

# Formulering av kurkumin for bruk i antimikrobiell fotodynamisk terapi (aPDT)

## TITTEL

Formulation of a hydrophobic photosensitizer for topical photodynamic therapy. Application of alginate and cyclodextrin

## EMNE

Galenisk farmasi

## STIPENDIAT

Anne Bee Hegge,  
Farmasøytisk institutt, UiO  
[a.b.hegge@farmasi.uio.no](mailto:a.b.hegge@farmasi.uio.no)

## HOVEDVEILEDERE

Professor Hanne Hjorth Tønnesen  
og professor Solveig Kristensen,  
Farmasøytisk institutt,  
Universitetet i Oslo

## FORSVAR AV OPPGAVEN

2010, vår

## HOVEDBUDSKAP

Gode formuleringer av det lysfølsomme molekylet kurkumin er nødvendig dersom kurkumin skal utvikles som en fotosensitizer (PS) i fotodynamisk terapi (PDT).

Forskjellige skumformulering som inneholder kurkumin er blitt utviklet til bruk på infiserte sår.

Antimikrobiell effekt av forskjellige kurkumin-skum er deretter undersøkt i kombinasjon med synlig lys (antimikrobiell fotodynamisk terapi).

## BAKGRUNN OG HENSIKT

Fotodynamisk terapi (PDT) er en behandlingsform som kombinerer bruken av synlig lys og et lysfølsomt legemiddel (fotosensitizer) til å selektivt drepe kreftceller eller bakterier. Kurkumin finnes naturlig i krydderet gurkemeie, og har en mulig bruk som fotosensitizer (PS). Kurkumin uten samtidig bruk av lys er tradisjonelt brukt i kinesisk og indisk naturmedisin. I dyreforsøk har kurkumin vist seg å ha anti-inflammatorisk

effekt og å virke som en antioksidant. Stoffet hevdes også å ha effekt mot flere former for kreft blant annet i mage-tarm-systemet (1). Det pågår flere kliniske studier på kurkumin (1), men på tross av lovende resultater er ikke kurkumin godkjent som legemiddel. Dette skyldes i stor grad at stoffet har svært dårlig biotilgjengelighet. Kurkumin er tilnærmet uløselig i vann ved fysiologisk pH, og er i tillegg utsatt for nedbrytning (hydrolytisk og fotolytisk).

Hensikten med doktorgradsarbeidet var å lage, karakterisere og optimalisere topikale formuleringer av naturstoffet kurkumin ved å bruke en kombinasjon av hjelpestoffene alginat og cyclodekstrin (CD). Riktig formulering av kurkumin vil kunne stabilisere molekylet og gjøre det mer tilgjengelig for opptak i celler og bakterier ved å øke løseligheten. Man ønsker videre å lage formuleringer av kurkumin med god brukervennlighet. Dette er spesielt viktig dersom kurkumin skal kunne påføres for eksempel infiserte sår. I dette doktorgradsarbeidet har man benyttet CD, som er ringformede sukkermolekyler (<1nm), til å solubilisere kurkumin og å fremme den hydrolytiske stabiliteten. Kurkumin og CD er så inkorporert i et alginatskum (en type sår dressing). Alginatskum er laget av en naturlig polymer (alginat) som ekstraheres fra brune alger. Et alginatskum med innhold av kurkumin har potensiell bruk i behandling av infiserte sår i kombinasjon med lys, såkalt antimikrobiell fotodynamisk terapi (aPDT). aPDT vil kunne inaktivere patogene bakterier, inkludert bakterier som er resistente mot antibiotika (2), med kun minimal skade på det omkringliggende vevet.

## METODER

Laboratorieforsøkene er utført ved avdeling for farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Bakteriestudiene ble utført ved Nordisk Institutt for Odontologiske Materialer AS (NIOM as). Syntetisert, rent kurkumin ble brukt og løseligheten i forskjellige CD (HPβCD og HPγCD) bestemt ved en fase solubliseringmetode (3). Kurkumin konsentrasjon ble bestemt ved HPLC. Frisettingsstudier av kurkumin fra formuleringene ble utført i Franz diffusjons-

celler med membraner av forskjellig pore-størrelse (3). Alginatskum ble fremstilt etter en modifisert patentert metode for fremstilling (4, 5). Ferdige kurkuminholdige alginatskum ble karakterisert med hensyn til skum hydreringshastighet (model fysiologisk væske), absorpsjonsevne, kurkuminstabilitet (hydrolytisk og fotolytisk) og frisetting. Fotodynamisk effekt av kurkumin-skum på bakterier ble undersøkt *in vitro* på gram positive *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) og gram negative *Escherichia coli* (*E. coli*)(4).

## MATERIALER

Syntetisert kurkumin, hydroxypropyl-β-CD (HPβCD), hydroxypropyl-γ-CD (HPγCD) (Wacker) og natrium alginat (FMC BioPolymer).

## RESULTATER

Estimert løselighet av kurkumin i vann er svært lav (~3\*10<sup>-8</sup> M) ved nøytral og sur pH. HPβCD og HPγCD økte vannløseligheten til kurkumin 10<sup>4</sup>-ganger i fosfatbuffer (pH 5) ved å danne inklusjonskomplekser med kurkumin (3).

Inklusjonskompleksene bestod hovedsakelig av ett molekyl kurkumin og ett molekyl CD. Grad av interaksjon mellom kurkumin og CDene var avhengig av tilstedeværelse av alginat og etanol i bufferløsningene (6). Ved pH 5 har ikke kurkumin ladning og er relativt stabil mot hydrolyse. Komplekseringen mellom CD og kurkumin ga økt hydrolytisk stabilitet av kurkumin.

For at kurkumin skal kunne brukes som en PS må stoffet frisettes fra selve formuleringen og nå målcellen (bakterie eller kreftcelle). Frisetting av kurkumin fra forskjellige formuleringer med alginat og CD ble derfor undersøkt. Frisettingshastighet av kurkumin var avhengig av viskositet av formuleringen, forholdet mellom kurkumin og CD, samt valg av type CD og alginat (3). Fordi kurkumin har lav vannløselighet var det nødvendig å inkludere CD eller polyetylen glykol 400 (PEG 400) som hjelpestoff, for å oppnå tilstrekkelig frisetting i vandige miljøer.

HPβCD, HPγCD og PEG 400 ble brukt til å solubilisere kurkumin i alginatskum. Skum med opptil 0,18 prosent (w/w)

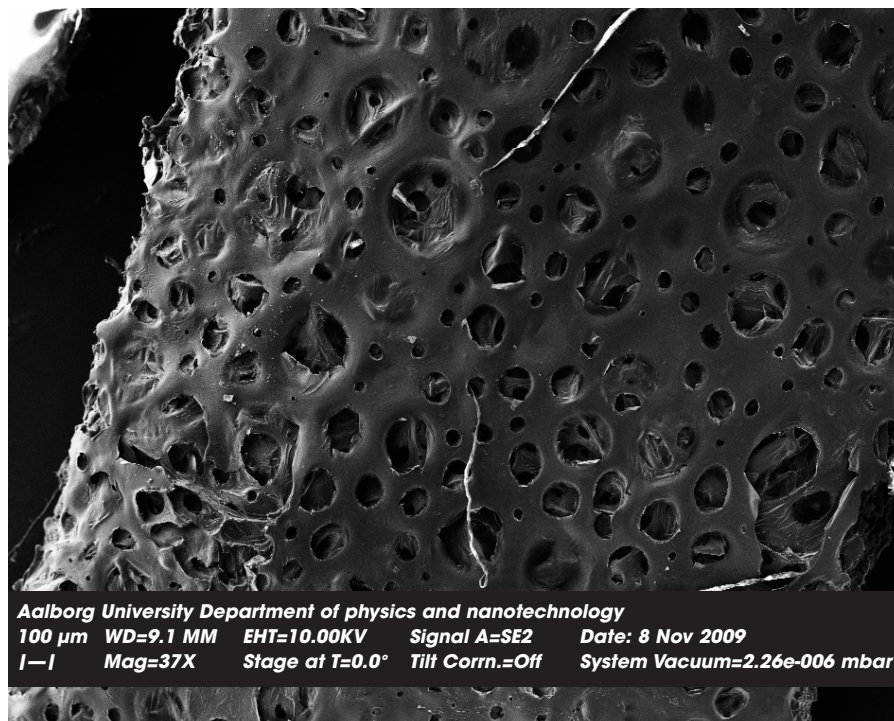
kurkumin av tørr skumvekt ble fremstilt. Utvalgte skum med kurkumin ble sterilisert ved gamma sterilisering uten at signifikant nedbryting av PS ble sett. Alle skummene hydrerte raskt (< 1 min) i fysiologisk modell væske og absorberer rundt 10–16 ganger sin egen tørrvekt (4, 5). Figur 1 viser SEM-bilde av et alginatskum med 0,15 prosent (w/w) kurkumin.

Kombinasjonen av kurkumin-skum og blått lys på inaktivering av gram positive og gram negative bakterier ble undersøkt (tabell 1). Skummene som ble testet på disse modellbakteriene inneholdt samme mengde kurkumin, men forskjellig hjelpestoff (CD eller kombinasjon av CD og PEG 400). Alginatskum uten kurkumin påvirket ikke overlevelsen til bakteriene, med eller uten lys. Heller ikke kurkumin-skum uten samtidig bruk av lys hadde effekt på baktérieverlevelsen (4).

## DISKUSJON

Det svært hydrofobe molekylet kurkumin kan oppløses i vandige miljø ved å danne inklusjonskomplekser med HPβCD og HPγCD, alternativt benytte en «co-solvent» slik som PEG 400 eller etanol. CDene og PEG 400 ble benyttet til å inkorporere i utgangspunktet vannuløselig kurkumin i hydrofilt alginatskum. Polymeren alginat er biodegraderbar og biokompatibel og blir brukt som materiale i sårbandasjer. Skum laget av denne polymeren kan steriliseres ved blant annet gamma bestråling og egner seg svært godt til å levere kurkumin til infiserte, væskende sår. Algianskum har god brukervenlighet fordi de kan påføres smertefulle sår med kun minimal berøring. Kurkumin vil frisettes når alginatskummene hydreres i sårvesken. I modelloppsettet brukt i denne studien var frisettingshastigheten avhengig av hjelpestoffet som blir benyttet til å inkorporere kurkumin i skummene, det vil si enten CD, PEG 400 eller en kombinasjon av disse. Skum uten CD, PEG 400 eller med høy ratio mellom HPβCD/kurkumin hadde svært lav frisetting av kurkumin. Skum med PEG 400 eller HPγCD hadde høyest frisettingshastighet og disse formuleringene egner seg derfor godt i aPDT, da relativt rask frisetting av legemidlet vil være ønskelig.

Kombinasjonen lys og kurkumin-skum fører antakelig til at det dannes oksygenradikaler som skader bakteriecellen og fører til inaktivering (aPDT). Tabell 1 viser at kurkumin-skum inaktiverte 100 prosent av de gram positive *E. faecalis* i kombinasjon med en lysdose på 9.7 J/cm<sup>2</sup>. Når bakteriene ble behandlet med kurkumin-skum uten tilstedeværelse av lys, ble ingen effekt på bakteriene observert (0 prosent



Figur 1. SEM-bilde av et kurkuminholdig alginatskum.

inaktivering). Gram negative bakterier generelt er mer motstandsdyktige mot aPDT enn gram positive bakterier. Kurkumin-skummene hadde ingen eller liten effekt på overlevelse av gram negative bakterier. Inaktivering av 81 prosent av gram negative bakterier i forhold til kontroll ble sett når *E. coli* ble behandlet med lys og kurkumin-skum som inneholdt PEG 400. Valg av hjelpestoff som brukes til å løse kurkumin i alginatskummet viste seg å være viktig for fotodynamisk effekt på gram negative *E. coli*.

## KONKLUSJON

Alginatskum med kurkumin var effektive i å inaktivere den gram positive modell bakterien *E. faecalis* i kombinasjon med lys og vil derfor ha potensiell bruk i aPDT. Den fotodynamiske effekten av kurkumin-skummene på gram negative *E.coli* var avhengig av hjelpestoff som ble brukt til å løse kurkumin i skummet. Skumformulering egner seg godt til bruk på infiserte væskende sår, og bør derfor undersøkes videre med hensyn til bruk i aPDT.

## REFERANSER

1. Hatcher H, Planalp R, Cho J et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2008; 65; 1631–1652.
2. Hamblin MR, Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3; 439–450.
3. Hegge AB, Shüller RB, Kristensen S et al. *In vitro* release of curcumin from vehicles containing alginate and cyclodextrin. *Studies of curcumin and curcuminoides, XXXIII. Pharmazie.* 2008; 63; 585–592.
4. Hegge AB, Andersen T, Melvik JE et al. Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: *Studies on curcumin and curcuminoides XLII, J Pharm Sci, DOI 10.1002/jps.22263.*
5. Hegge AB, Andersen T, Melvik JE et al. Evaluation of novel alginate foams as drug delivery systems in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) of infected wounds – An *in vitro* study: *Studies in curcumin and curcuminoides XL. J Pharm Sci.* 2010; 99; 3499–3513.
6. Hegge AB, Måsson M, Kristensen S et al. Investigation of curcumin-cyclodextrin inclusion complexation on aqueous solutions containing various alcoholic co-solvents and alginate using an UV-VIS titration method, *Studies of curcumin and curcuminoides, XXXV. Pharmazie.* 2009; 64; 382–389.

Tabell 1. Fotodynamisk effekt av kurkumin-skum på bakterier *in vitro*.

Hjelpestoff valgt til å inkorporere kurkumin i skummene	Inaktivering av <i>E. faecalis</i> (Lys dose: 9.7 J/cm <sup>2</sup> )	Inaktivering av <i>E. coli</i> (Lys dose: 29 J/cm <sup>2</sup> )
PEG 400	100 % inaktivering	81 % inaktivering
HPβCD + PEG 400	100 % inaktivering	0 % inaktivering
HPγCD	100 % inaktivering	0 % inaktivering