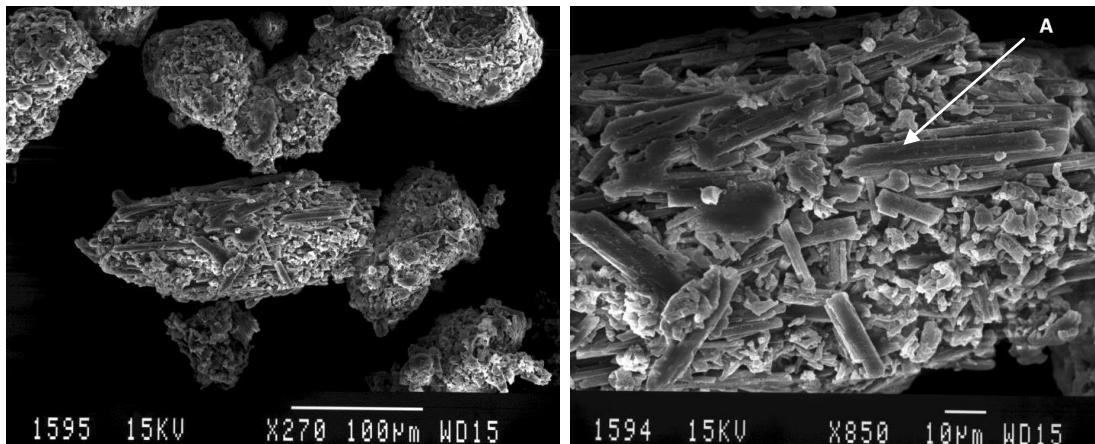
Pod vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali mikrosfere Serije 1 in sicer frakcijo velikosti od 80 μm do 100 μm . Slike prikazujejo mikrosfere pod različnimi povečavami.



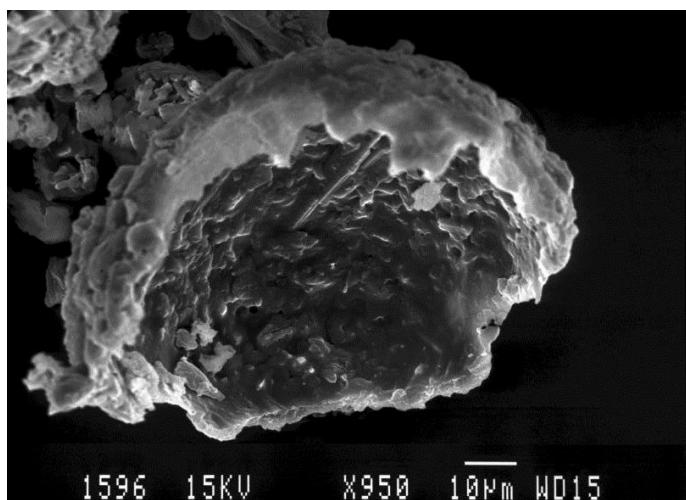
Slika 10: Mikrosfere. Levo:50x povečava; Desno: 190x povečava



Slika 11: Levo: **Mikrosfera kroglaste oblike.** (450x povečava) Desno: **Površina iste mikrosfere.** (1300x povečava)



Slika 12: Levo: **Mikrosfera ovalne oblike.** (270x povečava) Desno: **Površina iste mikrosfere.** (850x povečava) (kristali v obliki palčk (A) so verjetno kristali ciprofloksacina)

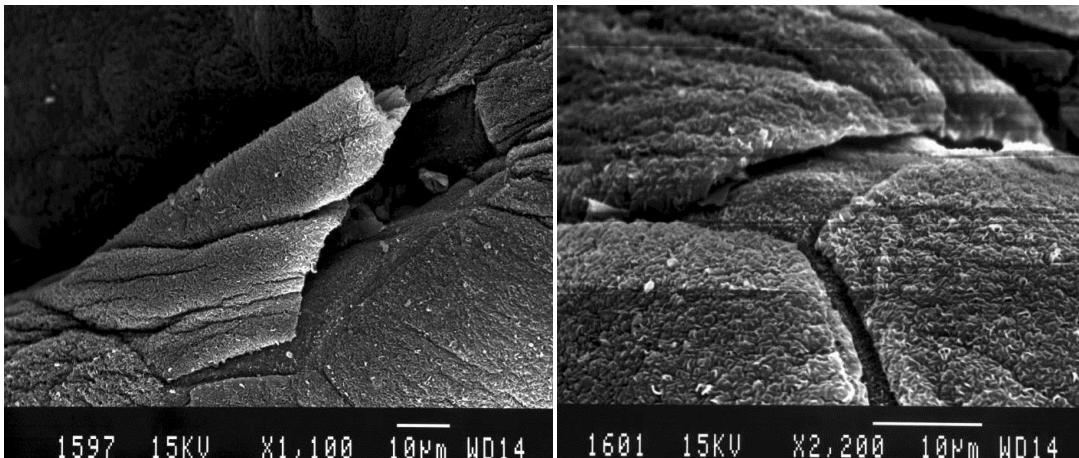


Slika 13: **Votla mikrosfera.** (950x povečava)

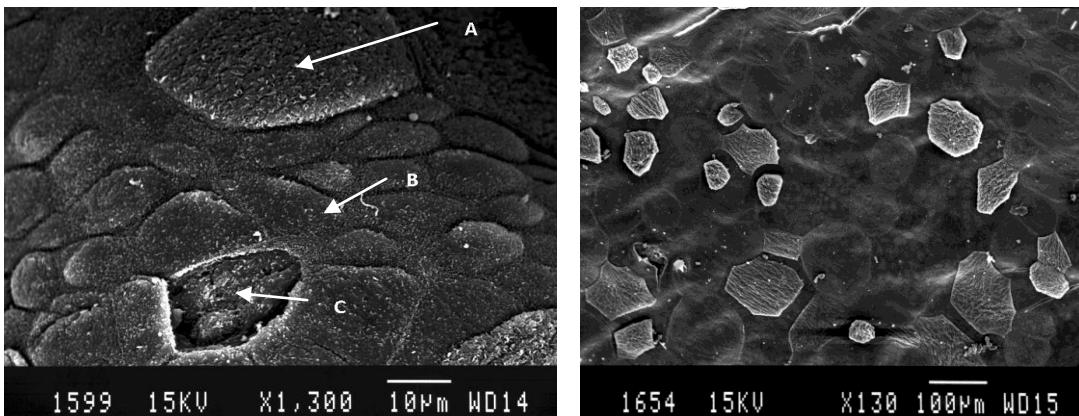
4.8.2 Opazovanje sluznice sečnega mehurja

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali tudi površino epitelija sečnega mehurja miši po intravezikalni aplikaciji suspenzije mikrosfer in disperzije hitosana. Spodnje slike predstavljajo spremembe v urotelija zaradi delovanja hitosana.

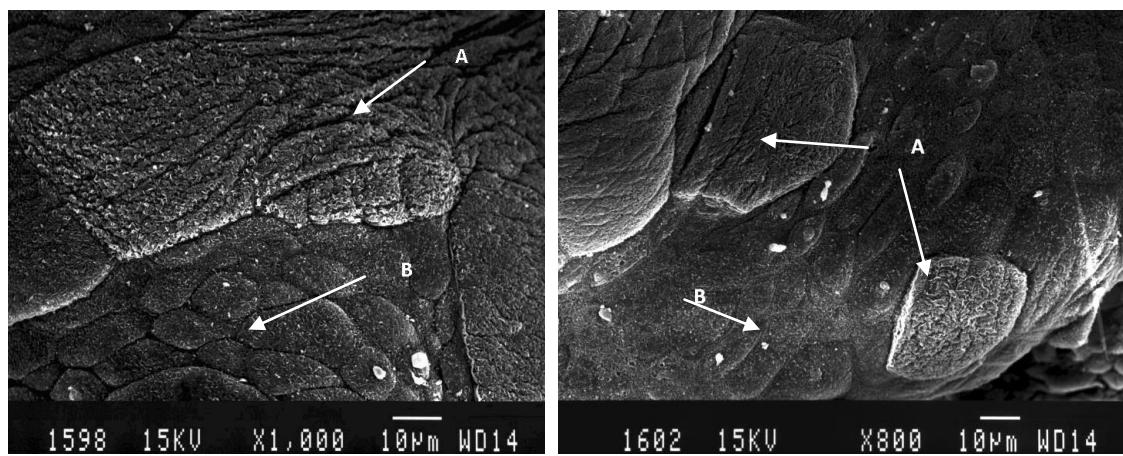
Po aplikaciji suspenzije mikrosfer



Slika 14: Levo: Luščenje dežnikaste celice. (1100x povečava) Desno: Začetek luščenja dežnikastih celic. (2200x povečava)

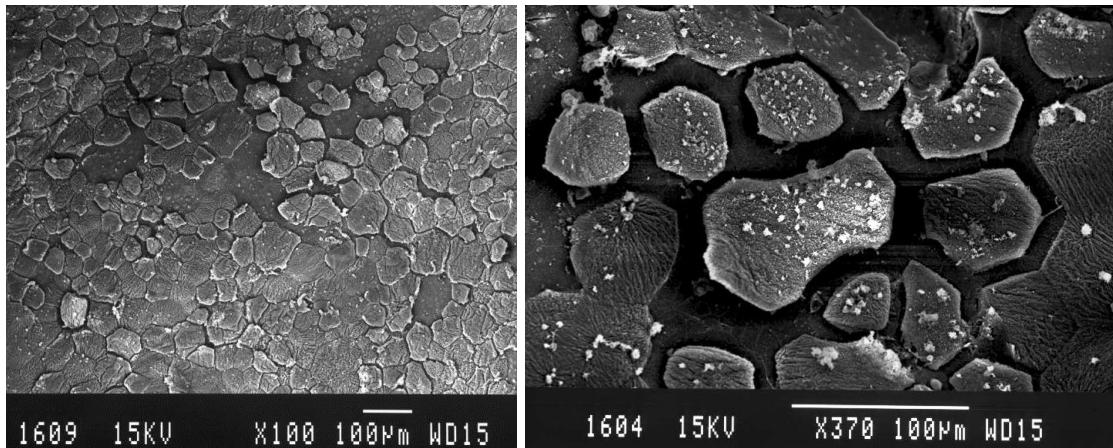


Slika 15: Levo: Neoluščena dežnikasta celica (A), manj diferencirane vmesne celice (B) in oluščena vmesna celica, vidijo se bazalne celice (C). (1300x povečava) Desno: Skoraj popolnoma oluščena prva plast urotelija z posameznimi neoluščenimi dežnikastimi celicami (130x povečava)

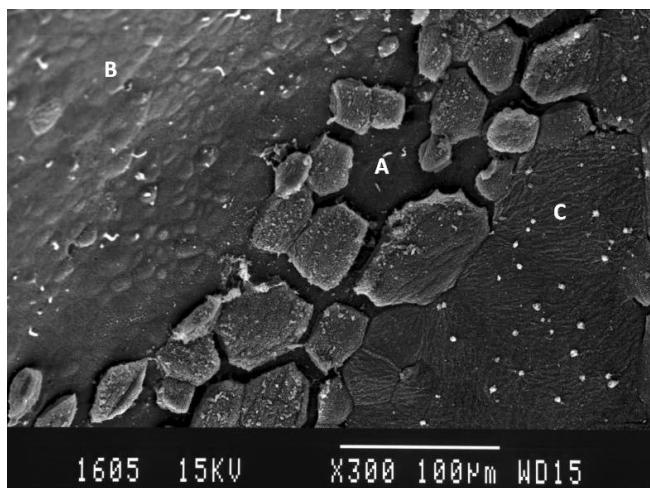


Slika 16: Neoluščene dežnikaste celice (A) in plast vmesnih manj diferenciranih celic, ki se navadno nahajajo pod oluščenimi dežnikastimi celicami (B). Levo: 1000x povečava; Desno: 800X povečava

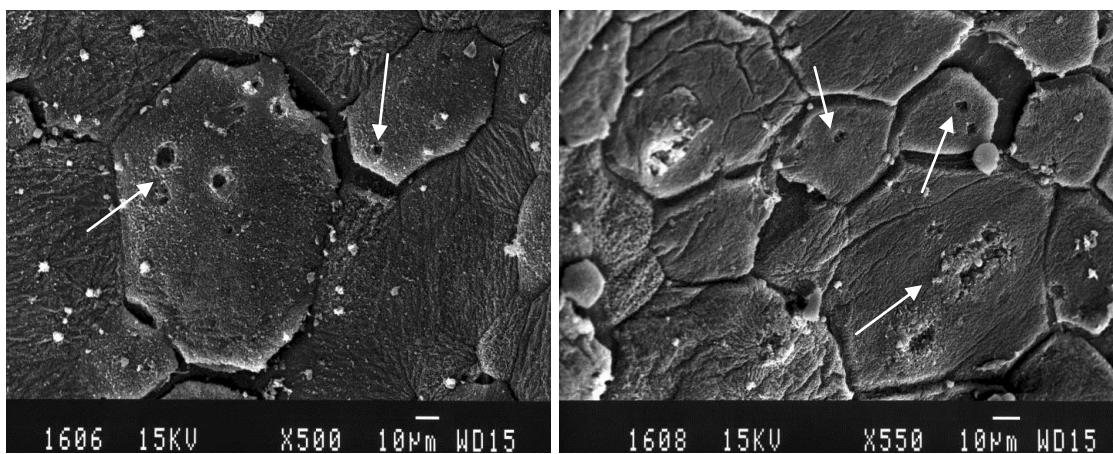
Po aplikaciji disperzije hitosana



Slika 17: Začetek luščenja dežnikastih celic, značilen vzorec satovja. Levo:100x povečava; Desno: 370x povečava



Slika 18: Meja luščenja(A), vmesne celice (B) in neoluščene dežnikaste celice(C). (300x povečava)



Slika 18: Začetek nekroze dežnikastih celic, s poškodbo plazmaleme (označeno s puščicami). Levo: 500x povečava; Desno: 550x povečava

5 Razprava

S hitosanom je bilo na Fakulteti za farmacijo, Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko opravljenih že precej študij. Proučevali so njegov vpliv na permeabilnost epitelija tkiv za različne učinkovine, odkrivali so vplive raznih dejavnikov (čas izpostavljenosti, koncentracija polimera, dodatek kalcija) na njegovo delovanje, uporabljali so ga v različnih farmacevtskih oblikah. Izvajali so tudi študije s fluorescenčno označenim hitosanom, ki omogoča bolj enostavno vrednotenje porazdeljevanja hitosana po tkivu, z uporabo fluorescenčnega mikroskopa.

Osnovni namen naše raziskovalne naloge pa je bila priprava mukoadhezivnih mikrosfer s hitosanom za intravezikalno terapijo hujših infekcij sečnega mehurja, ki jih s sistemsko aplikacijo kemoterapevtikov ne uspemo pozdraviti. Kombinacija hitosana in fluorokinolonskega kemoterapevtika v mikrosferah deluje sinergistično pri zdravljenju uroinfektov. Hitosan že sam deluje protibakterijsko, poleg tega lahko z luščenjem površinskih urotelijskih celic odstrani inficirane celice ter hkrati poveča permeabilnost tkiva za sočasno aplicirano učinkovino. Tako v tkivo prodre več učinkovine, tudi v inficirane celice, ki ležijo globlje v steni sečnega mehurja. Poskušali smo optimizirati sam postopek priprave mikrosfer z metodo odparevanja topila in njihove lastnosti (velikost ter sposobnosti suspendiranja in nabrekanja mikrosfer, vsebnost in sproščanje učinkovine iz mikrosfer). Priredili smo recepturo in ugotavljali razlike med uporabo Eudragita® RS oz. RL in dodatkom Mg-stearata. Po vrednotenju mikrosfer smo izbrali optimalno serijo mikrosfer s katero smo nadaljevali poskuse. Ugotavljali smo vpliv hitosana v disperziji in vgrajenega v mikrosfere na TEER sečnega mehurja podgan. Prav tako pa smo na živem modelu miši, preko katetra v sečni mehur aplicirali disperzijo hitosana ali suspenzijo mikrosfer z ekvivalentno količino hitosana in površino urotelija opazovali z elektronsko vrstično mikroskopijo.

5.1 Izdelava in vrednotenje mikrosfer

Najprej smo izdelali testne vzorce, ki so se razlikovali glede količine in vrste uporabljenega Eudragita®, prisotnosti in vsebnosti Mg-stearata, uporabljene zdravilne učinkovine in količine acetona, ki je služil kot notranja faza. Nato smo preračunali izkoristke postopka, ki so se gibali med 74% in 99% (preglednica IV). Tako smo izločili Serijo D, pri kateri je bil izkoristek le

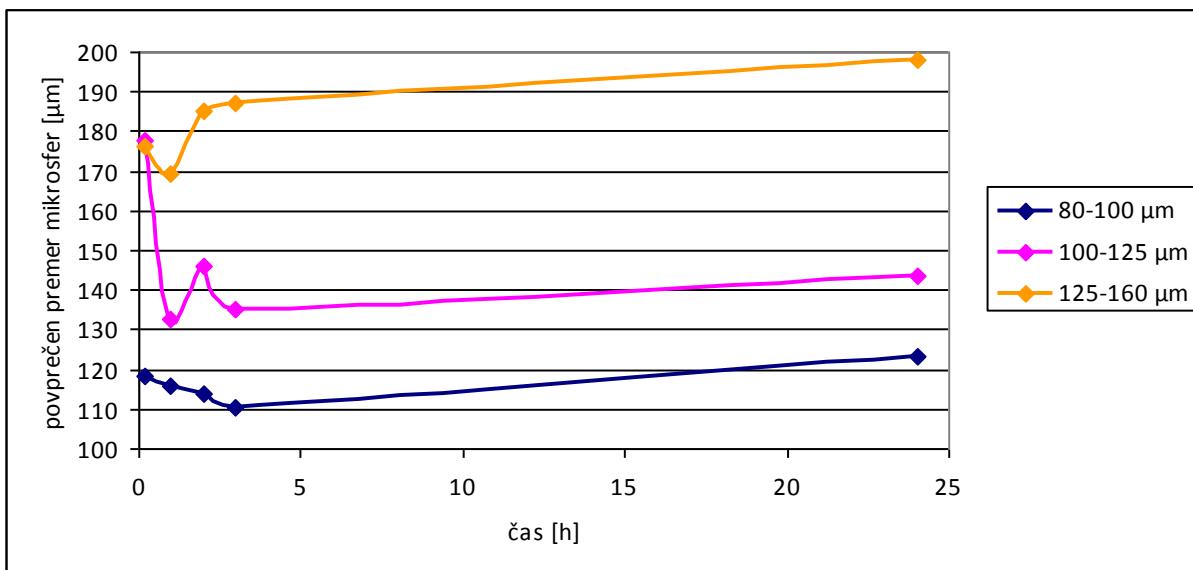
74%. Zaradi manjšega volumna acetona je bila homogenizirana zmes pregosta in je ni bilo mogoče kvantitativno prenesti v ohlajen parafin. Izvedli smo tudi sejalne analize ter ugotavljali delež uporabne frakcije mikrosfer in sicer med $80\mu\text{m}$ in $200\mu\text{m}$. Ta je v odstotkih pri ostalih serijah predstavljal od 51% do 68%. Velikost uporabne frakcije smo izbrali glede na notranji premer katetra, ki se uporablja pri intravezikalni aplikaciji v odrasle miši in meri $280\mu\text{m}$. Najvišji delež uporabnih frakcij je bil pri Seriji B, kjer smo uporabili 0,1g Mg-stearata. Prav tako smo ugotovili, da med ostalimi serijami ni večjih razlik, tako v izkoristku postopka, kot v deležu uporabnih frakcij (preglednica IV).

Nato smo določili štiri različne recepture za nadaljnje serije mikrosfer. V prvi seriji smo uporabili Eudragit® RL, zmesi smo dodali tudi 0,1g Mg-stearata, v drugi smo prav tako uporabili Eudragit® RL, brez Mg-stearata, v tretji seriji smo namesto RL uporabili Eudragit® RS, v četrti pa smo uporabili kombinacijo Eudragita® RL in RS (preglednica III).

Izkoristek postopka se je v teh povprečju gibal med 85% in 93%, delež uporabne frakcije pa med 58% in 61%. Računali smo tudi povprečni premer mikrosfer posamezne serije, ki je bil med 138 in $167\mu\text{m}$ (preglednica V). S statistično analizo smo ugotovili, da s 5% tveganjem med serijami ni značilnih razlik v deležu uporabne frakcije in v povprečnem premeru mikrosfer v posameznih frakcijah (preglednica VI, VII).

Naslednji test je bilo gravimetrično določanje količine flotiranih in sedimentiranih mikrosfer, s katerim smo določevali njihovo sposobnost suspendiranja. Izvedli smo dva poskusa. V prvem smo 50 mg mikrosfer suspendirali v 5 mL PBS 6. Dobljeni rezultati so pokazali večji delež flotiranih mikrosfer, vendar pa sta bila standardna deviacija in koeficient variacije precej velika, kar kaže na slabo ponovljivost meritev (preglednica VII). Razlog je verjetno v tem, da je bila testirana količina mikrosfer prevelika in se le-te v izbranem volumnu pufra niso v celoti omočile. Nadalje smo izvedli poskus, kjer smo v 5 mL PBS 6 suspendirali 25 mg mikrosfer. V vseh serijah smo opazili večji delež sedimentiranih mikrosfer kot flotiranih mikrosfer, standardna deviacija in koeficient variacije kažeta na večjo ponovljivost poskusa (preglednica IX). Z računanjem masne bilance smo ugotovili, da med samim postopkom gravimetričnega določanja nekje prihaja do izgub. Pri nadaljnjih poskusih smo ugotovili, da so te izgube najverjetneje posledica hitrega sproščanja učinkovine iz mikrosfer.

Pod optičnim mikroskopom smo opazovali nabrekanje mikrosfer v PBS 6 v odvisnosti od časa. Poskus smo izvedli na Seriji 1, paralelki C. V različnih časovnih točkah smo s kamero posneli sliko mikrosfer v vidnem polju in izmerili premere delcev. Izračunali smo povprečne premere in mediano posamezne frakcije v različnih časovnih točkah. Trend spremenjanja premera mikrosfer smo prikazali v grafu 3. Pri vseh frakcijah je bilo opazno začetno zmanjšanje premera in njegovo povečevanje od 3. do 24. ure. Zaradi majhnega števila ponovitev in naključne izbire vidnega polja za merjenje premera, rezultati niso najbolj zanesljivi. Prav tako pa je postopek precej zamuden, zato smo se odločili, da bomo nabrekanje opazovali z drugo metodo in sicer preko vrednotenja velikosti delcev z analizatorjem Mastersizer.

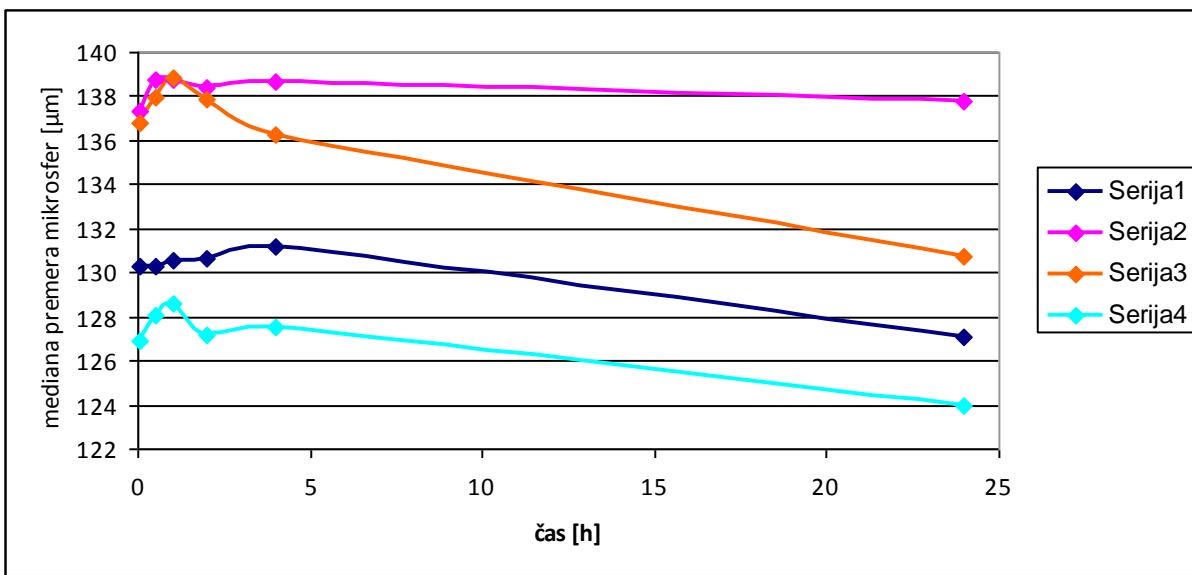


Graf 3: Nabrekanje različnih frakcij mikrosfer Serije 1, paralelki C v PBS 6 opazovanih pod optičnim mikroskopom s kamero.

Za potrebe meritev z Mastersizerjem smo morali določiti približno gostoto mikrosfer. Določali smo jo prvi seriji mikrosfer z uporabo piknometra z znanim volumnom in heksana z znanostoto. Gostote so se gibale med 0,70 kg/L in 1,03 kg/L, pri čemer smo opazili precejšnje variiranje rezultatov. Vzrok za velike razlike v gostoti bi lahko bili ujeti zračni mehurčki ali nehomogenost začetne suspenzije za mikrokapsuliranje. Iz izračunanih gostot smo določili povprečno gostoto mikrosfer, ki je bila 0,89 kg/L (preglednica X).

Z uporabo aparature Mastersizer smo dobili vrednosti mediane, prvega in zadnjega decila premera mikrosfer. Aparatura je vzorčila 1000 delcev. Opazovali smo spremembe v mediani

premera med začetno časovno točko in po 24 urah. V poskusih nismo vrednotili premera posameznih frakcij MS, temveč povprečen premer celotne uporabne frakcije. Rezultati so predstavljeni z grafom 4. Največje spremembe so bile opazne v Seriji 3, mediana premera mikrosfer se je v 24 urah zmanjšala za 4,4 %, najmanjše pa v Seriji 2, kjer se je premer povečal za 0,3 %. Največja mediana premera mikrosfer po nabrekanju je bila pri Seriji 2, najmanjša pa pri Seriji 4, vendar med njima ni velikih razlik (ne več kot 15 μm) (preglednica XII). V celotnem poskusu sta se prepletala dva procesa nabrekanje in raztpljanje mikrosfer, kar lahko vidimo v začetnem trendu naraščanja, kjer prevladuje nabrekanje polimerov v mikrosferah, in v padanju mediane premera proti zadnji časovni točki, ko prevlada raztpljanje mikrosfer. Rezultati se ne ujemajo s tistimi z merjenjem premera pod mikroskopom, vendar pa so vrednosti določene z analizatorjem velikosti delcev zaradi velikega vzorca bolj točne. Poskus je bil pomemben z vidika intravezikalne aplikacije mikrosfer, saj bi ob prevelikem nabrekanju mikrosfere lahko zamašile kateter, ki se uporablja ob aplikaciji. Prav tako pa bi med izločanjem seča preveč nabrekle mikrosfere lahko zamašile samo sečnico. Spremembe v premeru med poskusom so majhne in tako samo nabrekanje ne predstavlja tveganja zamašitve sečnice ali katetra.

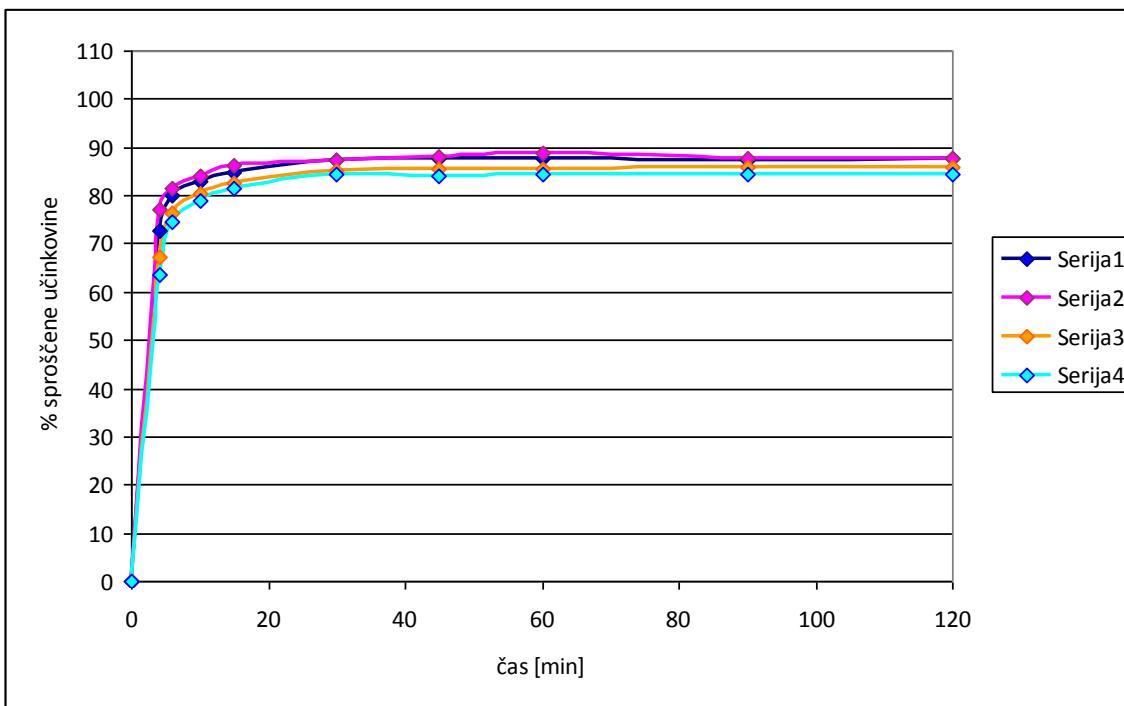


Graf 4: Spreminjanje mediane premera mikrosfer Serij 1-4 v PBS 6 v različnih časovnih točkah.

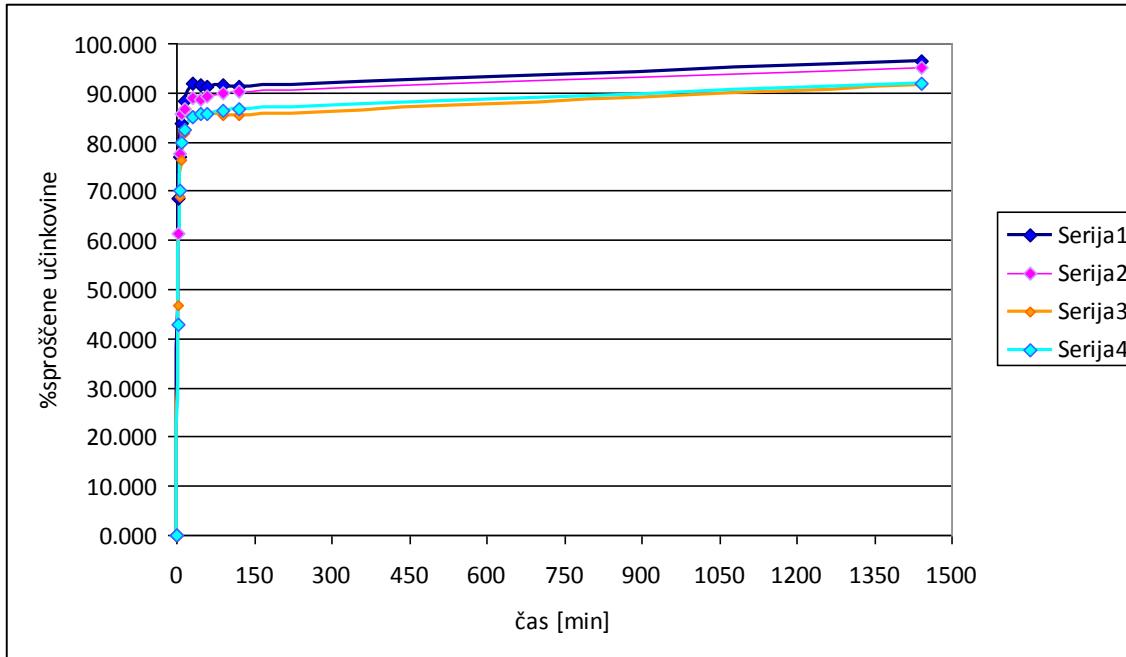
Vsebnost in delež ciprofloksacina smo določali v 0,01M HCl, z uporabo umeritvene premice (graf 1). Delež je variiral od 21% do 22%. Izračunana vsebnost pa je bila med 112% in 128%.

Ugotovili smo, da večjih razlik med posameznimi serijami ni (preglednica XIII). Vzroke za vsebnost učinkovine večjo od 100%, so ugotavljali pri vplivu procesnih pogojev na lastnosti mikrosfer. Razložili so jih z dejstvom, da med pripravljanjem mikrosfer učinkovina difundira iz notranje v zunanjo fazo. Ker se v zunanjo fazo izgublja tudi Mg-stearat in druge sestavine, je lahko dejanska vsebnost učinkovine večja od teoretične.⁽⁴⁰⁾

Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer smo spremljali po metodi USP XXIII. Koncentracije smo izračunali na podlagi umeritvene krivulje koncentracij ciprofloksacina v PBS. Uporabili smo uporabno frakcijo posameznih serij. Po 10 minutah se je pri vseh serijah iz mikrosfer sprostilo več kot 80% učinkovine. Po dveh urah se je iz njih sprostilo 86-87% učinkovine. Zanimalo nas je tudi, koliko ciprofloksacina se sprosti iz mikrosfer po 24 urah. Največ (96%) se ga sprosti iz mikrosfer Serije 1, najmanj (92%) pa iz mikrosfer Serije 3. Izid obeh poskusov je prikazan v grafu 5 in 6. V prvih 30 minutah se učinkovina hitro sprosti, potem se sproščanje upočasni. Iz vidika intravezikalne terapije bi sicer želeli, počasnejše in bolj enakomerno sproščanje, saj bi tako zagotovili terapevtske koncentracije učinkovine v mehurju skozi daljše časovno obdobje.



Graf 5: Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer v PBS 6. Na grafu so krivulje povprečnih vrednosti % sproščene učinkovine za posamezno serijo.



Graf 6: **Sproščanje ciproflokssacina iz mikrosfer v PBS 6 v 24 urah.** Na grafu so krivulje povprečnih vrednosti % sproščene učinkovine za posamezno serijo.

S tem poskusom smo našli odgovor o izgubah pri računanju masne bilance, ko smo določevali deleže flotiranih in sedimentiranih mikrosfer. V 10 minutah se iz mikrosfer sprosti večina učinkovine, kar se pozna na masi.

Pri vrednotenju mikrosfer smo ugotovili, da se posamezne serije med seboj bistveno ne razlikujejo. Za nadaljnje poskuse smo izbrali Serijo 1, ki je vsebovala tudi stabilizator Mg-stearat.

Ko smo mikrosfere opazovali pod vrstičnim elektronskim mikroskopom smo ugotovili, da so različnih oblik. Od okroglih in ovalnih do tistih, ki so povsem nepravilnih oblik. Površina mikrosfer je na pogled precej porozna in je pri podolgovatih mikrosferah prekrita s paličastimi kristali, ki bi lahko predstavljalci ciproflokssacina. Tako poroznost, kot porazdeljevanje ciproflokssacina po površini mikrosfer sta lahko razlog za hitro sproščanje učinkovine iz mikrosfer v PBS 6, ki smo ga opazovali po metodi USP XXIII. Da bi lahko potrdili, da so paličasti kristali na površini mikrosfer res ciproflokssacini, bi pod vrstičnim elektronskim mikroskopom morali opazovati še sam ciproflokssacini. Opazili smo tudi nekaj mikrosfer, ki so bile votle. Najverjetneje je nekaj mikrosfer votlih zaradi ujetih zračnih mehurčkov med

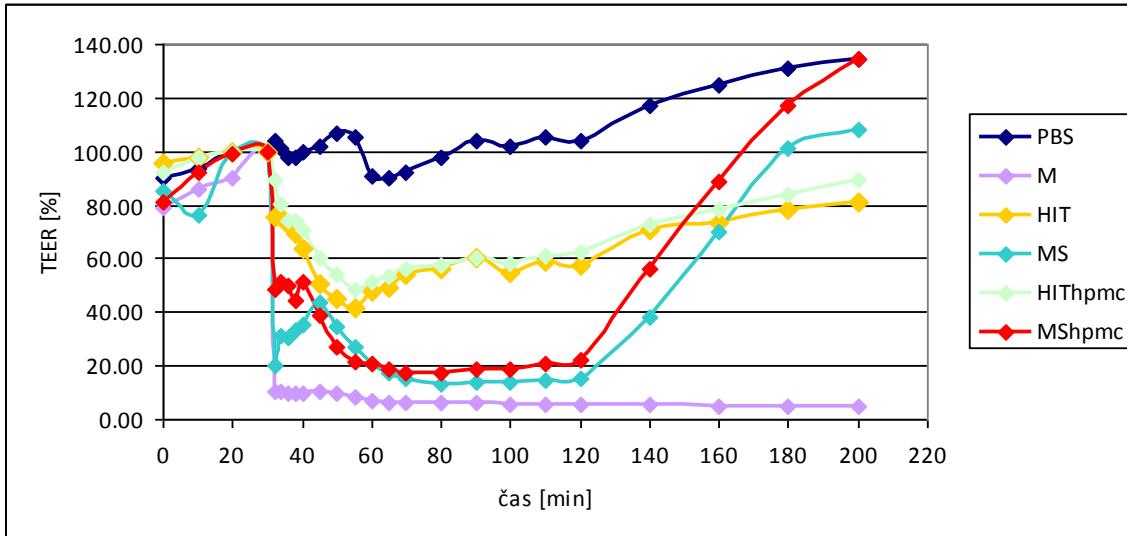
postopkom izdelave mikrosfer. To je lahko tudi razlog za variabilnost gostote in deležev flotiranih oziroma sedimentiranih mikrosfer, kar pa je odvisno od tega, kolikšen delež mikrosfer v seriji je votlih.

5.2 Vpliv mikrosfer na vrednotenje TEER podganjega mehurja

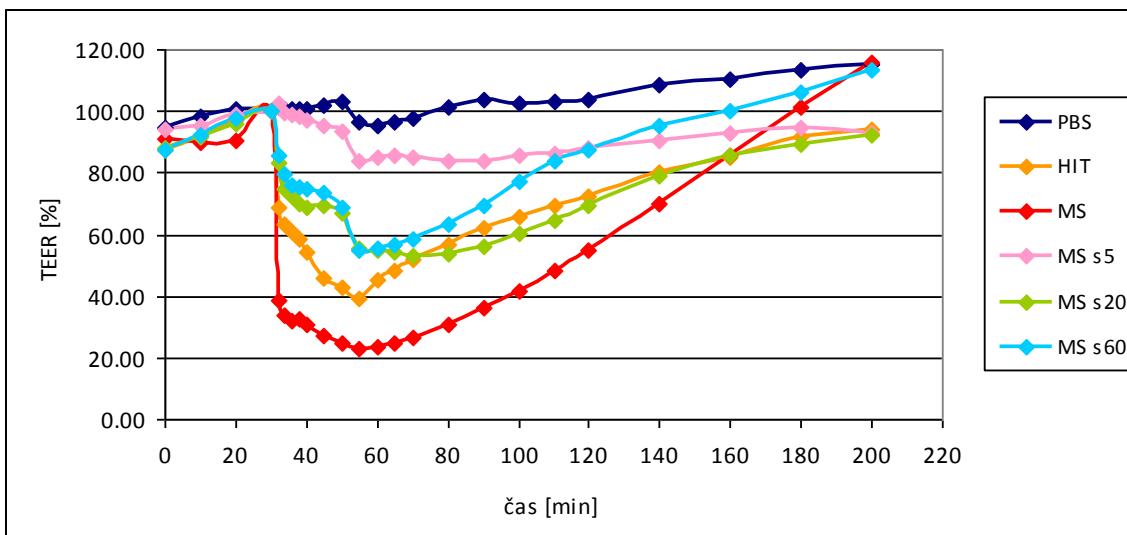
Merjenje sprememb v transepiteljski električni upornosti tkiva je ena najbolj občutljivih metod za merjenje prepustnosti tkiva za ione. Urotelij ima v primerjavi z drugimi epiteliji visoko vrednost TEER, ki jo omogočajo plast GAG, tesni stiki in epitelijske celice z membranskimi plaki. Hitosan z luščenjem površinskih dežnikastih celic urotelija odstrani permeabilnostno bariero in tako poveča permeabilnost za učinkovine in zmanjša TEER.⁽²⁾

V prvi seriji poskusov je bila sluznica sečnega mehurja izpostavljena vzorcem 20 min. Ugotavljali smo spreminjanje TEER sečnega mehurja, medtem ko je bila sluznica v stiku z vzorci in v fazi regeneracije. Želeli smo preprečiti, da mikrosfere v PBS 6 kljub starnem kroženju medija v pretočnih celicah zaradi sedimentacije ne bi prišle v stik s tkivom in bi zaradi tega imele nanj manjši učinek, saj je za delovanje pomembna mukoadhezija mikrosfer na sluznico. Zato smo povečali viskoznost medija s HPMC, s tem bi upočasnili posedanje mikrosfer. Primerjali smo disperzijo hitosana in suspenzijo mikrosfer ob prisotnosti HPMC in brez nje. Iz grafa 7 lahko razberemo, da med posameznimi vzorci ni opaziti večjih razlik v TEER. Iz tega lahko sklepamo, da povečanje viskoznosti medija na donorski strani pretočnih celic ne vpliva na sam vpliv mikrosfer na permeabilnost tkiva.

V enem od poskusov smo ob menjavi medija direktno na sluznico mehurja nanesli suhe mikrosfere in nato pretočno celico na donorski strani napolnili s PBS 6. Ob merjenju TEER smo ugotovili, da se upornost zmanjša bolj, kot pri ostalih vzorcih, prav tako pa kasneje ni opazne regeneracije. Verjetno je ob direktnem nanosu mikrosfer na tkivo prišlo do prevelikih poškodb, da bi se bilo le-to v opazovanem času sposobno regenerirati.



Graf 7: Spreminjanje relativne vrednosti TEER [%] sečnega mehurja podgane po prvem poskusu ob 20 minutnem direktnem stiku sluznice z mikrosferami (M), z disperzijo hitosana (HIT), suspenzijo mikrosfer (MS), disperzijo hitosana v 0,2% HPMC (HIT_{hpmc}) ter suspenzijo mikrosfer v 0,2% HPMC (MS_{hpmc}). PBS smo uporabili kot kontrolo.

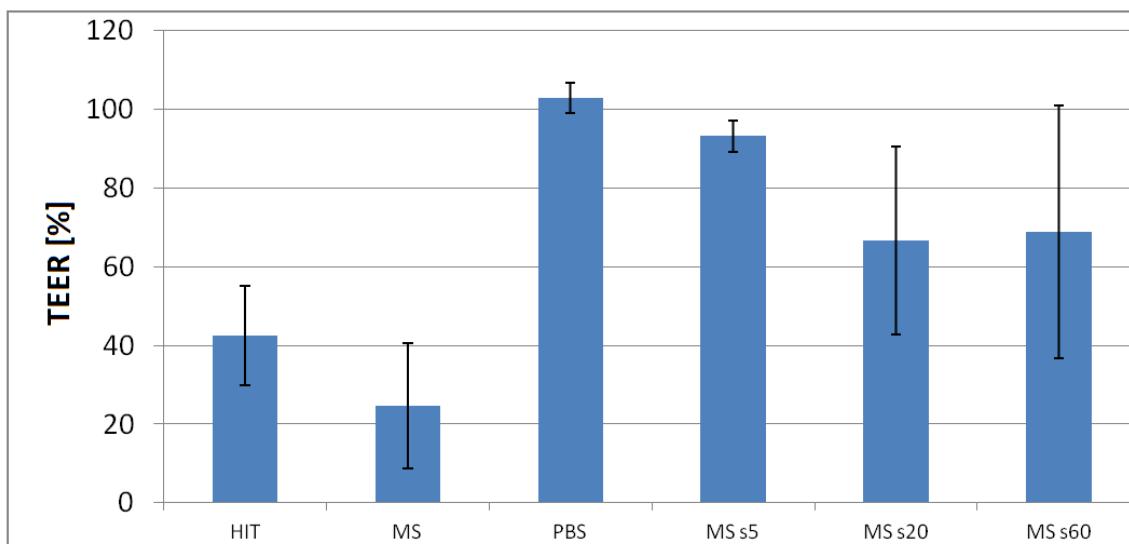


Graf 8: Spreminjanje relativne vrednosti TEER [%] sečnega mehurja podgane ob stiku sluznice z vzorci. V grafu so podane povprečne vrednosti za vse vzorce (PBS 6, disperzija hitosana (HIT), mikrosfer (MS) in supernatanti (MS s5, MS s20, MS s60)), ko jim je bila sluznica izpostavljena 20 min.

Spreminjanje povprečnih relativnih vrednosti TEER v % pod vplivom PBS 6, disperzije hitosana, mikrosfer in supernatantov je prikazan v grafu 8. PBS 6 smo uporabili kot kontrolo postopka, vsi ostali vzorci pa kažejo statistično značilno znižanje TEER po 20 minutah stika tkiva z vzorcem. Pri supernatantu, kjer so bile mikrosfere suspendirane 5 min so značilne

razlike med točko pred aplikacijo vzorca in končno točko regeneracije, zaradi tega popolne regeneracije ne moremo potrditi. Pri vseh ostalih vzorcih je regeneracija potekla do konca. Pri disperziji hitosana in suspenziji mikrosfer so značilne tudi spremembe med začetkom in koncem regeneracije (preglednica XIX).

Ugotovili smo značilne razlike v TEER med vzorci pri 50min (pred začetkom regeneracije), medtem ko pri 200min (končna točka poskusa) razlike niso bile značilne (preglednica XX). Na grafu 9 so prikazana povprečja in SD za posamezne vzorce v časovni točki 50 min. Opazimo lahko značilne razlike med kontrolnim vzorcem (PBS 6) in vsemi ostalimi vzorci.

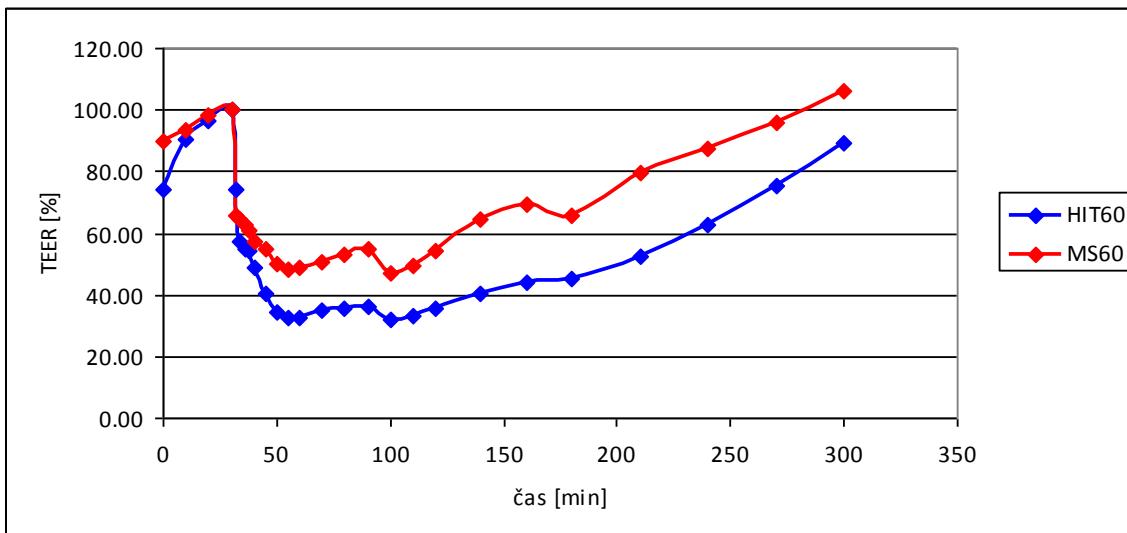


Graf 9: **Povprečne vrednosti TEER sečnega mehurja v % v časovni točki 50min** (po koncu 20-minutne izpostavljenosti tkiva posameznim vzorcem, pred začetkom regeneracije) in njihove standardne deviacije.

Razlik med disperzijo hitosana in suspenzijo mikrosfer nismo mogli dokazati. Pokazale so se značilne razlike med disperzijo hitosana in supernatantom MS s5. Prav tako se od suspenzije mikrosfer pomembno razlikujejo vsi trije supernatanti. S tem smo dokazali, da je učinek mikrosfer odvisen predvsem od delovanja hitosana, ki je vezan v mikrosferah, in ne prostega hitosana, ki se je iz mikrosfer že sprostil. Variabilnost izmerjenih TEER pri posameznem vzorcu v določenih časovnih točkah je bila precej visoka in jo verjetno lahko pripisemo predvsem biološki variabilnosti.

Zanimalo nas je, kako se obnaša sečni mehur, če je disperziji hitosana ali suspenziji mikrosfer izpostavljen daljši čas (1h). Potek spremenjanja povprečnih relativnih vrednosti TEER v % je

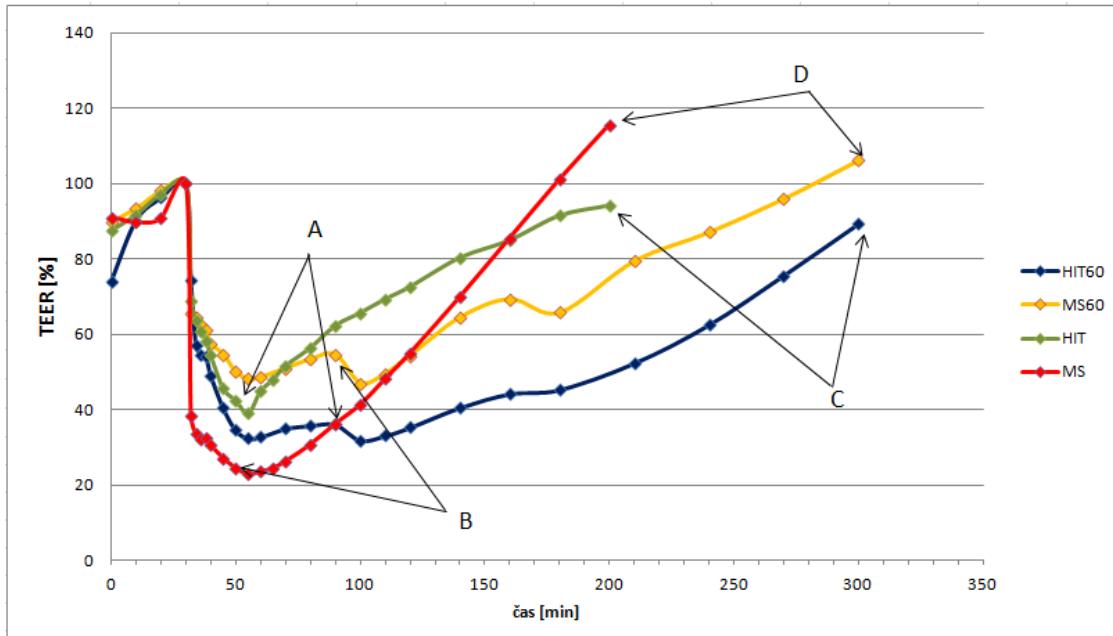
prikazan na grafu 10. Tako pri disperziji, kot pri suspenziji smo ugotovili značilne razlike med začetno (30min) in končno točko (90min) izpostavljenosti sluznice vzorcu. Med točko pred aplikacijo vzorca in končno točko poskusa razlik ne moremo potrditi, kar kaže, da pride v obeh primerih do popolne regeneracije tkiva (preglednica XXII).



Graf 10: Spreminjanje relativne vrednosti TEER [%] sečnega mehurja podgane ob stiku sluznice z vzorcem. V grafu so podane povprečne vrednosti za disperzijo hitosana (HIT_{60}) in suspenzijo mikrosfer (MS_{60}) ko jima je bila sluznica izpostavljena 60 min.

Ugotavljali smo tudi razlike med vzorcema v dveh časovnih točkah, pred začetkom regeneracije in v zadnji točki poskusa (90min in 300min). O statistično pomembnih razlikah o delovanju ne moremo sklepati v končni točki poskusa, kar kaže, da po odstranitvi vzorcev ni razlik v regeneraciji tkiva. Po eno urni izpostavljenosti vzorcu pa smo zaznali signifikantne spremembe glede na to ali je bila sluznica v stiku z disperzijo hitosana ali suspenzijo mikrosfer (preglednica XXIII).

Hoteli smo ugotoviti, če so prisotne razlike v TEER sečnega mehurja, če primerjamo točki, kjer smo odstranili vzorec in ga zamenjali za PBS 6 (A in B), ter končni točki poskusa (C in D), po tem, ko je bilo tkivo vzorcema (HIT in MS) izpostavljeno 20 oz. 60min. Krivulja povprečnih vrednosti TEER in obravnavane točke so predstavljene na grafu 11. Ugotovili smo, da v končni točki poskusa (točki C in točki D) razlik ni bilo, kar pomeni, da je regeneracija v obeh primerih potekla do konca, tako po izpostavljenosti suspenziji mikrosfer kot disperziji hitosana. Odkrili pa smo statistično značilne razlike v TEER po stiku z suspenzijo mikrosfer tik preden smo vzorec zamenjali za PBS 6 (točki B) (preglednica XXIV).



Graf 11: Spreminjanje relativne vrednosti TEER [%] sečnega mehurja podgane ob stiku sluznice z vzorci. V grafu so podane povprečne vrednosti disperzije hitosana (HIT in HIT₆₀) in suspenzije mikrosfer (MS in MS₆₀), ter točke, ki smo jih primerjali. A=po 20 oz. 60 minutni izpostavljenosti disperziji hitosana; B= po 20 oz. 60 minutni izpostavljenosti suspenziji mikrosfer; C=končna točka poskusa po 20 oz. 60 minutni izpostavljenosti disperziji hitosana; D= končna točka poskusa po 20 oz. 60 minutni izpostavljenosti suspenziji mikrosfer.

5.3 Vpliv mikrosfer na morfologijo sečnega mehurja miši

Disperzija hitosana

Ko je bila sluznica sečnega mehurja miši 20 min v stiku z disperzijo hitosana, smo jo opazovali pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. Opazili smo začetek luščenja heksagonalnih dežnikastih celic v vzorcu satovja. Ločevanje dežnikastih celic se prične ob robu celice, celica se skrči in pod njo se pokažejo spodne manj diferencirane vmesne celice. Prisotna je bila tudi nekroza, ki se začne s poškodovano plazmalemo. Prav tako smo poleg nediferenciranih vmesnih celic opazili diferenciacijo v mlade dežnikaste celice z značilno nazobčano površino in starejše dežnikaste celice z mikrovili. Rezultati se ujemajo z že opravljenimi študijami⁽²⁹⁾ vpliva disperzije hitosana na urotelij.

Suspenzija mikrosfer

Pri opazovanju sluznice sečnega mehurja miši po 20 minutnem izpostavljanju suspenziji mikrosfer z ekvivalentno količino hitosana kot pri disperziji hitosana, smo z uporabo

vrstičnega elektronskega mikroskopa opazili izrazito luščenje površinskih dežnikastih celic urotelija, vendar je to neenakomerno. Na delih sluznice so bile vidne spremembe celo v globini, na vmesnih celicah, prav tako pa so bili predeli sluznice povsem nespremenjeni. Opaznih je bilo nekaj okroglih apoptotskih celic, nekroza ni bila vidna.

Hitosan v primeru mikrosfer deluje globlje v tkivu, odstrani veliko celic bi tako lahko odstranil tudi več inficiranih celic ter bi hkrati omogočil delovanje ciprofloksacina tudi na bakterije, ki so se namnožile bolj v notranosti stene sečnega mehurja. Ko se mikrosfere zaradi mukoadhezivnih lastnosti hitosana vežejo z mukusom, je koncentracija hitosana lokalno precej visoka. Tako se pojavi vprašanje, če je za neenakomerno luščenje razlog v sedimentiranju mikrosfer na distalnem delu mehurja (ko miš po aplikaciji mikrosfer leži na hrbtnu). Odgovor bi lahko dobili, če bi poskuse ponovili in bi ločeno pod SEM gledali urotelij abdominalnega ter hrbtnega dela sečnega mehurja. Problemu pa bi se lahko izognili tudi z večkratnim obračanjem uspavanih miši po aplikaciji mikrosfer.

Luščenje celic se pri obeh poskusih začne ob robu celice, kjer so tesni stiki. S tem bi lahko potrdili eno od hipotez, da hitosan deluje na tesne stike, kamor prodre in s svojo kationsko naravo spremeni fino elektrolitsko ravnotežje, kar povzroči ločevanje celic brez nekroze.⁽⁴⁸⁾. Kljub temu, da rezultati vrednotenja TEER med suspenzijo mikrosfer in disperzijo hitosana ne kažejo bistvenih razlik, pa lahko vidimo razlike v spremembji morfologije. Ker v primeru mikrosfer, hitosan deluje globlje v tkivo, bi se tako lahko odstranilo več inficiranih celic in hkrati omogočilo delovanje ciprofloksacina na bakterije, ki bi se namnožile v notranosti stene sečnega mehurja. Pojavi pa se še eno vprašanje in sicer, zakaj se vpliv disperzije hitosana na dežnikaste celice kaže tudi kot nekroza, pri suspenziji mikrosfer pa nekroze ni opaziti. Razlago bi lahko iskali v preučevanju hkratnega vpliva Eudragita, ki je prav tako prisoten v mikrosferah. Hitosan se zaradi svoje kationske narave in vodikovih ter hidrofobnih interakcij poveže z negativno nabitimi mucini na površju urotelija.⁽²⁴⁾ Raziskati bi bilo potrebno, če Eudragit, ki je prav tako kation, vpliva na te povezave in tako deluje protektivno.

Tako so potrebne še dodatne raziskave: vpliv Eudragita, obračanje miši po aplikaciji vzorca oz. selektivno opazovanje urotelija hrbtnega in trebušnega dela sečnega mehurja. Prav tako pa bi bilo v nadaljevanju potrebno optimizirati sproščanje vgrajene učinkovine iz mikrosfer, da bi zagotovili čim daljše delovanje.

6 Sklep

Glede na rezultate eksperimentalnega dela, njihovo obdelavo in statistično analizo smo prišli do naslednjih ugotovitev in zaključkov:

- Med posameznimi serijami mikrosfer ni bistvenih razlik v izkoristku postopka, velikosti mikrosfer, njihovi sposobnosti sedimentacije ter nabrekanja, in v vsebnosti in sproščanju učinkovine iz mikrosfer.
- Za nadaljnje analize smo uporabili serijo mikrosfer, ki je vsebovala tudi magnezijev stearat, ki služi kot stabilizator.
- Ciprofloksacin se v 80% sprosti iz mikrosfer v prvih desetih minutah poskusa. Vzrok je lahko v poroznosti mikrosfer in prisotnosti učinkovine na površini mikrosfer.
- V primeru 20-minutne izpostavitev tkiva hitosanu ni značilnih razlik v TEER sečnega mehurja podgan med suspenzijo mikrosfer in disperzijo hitosana. Po 60 minutni izpostavitvi tkiva hitosanu pa se TEER sečnega mehurja pri stiku s suspenzijo mikrosfer statistično manj zmanjša, kot pri stiku z disperzijo hitosana. Za vpliv mikrosfer na TEER je odgovoren predvsem hitosan, ki je še vezan v ogrodje mikrosfer in ne sproščen, prosti hitosan.
- Pod vplivom hitosana iz mikrosfer in disperzije hitosana se začnejo luščiti površinske urotelijske celice. Po stiku tkiva s hitosanom iz mikrosfer je luščenje izrazito, a neenakomerno. Na delih sluznice je bil opazen vpliv celo na vmesne celice. Pri delovanju disperzije hitosana na luščenje dežnikastih celic opazimo značilen vzorec satovja, luščenje je enakomerno po celotni površini urotelija, a je opaznih manj predelov, kjer so celice popolnoma odluščene, na nekaterih celicah je prisotna tudi nekroza.

7 Literatura

- 1) Podobnik B: Povečanje permeabilnosti stene sečnega mehurja prašiča s hitosanom in vpliv kalcijevih ionov, Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005.
- 2) Lewis SA: Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278: F867-F874.
- 3) Bertolini: Systematishe Anatomie des Menschen, 5. izdaja, UlstenMosby GmbH & Co., Berlin, 1995, 294-296.
- 4) Kingsnorth AN, Skandalakis PN, Colborn GL, Weidman TA, Skandalakis LJ, Skandalakis JE: Embryology, anatomy, and surgical applications of the preperitoneal space. Surg Clin North Am. 2000; 80(1):1-24.
- 5) Višnjar T: Fiziološke in strukturne spremembe v urotelijskih celicah in vitro med diferenciacijo, Diplomska naloga. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2009.
- 6) Andersson KE, Arner A: Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and Pathophysiology. Physiol Rev 2004; 84: 935–986.
- 7) Birder LA: More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 289: F489–F495.
- 8) Min G, Zhou G, Schapira1 M, Sun TT, Kong XP: Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uroplakin particle. J Cell Sci 2003; 116 (20): 4087-4094
- 9) Bogataj M, Mrhar A, Korošec L: Influence of physicochemical and biological parameters on drug release from microspheres adhered on vesical and intestinal mucosa. Int J Pharm 1999; 177: 211-220.
- 10) Burjak M, Bogataj M, Velnar M, Grabnar I, Mrhar A: The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. Int J Pharm Sci 2001; 224: 123-130.
- 11) Shruti GS, Banerjee R: Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies, Review. J Control Release 2010; 148: 147-159.
- 12) Košnik M, Mravlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina. 4. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2011, 1071-1080.
- 13) Lindič J: Okužbe sečil. Krka Med Farm 2003; 24: Suppl 1: 11-62.
- 14) Head KA: Natural Approaches to Prevention and Treatment of Infections of Lower Urinary Tract. Altern Med Rev 2008; 13 (3): 227-244.

- 15) Hunstad DA, Justice SS: Intracellular Lifestyles and Immune Evasion Strategies of Uropathogenic Escherichia coli. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 203-221.
- 16) Sedmak B: Maligni tumorji mehurja. *Zdrav vestn* 2003; 72: 27-31.
- 17) Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E: Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Review. Prog Polym Sci* 2011; 36: 981-1014.
- 18) Kerec-Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. *Farm vestn* 2006; 57: 287-291.
- 19) Majeti NV, Kumar R: A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000; 46: 1-27.
- 20) Rinaudo M: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31: 603-632.
- 21) Lekka M, Laidler P, Ignacak J: The effect on stiffness and glycolytic activity of human bladder cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540: 127-136.
- 22) Naveen P, Aparna L, Uma S, Swaraj P: Design and Characterisation of Mucoadhesive Buccal Patch of Glimepride. *IJRPS* 2012; 2(1): 117-128.
- 23) Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV: Chitosan-based mucoadhesive tablets for oral delivery of ibuprofen. *Int J Pharm* 2012; 436 (1-2): 602–610.
- 24) Kotzé AF, de Leeuw BJ, Lueßen HL, de Boer AG, Verhofer JC, Juninger HE: Chitosans for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci* 1998; 7: 145-151.
- 25) Schipper NGM, Vårum KM, Arturson P: Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res* 1996; 13 (11): 1686-1692.
- 26) Artursson P, Lindmark T, Davis SS, Illum L: Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1994, 11(9): 1358-1361.
- 27) Kerec M, Bogataj M, Veranič P, Mrhar A: Permeability of pig urinary bladder wall: the effect of chitosan and the role of calcium. *Eur J Pharm* 2005; 25: 113-121.
- 28) 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.

- 29) Kerec Kos M, Bogataj M, Veranič P, Mrhar A: Permeability of Pig Urinary Bladder Wall: Time and Concentration Dependent Effect of Chitosan. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(8):1685-1691.
- 30) Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Gibin S, Caramella C: Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery. Evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. *Eur J Pharm Sci* 2008; 33: 166-176.
- 31) Aspden TJ, Illum L, Skaugrud Ø: Chitosan as a nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *Eur J Pharm Sci* 1996; 4: 23-31.
- 32) Şenel S, Hincal AA: Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *J Control Rel* 2001; 72: 133-144.
- 33) Zambito Y, Zaino C, Di Colo G: Effects of N-trimethylchitosan on transcellular and paracellular transcorneal drug transport. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 64: 16-25.
- 34) Blondeau JM: Fluoroquinolones: mechanism of action, classification and development of resistance. *Surv Ophthalmol* 2004; 49 (2): S73-S78.
- 35) Smpc: Ciloxan, 3 CILOXAN 3 mg/mL kapljice za oko, raztopina(SA Alcon-Couvreur NV, Belgija); Baza podatkov o zdravilih. <http://www.zdravila.net>. Dostopano: 5-6-2012.
- 36) Mizuki Y, Iwao Fujiwara I, Yamaguchi T: Pharmacokinetic interactions related to the chemical structures of fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 41-55.
- 37) Smpc: Ciprinol filmsko obložene tablete (KRKA, tovarna zdravil, Slovenija); Baza podatkov o zdravilih. <http://www.zdravila.net>. Dostopano: 5-6-2012.
- 38) Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani: Vaje iz farmacevtske tehnologije 2. 2002.
- 39) Mateović -Rojnik T, Frlan R, Bogataj M, Bukovec P, Mrhar A: Effect of Preparation Temperature in Solvent Evaporation Process on Eudragit RS Microsphere Properties. *Chem Pharm Bull*, 2005; 53(1): 143-146.
- 40) Mateović T, Kriznar B, Bogataj M, Mrhar A: The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS Microspheres. *J Microencapsulation*, 202; 19(1): 29-36.
- 41) Križnar B, Mateović T, Bogataj M, Mrhar A: The Influence of Chitosan on in vitro Properties of Eudragit RS Microspheres. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(4): 356-364.

- 42) Burjak M, Bogataj M, Velnar M., Grabnar I., Mrhar A: The Study of Drug Release from Microspheres Adhered on Pig Vesical Mucosa. *Int J Pharm* 2001; 224: 123-130.
- 43) Burjak M: Mukoadhezivne mikrosfere za intravezikalno aplikacijo, Doktorsko delo. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Ljubljana, 2002.
- 44) Uradna spletna stran podjetja Evonik, ki je proizvajalec polimerov Eudragit: <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/sustained-release-formulations/Pages/default.aspx>. Dostopano: 17-8-2012.
- 45) Raja Sekharan T, Palanichamy S, Tamilvanan S, Shanmuganathan S, Thanga Thirupathi A: Formulation and evaluation of hydroxypropyl methylcellulose-based controlled release matrix tablets for theophylline. *Indian J Pharm Sci* 2001; 73(4): 451-456.
- 46) Ye J, Zhang H, Wu H, Wang C, Shi X, Xie J, He J, Yang J: Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012.
- 47) Uradna spletna stran podjetja Haerke group, ki je proizvajalec polimera HPMC: <http://www.harke.com/index.php?id=1420>. Dostopano: 17-8-2012.
- 48) Smith J, Wood E, Dornish M: Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharm Res* 2004; 21(1): 43-49.