

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA SULJAKOVIĆ

**RAZVOJ IN UPORABA *IN VITRO* MODELA ZA
VREDNOTENJE LIPOSOMOV S KURKUMINOM
ZA VAGINALNO APLIKACIJO**

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF AN *IN VITRO* MODEL
FOR EVALUATION OF LIPOSOMES WITH CURCUMIN FOR
VAGINAL DELIVERY**

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla, mag. farm. in somentorstvom dr. Katje Berginc, mag farm.

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Albinu Kristlu, mag. farm in somentorici dr. Katji Berginc, mag. farm. za vse strokovne nasvete in vsestransko pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi dragim staršem in fantu, ki so mi ob težkih trenutkih vedno stali ob strani skozi celoten študij.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Albina Kristla, mag. farm. in somentorstvom dr. Katje Berginc, mag. farm..

Sabina Suljaković

KAZALO

POVZETEK	1
ABSTRACT	2
1 UVOD	3
1.1 Vaginalna sluznica	3
1.1.1 Lastnosti človeške vaginalne sluznice	4
1.1.2 Kravja vaginalna sluznica	10
1.2 Vaginalni dostavni sistemi	12
1.2.1 Karbopol	14
1.2.2 Hitosan	16
1.3 Mukoadhezija	18
1.4 Kurkumin	21
2 NAMEN	26
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 Materiali	27
3.1.1 Spojine	27
3.1.2 Aparature in ostali materiali	28
3.2 Metode	28
4 REZULTATI	41
4.1 Permeabilnost kurkumina	41
4.1.1 Permeabilnost kurkumina skozi prazen Transwell filter	41
4.1.2 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit z 1 m/v% disperzijo glikoproteinov	41
4.1.3 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s 3 m/v% disperzijo glikoproteinov	42
4.1.4 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s 5 m/v% disperzijo glikoproteinov	42
4.1.5 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s 7 m/v% disperzijo glikoproteinov	43
4.1.6 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit z 9 m/v% disperzijo glikoproteinov	43
4.1.7 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s kravjim vaginalnim mukusom	44

4.2	Komentar rezultatov za permeabilnost	45
4.2.1	Raztopina	46
4.2.2	Neobloženi liposomi.....	47
4.2.3	Mukoadhezivni liposomi z 0.1% hitosana.....	49
4.2.4	Mukoadhezivni liposomi z 0.6% hitosana.....	50
4.2.5	Mukoadhezivni liposomi z 0.1% karbopolom.....	51
4.2.6	Mukoadhezivni liposomi z 0.6% karbopolom.....	53
4.3	Jakost mukoadhezije	55
4.4	Komentar rezultatov za jakost mukoadhezije	55
5	RAZPRAVA	57
5.1	Permeabilnost kurkumina skozi mukus	57
5.2	Mukoadhezija.....	63
6	SKLEP.....	66
7	LITERATURA.....	67

POVZETEK

Številne *in vitro* ter *in vivo* raziskave potrjujejo protivnetne, antioksidativne in antikancerogene učinke kurkumina. Zaradi neugodnih biofarmaceutskih lastnosti učinkovine (slaba vodotopnost in permeabilnost skozi črevesno steno, nestabilnost v prebavnem traktu itd.) je peroralna aplikacija neučinkovita za doseganje terapevtskih plazemskih koncentracij kurkumina, tudi pri uporabi enkratnih 12 g odmerkov. Da bi izkoristili ugodne farmakološke lastnosti te naravne substance, avtorji v številnih študijah preučujejo aplikacijo kurkumina v novejših dostavnih sistemih z namenom doseganja lokalnih protivnetnih in protirakastih učinkov.

V nalogi smo razvili *in vitro* model za človeški vaginalni mukus in z njegovo pomočjo ovrednotili permeabilnost kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi in obloženi – bioadhezivni liposomi). Vaginalni mukus smo ponazorili z uporabo disperzij naraščajočih koncentracij Sigma glikoproteinov v umetni vaginalni tekočini ter z izoliranim kravjim vaginalnim mukusom. Kot dostavni sistem za kurkumin smo uporabili (ne)obložene liposome, pripravljene iz fosfatidilholina. Obloženi liposomi so v oblogi vsebovali 0.1% ali 0.6% hitosana oz. karbopola. V drugem delu smo vrednotili moč bioadhezije (ne)obloženih liposomov v *in vitro* pogojih na svežem izoliranem kravjem vaginalnem tkivu.

Ugotovili smo, da koncentracija glikoproteinov, ki se med menstrualnim ciklusom spreminja pod vplivom nihanja plazemskih koncentracij ženskih spolnih hormonov, pomembno vpliva na permeabilnost kurkumina skozi vaginalni mukus. Potrdili smo, da je oblaganje liposomov z mukoadhezivnimi polimeri upravičen pristop pri izdelavi vaginalnih dostavnih sistemov za kurkumin, saj se je permeabilnost kurkumina značilno izboljšala skozi izoliran kravji mukus kot tudi skozi umetno pripravljen mukus z višjimi koncentracijami glikoproteinov. Poleg izboljšanja permeabilnosti kurkumina, mukoadhezivni dostavni sistemi omogočajo tudi podaljšano zadrževanje oblik na mestu aplikacije. Pri testiranju obloženih liposomov v pogojih *in vitro* smo namreč potrdili, da se njihov čas zadrževanja na mestu aplikacije podaljša, kar poleg ugodnega vpliva na izboljšanje permeabilnosti lahko pomembno tudi vpliva na lokalno dostavo kurkumina.

ABSTRACT

Several *in vitro* and *in vivo* studies confirmed antitumour, anti-inflammatory and anti-oxidant properties of curcumin. However, because of its unfavourable biopharmaceutical properties (i.e. low solubility and permeability, instability etc.) it is impossible to achieve therapeutic plasma curcumin concentrations after per-oral application even with extremely high, single 12 g doses. Therefore, to exploit health-beneficial curcumin properties, several studies have investigated preventive and therapeutic curcumin effects achieved with local application by using novel drug delivery systems.

An attempt was made to establish an *in vitro* vaginal model of human mucus, which was then utilized to evaluate curcumin permeability into acceptor solution from different vaginal formulations (solution, non-coated liposomes, and coated liposomes). Vaginal mucus was simulated with increasing concentrations of Sigma glycoproteins in simulated vaginal solution and with isolated cow vaginal mucus. Liposomes were composed of phosphatidylcholine. Coated liposomes contained chitosan or carbopol in their coatings in 0.1% or 0.6%. *In vitro* bioadhesive strength of non-coated and coated liposomes on vaginal cow tissue was also evaluated.

Results showed that mucus composition (i.e. the concentration of glycoproteins, which is under the influence of plasma estrogen and gestagen concentration) significantly influences curcumin permeability. Based on our data, coating with mucoadhesive polymers (chitosan and carbopol) was justified, because the permeability of curcumin through isolated cow mucus and through simulated mucus substantially improved with higher concentrations of glycoproteins. Besides that, the strength of bioadhesion was stronger with coated liposomes, which could prolong liposome residence time at the site of application and increase curcumin local bioavailability.

1 UVOD

Zanimanje farmacevtske industrije za ne-peroralno aplikacijo zdravilnih učinkovin skozi različne sluznice (npr. nazalna, bukalna, vaginalna, rektalna idr.) izrazito narašča bodisi z namenom doseganja sistemskih bodisi lokalnih učinkov; zlasti za substance, ki zaradi neugodnih biofarmacevtskih lastnosti (npr. slaba vodotopnost, slaba permeabilnost skozi črevesno steno, obsežen predsistemski metabolizem v črevesnem lumnu ali v črevesni steni, jetrni metabolizem prvega prehoda, draženje gastrointestinalnega trakta, vpliv hrane ali fizikalnih sprememb na absorpcijo učinkovin itd.) ne dosegajo terapevtskih plazemskih koncentracij po peroralnem jemanju (1,2).

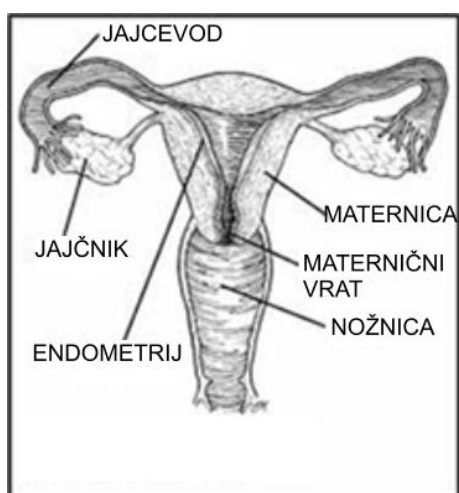
1.1 Vaginalna sluznica

Vse do leta 1918 je veljalo, da se učinkovine skozi vaginalno sluznico ne absorbirajo. V naslednjih letih se je to zmotno prepričanje spremenilo z objavo izsledkov študij, ki so nedvoumno dokazale nastop sistemskih terapevtskih učinkov vaginalno apliciranih učinkovin (3). Vaginalna aplikacija omogoča lokalno ali sistemsko terapevtsko učinkovitost pri ženskah (3,4), kjer se lahko izognemo zapletom, povezanih s peroralno ali parenteralno aplikacijo (4). Vaginalna sluznica omogoča enostavno in neinvazivno administracijo učinkovin (3,5), ki se zaradi značilno velike absorpcijske površine in gostega žilnega pleteža, ki zagotavlja dobro prekrvavljenost, dobro absorbirajo. Omenjene lastnosti sluznice tako omogočajo dobro permeabilnost učinkovin, predvsem za majhne molekule (5,6). Lastnosti vaginalne sluznice se spreminjajo skladno s cikličnim nihanjem plazemskih koncentracij ženskih spolnih hormonov. Da bi zagotovili čim večjo učinkovitost in ponovljivost po aplikaciji vaginalnih pripravkov, moramo vplive ciklično spreminjajočih se lastnosti (anatomske in fiziološke lastnosti) vaginalne sluznice na farmacevtsko obliko ter učinkovino tudi ustrezno ovrednotiti. Za vaginalno sluznico so tako značilne ciklične spremembe debeline vaginalnega epitelijskega tkiva, sestave vaginalne mikroflore, pH ter količine, sestave in fizikalno-kemijskih lastnosti vaginalnega mukusa (1,3,4).

1.1.1 Lastnosti človeške vaginalne sluznice

a) Anatomske lastnosti – debelina vaginalne sluznice

Vaginalna votlina predstavlja pomemben del ženskega reproduktivnega sistema (Slika 1), ki oblikuje približno 7.5 - 12 cm dolg kanal, potekajoč vse od zunanjih genitalij do maternice. Stena vaginalne sluznice je troslojna; gradijo jo epitelij, mišični sloj in vezivna vlakna (t.i. tunica adventitia). Tekom menstrualnega ciklusa se debelina vaginalnega epitelija spreminja. Ob porastu plazemskih koncentracij estrogenov se epitelij odebeli, kar sovpada s proliferativno fazo ciklusa, ko je zaradi odebelitve endometrija maternice omogočeno ugnezdenje oplojenega jajčeca (t.j. prva polovica menstrualnega ciklusa). V drugi polovici menstrualnega ciklusa lahko zaznamo padec estrogenov in porast plazemskih koncentracij progesterona, ki vzdržuje konstantno debelino vaginalne sluznice ter endometrija vse do padca koncentracij progesterona, ko nastopi krvavitev, luščenje maternične stene ter posledično tudi zmanjšanje debeline vaginalne sluznice. Čeprav so spremembe debeline vaginalnega epitelija manj izrazite kot na materničnem endometriju, lahko značilno spremenijo učinkovitost lokalno apliciranih farmacevtskih oblik oz. učinkovin. Debelina vaginalne sluznice se spreminja tudi s starostjo. Po menopavzi se zaradi upada estrogenov, vaginalni epitelij izrazito stanjša, kar z vidika lokalne aplikacije učinkovin zaradi zmanjšane debeline bariere, ugodno vpliva na absorpcijo učinkovin. Izboljšanje absorpcije skozi vaginalni epitelij v menopavzi je že bilo dokazano v primeru estrogena in drugih steroidov (1,3,4,5).



Slika 1: Ženski reproduktivni organi.

b) Vaginalna mikroflora

Vaginalno mikrofloro sestavljajo bakterije *Lactobacillus acidophilus*, od katerih so najpogostejši sevi *L. gasseri* CRL1412, *L. gasseri* CRL1421 in *L. delbrueckii* CRL1461 (7). Omenjeni organizmi pretvarjajo glikogen v mlečno kislino, ki služi kot pufer in vzdržuje vaginalni fiziološki pH med 3.5 in 4.5 v reproduktivni dobi in preprečuje razrast patogenih bakterij. Kljub temu, da so patogene bakterije v vaginalni votlini nenehno prisotne (npr. *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter* spp. in druge) (8), je njihova kolonizacija v kislem okolju nožnice preprečena, kadar prevladujejo mlečno-kislinske bakterije. Ob morebitnem dvigu pH zaradi upada števila koristnih bakterij, se patogene bakterije razrastejo in povzročijo lokalno infekcijo.

Količina glikogena narašča skozi celoten menstrualni cikel vse do luščenja materničnega epitelija, ko kot posledica znižanja plazemskih koncentracij hormonov, količina glikogena v nožnici sočasno upade. Padeč plazemskih koncentracij estrogena v menopavzi značilno zaznamuje tudi količino glikogena v vaginalnem kanalu starejših žensk. Zaradi njegovega pomanjkanja, *Lactobacillus acidophilus* ne predstavljajo več dominantnih acidofilnih mikroorganizmov, kar povzroči porast lokalnega pH ter tako razrast drugih mikroorganizmov, ki sicer ne bi uspevali v kislih pogojih (6).

Nekaj urno reverzibilno zvišanje vaginalnega pH lahko zaznamo tudi ob ejakulaciji (pH semenske tekočine je približno 7,0 – 8,0). Nihanja vaginalnega pH lahko sprožijo tudi krvavitve, spolna vzbujenost, prihod izločkov iz maternice ali materničnega vratu v nožnico ali uporaba različnih kozmetičnih izdelkov za intimno nego (npr. tamponi in adsorbenti), ki nožnico alkalizirajo in sperejo zaščitno plast laktobacilov. Na količino glikogena in pH v nožnici lahko vpliva tudi uporaba kontraceptivov, spremljajoče bolezni in porod (1,3,4).

Zaradi visoke občutljivosti nožnice na dvig pH in posledično razvoj različnih infekcij, mora biti vaginalna farmacevtska oblika zasnovana tako, da ne bo dolgotrajno ali irreverzibilno vplivala na vzdrževanje kislega lokalnega pH, oz. da njena prisotnost ne bo kakorkoli vplivala na integriteto okoliškega tkiva (3,4).

c) Vaginalni izločki – vaginalni mukus

Kljub temu, da v vaginalni sluznici ni eksokrinih žlez, ki bi izločale vaginalni mukus in njegove sestavine, predstavlja le-ta kompleksno mešanico izločkov iz materničnega vratu, maternice, jajcevodov ter tekočin, ki s transudacijo iz krvnih žil skupaj z odluščenimi vaginalnimi celicami, levkociti, encimi, encimskimi inhibitorji, laktobakterijami in drugimi mikroorganizmi, proteini, ogljikovimi hidrati, aminokislinami in aromatičnimi derivati predstavljajo poglavitne sestavine vaginalnega izločka (9). Dnevno se izloči približno 1 do 11 mL mukusa v reproduktivnem obdobju oz. 50% manj v času menopavze (6). Povišane plazemske koncentracije estrogenov ter spolno vzbujenje povečajo količino izločene tekočine (4).

Vaginalni mukus je bistra, viskozna sluz, ki vpliva na gibljivost spermijev, deluje kot njihov rezervoar in zagotavlja spermijem glukozo, ki jo porabijo kot vir energije za primerno gibljivost in potovanje skozi maternični vrat do jajcevodov (10). V drugi polovici menstrualnega ciklusa se zaradi porasta progesterona spremeni sestava in fizikalno-kemijske lastnosti mukusa, zaradi česar je gibanje spermijev znižano in posledično možnost zanositve (5,11).

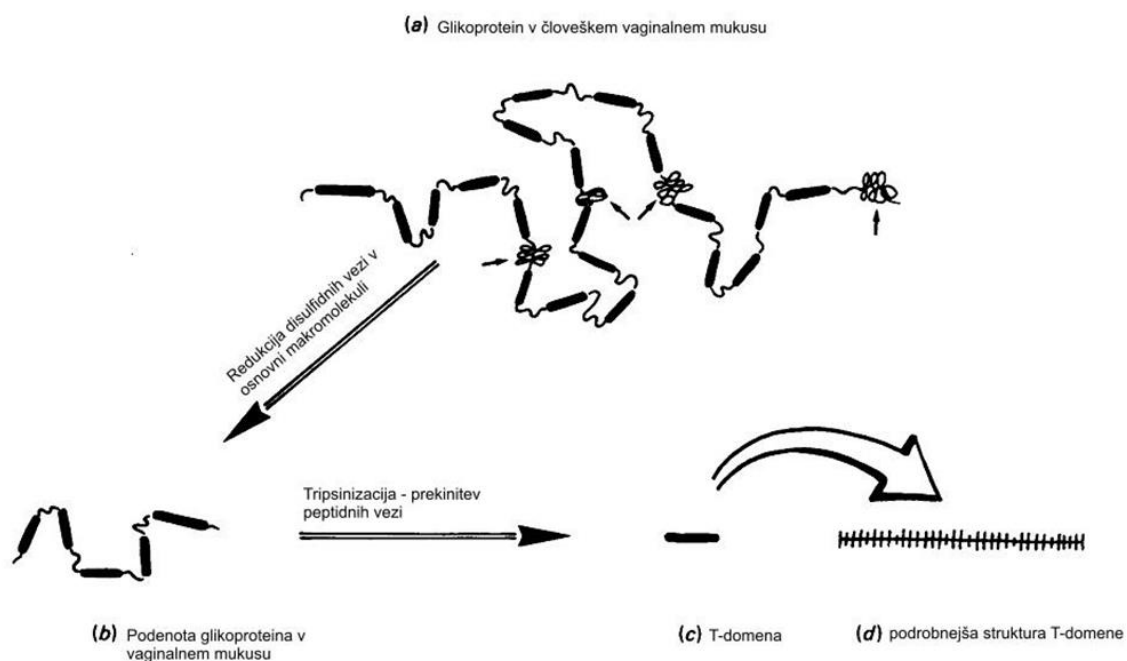
Količina ter sestava vaginalne tekočine lahko značilno spremeni tudi učinkovitost in obnašanje vaginalne farmacevtske oblike, kar bi lahko vodilo v zmanjšano terapevtsko učinkovitost zdravil. V prvi polovici menstrualnega ciklusa lahko zaradi povečane tvorbe bolj vodenega mukusa pričakujemo hitrejšo odstranitev oblike z mesta aplikacije in posledično skrajšani čas delovanja učinkovine na mestu aplikacije. S tem bi bilo sproščanje kot tudi penetracija zdravilne učinkovine nezadostno za doseganje želenih terapevtskih učinkov. V drugi polovici ciklusa pa bi zmanjšana količina vode v vaginalnih izločkih ter povečana viskoznost mukusa lahko zavirala raztapljanje in sproščanje učinkovine iz farmacevtskih oblik ter na hitrost difuzije učinkovine iz lumna do epitelija (1,6). V primeru nizke vsebnosti vode v vaginalnih izločkih lahko namreč pričakujemo, da bo prišlo do nasičene topnosti učinkovine, zaradi česa se odmerek ne bo raztopil v skladu z našimi pričakovanji. Kadar je izločanje vode v vaginalno votlino pospešeno pa lahko pričakujemo, da se bo odmerek učinkovine bolje raztapljal in bo količina raztopljene učinkovine višja kot v primeru nižje količine vode, vendar pa bo voda v vaginalnih izločkih sočasno vplivala na čas zadrževanja tako farmacevtske oblike kot tudi sproščene in raztopljene učinkovine na mestu aplikacije.

Vaginalni mukus tako predstavlja nenehno obnavljajočo se semi-permeabilno, visko-elastično bariero, ki prekriva celotni ženski reprodukativni sistem. Njegove glavne komponente so voda, glikoproteini, lipidi, sladkorji, prosti proteini, odlučene epitelne celice ter celice imunskega sistema, elektroliti in bakterije (12).

Količina vode v mukusu med ciklusom pod vplivom estrogena niha med 90 in 99% glede na celotno težo mukusa, kar vpliva tudi na njegovo viskoznost. Ob višjih plazemskih koncentracijah estrogenov se vsebnost vode v mukusu giblje povprečno okoli 92 – 94%, naraste na povprečno 98% ob ovulaciji, nato pa ponovno upade na prvotne vrednosti v lutealni fazi (t.j. po ovulaciji, ko poraste koncentracija progesterona) (13).

Drugo najpomembnejšo komponento mukusa predstavljajo glikoproteini ali mucini, katerih koncentracija v mukusu se giblje med 0.5 in 5%, odvisno od količine prisotne vode, torej posredno od koncentracije spolnih hormonov (10). Mucini so dolge proteinske verige, na katere so kovalentno z O- ali N-glikozidnimi vezmi pripete različno dolge polisaharidne verige, ki ščitijo proteinsko verigo pred proteolitičnim delovanjem vaginalnih encimov (zlasti ekso- in endopeptidaz). Tako zaščitena veriga mucina zaradi nekovalentnih interakcij med polisaharidnimi ali proteinskimi podenotami (hidrostatske in hidrofobne vezi, van der Waalove vezi, ionske in vodikove vezi) oblikuje značilno trodimenzionalno strukturo, ki na koncih polisaharidnih verig na svoji površini izpostavi sialično kislino in sulfatne skupine, zaradi česar je mukus pri fiziološkem pH (3.5 – 4.5) navzven negativno nabit. Mucini v vaginalnem mukusu so fleksibilne, linearne verige (Slika 2a) s povprečno molekularno maso $5.9 - 10 \times 10^6$ g/mol (odvisno od uporabljene metode za določevanje molekularne mase) (14), zgrajene iz 4-5 podenot ($M = 2.1 \times 10^6$ g/mol), med seboj povezanih z disulfidnimi vezmi (Slika 2b). Vsaka podenota pa je naprej sestavljena iz še manjših gradnikov, ki jim pravimo tudi T-domene (Slika 2c). Običajno v vsaki podenoti zasledimo pet T-domen. Vse T-domene so grajene iz osrednje proteinske verige, na katero so z N- in O-glikozidnimi vezmi pripete oligosaharidne enote, ki zaradi svoje prostorske razvejanosti ščitijo mucine pred proteolitičnimi encimi iz mukusa. Oligosaharidne enote predstavljajo približno 75 m/m%, proteinska veriga pa 25 m/m% teže mucina (14). Glavne aminokisliline, ki gradijo osrednjo proteinsko verigo so serin, treonin in prolin, medtem ko so stranske sladkorne verige zgrajene v glavnem iz N-acetil glukozamina (12.8%), N-acetil galaktozamina (9.7%), galaktoze (18.7%), sialične kisline (15%) in fukoze (7.5%) (14).

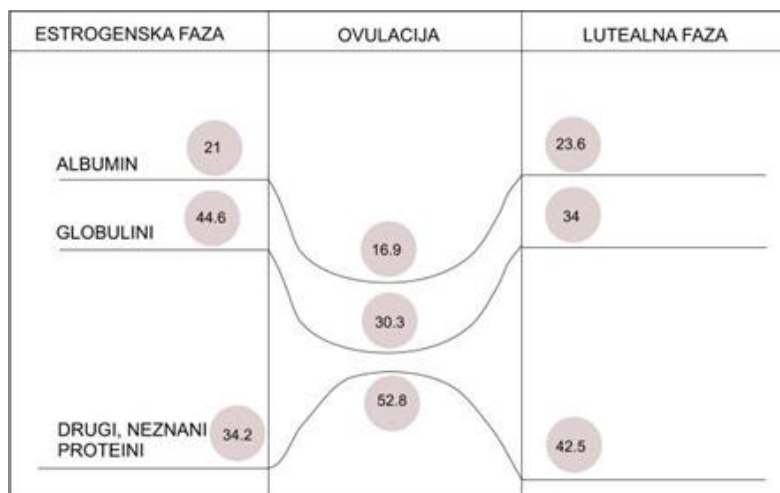
Kljub relativno nizki vsebnosti mucinov v mukusu so te makromolekule odgovorne za vzdrževanje trodimenzionalnega ogrodja in viskoelastičnosti, ki sta značilni lastnosti vaginalnega mukusa (11). Študije so pokazale, da so v različnih fazah menstrualnega ciklusa, ne glede na plazemsko koncentracijo estrogena in progesterona, v mukusu vedno prisotni mucini enake sestave, spreminja pa se le njihova koncentracija (15). Najpomembnejši predstavniki mucina v vaginalnem mukusu so mucini, poimenovani MUC4, MUC5A/C ter MUC8 (16).



Slika 2: Struktura glikoproteina mucina in njegovih manjših gradnikov v vaginalnem človeškem mukusu (17).

V mukusu lahko zasledimo tudi proste proteine, ki s transudacijo vstopajo iz seruma v nožnico. Celokupno predstavljajo prosti proteini približno 0.5 – 3 % celotne teže mukusa (13), običajno pa se ta vrednost giblje okoli 1%. Od vseh proteinov predstavljajo prosti albumin povprečno 21% vseh proteinov, globulini 36%, preostalih 43% pa predstavljajo drugi, neidentificirani proteini. Zaradi spreminjanja količine vode tekom ciklusa, se njihova koncentracija ciklično spreminja, kot je prikazano na Sliki 3. Tekom ciklusa se v mukus pod vplivom estrogenov in progesterona izloča vse več vode in glikoproteinov. Zaradi tega se razmerje med koncentracijo glikoproteinov in proteinov poveča, saj je glikoproteinov vedno več, količina proteinov pa ostaja nespremenjena. Razmerje med obema vrstama sestavin mukusa narašča vse do ovulacije, nato pa sekrecija glikoproteinov

kot tudi vode upade. Glede na začetek menstrualnega ciklusa kljub nižani hitrosti izločanja glikoproteinov njihova koncentracija zaradi še bolj nižane hitrosti izločanja vode ostaja visoka, hkrati pa se poviša koncentracija proteinov. V lutealni fazi ciklusa je razmerje glikoproteini:proteini visoko, kar pomembno vpliva na povečanje viskoznosti vaginalnega mukusa (18).



Slika 3: Ciklično spreminjanje koncentracije prostih proteinov med menstrualnim ciklusom v humanem vaginalnem mukusu (13). Nihanje povprečja procentov posamezne frakcije proteinov v vsaki fazi menstrualnega ciklusa je prikazano v krožcih.

Sladkorji – polisaharidi v mukusu predstavljajo heteropolisaharidne verige. Kar 75 – 80% vseh polisaharidov je zgrajenih iz metilpentoze, heksoamina in galaktoze (19), njihova sestava pa se tekom ciklusa ne spreminja. Razmerje med številom galaktoznih in heksoaminskih gradnikov v polisaharidih se namreč ohranja pri vrednosti približno 1, spreminja pa se le delež metilpentoznih gradnikov kot posledica intersubjektivnih razlik (19). V mukusu je prisotna tudi glukoza, ki nastaja pri razgradnji glikogena z laktobacili (19). Koncentracija polisaharidov med ciklusom zaradi različne hitrosti izločanja vode pod vplivom spolnih hormonov niha (18). Reološke študije so pokazale, da prosti sladkorji skupaj z glikoproteini pomembno vplivajo na viskoelastične lastnosti mukusa (15).

V mukusu se nahajajo tudi elektroliti, katerih delež se giblje med 0.5 – 1%. Najpomembnejši ioni identificirani v mukusu so Na^+ (82 ± 4 mmol/kg tekočine), K^+ ($30 \pm$

2 mmol/kg tekočine), Cl^- (79 ± 4 mmol/kg tekočine) in Ca^{2+} (1 – 5 mmol/kg tekočine) (20).

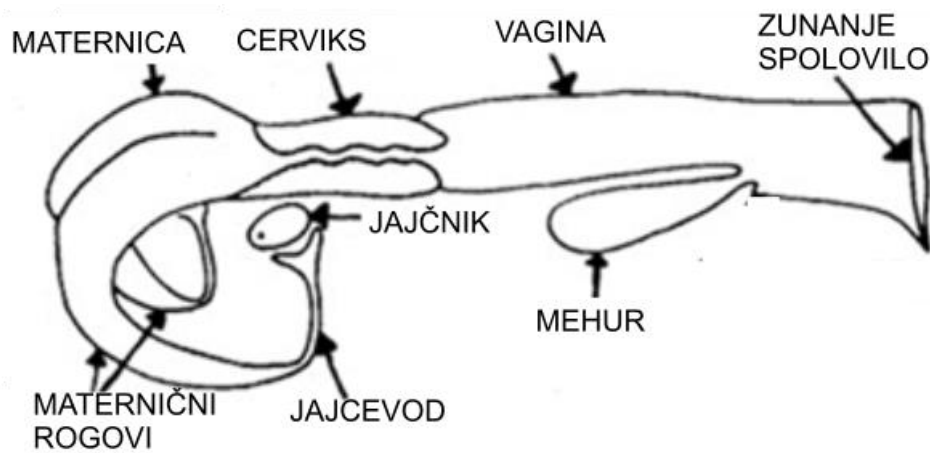
V mukusu se nahajajo tudi različni prosti lipidi, ki predstavljajo 10.5% vaginalne tekočine, ki jo telo izloči skozi celoten cikel (od dneva 5 do dneva 28 menstrualnega cikla). Ti lahko izvirajo iz membran odluščenih celic (fosfolipidi in holesterol), lahko pa so to tudi organske kisline, ki predstavljajo stranske produkte razgradnje glikogena z laktobacili (C3 – C5 maščobne kisline: propanojska, butanojska in pentanojska kislina, mlečna kislina) (21). Od vseh lipidov manjši delež (10.5%) predstavljajo proste maščobne kisline, katerih koncentracija med ciklusom variira in je najvišja v estrogenski fazi. Prevladujejo nasičene maščobne kisline (75 - 84 %) kot so palmitinska (16:0), miristinska (14:0), stearinska (18:0), lignocerinska (24:0), n-tridekanojska (13:0) ter n-pentadekanojska kislina (15:0). Od navedenih stearinska in palmitinska kislina predstavljata glavni nasičeni maščobni kislini. Zaznali pa so tudi nenasičene maščobne kisline, katerih delež glede na celotne lipide niha med 15 – 25%. Tako so od mononenasičenih maščobnih kislin najbolj zastopane palmitoleinska (16:1), heptadekanojska (17:1), oleinska (18:1) ter cis-5-eikozanojska (20:1) kislina, medtem ko je linolejska (18:2) kislina edini predstavnik maščobnih kislin z dvema nenasičenima C – C vezema (22). Glede na izsledke študij pri neplodnih parih, so omenjene maščobne kisline pomembne za vzdrževanje primerne fluidnosti membrane spermijev, ki je potrebna za uspešno oploditev jajčeca, pomembno pa prispevajo tudi pri obrambi vaginalnega trakta pred patogenimi bakterijami in glivicami. Omenjene maščobne kisline se namreč lahko vgradijo v njihovo membrano in delujejo protimikrobno (20).

1.1.2 Kravja vaginalna sluznica

Kravja vaginalna sluznica predstavlja *in vitro* model, ki ustrezno posnema bistvene anatomske, fiziološke in funkcijske lastnosti človeške vaginalne sluznice (23). Pri obeh vrstah je anatomija reproduktivnih organov identična; gradi jih zunanje spolovilo, nožnica, maternični vrat (cerviks), maternica, jajcevodni ter jajčniki, kot je prikazano na Sliki 4. Edina anatomska razlika med obema vrstama predstavlja oblika maternice, kar ni relevantno za magistrsko delo (24). Lastnosti obeh vaginalnih sluznic se spreminjajo pod vplivom nihanja plazemskih koncentracij spolnih hormonov estrogena in progesterona kot

je predstavljeno že v prejšnjem poglavju (23,24). Vaginalni epitelij pri kravi je tako kot pri človeku zgrajen iz treh plasti; seroze, zunanjih vzdolžnih in notranjih krožnih mišic, submukoze in mukoze, vendar s to razliko, da mukozo pri kravi gradijo cilindrične, človeško pa visokoprizmatske celice (24). Kljub različnim oblikam celic v mukozi lahko zasledimo, da sta sestava in funkcija kravjega ter človeškega mukusa zelo podobni. pH kravjega mukusa se giblje med 6 in 7.5, zaradi česar je še posebej primeren model človeške vaginalne sluznice post-menopavzalnih žensk (23,24).

Številne raziskave potrjujejo primernost kravje vaginalne sluznice kot *in vitro* modela za preučevanje različnih procesov. Z omenjeno sluznico lahko primerno posnemamo procese, ki so udeleženi pri sistemski ali lokalni dostavi učinkovin skozi vaginalno sluznico pri človeku. Izkazalo se je tudi, da kravja vaginalna sluznica omogoča preučevanje mehanizma adhezije laktobacilov na vaginalni epitelij, mehanizma transporta spermijev skozi mukus ter pristope imunizacije oseb s pomočjo vaginalne aplikacije ustreznih antigenov (23,24). Razširjenost tega modela med raziskovalci pa ni le posledica številnih podobnosti med človeško ter kravjo vaginalno sluznico temveč tudi dejstva, da lahko kravjo sluznico dobimo dovolj pogosto in v zadostnih količinah po relativno nizki ceni. Zaradi omenjenih prednosti kravje vaginalne sluznice pred drugimi živalskimi modeli smo kot model v tej magistrski nalogi uporabili kravji mukus in vaginalno tkivo.



Slika 4: Anatomske značilnosti reproduktivnih organov pri kravah.

1.2 Vaginalni dostavni sistemi

Tradicionalno so se vaginalno aplicirala le zdravila, namenjena doseganju lokalnih učinkov (antibiotiki, antimikotiki, protivirusna zdravila, zdravila za preprečevanje okužb s praživalmi, spermicidi, sredstva za pospešitev popadkov in hormoni) (1,2,4). Zaradi občutno znižane ekspresije metabolnih encimov in sekretornih prenašalcev, značilnih za gastrointestinalni trakt (npr. citokromi ter encimi, ki so udeleženi pri konjugaciji učinkovin ter najbolj poznana sekretorna prenašalca P-glikoprotein – Pgp ter Prenašalec povezan z rezistenco na več učinkovin – MRP (Multidrug Resistance Associated Protein)), dobre prekrvavljenosti, velike površine ter dobre permeabilnosti za učinkovine ter dostave učinkovin v sistemski krvni obtok mimo jeter, predstavlja vaginalni epitelij in nožnica primerno okolje za dostavo občutljivejših učinkovin kot so steroidi in peptidi. Zaradi teh lastnosti beležimo v zadnji dekadi pospešen porast študij in registriranih farmacevtskih oblik namenjenih vaginalni aplikaciji z namenom doseganja sistemskih ali lokalnih učinkov, saj le-ti dostavni sistemi omogočajo boljšo biološko uporabnost učinkovin (2,3,4,5).

Vaginalna aplikacija se je izkazala za primernejšo pot administracije učinkovin kot so bromokriptin, propranolol, oksitocin, kalcitonin, rastni hormon, inzulin in steroidi za kontracepcijo ali nadomestno hormonsko terapijo v primerjavi z enteralnim ali parenteralnim načinom, kjer je biološka uporabnost slabša. Tudi v primerjavi z oralno sluznico se je vaginalna izkazala za ugodnejše mesto aplikacije v primeru kontraceptivov. Poleg naštetega omogoča vaginalna aplikacija tudi direktno dostavo učinkovin in učinek v maternici zaradi specifičnega ožiljenja vaginalne stene. Ta omogoča neposreden transport učinkovin iz vagine v maternico, čemur pravimo tudi »first-pass uterine effect«. V primeru progesterona, ki se uporablja kot sredstvo za preprečevanje prezgodnjega poroda, splavov ter pri hormonski nadomestni terapiji, prav omenjeni »first-pass uterine effect« omogoča doseganje značilno višjih lokalnih koncentracij progesterona v maternici po vaginalni aplikaciji farmacevtskih oblik, kot bi jih dosegli po peroralni ali parenteralni poti (2,5).

Z vaginalno aplikacijo se tudi izognemo predsistemskemu jetrnemu metabolizmu, zaradi česar se biološka uporabnost učinkovin izboljša, zmanjša pa se verjetnost stranskih učinkov (zlasti je manj jetrnih poškodb). Vaginalno aplikacijo odlikujejo tudi enostavnost vstavitve in odstranitve farmacevtskih oblik, kar lahko stori pacient sam. Izognemo se bolečinam, ki so povezane s parenteralno aplikacijo, nižja pa je tudi verjetnost infekcije in

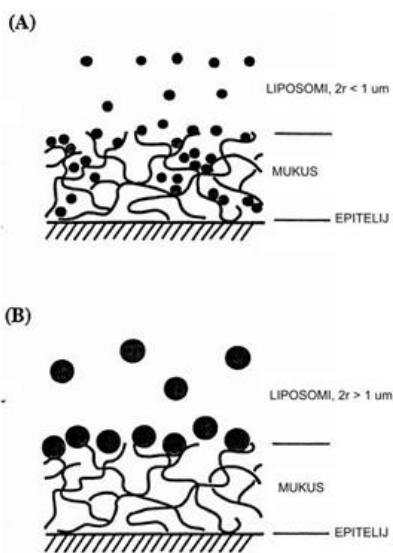
poškodb. Lokalizacija farmacevtske oblike na vaginalni sluznici ne povzroča lokalnega draženja in neprijetnosti, ki jih pogosto zaznamo pri drugih načinih lokalne aplikacije učinkovin, npr. pri okularni ali oralni mukoadheziji (1,2,3,4).

Običajno za vaginalno aplikacijo uporabljamo trde ali poltrdne, redkeje tekoče farmacevtske oblike (geli, suspenzije, tablete, globule, kreme in raztopine). Večina teh farmacevtskih oblik zlasti tekoče, izkazujejo kratek in nezadosten čas zadrževanja na mestu aplikacije. Zato je potrebna večkratna dnevna aplikacija, kar bi lahko vodilo do zmanjšane compliance ter s tem povezanim nerednim in nepravilnim jemanjem zdravila.

Zaradi omenjenih slabosti in prednosti, se je farmacevtska industrija usmerila v izdelavo mukoadhezivnih vaginalnih farmacevtskih oblik. To so dostavni sistemi za učinkovine, ki vsebujejo različne polimere in v stiku z vodo na mestu aplikacije nabrekajo (velja za nevodotopne oblike) ali se raztapljajo (velja za vodotopne oblike). Pri nabrekanju oz. raztapljanju, verige polimerov pridobivajo na fleksibilnosti in se tako prepletejo z glikoproteinskimi verigami mukusa, kar posledično privede do mukoadhezije. Glavni cilj mukoadhezije je, da takšni dostavni sistemi omogočajo podaljšano zadrževanje zdravila na mestu aplikacije (v nožnici) ter posledično boljšo terapevtsko učinkovitost ter višjo stopnjo compliance. Idealen mukoadhezivni polimer za vaginalno uporabo naj bi zadostil kriterijem netoksičnosti, polimer ali njegovi razgradni produkti se ne bi smeli absorbirati skozi mukus ali ga kakorkoli dražiti, mukoadhezija bi se morala vzpostaviti hitro, farmacevtska oblika pa bi morala biti zasnovana tako, da ne bi ovirala sproščanja učinkovine v tkivo, se na vaginalno sluznico ne bi adherirala s pomočjo kovalentnih vezi, njena izdelava pa bi bila ekonomsko upravičena (2).

V primeru bioadhezivnih liposomov, katera bomo uporabili, lahko pričakujemo, da bosta glede na velikost liposomov ter glede na vsebovani mukoadhezivni polimer nastopila dva možna mehanizma (Slika 5). Če bodo liposomi manjši kot so medprostorji – vodni kanali med glikoproteini mukusa, bodo liposomi lahko difundirali med verigami do določene globine, kjer se bodo zaradi mukoadhezije ujeli na glikoproteinske makromolekule (Slika 5a). V nasprotnem pa se bodo liposomi adherirali na glikoproteine že na sami površini mukusa (Slika 5b). Zaželen je seveda prvi mehanizem, saj se s tem skrajša pot potovanja za sproščeno učinkovino do površine epitelija, kjer poteče njena absorpcija, prav tako pa se zmanjša verjetnost odplavljanja oblike z mesta aplikacije zaradi obnavljanja mukusne bariere (25,26).

Bioadhezivni ali mukoadhezivni polimeri so glede na njihov izvor sintezni, polysintezni ali naravnega izvora in glede na svojo kemijsko strukturo ter funkcionalne skupine omogočajo različne mehanizme mukoadhezije. Pri delu smo uporabili mukoadhezivne liposome, ki so vsebovali bodisi karbopol bodisi hitosan, zato bomo na kratko predstavili tudi njune lastnosti.

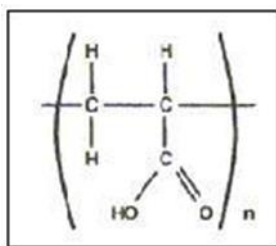


Slika 5: Mesto mukoadhezije različno velikih liposomov (slika 5A $2r < 1 \mu\text{m}$; slika 5B $2r > 1 \mu\text{m}$) na vaginalni sluznici.

1.2.1 Karbopol

Karbopol ali karbomer je sintezen polimer akrilne kisline (Slika 6), ki je lahko še dodatno ko-polimeriziran in na ta način prečno premrežen z različnimi strukturami (npr. s sukrozo – Karbopol 934P, z alilpentaeritriolom – Karbopol 71G, Karbopol 971G, Karbopol 974G, z divinil glikolom – Polikarbofil,...) (26,27). To so nevodotopni hidrofilni polimeri, ki v vodi nabrekajo kar do 1000-krat glede na začetni volumen oz. 10-krat glede na izhodiščni polmer suhe substance in tvorijo gel v pH območju med 4 in 6 (27). Molekulska masa je visoka in vpliva na viskoznost ter nabrekanje v vodnih medijih. Glede na funkcionalno skupino, ki omogoči prečno premreženost, izkazujejo različni podtipi karbopola tudi različne jakosti adhezije in čas zadrževanja na mestu aplikacije. Študije so pokazale, da je čas zadrževanja karbopola na črevesni sluznici prašiča daljši, kadar uporabimo karbopol višjih molekulskih mas in višje stopnje premreženosti, saj se na ta način zniža hitrost

raztapljanja karbopola v farmacevtski obliki na mestu aplikacije. To pa pomeni, da se zmanjša tudi verjetnost odplavljanja oz. odstranitve aplicirane farmacevtske oblike (26). Kljub temu, da sta tako mukus kot tudi polimer s prosto karboksilno skupino navzven negativno nabita, je čas zadrževanja na mukusu značilno podaljšan ob uporabi s karbopolom obloženih oblik v primerjavi z neobloženimi. V kislem vaginalnem pH je negativni naboj karbopola mnogo manj izrazit kot če bi obliko aplicirali v okolje z višjim pH, kjer bi zaradi odbojnih elektrostatskih sil z mukusom, ki je tudi negativen, pričakovali nižjo jakost mukoadhezije (1,12,25). Glede na molekulsko maso karbopola velja splošno pravilo, da najdaljše čase zadrževanja na mukusu dosežemo s Karbopolom 980, sledi Karbopol 874P, Polikarbofil, Karbopol 971P ter nepremrežena poliakrilna kislina (26). Lahko uporabimo tudi natrijeve soli karbopolnih polimerov, ki omogočijo še večjo moč mukoadhezije v primerjavi s kislinskimi derivati. Nevtralne soli akrilne kisline naj bi omogočile privzem večjih količin vode, kar bi pomenilo boljšo razširitev prečno premreženih verig polimera. Tako bi se celokupna površina mukoadhezivnega polimera, ki bi bil na voljo za tvorbo vodikovih vezi z glikoproteini mukusa, povečala. Z omenjenim načinom se čas zadrževanja oblike na apliciranem mestu močno podaljša (1,12,26).



Slika 6: Osnovna enota karbopola – akrilna kislina.

Za uspešno doseganje mukoadhezije pa je pri derivatih karbopola izrazito pomembna tudi kakovost izhodnega materiala in postopek, s katerim je bil le-ta pripravljen. Ugotovljeno je bilo, da je mukoadhezija močnejša, kadar pri formulaciji uporabimo karbopol, pridobljen s postopkom obarjanja in ne liofilizacije, saj procesni pogoji izrazito vplivajo na poroznost, kohezivnost materiala in s tem povezano dovzetnost karbopola za hidratacijo (25).

Polimere karbopola odlikujejo zlasti njegova varnost, netoksičnost in neiritabilnost po lokalni aplikaciji na sluznico (28,29).

Karboksilna skupina akrilne kisline lahko reagira z zunajceličnimi kalcijevimi ioni na mestu aplikacije in tako poruši integriteto tesnih stikov v epiteliju, s čimer se posledično

lahko izboljša paracelularna absorpcija učinkovin. Sposobnost interreagiranja s kationi (npr. s kationi v raztopinah z visokimi koncentracijami elektrolitov, s kationskimi polimeri ali fenoli) pa je lahko tudi nezaželena v primeru kationskih učinkovin, saj bi se s tem sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike upočasnilo (28,29).

Karbopol se lahko uporablja za izdelavo sistemov z nadzorovanim sproščanjem ter kot zgoščevalec v tekočih in poltrdnih farmacevtskih oblikah, vezalec v tabletah, stabilizator suspenzij ter v bio/mukoadhezivnih sistemih (1,12,27).

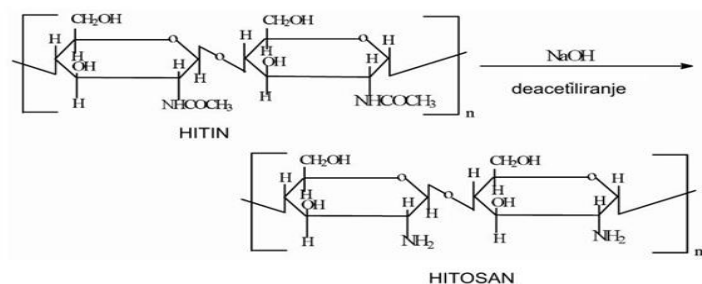
Za sproščanje učinkovin iz farmacevtskih oblik, obloženih s karbopolom, je značilno, da se v vodnem okolju okoli oblike (v našem primeru okoli liposoma) tvori gelski obroč, ki je nevodotopen in zato ne erodira. Ko je dosežena polna hidriranost gela, se učinkovina iz takšnega gela sprošča zaradi osmotskega tlaka, ki od znotraj-navzven poruši strukturo gela. Sproščanje učinkovine iz takšnih oblik bo tako odvisno od lastnosti uporabljenega derivata karbopola (struktura, stopnja hidratacije, stopnja nabrekanja, stopnja premreženja), njegove koncentracije v obliki ter okoliškega pH (27).

1.2.2 Hitosan

Hitosan (Slika 7) je naravni polikationski kopolimer, zgrajen iz glukozamina in N – acetilglukozamina. Pridobivamo ga iz hitina s postopkom hidrolize acetilne skupine na acetilaminskem preostanku hitina v alkalnih pogojih. Postopek deacetilacije nikoli ne poteče v celoti, vendar pa mora biti stopnja deacetiliranja manjša kot 0.35 (Slika 7) (30,31). Za hitosan je značilna visoka molekulska masa ($1 - 5 \times 10^5$ g/mol), delna vodotopnost pri $\text{pH} < 6.5$, sposobnost kelacije težkih kovin in negativno nabitih mineralov ter geliranje v prisotnosti drugih polianionov (30). Farmacevtske oblike izdelane iz hitosana flotirajo in tvorijo gele v kislem (32). Zaradi biokompatibilnosti, biorazgradljivosti in netoksičnosti ter drugih lastnosti (hemostatične, fungistatične, bakteriostatične, spermicidne, antikarcinogene in antiholesterolemične lastnosti) njegova uporaba pri izdelavi različnih farmacevtskih oblik narašča zlasti pri izdelavi praškov, tablet, emulzij, gelov in pripravkov s podaljšanim sproščanjem (28,30). Poleg navedenega izkazuje tudi mukoadhezivne lastnosti (1,8,29), za katere so pomembne predvsem proste hidroksi in amino skupine (Slika 7), udeležene pri tvorbi vodikovih vezi z mukusom

(28,29), ter pozitiven naboj, ki omogoča vzpostavitev privlačnih elektrostatskih vezi z negativno nabitim mukusom (32). Verige hitosana so linearne in ob primerni hidraciji dosegajo ustrezno fleksibilnost, potrebne za mukoadhezijo (32). Glede na nedavne izsledke je mogoče v farmacevtskih oblikah hitosan kombinirati tudi z drugimi anionskimi polimeri z namenom doseganja ustreznih/želenih lastnosti farmacevtske oblike oz. zdravila (28,29), pri tem pa bistvenega vpliva na mukoadhezijo ni.

Na tržišču lahko zasledimo derivate hitosana (derivati N-alkil hitosana, N-acil hitosana, N-karboksialkil hitosana, N-karboksiacil hitosana, sladkorni derivati in mnogi drugi (31,33)) različnih molekulskih mas, stopenj deacetilacije in soli (soli z glutamatom, laktatom in HCl) (30). Kvarterne amonijeve soli hitosana (derivati N-alkil hitosana) izkazujejo boljšo topnost pri višjih pH kot sam hitosan, ki je topen le v kislem, in se zato pogosto uporabljajo v oblikah, namenjenih peroralni aplikaciji oz. aplikaciji na mesta z višjim lokalnim pH. Jakost mukoadhezije je sicer nižja zaradi odbojnih elektrostatskih sil med kvarternimi amonijevimi skupinami v polimeru, kar zniža fleksibilnost verig in posledično prepletanje verig polimera z glikoproteini. Vendar pa so ti derivati boljši pospeševalci absorpcije učinkovin. Kvarterne amonijeve skupine namreč vstopajo v interakcije s proteini negativno nabitih tesnih stikov in tako prehodno povečajo paracelularno permeabilnost učinkovin (33). Kot pospeševalec absorpcije pa lahko uporabimo tudi derivate hitosana s prosto –SH skupino, saj se ta močneje veže na glikoproteine mukusa (tvori kovalentne disulfidne vezi) in zagotavlja večjo jakost mukoadhezije in daljši čas zadrževanja na mestu aplikacije (33). Poleg tega proste tiolne skupine inhibirajo proteaze na mestu aplikacije in prenašalec Pgp. Vendar pa uporabo tioliranih hitosanovih derivatov običajno omejuje slaba vodotopnost pri fizioloških pogojih (pri pH 7.4) (33).



Slika 7: Postopek deacetiliranja hitina ter strukturna formula hitosana.

1.3 Mukoadhezija

Zmožnost adhezije sinteznih ali naravnih snovi ter farmacevtskih oblik na biološki nosilec (bodisi tkivo bodisi mukus) za daljši čas pojmujemo bioadhezija. Kadar imamo v mislih adhezijo farmacevtskih oblik na mukus, pa ta pojav označimo bolj specifično, in sicer kot mukoadhezija.

Glede na naravo komponent, ki so udeležene v adhezijo, ločujemo med dvema tipoma adhezij in sicer poznamo adhezijo med dvema biološkima komponentama (fuzija, agregacija celic) ter adhezijo biološke (npr. celic) in nebiološke komponente (npr. različne podlage: plastika, kovina, sintetični materiali). Kadar so molekularni mehanizmi, ki adhezijo omogočijo, poznani, govorimo o specifični, sicer pa o nespecifični adheziji (28,34).

Iz biofarmacevtskega stališča bioadhezija farmacevtskih oblik na mesto aplikacije omogoča lokalizacijo in tesen stik s sluznico, kar vodi v boljšo absorpcijo apliciranih učinkovin. S takšnim pristopom lahko apliciramo tudi tiste zdravilne učinkovine, ki so nestabilne v prebavnem traktu, saj se z lokalizacijo in vzpostavitvijo tesnega stika med formulacijo in absorbirajočo sluznico izognemo difuziji učinkovine v lumen, kjer je učinkovina potencialno izpostavljena obarjanju, vezavi na komponente hrane, metabolizmu z encimi ali bakterijami. Dodatno pa lahko pri aplikaciji bioadhezivnih izdelkov na lokalne sluznice tudi zmanjšamo pojavnost stranskih oz. neželenih učinkov, kar dosežemo z uporabo različnih formulacijskih tehnik in izbiro ustreznih polimerov, ki priredijo sproščanje učinkovine na mestu aplikacije tako, da se izognemo ali omejimo sistemsko absorpcijo učinkovin. Ker je terapija z bioadhezivnimi pripravki varnejša in učinkovitejša, lahko pričakujemo tudi višjo stopnjo compliance s strani pacientov ter s tem povezano boljše izzide terapije (29,34).

Bioadhezija med biološko in nebiološko komponento poteče dvofazno. V začetku zaradi sposobnosti omočitve bioadhezivnega materiala le-ta nabreka, poveča se gibljivost bioadhezivnih verig polimera, kar omogoči vzpostavitev kontakta med biološko membrano in bioadhezivom, ki mu sledi penetracija bioadhezivnih verig globlje v mukus (v primeru mukoadhezije). Na določeni globini mukusa se verige polimera prepletejo z mucini, vzpostavijo se različne molekularne interakcije (odbojne ali privlačne) in omogočijo mukoadhezijo. Med privlačne sile prištevamo van der Waalsove, elektrostatske, vodikove

in hidrofobne interakcije, medtem ko k odbojnim prištevamo elektrostatske sile in odbojne sile, ki so posledica steričnega oviranja med komponentama. Za primerno močno mukoadhezijo mora vsota privlačnih sil presegati moč vseh odbojnih (28), kar opisujejo različne teorije: elektrostatska teorija, teorija adsorpcije, teorija močenja, difuzijska teorija ter teorija, ki vrednoti silo, potrebno za ločbo dveh adheriranih komponent (28,29).

Z vidika bioadhezije zdravil je zaželeno, da je jakost bioadhezije čim višja, vendar ne previsoka, saj bi bila ločba farmacevtske oblike od biološke površine v tem primeru preprečena. Jakost mukoadhezije je tako odvisna od značilnosti polimera in od okolja kot mesta aplikacije.

- Molekulska masa

Molekulska masa polimera vpliva na jakost mukoadhezije. Verige nizko molekularnih polimerov uspešneje prodirajo v globino mukusa, saj izkazujejo boljšo gibljivost verig v primerjavi s polimeri višjih molekulskih mas. Vendar pa je z vidika prepletanja verig polimera z mucini in vzpostavljanja bioadhezije ustrezne jakosti zaželeno večja molekulska masa. Optimalna molekulska masa za doseg maksimalne bioadhezije je odvisna tudi od vrste polimera, čeprav splošno pravilo pravi, da sila bioadhezije narašča z molekulsko maso do 100000 g/mol, nad to mejo pa se jakost bioadhezije ne povečuje več (28,34). Poleg molekulske mase je pomembna tudi prostorska orientacija verig polimera ter njihova prečna premreženost (28,29,34).

- Koncentracija polimera

Z naraščanjem koncentracije bioadhezivnega polimera jakost bioadhezije narašča, saj se povečuje število potencialnih mest, ki lahko interagirajo z verigami mucinov. Povečevanje koncentracije bioadhezivnega polimera v nedogled pa ne omogoča nadaljnjega naraščanja jakosti bioadhezije, saj na apliciranem mestu po preseženi optimalni koncentraciji polimera prične primanjkovati vode, ki bi omočila polimer in omogočila njegovo nabrekanje ter povečanje gibljivosti verig. Pri visokih koncentracijah adhezivna moč torej opazno pade, saj je prodiranje verig polimera v mukusne plasti omejeno (28,29,34).

- Gibljivost verig

Optimalna gibljivost verig polimera zagotavlja uspešno prodiranje polimera v plast mukusa. Gibljivost je višja ob večji količini vode na mestu aplikacije. Prevelika gibljivost

pa s stališča jakosti mukoadhezije ni zaželjena, saj se ob preveliki gibljivosti zmanjša verjetnost, da bo polimer »srečal« verige mukusa, poleg tega pa se verige polimera lahko povežejo same med sabo ali pa v primeru vodotopnih polimerov oddifundirajo v lumen namesto na površino oz. v notranjost mukusa (28,29,34).

- pH vodnega medija na mestu aplikacije

pH ima pomemben učinek na jakost mukoadhezije, saj vpliva na naboj polimera in mukusa. Večina bioadhezivnih polimerov v farmacevtskih oblikah izkazuje polianionski značaj zaradi kislih funkcionalnih skupin. Kadar je pH na mestu aplikacije višji od ustrezne pKa vrednosti polimera, bo ta ioniziran oz. neioniziran pri pH-jih, ki so nižji od pKa. Poliakrilna kislina ima pKa približno 4,75 in omogoča maksimalno jakost bioadhezije pri pH 5-6, nad temi vrednostmi pa se jakost občutno zniža, ker je poliakrilna kislina popolnoma ionizirana in se zaradi odbojnih elektrostatskih sil odbija od negativno nabitih verig mukusa, kar prepreči tesen stik med formulacijo in mukusom. Znižanje pH pod pKa vrednosti bioadheziva pa ne pripomore k povečanju jakosti bioadhezije, saj v teh pogojih polimer ne nabreka, ker je neioniziran. Polimer torej ne pridobi zadostne gibljivosti, da bi prehajal v mukusno plast, prav tako pa s površino mukusa ne more vzpostaviti vodikovih ali drugih privlačnih vezi (28,29,34).

- Jakost pritiska mukoadhezivnega pripravka na lokalno dostopne sluznice

Da bi se mukoadhezivni sistem na mestu aplikacije obdržal čim dlje, ga na sluznico pritrdimo močneje. Jakost bioadhezije in retencijski čas oblike na mestu aplikacije z močjo pritrditve sistema sicer naraščata, saj moč pritiska oblike na tkivo vpliva na globino interpenetracije verig polimera z glikoproteini. Če obliko močno pritismo in jo na mestu aplikacije držimo daljši čas, polimeri postanejo mukoadhezivni, kljub temu da nimajo privlačnih sil z mucini (28).

- Čas stika bioadhezivne oblike z mukusom

Čas kontakta med mukoadhezivom in mukusom vpliva na obseg nabrekanja polimera in interpenetracijo polimernih verig v mukus. Jakost mukoadhezije z naraščanjem kontaktnega časa narašča. To je zlasti pomembno za formulacije s polimeri, ki na mestu aplikacije še polimerizirajo. Čas stika lahko nadzorujemo le v oblikah, apliciranih na lokalne sluznice (npr. oko, nos, usta, vagina), ne pa pri peroralnih bioadhezivnih oblikah (28,29,34).

- Nabrekanje

Nabrekanje je nujno potrebno za pridobitev ustrezne/zadostne gibljivosti verig polimera in posledično prepletanje. Nabrekajo le prečno premreženi polimeri, medtem ko se linearni polimeri raztopijo v vodi. Nabrekanje zavisi od vrste in koncentracije polimera ter količine okoliške vode. Ob nezadostnem nabrekanju polimer nima ustrezne gibljivosti in zato se čas zadrževanja skrajša, medtem ko se linearni polimeri popolnoma raztopijo in oddifundirajo v okolico (28,29,34).

- Mucin

Zaradi neprestanega obnavljanja mukusnih celic je čas zadrževanja farmacevtske oblike na površini mukusa omejen, ne glede na naravo in jakost bioadhezije, ki bi jo teoretično lahko dosegli na statičnih sistemih. Ko se celice odluščijo, se z njimi odlušči tudi mukus ter farmacevtska oblika na njem. Uspešno lokalizacijo dostavnih sistemov učinkovin na sluznicah dodatno omejujejo še proste verige mucinov, ki se odstranijo s površine mukusa in so prisotne v lumnu organa in tako predstavljajo dodatno mesto, kamor bi se bioadhezivni sistem lahko pritrtil še preden bi imel priložnost interagirati z mukusom na površini tkiva (28,29,34).

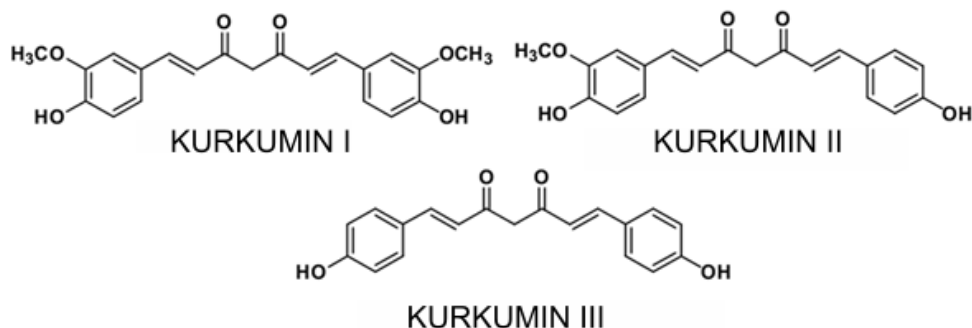
1.4 Kurkumin

Kurkumin je naravni polifenol, ki ga pridobivamo z ekstrakcijo iz korenike kurkume - *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) (Slika 8). Uporablja se kot začimba zlasti v azijski prehrani, hkrati pa je tudi registriran kot aditiv in barvilo. Ker polifenoli v splošnem izkazujejo pomembne protivnetne in antioksidativne lastnosti, je zanimanje za uporabo kurkumina v medicinske namene zadnje desetletje izrazito poraslo še posebej zaradi tradicionalnih zapisov o možnih rabah kurkumina (npr. za zdravljenje revme, različnih kožnih stanj, zaprtja, driske, glist in vnetij) ter številnih še potekajočih kliničnih študij (v letu 2011 je bilo prijavljenih kar 56 kliničnih študij s kurkuminom) (35,36).



Slika 8: Curcuma longa, njena korenika in kurkumin.

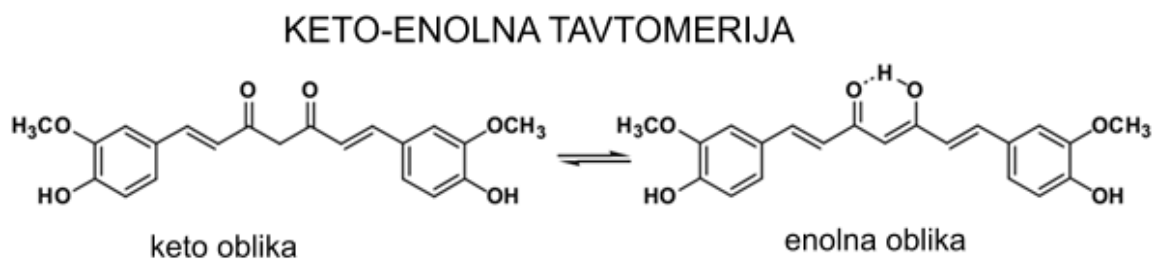
Prašek - začimba, pridobljena iz korenike, ima značilno rumeno barvo, ki je posledica prisotnosti kurkuminoidov (3 – 5% glede na maso zdrobljene korenike); kurkuminoida I (kurkumin ali diferuloil metan), II (desmetoksikurkumin, kurkumin II) in III (bidesmetoksi kurkumin, kurkumin III), katerih kemijske strukture so prikazane na Sliki 9. Komercialno dostopni »kurkumin« tako običajno predstavlja mešanico vseh treh kurkuminoidov, pri čemer kurkumin I predstavlja kar 77%, preostala derivata pa približno 18 in 5% (35). Pri našem delu smo uporabljali čisti kurkumin I (glej poglavje Metode in materiali).



Slika 9: Strukturne formule kurkuminoidov (kurkumina I, II in III).

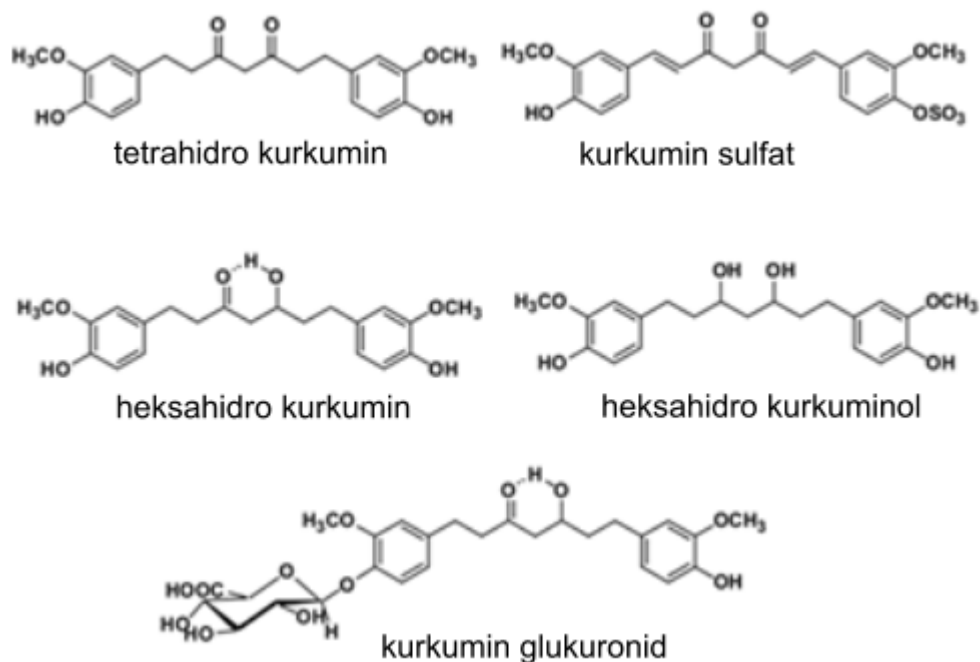
Kurkumin I (v nadaljevanju kurkumin) kemijsko predstavlja (E,E)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadiene-3,5-dion. Ker je to bis- α,β -nenasičen β -diketon, lahko zavzame keto ali enolno obliko, vendar v trdnem in raztopljenem stanju (kisli in nevtralni pH) obstaja pretežno v keto obliki in deluje kot donor protonov. V alkalnem pri pH > 8 je enolna oblika prevladujoča in kurkumin deluje kot donor elektronov (Slika 10).

Kurkumin je slabo topen polifenol, ki v raztopinah pod vplivom svetlobe ali pri ekstremnih pH vrednostih razpada na trans-6-(4'-hidroksi-3'-metoksipentil)-2,4-diokso-5-heksanal, vanillin, feruloilmetan, ter ferulno kislino v časovnem obdobju pol ure. Razpadu se lahko izognemo z dodatkom seruma, proteinov, antioksidantov ali z uporabo optimalnih pH pogojev tekom eksperimenta (35).



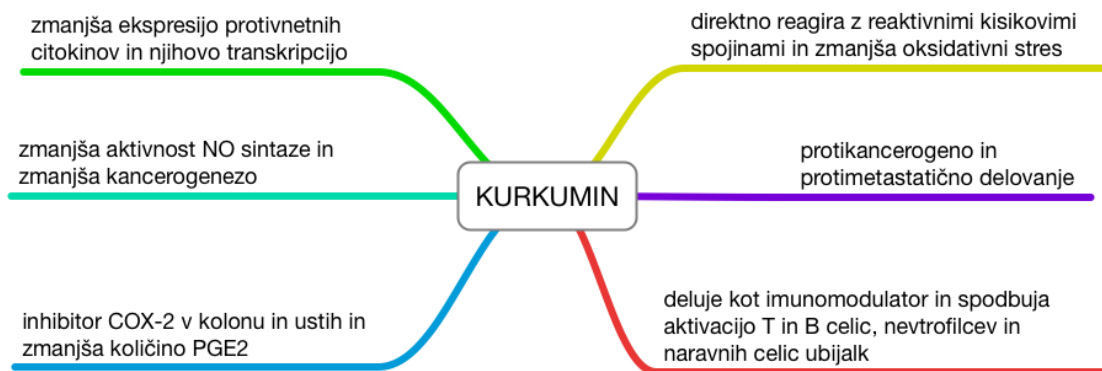
Slika 10: Keto-enolna tautomerija kurkumina I kot funkcija pH.

V različnih kliničnih študijah, ki so skušale ovrednotiti preventivno in kurativno farmakološko aktivnost kurkumina pri vnetnih ali (pred)rakastih stanjih glede na spodbudne izsledke številnih *in vitro* raziskav, so ugotovili, da je biološka uporabnost kurkumina po peroralni aplikaciji tudi ekstremno visokih doz (12 g/dan), ki sicer niso izzvale neželenih učinkov ali lokalnega draženja, zanemarljivo majhna (kar 35% aplicirane doze se izloči s fecesom kot kurkumin, preostalih 65% pa se iz telesa izloči v obliki metabolitov – Slika 11). Ker absorpcijo kurkumina iz prebavil omejujejo tako slaba vodotopnost, nestabilnost, vezava na komponente hrane, obsežen predsistemski metabolizem v jetrih in črevesju (s citokromi, glukuronidazami, sulfatazami), je vse več raziskav in študij usmerjenih k doseganju lokalnih učinkov s pomočjo aplikacije kurkumina na obolelo mesto. Tako se je v eni izmed študij kurkumin v 12 g odmerkih, ki so jih pacienti zaužili peroralno, izkazal kot učinkovito sredstvo pri kurativi raka kolona, saj se je tako število kot velikost rakastih sprememb na površini debelega črevesja značilno zmanjšalo (35).



Slika 11: Najpomembnejši metaboliti kurkumina pri človeku, ki se iz telesa izločijo z urinom in fecesom.

In vitro raziskave na podganjem črevesju so pokazale, da je kurkumin podvržen obsežnemu predsistemskemu metabolizmu s citokromi ter sekreciji iz enterocitov s sekretornimi prenašalci Pgp, MRP-2 in BCRP (35,37). Njegova permeabilnost skozi sluznico je bila nižja od nizko permeabilnih FDA (Food and Drug Agency) standardov kot posledica ekstremno visoke afinitete do vezave na glikoproteine v mukusu ter tkiva. Sistemska absorpcija kurkumina bodisi po peroralni bodisi po vaginalni aplikaciji kurkumina zato ni mogoča, smiselno pa bi bilo izkoristiti farmakološke lastnosti kurkumina pri preventivi oz. terapiji lokalnih vnetnih ali (pred)rakavih stanj (Slika 12) na vaginalnem epiteliju, pri čemer bi bila skrb za nastanek interakcij s sočasno, peroralno apliciranimi učinkovinami pri pacientih odveč (35,37).



Slika 12: Mehanizmi protivnetnega in protirakastega delovanja kurkumina.

Za učinkovito izkoriščanje protivnetnih in protirakastih učinkov kurkumina je potrebno tega na tarčno mesto dostaviti v ustrezni farmacevtski obliki. Pretekle raziskave so ugotovile, da topnost kurkumina lahko povečamo z uporabo kompleksov kurkumina s kovinami (cink, baker, magnezij in selen) ali albuminom oz. z vgradnjo v novejši dostavne sisteme. Kot primerni so se izkazali različni implantati, miceli, nanodelci in fosfolipidni liposomi (36). V primeru fosfolipidnih liposomov je bilo ugotovljeno, da se kurkumin vgradi v hidrofobni del. Topnost in količina raztopljenega kurkumina sta tako bistveno večji kot v običajnih farmacevtskih oblikah, izboljša pa se tudi stabilnost kurkumina in *in vitro* zaviralni učinek na rast rakasto spremenjenih celic. *In vivo* raziskave na podganah pa so potrdile, da se sočasno po peroralni aplikaciji poveča tudi hitrost in obseg absorpcije (36).

2 NAMEN

Namen magistrske naloge je bil razviti *in vitro* vaginalni model, ki bi posnemal *in vivo* pogoje – sestavo in funkcijo vaginalnega trakta pri ženskah ter nam tako omogočil vrednotenje biofarmaceutskih lastnosti kurkumina, vgrajenega v različne (ne)bioadhezivne liposome. V nalogi bomo najprej vrednotili permeabilnost kurkumina skozi vaginalni mukus, saj predhodne znanstvene objave nakazujejo možnost, da mukus predstavlja pomembno bariero pri dostavi te spojine (1,4,34,37). Vaginalni mukus bomo v nalogi posnemali bodisi z uporabo Sigma glikoproteinov, izoliranih iz prašičjih želodcev, bodisi bomo uporabili sveže izoliran kravji vaginalni mukus, ki po sestavi in funkcijah najbolje posnema omenjene lastnosti pri ženskah.

Med menstrualnim ciklusom koncentracija glikoproteinov (t.j. najpomembnejših gradnikov mukusa) pod vplivom ženskih spolnih hormonov niha, zato bomo nihanje *in vitro* posnemali s spreminjanjem vsebnosti glikoproteinov in spremljali vpliv na permeabilnost kurkumina. Tako dobljene rezultate bomo primerjali s tistimi, ki jih bomo določili pri prehodu kurkumina skozi kravji mukus.

V nalogi bomo testirali različne formulacije, ki bi bile lahko primerne za vaginalno aplikacijo: raztopino, neobložene liposome ter obložene, mukoadhezivne liposome ter primerjali njihove permeabilnosti. Na osnovi dobljenih rezultatov bomo skušali ugotoviti, kateri mukoadhezivni polimer – hitosan ali karbopol – bi bil za vaginalno dostavo kurkumina najbolj ustrezen. Vpliv obeh mukoadhezivnih polimerov na permeabilnost kurkumina bomo vrednotili pri dveh koncentracijah – 0.1 ter 0.6%.

V drugem delu naloge bomo vrednotili jakost mukoadhezije na svežem kravjem tkivu za že vse prej omenjene (ne)obložene liposome. Sveže kravje vaginalno tkivo bomo narezali in poskrbeli, da se mukus obdrži na površini tkiva. Nanje bomo aplicirali liposome z znano koncentracijo kurkumina, ki jih bomo po 3 urah spirali ter določili koncentracijo kurkumina v tekočini za spiranje. Na podlagi primerjav med različnimi liposomi bomo predvideli, kateri liposomi omogočijo najmočnejšo mukoadhezijo.

Z nalogo bomo skušali načrtovati smernice razvoja novejših dostavnih sistemov za vaginalno dostavo kurkumina, ki po peroralni aplikaciji ne dosega terapevtskih plazemskih koncentracij. Vzpostavili bomo *in vitro* vaginalni model, ki omogoča spremljanje permeabilnosti učinkovine skozi mukus ter *in vitro* vrednotenje jakosti mukoadhezije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Spojine

- 100 % acetonitril (MS-grade, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska),
- dimetilsulfoksid (MW: 78.13 g/mol, čistost $\geq 99.5\%$, MerckK GaA),
- dinatrijevhidrogenfosfat (MW: 141.69 g/mol, čistost $\geq 99.0\%$, MerckK GaA),
- glicerol (MW: 92.09 g/mol, čistost 99.0 – 101.0%, Sigma – Aldrich co.),
- D-(+)-glukoza (MW: 180.16 g/mol, čistost $\geq 99.5\%$, Sigma – Aldrich co.),
- humani albumini (koncentracija beljakovin je 200 g/L, čistost $\geq 96.0\%$, Octa pharma),
- kalcijev dihidroksid (MW: 73.9 g/mol, čistost $\geq 85.0\%$, Sigma – Aldrichco.),
- kalcijev diklorid dihidrat (MW: 147.01 g/mol, čistost $\geq 99.0\%$, Sigma – Aldrich co.),
- kalijev dihidrogenfosfat (MW: 136.08 g/mol, čistost $\geq 99.5\%$, MerckK GaA),
- kalijev hidroksid (MW: 56.11 g/mol, čistost $\geq 85.0\%$, Carlo Erba),
- kalijev klorid (MW: 74.55 g/mol, čistost $\geq 99.5\%$, Cerlo Erba reagenti),
- kurkumin (MW: 368.38 g/mol, MerckKGaA),
- magnezijev diklorid šesthidrat (MW: 230.30 g/mol, čistost 99.0 – 102.0%, Sigma – Aldrich co.),
- metanol (MW: 32.04 g/mol, čistost $\geq 99.9\%$, Fluka Analytical),
- mravljična kislina (Suprapur®, Merck, Darmstadt, Nemčija),
- mucini izolirani iz prašičjih želodcev, tip II (Sigma – Aldrich co.),
- natrijev dihidrogenfosfat hidrat (MW: 137.99 g/mol, čistost $\geq 99.0\%$, MerckK GaA),
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat (MW: 156.01 g/mol, čistost $\geq 99.0\%$, Sigma – Aldrich co.),
- natrijev hidrogenkarbonat (MW: 84.01 g/mol, čistost $\geq 99.0\%$, Sigma – Aldrich co.),
- natrijev klorid (MW: 58.44 g/mol, čistost $\geq 99.5\%$, MerckK GaA),
- natrijev L-laktat (MW: 112.06 g/mol, čistost $\geq 99.0\%$, Aldrich Chemistry),
- očetna kislina (MW: 60.05 g/mol, čistost $\geq 99.8\%$, MerckK GaA),

- urea (MW: 60.06 g/mol, čistost 99.0 – 100.5%, MerckKGaA).

3.1.2 Aparature in ostali materiali

- Vortex (Tehtnica, Železniki),
- Chilling/Heating Block (Cole – Parmer),
- Vortemp 56EVC (Tehtnica, Železniki),
- Centrifuge 5415R (Eppendorf),
- Transwell Permeable Support (0,4 μm Polycarbonate membrane, Corning Incorporated),
- 1.5 mL epice (Plastibrand),
- pluta,
- skalpel,
- cianoakrilatno lepilo UHU,
- avtomatske pipete.

3.2 Metode

- **Priprava umetne vaginalne tekočine (SVF – simulated vaginal fluid)**

Dan pred poskusom v enolitrski buči s prečiščeno vodo dodamo 3.51 g NaCl, 1.4 g KOH, 0.222 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 1 g očetne kisline, 2 g mlečne kisline, 0.16 g glicerola, 0.4 g sečnine ter 5 g glukoze. Počakamo, da se sestavine raztopijo in pH uravnamo na 4.5 z 1M HCl (6). Pri vrednotenju mukoadhezije dodamo v 1L 2mL albuminov (konc. 200 g/L), da posnemamo kri, hkrati pa pride do vezave kurkumina na albumine, kar naredi učinkovino obstojnejšo.

- **Priprava fiziološkega fosfatnega pufra (PB – phosphate buffer)**

Dan pred poskusom v enolitrski bučki s prečiščeno vodo raztopimo 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 in 0.24 g KH_2PO_4 , nato uravnamo pH na 7.4 z 1M HCl ali 1M NaOH. Pri vrednotenju vrednosti permeabilnosti kurkumina dodamo 1L 2mL albuminov (konc. 200 g/L), da posnemamo kri in s tem vzdržujemo *sink* pogoje v receptorski tekočini, zaradi vezave kurkumina na proteine.

- **Priprava Ringerjeve raztopine s pH 7,4 in 10 mM glukoze.**

Dan pred poskusom v enolitrski bučki zatehtamo 2.10g NaHCO₃, 0.055g NaH₂PO₄ x H₂O, 3.624 g NaCl, 0.373 g KCl, 0.176 g CaCl₂ x 2H₂O, 0.244 g MgCl₂ x 6H₂O, 0.285 g NaHPO₄ x 2H₂O ter 1,8 g glukoze. Počakamo, da se sestavine raztopijo in nato pufer preprihavamo s karbogenom (5% CO₂), da se uravna pH na 7.4.

- **Priprava liposomov**

Pri delu smo uporabili liposome, pripravljene iz L-fosfatidilholina, ki so/niso bili obloženi s polimeri. Liposomi so bili izdelani na Norveškem (prof. Dr. Nataša Škalko-Basnet, Drug Transport and Delivery Research Group, Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø) (37). Pri poskusih smo testirali (ne)obložene liposome z znano koncentracijo kurkumina (Preglednica I in Preglednica II). Obloženi liposomi so vsebovali 0.1 ali 0.6% hitosana ali karbopola.

Koncentrirane suspenzije liposomov pred poskusom za 5 – 10 min postavimo v ultrazvočno kadičko, tako da dobimo homogeno suspenzijo.

Za prvi del poskusa odpipetiramo ustrezní volumen koncentrata (V_x) ter redčimo z umetno vaginalno tekočino (SVF) na končni volumen tako, da je koncentracija kurkumina vedno 20 μ M, ter da so koncentracije lipidov podobne (Preglednica I). Za pripravo raztopine natehtamo ustrezno maso standarda kurkumina, ga raztopimo v 1 ml DMSO ter odpipetiramo določen volumen tega koncentrata v 10 mL bučko s SVF tako, da je raztopina kurkumina tudi 20 μ M ter da vsebnost DMSO ni višja od 1%. Vso steklovino s pripravljenimi donorskimi raztopinami oz. suspenzijami segrejemo v vodni kopeli na 37°C in jih zaščitimo pred svetlobo z alu folijo.

Za merjenje jakosti mukoadhezije, suspenzije liposomov ne redčimo z umetnim vaginalnim sokom, temveč jih apliciramo direktno na pripravljeno tkivo. Aplicirali smo take volumne, da je masa kurkumina med vzorci podobna, in sicer 50 μ g (Preglednica II).

Preglednica I: Koncentracija kurkumina (c(K)) in lipidov (c(lipidov)) v koncentriranih suspenzijah različnih vzorcev liposomov za vrednotenje permeabilnosti kurkumina, volumen pipetiranja koncentriranih suspenzij (V_x), končni volumen donorskih vzorcev ter koncentracije kurkumina in lipidov v donorskih vzorcih.

VZOREC (koncentrirane suspenzije različnih liposomov)	c(K) [mg/ml]	c(lipidov) [mg/ml]	V_x [μL]	Končni volumen donorskih vzorcev [mL]	c(K)v donorskihvzorceh [μM]	c(lipidov) v donorskihvzorceh [mg/ml]
NEOBLOŽENI	1.97	20	25	6.7	20	0.075
0.1 % HITOSAN	0.99	10	50	6.7	20	0.075
0.6% HITOSAN	0.93	10	50	6.3	20	0.079
0.1% KARBOPOLA	0.91	10	50	6.2	20	0.081
0.6% KARBOPOL	0.90	10	50	6.1	20	0.082

Vzorec: koncentrirana suspenzija liposomov iz Norveške; Donorski vzorec – suspenzije, pripravljene za eksperiment.

Preglednica II: Koncentracija kurkumina ($c(K)$) različnih vzorcev liposomov za vrednotenje jakosti mukoadhezije, volumen pipetiranja suspenzij (V_x) in končna masa kurkumina ($m(K)$) v donorskih vzorcih.

VZOREC (koncentrirane suspenzije različnih liposomov)	$c(K)$ [mg/ml]	V_x [μL]	$m(K)$ [μg]
NEOBLOŽENI	1.92	25	48
0.1 % HITOSAN	0.92	50	46
0.6% HITOSAN	0.93	50	46,5
0.1% KARBOPOL	0.90	50	45
0.6% KARBOPOL	0.92	50	46

- **Priprava disperzij s Sigma glikoproteini**

Dan pred poskusom natehtamo ustrezno količino prašičjega želodčnega mucina (Sigma, tip II) in jo kvantitativno prenesemo v čašo z izbranim volumnom umetne vaginalne tekočine, tako da smo dobili 1, 3, 5, 7 in 9 %m/v koncentracije disperzij s Sigma glikoproteini. V čašo damo magnetno mešalo in mešamo 2 – 3 ure pri sobni temperaturi, da je disperzija homogena. Čašo s pripravljenimi glikoproteini pokrijemo s parafilmom ter do naslednjega dne hranimo v hladilniku.

- **Priprava kravjega mukusa**

Kravjo nožnico na dan poskusa prevzamemo iz klavnice takoj po zakolu. Tkivo nam veterinar zaveže z vrvjo, da prepreči iztekanje vaginalnega mukusa in kontaminacijo nožnice s krvjo ali drugimi primesmi. Tkivo v hladilni torbi, obloženi z zamrzovalnimi vložki ($T < 10^{\circ}\text{C}$), pripeljemo na fakulteto in takoj izoliramo mukus. Nožnico prerežemo in mukus zberemo v čašo s spatulo, da čim manj posegamo v njegovo strukturo (izogibamo se uporabi strgal, objektnih stekelc ali tehtalne kartice). Mukus takoj uporabimo za poskus.

- **Priprava kravjega tkiva**

Nožnico, s katero ravnamo enako kot opisano v prejšnji točki, prerežemo in razdelimo na približno enako velike manjše koščke tako, da ne posegamo v okolico tkiva (t.j. ohranimo mukus na površini intakten) in se izognemo kontaminaciji tkiva s krvjo ali drugimi snovmi.

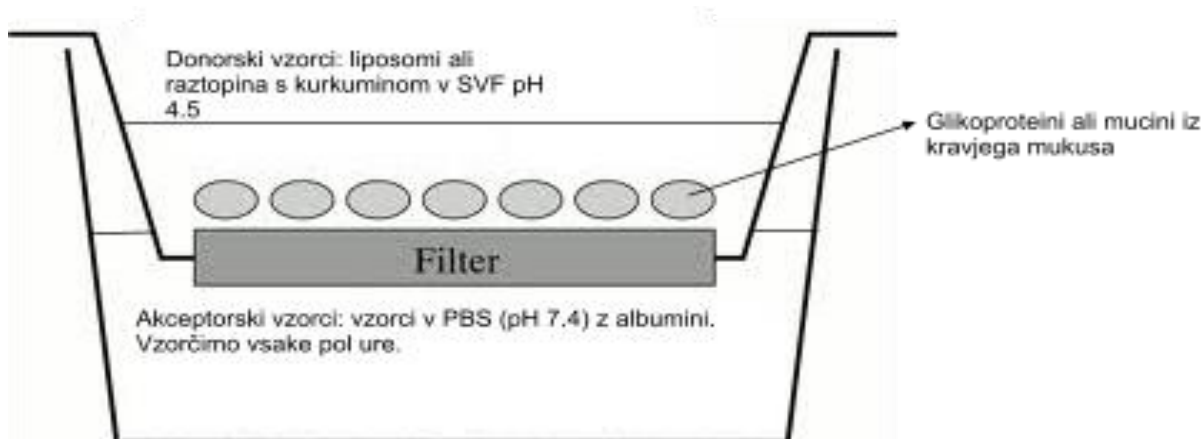
- **Priprava Transwell filtrov za poskus vrednotenja permeabilnosti ter izvedba**

Pripravimo si dve prazni Transwell plošči, kjer ima vsaka 12 filtrov. Na vsak filter naneseemo 160 μL raztopine Sigma glikoproteinov ali kravjega mukusa in poskrbimo, da mucini prekrijejo celotno površino filtra. Filtre nato vrnemo v njihove vstavke, ki jih postavimo na avtomatski stresalnik, segrevan na 37 °C.

Na zgornjo – apikalno stran praznih filtrov nato dodamo 0.5 mL testiranega vzorca (raztopina kurkumina ali (ne)obloženi liposomi s kurkuminom – donorski vzorci (Preglednica I)), tako da so začetne koncentracije kurkumina v vseh primerih enake. Na spodnjo stran filtra šele nato dodamo 1.5 mL fosfatnega pufru PBS pH 7.4 z albumini, kateri so prisotni za vzdrževanje *sink* pogoja v akceptorski tekočini (slaba topnost kurkumina ni vplivala na prehod v akceptorsko tekočino) in stabilnosti (izognemo se razpadu učinkovine).

Vsako vrsto liposomov oz. raztopino testiramo v 4 paralelkah (celokupno torej 24 paralelk).

Tekom poskusa vsake pol ure odvezamo 150 μL vzorca na spodnji strani filtra in ga shranimo v epice, ki vsebujejo 450 μL ledenega metanola za obarjanje albuminov. Vsebino epic premešamo na vortexu in takoj shranimo v zamrzovalniku. Odvzet volumen vzorcev nadomestimo s PBS z albumini. Na koncu poskusa (po 3h) vzamemo tudi vzorec donorskih raztopin na zgornji strani filtra na enak način kot je že opisano za vzorce (Slika 13).



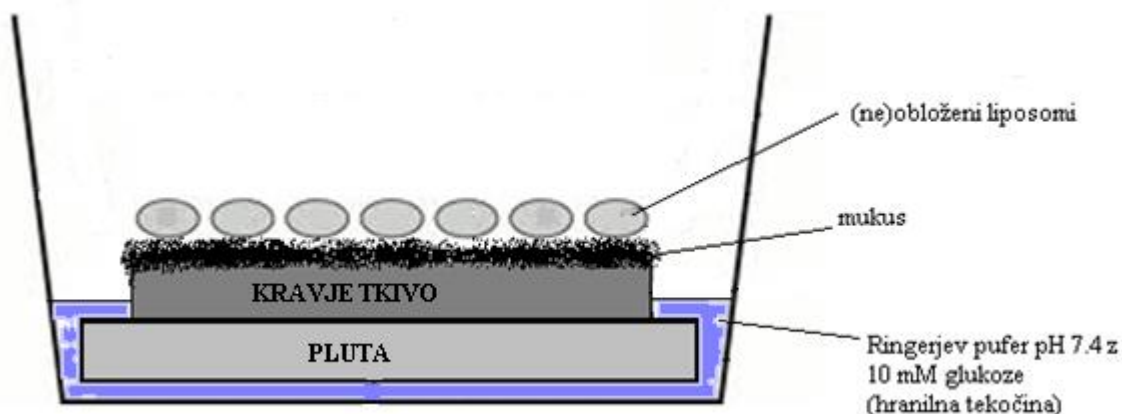
Slika 13: Shematski prikaz priprave Transwell filtrov za poskus vrednotenja permeabilnosti kurkumina.

- **Priprava kravjega tkiva za poskus vrednotenja mukoadhezije in izvedba**

Kravje tkivo razrežemo na manjše kose in jih s cianoakrilatnim lepilom prilepimo na kose plute v velikosti filtrov na Transwell ploščah. V prazne Transwell plošče namestimo pluto s tkivom ter dodamo 1.5 mL Ringerjevega pufru pH 7.4 z glukozo, ki služi kot hranilni pufer za tkivo (Slika 14).

Na tkivo dodamo 25 μL neobloženih liposomov s kurkuminom in 50 μL obloženih liposomov s kurkuminom (Preglednica II), tako da imamo podobne začetne mase kurkumina, ki jih apliciramo na tkivo. Vsako formulacijo testiramo v 4 paralelkah.

Plošče inkubiramo v avtomatskem stresalniku pri 37 °C 3 ure. Med inkubacijo pripravimo čaše, v katere odpipetiramo 10 mL simuliranega vaginalnega soka z albumini. Po 3 urah vsak kos tkiva speremo v svoji čašici, iz katere odvezamemo 150 μL vzorca v epico, ki vsebuje 450 μL ledenega metanola. Vsebino epic premešamo na vortexu in takoj shranimo v zamrzovalniku.



Slika 14: Shematski prikaz priprave Transwell filtrov za poskus vrednotenja jakosti mukoadhezije.

- **Priprava vzorcev za analizo**

Vzorci obeh poskusov pustimo v zamrzovalniku 48 ur na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, da se albumini oborijo, kurkumin pa sprostimo z albuminov. Vzorce centrifugiramo 10 min pri 16400 min^{-1} pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz vseh epic na mikrotitrsko ploščico odpipetiramo $50\text{ }\mu\text{L}$ vzorca in ploščice zatesnimo s plastičnim pokrovčkom, da preprečimo izhlapevanje metanola. Ploščice do LC-MS analize hranimo v hladilniku, zaščitene pred svetlobo.

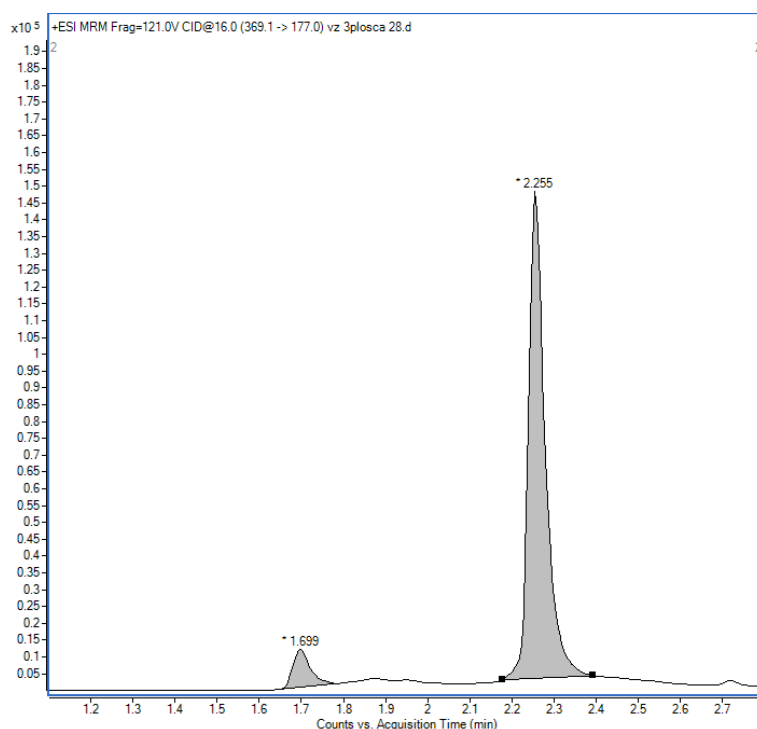
- **LC-MS analiza**

Količino kurkumina v inkubacijskih vzorcih smo določili s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti (UHPLC) sklopljene z masnim detektorjem tipa trojni kvadrupol (QQQ):

- I. UHPLC: Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA),
- II. Kolona: Kinetex $2.6\text{ }\mu\text{m}$ C18, $50 \times 2.1\text{ mm}$, (Phenomenex, Torrance, ZDA),
- III. Predkolona Security Guard C18, $4 \times 2.0\text{ mm}$ (Phenomenex, Torrance, ZDA)
- IV. Ionski izvor: ESI JetStream® v pozitivnem načinu ionizacije,
- V. Masni detektor (MS): Agilent 6460 MSD Triplequadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA),

Za separacijo smo uporabili gradientno izpiranje z mobilno fazo A (vodna faza), ki je vsebovala 0,1 % mravljične kisline v Milli-Q vodi in mobilno fazo B - organska faza: 100

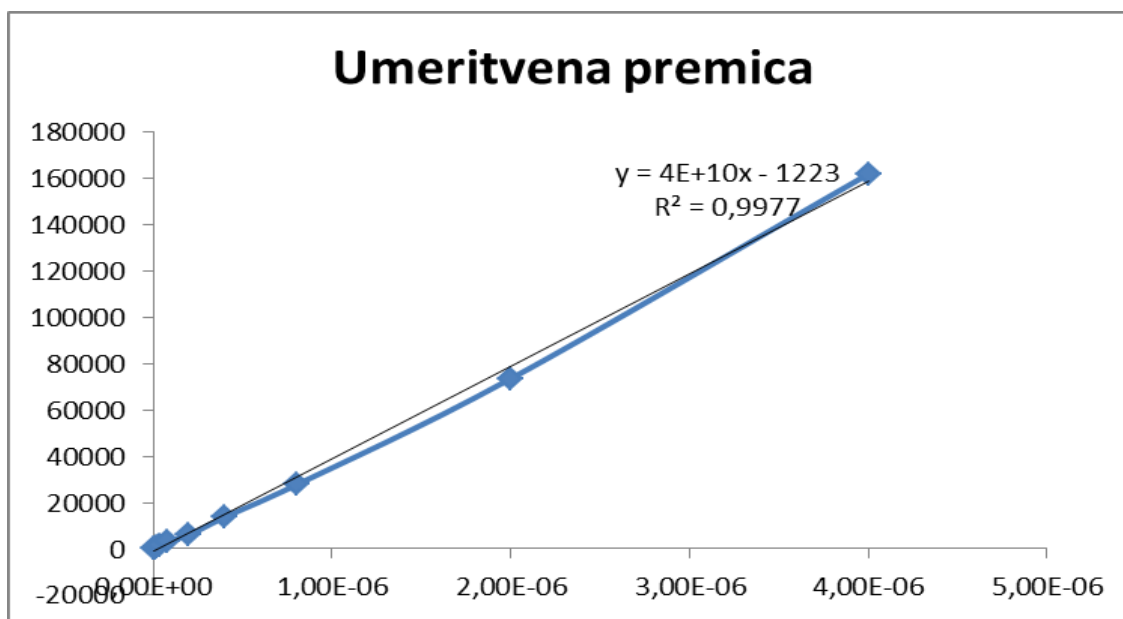
% acetonitril. Linearni gradient je predstavljen v Preglednici III. Temperatura kolone med analizo je bila 50 °C. Pri akceptorskih vzorcih smo injicirali 1.0 µL, pri donorskih pa 0.1 µL vzorca. Retencijski čas kurkumina je znašal 2.25 min, med tem ko je bil čas celotne analize vključno z re-ekvilibracijo kolone 3.1 min (Slika 15). Masni detektor je deloval v pozitivnem načinu multirezidualne analize (MRM) in sicer smo za kvantifikacijo kurkumina spremljali masni prehod m/z 369.1→177.0, pri čemer je bila resolucija obeh kvadrupolov nastavljena na 2.5 enote. Čas vzorčenja je bil 80 ms. Parametri, kot so temperatura in tlak sušilnega in pomožnega plina ter energija za fragmentacijo, so bili optimizirani za kar največji možen signal kurkumina. Rezultat je bila visoko občutljiva in selektivna metoda za kurkumin z limito kvantifikacije pri 0.04 µM koncentraciji. Ponovljivost metode smo dokazali z RSD 1.62%, točnost pa tako, da ni odstopa od nominalnih vrednosti za več kot 15% od izračunane limite. To pomeni, da so dobljeni rezultati zanesljivi (Slika 16).



Slika 15: Masni kromatogram multirezidualne metode (MRM) vzorca akceptorske raztopine. Retencijski čas 2.255 min pripada kurkuminu; 1.699 pripada izobarični nečistoti.

Preglednica III: Program gradientnega izpiranja na koloni po injiciranju vzorca.

Čas od začetka injiciranja (min)	Delež mobilne faze B (%)	Pretok (mL/min)
0.0	25	0.70
0.80	25	0.50
2.50	81	0.50
2.59	25	0.50
2.80	25	0.70



Slika 16: Umeritvena krivulja za kvantifikacijo kurkumina v bioloških vzorcih.

- **Izračun vrednosti P_{app} kurkumina skozi Transwell filter in plast glikoproteinov**

Pri izračunu permeabilnostnega koeficienta (P_{app}) za kurkumin skozi Transwell filter in mukus, je potrebno najprej izračunati pretok (J) te spojine skozi tkivo. Ker je prehod skozi mukus in filter pasiven proces velja, da je P_{app} neodvisen od koncentracije te spojine na donorski strani. P_{app} izračunamo po Enačbi 1:

$$P_{app} = \frac{J}{c} \quad \text{(Enačba 1)}$$

P_{app} (navidezni) permeabilnostni koeficient [cm/s]

J fluks/pretok [nmol/hcm²]

c začetna koncentracija spojine na donorski strani [mol/L]

Pretok je definiran kot množina snovi, ki difundira skozi 1 cm² membrane v eni uri in ga izračunamo po Enačbi 2:

$$J = \frac{k_d}{A} \quad \text{(Enačba 2)}$$

k_dkonstanta difuzije [mol/h]

A površina tkiva, skozi katero prehaja snov [cm²]

Hitrost difuzije opisuje Enačba 3:

$$\frac{dQ}{dt} = k_d \times (C_d - C_a) \quad \text{(Enačba 3)}$$

dQ/dt hitrost difuzije [mol/h]

C_dkoncentracija spojine na donorski strani [mol/L]

C_a koncentracija spojine na akceptorski strani [mol/L]

Ker se faktor ($C_d - C_a$) v Enačbi 3 med poizkusom zanemarljivo malo spreminja, ga kot konstanto pridružimo konstanti difuzije k_d in velja Enačba 4, 5 in 6:

$$\frac{dQ}{dt} = k_d^* \quad \text{(Enačba 4)}$$

$$\int_0^{Q(t)} dQ = k_d^* \times \int_0^t dt \quad \text{(Enačba 5)}$$

$$Q(t) = k_d^* \times t + n \quad \text{(Enačba 6)}$$

$Q(t)$množina spojine, ki je difundirala v času t [mol]

Množino spojine, ki je v času t difundirala skozi tkivo oz. membrano, izračunamo po Enačbi 7:

$$Q(t) = (\sum_{i=1}^{N-1} V_v \times c_i) + c_t \times V_c \quad \text{(Enačba 7)}$$

V_vvolumen vzorca [L]

c_ikoncentracija spojine na akceptorski strani v predhodnih vzorcih [mol/L]

c_tkoncentracija spojine na akceptorski strani v času t , ko vzamemo vzorec [mol/L]

V_cvolumen raztopine na akceptorski strani celice [L]

Po izračunu množine spojine v času t ($Q(t)$) lahko s pomočjo linearne regresije po enačbi (6) izračunamo konstanto difuzije (k_d). Pearsonov koeficient (R) nam poda moč povezave. Ko je znana konstanta difuzije, lahko naprej izračunamo pretok snovi skozi tkivo (J) po Enačbi 2 in nazadnje permeabilnostni koeficient (P_{app}) po Enačbi 1.

- **Izračun vrednosti P_{app} kurkumina skozi mukus**

S pomočjo Enačb 1 – 7 za vsak poskus izračunamo vrednosti P_{app} kurkumina skozi filter ter mukusno plast in podamo rezultat kot povprečje z ustrezno standardno deviacijo. Ker polikarbonatni Transwell filter tudi omejuje prehod kurkumina v akceptrosko tekočino, moramo permeabilnosti skozi sam mukus izračunati po Enačbi 8:

$$\frac{1}{P_{app}^{poizkus}} = \frac{1}{P_{app}^{mukus}} + \frac{1}{P_{app}^{filter}} \quad \text{(Enačba 8)}$$

$P_{app}^{poizkus}$povprečna permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter in mukus pri določeni vsebnosti glikoproteinov [cm/s]

P_{app}^{mukus}povprečna permeabilnost kurkumina samo skozi plast mukusa [cm/s]

P_{app}^{filter}povprečna permeabilnost kurkumina skozi prazen Transwell filter [cm/s]

Ko preoblikujemo enačbo lahko iskano vrednost (P_{app}^{mukus}) izračunamo po Enačbi 9:

$$P_{app}^{mukus} = \frac{P_{app}^{poizkus} \times P_{app}^{filter}}{P_{app}^{filter} - P_{app}^{poizkus}} \quad \text{(Enačba 9)}$$

Ker smo v enačbo vnašali povprečne vrednosti permeabilnosti kurkumina skozi sam filter oz. skozi filter in mukus, je naš rezultat prav tako povprečna vrednost, ki pa ji moramo določiti še napako. Vsaka izmed spremenljivk (P_{app}^{filter} ter $P_{app}^{poizkus}$) predstavlja spremenljivko z določeno napako. Standardno deviacijo (s_p) za P_{app}^{mukus} pa zato določimo skladno z Enačbo 10:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_{filter}-1) \times s_{filter}^2 + (n_{poizkus}-1) \times s_{poizkus}^2}{n_{filter} + n_{poizkus} - 1}} \quad \text{(Enačba 10)}$$

n_{filter} , $n_{poizkus}$ število meritev

s_{filter} , $s_{poizkus}$ standardne deviacije za posamezen eksperiment

- **Izračun jakosti mukoadhezije**

Pri izračunu jakosti mukoadhezije (ne)obloženih liposomov, smo kot merilo adhezije uporabili adheriran delež kurkumina. Po poskusu smo izmerili maso spranega, neadheriranega kurkumina v akceptorski tekočini, katerega smo odšteli od znane, začetne mase donorskega kurkumina (Preglednica II) in dobili maso kurkumina, ki se je adheriral na tkivo. Maso adheriranega kurkumina smo delili z donorsko maso kurkumina (Enačba 11), da smo dobili delež vezane učinkovine.

$$\% \text{ adheriranega kurkumina} = \frac{(m(K)_{don.} - m(K)_{akc.})}{m(K)_{don.}} \times 100\% \quad \text{(Enačba 11)}$$

$m(K)_{don.}$ donorska masa kurkumina

$m(K)_{akc.}$ masa kurkumina, spranega v akceptorsko tekočino

- **Statistična obdelava podatkov**

Podatke smo med seboj primerjali tako, da smo za vsako oceno permeabilnosti kurkumina določili 95% interval zaupanja z Enačbo 12 in preverili, ali se intervali med seboj prekrivajo. Enako smo izračunali interval zaupanja za vrednosti mukoadhezije različnih

(ne)obloženih liposomov. V primeru prekrivanja intervalov smo zaključili, da signifikantnih razlik med vzorci pri 5% stopnji tveganja ni.

$$95\% \text{ IZ} = \bar{x} \pm t_{\alpha/2}^{SP} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Enačba 12})$$

IZ.....interval zaupanja

\bar{x} povprečna vrednost (izračunana permeabilnost kurkumina, izračunana jakost mukoadhezije)

$t_{\alpha/2}^{SP}$ faktor t pri določeni stopnji tveganja ($\alpha < 0,05$) in številu prostostnih stopenj (SP)

s_p standardna deviacija (po Enačbi 10 pri izračunu IZ vrednosti permeabilnosti; pri izračunu IZ jakosti mukoadhezije po Preglednici XI)

nštevilo prostostnih stopenj (število meritev manj 1)

4 REZULTATI

4.1 Permeabilnost kurkumina

4.1.1 Permeabilnost kurkumina skozi prazen Transwell filter

Preglednica IV: Posamezne meritve permeabilnosti kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) skozi prazne Transwell filtre ter pripadajoča povprečja in standardne deviacije.

Testna formulacija	Posamezne meritve permeabilnosti skozi Transwell filtre ($\times 10^{-6}$ cm/s)				Povprečje ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Standardna deviacija ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Raztopina	21.3	19.9	17.1	17.7	19.0	2.0
Neobloženi	9.0	14.6	13.5	-	12.4	2.9
0.1% hitosan	8.8	8.5	8.9	7.8	8.5	0.5
0.6% hitosan	13.5	13.0	12.1	14.6	13.3	1.0
0.1% karbopol	-	11.2	11.0	15.5	12.6	2.5
0.6% karbopol	18.6	11.2	-	-	14.9	5.2

- : meritve zaradi visokih odstopanj nismo upoštevali.

4.1.2 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit z 1 m/v% disperzijo glikoproteinov

Preglednica V: Posamezne meritve permeabilnosti kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) skozi Transwell filtre prekrite z 1 m/v% disperzijo glikoproteinov ter pripadajoča povprečja in standardne deviacije.

Testna formulacija	Posamezne meritve permeabilnosti skozi Transwell filtre + 1 m/v% glikoproteini ($\times 10^{-6}$ cm/s)				Povprečje ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Standardna deviacija ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Raztopina	8.8	6.3	10.5	-	8.5	2.1
Neobloženi	2.3	2.1	1.7	-	2.0	0.3
0.1% hitosan	2.2	2.8	3.8	-	2.9	0.8
0.6% hitosan	2.6	2.9	3.0	3.0	2.9	0.2
0.1% karbopol	1.4	1.1	1.7	-	1.4	0.3
0.6% karbopol	0.4	0.5	0.3	0.5	0.4	0.1

- : meritve zaradi visokih odstopanj nismo upoštevali.

4.1.3 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s 3 m/v% disperzijo glikoproteinov

Preglednica VI: Posamezne meritve permeabilnosti kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) skozi Transwell filtre prekrte s 3 m/v% disperzijo glikoproteinov ter pripadajoča povprečja in standardne deviacije.

Testna formulacija	Posamezne meritve permeabilnosti skozi Transwell filtre + 3 m/v% glikoproteini ($\times 10^{-6}$ cm/s)				Povprečje ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Standardna deviacija ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Raztopina	3.8	1.6	4.9	4.1	4.3	0.5
Neobloženi	2.5	1.9	2.0	-	2.1	0.3
0.1% hitosan	2.0	5.3	2.8	-	3.4	1.7
0.6% hitosan	2.8	2.6	2.5	-	2.7	0.2
0.1% karbopol	1.3	1.0	2.1	1.5	1.5	0.4
0.6% karbopol	0.4	0.6	0.4	-	0.5	0.1

- : meritve zaradi visokih odstopanj nismo upoštevali.

4.1.4 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s 5 m/v% disperzijo glikoproteinov

Preglednica VII: Posamezne meritve permeabilnosti kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) skozi Transwell filtre prekrte s 5 m/v% disperzijo glikoproteinov ter pripadajoča povprečja in standardne deviacije.

Testna formulacija	Posamezne meritve permeabilnosti skozi Transwell filtre + 5 m/v% glikoproteini ($\times 10^{-6}$ cm/s)				Povprečje ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Standardna deviacija ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Raztopina	5.4	5.4	3.4	2.5	4.2	1.5
Neobloženi	1.8	2.0	1.5	-	1.8	0.2
0.1% hitosan	4.3	3.8	2.5	3.4	3.5	0.7
0.6% hitosan	2.0	3.7	5.9	-	3.9	1.9
0.1% karbopol	1.9	2.8	2.3	2.2	2.3	0.3
0.6% karbopol	2.2	2.9	2.5	-	2.6	0.7

- : meritve zaradi visokih odstopanj nismo upoštevali.

4.1.5 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s 7 m/v% disperzijo glikoproteinov

Preglednica VIII: Posamezne meritve permeabilnosti kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) skozi Transwell filtre prekrte s 7 m/v% disperzijo glikoproteinov ter pripadajoča povprečja in standardne deviacije.

Testna formulacija	Posamezne meritve permeabilnosti skozi Transwell filtre + 7 m/v% glikoproteini ($\times 10^{-6}$ cm/s)				Povprečje ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Standardna deviacija ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Raztopina	4.1	5.6	4.3	-	4.2	0.1
Neobloženi	2.2	1.9	1.9	2.0	2.0	0.1
0.1% hitosan	2.0	2.2	2.3	-	2.2	0.1
0.6% hitosan	2.2	2.3	2.5	2.2	2.3	0.1
0.1% karbopol	2.6	2.4	2.3	2.3	2.4	0.1
0.6% karbopol	3.5	3.7	2.8	-	3.3	0.5

- : meritve zaradi visokih odstopanj nismo upoštevali.

4.1.6 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit z 9 m/v% disperzijo glikoproteinov

Preglednica IX: Posamezne meritve permeabilnosti kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) skozi Transwell filtre prekrte z 9 m/v% disperzijo glikoproteinov ter pripadajoča povprečja in standardne deviacije.

Testna formulacija	Posamezne meritve permeabilnosti skozi Transwell filtre + 9 m/v% glikoproteini ($\times 10^{-6}$ cm/s)				Povprečje ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Standardna deviacija ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Raztopina	0.9	1.5	1.6	1.9	1.5	0.4
Neobloženi	0.9	1.5	1.6	1.9	1.4	0.4
0.1% hitosan	1.6	1.2	1.2	-	1.3	0.2
0.6% hitosan	1.6	1.7	1.2	-	1.5	0.3
0.1% karbopol	2.9	1.7	2.3	2.8	2.4	0.5
0.6% karbopol	3.5	3.1	3.4	3.6	3.4	0.2

- : meritve zaradi visokih odstopanj nismo upoštevali.

4.1.7 Permeabilnost kurkumina skozi Transwell filter, prekrit s kravjim vaginalnim mukusom

Tabela X: Posamezne meritve permeabilnosti kurkumina iz različnih formulacij (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) skozi Transwell filtre prekrte s kravjim vaginalnim mukusom ter pripadajoča povprečja in standardne deviacije.

Testna formulacija	Posamezne meritve permeabilnosti skozi Transwell filtre + kravji vaginalni mukus ($\times 10^{-6}$ cm/s)				Povprečje ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Standardna deviacija ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Raztopina	5.9	11.1	-	-	8.5	3.7
Neobloženi	7.7	7.9	-	-	7.8	0.1
0.1% hitosan	3.0	4.8	-	-	3.9	1.3
0.6% hitosan	7.9	9.2	-	-	8.5	1.0
0.1% karbopol	5.5	6.0	-	-	5.7	0.3
0.6% karbopol	7.1	11.1	-	-	9.1	2.9

- : izvedli smo le dve meritvi.

4.2 Komentar rezultatov za permeabilnost

Permeabilnost kurkumina skozi plast mukusne bariere smo izračunali iz meritev (t.j. permeabilnost P_{app} iz Tabel Iv - X), z Enačbo 7 in Enačbo 9, tako da smo dobili vrednosti, ki ovrednotijo le prehod kurkumina skozi plast glikoproteinov oz. kravjega mukusa ne da bi pri tem zaobjeli tudi vpliv praznega Transwell filtra, brez katerega sicer ne bi mogli opraviti poskusov (služil je le za oporo mukusne plasti). Napake izračunanih vrednosti permeabilnosti pa smo ocenili skladno z Enačbo 10. Statistično smo dobljene rezultate ovrednotili tako, da smo za vsako izračunano vrednost permeabilnosti kurkumina in ocenjene napake ocenili 95% interval zaupanja (Enačba 12) in opazovali prekrivanje intervalov.

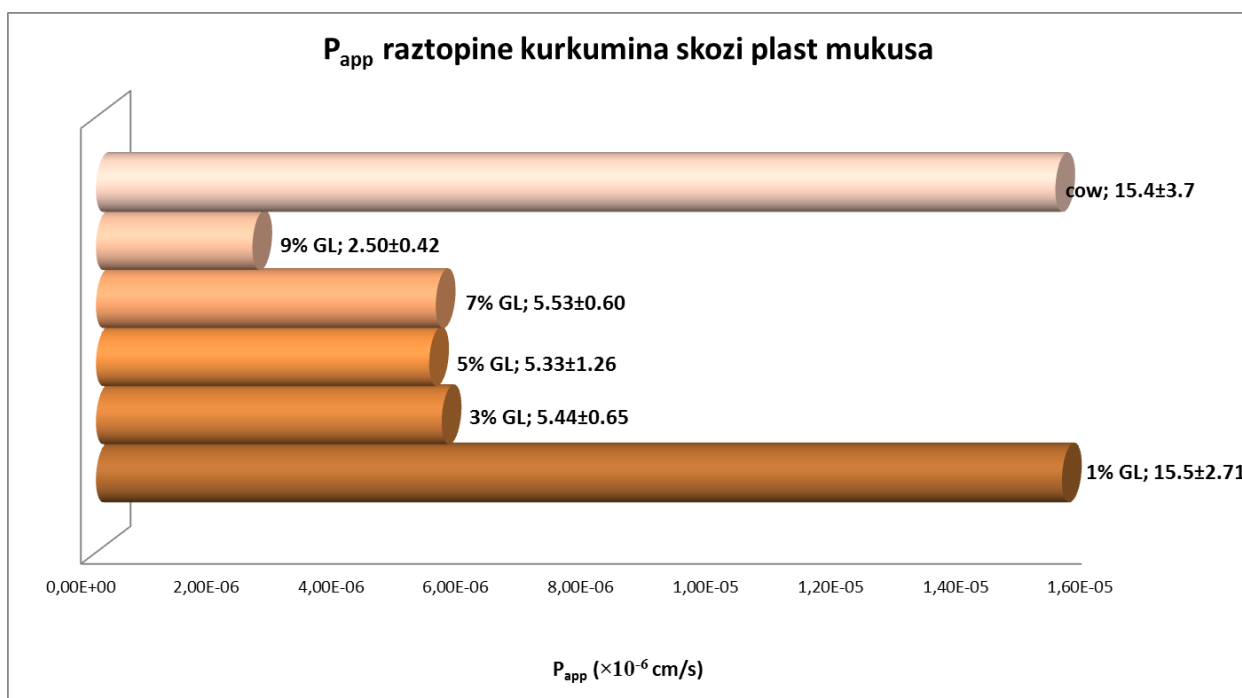
Tako dobljene permeabilnosti kurkumina skozi različne mukusne plasti (1, 3, 5, 7, in 9 m/v% disperzije Sigma glikoproteinov in izoliran kravji mukus) smo prikazali v spodnjih slikah (Slika 17a – 22a) za vsako formulacijo v obliki povprečij in pripadajočih standardnih deviacij. Intervali zaupanja pa so prikazani na Slikah 17b – 22b.

Ker izračun permeabilnosti kurkumina temelji na Fickovem zakonu, t.j. na delu premice, kjer množina linearno narašča s časom, smo prikazane permeabilnosti kurkumina lahko izračunali le iz prvih dveh ali treh točk. Kasneje smo ugotovili, da množina kurkumina ne narašča več linearno, torej se nam je med poizkusom spremenila kinetika difuzije kurkumina iz nultega v prvi red.

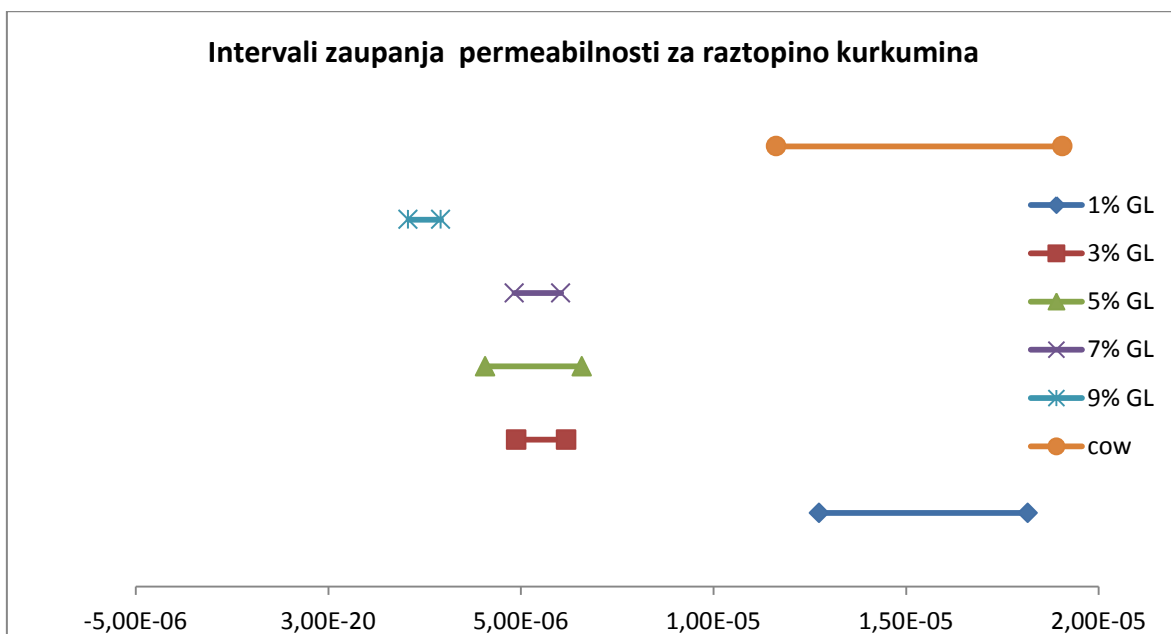
Če namreč predpostavimo, da *in vivo* za mukusom kurkumin difundira v tkivo, potem spremembe kinetike difuzije kurkumina skozi plast simuliranega mukusa ne bi smeli zaznati, saj bi tkivo delovalo kot rezervoar za kurkumin (kar so potrdile tudi predhodne študije (34, 35)).

S permeabilnostjo kurkumina lahko tako ovrednotimo biofarmacevtsko obnašanje različnih formulacij v različnih pogojih le za prvo uro ali uro in pol poskusa zaradi omejitev našega *in vitro* modela (za plastjo mukusa ni vaginalnega tkiva, kamor bi prehajal kurkumin).

4.2.1 Raztopina



Slika 17a: Zbrane permeabilnosti kurkumina iz raztopine skozi vaginalni mukus (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

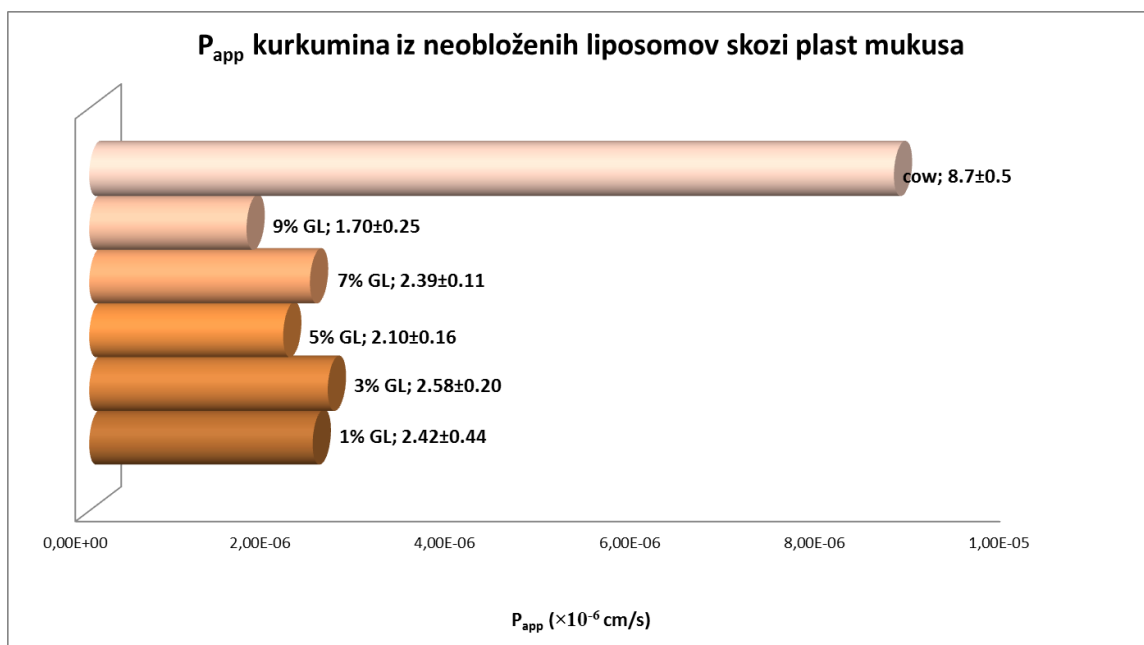


Slika 17b: Intervali zaupanja permeabilnosti kurkumina skozi plasti mukusa za raztopino (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

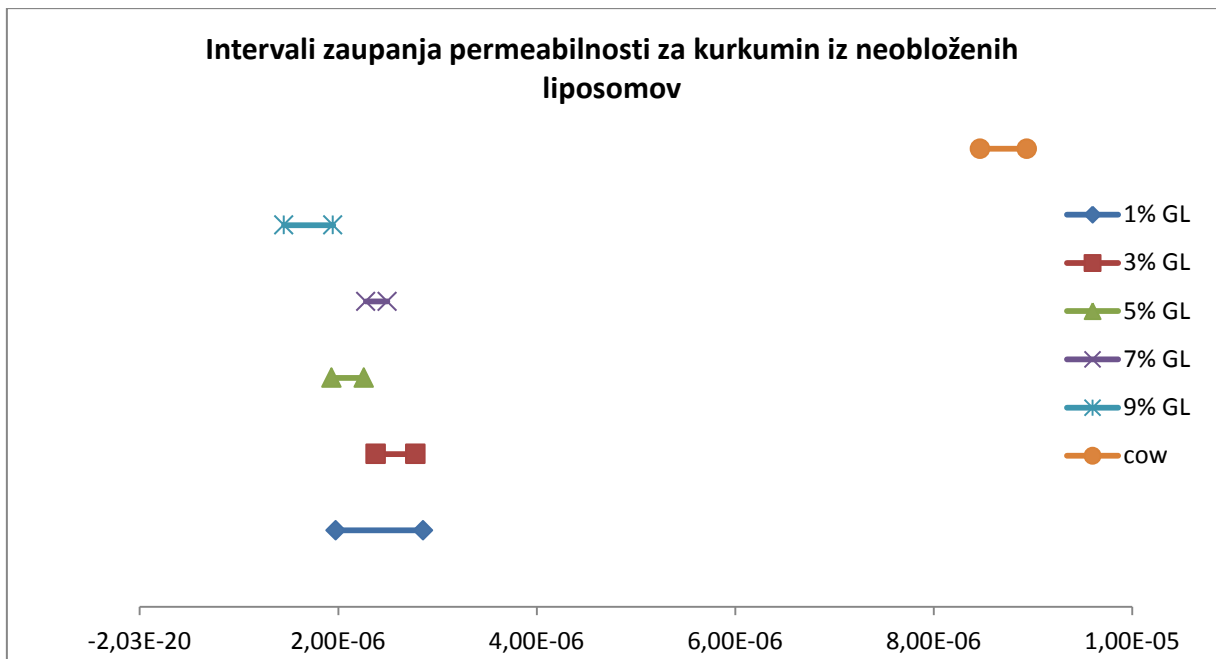
Permeabilnost kurkumina iz raztopine skozi mukusno plast značilno pada z naraščanjem procenta Sigma glikoproteinov; permeabilnost je bila najvišja pri 1 m/v%, značilno nižja in podobna pri 3, 5 in 7 m/v% in najnižja pri 9 m/v% (Slika 17a, 17b). Permeabilnost skozi plast izoliranega kravjega vaginalnega mukusa je bila podobna permeabilnosti skozi sloj Sigma glikoproteinov koncentracije 1 m/v%.

4.2.2 Neobloženi liposomi

Pri poskusih z neobloženimi liposomi smo ugotovili, da spreminjanje vsebnosti Sigma glikoproteinov v mukusni plasti nima značilnega vpliva na permeabilnost kurkumina (Slika 18a, 18b), čeprav smo opazili neznačilen trend padanja permeabilnosti z naraščanjem vsebnosti glikoproteinov tako kot pri raztopini. Permeabilnost skozi kravji vaginalni mukus je bila značilno višja v primerjavi s permeabilnostjo skozi glikoproteinske plasti. V primerjavi z raztopino pa je bila permeabilnost kurkumina iz takšnih liposomov skozi kravji mukus ter glikoproteinske plasti značilno nižja ($p < 0.05$) (Slika 17a).

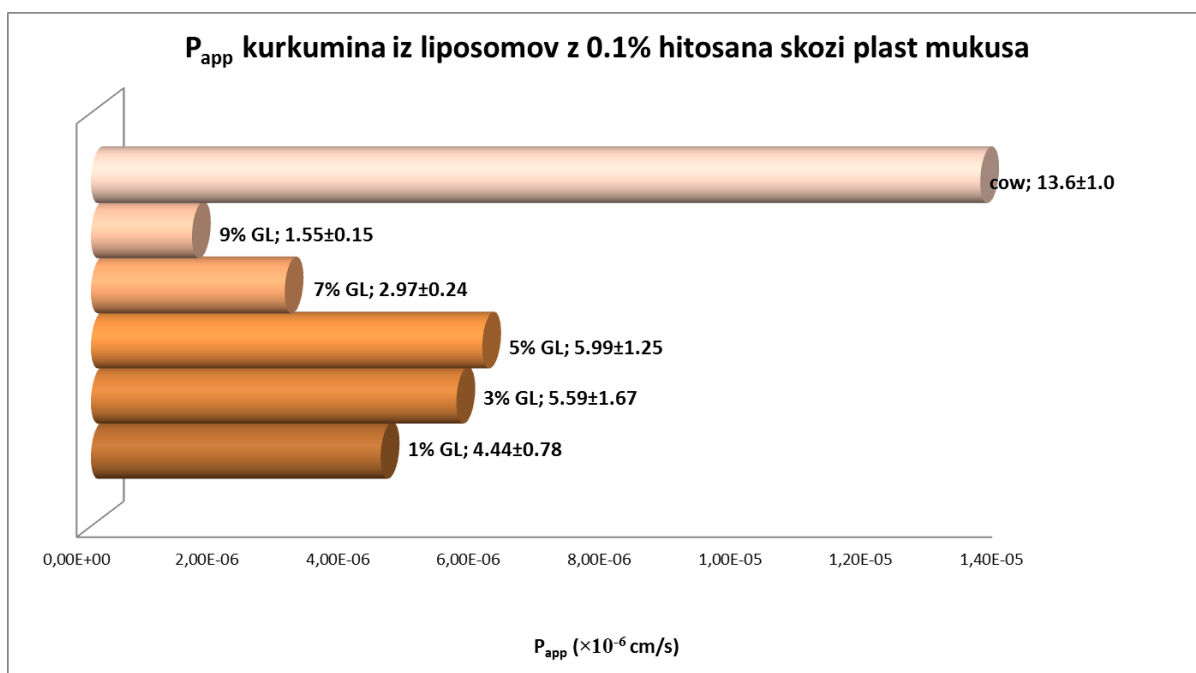


Slika 18a: Zbrane permeabilnosti kurkumina iz neobloženih liposomov skozi vaginalni mukus (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

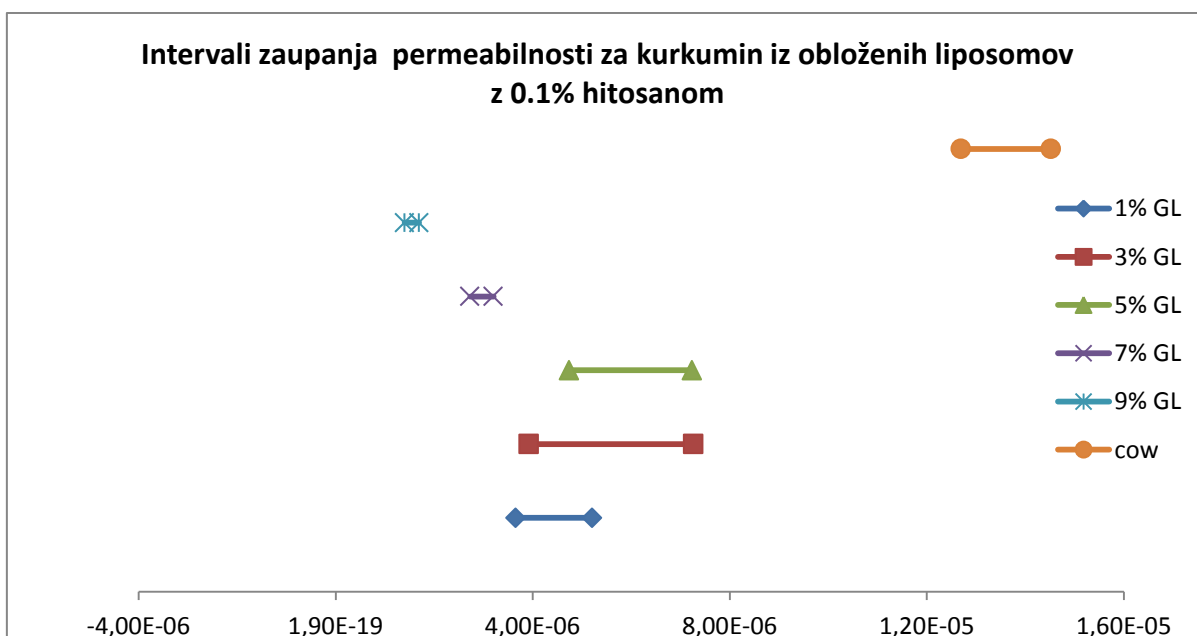


Slika 18b: Intervali zaupanja permeabilnosti kurkumina skozi plasti mukusa za neobložene liposome (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

4.2.3 Mukoadhezivni liposomi z 0.1% hitosana



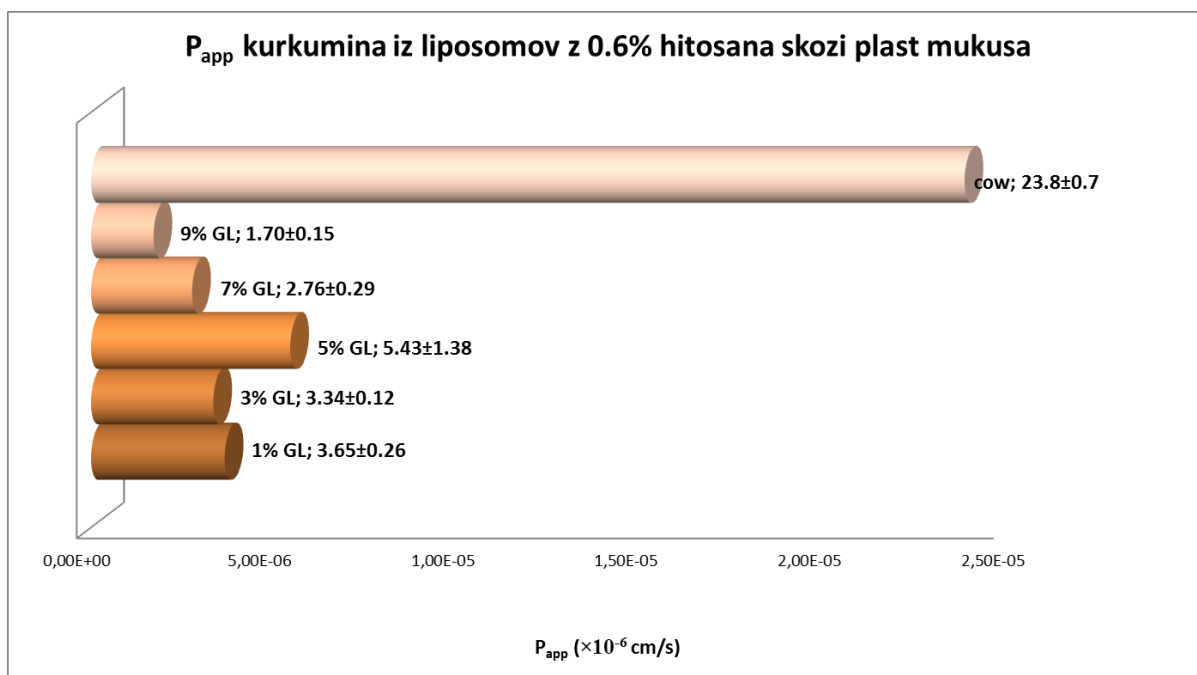
Slika 19a: Zbrane permeabilnosti kurkumina iz obloženih liposomov z 0.1% hitosana skozi vaginalni mukus (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).



Slika 19b: Intervali zaupanja permeabilnosti kurkumina skozi plasti mukusa za obložene liposome z 0.1% hitosanom (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

Vrednosti permeabilnosti kurkumina iz obloženih liposomov z 0.1% hitosanom skozi plasti glikoproteinov se postopoma neznačilno višajo z naraščanjem koncentracij Sigma glikoproteinov vse do 5 m/v%, ko dosežejo najvišje vrednosti. Z nadaljnjim zviševanjem vsebnosti glikoproteinov pa smo zaznali značilen padec permeabilnosti (7 in 9 m/v% glikoproteinov). Permeabilnost kurkumina skozi izoliran kravji mukus je bila višja od vseh ostalih meritev za te liposome (Slika 19a, 19b). Z 0.1% hitosanom obloženi liposomi zagotavljajo podobne permeabilnosti kurkumina skozi 3, 5 in 7 m/v% plasti glikoproteinov in skozi kravji mukus kot raztopina (Slika 17a, 17b). So pa permeabilnosti kurkumina signifikantno višje od ustreznih vrednosti, izmerjenih za neobložene liposome (Slika 18a, 18b).

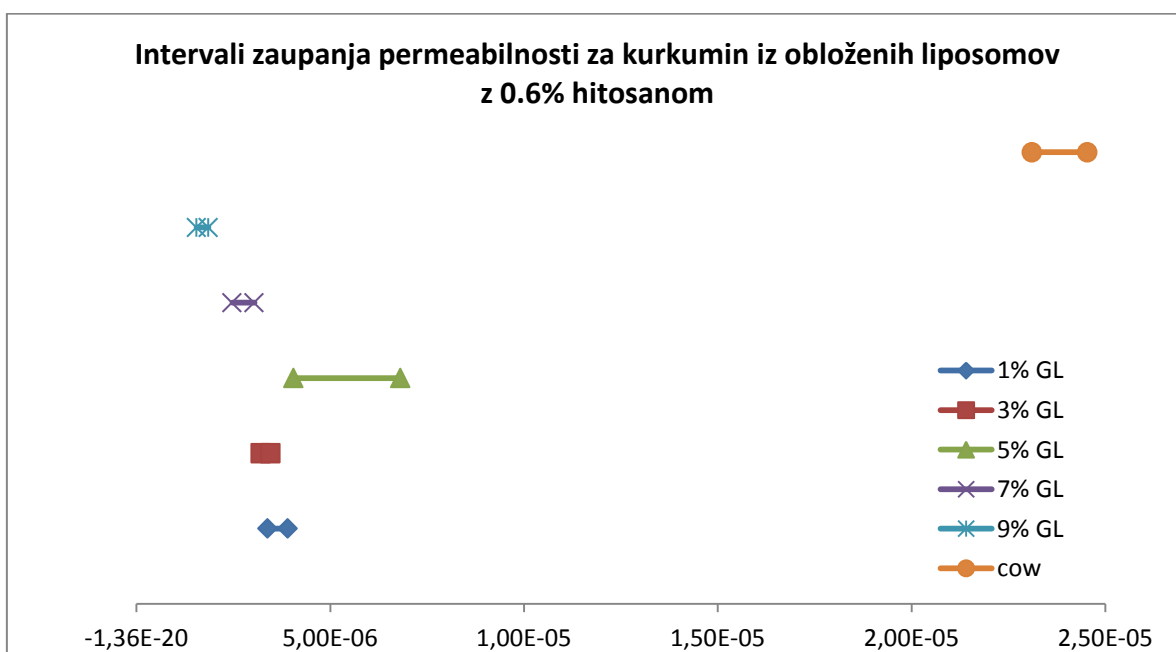
4.2.4 Mukoadhezivni liposomi z 0.6% hitosana



Slika 20a: Zbrane permeabilnosti kurkumina iz obloženih liposomov z 0.6% hitosana skozi vaginalni mukus (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

Podobno kot pri liposomih z 0.1% oblogo hitosana, tudi 0.6% obloga hitosana omogoča najprej postopno naraščanje permeabilnosti kurkumina vse do 5 m/v% vsebnosti Sigma glikoproteinov, kjer so dobljene vrednosti permeabilnosti najvišje in ji nato sledi postopen,

signifikanten padec permeabilnosti z višanjem vsebnosti glikoproteinov do 9 m/v% (Slika 20a, 20b). Vrednosti permeabilnosti so sicer nižje od tistih, določenih pri istih pogojih za 0.1% hitosan (Slika 19 – razlike so statistično nesignifikantne), neobložene liposome (Slika 18 – razlike so statistično značilne) in raztopino (Slika 17 – statistično značilne razlike). Permeabilnost kurkumina skozi kravji mukus je najvišja v primerjavi z meritvami izvedenimi skozi različne plasti z različno vsebnostjo Sigma glikoproteinov za liposome obložene z 0.6% hitosanom (Slika 20a, 20b), kar izkazujejo tudi ostale formulacije (raztopina, neobloženi liposomi, liposomi z 0.1% hitosanom, liposomi z 0.1% in 0.6% karbopolom).

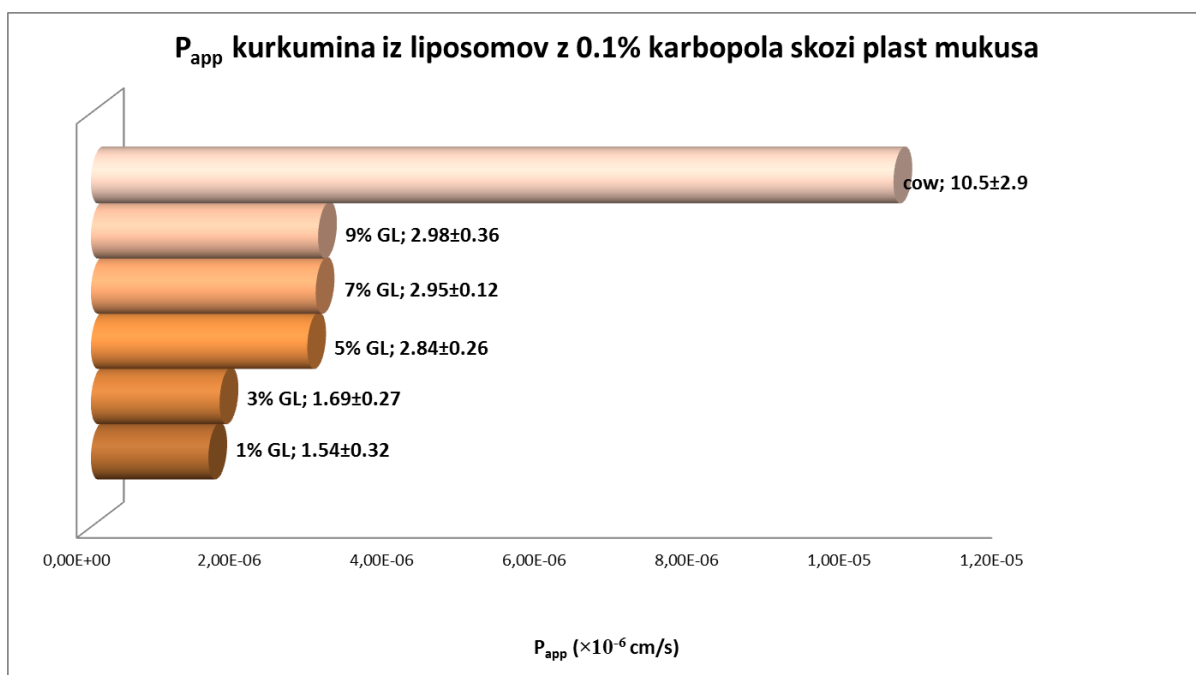


Slika 20b: Intervali zaupanja permeabilnosti kurkumina skozi plasti mukusa za obložene liposome z 0.6% hitosanom (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

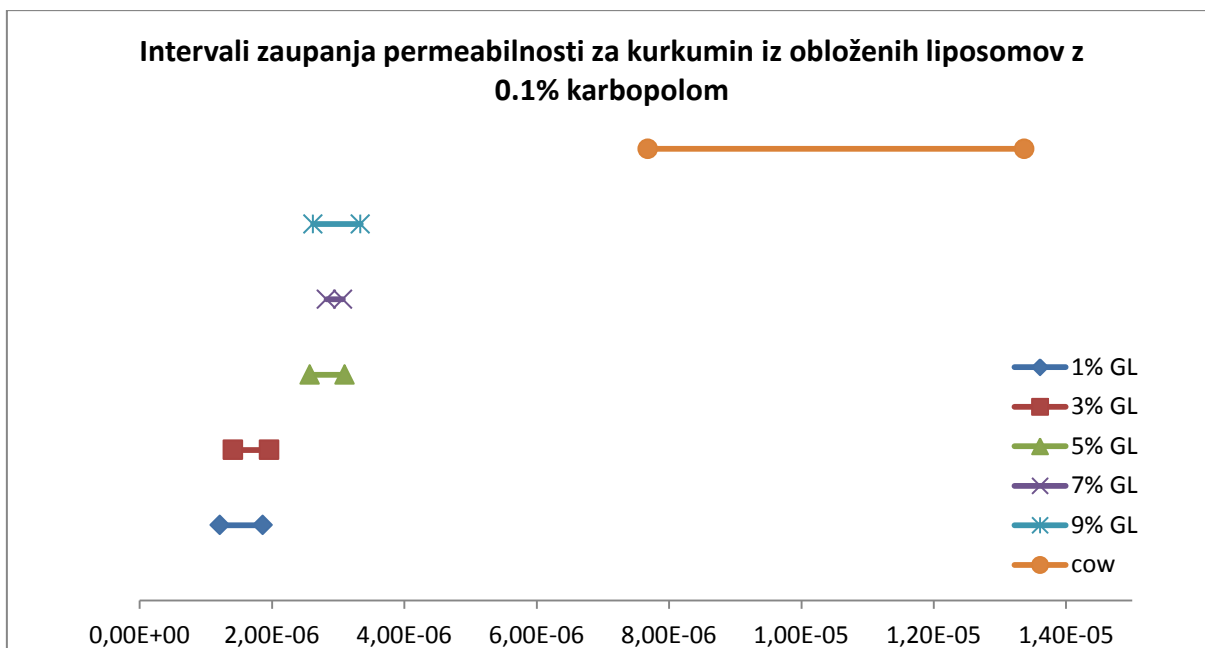
4.2.5 Mukoadhezivni liposomi z 0.1% karbopolom

Vrednost permeabilnosti kurkumina z naraščanjem vsebnosti glikoproteinov v mukusni plasti postopoma narašča in sicer tako, da so permeabilnosti pri 5, 7 in 9 m/v% glikoproteinov statistično značilno višje od tistih, določenih pri vsebnosti 1 in 3 m/v% glikoproteinov. Permeabilnost kurkumina skozi izoliran kravji mukus je najvišja od vseh

meritev (Slika 21a, 21b). Pri 9 m/v% glikoproteinov liposomi z 0.1% karbopolom zagotavljajo višje permeabilnosti kurkumina v primerjavi z raztopino, neobloženimi in s hitosanom (0.1% in 0.6%) obloženimi liposomi. Vrednosti permeabilnosti skozi kravji mukus pa je za tovrstne liposome podobna permeabilnosti kurkumina iz neobloženih liposomov, ki sta med vsemi vrednostmi permeabilnosti skozi kravji mukus med najnižjimi.

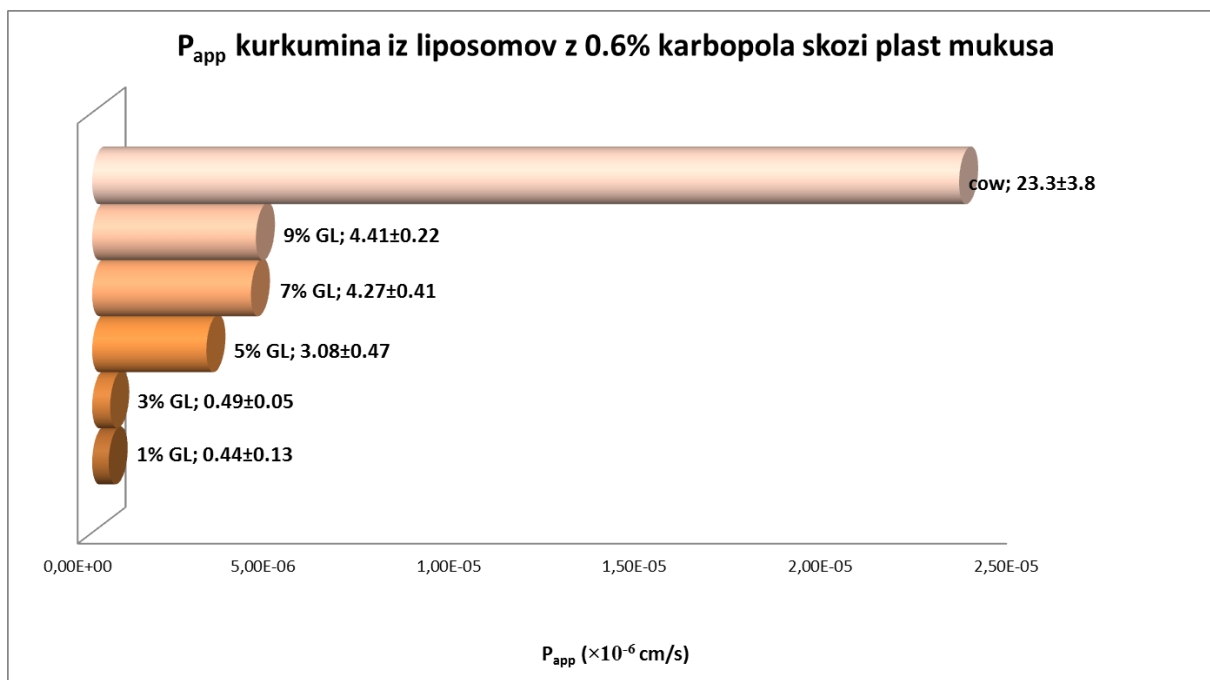


Slika 21a: Zbrane permeabilnosti kurkumina iz obloženih liposomov z 0.1% karbopola skozi vaginalni mukus (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).



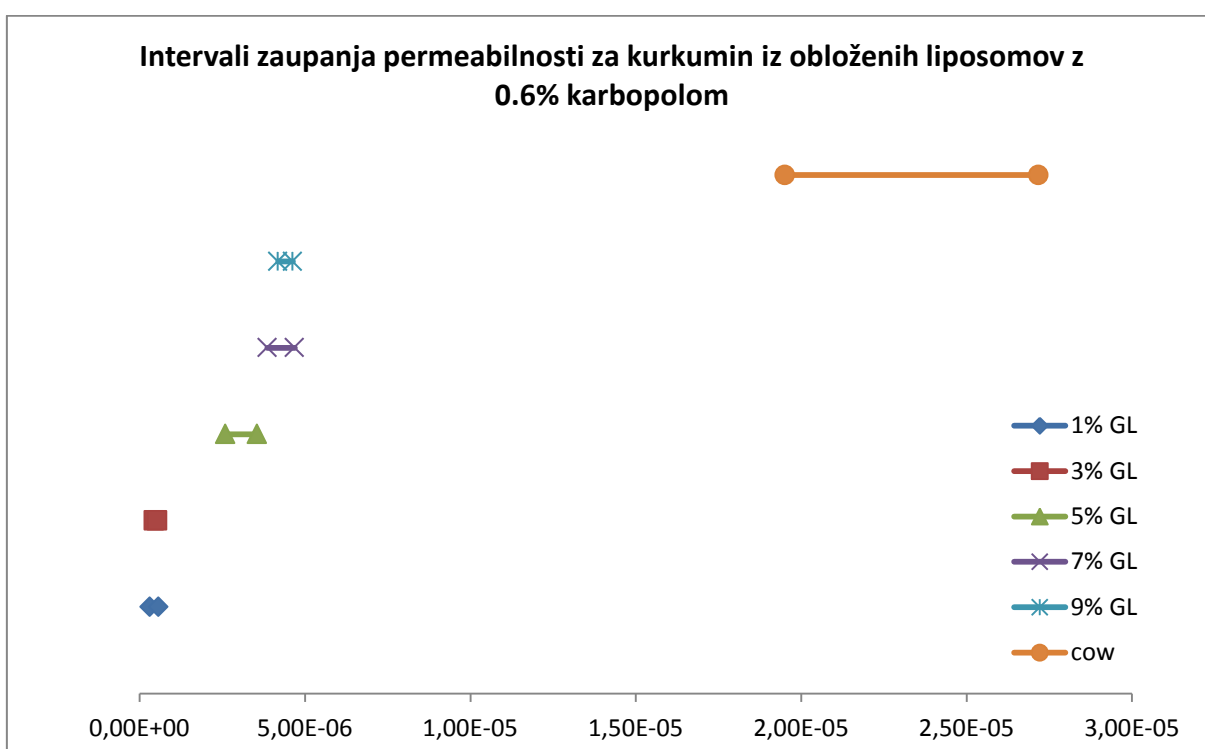
Slika 21b: Intervalsi zaupanja permeabilnosti kurkumina skozi plasti mukusa za obložene liposome z 0.1% karbopolom (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

4.2.6 Mukoadhezivni liposomi z 0.6% karbopolom



Slika 22a: Zbrane permeabilnosti kurkumina iz obloženih liposomov z 0.6% karbopola skozi vaginalni mukus (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

Permeabilnost kurkumina iz liposomov, obloženih z 0.6% karbopolom, narašča z naraščanjem vsebnosti glikoproteinov v mukusni plasti. Vrednosti so statistično značilno najvišje pri 7 in 9 m/v% glikoproteinov. Permeabilnost skozi plast izoliranega kravjega mukusa je najvišja in predstavlja eno izmed najvišjih permeabilnosti kurkumina skozi kravji mukus (podobno permeabilnost kurkumina skozi kravji mukus smo zaznali tudi pri liposomih, obloženimi z 0.6% hitosanom) (Slika 22a, 22b). V primerjavi z ostalimi formulacijami je permeabilnost kurkumina skozi 1 in 3 m/v% plast glikoproteinov iz z 0.6% karbopolom obloženih liposomov najnižja izmed vseh meritev, skozi 9 m/v% plast glikoproteinov pa najvišja.



Slika 22b: Intervali zaupanja permeabilnosti kurkumina skozi plasti mukusa za obložene liposome z 0.6% karbopolom (GL – glikoproteini, cow – izoliran kravji vaginalni mukus).

4.3 Jakost mukoadhezije

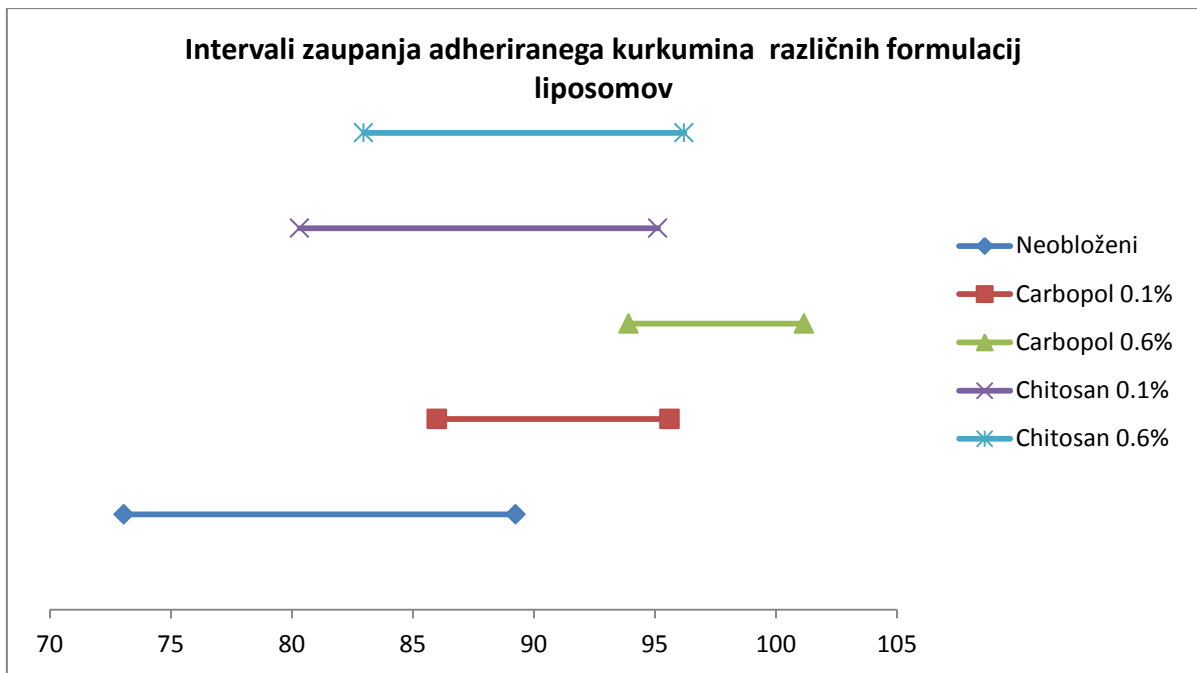
Preglednica XI: Delež kurkumina, ki se je po 3h urah adheriral na tkivo, po aplikaciji različnih liposomov (neobloženi liposomi, liposomi oboženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom, ter liposomi obloženi z 0.1 ali 0.6% karbopolom) z izračunanim povprečjem in standardno deviacijo.

	Neobloženi	Karbopol 0.1%	Karbopol 0.6%	Hitosan 0.1%	Hitosan 0.6%
1	88.42	83.13	93.17	81.06	88.73
2	66.46	89.50	91.72	83.48	92.69
3	91.60	91.75	98.47	81.37	79.05
4	80.75	86.19	90.10	82.18	81.91
5	84.85	92.90	99.68	82.10	93.21
6	81.96	96.50	99.76	96.21	83.65
7	74.35	94.69	99.71	83.25	93.38
8	88.78	86.33	99.86	95.61	99.61
9	77.83	96.27	98.89	97.98	96.34
10	81.11	-	99.90	92.93	87.34
11	70.29	-	99.36	79.60	-
12	87.46	-	99.87	96.92	-
POVPREČJE	81.16	90.81	97.54	87.72	89.59
STDEVIACIJA	7.78	4.80	3.63	7.40	6.62

- : meritve zaradi visokih odstopanj nismo upoštevali.

4.4 Komentar rezultatov za jakost mukoadhezije

Kot merilo jakosti mukoadhezije smo uporabili delež adheriranega kurkumina v tkivo. Pri statistični obdelavi podatkov smo ugotovili glede na intervale zaupanja, da od obloženih formulacij liposomov zagotavlja značilno boljšo mukoadhezijo le formulacija obložena z 0.6% karbopolom v primerjavi z neobloženo (Slika 23). Ostale obložene formulacije se ne razlikujejo v primerjavi z neobloženimi liposomi niti med sabo, saj so procenti kurkumina, ki jih po 3-urni inkubaciji ne speremo iz tkiva, podobni (Tabela XI). Kljub temu lahko opazimo, da oblaganje liposomov sicer zagotovi nekoliko močnejšo bioadhezijo in tako večjo količino preitega kurkumina v tkivo, pri čemer je korelacija med koncentracijo bioadhezivnega polimera in jakostjo mukoadhezije premosorazmerna. Najvišji procent adhezije smo zaznali pri uporabi liposomov, obloženih z 0.6% karbopolom, vpliv hitosana pa je bil v primerjavi s karbopolom šibkejši.



Slika 23: Intervali zaupanja adheriranega kurkumina iz različnih formulacij liposomov (neobloženi, obloženi z 0.1% in 0.6% karbopolom ter obloženi z 0.1% in 0.6% hitosanom).

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo si zastavili dva cilja. S pomočjo Transwell filtrov, namenjenih gojenju celičnih monoslojev, smo razvili *in vitro* model vaginalnega mukusa tako, da smo uporabili komercialno dostopne glikoproteine, izolirane iz želodčnega mukusa prašičev namesto izoliranega vaginalnega mukusa žensk. Ciklično nihanje spolnih hormonov v plazmi in njihov vpliv na sestavo mukusa pa smo posnemali s postopnim zviševanjem koncentracije glikoproteinov. Sočasno smo izvedli tudi poskus z izoliranim kravjim vaginalnim mukusom, saj se naj bi ta glede sestave še najbolj približal sestavi mukusa pri ženskah.

Z opisanim modelom smo nato skozi pripravljene mukusne plasti ovrednotili permeabilnost kurkumina, ki se zaradi svojih biofarmaceutskih omejitev učinkovito uporablja le lokalno. Vrednotili smo različne formulacije; raztopino, neobložene fosfolipidne liposome ter mukoadhezivne liposome, ki so bili obloženi z 0.1 ali 0.6% hitosanom ter z 0.1 ali 0.6% karbopolom.

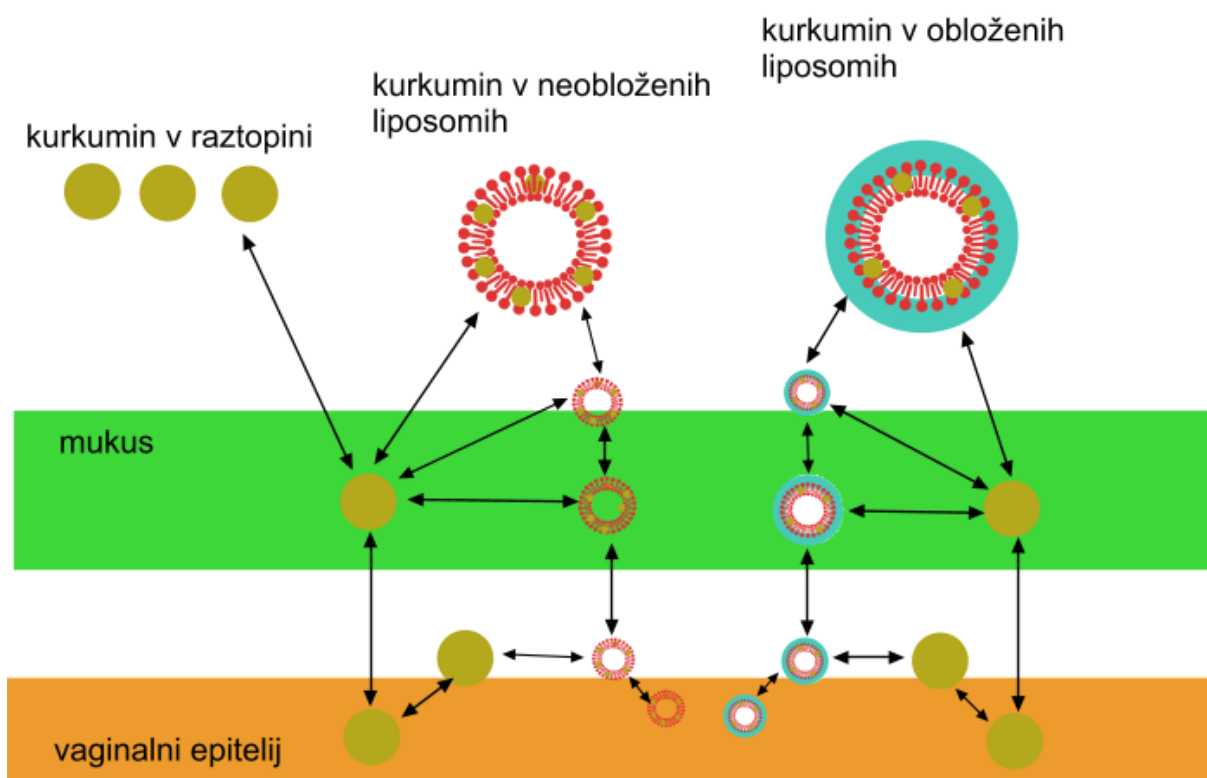
V drugem delu naloge smo vrednotili jakost mukoadhezije (ne)obloženih liposomov na svežem kravjem vaginalnem tkivu, ki je fiziološko in anatomsko zelo podobno ženskemu. Za preučevanje smo uporabili iste formulacije kot za vrednotenje permeabilnosti kurkumina.

Naš končni cilj je bil načrtati osnovne smernice, ki bi omogočile izdelavo mukoadhezivnih fosfolipidnih dostavnih sistemov za vaginalno aplikacijo kurkumina, ki bi zagotavljali primerno permeabilnost in jakost bioadhezije.

5.1 Permeabilnost kurkumina skozi mukus

Pri spremljanju permeabilnosti kurkumina skozi vaginalni mukus smo kot referenčno formulacijo uporabili raztopino, kjer na permeabilnost vpliva zgolj vzpostavitev ravnotežja med raztopljenim in na glikoproteine oz. na mucine vezanim kurkuminom. Pri ostalih formulacijah (neobloženi in obloženi liposomi), pa lahko pričakujemo še dodatne zakasnjene farmakokinetične vplive, odvisne od sestave liposomov in postopka njihove izdelave. In sicer lahko liposomi na različnih globinah interagirajo s sestavinami mukusa; večji se običajno zadržijo na mukusni površini, manjši pa lahko potujejo do nižje ležečih

plasti oz. vse do epitelijskega tkiva. Na mestu lokalizacije liposomov se kurkumin iz njih sprosti in difundira do vaginalnega epitelijskega tkiva. Glede na nedavno študijo, bi lahko prišlo do privzema intaktnih liposomov, katerih fosfolipidna sestava omogoča zlitje s celičnimi membranami tarčnega epitelijskega tkiva (36) (Slika 23). Navkljub časovni zahtevnosti opisanih procesov, ki najverjetneje negativno vplivajo na permeabilnost kurkumina skozi mukus, pa fosfolipidno ogrodje omogoča vgradnjo večjih količin kurkumina kot raztopina zaradi njegove višje topnosti v hidrofobnem delu liposomov ($\log P$ kurkumina > 3) ter izboljšane stabilnosti kurkumina (t.j. zaščita pred okoljskimi vplivi) (35). Oblaganje liposomov z mukoadhezivnimi polimeri (v našem primeru s hitosanom in karbopolom) še dodatno nudi možnost podaljšanja časa zadrževanja farmacevtske oblike na mestu aplikacije, s čimer se potreba po ponavljajoči aplikaciji zdravila zmanjša, komplanca pacientk pa izboljša.



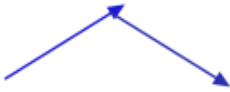



Slika 24: Farmakokinetični procesi (porazdeljevanje kurkumina iz raztopine oz. liposomov v mukusno plast/umetno vaginalno tekočino, interakcije liposomov z mukusom ter vaginalnim epitelijem), ki vplivajo na permeabilnost kurkumina skozi plast mukusa.

Pri poizkusih z različnimi formulacijami kurkumina smo opazili tri različne trende spreminjanja permeabilnosti substance z naraščanjem vsebnosti glikoproteinov. Pri

raztopini in neobloženih liposomih je permeabilnost statistično (ne)značilno padala z višanjem vsebnosti glikoproteinov, medtem ko smo pri s hitosanom obloženih liposomih opazili najprej postopno naraščanje permeabilnosti do določene vsebnosti glikoproteinov, ki ji je sledil statistično značilen padec. Če so bili liposomi obloženi s karbopolom, je permeabilnost kurkumina z naraščanjem vsebnosti glikoproteinov statistično signifikantno naraščala (Preglednica XII).

Preglednica XII: Trendi spreminjanja permeabilnosti kurkumina skozi vaginalni mukus.

Testirana formulacija	Trend spreminjanja permeabilnosti z naraščanjem konc. glikoproteinov	Max permeabilnost	Permeabilnost skozi kravji mukus
RAZTOPINA	 sig.	1 w/v % GL	višja; podobna permeabilnosti skozi 1 w/v% GL
NEOBLOŽENI LIPOSOMI	 nesig.	povsod podobna	višja
OBLOŽENI LIPOSOMI S HITOSANOM	 sig.	5 w/v % GL	višja
OBLOŽENI LIPOSOMI S KARBOPOLOM	 sig.	7 in 9 w/v % GL	višja

Glede na trend spreminjanja permeabilnosti kurkumina, apliciranega na mukusne plasti v obliki raztopine, smo sklepali, da se število oz. verjetnost interakcij med kurkuminom in glikoproteini z naraščanjem koncentracije glikoproteinov povečuje, ker se za preučevani polifenol povečuje število vezavnih mest na makromolekulah. Kurkumin se tako v večji meri veže na makromolekule pri višjih koncentracijah glikoproteinov, kar zniža njegovo prosto koncentracijo, koncentracijski gradient in posledično tudi permeabilnost. Možno je tudi, da k zniževanju permeabilnosti kurkumina prispeva tudi postopno višanje viskoznosti pripravljenega medija z glikoproteini kot posledica njihove večje vsebnosti. Naša opažanja, da mukus signifikantno zmanjša permeabilnost kurkumina na poti do tkiva, se skladajo tudi z izsledki študij, izvedenih na črevesnem epiteliju, kjer so s porušenjem oz. odstranitvijo mukusa s površine črevesne sluznice avtorji dosegli statistično značilno zvišanje permeabilnosti kurkumina (36).

Permeabilnost kurkumina iz neobloženih liposomov je bila statistično značilno nižja v primerjavi z raztopino pri vseh uporabljenih koncentracijah glikoproteinov. Prav tako smo

opazili, da sestava umetnega mukusa (t.j. vsebnost glikoproteinov v mukusni plasti) nima značilnega vpliva na permeabilnost (Slika 17b), navkljub nakazanemu trendu padanja permeabilnosti z višanjem vsebnosti glikoproteinov (Slika 17a, Tabela XII). Ogradje neobloženih liposomov predstavljajo le fosfolipidne molekule, kjer se v hidrofobni notranjosti nahaja vgrajen kurkumin. Neobčutljivost permeabilnosti kurkumina iz neobloženih liposomov, na spreminjanje sestave pripravljenega mukusa nakazuje, da fosfolipidno ogradje neobloženih liposomov najverjetneje ne interreagira z glikoproteini v mukusni plasti ter da se v *in vivo* pogojih liposomi najverjetneje nahajajo na površini mukusne bariere, saj glede na ocenjeno velikost teh liposomov 700-1000 nm, le-ti ne prehajajo skozi ožje vodne pore v globlje plasti mukusa (38, Slika 5). Nižje vrednosti P_{app} so tako najverjetneje posledica časovno zahtevnega porazdeljevanja kurkumina iz neobloženih liposomov v vaginalni sok tik nad površino mukusa oz. v prvih nekaj plasteh. Pri neobloženih liposomih tako najverjetneje potečejo trije zaporedni procesi; sproščanje kurkumina iz liposomov, difuzija skozi mukusno plast do epitelija ter vzpostavljanje ravnotežja med prostim in na glikoproteine vezanim kurkuminom. Pri tem lahko sklepamo, da je porazdeljevanje kurkumina iz liposomov hitrost-omejujoči korak pri nižjih vsebnostih glikoproteinov, medtem ko se pri višjih koncentracijah glikoproteinov upočasni tudi vzpostavljanje ravnotežja med na makromolekule vezanim in nevezanim kurkuminom zaradi večjega števila vezavnih mest (kot že opisano na primeru raztopine).

V nadaljevanju smo testirali obložene liposome, katerih obloga je vsebovala bodisi karbopol bodisi hitosan v 0.1 ali 0.6% koncentracijah in katerih ocenjena velikost je bila v razponu 1 – 2 μm (38). Oba polimera izkazujeta mukoadhezivne lastnosti (28), zato smo pričakovali, da se bo vzpostavitev mukoadhezije med liposomi in umetnim mukusom odražala tudi na izmerjenih permeabilnostih. Te so bile ob uporabi hitosana v oblogi najvišje pri 5 m/v%, pri uporabi karbopola pa pri 7 in 9 m/v% glikoproteinov.

Višanje vsebnosti hitosana z 0.1 na 0.6% ni signifikantno vplivalo na permeabilnost kurkumina, saj so bile vse vrednosti permeabilnosti kurkumina iz liposomov z nižjo vsebnostjo hitosana višje od tistih, dobljenih z višjo, 0.6% vsebnostjo. Primerjava s preostalimi formulacijami pa je pokazala, da so bile permeabilnosti kurkumina iz liposomov z 0.1% hitosana v oblogi primerljive s permeabilnostjo kurkumina iz raztopine (izjema je disperzija z 1 m/v% glikoproteini) in statistično višje od tistih, ki smo jih določili za neobložene liposome.

Nasprotno smo pri obloženih liposomih s karbopolom zaznali pozitivno korelacijo med vsebnostjo karbopola in permeabilnostjo kurkumina. 0.6% karbopol je namreč statistično signifikantno vplival na povišanje permeabilnosti kurkumina pri višjih vsebnostih glikoproteinov (7 in 9 m/v%). Z uporabo teh liposomov smo tako pri visokih vsebnostih glikoproteinov določili celo višjo permeabilnost kurkumina kot za preostale testirane formulacije.

Ker je velikost obloženih liposomov večja od neobloženih, obloženi liposomi po aplikaciji ostanejo na mukusni površini, kjer po določenem času obloga nabrekne, nastopi prepletanje verig z glikoproteini in vzpostavitvev mukoadhezije (1,2,12,28). Podobno kot pri neobloženih tudi pri obloženih liposomih sledi porazdeljevanje kurkumina v umetno vaginalno tekočino oz. v mukus ter difuzija učinkovine skozi mukus, vezava na mukus in na koncu še difuzija v vaginalni epitelij (1,2,12). Glede na različne permeabilnosti kurkumina iz obloženih liposomov smo sklepali, da izbira mukoadhezivnega polimera pomembno vpliva na porazdeljevanje kurkumina iz liposomov v okolico ter morebiti vpliva tudi na strukturo glikoproteinov in jakost mukoadhezije. Najpomembnejša razlika med uporabljenima polimeroma je njun naboj v kislih pogojih. V kisli umetni vaginalni tekočini (pH 4) izkazujejo liposomi, obloženi s hitosanom, navzven pozitiven naboj, medtem ko so liposomi, obloženi s karbopolom, brez naboja (28). Elektrostatske interakcije med polimerom in mukusom, bi tako lahko vplivale na hitrost porazdeljevanja kurkumina iz liposomov v vaginalni sok. Poleg tega pa lahko tudi sklepamo, da je jakost mukoadhezije med hitosanom in glikoproteini najvišja pri 5 m/v% glikoproteinih, med karbopolom in glikoproteini pa doseže najvišje vrednosti šele pri višjih, 7 in 9 m/v% vsebnostih. Višja jakost mukoadhezije posledično pomeni boljšo lokalizacijo oblike na mestu aplikacije ter višje lokalne koncentracije sproščene učinkovine. Znano je namreč, da jakost mukoadhezije narašča z naraščanjem vsebnosti ene izmed komponent, bodisi polimera bodisi glikoproteinov v mukusu vse do določenih mejnih vrednosti, nad katerimi se jakost mukoadhezije prične zmanjševati oz. ostaja nespremenjena, saj je razpoložljiva površina obloženega liposoma, na kateri lahko poteče mukoadhezija z glikoproteini, omejena. Pri večanju deleža polimera v oblogi se tako obloga debeli, premer liposomov narašča, velik delež polimera pa ostaja v globljih plasteh liposomov, ki niso udeleženi pri mukoadheziji vse dokler se zgornje plasti obloge ne odstranijo iz delcev npr. z erozijo oz. z obnavljanjem mukusa (28,29). V primeru obloge iz hitosana, smo višje permeabilnosti

določili pri 0.1% vsebnosti hitosana ter pri srednji vrednosti glikoproteinov, kar pomeni, da je vgradnja višjega procenta hitosana v obložene liposome nesmiselna z vidika izboljšanja permeabilnosti kurkumina. Obloga iz karbopola pa zagotavlja večjo permeabilnost kurkumina pri 7 in 9 m/v% Sigma glikoproteinov, ko je število interakcij med polimerom in glikoproteini najverjetneje najvišje. Za ta polimer bi bilo zato utemeljeno preveriti vpliv še višjih vsebnosti karbopola v oblogi na permeabilnost kurkumina (morda 0.6% karbopol še ne zagotavlja najvišje jakosti mukoadhezije).

Uporaba *in vitro* modela s prašičjimi želodčnimi glikoproteini nam je tako omogočila, da smo ovrednotili možne biofarmacevtske procese, ki zaznamujejo prehod kurkumina skozi vaginalni mukus glede na aplicirano formulacijo. Ker pa je sestava *in vivo* mukusa bistveno kompleksnejša kot jo predstavlja vodna disperzija glikoproteinov, smo vpliv formulacij na permeabilnost kurkumina preverili tudi z izoliranim kravjim mukusom, ki po sestavi spominja na vaginalni mukus žensk (8). Ugotovili smo, da so vrednosti P_{app} kurkumina iz vseh testiranih dostavnih sistemov statistično značilno višje od tistih, določenih pri različnih vsebnostih glikoproteinov v umetnem mukusu, ter da najvišjo permeabilnost zagotovimo z uporabo obloženih liposomov, ki vsebujejo bodisi 0.6% hitosan bodisi 0.6% karbopol.

Glede na izgled izoliranega kravjega mukusa (brezbarven, voden gel) smo sklepali, da smo mukus odvzeli živali v estrogenski oz. ovulatorni fazi, ko je vsebnost glikoproteinov nižja. Ker smo opravili le en poskus, ne moremo sklepati, ali bi bili trendi spreminjanja permeabilnosti kurkumina skozi mukus, ki bi ga odvzeli v lutealni fazi, podobni kot smo jih predstavili z *in vitro* umetnim mukusom in višjo vsebnostjo glikoproteinov. Potrdimo pa lahko, da je uporaba mukoadhezivnih liposomov verjetno upravičena, ter da iz *in vitro* rezultatov z umetnim mukusom ne moremo napovedovati optimalne vsebnosti mukoadhezivnega polimera v oblogah, da bi zagotovili najvišjo jakost mukoadhezije oz. permeabilnost. Pri obeh mukoadhezivnih polimerih je permeabilnost kurkumina skozi izoliran kravji mukus namreč narasla z višanjem vsebnosti polimera, česar nismo mogli potrditi tudi z umetnim mukusom.

5.2 Mukoadhezija

Mukoadhezijo smo ocenjevali z aplikacijo različnih formulacij liposomov s kurkuminom na izolirano vaginalno tkivo krav, ki jim med pripravo nismo odstranili vaginalnega mukusa. Liposome smo pustili na tkivu pri kontroliranih pogojih 3h ter nato z umetnim vaginalnim sokom, neadherirani delež formulacije sprali s tkiva. V izprani tekočini smo nato določili delež neadheriranega kurkumina, kar nam je omogočilo določitev adheriranega deleža, ki je služil kot merilo za jakost mukoadhezije.

Pri s karbopolom obloženih liposomih smo zaznali pozitivno korelacijo med količino adheriranega kurkumina in deležem mukoadhezivnega polimera v oblogi (Preglednica XI). Med liposomi obloženimi z 0.1% in 0.6% hitosanom nismo zaznali signifikantnih razlik v deležu adheriranega kurkumina, iz česar smo sklepali, da obe koncentraciji bioadhezivnega polimera omogočita približno enako jakost mukoadhezije. Tako kot pri določanju vrednosti permeabilnosti, kjer procent hitosana v oblogi ni signifikantno vplival na njeno izboljšanje, bi ta odstopanja morda lahko pripisali različni stopnji ionizacije in naboja polimerov v kislih pogojih (hitosan je pozitivno nabit, karbopol je brez naboja). Delež adheriranega kurkumina je bil od uporabljenih formulacij najnižji pri uporabi neobloženih liposomov.

Preglednica XIII: ANOVA Post Hoc test (primerjava vrednosti mukoadhezije med uporabljenimi liposomi).

ANOVA (Bonferroni)		Sig.
Neobloženi	Karbopol 0,1 %	0,011
	Karbopol 0,6 %	0,000
	Hitosan 0,1 %	0,139
	Hitosan 0,6 %	0,030
Karbopol 0,1 %	Neobloženi	0,011
	Karbopol 0,6 %	0,192
	Hitosan 0,1 %	1,000
	Hitosan 0,6 %	1,000
Karbopol 0,6 %	Neobloženi	0,000
	Karbopol 0,1 %	0,192
	Hitosan 0,1 %	0,004
	Hitosan 0,6 %	0,049
Hitosan 0,1 %	Neobloženi	0,139
	Karbopol 0,1 %	1,000
	Karbopol 0,6 %	0,004
	Hitosan 0,6 %	1,000
Hitosan 0,6 %	Neobloženi	0,030
	Karbopol 0,1 %	1,000
	Karbopol 0,6 %	0,049
	Hitosan 0,1 %	1,000

Razlika je statistično signifikantna pri sig < 0,005

Iz dobljenih vrednosti mukoadhezij uporabljenih (ne)obloženih liposomov, smo izvedli ANOVA test (analiza varianc) (Tabela XIII), kjer smo primerjali deleže vezanega kurkumina iz vseh formulacij. Izkazalo se je, da se rezultati dobljeni z liposomi, obloženimi z 0.6 % karbopolom, statistično značilno razlikujejo od deleža adheriranega kurkumina pri neobloženih in s hitosanom (obe koncentraciji) obloženih liposomih (Preglednica XIII).

Čeprav neobloženi liposomi sami po sebi ne omogočajo mukoadhezije, je procent »navidezno adheriranega« kurkumina na kravjo vaginalno sluznico relativno visok

(Preglednica XI). Kot smo omenili že v prvem delu diskusije, je sproščanje kurkumina iz neobloženih liposomov najverjetneje hitrejše kot je sproščanje iz obloženih liposomov. Dodatna obloga na površini fosfolipidnega sloja namreč predstavlja dodatno difuzijsko bariero za porazdeljevanje kurkumina iz formulacije v inkubacijski medij. Dokaj visoke vrednosti vezave kurkumina na tkivo se izkazujejo tudi kot posledica visoke afinitete učinkovine do tkiva. Afiniteta kurkumina do tkiva pa se še poveča, ko je le-ta kompleksiran v lipidnem vehiklu kot je L-fosfatidilholin, ogrodje uporabljenih liposomov. Kljub temu se vrednosti adheriranega kurkumina signifikantno razlikujejo od ostalih formulacij razen od liposomov obloženih z 0.1% hitosanom (Preglednica XIII). Glede na predstavljene rezultate, hitrejše sproščanje kurkumina iz neobloženih liposomov ter visoka afiniteta te lipofilne molekule do tkiva, pripomore k temu, da je učinek izboljšanja lokalizacije mukoadhezivnih liposomov na tkivu zabrisan. Za nadaljne študije jakosti mukoadhezije (ne)obloženih liposomov s kurkuminom zato predlagamo bodisi izvedbo krajših poskusov in določanje jakosti adheriranega kurkumina po eni uri bodisi uporabi manj statičnih modelov za vrednotenje jakosti mukoadhezije, ki bi vključevali agresivnejše spiranje, katero bi omogočilo bolj natančno zaznavanje razlik v jakosti mukoadhezije različnih formulacij (35, 36, 37) (Preglednica XI).

Glede na rezultate obeh analiz lahko zaključimo, da izmed uporabljenih liposomov, liposomi obloženi z 0.6% karbopolom zagotavljajo najvišjo permeabilnost kurkumina in najboljšo jakost mukoadhezije na vaginalnem tkivu *in vitro*. Za ugotovitev optimalne koncentracije tega polimera pa predlagamo dodatne teste permeabilnosti kurkumina in jakosti mukoadhezije z uporabo kravjega vaginalnega tkiva, odvzetega iz različnih in znanih faz menstrualnega ciklusa živali.

6 SKLEP

S pomočjo razvitega *in vitro* vaginalnega modela smo ovrednotili biofarmaceutske lastnosti kurkumina (permeabilnost kurkumina skozi umetni vaginalni mukus, jakost mukoadhezije) iz različnih (ne)obloženih liposomov za vaginalno aplikacijo. Ugotovili smo, da aplikacija obloženih liposomov omogoči boljšo permeabilnost kurkumina skozi mukusno plast zlasti pri višjih koncentracijah glikoproteinov najverjetneje zaradi mukoadhezije, ki omogoči višje lokalne koncentracije spojine.

Sestava *in vivo* mukusa je kompleksnejša od disperzij Sigma glikoproteinov, predstavljenih v nalogi, zato smo vpliv vaginalnega mukusa na permeabilnost in sproščanje kurkumina preverili tudi z izoliranim kravjim mukusom in ugotovili, da so vrednosti permeabilnosti za vse testirane formulacije višje od tistih, ki smo jih določili skozi plasti umetnega mukusa, najvišje vrednosti pa smo določili za obložene liposome z 0.6% hitosanom ali z 0.6% karbopolom.

Mukoadhezijo smo določali na sveže izoliranem vaginalnem kravjem tkivu, ki je fiziološko in anatomsko še najbolj podobno človeškemu in pokazali, da 0.6% karbopol omogoča najmočnejšo jakost mukoadhezije, čeprav med vzorci nismo zaznali bistvenih razlik. Razlik med liposomi obloženimi z 0.1 in 0.6% hitosanom ni, medtem ko neobloženi liposomi omogočajo najnižji obseg mukoadhezije, vendar pa so rezultati za to formulacijo nepričakovano visoki, najverjetneje zaradi visoke afinitete kurkumina do vaginalnega tkiva in dolgo trajajočega eksperimenta.

V nalogi smo dokazali, da je uporaba mukoadhezivnih polimerov upravičena, vendar pa optimalne vsebnosti polimera v oblogi zaradi razlik v sestavi kravjega in človeškega mukusa ne moremo ekzaktno določiti z *in vitro* modelom.

7 LITERATURA

1. Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 2005, št. 57, str. 1692-1712.
2. Valenta C, Kast CE, Harich I, Bernkop-Schurnch A. Development and in vitro evaluation of mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. *Journal of controlled release*, 2001, št. 77, str. 323-332.
3. Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L, Zampaglione E. Why consider vaginal drug administration? *Fertility and sterility*, 2004, vol. 82, št. 1.
4. Hani U, Bhat RS, Sisodiya R, Shivakumar HG. Novel vaginal drug delivery systems : A review. *Current drug therapy*, 2010, št. 5, str. 95-104.
5. Hussain A, Aksan F. The vagina as a route for systemic drug delivery. *Journal of controlled release* 2005, št. 103, str. 301-313.
6. Owen DH, Katz DF. A vaginal fluid stimulant. *Contraception* 1999, št.59, str. 91-95.
7. Otero MC, Nader-Macias ME. Lactobacillus adhesion to epithelial cells from bovine vagina. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, str. 749-757.
8. Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *Journal of Animal Science*, 1999, št. 77, str. 101-110.
9. De Araujo Pereira RR, Bruschi ML. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 2011, str. 1-10.
10. Pret G, Huggins GH. Cyclical changes in volatile acidic metabolites of human vaginal secretions and their relation to ovulation. *Journal of Chemical Ecology*, 1975, št.3, str. 361-376.
11. Daunter B, Counsilman C. Cervical mucus: its structure and possible biological functions. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 1980, št. 10/3, str. 141-161.
12. Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. *Advanced drug delivery reviews*, 2001, št. 48, str. 173-193.
13. Wolf DP, Sokoloski JE, Litt M. Composition and function of human cervical mucus. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1980, št. 630, str. 545-558.

14. Moghissi K, Neuhaus OW, Stevenson CS. Composition and properties of human cervical mucus: Electrophoretic separation and identification of proteins. Detroit, 1960.
15. Carlstedt I, Lindgren, H. et al. Isolation and characterization of human cervical-mucus glycoproteins. *Biochemical Journal*, 1983, št. 211, str. 13-22.
16. Baloglu E, Senyigit ZA, Karavana SY, Bernkop-Schnurch A. Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2009, št. 12, str. 312-336.
17. Carlsted I, Lindgren H, Sheehan JK. The macromolecular of human cervical-mucus glycoproteins. *Biochemical Journal*, 1983, št. 213, str. 427-435.
18. Van Kooij RJ, Roelofs HJ, Kathmann GA, Kramer MA. Human cervical mucus and its mucous glycoprotein during the menstrual cycle. *Fertility and sterility*, 1980, št. 34, str. 226-233.
19. Shettles LB, Dische Z, Osnos M. Neutral mucopolysaccharide of the human cervical mucus. 1951, New York.
20. Wagner G, Levin RJ. Electrolytes in vaginal fluid during the menstrual cycle of coitally active and inactive women. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1980, št. 60, str. 17-27.
21. Shettles LB. The polysaccharide composition of human cervical mucus. *Fertility and sterility*, 1951, vol. 2, št. 4, str. 361-368.
22. Singh EJ Swartwout JR. Effects of oral contraceptives on free fatty acids of human cervical mucus.
23. Rutllant J, Lopez-Bejar M, Lopez-Gatius F. Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 2005, št. 40, str. 79-86.
24. Deutscher GH. G80-537 Reproductive trace anatomy and physiology of the cow. Historical materials from University of Nebraska-Lincoln Extension, 1980. Paper 315.
25. Takeuchi H, Matsui Y, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *Journal of controlled release*, 2003, št. 86, str. 235-242.

26. Grabovac V, Guggi D, Bernkop-Schnurch A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced drug delivery reviews*, 2005, št. 57, str. 1713-1723.
27. Hosmani, A.H. Carbopol and its pharmaceutical significance: A review. 2006.
28. Ahuja, A. Khar, R.K. in Ali, J. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 1997, št. 23, str. 489-515.
29. Varum FJO, McConell EL, Sousa JJS, Veiga F, Basit AW. Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 2008, št. 25, str. 207-258.
30. Suheyly Kas H. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *Microencapsulation*, 1997, vol. 14, št. 6, str. 689-711.
31. Ravi Kumar M.N.V. A review of chitin and chitosan application. *Reactive & functional polymers*, 2000, št. 46, str. 1-27.
32. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International journal of pharmaceutics*, 1998, št. 166, str. 68-75.
33. Yin L, Ding J, He C, Cui L, Tang C, Yin C. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 2009, št. 30, str. 5691-5700.
34. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2011, št. 3, str. 89-100.
35. Škalko-Basnet N, Basnet P. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*, 2011, št. 16, str. 4567-4598.
36. Kunwar A, Barik A, Pandey R, Priyadarsini KA. Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochimica and Biophysica Acta*, 2006, št. 1760, str. 1513-1520.
37. Berginc K, Škalko-Basnet N, Basnet P, Kristl A. An in vitro model to assess biopharmaceutical properties of liposomally-associated drug for vaginal delivery: Permeability of curcumin. Poslano v objavo v: AAPS PharmSciTech.

38. Karn PR, Vanić Ž, Pepić I, Škalko-Basnet N. Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material. Drug development and industrial pharmacy, 2011, št. 37, str. 482-488.