

## **Mucus-penetrerende legemiddelbærere:**

*Hvordan modifisering av overflaten påvirker terapeutisk effekt*

**Malin Nyland Aalberg**

*Masteroppgave i Farmasi, mai 2014*





MASTEROPPGAVE FOR INTEGRERT MASTERGRAD I FARMASI

MUKUS-PENETRERENDE LEGEMIDDELBÆRERE:  
HVORDAN MODIFISERING AV OVERFLATEN PÅVIRKER TERAPEUTISK  
EFFEKT

AV  
MALIN NYLAND AALBERG

MAI 2014

VEILEDERE:

Professor Nataša Škalko-Basnet

og

PhD student May Wenche Bakke Jøraholmen

Drug Transport and Delivery Research Group

Institutt for farmasi

Det helsevitenskapelige fakultet

Norges arktiske Universitet, Tromsø





## FORORD

Masteroppgaven ble utført ved Drug Transport and Delivery Research Group, ved Institutt for Farmasi, Norges Arktiske Universitet, Tromsø, i perioden oktober 2013 til mai 2014.

Først vil jeg takke alle vennene mine i Tromsø for å ha gjort studietiden her uforglemmelig.

Takk til familien min, både her i Tromsø og hjemme i Steinkjer, for støtten dere alltid gir meg.

En stor takk til veilederen min May Wenche Bakke Jøraholmen for å ha hatt tålmodighet og veiledet meg gjennom arbeidet. Takk for at du alltid har vært tilgjengelig og kommet med konstruktive tilbakemeldinger både på laboratoriet og gjennom skriveprosessen.

Takk til veilederen min professor Nataša Škalko-Basnet for god støtte og oppmuntrende ord, og alle bidragene du har kommet med.

Tusen takk til Ida Emilie Thoresen for all hjelp med beregninger, word og excel. Dette året hadde ikke vært det samme uten alle diskusjonene og kaffepausene våre.

En takk til resten av avdelingen for et godt miljø og for å ha gitt meg hjelp med utstyr og maskiner på laboratoriet.

Sist, men ikke minst, takk til resten av kull 09.

Tromsø, mai 2014

Malin Nyland Aalberg



## ABSTRACT

The favorable treatment for sexually transmitted infections and other gynecological diseases is locally administered drugs. For women, the vaginal route is favorable for these infections and diseases. There are many challenges that need to be considered when developing pharmaceutical formulations for vaginal administration; vagina is capable of self-cleansing, physiological changes in the vaginal environment, and mucosal tissue that wants to reject foreign molecules. To achieve increased retention time at the administration site, pharmaceutical formulations for vaginal administration have to be mucoadhesive.

The aim of this study was to optimize the surface of liposomes to achieve prolonged retention time at vaginal site, thus enabling local treatment with resveratrol. Resveratrol was incorporated in liposomes by the thin-film method. To obtain liposomes in a specific size range, the liposome suspension was extruded. Liposomes were coated with chitosan 0.1 % (w/v) to become more mucoadhesive and achieve prolonged retention time. Free untrapped resveratrol was separated by dialysis. The liposomes were characterized for their size distribution, zeta potential and resveratrol entrapment, before and after coating with chitosan 0.1 % (w/v). *In vitro* drug release from chitosan-coated liposomes was compared to drug release from non-coated liposomes and free resveratrol. Chitosan-coated liposomes showed an almost identical, but more regular release of entrapped resveratrol compared to non-coated liposomes. The mucoadhesion was measured by determining the binding of liposomes to pig mucin. Liposomes were coated with three different concentrations of chitosan (0.1 %, 0.3 % and 0.6 % w/v, respectively), and non-coated liposomes were used as control. Liposomes coated with lower concentration of chitosan exhibited superior mucoadhesiveness.

Keywords: Sexually transmitted infections, vaginal administration, mucoadhesive liposomes, resveratrol, chitosan, mucin





## SAMMENDRAG

Seksuelt overførbare infeksjoner og andre gynekologiske sykdommer vil man helst behandle lokalt. Hos kvinner er vaginal administrasjon fordelaktig for behandling av nettopp slike sykdommer. Det er flere utfordringer som må overvinnes når farmasøytiske formuleringer til vaginal administrasjon skal utvikles; vagina har en evne til å rense seg selv, det skjer hele tiden fysiologiske forandringer i miljøet i vagina og vaginas slimhinneoverflate prøver å støte fra seg fremmede molekyler. De farmasøytiske formuleringene som skal brukes til vaginal administrasjon må være mukoadhesive slik at retensjonstiden på administrasjonsstedet blir lang nok til å oppnå ønskelig effekt.

Målet med denne studien var å optimalisere liposomer for å oppnå forlenget retensjonstid på administrasjonsstedet og muliggjøre lokal behandling med resveratrol.

Resveratrol ble inkorporert i liposomer ved hjelp av tynn-film metoden. For å oppnå ønskelig størrelse på liposomene ble liposomsuspensjonen ekstrudert. For å forlenge retensjonstiden til liposomene ble de coatet (overtrukket) med kitosan 0,1 % (w/v). Dialyse ble brukt for å separere fritt virkestoff fra liposomene. Liposomenes størrelse, zetapotensiale og grad av resveratrolinkorporering ble karakterisert, både før og etter liposomene var coatet. *In vitro* frigjøring av virkestoff fra coatede liposomer ble sammenlignet med frigjøring fra ikke-coatede liposomer, og fritt resveratrol. Kitosan-coatede liposomer viste ganske lik, men jevnere frigjøring av resveratrol enn ikke-coatede liposomer. De mukoadhesive egenskapene til liposomene ble bestemt ut ifra liposomenes evne til å binde seg til mucin. Liposomene ble coatet med 3 forskjellige konsentrasjoner av kitosan; 0,1 %, 0,3 % og 0,6 % (w/v). Ikke-coatede liposomer ble brukt som kontroll. Coating med lavest konsentrasjon av kitosan viste seg å gi liposomene de beste mukoadhesive egenskapene.

Nøkkelord: Seksuelt overførbare infeksjoner, vaginal administrasjon, mukoadhesive liposomer, resveratrol, kitosan, mucin.

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>IX</b>
<b>INNHALDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE OVER FIGURER</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTE OVER TABELLER</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. GENERELL INTRODUKSJON</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUKSJON</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Vagina</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Vaginalflora .....	4
<b>2.2 Vagina som administrasjonsvei</b> .....	<b>4</b>
2.2.1 Vaginale doseringsformer .....	6
<b>2.3 Vaginale infeksjoner og seksuelt overførbare sykdommer</b> .....	<b>6</b>
2.3.1 Genital <i>Herpes simplex</i> virus .....	6
2.3.2 Chancroid .....	8
2.3.3 Gonoré .....	8
<b>2.4 Resveratrol</b> .....	<b>9</b>
2.4.1 Studier som er gjort på resveratrol og ulike mikroorganismer .....	10
<b>2.5 Leveringssystemer</b> .....	<b>11</b>
2.5.1 Liposomer .....	12
2.5.2 Tillaging av liposomer .....	14
<b>2.6 Mukoadhesjon</b> .....	<b>15</b>
2.6.1 Mukus .....	16
2.6.2 Faktorer som påvirker mukoadhesjon.....	17
2.6.3 Vaginale doseringsformer med mukoadhesive egenskaper .....	17
2.6.4 Mukoadhesive polymerer.....	18
<b>2.7 Kitosan</b> .....	<b>19</b>
<b>3. FORMÅL MED STUDIEN</b> .....	<b>21</b>
<b>4. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Materialer</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2 Utstyr</b> .....	<b>22</b>



<b>4.3 Instrumenter</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4 Dataprogrammer</b> .....	<b>23</b>
<b>4.5 Metoder</b> .....	<b>24</b>
4.5.1 Tillaging av liposomer med resveratrol .....	24
4.5.2 Tillaging av liposomer uten resveratrol .....	24
4.5.3 Størrelsesreduksjon .....	24
4.5.4 Størrelsesanalyse .....	24
4.5.5 Standardkurve .....	25
4.5.6 Inkorporering .....	25
4.5.7 Coating av liposomene.....	25
4.5.8 Måling av zetapotensiale.....	26
4.5.9 Tillaging av acetatbuffer .....	26
4.5.10 Tillaging av fosfatbuffer .....	26
4.5.11 Frigjøring av virkestoff ( <i>in vitro</i> ).....	26
4.5.12 Testing av mukoadhesjon .....	27
<b>5. RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1 Karakterisering av liposomene</b> .....	<b>28</b>
5.1.1 Størrelse av liposomer.....	28
5.1.2 Overflateladning til liposomene.....	29
5.1.3 Grad av inkorporert resveratrol.....	30
<b>5.2 <i>In vitro</i> frigjøring av resveratrol</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3 Mucin-binding</b> .....	<b>35</b>
<b>6. KONKLUSJON</b> .....	<b>37</b>
<b>7. PERSPEKTIV</b> .....	<b>38</b>
<b>8. REFERANSER</b> .....	<b>39</b>

## LISTE OVER FIGURER

<b>Figur 1:</b> Oppbygging av veggen i vagina 1: kapillære blodårer, 2: arterie, 3: vene (das Neves & Bahia, 2006) .....	3
<b>Figur 2:</b> Sår og blemmer i vulva forårsaket av genital <i>H. simplex</i> (Moi & Maltau, 2008).....	7
<b>Figur 3:</b> Strukturen til <i>trans</i> -3,5,4'trihydroxystilbene (Jang <i>et al.</i> , 1997).....	9
<b>Figur 4:</b> Struktur av lecitin (Elnaggar <i>et al.</i> , 2014).....	13
<b>Figur 5:</b> Liposom der hydrofilt virkestoff er i vannfase og hydrofobt virkestoff i fettfase (Hupfeld <i>et al.</i> , 2006).....	13
<b>Figur 6:</b> Mekanisme til mukoadhesjon. A: Kontakt B: Sammenslåing (Kumar <i>et al.</i> , 2013).....	15
<b>Figur 7:</b> Kjemisk struktur av kitosan (Jones, 2012).....	19
<b>Figur 8:</b> Kalibreringskurve for resveratrol i metanol.....	31
<b>Figur 9:</b> Tap av resveratrol under ekstrusjon .....	32
<b>Figur 10:</b> Konsentrasjon av resveratrol før og etter dialyse.....	32
<b>Figur 11:</b> <i>In vitro</i> frigjøring av resveratrol fra løsning (propylenglykol) og ikke-coatede liposomer .....	33
<b>Figur 12:</b> <i>In vitro</i> frigjøring av resveratrol fra ikke-coatede og kitosan-coatede (0,1 %) liposomer .....	34
<b>Figur 13:</b> Mucin-binding for kitosan-coatede og ikke-coatede liposomer ved pH 4,6 og pH 7,4.....	35

## **LISTE OVER TABELLER**

<b>Tabell 1:</b> Størrelse og størrelsesfordeling for ekstruderte liposomer .....	28
<b>Tabell 2:</b> Zetapotensialet før og etter coating med kitosan 0,1 % (w/v) .....	30



# 1. GENERELL INTRODUKSJON

Vaginaveggen består av tre lag; epitellag, muskellag og *tunica adventitia* (D'Amati *et al.*, 2003). Overflaten har mange folder, eller rynker, som gjør at vagina har et stort overflateareal (Hussain & Ahsan, 2005). Vagina har også rik blodtilførsel, og fordi blodet fra vagina går til tynntarmen og forbi leveren, unngår legemidler som administreres vaginalt førstepassasjemetabolisme (Knuth *et al.*, 1993). Miljøet i en frisk vagina hos fertile kvinner er fuktig med en balansert bakterieflora dominert av *Lactobacillus* spp. (Teigen, 2011; Mastromarino *et al.*, 2013). *Lactobacillus* har i hovedoppgave å sørge for at andre, uønskede bakterier ikke trives i miljøet ved å produsere organiske syrer slik at pH holdes mellom 3,5 og 4,5 (Aroutcheva *et al.*, 2001). Vaginaflora påvirkes av pH, hormoner, samleie, prevensjonspiller, alder og antimikrobiell behandling (Valenta, 2005). Som administrasjonsvei har vagina både fordeler og ulemper i forhold til andre administrasjonsveier. Noen av fordelene er at legemidlene unngår førstepassasjemetabolisme, vagina har en stor overflate, rik blodtilførsel og god permeabilitet gjennom slimhinneoverflaten for mange forbindelser (Knuth *et al.*, 1993; Srikrishna & Cardozo, 2013). Ulempene er blant annet at administrasjonsveien påvirkes av samleie, lokal irritasjon og personlig hygiene, den er kjønnsespesifikk og effekten av legemidlene påvirkes av forandringer i bakterieflora (Srikrishna & Cardozo, 2013).

Det finnes flere ulike vaginale doseringsformer på markedet i dag, og det viktigste for den ideelle doseringsformen er at den bør være lett å bruke, diskret, lukt- og fargeløs, ikke påvirke samleie og ikke føre til smerte for pasienten eller irritasjon av slimhinnen. Den bør heller ikke lekke ut fra vagina (Srikrishna & Cardozo, 2013).

Vaginal administrasjonsvei blir mest brukt til å behandle lokale sykdommer, som for eksempel vaginale infeksjoner og seksuelt overførbare sykdommer, men blir også brukt til å gi systemisk effekt. Eksempler på seksuelt overførbare sykdommer er genital *Herpes simplex* virus, chancroid og gonoré (Moi & Maltau, 2008; Beigi, 2012). Vi har brukt resveratrol som virkestoff i denne masteroppgaven, og flere forskere har vist at resveratrol har hemmende og/eller drepende effekt på de tre seksuelt overførbare sykdommene nevnt over (Docherty *et al.*, 2001; Docherty *et al.*,

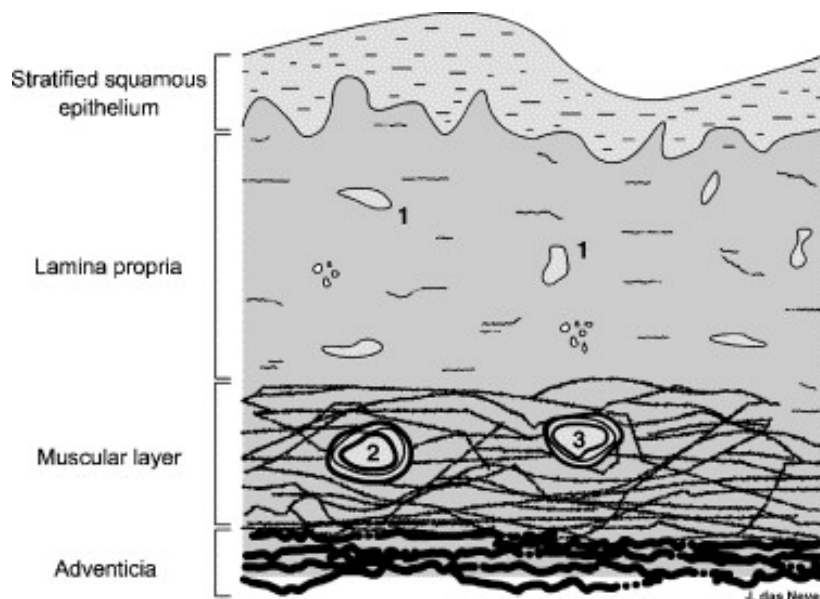
2005; Nawrocki *et al.*, 2013). Resveratrol har flere positive helseeffekter, men det er den mikrobicide, antibakterielle og antivirale effekten som ønskes å utnyttes vaginalt (Baur & Sinclair, 2006; Piñeiro *et al.*, 2006). Fordi resveratrol blant annet er veldig dårlig løselig i vann og har kort halveringstid er det ønskelig å utvikle legemiddelbærere for å forbedre biotilgjengeligheten (Amri *et al.*, 2012; Isailović *et al.*, 2013). Det finnes flere typer legemiddelbærere, for eksempel selv-emulgerende leveringssystemer i nanostørrelse, miceller, dendrimerer, nanotuber og liposomer, hvor den sistnevnte er den som brukes i denne masteroppgaven. Liposomer er sammensatt av fosfolipider med hydrofile polare hodegrupper og lipofile ikke-polare fettsyrehaler (Budai *et al.*, 2013). Fordi liposomene består av både en hydrofil- og en lipofil del, kan liposomer benyttes til både hydrofile og lipofile virkestoff (Hupfeld *et al.*, 2006). Resveratrol er lipofilt og vil inkorporeres i liposomenes lipofile dobbeltlag. Ved å inkorporere virkestoff i liposomer kan man få en selektiv, målrettet levering av legemidler, det terapeutiske vinduet kan øke, stabiliteten til virkestoffet blir bedre og eventuelle toksiske effekter og bivirkninger reduseres (Dua *et al.*, 2012).

Fordi slimhinnen i vagina fungerer som en barriere mot fremmede molekyler, ved å prøve å frastøte disse, kan legemidlene få redusert retensjonstid på behandlingssted (Cone, 2009). For å overkomme denne utfordringen, kan man utnytte polymerers mukoadhesive egenskaper ved å coate (overtrekke) liposomene. Mukoadhesjon kan defineres som to materialer som holdes sammen over en periode på grunn av tiltrekkende krefter mellom dem, eller som muligheten et materiale har til å adhere til et biologisk vev (Kumar *et al.*, 2013). I denne studien blir kitosan brukt til å coate liposomene. Kitosan er en naturlig kationisk biopolymer (Kumar *et al.*, 2004). Fordi den er kationisk, og slimhinnen er anionisk, oppstår det en interaksjon mellom kitosan og slimhinnen når de kommer i kontakt (Sogias *et al.*, 2008). Dette vil forbedre retensjonstiden til virkestoffet på behandlingsstedet, i tillegg til at frigjøringen av virkestoff fra liposomer skjer mer kontrollert, biotilgjengeligheten til virkestoffet i kroppen forbedres og muligheten for en målrettet distribusjon av et legemiddel øker, slik at man kan unngå bivirkninger (Andrews *et al.*, 2009).

## 2. INTRODUKSJON

### 2.1 Vagina

Vagina har en kompleks struktur. Den er en fibromuskulær, bueformet kanal med to separate deler: en nedre konveks del og en videre øvre del. Den øvre delen ligger nesten horisontalt når kvinnen står og vinkelen mellom den øvre og nedre delen er 130 grader (Funt *et al.*, 1978). Vaginalkanalen binder livmorhalsen med skjeden, og den er mellom 7-15 cm (Machado *et al.*, 2013). Veggen inne i vagina hos en frisk kvinne består av tre lag (Figur 1); epitellag, muskellag og *tunica adventitia* (D'Amati *et al.*, 2003). Overflaten inne i vagina er sammensatt av flere folder. Disse foldene, eller rynkene, fører til at vagina har en stor overflate (Hussain & Ahsan, 2005). I tillegg til stor overflate har vagina også rik blodtilførsel (Acartürk, 2009).



**Figur 1:** Oppbygging av veggen i vagina der 1: kapillære blodårer, 2: arterie, 3: vene (das Neves & Bahia, 2006)

Blodet som forlater vagina entrer den perifere blodsirkulasjonen via et rikt venøst nettverk som tømmer i tynntarmen, med andre ord går blodet forbi leveren. Derfor unngår legemidler som administreres vaginalt førstepassasjemetabolisme (Knuth *et al.*, 1993).

Epitelcellene i slimhinnen i vagina utskiller store mengder væske. En kvinne i fertil alder produserer omtrent 6 ml daglig, hvor 0,5-0,75 ml er tilstede i vagina hele tiden. Væsken inneholder blant annet enzymer, enzymhemmere, proteiner, karbohydrater, aminosyrer og alkoholer. Etter overgangsalderen halveres mengden væske (Baloglu *et al.*, 2009).

### **2.1.1 Vaginalflora**

En frisk vagina sørger for å opprettholde et fuktig miljø og en rik, balansert bakterieflora (Teigen, 2011). Bakteriefloreaen til en frisk kvinne i fertil alder domineres av *Lactobacillus* spp., men andre bakterier er også tilstede. Man finner ofte gjærsopp og anaerobe bakterier, men i små mengder (Mastromarino *et al.*, 2013). *Lactobacillus* har i hovedoppgave å konkurrere mot andre mikroorganismer om næringsstoffer og adhesjon til vaginalt epitel, redusere pH ved å produsere organiske syrer (melkesyre) og produsere antimikrobielle substanser, som for eksempel hydrogenperoksid. Fordi det produseres organiske syrer, holdes pH mellom 3,5 og 4,5, noe som forhindrer vekst av patogene organismer (Aroutcheva *et al.*, 2001). Menstruasjon, sekret fra livmor og livmorhals, og sæd øker pH (Richardson & Illum, 1992). Vaginalfloraen påvirkes av pH, hormoner, samleie, prevensjonspiller, alder og antimikrobiell behandling (Valenta, 2005).

Når man skal utvikle legemiddelbærere for legemidler som skal administreres vaginalt, enten det er for lokal effekt eller systemisk effekt, må man ta hensyn til alle forandringene i miljøet i vagina som hele tiden skjer (Baloglu *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2013).

## **2.2 Vagina som administrasjonsvei**

Den vaginale administrasjonsveien blir mer og mer etterspurt, både for lokal og systemisk behandling. Administrasjonsveien har mange fordeler, blant annet det store overflatearealet, den rike blodtilførselen og permeabiliteten den har for mange forbindelser, inkludert peptider og proteiner. For legemidler som skal virke systemisk er fordelene med vaginal administrasjonsvei at det kreves lavere doser enn ved oralt

administrerte legemidler, på grunn av at legemidlene unngår førstepassasjemetabolisme (Srikrishna & Cardozo, 2013). Ved å unngå førstepassasjemetabolisme vil ikke pasientene få gastrointestinale eller hepatiske bivirkninger. Skade eller infeksjon på administrasjonsstedet vil ikke forekomme, og administrasjonsmetoden er diskret (Alexander *et al.*, 2004; Baloglu *et al.*, 2009; Friedl *et al.*, 2013). Som med alle andre administrasjonsveier følger det ikke bare fordeler med denne administrasjonsveien, det er også noen ulemper. Blant annet er vaginal administrasjon kjønnsspesifikk og påvirkes av lokal irritasjon, samleie og personlig hygiene. I tillegg har vagina en evne til å rense seg selv. Dette kan føre til at legemidler ikke har kontakt med behandlingsstedet lenge nok til å få en god biotilgjengelighet (Valenta, 2005). Noen kvinner har en kulturell bakgrunn som ikke tillater vaginal administrasjon (Srikrishna & Cardozo, 2013).

Absorpsjonen av legemidler i vagina forekommer i to steg: først løses legemidlet opp i vaginal lumen, deretter penetrerer legemidlet slimhinneoverflaten (Srikrishna & Cardozo, 2013). Det er flere måter legemidlet kan krysse slimhinneoverflaten på; ved transcellulær transport, intracellulær transport eller reseptor-mediert transportmekanisme (Richardson & Illum, 1992).

Alle forandringer i miljøet i vagina må tas hensyn til når det skal utvikles legemiddelbærere som skal administreres vaginalt. Absorpsjonen til legemidler påvirkes av pH, og fordi pH ikke er konstant kan dette være en utfordring (Valenta, 2005). Østrogenkonsentrasjonen påvirker permeabiliteten gjennom den vaginale slimhinneoverflaten, som igjen kan påvirke farmakokinetikken til legemidler som skal virke systemisk (Acatürk & Robinson, 1996). Tykkelsen til epitelet i vagina forandrer seg med alder. En kvinne har mindre østrogen før puberteten og i overgangsalderen enn når kvinnen er i fertil alder (Hussain & Ahsan, 2005). Mengde hormoner påvirker tykkelsen på epitellaget. Jo mer østrogen, jo tykkere epitellag (Valenta, 2005). Dette påvirker absorpsjonen av legemidler. Noen legemidler vil absorberes bedre i tilfeller der epitelet er tynnere, for eksempel hos postmenopausale kvinner. Andre legemidler har bedre absorpsjon jo tykkere epitelet er (Srikrishna & Cardozo, 2013). Mengde væske i vagina reduseres ved økende alder, og det vil også kunne påvirke absorpsjonen til legemidler. Veldig mye væske vil igjen kunne føre til at legemidlet vil skylles ut av vagina (Valenta, 2005).

### **2.2.1 Vaginale doseringsformer**

Vaginale doseringsformer kan blant annet være kremer, geler, tabletter, kapsler, pessarier, skum, salver, intravaginale ringer, tamponger, suppositorier, vaginale filmer og pudder (Srikrishna & Cardozo, 2013). Den perfekte doseringsformen for vaginal administrering bør være lett å bruke, diskret, ikke påvirke samleie, lukt- og fargeløs, bør ikke føre til smerte for pasienten eller irritasjon av slimhinneoverflaten, eller lekke ut av vagina (Srikrishna & Cardozo, 2013).

Effektiviteten til mange vaginale doseringsformer er begrenset på grunn av vaginaens mulighet til å rense seg selv, slik at legemidlet kun er i kontakt med administrasjonsstedet i en kort periode (das Neves & Bahia, 2006; Ravani *et al.*, 2013). Bruk av mukoadhesive polymerer kan forlenge tiden legemidlet er i kontakt med administrasjonsstedet. Mukoadhesive polymerer blir grundigere beskrevet lengere ut i teksten.

### **2.3 Vaginale infeksjoner og seksuelt overførbare sykdommer**

Det finnes flere typer seksuelt overførbare sykdommer og andre vaginale infeksjoner, men jeg skal ta for meg tre av sykdommene. Det er gjort studier som viser at resveratrol har både hemmende og drepende effekt på de tre infeksjonene jeg tar for meg i 2.3.1, 2.3.2 og 2.3.3, og disse studiene er nærmere beskrevet i kapittel 2.4.1.

#### **2.3.1 Genital *Herpes simplex virus***

En av de vanligste seksuelt overførbare infeksjonene og årsaken til genitale sår er *Herpes simplex virus* (HSV). Det forårsakes av HSV-1 og HSV-2, og kan smittes gjennom nær kontakt, samleie eller oral sex. For at viruset skal overføres mellom to personer må det være aktivert og til stede i hud eller slimhinne. Når viruset har overvunnet hud- eller slimhinnebarrieren transporteres det gjennom nervebaner og integreres i form av et plasmid. Her blir det liggende latent resten av livet. Ved reaktivering dannes nye viruspartikler som transporteres til hud eller slimhinne, og man vil få en inflammatorisk reaksjon fra immunforsvaret som fører til dannelse av

blærer og sår (Figur 2). Fordi viruset kan overføres til og fra områder som ikke er dekket av kondom, vil ikke kondom være en sikker beskyttelse mot overføring (Moi & Maltau, 2008).



**Figur 2:** Sår og blemmer i vulva forårsaket av genital *H. simplex* (Moi & Maltau, 2008)

Det oppstår sjeldent farlige komplikasjoner fra genital *H. simplex*, og de vanligste komplikasjonene er psykiske. I noen tilfeller kan sykdommen være en ko-faktor til cervixcancer (Moi & Maltau, 2008).

Aciklovir og valaciklovir er to legemidler som kan brukes for å behandle genital *H. simplex*, og som er markedsført i Norge. Aciklovir har dårlig biotilgjengelighet, og valaciklovir er en videreutvikling av aciklovir med forbedret biotilgjengelighet (Nawrocki *et al.*, 2013). I tillegg har Docherty og hans forskningsgruppe vist at resveratrol har mikrobicid effekt på genital *H. simplex* virus hos mus (Docherty *et al.*, 2005).

### 2.3.2 Chancroid

Chancroid forårsakes av *Haemophilus ducreyi*, og infeksjonen karakteriseres av genitale sår og inflammasjon i lysken. Den er uvanlig i Norge og andre vestlige land, men i Afrika, Asia, Sør-Amerika og i Karibia kan den oppdages ofte (Rogstad, 2011; Beigi, 2012). For at *H. ducreyi* skal overføres må det oppstå et brudd eller åpning i epitelet under seksuell kontakt med en person som er infisert. Når en person som har blitt infisert med *H. ducreyi* får utbrudd, er det fare for gjentakelse (Beigi, 2012). Symptomer er smertefulle sår som væsker og blør i tillegg til hevelse i lysken. Det kan oppstå komplikasjoner som for eksempel vevsødeleggelser, byller i lyskeområdet og kroniske materiedannede hulrom (Rogstad, 2011).

Acitromycin og ceftriaxone er de mest brukte legemidlene for å behandle chancroid, og disse gis oralt. Nawrocki og forskningsgruppen hans har gjort en studie som viser at resveratrol har mikrobicid effekt på *H. ducreyi* (Nawrocki *et al.*, 2013).

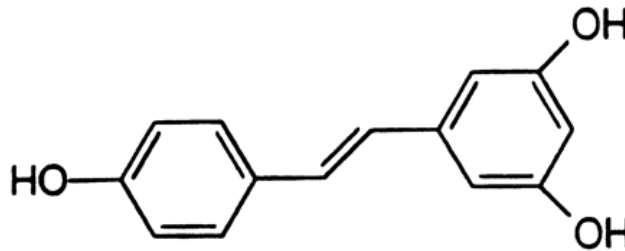
### 2.3.3 Gonoré

Gonoré forårsakes av *Neisseria gonorrhoeae*, og har en global utbredelse. Sykdommen smittes gjennom direkte kontakt mellom genitalslimhinner, eller ved smitte via sexleketøy og fingre. I 10 % av tilfellene er sykdommen symptomløs, men både menn og kvinner kan få gulgrønn utflod og smerter (Moi & Maltau, 2008). Kvinner kan få menstruasjonsforstyrrelser. Hvis man blir smittet en gang kan man allikevel bli smittet flere ganger, da infeksjon ikke gir noen form for immunitet. Komplikasjoner som infertilitet og ekstrauterin graviditet kan forekomme. Behandling av gonoré skjer med oralt administrert antibiotika, som for eksempel cefalosporin, amokisillin, cefixime og ofloksacin (Moi & Maltau, 2008). Docherty *et al.* har vist at resveratrol har en hemmende effekt på *N. gonorrhoeae* (Docherty *et al.*, 2001).



## 2.4 Resveratrol

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) er utvunnet fra roten til planten *Polygonum cuspidatum*, en plante som brukes i kinesisk og japansk medisin (Amri *et al.*, 2012). Virkestoffet finnes i peanøtter, grapefrukt, bær, vin og sjokolade (Isailović *et al.*, 2013).



**Figur 3:** Strukturen til *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene (Jang *et al.*, 1997)

Resveratrol har mange positive helseeffekter som gjør at det er ønskelig å bruke det som legemiddel (Baur & Sinclair, 2006; Piñeiro *et al.*, 2006);

- antiviral, antifungal og antibakteriell effekt
- microbicid effekt
- antioksidativ effekt
- analgetisk effekt
- anti-inflammatorisk effekt
- beskytter hjertet og nervene
- forebygger kreft

Det er den antivirale, den antibakterielle og den microbicide effekten som er relevant med tanke på vaginal administrasjon av resveratrol. Forskjellen mellom microbicider og antibiotika er at microbicider kan forebygge overføring av bakterier mellom personer som har seksuell kontakt, ved at de dreper patogene mikroorganismer fullstendig, også de som finnes under infeksjonsmengde, mens antibiotika behandler allerede oppstått infeksjon (Moncla & Hillier, 2005). Microbicider vil dessuten kunne virke innen minutter, mens antibiotika virker over en periode på flere dager. En ideell microbicid vil i tillegg til å forebygge overføring av bakterier mellom personer, opprettholde en normal bakterieflora (Nawrocki *et al.*, 2013).

Resveratrol har en del negative egenskaper som gjør det utfordrende når man skal bruke det til videre utvikling av legemidler. Det er for eksempel veldig dårlig løselig i vann ( $\log P = 3,1$ ) (Neves *et al.*, 2013), det er fotosensitivt og det er utsatt for oksidasjon (Amri *et al.*, 2012). Halveringstiden til resveratrol er dessuten kort, og det gjør at det kreves høye doser av virkestoffet for å få effekt. Høye doser kan føre til toksisitet og høyere risiko for bivirkninger (Isailović *et al.*, 2013). For å utvikle effektive legemidler av resveratrol kreves det at det er inkorporert i virkestoff-bærere.

Virkningsmekanismen til resveratrol er ikke helt klarlagt, men man tror at virkningen kommer av at den hemmer aktiviteten til ATPaser, og derfor hindrer mikroorganismene i å produsere og anvende energi (Nawrocki *et al.*, 2013).

#### **2.4.1 Studier som er gjort på resveratrol og ulike mikroorganismer**

Nawrocki *et al.* fant at resveratrol ikke bare er bakteriehemmende, men også bakteriedrepende for *H. ducreyi*. De bestemte minimum konsentrasjon av resveratrol som var nødvendig for å drepe *H. ducreyi* ( $\leq 500 \mu\text{g/ml}$ ) *in vitro*. I tillegg testet de resveratrol mot *Lactobacillus* spp., og fant ut at *Lactobacillus* spp. ikke ble påvirket i like stor grad som *H. ducreyi* (Nawrocki *et al.*, 2013).

Docherty *et al.* fant ut at resveratrol har en hemmende effekt på veksten til *N. gonorrhoeae*, ved å gjøre en *in vitro* studie. En konsentrasjon på mellom 75-125  $\mu\text{g/ml}$  vil hemme *N. gonorrhoeae* fullstendig, mens en konsentrasjon på mellom 25-100  $\mu\text{g/ml}$  vil hemme veksten med 50 %. Det vil si at ved å hemme veksten fullstendig, har de en mikrobicid effekt (Docherty *et al.*, 2001). De testet ikke hvordan resveratrol påvirker den naturlige vaginalfloraen (Nawrocki *et al.*, 2013).

Docherty *et al.* fant også ut at resveratrol har effekt på genital *H. simplex* virus hos mus. For å finne ut dette infiserte de musens vagina med HSV-2 eller HSV-1, og behandlet de med en krem som inneholdt resveratrol. Effekten avhenger av konsentrasjonen av resveratrol, tiden det tar fra infeksjon har oppstått til administrasjon skjer og antall administrasjoner per dag. De testet 3 forskjellige konsentrasjoner; 6 %, 12,5 % og 19 %, der den på 19 % har best effekt på HSV-2 når

den gis 1 time etter musen var infisert, og administreres 5 ganger daglig i 5 dager. Kremen med 12,5 % resveratrol hemmer replikasjon av viruset, men forhindrer ikke utbrudd. 6 % forsinket bare utbruddet med 1 dag. Kremen med konsentrasjon på 19 % hadde også effekt på HSV-1, men ikke signifikant. (Docherty *et al.*, 2005).

Dårlig vannløselighet og begrenset stabilitet gjør at resveratrol må inkorporeres i leveringsystemer for å oppnå ønsket effekt.

## 2.5 Leveringssystemer

Det finnes flere systemer som kan formuleres sammen med et virkestoff for å forbedre effekten på forskjellige måter. Vi har for eksempel selv-emulgerende leveringsystemer i nanostørrelse (Self-nano-emulsifying drug delivery systems; SNEDDs), nanopartikler, miceller, dendrimerer, nanotuber og liposomer.

SNEDDs er lipidbaserte formuleringer som ofte benyttes til virkestoff som gis oralt (Singh & Pai, 2014). De er satt sammen av en lipiddel, surfaktant, ko-surfaktant og virkestoffet (Zhang *et al.*, 2014). Virkestoffet kan være oppløst i den hydrofobe kjernen (oljefasen) eller i det hydrofile skallet (det hydrofile hodelaget til surfaktanten) (Hathout *et al.*, 2010). Når virkestoffet er inkorporert i et slikt system forbedres biotilgjengeligheten til stoffet ved at det hele tiden er i løselig form (Warren *et al.*, 2011).

De fleste nanopartikler består av et hydrofilt skall og en hydrofob kjerne, hvor det hydrofobe virkestoffet innkapsles eller inkorporeres i den faste hydrofobe kjernen. Dette øker stabiliteten, reduserer nedbrytningen og forlenger frigjøring av virkestoffet. Eventuell toksisitet reduseres, og vi får en mer målrettet distribusjon av virkestoffet (Muller, 2000). Nanopartiklene er satt sammen av faste lipider, surfaktanter og vann. De kan også inneholde kosurfaktanter (Mehnert, 2001). Fettsyrer, triglyserider, voks eller en blanding av disse er eksempler på lipider som brukes for å lage nanopartikler. Surfaktantene som brukes er fosfolipider, sorbitan ester eller en blanding av disse (Mehnert, 2001). Nanopartiklene kan brukes til oral, parental, dermal, rektal, nasal, okulær eller pulmonær administrasjonsvei (Iqbal *et al.*, 2012).

Miceller er kolloidale dispersjoner med partikkelstørrelse mellom 5-100 nm. De består av en dispers fase (partikler) som er distribuert i et dispersjonsmedium. Micellene tilhører gruppen amfifile kolloider som dannes spontant ved den rette konsentrasjonen og temperaturen når en overflateaktiv substans (surfaktant) er til stede (Torchilin, 2007). De er sammensatt av fosfolipider. Hodet til fosfolipidene utgjør det hydrofile skallet og halen til fosfolipidene utgjør den hydrofobe kjernen som kan inkorporere et dårlig vannløselig virkestoff (Wang *et al.*, 2013).

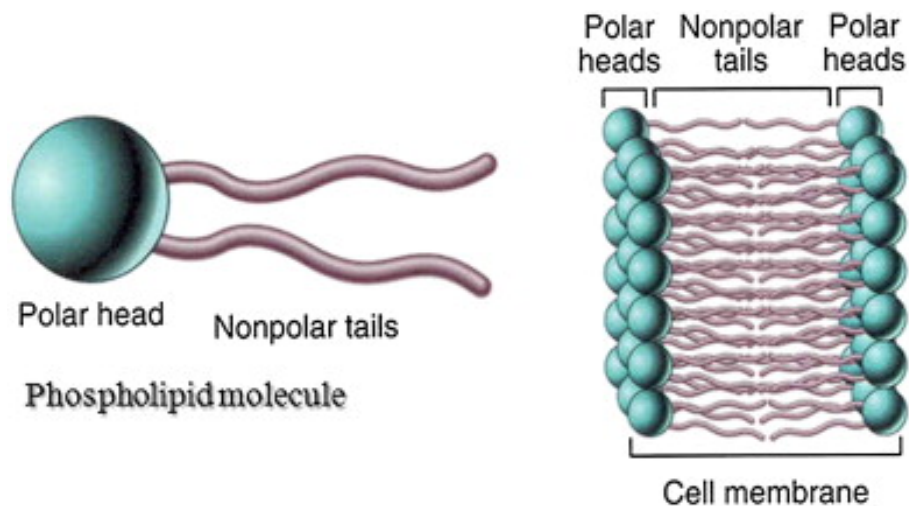
Dendrimerer er unike syntetiske makromolekyler i nanostørrelse som har en forgrenet struktur og en rund form (Abderrezak *et al.*, 2012). Fordi dendrimerene er så forgrenet som de er, og består av så mange terminalgrupper, har virkestoffet mange mulige steder å feste seg til, og levering av virkestoffet til det stedet i kroppen det skal virke skjer veldig effektivt. Dessuten har dendrimerene bindingssteder for både hydrofobe, hydrofile, kationiske og anioniske virkestoff (LeeFréchet *et al.*, 2005).

Nanotuber har en hul tubulær struktur som kan fylles med dårlig løselige virkestoff. De er ca 50 nm i diameter og 500-1500 nm lange. Det er forsket på en type nanotube som kan benyttes til resveratrol; Hallocyte Clay nanotube. Den består av naturlig alumina og silica. Det at stoffene er naturlige gjør at det ikke medfører noen risiko å utvikle de, og det er heller ikke så dyrt (Vergaro *et al.*, 2012).

Den type leveringssystem for virkestoff som er brukt i denne masteroppgaven er liposomer.

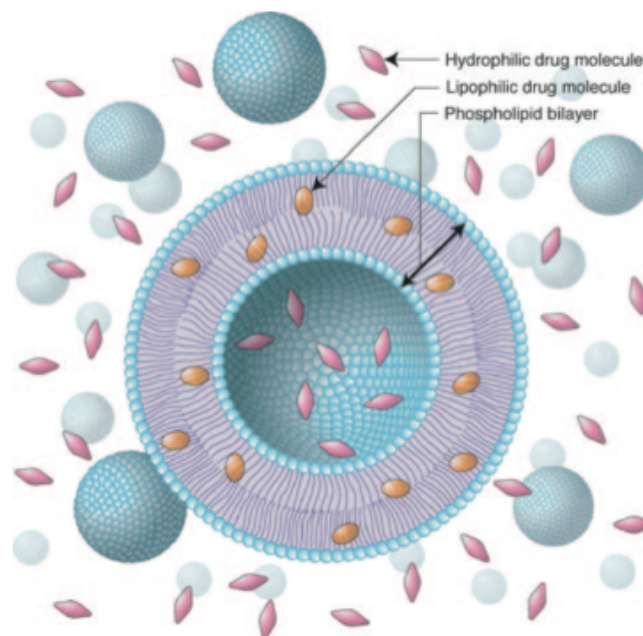
### **2.5.1 Liposomer**

Liposomer er kolloidale vesikler bestående av fosfolipider. De mest vanlige fosfolipidene som brukes i liposomer er lecitin fra ulike kilder, for eksempel soyabønner eller egg. Sammensetningen av lecitin avhenger av hvilken kilde lecitin kommer fra, men alle inneholder hydrofile, polare hodegrupper og hydrofobe, ikke-polare fettsyrehaler (Figur 4) (Budai *et al.*, 2013).



**Figur 4:** Struktur av lecitin (Elnaggar *et al.*, 2014)

Når fosfolipidenes hydrofile hodegrupper interagerer med vann dannes det liposomer. Liposomene har et hydrofilt indre og ytre, mens fosfolipidmembranen er hydrofob (Patel & Panda, 2012). Det gjør at hydrofile virkestoff enten kan inkorporeres inne i liposomene eller adheres til utsiden av liposomene, og hydrofobe virkestoff kan feste seg inne i det hydrofobe dobbeltlaget (Figur 5) (Hupfeld *et al.*, 2006).



**Figur 5:** Liposom der hydrofilt virkestoff er i vannfase og hydrofobt virkestoff i fettfase (Hupfeld *et al.*, 2006)

Når virkestoff som i utgangspunktet har dårlig biotilgjengelighet, fordi de for eksempel er hydrofobe (Vanaja *et al.*, 2013), inkorporeres i det lipofile dobbeltlaget i

liposomer forbedres biotilgjengeligheten ved at opptaket i tarmen forbedres (Catania *et al.*, 2013). Liposomer kan beskytte virkestoff fra å brytes ned, de kan forlenge virketiden, redusere sirkulasjonstiden i plasma og redusere toksisiteten (Kaur *et al.*, 2013).

Virkestoff som er inkorporert i liposomer er ikke biotilgjengelige. De må frigis fra liposomene før de blir biotilgjengelige (Lee *et al.*, 2013).

Oppsummering av fordelene med liposomer (Dua *et al.*, 2012):

- Kan få selektiv, målrettet levering av legemidler
- Økt terapeutisk vindu
- Økt stabilitet av virkestoff
- Redusert toksisitet
- Mindre bivirkninger
- Bedre farmakokinetiske effekter (reduert eliminasjon)

### **2.5.2 Tillaging av liposomer**

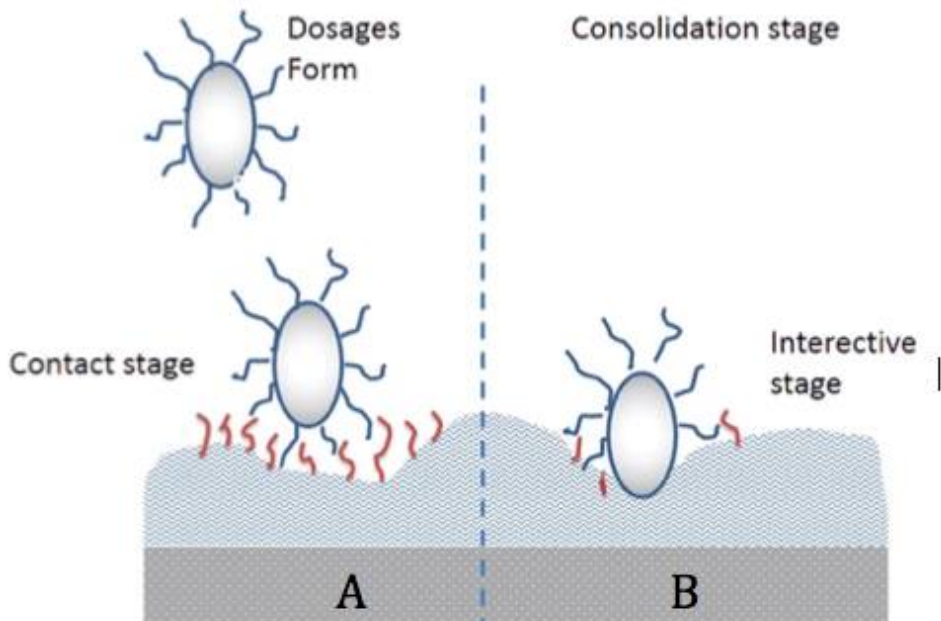
Det finnes flere metoder for å fremstille liposomer. Den ene er lipid-film-metoden. Den går ut på at lipidene og virkestoffet løses i et løsemiddel, for deretter å fjerne løsemiddelet ved hjelp av evaporator (Isailović *et al.*, 2013). Det dannes da en tynn film av lipider som blir til liposomer når vann tilsettes og suspensjonen ristes (Dua *et al.*, 2012). Størrelsen på liposomene som dannes kan kontrolleres og reduseres ved sonikering eller ekstrusjon. Lipid-film-metoden egner seg ikke for produksjon i større skala, da dette er kostbart, består av mange trinn og er tidkrevende (Isailović *et al.*, 2013; Dua *et al.*, 2012). Proliposom-metoden kan egne seg for produksjon i større skala. Proliposomer er tørre granulater bestående av virkestoff og fosfolipider som danner en suspensjon av liposomer når vann blir tilsatt (Shaji & Bhatia, 2013). For at liposomer skal kunne lages industrielt må de kunne lages i stor skala, i tillegg må de være fysisk og kjemisk stabile og de må være sterile (Dua *et al.*, 2012).

For legemidler som skal administreres på steder hvor det finnes slimhinneoverflate, holder det ikke alltid å bare inkorporere de i liposomer. Noen ganger må liposomenes

overflate modifiseres for å forbedre mukoadhesjonen. I denne studien har kitosan blitt brukt til å modifisere liposomenes overflate.

## 2.6 Mukoadhesjon

En definisjon på mukoadhesjon kan være at to materialer, der en av de er biologisk av natur, holdes sammen over en lengre periode på grunn av en tiltrekkende kraft som oppstår mellom dem. En annen definisjon er muligheten et materiale (syntetisk eller biologisk) har til å adhere til et biologisk vev over en lengre periode (Kumar *et al.*, 2013). Denne egenskapen blir brukt til å utvikle legemidler som skal administreres i munnhulen, oralt, nasalt, okulært og vaginalt (Khutoryanskiy, 2011). Fordelene med å bruke mukoadhesive materialer i utvikling av legemiddelbærere er at tiden legemidlet er i kontakt med en slimhinneoverflate øker, biotilgjengeligheten til legemidlet blir bedre, administrasjonsfrekvensen reduseres og muligheten for en målrettet distribusjon av et legemiddel øker slik at man kan unngå bivirkninger (Andrews *et al.*, 2009).



**Figur 6:** Mekanisme til mukoadhesjon. A: Kontakt B: Sammenslåing (Kumar *et al.*, 2013)

Mukoadhesjon skjer i to steg (Figur 6). Det første steget (A) innebærer at det mukoadhesive materialet kommer i kontakt med slimhinneoverflaten. Det andre steget (B) innebærer fysiokjemiske interaksjoner mellom det mukoadhesive materialet og slimhinneoverflaten, noe som fører til en sterk kontakt og forlenget adhesjon mellom dem (Kumar *et al.*, 2013).

Det er enda ikke helt avklart hva som fører til mukoadhesjon (Edsman & Hägerström, 2005), men det finnes flere teorier som beskriver hva som skjer; den ene teorien er den elektrostatiske teorien. Den sier at på grunn av at slimhinneoverflaten og den mukoadhesive polymeren har ulike elektroniske karakteristikk, oppstår det en elektrostatisk tiltrekning mellom dem. Den andre teorien er adsorpsjonsteorien, som sier at det oppstår tiltrekning mellom slimhinneoverflaten og den mukoadhesive polymeren på grunn av hydrogenbindinger, kovalente bindinger og van der Waals krefter. Den vætende teorien gjelder bare for flytende eller lav-viskositet-systemer, og forklarer hvordan en væske kan spre seg utover slimhinneoverflaten. Diffusjonsteorien forklarer at mukoadhesive makromolekyler kan penetrere gjennom en mucinkjede og danne delvis permanente adhesive bindinger. Kraften som kreves for at to overflater som har mukoadhesiv tiltrekning skal separeres skal være lik styrken på adhesjonen og forklares ved hjelp av bristeteteorien. Den mekaniske teorien sier at en ru overflate har større kontaktflate og gir derfor adhesjon (Edsman & Hägerström, 2005; Khutoryanskiy, 2011; Kumar *et al.*, 2013). Ingen av disse teoriene kan beskrive mukoadhesjon alene, men det er en mulighet for at en kombinasjon av to eller flere av disse teoriene kan beskrive det (Khutoryanskiy, 2011).

### **2.6.1 Mukus**

Mucus er en hydrogel som er sammensatt av spesialiserte glykoproteiner som syntetiseres av spesialiserte epitelceller (begerceller) (Saltzman *et al.*, 1994). Mucus er komplekst, viskøst og klebende, og inneholder i tillegg til glykoproteiner, også vann (95-99,5 %), lipider, salter, DNA og enzymer. Mucus legger seg som en beskyttende hinne (slimhinne) over epitelceller flere steder i kroppen for å beskytte underliggende vev mot omgivelsene (Bansil & Turner, 2006; Sigurdsson *et al.*, 2013). Fordi hovedoppgaven til slimhinneoverflaten er å beskytte celleoverflaten og



oppretholde vannbalansen i cellene, kan man si at den er en barriere for penetrering av fremmede molekyler inn i cellen (Cone, 2009). Legemidler er også fremmed for kroppen, og slimhinneoverflaten vil derfor prøve å hindre de i å penetrere cellene. Dette avhenger av hvilken pH legemidlene har, om de er ioniserte eller ikke og om det er andre faktorer til stede (Khanvilkar *et al.*, 2001). Små molekyler kan penetrere slimhinneoverflaten fordi de kan diffundere gjennom (Saltzman *et al.*, 1994).

### **2.6.2 Faktorer som påvirker mukoadhesjon**

Graden av en polymers mukoadhesjon påvirkes av molekylvekt, pH, konsentrasjon, bindinger og partikkelstørrelse:

1. Den optimale molekylvekten til polymeren avhenger av type polymer som brukes. De bioadhesive kreftene øker med molekylvekten til polymeren (Shaikh *et al.*, 2011). Kjedene bør være små nok til at polymeren kan trenge gjennom slimhinneoverflaten, men store nok til at de kan flette seg sammen (Edsman & Hägerström, 2005).
2. pH kan påvirke ladningen til slimhinneoverflaten. pH er viktig for ioniserte bioadhesive polymerer. Hvis pH til slimhinneoverflaten er større en pK til polymeren vil polymeren bli ionisert. Hvis pH til slimhinneoverflaten er mindre enn pK til polymeren vil den bli ikke-ionisert (Shaikh *et al.*, 2011).
3. Det finnes en optimal konsentrasjon av polymeren for å få best mulig mukoadhesjon (Shaikh *et al.*, 2011).
4. Jo mindre kryssbinding-tetthet, jo høyere er fleksibiliteten; jo større blir overflatearealet til polymeren og jo bedre blir mukoadhesjonen (Shaikh *et al.*, 2011).
5. Partikkelstørrelsen til den mukoadhesive polymeren påvirker mukoadhesjonen (Edsman & Hägerström, 2005).

### **2.6.3 Vaginale doseringsformer med mukoadhesive egenskaper**

Formålet med å utvikle mukoadhesive doseringsformer er å forbedre og øke legemidlets kontakt med slimhinneoverflaten for å forlenge virketiden (Vinod *et al.*, 2012). For legemidler som skal administreres på steder hvor det finnes

slimhinneoverflater; vaginalt, okulært, i munnhulen, sublingvalt, rektalt og nasalt, og for legemidler som skal tas opp i tarmen, er mukoadhesive doseringsformer fordelaktige (Ahuja *et al.*, 1997). Ideelle mukoadhesive doseringsformer er små og fleksible slik at de ikke forårsaker irritasjon. De fører til kontrollert frigjøring av legemidler, har høy kapasitet til å lades med virkestoff, har en glatt overflate og har gode mukoadhesive egenskaper (Boddupalli *et al.*, 2010). Eksempler på doseringsformer som er formulert med mukoadhesive egenskaper er tabletter, filmer, plastre, geler og salver, hvor geler er den typen doseringsform som har blitt mest brukt til vaginal administrasjon (Boddupalli *et al.*, 2010). Geler er halvfaste og har den egenskapen at de enkelt kan fordele seg utover slimhinneoverflaten i vagina. Ofte har geler dårlig retensjonstid på grunn av vaginaens evne til å rense seg selv, men med mukoadhesive formuleringer kan den forlenges (Boddupalli *et al.*, 2010).

På grunn av fysiologiske forandringer i vagina er det utfordrende å utvikle mukoadhesive legemiddelbærere for legemidler som skal administreres vaginalt. Som nevnt tidligere kan mengde væske i vagina variere gjennom menstruasjonssyklusen, og med alder. Ved økt vaginal væske kan kontakten mellom slimhinneoverflaten og de mukoadhesive legemidlene bli bedre, og motsatt ved redusert vaginal væske. Samtidig vil økt væske kunne redusere styrken på interaksjonen mellom slimhinneoverflaten og de mukoadhesive legemidlene (das Neves *et al.*, 2011).

#### **2.6.4 Mukoadhesive polymerer**

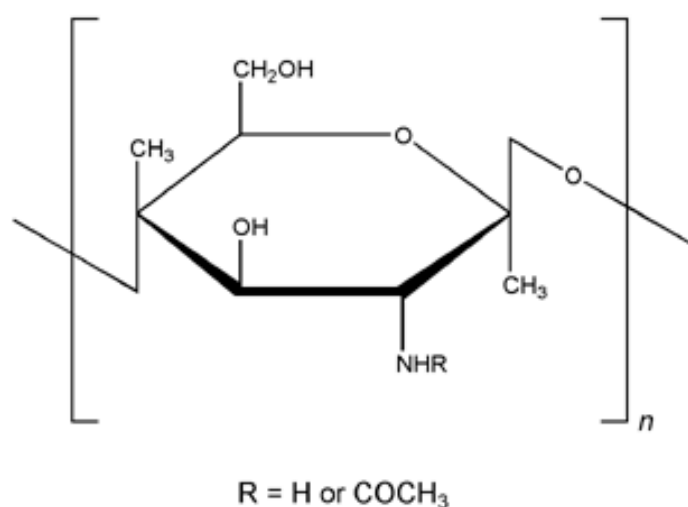
Mukoadhesive polymerer kan enten være naturlige eller syntetiske. Kitosan er et eksempel på en naturlig polymer, mens cellulosederivater er eksempler på syntetiske polymerer. De mukoadhesive polymerene kan kategoriseres etter hvordan de binder seg til slimhinneoverflaten (Laffleur, 2014). Ideelle polymerer bør svulle i den vandige biologiske omgivelsen på absorpsjonsstedet, interagere med slimhinneoverflaten slik at det oppstår adhesjon og føre til kontrollert frigjøring av den aktive forbindelsen etter de har svellet. De bør også utskilles uforandret eller brytes biologisk ned i kroppen til en inaktiv, ikke-toksisk oligomer, inneha tilstrekkelig mengde med kjemiske grupper som kan danne hydrogenbindinger, ha høy molekylvekt og kjedefleksibilitet. Overflatespenningen må også være slik at

polymeren kan bre seg ut over slimhinneoverflaten (Vinod *et al.*, 2012). Mukoadhesive polymer kan deles inn i første- og andregenerasjons polymerer. Førstegenerasjons polymerer har ikke mulighet til å gi en målrettet levering av legemidler. De fester seg til slimhinneoverflaten ved hjelp av ikke-kovalente interaksjoner som hydrogenbindinger, hydrofobiske og elektrostatiske interaksjoner. Fordi førstegenerasjons polymerer interagerer med slimhinneoverflaten gjennom ikke-kovalente bindinger, og andregenerasjons polymerer interagerer med slimhinneoverflaten gjennom kovalente bindinger, vil tiden polymeren er i kontakt med slimhinneoverflaten være kortere for førstegenerasjons- enn for andregenerasjons polymerer (Vinod *et al.*, 2012).

## 2.7 Kitosan

For å øke de mukoadhesive egenskapene til liposomer kan man overtrekke overflaten til liposomene (coate) med kitosan. Kitosan vil beskytte liposomene og virkestoffet slik at de ikke brytes så raskt ned, i tillegg til at kitosan vil øke permeabiliteten gjennom slimhinner (Gradauer *et al.*, 2013).

Kitosan er en lineær polysakkarid sammensatt av  $\beta$ -(1-4)-bundet D-glukosamin og N-acetyl-D-glukosamin (Bhattarai *et al.*, 2010).



Figur 7: Kjemisk struktur av kitosan (Jones, 2012)

Kitosan er en naturlig kationisk biopolymer som produseres når kitin deacetyleres (Kumar *et al.*, 2004). Kitin finnes i skjelettet til virvelløse dyr og skalldyr (Muzzarelli & Muzzarelli, 2005). Kitosan er kationisk, og når den kommer i kontakt med den negativt ladde slimhinneoverflaten vil det oppstå elektrostatiske interaksjoner (Sogias *et al.*, 2008). Det er disse kreftene som gjør at kitosan er mukoadhesiv. I tillegg til de mukoadhesive egenskapene er kitosan lite toksisk og biokompatibiliteten er god, dessuten har den antibakterielle egenskaper. Derfor brukes kitosan ofte i legemiddelutviklingen for å forbedre egenskapene til legemidler (Karn *et al.*, 2011; Gibis *et al.*, 2013).

Kitosan kan være med på å forlenge tiden et legemiddel er i kontakt med absorpsjonsstedet, oppnå uavbrutt og kontrollert frigjøring av et virkestoff og forbedre biotilgjengeligheten til et legemiddel (Dodane & Vilivalam, 1998).

### **3. FORMÅL MED STUDIEN**

Hensikten med denne studien er å utvikle og optimalisere liposomer med tanke på evnen til å penetrere slimhinneoverflaten, og frigi resveratrol på administrasjonsstedet. Liposomenes størrelse, zetapotensiale og grad av virkestoff-inkorporering ble karakterisert, og liposomene ble testet *in vitro* med tanke på frigjøring og evne til å adhere til slimhinnen.

## 4. MATERIALER OG METODER

### 4.1 Materialer

Ammoniumacetat, BHD Prolab, Leuven, Belgia

Destillert vann

Eddiksyre (glacial) vannfri GR for analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

Etanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kaliumklorid, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

Kaliumfosfat enbasisk (renhet  $\geq 99,0$  %), Sigma-Aldrich, St-Louis, USA

Kitosan, lav molekylvekt, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Lipoid S 100 (soyabønne lecitin,  $> 94$  % w/w fosfatidylkolin), Lipoid GMBH, Ludwigshafen, Tyskland

Metanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Mucin fra grisemage, type III, bundet til sialinsyre 0,5-1,5 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natriumhydroksid (renhet  $\geq 98$  %), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natriumklorid (renhet  $\geq 99,5$  %), Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natriumfosfat tobasisk (renhet  $\geq 98,5$  %), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Propylenglykol, Norsk medisinaldepot, Oslo, Norge

Resveratrol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 4.2 Utstyr

Beckman Sentrifugetuber, Beckman Instruments, Palo Alto, USA

Dialysetube, Molecular weight cut-off 12-14000 Daltons, Medicell Membranes Ltd, London, Storbritannia

Einmach Fix Zellglas, Wendelstein, Tyskland

Nuclepore Track-Etch Membran, Whatman House, Maidstone, Storbritannia

UV plate, 96 Well, med UV transparent flat bunn, Corning Incorporated, New York, USA

### **4.3 Instrumenter**

Agilent 8453 UV synlig lys spektroskopi system, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Beckman model L8-70M forberedende Ultrasentrifuge, Beckman Instruments, Palo Alto, USA

Beckman SW 60 Ti rotor, Beckman Coulter, Beckman Instruments, Palo Alto, USA

Biocap LAF benk, 230 V, 50 Hz, 73 W, Erlab, Val de Reuil, Cedex, Frankrike

Branson 5510 E-MT, Branson ultrasonikator-reenser, Danbury, USA

Büchi rotavapor R-124, Büchi vannbad B-480, Büchi vakuum-kontroller B-721, Büchi Vac® V-500, Büchi labor teknik, Flawil, Sveits

Metrohm 744 pH-meter, Metrohm AG, Herisau, Sveits

Perme Gear Ink, Diffusjons-celler og systemer, 12 ml, Hellertown, USA

SpectraMax 190, Mikroplate spektrofotometer, Molecule Devices, Sunnyvale, USA

Submikron partikkelstørrelse-måler model 370, Nicomp, Santa Barbra, California, USA

Ultrasonic prosessor 500 watt, Sigma-Aldrich, St Louis, USA

Zetasizer Nanoseries, Model ZEN 2600, Malvern Instruments Limited, Malvern, Storbritannia

### **4.4 Dataprogrammer**

Nicomp Particle Sizing System, CW 388 version 1.68

Softmax Pro Software, Molecular Devices Corp.

UV-Visible ChemStation Software, Agilent technologies 95-03

Zetasizer software 7.03, Malvern Instruments

## **4.5 Metoder**

### **4.5.1 Tillaging av liposomer med resveratrol**

Resveratrol (10 mg) ble oppløst i etanol i en rundkolbe, og lipoid S 100 (200 mg) ble oppløst i metanol i en annen rundkolbe. Deretter ble løsningene blandet sammen og satt på rotavapor, med aluminiumsfolie rundt for å beskytte mot lys, i 3 timer ved 50 mm Hg og 50 °C for å evaporere løsemidlene. Den tørre filmen av lipoid og resveratrol ble resuspendert i 10 ml destillert vann før den ble tildekt med aluminiumsfolie og satt i kjøleskap (4-8 °C) til neste dag.

### **4.5.2 Tillaging av liposomer uten resveratrol**

Lipoid S 100 (200 mg) ble oppløst i metanol i en rundkolbe og satt på rotavapor i 1,5 timer ved 50 mm Hg og 50 °C for å evaporere løsemiddelet. Den tørre filmen av lipoid ble resuspendert i 10 ml destillert vann og satt i kjøleskap (4-8 °C) til neste dag.

### **4.5.3 Størrelsesreduksjon**

Liposomenes størrelse ble redusert ved ekstrusjon. Ekstrusjonsfilter ble brukt til å redusere størrelsen, først til 800 nm, deretter til 400 nm. Hver ekstrusjon ble gjort 5 ganger.

### **4.5.4 Størrelsesanalyse**

Liposomenes størrelsesfordeling ble analysert ved foton korrelasjon spektroskopi (photon correlation spectroscopy; PCS) på Nicomp model 370. For å forhindre støvpartikler i å forstyrre analysen, ble testrørene først fylt med destillert vann og sonikert i 10 minutter i ultralyd-bad, deretter rensset med filtrert destillert vann. Det destillerte vannet ble filtrert med et sprøytefilter med porestørrelse på 0,2 µm. Veldig små mengder av prøvene ble overført til testrørene og fortynnet med filtrert vann til partikkelintensiteten lå mellom 200-350 kHz. Både rensinga av testrørene og



tillagingen av prøvene ble gjort i en laminar airflow benk (LAF-benk). Det ble kjørt 3 paralleller av hver prøve i vesikkel-modus og intensitet fordeling, og hver parallell ble satt til å ta 10 minutter.

#### **4.5.5 Standardkurve**

Standardkurven ble laget ved å fortynne stamløsningen av resveratrol (500 µg/ml) i metanol. Det ble laget 0,25, 0,5, 2, 3, 4 og 5 µg/ml fortynninger, og absorbansen ble målt i UV-spektrofotometer ved bølgelengde 306 nm. Det ble gjort 3 målinger av hver løsning, og standardkurven ble laget ut i fra absorbansen som ble målt.

#### **4.5.6 Inkorporering**

For å bestemme hvor mye av virkestoffet som har blitt inkorporert i liposomene må det frie legemidlet bli separert fra liposomene. Dette ble gjort ved dialyse. Liposomsuspensjonen (800 µl) ble overført til en dialysetube, og denne ble lagt i et begerglass med 400 ml destillert vann i 4 timer. Begerglasset var tildekt med aluminiumsfolie for å beskytte mot lys. Etter 4 timer ble prøvene tatt ut, og 50 µl av innholdet i dialysetuben ble fortynnet i metanol til et totalt volum på 1000 µl. Ut fra denne fortynningen ble det pipettert ut 50 µl og 100 µl, som igjen ble fortynnet i metanol til et totalt volum på 1000 µl. Av dialysevannet ble det pipettert ut 500 µl som ble fortynnet i metanol til et totalt volum på 1000 µl. Absorbansen av dialysetuben og dialysevannet ble målt i UV-spektrofotometer ved bølgelengde 306 nm for å bestemme hvor mye virkestoff de inneholdt.

#### **4.5.7 Coating av liposomene**

Det ble laget 0,1, 0,3 og 0,6 % (w/v) kitosanløsninger, hvor 0,1 % kitosanløsning ble laget i 0,1 % (v/v) glacial eddiksyre, 0,3 % (w/v) kitosanløsning ble laget i halvt om halvt 0,1 og 0,5 % (v/v) glacial eddiksyre, mens 0,6 % (w/v) kitosanløsning ble laget i 0,5 % (v/v) glacial eddiksyre. Det ble tilsatt 2 ml kitosanløsning dråpevis til 2 ml av

liposomsuspensjonen mens den sto på magnetrører. Etter tilsetning av kitosanløsning fortsatte blandingen å stå på magnetrøreren i 1 time ved romtemperatur og konstant hastighet (Karn *et al.*, 2011), og aluminiumsfolie rundt for å beskytte mot lys, etterfulgt av inkubering i kjøleskap (4-8 °C) til neste dag.

#### **4.5.8 Måling av zetapotensiale**

Zetapotensialet ble målt med Zetasizer Nanoseries. Før måling ble cellen vasket med etanol og filtrert vann. Vannet ble filtrert med et sprøytefilter med porestørrelse på 0,2 µm for å få bort eventuelle uønskede partikler. Deretter ble 25 µl av prøven fortynnet i filtrert vann til et totalt volum på 1000 µl, overført cellen og målt. Hver måling bestod av 3 paralleller.

#### **4.5.9 Tillaging av acetatbuffer**

Acetatbuffer (pH 4,5) ble laget ved å løse 77,1 g/l CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> i destillert vann, deretter tilsette 70 ml eddiksyre før volumet til slutt ble justert til 1000 ml med destillert vann (Ph.Eur). Den målte pH var 4,6.

#### **4.5.10 Tillaging av fosfatbuffer**

Fosfatbuffer (pH 7,4) ble laget ved å løse 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> og 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i destillert vann før pH ble justert til 7,4 med 1 M NaOH (Sambrook and Russell, 2001).

#### **4.5.11 Frigjøring av virkestoff (*in vitro*)**

For å teste frigjøringen av virkestoff fra liposomene ble Franz Diffusion systemet brukt. Før bruk ble cellene vasket med henholdsvis metanol og destillert vann, først metanol i 30 minutter, deretter 15 minutter med destillert vann to ganger (til sammen 30 minutter). Varmen ble stilt til 37 °C. Reseptorkamrene (12 ml) ble fylt opp med acetatbuffer (pH 4,6), og cellofan, som ble brukt som membran, ble klippet til slik at

de passet til donorcellene og bløtet opp i samme buffer i 30 minutter før bruk. Av hver av prøvene (en med kitosan-coatede liposomer, en med ikke-coatede liposomer og en kontroll med resveratrol oppløst i propylenglykol) ble det tatt ut 600 µl som ble overført til donorcellene og hele systemet ble lukket med en silikonpropp. Det ble tatt ut prøver på 500 µl av reseptorkamrene etter ½, 1, 1 ½, 2, 2 ½, 3, 3 ½, 4 og 8 timer. Hver prøve som ble tatt ut ble erstattet med 500 µl buffer, slik at det hele tiden var 12 ml i reseptorkamrene. Mengde virkestoff ble bestemt ut i fra måling av absorpsjon ved UV-spektrofotometer.

#### **4.5.12 Testing av mukoadhesjon**

De mukoadhesive egenskapene til kitosan-coatede liposomer ble testet ved bruk av liposomer uten virkestoff og mucin. Liposomene som ble brukt til denne testen var ikke ekstrudert. Det ble brukt 400 mg/ml mucin i henholdsvis acetatbuffer og fosfatbuffer. Det ble pipettert ut 1 ml av coatede liposomer (0,1, 0,3 og 0,6 % (w/v) kitosan) og 1 ml liposomer som ikke var coatet for kontroll. Alle prøvene ble tilsatt 1 ml mucinløsning. Deretter ble de satt til inkubasjon i romtemperatur i 2 timer før de ble sentrifugert i ultrasentrifuge ved 215 000 g i 65 minutter (Pawar *et al.*, 2012). Det ble pipettert ut 4 paralleller med 200 µl av supernatanten, og målt absorbanse ved hjelp av UV-spektrofotometer ved bølgelengde 251 nm.

## 5. RESULTATER OG DISKUSJON

### 5.1 Karakterisering av liposomene

#### 5.1.1 Størrelse av liposomer

Etter å ha laget liposomer ved hjelp av tynn-film metoden vet vi verken størrelse eller hvordan størrelsesfordelingen til liposomene er. Liposomenes evne til å penetrere slimhinneoverflaten er avhengig av størrelse. Vi har valgt å bruke liposomer med gjennomsnittlig størrelse på 400 nm for å få nok virkestoff inkorporert i liposomene, da 200 nm ga for lav grad av inkorporering. Det er flere artikler som har brukt større liposomer, for eksempel Basavaraj og Betageri, og Bonechi *et al.* (Basavaraj & Betageri, 2014; Bonechi *et al.*, 2012). Størrelsen og størrelsesfordelingen til liposomene våre ble bestemt ved NICOMP fordeling, ved å måle intensiteten til vesiklene.

**Tabell 1:** Størrelse og størrelsesfordeling for ekstruderte liposomer

Ekstrudert	Vesikkelstørrelse				Polydispersitets indeks (PI)
	Topp 1 (nm)	Intensitet (%)	Topp 2 (nm)	Intensitet (%)	
800 nm	770 ± 122	91	194 ± 159	9	0,246
400 nm	504 ± 33	70	198 ± 25	29	0,216
400 nm *	587 ± 25	85	138 ± 24	15	0,445

\* Disse liposomene ble coatet med kitosan 0,1 % (w/v).

Verdiene viser gjennomsnitt av tre separate målinger ± SD.

Om partikkelstørrelsene er fordelt homogent kan forklares av polydispersitets indeks (PI, tabell 1), som går fra 0 til 1, der 0 er et system med bare en størrelse, og 1 som er et heterogent system (Isailović *et al.* 2013). En akseptabel PI-verdi er under 0,7. De fleste målingene våre viste to topper, som forklarer at fordelingen av partikkelstørrelsen til liposomene er bimodal. Vi har allikevel en lav PI-verdi fordi liposomene hovedsakelig er i samme størrelsesorden (Tabell 1). Det at vi har en bimodal fordeling viser at størrelsesfordelingen er delt i vår liposomsuspensjon. PI-

verdien er lavere for liposomene som ble ekstrudert ned til 400 nm, noe som kan forklares ved at jo flere ganger suspensjonen ble filtrert, jo bedre kontroll fikk vi på størrelsen. Vi ser også at vesikkelstørrelsen hovedsakelig er lik porestørrelsen på ekstrusjonsfilteret som ble brukt for å ekstrudere liposomsuspensjonen. Dette var som forventet, da Bonechi *et al.* fikk størrelsene veldig lik porestørrelsene (Bonechi et al. 2012a).

Av tabell 1 kan vi se at modifiseringen av liposomenes overflate ved å coate dem med kitosan (0,1 %) var tilfredsstillende fordi størrelsen på liposomene har økt. Kitosan har lagt seg som en hinne på overflaten til liposomene.

### **5.1.2 Overflateladning til liposomene**

Zetapotensialet beskriver overflateladningen til liposomene. I tillegg til å gi informasjon om hvordan overflateladningen til partiklene er, kan zetapotensialet også si noe om hvilke typer interaksjoner som oppstår mellom den aktive substansen og legemiddelbæreren; om virkestoffet er inkorporert i kjernen av liposomene, eller om det er adsorbent til overflaten. Hvis virkestoffet bare er adsorbent til overflaten av legemiddelbæreren er det ikke sikkert at det beskyttes mot enzymatisk nedbrytning og det kan frigis veldig raskt etter administrasjon (Barratt 1999). Zetapotensialet for liposomer uten resveratrol ble målt, og viser seg å ikke være signifikant forskjellig fra liposomer med resveratrol. Det bekrefter at resveratrol ikke er adsorbent til overflaten, men sannsynligvis er inkorporert inne i det lipofile dobbeltlaget i liposomene.

Zetapotensialet kan også si oss noe om hvordan interaksjonen mellom liposomene og slimhinneoverflaten er (Li et al. 2012). Fordi slimhinneoverflaten er negativt ladd og overflaten til kitosan-coatede liposomer er positivt ladd vil det oppstå en interaksjon.

**Tabell 2:** Zetapotensialet før og etter coating med kitosan 0,1 % (w/v)

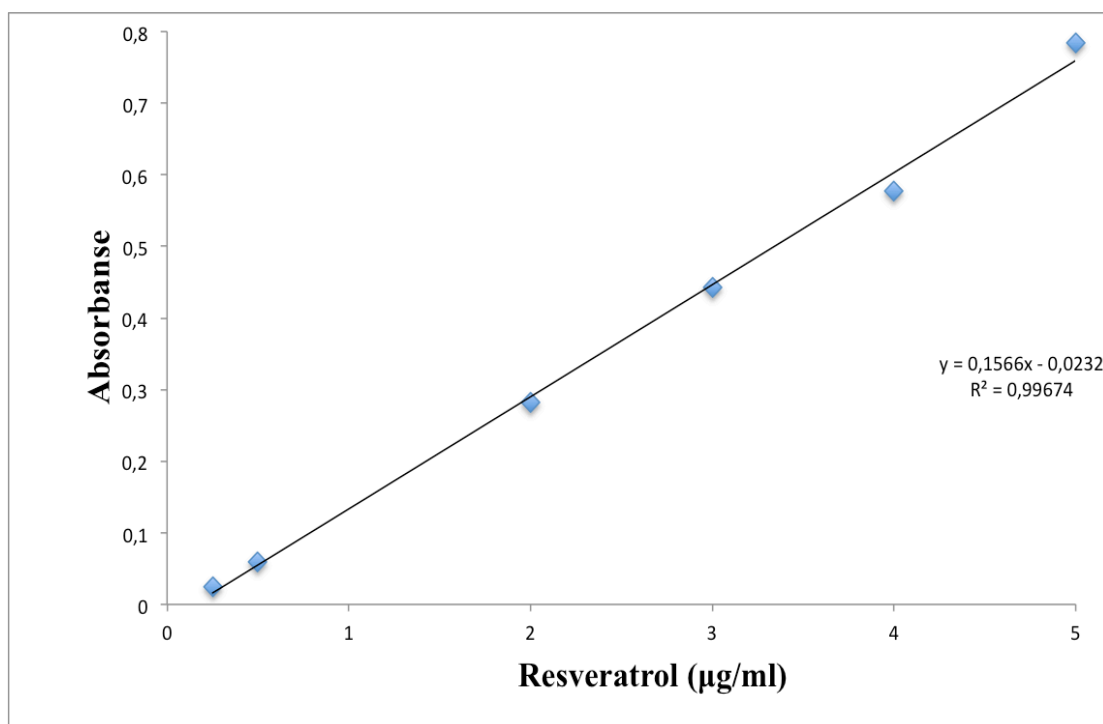
Prøver	Zetapotensial (mV)
Ikke-coatede liposomer	$-0,7 \pm 0,2$
Kitosan-coatede liposomer (0,1 %)	$1,5 \pm 0,1$
Ikke-coatede liposomer uten resveratrol	$-0,65 \pm 0,03$

Verdiene viser gjennomsnitt av tre separate målinger  $\pm$  SD.

Ikke-coatede liposomer har et negativt zetapotensial (tabell 2), det vil si at liposomene har en negativ overflateladning. Den negative ladningen kommer av at de polare hodegruppene til fosfolipidene har negativ ladning (Basavaraj % Betageri, 2014). Når vi modifierer overflaten til liposomene med kitosan 0,1 % (w/v) blir overflateladningen litt positivt (tabell 2). Dette kommer av at kitosan har en positiv ladning. Forskjellen i zetapotensialet bekrefter at modifiseringen var vellykket.

### 5.1.3 Grad av inkorporert resveratrol

For å bestemme hvor mye av virkestoffet som har blitt inkorporert i liposomene (entrapment efficiency; EE) ble det først laget en kalibreringskurve av resveratrol i metanol med konsentrasjoner på 0,25, 0,5, 2, 3, 4 og 5  $\mu\text{g/ml}$ . Kalibreringskurven ble uttrykt ved absorbanse av standard resveratrol ved 306 nm mot standard konsentrasjon av resveratrol (Figur 8).

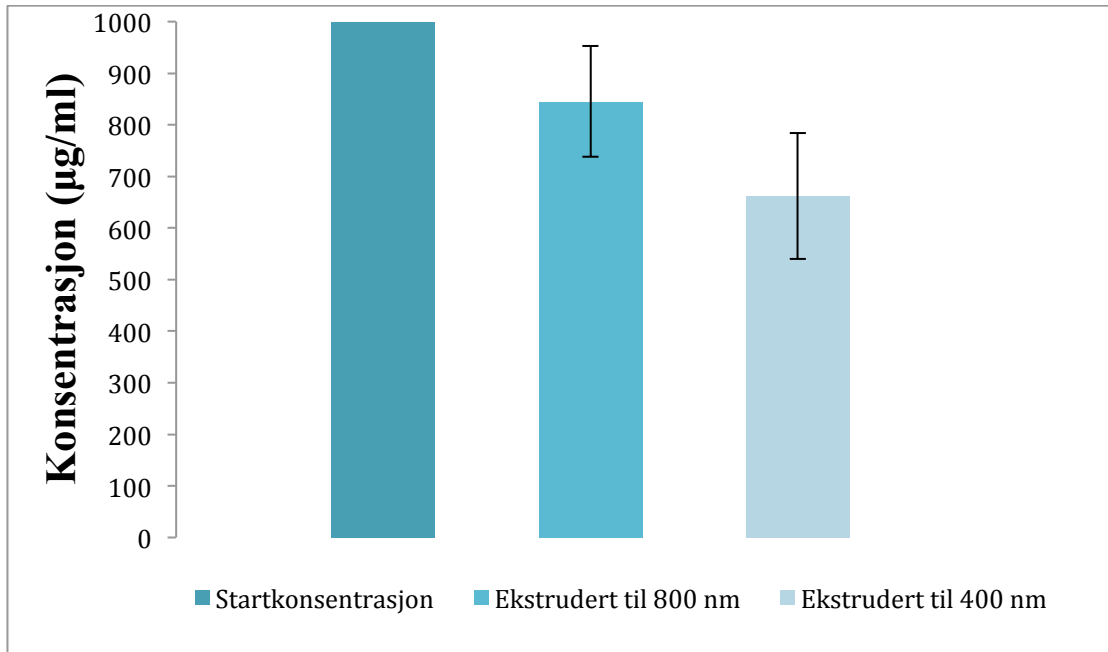


**Figur 8:** Kalibreringskurve for resveratrol i metanol

Konsentrasjonene ga en lineær linje mellom absorbansen til resveratrol, og korrelasjonskoeffisienten ble 0,99674.

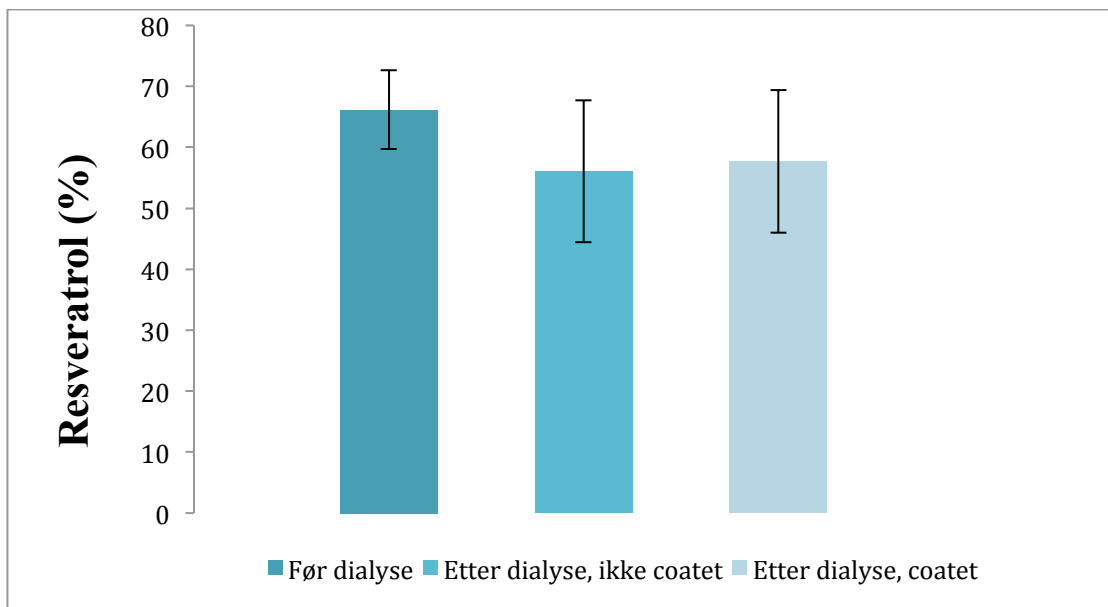
For at et legemiddel skal gi tilstrekkelig effekt kreves det en tilfredsstillende EE. EE påvirkes av virkestoffets fysiokjemiske egenskaper, blant annet dets løselighet (Mura *et al.*, 2007). Resveratrol er dårlig løselig i vann (log P 3,1) (Neves *et al.*, 2013), og vi forventet derfor at resveratrol skulle inkorporere seg i liposomenes lipofile dobbeltlag.

Startkonsentrasjonen av resveratrol i liposomsuspensjonen var 1000 mg/ml. Da liposomene ble ekstrudert, til henholdsvis 800 og 400 nm, ble konsentrasjonen litt lavere (figur 9). Dette kan være fordi noe av virkestoffet som ikke ble inkorporert i liposomene, dannet aggregat så de ble for store til å komme gjennom ekstrusjonsfilterene.



**Figur 9:** Tap av resveratrol under ekstrusjon  
Verdiene viser gjennomsnitt av tre separate målinger  $\pm$  SD.

Figur 10 viser at konsentrasjonen av resveratrol reduseres etter dialyse, både for coatede og ikke-coatede liposomer. Det forteller oss at det fantes fritt resveratrol som ikke hadde inkorporert seg i liposomene i liposomsuspensjonen før dialyse.



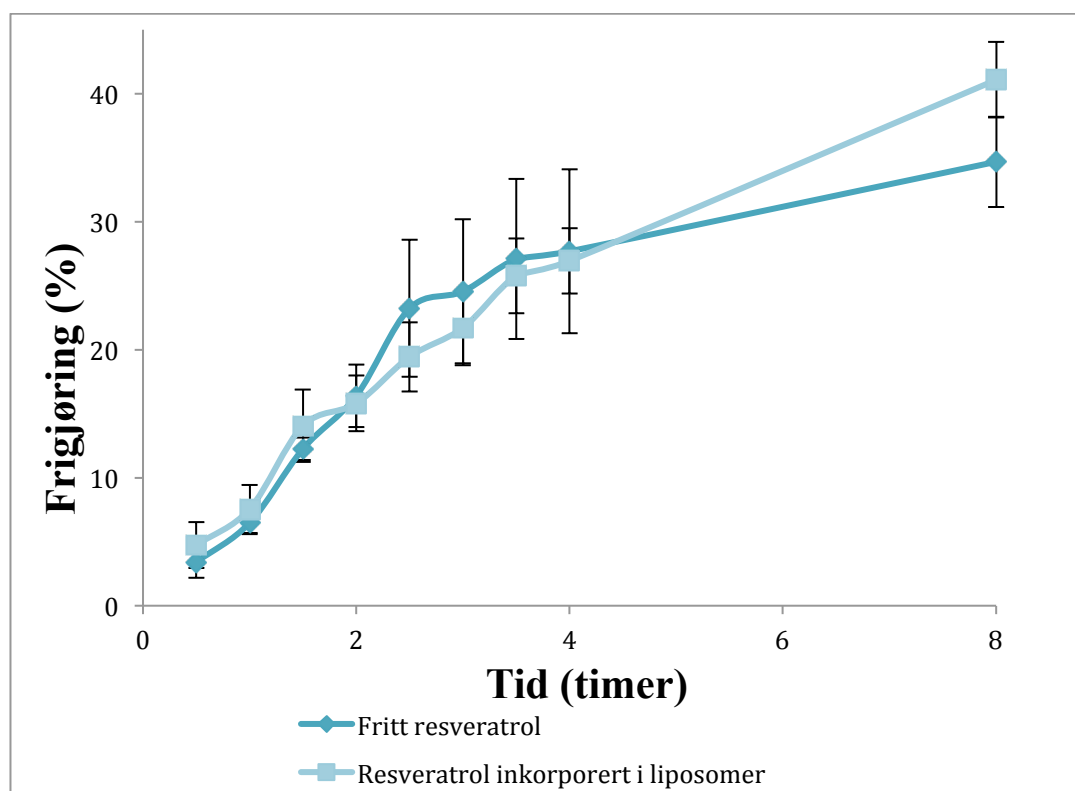
**Figur 10:** Konsentrasjon av resveratrol før og etter dialyse  
Verdiene viser gjennomsnitt av tre separate målinger  $\pm$  SD.



EE for resveratrol ble beregnet til å være 57 % av startkonsentrasjonen med et standardavvik på 1,1 %. En del resveratrol ble tapt under ekstrudering. EE for resveratrol i forhold til konsentrasjonen jeg hadde før dialyse (etter ekstrusjon) er 86 % med et standardavvik på 1,7 %. I en studie gjort av Bonechi *et al.* er EE for resveratrol > 50 %. De brukte samme metode som oss for å inkorporere resveratrol i liposomer, men de brukte kolesterol i stedet for fosfolipider. Liposomene de brukte var også litt mindre enn våre (Bonechi *et al.*, 2012).

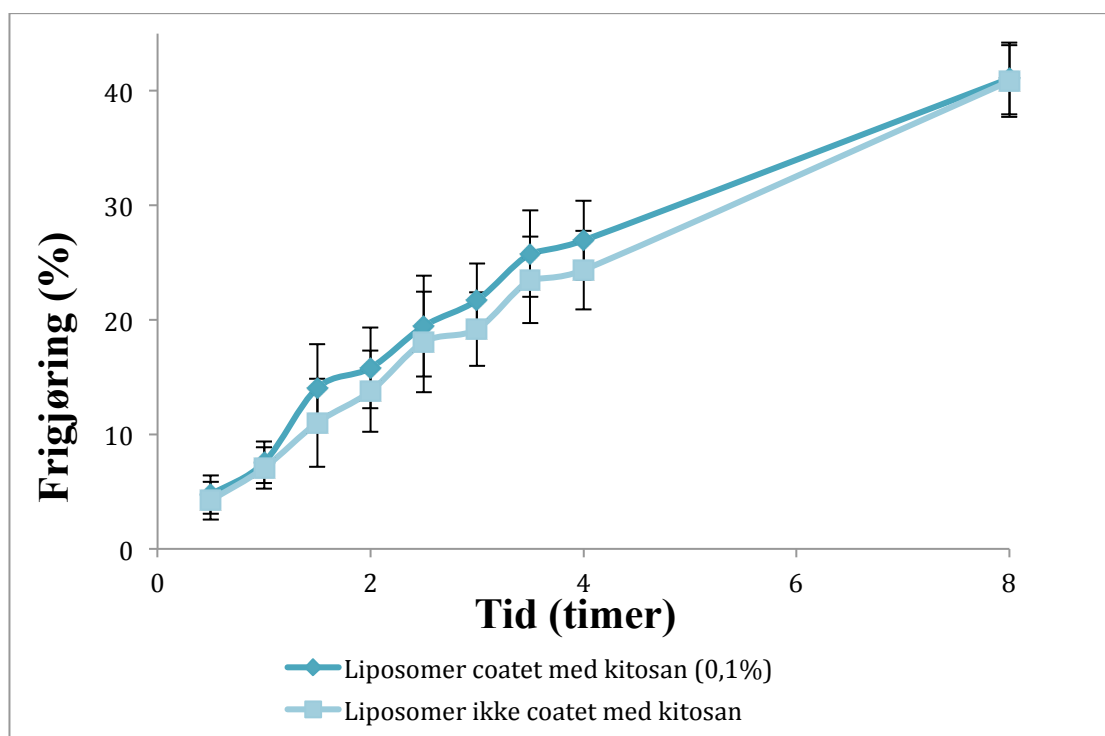
## 5.2 *In vitro* frigjøring av resveratrol

For å finne ut i hvilken grad resveratrol frigis fra liposomene ble Franz Diffusion brukt. Fordi disse liposomene skal administreres vaginalt, og den vaginale pH er mellom 3,5 og 4,5 (Aroutcheva *et al.*, 2001), benyttes acetatbuffer (pH 4,6) som reseptormedium. For å sammenligne frigjøringen av resveratrol inkorporert i liposomer med fritt resveratrol ble resveratrol oppløst i propylenglykol som kontroll.



**Figur 11:** *In vitro* frigjøring av resveratrol fra løsning (propylenglykol) og ikke-coatede liposomer. Verdiene viser gjennomsnitt av tre separate målinger  $\pm$  SD.

Av figur 11 kan vi se at inkorporering i liposomer forsinket frigivelsen av resveratrol de første fire timene. Fritt resveratrol (løst i propylenglykol) frigis raskere enn resveratrol inkorporert i liposomer (ikke-coatet) de første fire timene, før det avtar. Resveratrol inkorporert i liposomer viser en mer kontrollert og jevn frigivelse av resveratrol. Denne trenden ble også observert av Isailović *et al.* (Isailović *et al.*, 2013).

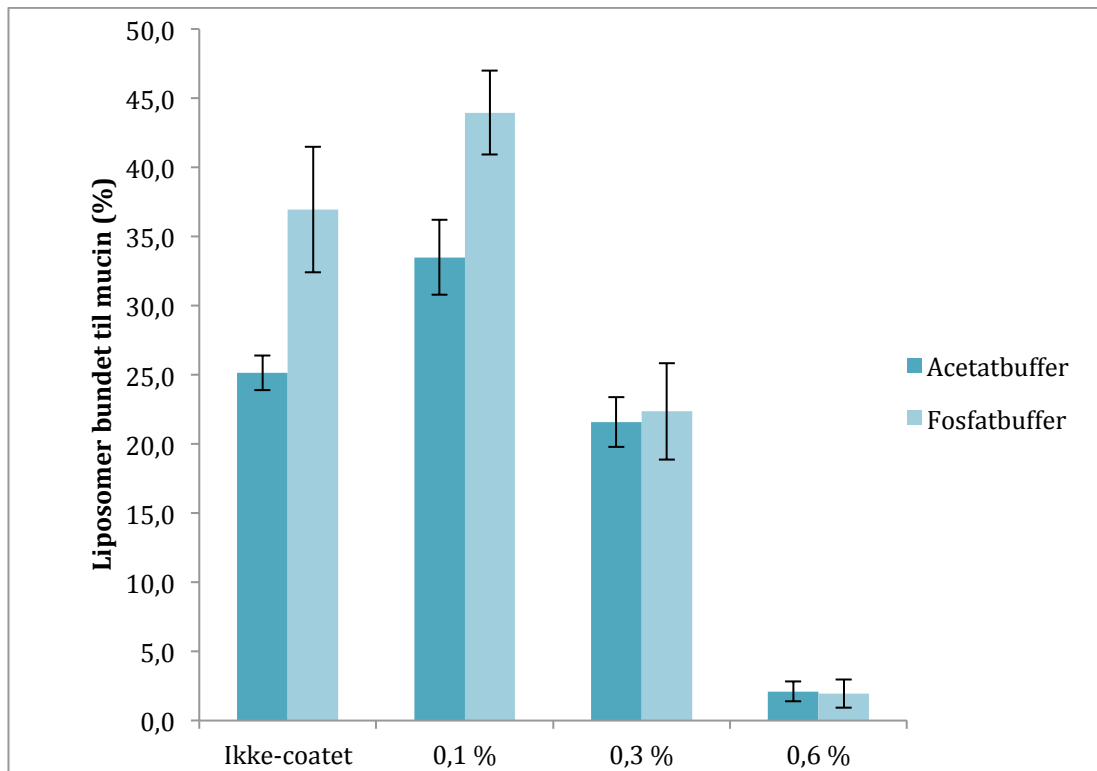


**Figur 12:** *In vitro* frigjøring av resveratrol fra ikke-coatede og kitosan-coatede (0,1 %) liposomer. Verdiene viser gjennomsnitt av tre separate målinger  $\pm$  SD.

Figur 12 viser at det å modifisere liposomene ved å coate de med 0,1 % (w/v) kitosan ikke påvirker frigivelsen av resveratrol spesielt mye, noe som er litt overraskende i og med at kitosan skal føre til en mer jevn og kontrollert frigivelse sammenlignet med liposomer uten kitosan (Dodane & Vilivalam, 1998). Vi kan så vidt se at frigivelsen av resveratrol er litt jevnere for coatede liposomer i forhold til de som ikke er coatet, men det er ikke veldig stor forskjell. Fordi forskjellen med og uten kitosan er så liten er det ikke godt å si om det er at resveratrol var inkorporert i liposomer eller om det er fordi liposomene var coatet med kitosan som utgjorde forskjellen mellom fritt resveratrol og resveratrol inkorporert i liposomer, med og uten kitosan.

### 5.3 Mucin-binding

For å finne ut om kitosan-coating gir liposomene gode mukoadhesive egenskaper, og om konsentrasjonen av kitosan påvirker de mukoadhesive egenskapene ble liposomene coatet med henholdsvis 0,1 %, 0,3 % og 0,6 % (w/v) kitosan. Det ble testet hvordan hver og en av disse konsentrasjonene binder seg til mucin. Mucinløsningene (400 µg/ml) var laget av mucin fra grisemage og henholdsvis acetatbuffer (pH 4,6) og fosfatbuffer (pH 7,4) for å se om de mukoadhesive egenskapene ble påvirket av pH. Til kontroll ble det brukt liposomer som ikke var coatet med kitosan. Liposomene i dette eksperimentet var ikke ekstrudert og inneholdt ikke resveratrol.



**Figur 13:** Mucin-binding for kitosan-coatede og ikke-coatede liposomer ved pH 4,6 og pH 7,4

Verdiene viser gjennomsnitt av tre separate malinger  $\pm$  SD.

Av figur 13 kan vi se at liposomene som var coatet med 0,1 % (w/v) kitosan festet seg best til mucin i fosfatbuffer, i forhold til de andre kitosankonsentrasjonene i henholdsvis acetat- og fosfatbuffer. Det vil si at 0,1 % (w/v) kitosan gir liposomene gode mukoadhesive egenskaper ved en pH på 7,4. Vi var ute etter mukoadhesive

egenskaper ved en pH lik pH i vagina, som acetatbufferen har, og av kitosankonsentrasjonene ved denne pH er det også 0,1 % (w/v) kitosan som fester seg best til mucin. Det vil si at 0,1 % (w/v) kitosan gir best mukoadhesive egenskaper både i pH 4,6 og pH 7,4. Filipovic-Grcic *et al.* sier at en forskjell i hvor mye mucin som fester seg til liposomene mellom ikke-coatede og coatede liposomer, kan forklare at kitosan er årsaken til de mukoadhesive egenskapene til liposomene (Filipovic-Grcic *et al.*, 2001). Forskjellen mellom ikke-coatede og kitosan-coatede (0,1 %) er ikke så stor som vi hadde forventet, og som Pawar *et al.* fant. Pawar *et al.* brukte samme separeringsmetode som oss, så hvorfor vi ikke fikk samme resultater som de, er uforklarlig (Pawar *et al.*, 2012). Filipovic-Grcic *et al.* brukte medium-molekylvekt kitosan, og fant at denne gir bedre adhesjon til mucin enn lav-molekylvekt kitosan (Filipovic-Grcic *et al.*, 2001). Det kan hende vi hadde fått bedre adhesjon til mucin hvis vi hadde prøvd en annen type kitosan. Medium-molekylvekt kitosan vil ha flere positivt ladde grupper som kan interagere med negativt ladd mucin, og derfor gi større adhesjon til mucin, enn lav-molekylvekt kitosan.

## 6. KONKLUSJON

Tynn-film metoden gir en god grad av inkorporering av resveratrol i liposomer. Ekstrudering viser seg å være en god metode for å redusere størrelsen på liposomene fordi størrelsen kommer veldig nært porestørrelsen på ekstrusjonsfilteret. Kitosan gir liposomene økt størrelse og zetapotensiale, som er en bekreftelse på at modifisering av liposomene med kitosan er vellykket. Når den mukoadhesive polymeren kitosan brukes for å modifisere overflaten til liposomene, forsinkes ikke frigjørelsen av inkorporert resveratrol nevneverdig, men frigivelsen er jevnere. Kitosan i rett konsentrasjon (0,1 % (w/v)) og pH (4,6) gjør at liposomene kan feste seg til mucin, noe som bekrefter at evnen til adhesjon til slimhinneoverflaten (pH mellom 3,5 og 4,5) økes ved bruk av kitosan.

Fordi resveratrol har en antiviral og mikrobicid effekt, er det ønskelig å utnytte disse når det gjelder behandling av flere seksuelt overførbare infeksjoner. På grunn av dets dårlige løselighet og korte halveringstid er det nødvendig å utvikle leveringssystemer for å få ønskelig effekt. Liposomer som leveringssystem for resveratrol kan være lovende, men det kreves at flere studier gjøres før man kan konkludere med det. Det trengs blant annet å gjøres *in vivo* studier.

## **7. PERSPEKTIV**

Fremover bør det gjøres flere studier på denne formuleringen. Blant annet bør det gjøres et lipid assay for å bestemme resveratrolinnhold i forhold til lipidinnholdet i liposomene. Mucin-testen bør også gjøres på nytt, da vi fikk litt uventede og uforklarlige resultater. Frigjøring og stabilitet ved tilstedeværelse av simulert vaginal væske bør studeres, i tillegg til frigjøring og penetrering gjennom epitel.

## 8. REFERANSER

- Abderrezak, A., P. Bourassa, J. Mandeville, R. Sedaghat-Herati, and H. Tajmir-Riahi. 2012. "Dendrimers Bind Antioxidant Polyphenols and Cisplatin Drug." *PloS One* 7: e33102.
- Acartürk, F. 2009. "Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems." *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 3: 193–205.
- Acatürk, F., and J. R. Robinson. 1996. "Effect of the Spermicide, Nonoxynol 9, on Vaginal Permeability in Normal and Ovariectomized Rabbits." *Pharmaceutical Research* 13: 950–51.
- Ahuja, A., R. K. Khar, and J. Ali. 1997. "Mucoadhesive Drug Delivery Systems." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 23: 489–515.
- Alexander, N., E. Baker, M. Kaptein, U. Karck, L. Miller, and E. Zampaglione. 2004. "Why Consider Vaginal Drug Administration?" *Fertility and Sterility* 82: 1–12.
- Allen, T. M., and P. R. Cullis. 2013. "Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 36–48.
- Amri, A., J.C. Chaumeil, S. Sfar, and C. Charrueau. 2012. "Administration of Resveratrol: What Formulation Solutions to Bioavailability Limitations?" *Journal of Controlled Release* 158: 182–93.
- Andrews, G. P., T. P. Lavery, and D. S. Jones. 2009. "Mucoadhesive Polymeric Platforms for Controlled Drug Delivery." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71: 505–18.
- Aroutcheva, A., D. Gariti, M. Simon, S. Shott, J. Faro, J. A. Simoes, A. Gurguis, and S. Faro. 2001. "Defense Factors of Vaginal Lactobacilli." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 185: 375–79.
- Baloglu, E., Z. A. Senyigit, S. Y. Karavana, and A. Bernkop-Schnürch. 2009. "Strategies to Prolong the Intravaginal Residence Time of Drug Delivery Systems." *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 12: 312–36.
- Bansil, R., and B. S. Turner. 2006. "Mucin Structure, Aggregation, Physiological Functions and Biomedical Applications." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11: 164–70.
- Barratt, G. 1999. "Characterization of Colloidal Drug Carrier Systems with Zeta Potential Measurements." *Pharmaceutical Technology Europe* 11: 25–32.
- Basavaraj, S., and G. V. Betageri. 2014. "Improved Oral Delivery of Resveratrol Using Proliposomal Formulation: Investigation of Various Factors Contributing to Prolonged Absorption of Unmetabolized Resveratrol." *Expert Opinion on Drug Delivery* 11: 493–503.

- Baur, J. A., and D. A. Sinclair. 2006. "Therapeutic Potential of Resveratrol: The in Vivo Evidence." *Nature Reviews. Drug Discovery* 5: 493–506.
- Beigi, R. H. 2012. *Sexually Transmitted Diseases*. 1. utgave. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Bhattarai, N., J. Gunn, and M. Zhang. 2010. "Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 83–99.
- Boddupalli, B. M., Z. N. K. Mohammed, R. A. Nath, and D. Banji. 2010. "Mucoadhesive Drug Delivery System: An Overview." *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 1: 381–87.
- Bonechi, C., S. Martini, L. Ciani, S. Lamponi, H. Rebmann, C. Rossi, and S. Ristori. 2012. "Using Liposomes as Carriers for Polyphenolic Compounds: The Case of Trans-Resveratrol." Edited by Heidar-Ali Tajmir-Riahi. *PloS One* 7: e41438.
- Budai, L., N. Kaszás, P. Gróf, K. Lenti, K. Maghami, I. Antal, I. Klebovich, I. Petrikovics, and M. Budai. 2013. "Liposomes for Topical Use: A Physico-Chemical Comparison of Vesicles Prepared from Egg or Soy Lecithin." *Scientia Pharmaceutica* 81: 1151–66.
- Catania, A., E. Barrajon-Catalán, S. Nicolosi, F. Cicirata, and V. Micol. 2013. "Immunoliposome Encapsulation Increases Cytotoxic Activity and Selectivity of Curcumin and Resveratrol against HER2 Overexpressing Human Breast Cancer Cells." *Breast Cancer Research and Treatment* 141: 55–65.
- Cone, R. A. 2009. "Barrier Properties of Mucus." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 75–85.
- D'Amati, G., C. R. T. di Gioia, L. Proietti Pannunzi, D. Pistilli, E. Carosa, A. Lenzi, and E. A. Jannini. 2003. "Functional Anatomy of the Human Vagina." *Journal of Endocrinological Investigation* 26: 92–96.
- Das Neves, J., M. Amiji, and B. Sarmiento. 2011. "Mucoadhesive Nanosystems for Vaginal Microbicide Development: Friend or Foe?" *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 3: 389–99.
- Das Neves, J., and M. F. Bahia. 2006. "Gels as Vaginal Drug Delivery Systems." *International Journal of Pharmaceutics* 318: 1–14.
- Docherty, J., M. M. Fu, J. M. Hah, T. J. Sweet, S. A. Faith, and T. Booth. 2005. "Effect of Resveratrol on Herpes Simplex Virus Vaginal Infection in the Mouse." *Antiviral Research* 67: 155–62.
- Docherty, J. J., M. M. Fu, and M. Tsai. 2001. "Resveratrol Selectively Inhibits Neisseria Gonorrhoeae and Neisseria Meningitidis." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 243–44.



- Dodane, V., and V. D. Vilivalam. 1998. "Pharmaceutical Applications of Chitosan." *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1: 246–53.
- Dua, J. S., A. C. Rana, and A. K. Bhandari. 2012. "Liposome: Methods of Preparation and Applications." *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* 3: 14–20.
- Edsman, K., and H. Hägerström. 2005. "Pharmaceutical Applications of Mucoadhesion for the Non-Oral Routes." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 3–22.
- Elnaggar, Y. S. R., W. M. El-Refaie, M. A. El-Massik, and O. Y. Abdallah. 2014. "Lecithin-Based Nanostructured Gels for Skin Delivery: An Update on State of Art and Recent Applications." *Journal of Controlled Release* 180: 10–24.
- Filipovic-Grcic, J., N. Škalko-Basnet, and I. Jalšienjak. 2001. "Mucoadhesive Chitosan-Coated Liposomes: Characteristics and Stability." *Journal of Microencapsulation* 18: 3–12.
- Friedl, H. E., S. Dünnhaupt, C. Waldner, and A. Bernkop-Schnürch. 2013. "Preactivated Thiomers for Vaginal Drug Delivery Vehicles." *Biomaterials* 34: 7811–18.
- Funt, M. I., J. D. Thompson, and H. Birch. 1978. "Normal Vaginal Axis." *Southern Medical Journal* 71: 1534–35, 1552.
- Gibis, M., N. Rahn, and J. Weiss. 2013. "Physical and Oxidative Stability of Uncoated and Chitosan-Coated Liposomes Containing Grape Seed Extract." *Pharmaceutics* 5: 421–33.
- Gradauer, K., J. Barthelmes, C. Vonach, G. Almer, H. Mangge, B. Teubl, E. Roblegg, et al. 2013. "Liposomes Coated with Thiolated Chitosan Enhance Oral Peptide Delivery to Rats." *Journal of Controlled Release* 172: 872–78.
- Hathout, R. M., T. J. Woodman, S. Mansour, N. D. Mortada, A. S. Geneidi, and R. H. Guy. 2010. "Microemulsion Formulations for the Transdermal Delivery of Testosterone." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40: 188–96.
- Hupfeld, S., A. M. Holsæter, M. Skar, C. B. Frantzen, and M. Brandl. 2006. "Liposome Size Analysis by Dynamic/Static Light Scattering upon Size Exclusion-/Field Flow-Fractionation." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6: 3025–31.
- Hussain, A., and F. Ahsan. 2005. "The Vagina as a Route for Systemic Drug Delivery." *Journal of Controlled Release* 103: 301–13.
- Iqbal, M. A., S. Md, J. K. Sahni, S. Baboota, S. Dang, and J. Ali. 2012. "Nanostructured Lipid Carriers System: Recent Advances in Drug Delivery." *Journal of Drug Targeting* 20: 813–30.

- Isailović, B. D., I. T. Kostić, A. Zvonar, V. B. Đorđević, M. Gašperlin, V. A. Nedović, and B. M. Bugarski. 2013. "Resveratrol Loaded Liposomes Produced by Different Techniques." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 19: 181–89.
- Jang, M., L. Cai, G. O Udeani, K. V Slowing, C. F Thomas, C. Beecher, and J. M Pezzuto. 1997. "Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes." *Science* 275: 218–20.
- Jones, D. S. 2012. "Chitosan: Pharmaceutical Excipients." *Medicines Complete*. <http://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/1001936100.htm>.
- Karn, P. R., Z. Vanić, I. Pepić, and N. Skalko-Basnet. 2011. "Mucoadhesive Liposomal Delivery Systems: The Choice of Coating Material." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 37: 482–88.
- Kaur, L., P. Kaur, and M. U. Khan. 2013. "Liposome as a Drug Carrier – A Review." *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 3: 121–28.
- Khanvilkar, K., M. D. Donovan, and D. R. Flanagan. 2001. "Drug Transfer through Mucus." *Advanced Drug Delivery Reviews* 48: 173–93.
- Khutoryanskiy, V. V. 2011. "Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers." *Macromolecular Bioscience* 11: 748–64.
- Knuth, K., M. Amiji, and J. R. Robinson. 1993. "Hydrogel Delivery Systems for Vaginal and Oral Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* 11: 137–67.
- Kumar, K., N. Dhawan, H. Sharma, S. Vaidya, and B. Vaidya. 2013. "Bioadhesive Polymers: Novel Tool for Drug Delivery." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology (Print)*, doi:10.3109/21691401.2013.815194.
- Kumar, M. N. V. R., R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, and A. J. Domb. 2004. "Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives." *Chemical Reviews* 104: 6017–84.
- Laffleur, F. 2014. "Mucoadhesive Polymers for Buccal Drug Delivery." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40: 591–98.
- Lee, C. C., J. A. MacKay, J. M. J. Fréchet, and F. C. Szoka. 2005. "Designing Dendrimers for Biological Applications." *Nature Biotechnology* 23: 1517–26.
- Li, W.-Z., N. Zhao, Y.-Q. Zhou, L.-B. Yang, W. Xiao-Ning, H. Bao-Hua, K. Peng, and Z. Chun-Feng. 2012. "Post-Expansile Hydrogel Foam Aerosol of PG-Liposomes: A Novel Delivery System for Vaginal Drug Delivery Applications." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47: 162–69.
- Machado, R. M., A. Palmeira-de-Oliveira, J. Martinez-De-Oliveira, and R. Palmeira-de-Oliveira. 2013. "Vaginal Films for Drug Delivery." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102: 2069–81.

- Mastromarino, P., B. Vitali, and L. Mosca. 2013. "Bacterial Vaginosis: A Review on Clinical Trials with Probiotics." *The New Microbiologica* 36: 229–38.
- Mehnert, W. 2001. "Solid Lipid Nanoparticles Production, Characterization and Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* 47: 165–96.
- Moi, H., and J. M. Maltau. 2008. *Seksuelt Overførbare Infeksjoner Og Genitale Hudsykdommer*. 2. utgave. Oslo: Gyldendal, Norsk Forlag AS.
- Moncla, B. J., and S. L. Hillier. 2005. "Why Nonoxynol-9 May Have Failed to Prevent Acquisition of Neisseria Gonorrhoeae in Clinical Trials." *Sexually Transmitted Diseases* 32: 491–94.
- Muller, R. 2000. "Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery: A Review of the State of the Art." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 161–77.
- Mura, P., F. Maestrelli, M. L. González-Rodríguez, I. Michelacci, C. Ghelardini, and A. M. Rabasco. 2007. "Development, Characterization and in Vivo Evaluation of Benzocaine-Loaded Liposomes." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67: 86–95.
- Muzzarelli, R., and C. Muzzarelli. 2005. *Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences*. Vol. 186. Advances in Polymer Science. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- Nawrocki, E. M., H. W. Bedell, and T. L. Humphreys. 2013. "Resveratrol Is Cidal to Both Classes of Haemophilus Ducreyi." *International Journal of Antimicrobial Agents* 41: 477–79.
- Neves, A. R., M. Lúcio, S. Martins, J. L. C. Lima, and S. Reis. 2013. "Novel Resveratrol Nanodelivery Systems Based on Lipid Nanoparticles to Enhance Its Oral Bioavailability." *International Journal of Nanomedicine* 8: 177–87.
- Patel, N., and S. Panda. 2012. "Liposome Drug Delivery System : A Critic Review." *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research* 2: 169–75.
- Pawar, H., D. Douroumis, and J. S. Boateng. 2012. "Preparation and Optimization of PMAA-Chitosan-PEG Nanoparticles for Oral Drug Delivery." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 90: 102–8.
- Ph.Eur. "Acetate Buffer Solution."  
[http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/04\\_reagents/4.1.\\_\\_reagents\\_standard\\_solutions\\_buffer\\_solutions/4.1.3. Buffer solutions.pdf](http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/04_reagents/4.1.__reagents_standard_solutions_buffer_solutions/4.1.3.Buffer%20solutions.pdf).
- Piñeiro, Z., M. Palma, and C. G. Barroso. 2006. "Determination of Trans-Resveratrol in Grapes by Pressurised Liquid Extraction and Fast High-Performance Liquid Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1110: 61–65.

- Ravani, L., E. Esposito, C. Bories, V. L.-L. Moal, P. M. Loiseau, M. Djabourov, R. Cortesi, and K. Bouchemal. 2013. "Clotrimazole-Loaded Nanostructured Lipid Carrier Hydrogels: Thermal Analysis and in Vitro Studies." *International Journal of Pharmaceutics* 454: 695–702.
- Richardson, J. L., and L. Illum. 1992. "Routes of Delivery: Case Studies." *Advanced Drug Delivery Reviews* 8: 341–66.
- Rogstad, K. E. 2011. *ABC of Sexually Transmitted Infections*. 6. utgave. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Saltzman, W. M., M. L. Radomsky, K. J. Whaley, and R. A. Cone. 1994. "Antibody Diffusion in Human Cervical Mucus." *Biophysical Journal* 66: 508–15.
- Sambrook, J. F., and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 3*. 3. utgave. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shaikh, R., T. R. Raj Singh, M. J. Garland, A. D. Woolfson, and R. F. Donnelly. 2011. "Mucoadhesive Drug Delivery Systems." *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 3: 89–100.
- Shaji, J., and V. Bhatia. 2013. "Proliposomes: A Brief Overview of Novel Delivery System." *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4: 150–60.
- Sigurdsson, H. H., J. Kirch, and C.-M. Lehr. 2013. "Mucus as a Barrier to Lipophilic Drugs." *International Journal of Pharmaceutics* 453: 56–64.
- Singh, G., and R. S. Pai. 2014. "Trans-Resveratrol Self-Nano-Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) with Enhanced Bioavailability Potential: Optimization, Pharmacokinetics and in Situ Single Pass Intestinal Perfusion (SPIP) Studies." *Drug Delivery*, doi:10.3109/10717544.2014.885616.
- Sogias, I. A., A. C. Williams, and V. V. Khutoryanskiy. 2008. "Why Is Chitosan Mucoadhesive?" *Biomacromolecules* 9: 1837–42.
- Srikrishna, S., and L. Cardozo. 2013. "The Vagina as a Route for Drug Delivery: A Review." *International Urogynecology Journal* 24: 537–43.
- Teigen, P. K. 2011. "Skjedens Mikroflora Og Bakteriell Vaginose". Universitetet i Oslo.
- Torchilin, V. P. 2007. "Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives." *Pharmaceutical Research* 24: 1–16.
- Valenta, C. 2005. "The Use of Mucoadhesive Polymers in Vaginal Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 1692–1712.
- Vanaja, K., M. A. Wahl, L. Bukarica, and H. Heinle. 2013. "Liposomes as Carriers of the Lipid Soluble Antioxidant Resveratrol: Evaluation of Amelioration of Oxidative Stress by Additional Antioxidant Vitamin." *Life Sciences* 93: 917–23.

- Vergaro, V., Y. M. Lvov, and S. Leporatti. 2012. "Halloysite Clay Nanotubes for Resveratrol Delivery to Cancer Cells." *Macromolecular Bioscience* 12: 1265–71.
- Vinod, K., T. Rohit Reddy, S. Sandhya, D. Banji, and B. Venkatram Reddy. 2012. "Critical Review on Mucoadhesive Drug Delivery Systems." *Journal for Drugs and Medicines* 4: 7–28.
- Wang, S., R. Su, S. Nie, M. Sun, J. Zhang, D. Wu, and N. Moustaid-Moussa. 2014. "Application of Nanotechnology in Improving Bioavailability and Bioactivity of Diet-Derived Phytochemicals." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25: 363–76.
- Warren, D. B., M. U. Anby, A. Hawley, and B. J. Boyd. 2011. "Real Time Evolution of Liquid Crystalline Nanostructure during the Digestion of Formulation Lipids Using Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering." *Langmuir* 27: 9528–34.
- Zhang, J., Y. Lv, S. Zhao, B. Wang, M. Tan, H. Xie, G. Lv, and X. Ma. 2014. "Effect of Lipolysis on Drug Release from Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS) with Different Core/Shell Drug Location." *Pharmscitech*, doi:10.1208/s12249-014-0096-9.

