

Uporaba hitosana v farmaciji

The use of chitosan in pharmacy

Mojca Kerec Kos

Povzetek Hitosan je biokompatibilen in biorazgradljiv kationski polimer, ki ga pridobivajo iz polisaharida hitina. V zadnjih letih mu posvečajo vedno več pozornosti v razvoju novih dostavnih sistemov, zlasti zaradi njegovih bioadhezivnih lastnosti ter sposobnosti pospeševanja absorpcije učinkovin skozi različne sluznice. Poleg tega naj bi hitosan znižal krvno koncentracijo holesterola in trigliceridov, deloval protimikrobno ter pospešil celjenje ran.

Ključne besede: hitosan, pospeševanje absorpcije, bioadhezija, dostavni sistemi

Abstract Chitosan is biocompatible and biodegradable cationic polymer, obtained from the polysaccharide chitin. In the last few years it is often incorporated in the novel drug delivery systems due to its bioadhesion and the ability to enhance the absorption of drugs across different mucosae. Moreover, chitosan is supposed to reduce the plasma cholesterol and triglyceride levels and to have antimicrobial and wound healing activity.

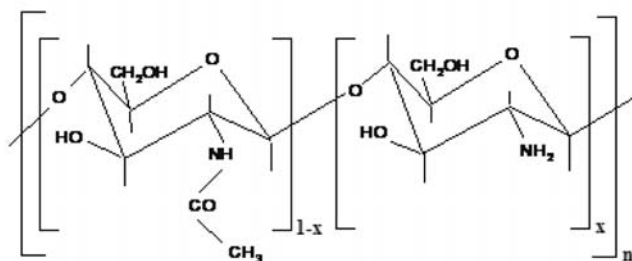
Keywords: chitosan, absorption enhancement, bioadhesion, drug delivery systems

1 Uvod

Pri razvoju novih dostavnih sistemov se vedno večja pozornost usmerja v pomožne snovi, ki lahko izboljšajo biološko uporabnost vgrajenih učinkovin. Obetavne rezultate dajejo polimeri, ki so bioadhezivni, hkrati pa imajo sposobnost povečanja permeabilnosti različnih sluznic. Takšnim zahtevam ustreza biokompatibilen ter biorazgradljiv polimer hitosan, ki hkrati izkazuje nekatere ugodne farmakološke lastnosti, ki še dodatno povečujejo uporabnost tega kationskega polimera v farmaciji (1, 2).

2 Splošne lastnosti

Hitosan je kemijsko kopolimer $\beta(1-4)$ povezanih enot glukozamina in N-acetilglukozamina. Njegova strukturna formula je prikazana na sliki 1.



Slika 1: Struktura hitosana; n = število sladkornih enot polimera, x = stopnja deacetiliranja (3).

Figure 1: Structure of chitosan; n = number of sugar units per polymer, x = degree of deacetylation (3).

Hitosan pridobivajo z delnim deacetiliranjem polimera hitina, ki je sestavljen iz N-acetilglukozaminskih enot in je za celulozo drugi najbolj razširjen polisaharid v naravi. Najdemo ga v oklepih rakov, pa tudi pri nekaterih insektih in gobah. Zaradi izredno slabe topnosti hitina v vodnih raztopinah je za industrijsko uporabo bolj primeren hitosan, vendar je tudi hitosan topen le v kisljih raztopinah, pri alkalnem in nevtralnem pH pa je netopen. Proizvajajo hitosan z različno molekulsko maso, viskoznostjo in stopnjo deacetiliranja. Na topnost v vodnih raztopinah vpliva tudi stopnja deacetiliranja – hitosan s 40 % stopnjo deacetiliranja je topen do pH 9, medtem ko je pri 85 % stopnji deacetiliranja topen samo do pH 6,5. Z anorganskimi in organskimi kislinami, kot so glutaminska, klorovodikova, mlečna in očetna kislina, tvori soli. Viskoznost disperzij hitosana narašča z nižanjem temperature, z večanjem koncentracije hitosana in z večanjem stopnje deacetiliranja (1-5).

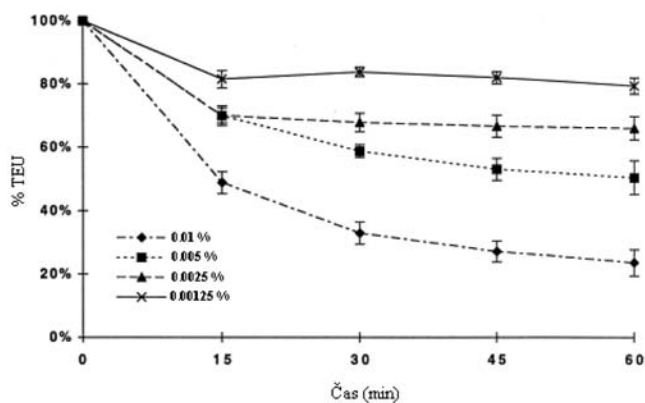
Hitosan ima majhno peroralno toksičnost, saj je LD₅₀ pri podganah 16 g/kg telesne teže. Toksičnost je odvisna od stopnje deacetiliranja, molekulske mase, čistosti hitosana ter od načina aplikacije. Za humano uporabo se priporoča le hitosan najvišje stopnje čistote (1, 6).

3 Sposobnost pospeševanja absorpcije

Hitosan učinkovito poveča permeabilnost različnih sluznic. Pri poskusnih živalih (ovce, podgane) so v prisotnosti hitosana ugotovili povečan prehod s fluorescein izotiocianatom označenega dekstrana, inzulina ter lososovega kalcitonina skozi nosno sluznico (3, 7, 8). Prav tako hitosan poveča permeabilnost bukalne sluznice za hidrokortizol, rastni faktor TGF- β ter aciklovir (9, 10). Absorpcija aciklovirja je v prisotnosti hitosana povečana tudi skozi prašičjo vaginalno sluznico (10). Hitosan spremeni tudi permeabilnostne lastnosti očesne sluznice (11) ter stene sečnega mehurja. Že 0,0005 % ut/vol

disperzija hitosana 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 (12).

Največ raziskav s hitosanom kot pospeševalcem absorpcije je narejenih na Caco-2 celicah, ki se uporabljajo kot model intestinalnega epitelijskega. Merilo za paracelularno permeabilnost Caco-2 celic je transepitelijska električna upornost. Višja kot je uporabljena koncentracija hitosana, manjša je transepitelijska električna upornost Caco-2 celic, pri čemer je učinek hitosana tudi pri nizkih koncentracijah viden že v 15 minutah (slika 2). Pri enourni izpostavljenosti je z 0,1 % ut/vol hitosanom dosežen prag delovanja tako na transepitelijsko električno upornost kot tudi na transport modelne spojine manitola skozi Caco-2 celice (13).



Slika 2: Vpliv koncentracije in časa delovanja hitosana na transepitelijsko električno upornost (TEU) Caco-2 celic (13).

Figure 2: The time and concentration dependence of the effect of chitosan on transepithelial electrical resistance (TEU) of Caco-2 cells (13).

Na pospeševanje absorpcije s hitosanom vplivata stopnja deacetiliranja ter molekulska masa polimera. Hitosani z visoko stopnjo deacetiliranja (99 in 85 %) povečajo absorpcijo ¹⁴C-manitola skozi Caco-2 monosloj pri majhnih in velikih molekulskih masah, vendar je pri teh hitosanih očitno izražena od odmerka odvisna toksičnost. Hitosani s 65 in 51 % stopnjo deacetiliranja so manj toksični, učinkoviti pa so le pri večjih molekulskih masah (14).

Učinek hitosana je odvisen tudi od prisotnosti mukusa na površini epitelijskih celic. Hitosan v večji meri pospeši absorpcijo manitola skozi Caco-2 celice, ki niso pokrite z mukusom, kot skozi intestinalne epitelijske celice HT29-H, ki so pokrite s 40-60 μm debelo plastjo mukusa. V primeru, ko so celicam HT29-H z večkratnim spiranjem odstranili mukusno plast, je imel hitosan večji vpliv na prehod manitola skozi te celice. Mukus ovira interakcije hitosana z negativno nabitimi glikoproteini na površini celičnih membran (15).

Hitosan je občutljiv na prisotnost večvalentnih kationov. V primeru, ko so na Caco-2 celice skupaj z 0,002 % ut/vol disperzijo hitosana nanесли še 20 mM Ca²⁺ ali Mn²⁺ ionov, so le-ti značilno zmanjšali absorpcijo modelne spojine inulina v primerjavi s samo disperzijo hitosana. Mg²⁺ ioni niso imeli vpliva na pospeševanje absorpcije s

hitosanom. Divalentni kationi lahko vplivajo na celično permeabilnost preko vezalnih mest na samem hitosanu ali na celični membrani (16).

3.1 Različni derivati hitosana

V zgoraj navedenih raziskavah je bil kot pospeševalec absorpcije uporabljen hitosan v obliki glutamata ali klorida. Na sposobnost obeh soli, da povečata permeabilnost Caco-2 celic, vpliva pH vrednost disperzije hitosana. Hitosan vstopa v interakcije z negativno nabitimi mesti na celični membrani preko pozitivno nabitih amino skupin. Navidezni pK_a hitosana je okoli 6,5 in z nižanjem pH vrednosti disperzij se transport manitola skozi Caco-2 celice povečuje. Večja gostota naboja pri nižjem pH omogoči hitosanu boljši stik z epitelijsko membrano. Pri pH 7,4 sta obe soli netopni in ne vplivata na permeabilnost Caco-2 celic (17).

Kot pospeševalci absorpcije se uporabljajo tudi nekateri drugi derivati hitosana. Delno kvarterniziran N-trimetil hitosan klorid je v enakih koncentracijah sicer manj učinkovit kot hitosan v obliki klorida ali glutamata, je pa zaradi svoje strukture topen pri pH 7,4, kjer sta drugi dve soli netopni in zato neučinkoviti (18, 19). Na učinkovitost pospeševanja absorpcije z N-trimetil hitosanom pomembno vpliva stopnja kvarternizacije te spojine. V "in vivo" poskusih na podganah se je nazalna absorpcija ¹⁴C-manitola pri pH 7,4 povečevala z večanjem stopnje kvarternizacije N-trimetil hitosana, dokler ni pri 48 % kvarternizacije prišlo do maksimalne absorpcije manitola. Nadaljnje povečevanje stopnje kvarternizacije ni povečalo absorpcije manitola, kar so razložili s steričnim oviranjem metilnih skupin in s spremembami v fleksibilnosti molekul N-trimetil hitosana (20).

Pri nevtralnem pH ima dobro topnost tudi mono-N-karboksimitil hitosan. Gre za derivat hitosana v obliki iona dvojčka, ki je kompatibilen tudi s polianionskimi substancami (npr. s heparinom), v prisotnosti katerih se hitosan v obliki klorida ali glutamata ter N-trimetil hitosan obarjajo. Pri nevtralnem pH vrednostih je za enak učinek potrebna nekajkrat višja koncentracija mono-N-karboksimitil hitosana kot N-trimetil hitosana (21).

V raziskavi so tudi hitosani z dodanimi tiolnimi skupinami, t.i. tiohitosani. Ti imajo v primerjavi s hitosanom v obliki glutamata ali klorida večjo sposobnost pospeševanja absorpcije, ki je posledica zaviranja encima tirozin fosfataze, ki ima pomembno vlogo pri uravnavanju odprtosti tesnih stikov. Zaviranje tega encima povzroči odprtje tesnih stikov (22).

3.2 Mehanizem pospeševanja absorpcije

Mehanizem, s katerim hitosan poveča absorpcijo učinkovin, je raziskan predvsem na Caco-2 celicah. Za razliko od polikarbofila, ki je prav tako znan pospeševalec absorpcije, hitosan ne zavira aktivnosti serinskih proteaz, kar bi preprečilo razgradnjo peptidnih učinkovin (23). Hitosan vpliva na strukturne elemente tesnih stikov ter na citoskelet Caco-2 celic. Hitosan povzroči depolimerizacijo citoskeletnega F-aktina ter spremembe lokacij proteinov tesnih stikov ZO-1 in okcludina (13, 16, 17, 24). Vpliv hitosana na citoskeletni F-aktin poveča paracelularno permeabilnost, saj je F-aktin povezan s proteini tesnih stikov (18). Poleg tega so kationske makromolekule kot je hitosan sposobne zamenjati katione v tesnih stikih, katerih notranjost

je visoko hidratirana in vsebuje stalen negativni naboj. Že majhne spremembe v koncentraciji posameznih vrst ionov znotraj tesnega stika lahko vodijo do velikih sprememb v prepustnosti teh stikov (17).

Vpliv hitosana na paracelularno permeabilnost Caco-2 celic je reverzibilen. Po enurni izpostavitvi hitosanu v koncentracijah od 0,00125 do 0,01 % ut/vol se permeabilnostni koeficient manitola ter transepitelijska električna upornost Caco-2 celic v 24 urah vrneta na enake vrednosti kot pri celicah, ki niso bile izpostavljene hitosanu. Pri večjih koncentracijah hitosana je za vzpostavitev prvotne membranske integritete potrebna sinteza proteinov. V primeru, ko so Caco-2 celice najprej za 30 minut izpostavili 0,5 % ut/vol hitosanu in jih nato 24 ur inkubirali s cikloheksimidom (inhibitor sinteze proteinov), učinek hitosana ni bil reverzibilen (13).

Mehanizem pospeševanja absorpcije s hitosanom je popolnoma drugačen v sečnem mehurju. V koncentracijah, ki značilno povečajo prehod modelnih učinkovin v steno prašičjega sečnega mehurja, hitosan povzroči luščenje zgornjih celičnih slojev epitelija sečnega mehurja. S tem se odstranijo permeabilnostne bariere, ki pri intaktnem sečnem mehurju preprečijo prehod snovi iz urina v steno mehurja (12). Za ostale sluznice je mehanizem pospeševanja absorpcije s hitosanom manj raziskan.

4 Bioadhezivne lastnosti

Hitosan izkazuje dobre bioadhezivne lastnosti, ki so predvsem posledica tvorbe vodikovih in ionskih vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino, prisotno v glikoproteinih na površini sluznice. Tiohitosani omogočajo še močnejšo bioadhezijo in sicer zaradi tvorbe kovalentnih vezi tiolnih skupin polimera s površinskimi glikoproteini. Hitosan se lahko adherira tako na trda kot mehka tkiva, je pa bioadhezija hitosana omejena s topnostjo posameznih derivatov tega polimera (22, 25). Na sluznici sečnega mehurja ima hitosan v obliki klorida večjo jakost bioadhezije kot anionska polimera polikarbofil in natrijeva karboksimetil celuloza. To je najverjetneje posledica večjega odboja med negativno nabitimi polimeri in glikozaminoglikani na površini sluznice (26). Na prašičji intestinalni sluznici so rezultati ravno obratni: polikarbofil ima večjo jakost bioadhezije kot hitosan. Največja razlika med polimeroma je opazna pri pH 1,2, kjer je zaradi dobre topnosti hitosana njegova sposobnost bioadhezije šibka in dokaj kratkotrajna (27).

5 Dostavni sistemi s hitosanom

Hitosan se zaradi dobrih bioadhezivnih lastnosti pogosto uporablja v razvoju novih dostavnih sistemov. Bioadhezivni sistemi za dostavo učinkovin izboljšajo biološko uporabnost vgrajenih učinkovin v primerjavi s klasičnimi dostavnimi sistemi, saj podaljšajo čas zadrževanja učinkovine na mestu adhezije ter omogočijo tesnejši stik farmaceutske oblike s sluznico, skozi katero se učinkovina absorbira. Poleg bioadhezivnih lastnosti se pri načrtovanju dostavnih sistemov izkorišča tudi sposobnost hitosana, da poveča absorpcijo učinkovin skozi različne sluznice (3, 28).

V razvoju so številni dostavni sistemi s hitosanom, najpogosteje pa hitosan sestavlja mikro in nanodelce ter liposome. Dostavni sistemi

mikro in nanometrijskih velikosti se lahko aplicirajo parenteralno ali na različne sluznice, kjer hitosan s kombinacijo bioadhezije in pospeševanja absorpcije poveča biološko uporabnost vgrajenih učinkovin. V teh dostavnih sistemih so lahko vgrajene polarne učinkovine, proteini, antigeni in DNK fragmenti, hitosan pa je lahko uporabljen kot ogrodni polimer ali le kot sredstvo za oblaganje. Za liposome obložene s hitosanom je značilna boljše ciljana dostava ter večja fizikalna in kemijska stabilnost v primerjavi z neobloženimi liposomi (2, 28, 30–32).

Za peroralna in nazalna cepiva so obetavni hitosanski nano in mikrodelci, v katere je vgrajen antigen (npr. tetanusni ali difterijski toksoid), ki je s tem zaščiten pred razgradnjo. Prednost takšnega cepljenja v primerjavi s klasičnim parenteralnim je manjša invazivnost ter lokalna tvorba protiteles na mestu, kjer patogeni vstopajo v organizem. Poleg lokalnega imunskega odziva v sluznici se sproži tudi sistemski imunski odziv. Takšno cepljenje je primerno zlasti za obolenja, kjer patogeni vstopajo v organizem skozi sluznice. Za peroralna cepiva je pomembno, da so aplicirani delci manjši od 10 µm in lahko prehajajo v Peyerjeve ploščice črevesnega limfatičnega tkiva. V primeru nazalnih cepiv vgradnja antigena v mikro in nano delce ni nujna, saj za razliko od peroralne aplikacije pri nazalnih cepivih antigen ni izpostavljen nizkim pH vrednostim in razgradnim encimom. Tako se lahko antigen namenjeni nazalnemu cepljenju aplicirajo skupaj s hitosanom v obliki raztopine ali praška (33).

Hitosan daje dobre rezultate tudi v razvoju dostavnih sistemov za vnos genov. Kationski hitosan, ki tvori komplekse z negativno nabito DNK, poveča učinkovitost transformacije; dodatek ustreznih ligandov h kompleksu hitosan-DNK pa lahko dodatno izboljša uspešnost vnosa gena s pomočjo receptorsko posredovane endocitoze. Prednost hitosana pred drugimi sintezniimi vektorji je njegova majhna citotoksičnost (3).

Hitosan se lahko uporablja tudi v dostavnih sistemih za kolon, kjer se izkorišča razgradnja tega polimera z bakterijskimi encimi v kolonu. Hitrost razgradnje je odvisna od molekulske mase ter stopnje deacetiliranja hitosana (29).

6 Drugi nameni uporabe hitosana v farmaciji

Hitosan najdemo v pripravkih za znižanje telesne teže. Z "in vivo" poskusi na podganah ter v študijah na ljudeh so ugotovili, da vsakodnevno peroralno jemanje hitosana zniža nivo plazemskega holesterola in trigliceridov ter poveča izločanje žolčnih kislin in maščob z blatom (34). Hitosan naj bi v prebavnem traktu tvoril gel, ki veže lipide ter ostala hranila, med drugim tudi v lipidih topne vitamine in minerale, in s tem zmanjša njihovo absorpcijo (34, 35). V nasprotju s temi študijami pa v drugih raziskavah (36, 37) niso potrdili statistično značilnega vpliva hitosana na znižanje telesne teže ter na povečano izločanje maščob z blatom. V raziskavah na podganah so ugotovili, da ima dolgotrajna uporaba hitosana lahko tudi negative posledice. Povzroči lahko pomanjkanje lipidotopnih vitaminov v plazmi, zaostajanje v rasti, zmanjšanje mineralne gostote krvi, kar lahko ob hkratni zmanjšani absorpciji kalcija in vitamina D iz prebavil vodi do osteoporozе ter spremembe normalne črevesne flore, kar lahko povzroči razrast odpornih patogenov (34).

Hitosan naj bi pospešil tudi celjenje ran. Ob aplikaciji na površinske rane, naj bi se hitosan vezal na fibroblaste in spodbujal proliferacijo keratinocitov ter s tem obnavljanje pokožnice. Poleg tega naj bi hitosan aktiviral obrambni sistem gostitelja in s tem preprečil okužbo rane. Povečal naj bi aktivnost polimorfonuklearnih levkocitov in makrofagov. Hitosan naj bi zaviral tudi rast in razmnoževanje bakterij. Hitosan se adsorbira na površino bakterij, pri čemer povzroči spremembe v strukturi celične stene ter v prepustnosti celične membrane, kar oboje vodi v smrt bakterij. Protimikrobni učinek hitosana je v tesni povezavi s površinskimi lastnostmi celične stene bakterij, kot sta hidrofilitnost ter naboj. Na Japonskem so že na tržišču pripravki s hitosanom v obliki hidrogela, praška in zrnec namenjeni celjenju ran (29, 38).

7 Zaključek

Hitosan je polimer velikih potencialov za uporabo v farmaciji. Zaradi bioadhezivnih lastnosti podaljša čas zadrževanja dostavnega sistema na mestu absorpcije, poleg tega poveča permeabilnost sluznice, kjer poteka absorpcija. Oboje poveča biološko uporabnost učinkovin, kar je pogosto cilj razvoja novih dostavnih sistemov. Hitosan lahko sestavlja mikro in nanodelce ter liposome, ki so namenjeni vnosu polarnih učinkovin, proteinov, antigenov ali DNK v organizem. Vedno več raziskav je usmerjenih v farmakološke lastnosti, ki jih izkazuje ta nizko toksičen polimer in bodo v prihodnosti uporabo tega polimera v farmaciji morda še povečale.

8 Literatura

1. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 1047-1067.
2. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 1998; 24: 979-993.
3. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT* 1998; 1: 246-253.
4. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv Drug Del Rev* 2001; 50: S91-S101.
5. Anthonsen MW. Chitosan, chemical structure and physical properties. Doktorska disertacija, Norveški tehnološki inštitut, Oddelek za biotehnologijo, Trondheim, Norveška, 1993.
6. Hejazi R, Amiji M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J Control Release* 2003; 89: 151-165.
7. Natsume H, Iwata S, Ohtake K, et al. Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery. *Int J Pharm* 1999; 185: 1-12.
8. Sinswat P, Tengamnuay P. Enhancing effect of chitosan on nasal absorption of salmon calcitonin in rats: comparison with hydroxypropyl- and dimethyl- β -cyclodextrins. *Int J Pharm* 2003; 257: 15-22.
9. Şenel S, Hincal AA. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *J Control Rel* 2001; 72: 133-144.
10. Sandri G, Rossi S, Ferrari F, et al. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21: 351-359.
11. Alonso MJ, Sánchez A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 1451-1463.
12. Kerec M, Bogataj M, Veranič P, et al. Permeability of pig urinary bladder wall: Time and concentration dependent effect of chitosan. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1685-1691.
13. Dodane V, Khan MA, Merwin JR. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm* 1999; 182: 21-32.
14. Schipper NGM, Vårum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res* 1996; 13: 1686-1692.
15. Schipper NGM, Vårum KM, Stenberg P, et al. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur J Pharm* 1999; 8: 335-343.
16. Ranaldi G, Marigliano I, Vespignani I, et al. The effect of chitosan and other polycations on the tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 line. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 157-167.
17. Artursson P, Lindmark T, Davis SS, et al. Effect of chitosan on the permeability of monolayers on intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1994; 11: 1358-1361.
18. Kotzé AF, Lueßen HL, de Leeuw BJ, et al. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J Control Rel* 1998; 51: 35-46.
19. Thanou M, Florea BI, Langemeijer MWE, et al. N-trimethylated chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug buserelin in vitro (Caco-2 cells) and in vivo (rats). *Pharm Res* 2000; 17: 27-31.
20. Hamman JH, Stander M, Kotzé AF. Effect of the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelium. *Int J Pharm* 2002; 232: 235-242.
21. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 117-126.
22. Bernkop-Schnürch A, Hornof M, Guggi D. Thiolated chitosans. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57: 9-17.
23. Kotzé AF, de Leeuw BJ, Lueßen HL, et al. Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cells. *Int J Pharm* 1997; 159: 243-254.
24. Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, et al. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res* 1997; 14: 923-929.
25. Dodou D, Breedveld P, Wieringa PA. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60: 1-16.
26. Bogataj M, Vovk T, Kerec M, et al. The correlation between zeta potential and mucoadhesion strength on pig vesical mucosa. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 743-746.
27. Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, et al. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm* 1992; 78: 43-48.

28. Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47: 39-54.
29. Şenel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:1467-1480.
30. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm* 1998; 166: 75-88.
31. Takeuchi H, Matsui Y, Yamamoto H, et al. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *J Control Rel* 2003; 86: 235-242.
32. Burjak M, Bogataj M, Velnar M, et al. The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. *Int J Pharm* 2001; 224: 123-130.
33. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, et al. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 139-144.
34. Koide SS. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr Res* 1998; 18: 1091-1101.
35. Gallaher CM, Munion J, Hesslink R, et al. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr* 2000; 130: 2753-2759.
36. Pittler MH, Abbot NC, Harkness EF, et al. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 379-381.
37. Guerciolini R, Radu-Radulescu L, Boldrin M, et al. Comparative evaluation of fecal fat excretion induced by orlistat and chitosan. *Obes Res* 2001; 9: 364-367.
38. Chung YC, Su YP, Chen CC, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 932-936.