

NAPREDNI DOSTAVNI SISTEMI UČINKOVIN ZA PREVENTIVO IN ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI

ADVANCED DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR PREVENTION AND TREATMENT OF PERIODONTAL DISEASE

AVTOR / AUTHOR:

Prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.,
Asist. dr. Špela Zupančič, mag. farm.,
Asist. Janja Mirtič, mag. farm.,
Izr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana
University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: julijana.kristl@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Parodontalna bolezen povzroči zmanjšano adhezijo obzobnih tkiv na zobno korenino in postopno razgradnjo pozobnice, cementa in čeljustne kosti. Ob tem prihaja do bolečine, nelagodja ob žvečenju in izgube zob. V prispevku so predstavljeni danes znani pristopi zdravljenja, kot so odstranjevanje zobnih oblog in parodontopatogenih mikroorganizmov, modulacija imunskega odziva in regeneracija obzobnih tkiv. Pri tem imajo vse večji pomen napredni dostavni sistemi, ki vključujejo nanonosilce, za vnos nizkomolekularnih učinkovin, biofarmacevtikov, probiotikov in matičnih celic. Nanodostavni sistemi v primerjavi s tradicionalnimi farmacevtskimi oblikami izboljšajo terapevtski učinek dostavljenih učinkovin, kar je posledica njihovih edinstvenih lastnosti. Nanozdravila omogočajo ciljno dostavo učinkovin v obzobne žepe, do določenih celic in celičnih organelov ali mikroorganizmov v biofilmu; dodatno pa lahko tudi nadzorujejo sproščanje vgrajenih terapevtikov. Predstavljeni so najpogosteje proučevani napredni dostavni sistemi, kot so liposomi, polimerni nanodelci in nanovlakna za preventivo in zdravljenje parodontalne bolezni. Posebna pozornost je namenjena nanovlaknom, ki omogočajo vgrajevanje učinkovin in probiotikov, lahko pa predstavljajo ogrodje za regenerativne celice za boljšo obnovo obzobnih tkiv.

KLJUČNE BESEDE:

nanodelci, nanovlakna, dostavni sistemi, nadzorovano sproščanje, probiotiki

ABSTRACT

Periodontal disease causes reduced adhesion of dental tissue to the tooth root, and gradual decomposition of the periodontal ligament, cementum, and alveolar bone, with occasional pain and discomfort on chewing, and eventual tooth loss. This paper provides an update on the approaches to periodontal disease treatment, for reduction of periodontal plaque and periodontopathogenic microorganisms, modulation of immune response, and regeneration of periodontal tissues. Advanced delivery systems in the fight against periodontal disease are gaining in importance, and include nanosized carriers for small drug molecules, biopharmaceutics, probiotics, or stem cells. Furthermore, nanodelivery systems with their specific features are designed to

improve the bioavailability of the therapeutics over that achieved by conventional dosage forms. Indeed, the nanomedicines can enable targeted drug delivery to periodontal pockets, to specific cells and cellular organelles, or to microorganisms in biofilms. Additionally, the nanocarriers can control the release of the incorporated therapeutic(s). The most studied advanced drug delivery systems for prevention and treatment of periodontal disease are liposomes, polymeric nanoparticles, and nanofibers, which are reviewed here. Special focus is on nanofibers, in which can be incorporated drug molecules and probiotics, as well as represent a scaffold for regenerative cells to achieve better regeneration of periodontal tissues.

KEY WORDS:

nanoparticles, nanofibers, drug delivery systems, controlled release, probiotics

1 UVOD

Parodontalna bolezen je vnetna bolezen dlesni, ki vodi k razgradnji obzobnega tkiva, nastanku obzobnega žepa med dlesnijo in zobom in razgradnji pozobnice, cementa in čeljustne kosti, kar povzroča motnje v podporni strukturi zob, občasne bolečine in oteženo žvečenje. Polovica odraslih in skoraj tri četrtine starejših odraslih ima parodontalno bolezen, ki se razvije iz dolgoletnega vnetja. Le-to je posledica neuravnotežene ustne mikrobiote v ob-

zobnem biofilmu, ki vzdržuje rast parodontopatogenih bakterij (zlasti anaerobov) in omogoča sproščanje bakterijskih toksinov in encimov, kar izzove nepravilen imunski odziv telesa. Prvim znakom obolenja, kot je občasna krvavitev med ščetkanjem, ljudje posvečajo majhno pozornost vse dotlej, dokler ne opazijo resnega vnetja in majavosti zob. Zdravljenje je zahtevno, saj bolezen povzroča več različnih dejavnikov, ki niso pri vseh bolnikih prisotni v enaki meri (1, 2). Današnje ustaljeno zdravljenje poleg mehanskega odstranjevanja zobnih oblog temelji pri napredovanih oblikah bolezni tudi na jemanju protimikrobnih zdravil, saj le z mehanskimi posegi popolno izkoreninjenje parodontopatogenih bakterij iz obzobnih prostorov ni mogoče (2-4). Poleg navedenega zdravljenja je napredek v raziskovalnih orodjih in posledično odkritjih privedel do novih spoznanj o patofiziologiji parodontalne bolezni, ki nakazujejo na štiri pomembna prijemališča zdravljenja (slika 1):

- zmanjšanje števila parodontopatogenih bakterij (protimikrobne učinkovine (npr. metronidazol, penicilin), antiseptiki (npr. klorheksidin, cetilpiridinijev klorid)) (5),
- vzpostavitev normalne ustne mikrobiote (probiotiki) (6),
- moduliranje imunskega odziva (npr. doksiciklin, ibuprofen in probiotiki) (7) in
- obnova podpornega tkiva zob (rastni dejavniki, regenerativne celice, tkivno inženirstvo) (8).

ALI STE VEDELI?

- Glavna pomanjkljivost danes razpoložljivih pristopov zdravljenja parodontalne bolezni je začasna ozdravitev ali delno izboljšanje stanja, zato je nujno potrebno raziskovanje v smeri novih terapevtskih pristopov.



Slika 1: Prijemališča zdravljenja, terapevtski pristopi, aktivne komponente in primeri nanodostavnih sistemov za zdravljenje parodontalne bolezni.

Figure 1: Treatment targets, therapeutic approaches, active ingredients, and some examples of nanodelivery systems for the treatment of periodontal disease.



2 DOSTAVNI SISTEMI ZA ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI

Po trenutnih smernicah uporabljamo za zdravljenje napredovale oblike parodontalne bolezni protimikrobne učinkovine ali njihove kombinacije v obliki kapsul ali tablet za sistemsko dajanje. Za terapevtski učinek so potrebni veliki odmerki, saj se po vnosu v organizem zdravilna učinkovina porazdeli po celotnem telesu in ne le v obzobnih žepih, kjer je mesto delovanja (2). Posledično lahko sistemsko jemanje vodi k neželenim učinkom in zmanjšanju raznolikosti mikrobiote tudi v prebavnem traktu (9). Za slednje se je v zadnjem času izkazalo, da lahko vpliva na razvoj številnih bolezni, kot so Chronova in Alzheimerjeva bolezen, pa tudi depresija (9-11). Dodatno se z rastočim številom odpornih bakterij in vse boljše ozaveščenostjo ljudi o grožnji, ki jo predstavljajo odporne bakterije, na svetovnem nivoju vse bolj poudarja iskanje novih rešitev za učinkovito zdravljenje infekcijskih bolezni (12).

Ena od možnosti za zmanjšanje obremenjenosti celotnega telesa s protimikrobnimi učinkovinami je lokalni vnos. V primeru zdravljenja parodontalne bolezni je to dajanje učinkovin v obzobne žepce. Le-to lahko vodi v izboljšanje terapevtskih rezultatov, potrebi po manjših odmerkih antibiotika, obvod presnove prvega prehoda jeter, zmanjšanje neželenih učinkov v prebavilih in zmanjšanje pogostnosti jemanja zdravila. Na splošno je tak pristop zdravljenja varen in učinkovit, saj izboljšuje tudi sodelovanje bolnika. Za zdravljenje parodontalne bolezni so že razvili številne lokalne dostavne sisteme, kot so vlakna, filmi, čipi, trakovi in mikrodenci narejeni iz različnih naravnih in sinteznih materialov (13). Tudi na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo smo že leta 1988 razvili bioadhezivni polimerni film z metronidazolom (14, 15). V skladu z oficinalno farmakopejo bi lahko te sisteme za lokalno dostavo v obzobni žep umestili v krovno monografijo Oralne farmacevtske oblike (preglednica 1) (16), njihova natančnejša uvrstitve v podskupino oralnih farmacevtskih oblik pa zaradi njihove specifične oblike in tarčnega mesta zdravljenja ni mogoča. V praksi se je izkazalo, da imajo lokalni dostavni sistemi velik potencial za uspešno zdravljenje parodontalne bolezni, kljub temu pa je potrebno rešiti določene pomanjkljivosti, kot so prekratek čas zadrževanja na mestu delovanja, potreba po odstranitvi dostavnega sistema po koncu delovanja, če je le-ta zgrajen iz nebiorazgradljivih materialov, težavna namestitve in omejeno prodiranje v obzobne žepce. Novost in še neizkoriščen potencial za uspešnejše zdravljenje parodontalne bolezni predstavljajo napredni dostavni sistemi, ki vključujejo tudi nanozdravila (2, 13).

ALI STE VEDELI?

- Z lokalnim dajanjem protimikrobnih učinkovin zmanjšamo neželene učinke v gastrointestinalnem traktu in možnost nastanka odpornih bakterij.

*Preglednica 1: Vrste oralnih farmacevtskih oblik po Ph. Eur. 9.6.
Table 1: Groups of Oral Dosage Forms by Ph. Eur. 9.6.*

Oralne farmacevtske oblike

- raztopine za grgranje
- raztopine za izpiranje ust
- raztopine za dlesni
- oralne raztopine in oralne suspenzije
- poltrdne oralne farmacevtske oblike (gel za dlesni, pasta za dlesni, oralni gel, oralna pasta)
- oralne kapljice, oralna pršila in podjezična pršila (vključno s pršili za usta in žrelo)
- pastile in mehke pastile
- stisnjene pastile
- podjezične tablete in bukalne tablete
- oralne kapsule
- mukoadhezivne farmacevtske oblike
- orodisperzibilni filmi

3 NAČRTOVANJE RAZVOJA NAPREDNIH DOSTAVNIH SISTEMOV ZA VNOS V OBZOBNI ŽEP

Za doseganje optimalnih terapevtskih rezultatov v različnih stopnjah razvoja parodontalne bolezni je potreben skrbno načrtovan razvoj dostavnega sistema, ki bo zagotavljal ciljan vnos zdravilnih učinkovin ali drugih aktivnih komponent v zadostni količini in ob ustreznem času v obzobni žep (2). Pristopi oblikovanja dostavnih sistemov za različne vrste zdravljenja so si v osnovi podobni, kljub temu pa jih moramo prilagoditi specifičnim značilnostim bolezni in mestu delovanja. Z vidika načrtovanja in preverjanja učinkovitosti, kakovosti in varnosti formulacij moramo v razvoju poleg fizikalno-kemijskih in farmakoloških lastnosti zdravilnih učinkovin ali drugih aktivnih komponent upoštevati tudi fiziološke pogoje, ki so prisotni v lokalnem mikrookolju. Na primer, obzobni žep je ozka reža, skozi katero teče gingivalna tekočina z zelo majhnim pretokom, le-ta pa lahko izpodriva vstavljeni dostavni sistem iz obzobnega žepa in spira sproščeno učinkovino. Iz tega razloga je izredno pomembno, da je razvit dostavni sistem bioadheziven in vsebuje zadostno količino

zdravilne učinkovine, ki se sprošča predviden čas zdravljenja v koncentraciji, ki je večja ali vsaj enaka minimalni terapevtski koncentraciji (2, 17). Dodatno je zdravljenje parodontalne bolezni oteženo, ker se parodontopatogene bakterije nahajajo skupaj z drugimi tj. koristnimi bakterijami v biofilmu. Ta je kompleksen ekosistem, obdan z zunajceličnimi polisaharidi, kar oteži prodiranje protimikrobnih učinkovin ter protiteles do bakterij (18). Poleg ostalih zahtev mora biti dostavni sistem tudi biokompatibilen, zaželeno pa je, da je biorazgradljiv. Prav tako mora biti inerten do vgrajene zdravilne učinkovine ali druge aktivne komponente in jo zaščititi pred zunanjimi dejavniki med shranjevanjem (slika 2) (2).

ALI STE VEDELI?

- Obzobni žep predstavlja mesto za lokalni vnos protimikrobnih in imunomodulatornih učinkovin, probiotikov ter regenerativnih celic.



Slika 2: Zahteve in želene lastnosti nanodostavnih sistemov za doseganje terapevtskih učinkov.

Figure 2: Requirements and desired properties of the nanodelivery systems to achieve therapeutic effects.

4 NAPREDNI DOSTAVNI SISTEMI Z ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI

Napredni dostavni sistemi omogočajo vnos in izboljšajo učinkovitost delovanja vgrajene zdravilne učinkovine ali drugih aktivnih komponent. Njihove lastnosti so odvisne

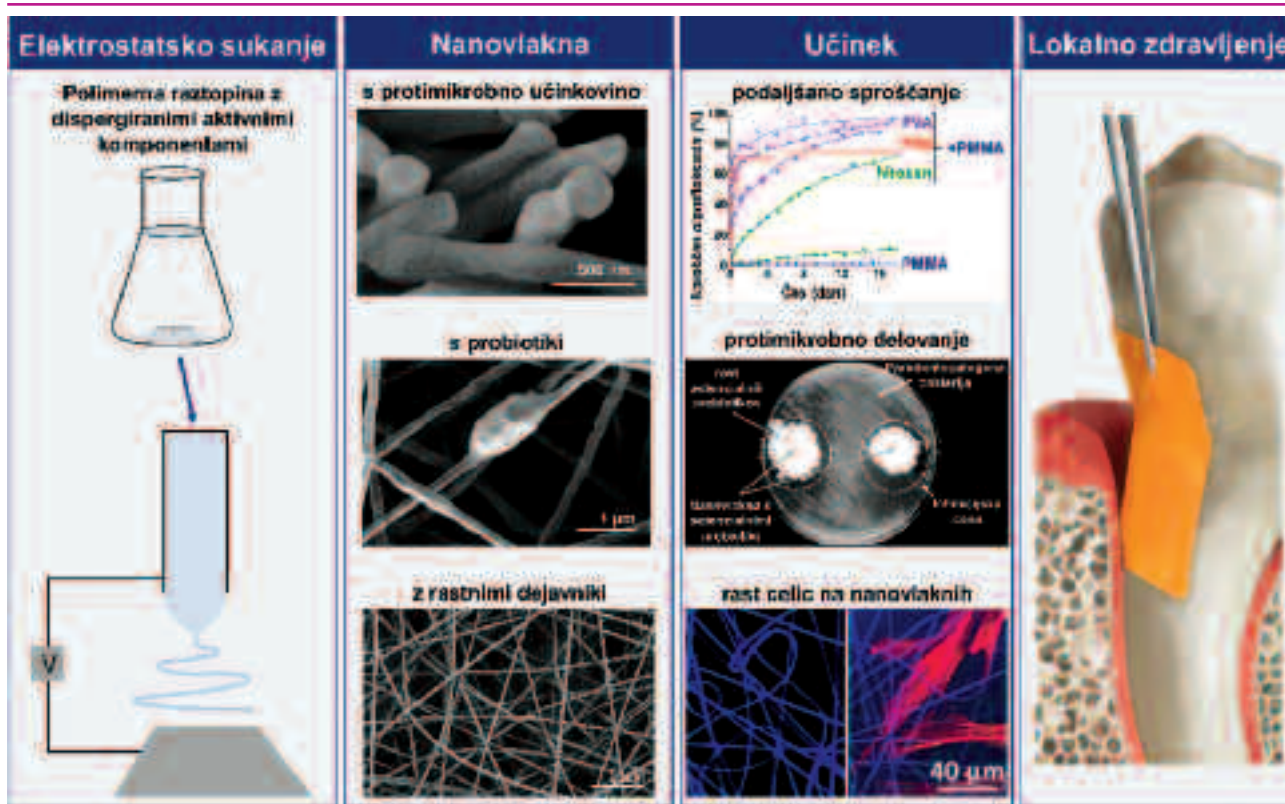
od fizikalno-kemijskih lastnosti osnovnih gradnikov in (kolidnih) značilnosti dostavnega sistema, kot so sestava, velikost, sposobnost vgrajevanja zdravilnih učinkovin, stabilnost ter površinske lastnosti in interakcije s celicami. Med napredne dostavne sisteme sodijo tudi nanodostavni sistemi, ki imajo vsaj eno dimenzijo nanometrijske velikosti. Le-ta jim omogoča edinstvene lastnosti in specifične interakcije z biološkim okoljem ter prinaša prednosti pred sistemi večjih razsežnosti (mikro- in makrovelikosti). Kot dostavne sisteme za zdravljenje parodontalne bolezni so doslej raziskovali različne vrste nanostrukturiranih nosilcev, kot so liposomi, polimerni miceli, dendrimeri, nanocevrke, nanodelci (polimerni nanodelci, trdni lipidni nanodelci, polimersomi) in nanovlakna (2, 19, 20).

Na (bio)kompatibilnost, biorazgradljivost, sposobnost vgrajevanja učinkovin, mehanizem in kinetiko sproščanja iz dostavnega sistema ter bioadhezivnost ključno vplivajo pomožne snovi za izdelavo dostavnega sistema in njihove s funkcionalnostjo povezane lastnosti. Za izdelavo nanodostavnih sistemov so zelo aktualni biokompatibilni sintezni polimeri (npr. poliglikolna kislina, polimlečna kislina, kopolimer mlečne in glikolne kisline, polikaprolakton) in naravni polimeri (npr. hitosan, kolagen, alginat, fibroin), predvsem tisti, ki so biorazgradljivi in se v telesu razgradijo v netoksične metabolite, ki se izločijo po naravni poti (21). Polimeri so ključni gradniki polimernih nanodelcev in nanovlaknen. Natančneje polimerne nanodelce glede na zgradbo in razporeditev polimera in zdravilne učinkovine v delcih delimo na nanosfere in nanokapsule. Nanosfere so zgrajene iz polimernega ogrodja, v katerem je učinkovina porazdeljena, nanokapsule pa imajo značilno zgradbo kapsule in so iz jedra in ovojnice (22). Učinkovina je v nanokapsulah običajno vgrajena v jedro, lahko pa je tudi v obojnici ali adsorbirana na površino nanokapsul. V nasprotju z nanodelci so nanovlakna dostavni sistem, zgrajen iz vlaken s premerom od nekaj nanometrov do enega mikrometra, veliko površino glede na maso vzorca in veliko poroznostjo med vlakni (23, 24). Tako v nanodelce kot v nanovlakna lahko vgradimo tako nizkomolekularne zdravilne učinkovine kot tudi biomakromolekule (npr. proteine). Polimeri dostavnega sistema ključno vplivajo na mehanizem in kinetiko sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine. Pri zdravljenju parodontalne bolezni je želena podaljšano sproščanje (npr. več dni ali tednov), kar lahko dosežemo z uporabo hidrofobnih polimerov. Z bioadhezivnimi polimeri, kot sta alginat in hitosan, in z edinstvenimi lastnostmi, ki jih imajo nanodostavni sistemi, lahko podaljšamo njihovo zadrževanje v obzobnih žepih (2). Poleg tega prinaša uporaba hitosana še dodatno prednost, saj



le-ta deluje po encimski razgradnji protimikrobno (18, 25). V naših raziskavah smo z nanovlakni z vgrajenima protimikrobnima učinkovinama, metronidazolom in ciprofloksacinom, dosegli sedem ali več dnevno podaljšano sproščanje obeh učinkovin. S sistematičnim proučevanjem številnih parametrov smo ugotovili, da na hitrost sproščanja učinkovin iz nanovlaken ključno vplivajo izbrani polimeri, fizikalno-kemijske lastnosti in vsebnost učinkovine, kvantitativna sestava in povprečni premer nanovlaken ter debelina plasti nanovlaken, ki je bila do sedaj pogosto spregledana lastnost (slika 3) (26-29). Na podlagi preizkusov delovanja na parodontalnopatogenih bakterijah smo dokazali, da je smiselno kombinirati obe protimikrobni učinkovini v eni formulaciji (27). Uporaba nanodostavnih sistemov, kot so nanodelci in liposomi, lahko poveča učinkovitost protimikrobne terapije, tako v primeru infekcij z odpornimi mikroorganizmi kot v primeru zdravljenja bolezni, ki so povezane z nastankom biofilma. Boljše delovanje je odraz večje top-

nosti vgrajene učinkovine, nadzorovanega sproščanja, boljšega prodiranja v biofilm, zaščite učinkovine pred encimsko razgradnjo v biofilmu, ciljane dostave do ali v zelene celice ali znotrajcelična tarčna mesta s pasivnim ali aktivnim ciljanjem (25, 30). Poleg nanodelcev so za zdravljenje parodontalne bolezni zanimivi liposomi, ki so sestavljeni iz ene (enoslojni liposomi) ali več (večslojni liposomi) fosfolipidnih dvojnih plasti, ki so urejene v koncentrično obliko, in vključujejo enako število prostorov z vodo (21). Liposomi lahko dostavijo antibiotik neposredno v Gram negativne bakterijske celice, saj se lahko lipidni dvosloj zlije s fosfolipidno membrano bakterij (25). Izreden potencial so liposomi in nanodelci pokazali pri izboljšanju zdravljenja znotrajceličnih infekcij, saj antibiotiki sami težko prehajajo v človeške celice (21). Privzem nanodelcev v celice poteka po več različnih mehanizmih (npr. fagocitoza in drugi načini endocitoznega privzema), ki so specifični za določeno vrsto celic in katerih poznavanje je pomembno za načrtovanje naprednih



Slika 3: Shematski prikaz vgrajevanja protimikrobnih učinkovin, probiotikov in rastnih dejavnikov z elektrostatskim sukanjem v nanovlakna za učinkovitejše lokalno zdravljenje parodontalne bolezni.

Figure 3: The schematic representation of incorporation of antimicrobials, probiotics and growth factors in electrospun nanofibers for improved local treatment of periodontal disease.

dostavnih sistemov (22, 31). V zadnjem času je bilo na področju nanodostavnih sistemov za zdravljenje parodontalne bolezni narejenih veliko raziskav *in vitro*, medtem ko je obseg *in vivo* raziskav, katerih rezultati odražajo njihovo dejansko uspešnost, veliko manjši. Priča smo tudi intenzivnemu razmahu tehnoloških pristopov za izdelavo nanodostavnih sistemov v industrijskem merilu ter metod za njihovo vrednotenje v različnih fazah razvoja, izdelave in uporabe. Več kot štiri desetletja intenzivnega razvoja in raziskav na tem področju je omogočilo postavitev temeljev za uspešno načrtovanje učinkovitih dostavnih sistemov za vnos učinkovin. Tako so danes določeni že na trgu (npr. Ambisome® (liposomalni amfotericin B), številni pa so še v različnih fazah razvoja in kliničnih testiranj (2, 25).

ALI STE VEDELI?

- Nanodelci z učinkovino manjši kot 200 nm omogočajo večji vnos učinkovine v celice ali biofilm v primerjavi z delci večjih velikosti.

5 NAPREDNI DOSTAVNI SISTEMI S PROBIOTIKI

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki v ustrezni količini koristno vplivajo na gostiteljevo zdravje po vnosu v organizem. V zadnjih letih dobivajo vedno večjo pozornost na področju preventive in zdravljenja številnih bolezni, med katerimi je tudi parodontalna bolezen (32, 33). Znanstveniki poudarjajo, da za razvoj parodontalne bolezni ni ključen le porast parodontopatogenih bakterij, ampak tudi pomanjkanje koristnih bakterij (34). Probiotiki lahko v ustni votlini koristno delujejo tako, da modilirajo imunski odziv, neposredno zavirajo parodontopatogene bakterije s sproščanjem protimikrobnih metabolitov (npr. mlečna kislina, vodikov peroksid in bakteriocini), ali posredno zavirajo bakterije s tekmovanjem za ista hranila ali kolonizacijske površine (35). Izbor vrste mikroorganizma je ključen, saj mora biti dokazano učinkovit, zeleno je, da je njegov mehanizem delovanja poznan, poleg tega pa mora biti natančno identificiran (vrsta in sev), dokazano nepatogen in brez genskega zapisa za odpornost proti antibiotikom (36). Za razvoj kakovostnega zdravila s probiotiki morajo biti, poleg izbora ustreznega probiotika, izpolnjeni naslednji pogoji: (i) zadostno število živih mi-

kroorganizmov v formulaciji ves čas roka uporabe, (ii) preživetje mikroorganizmov po dajanju vse do mesta delovanja in (iii) zadrževanje na zelenem mestu dovolj časa, da se mikroorganizmi sprostijo iz dostavnega sistema (37). Trenutno uporabljeni dostavni sistemi kot so pastile, ustne vode, zobne paste in tablete imajo določene pomanjkljivosti, ki v primeru parodontalne bolezni onemogočajo dostavo probiotikov v obzobne žepe, prav tako pa je stični čas probiotikov s površinami ustne votline prekratek za kolonizacijo ustne votline ali obzobnih žepov (38-40). Za razvoj učinkovitega dostavnega sistema s probiotiki je ključno, da metoda izdelave ter uporabljeni materiali omogočajo preživetje probiotikov med procesom izdelave. Predvsem je pomembna izbira netoksičnih topil in ustreznih (milih) pogojev izdelave (npr. temperatura, tlak, pH, osmolarnost). Prednost vgrajevanja probiotikov v ustrezen dostavni sistem je lahko tudi zaščita probiotikov pred zunanjimi vplivi (kisik, vlaga, toplota) ter s tem podaljšanje njihove stabilnosti in preživetja. S tem je omogočena priprava ustrezne trdne farmacevtske oblike ter doseganje potencialnega nadzorovanega sproščanja ter bioadhezivnih lastnosti (6, 37). V primeru razvoja farmacevtske oblike za dostavo probiotikov v ustno votlino je bistvena tudi velikost farmacevtske oblike, ki omogoča vnos v parodontalne žepe ali v njihovo bližino (2, 6). Iz tega razloga je smiseln razvoj farmacevtskih oblik, ki temeljijo na dostavnih sistemih mikro- in nanovelikosti.

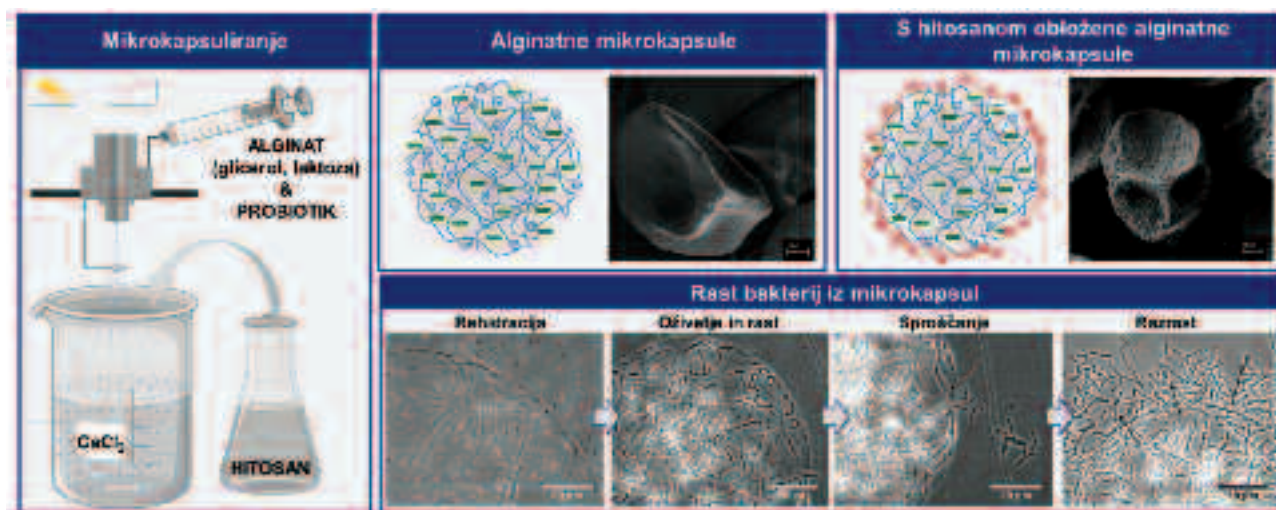
ALI STE VEDELI?

- Prednost specifičnih probiotikov predstavlja možnost preventive in zdravljenja parodontalne bolezni z visokim varnostnim profilom.

5.1. MIKROKAPSULE S PROBIOTIKI

Vgrajevanje probiotikov v mikrokapsule je eden najbolj poznanih in uporabljenih načinov izdelave dostavnih sistemov za probiotike. Za izdelavo mikrokapsul s probiotiki se najpogosteje uporabljajo metode emulgiranja, sušenja z razprševanjem ter metode razbijanja laminarnega curka tekočine v kapljice enakih velikosti, ki jih nato utrdimo (41, 42). Za izdelavo ogrodja mikrokapsul se uporabljajo zlasti biokompatibilni, biorazgradljivi in netoksični polimeri (43) in druge pomožne snovi, kot so polnila ter krioprotektanti (npr. laktoza, glicerol, trehaloza), kadar mikrokapsuliranju sledi proces liofilizacije z namenom izdelave trdne, stabilne





Slika 4: (a) Izdelava mikrokapsul v mikrokapsulatorju, kjer iz curka polimerne raztopine z dispergiranimi celicami probiotika s pomočjo vibrirajoče membrane nastanejo kapljice, ki jih utrdimo s premreževanjem alginata s kalcijevimi ioni. S polielektrolitnim oblaganjem s hitosanom dosežemo bioadhezivne lastnosti mikrokapsul in prirejeno sproščanje vgrajenih probiotikov. (b) Shematski prikaz in SEM slike liofilizirane alginatne in s hitosanom obložene mikrokapsule. (c) Izražanje bakterij iz mikrokapsul.

Figure 4: (a) Production of microcapsules in the microencapsulator where the laminar flow of polymer solution with dispersed probiotic cells is broken up by vibrating nozzle into droplets, which are hardened by alginate crosslinking with calcium ions. The polyelectrolyte coating of microcapsules with chitosan can assure the bioadhesive properties of microcapsules and the modified release of probiotics. (b) The schematic representation and the SEM images of the lyophilized alginate and the chitosan-coated microcapsules. (c) The growth of bacteria from microcapsules.

farmacevtske oblike (44). Primer razvoja mikrokapsul s probiotiki je predstavljen na sliki 4.

5.2. NANOVLAKNA S PROBIOTIKI

Vgrajevanje probiotikov v nanovlakna je v primerjavi z mikrokapsuliranjem precej novejši tehnološki pristop za izdelavo naprednih dostavnih sistemov s probiotiki. Pomanjkanje raziskav, v katerih bi za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni uporabili probiotični sev izoliran iz oralne mikrobiote in ga vgradili v dostavnih sistemov za lokalni vnos v obzobne žepe je bilo gonilo, da smo kot prvi razvili tak trdni dostavni sistem (slika 3) (6). Za vgrajevanje smo izbrali sev potencialnega probiotika iz rodu *Bacillus sp.*, ki je bil izoliran iz avtohtone mikrobiote zdravih prostovoljcev in je izkazal protimikrobno delovanje proti bakteriji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ki je ena izmed najpomembnejših parodontopatogenih bakterij. Potencialni probiotik smo vgradili v nanovlakna z elektrostatskim sukanjem, ki je najpogostejša metoda za pripravo nanovlaken (6). Proces poteka tako, da na šobo, skozi katero enakomerno priteka polimerna raztopina, priključimo visoko električno napetost (10-25 kV),

ki povzroči nastanek curka polimerne raztopine, ki se zvija in tanjša na poti do zbirala. Na ozemljenem zbiralu se nato naberejo suha nanovlakna (24, 45). Dokazali smo, da je prednost elektrostatskega sukanja, da je mogoče v enem koraku vgraditi probiotik, izdelati vlakna, posušiti disperzijo probiotikov in izdelati končno, dolgočasno stabilno farmacevtsko obliko (6, 46). Metoda omogoča izredno visoko vgradnjo probiotikov v nanovlakna z minimalnim zmanjšanjem viabilnosti celic tekom procesa izdelave, kar je ključno, da lahko že z zelo majhno količino nanovlaken (~10 mg) dosežemo pričakovani terapevtski učinek. Enako kot pri dostavi zdravilnih učinkovin ima tudi pri nanovlaknih s probiotiki izbira polimera/ov ključno vlogo pri načrtovanju njihovih lastnosti, kot so biorazgradljivost, bioadhezivnost, sproščanje in rast probiotikov iz nanovlaken (2, 6).

ALI STE VEDELI?

- Elektrostatsko sukanje je izredno uspešen tehnološki proces, ki omogoča izdelavo in vgradnjo nizkomolekularnih učinkovin, biofarmaceutikov ali visokega števila živih probiotikov v nanovlakna (do 10¹² CFU/g).

6 NAPREDNI DOSTAVNI SISTEMI ZA REGENERACIJO OBZOBNIH TKIV

Regeneracija obzobnih tkiv je zahteven proces, ki vključuje obnovo treh zelo različnih, podpornih tkiv (pozobnice, čeljustne kosti in koreninskega cementa) in vmesnega področja, ki povezuje ta tkiva. Žal sedanji načini zdravljenja, tako kirurški kot nekirurški, ne zagotovijo popolne obnove podpornih tkiv, postopki regeneracije, ki so na voljo, pa so, zlasti v primeru napredovale parodontalne bolezni, omejeno uspešni (47).

Pristopi za tkivno in kostno regeneracijo so se v zadnjih letih preusmerili od tehnologije, usmerjene v tkivno regeneracijo z uporabo rastnih dejavnikov (fibroblastni rastni dejavnik-2, paratiroidni hormon), trombocitne plazme in kostnih presadkov, k endogeni regenerativni terapiji (48). Pri slednji gre za spodbujanje bolnikovih lastnih tj. endogenih regenerativnih mehanizmov, ki temeljijo na aktivaciji bolnikovih matičnih celic (»cell homing«) ali za presaditev matičnih celic iz drugih tkiv (npr. mezenhimske matične celice, matične celice maščobnega tkiva) z namenom izboljšanja regeneracije (49). Pluripotentne matične celice za uporabo v regenerativni terapiji parodontalne bolezni najdemo v številnih tkivih, velik potencial pa imajo dentalne matične celice, izolirane iz različnih obzobnih tkiv (npr. matične celice zobne pulpe, periodontalnega ligamenta, apikalne papile, gingivalnih tkiv) katerih vir predstavljajo »medicinski odpadki«, kot so zobje in dlesni, odstranjeni iz ortodontskih, hiperplastičnih ali estetskih razlogov (47).

Za vnos matičnih celic je ključen razvoj ustreznih in učinkovitih dostavnih sistemov, ki omogočajo razrast celic in njihovo pritrditev na tarčno mesto. Vodena endogena regeneracija lahko poteka z vstavitvijo ti. »praznih« ogrođij, ki jih gostiteljeve celice same naselijo in tako omogočijo hitrejšo in učinkovitejšo regeneracijo tkiva (8). Za takšna ogrođja oz. »matrice« želimo, da posnemajo strukturne elemente in mehanske lastnosti zunajceličnega ogrođja ter tako spodbujajo celično adhezijo in vraščanje celic (50). Nanovlakna predstavljajo s svojo izredno veliko površino, bioadhezivnimi lastnostmi, prilagodljivo morfologijo, poroznostjo in strukturo, podobno gradnikom zunajceličnega ogrođja, obetaven material za izdelavo tkivnih nadomestkov. Iz nanovlaken je mogoče izdelati tridimenzionalna tkivna podporna ogrođja ustrezne debeline, trdnosti in velikosti por za učinkovito vraščanje celic, ki lahko hkrati potreben čas nadzorovano sproščajo tudi vgrajeno aktivno komponento (51-53). Dodatno bi lahko nanovlakna uporabili pri zdravljenju parodontalne bolezni kot membrano, ki bi jo uporabili pri kirurškem zdravljenju in bi preprečevala vdor hitro rastočih fibroblastov v obzobni žep. S tem bi počasi ra-

stoče celice pridobile čas, da delno regenerirajo cement in čeljustno kost (8).

ALI STE VEDELI?

- Nanovlakna predstavljajo biomaterial, ki pospešuje regeneracijo tkiv, saj se celice odzovejo tako, da se nanje adherirajo, spremenijo metabolizem in se bolje razraščajo.

Izbor lastnih celic in presaditev celic sta znanstveno utemeljena pristopa, ki kažeta, da bo ob nadaljnjem razvoju in raziskavah možno popolnoma obnoviti vsa tkiva, ki jih prizadene parodontalna bolezen.

7 SKLEP

Napredni dostavni sistemi so izrednega pomena za uspešnejše zdravljenje parodontalne bolezni, ker omogočajo vgrajevanje različnih nizkomolekularnih učinkovin in biofarmaceutikov ter probiotikov. Inovativnost tehnoloških postopkov in analizičnih metod je privedla do razmaha razvoja številnih nanodostavnih sistemov, ki glede na *in vitro* raziskave veliko obetajo, vendar so za nedvoumno potrditev učinkovitosti takšnih inovativnih terapij parodontalne bolezni potrebne še klinične študije.

8 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo Ministrstvu za izobraževanje, znanost in šport Republike Slovenije in Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS za finančno podporo programa P1-0189 in projekta J1-9194.

9 LITERATURA

1. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):59-94.



2. Zupančič Š, Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Contribution of Nanotechnology to Improved Treatment of Periodontal Disease. *Curr Pharm Des.* 2015;21(22):3257-71.
3. Rabbani GM, Ash MM, Caffesse RG. The Effectiveness of Subgingival Scaling and Root Planing in Calculus Removal. *J Periodontol.* 1981;52(3):119-23.
4. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol* 2000. 2014;64(1):139-53.
5. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol.* 1990;17(7 (Pt 2)):479-93.
6. Zupančič Š, Rijačec T, Lapanje A, Petelin M, Kristl J, Kocbek P. Nanofibers with Incorporated Autochthonous Bacteria as Potential Probiotics for Local Treatment of Periodontal Disease. *Biomacromolecules.* 2018;19(11):4299-306.
7. Bhatavadekar NB, Williams RC. New directions in host modulation for the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2009;36(2):124-6.
8. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu T-MG, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective. *Dental Materials.* 2012;28(7):703-21.
9. Dudek-Wicher RK, Junka A, Bartoszewicz M. The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Prz Gastroenterol.* 2018;13(2):85-92.
10. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;58(1):1-15.
11. Lach G, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides. *Neurotherapeutics.* 2018;15(1):36-59.
12. Global action plan on antimicrobial resistance. *World Health Organization;* 2015.
13. Joshi D, Garg T, Goyal AK, Rath G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv.* 2016;23(2):363-77.
14. Šmid-Korbar J, Kristl J, Čop L, Grošelj D. Formulation and evaluation of oral mucoadhesive films containing metronidazole. *Acta Pharm Jugosl.* 1991;41:251-8.
15. Čop L, Šmid-Korbar J, Kristl J, Grošelj D. Bioadhezivni polimerni filmi za nanašanje na ustno sluznico. *Zobozdrav vest.* 1988;43(3/5):95-8.
16. *European pharmacopoeia*, ed. 9.6. Council of Europe, and Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia. *Sainte-Ruffine, France: Maisonneuve.*
17. Goodson JM. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:142-68.
18. Kuang X, Chen V, Xu X. Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms. *Biomed Res Int.* 2018;2018:6498932.
19. Mirtič J, Kogej K, Baumgartner S, Smistad G, Kristl J, Hiorth M. Development of cetylpyridinium-alginate nanoparticles: a binding and formulation study. *Int J Pharm.* 2016;511(2):774-84.
20. Mirtič J, Ilaš J, Kristl J. Influence of different classes of crosslinkers on alginate polyelectrolyte nanoparticle formation, thermodynamics and characteristics. *Carbohydr Polym.* 2018;181:93-102.
21. Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: a promising solution to treat intracellular bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(6):485-96.
22. Teskač K, Kocbek P, Erdani-Krefit M, Kristl J. Mehanizmi vstopa nanodelcev v celice in njihov vpliv na dostavljanje učinkovin. *Zobozdrav vest.* 2012;81(3):225-35.
23. Rošič R, Kocbek P, Pelipenko J, Kristl J, Baumgartner S. Nanofibers and their biomedical use. *Acta Pharm.* 2013;63(3):295.
24. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm.* 2015;484(1-2):57-74.
25. Forier K, Raemdonck K, De Smedt SC, Demeester J, Coenye T, Braeckmans K. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Control Release.* 2014;190:607-23.
26. Zupančič Š, Sinha-Ray S, Sinha-Ray S, Kristl J, Yarin AL. Long-Term Sustained Ciprofloxacin Release from PMMA and Hydrophilic Polymer Blended Nanofibers. *Mol Pharmaceutics.* 2016;13(1):295-305.
27. Zupančič Š, Preem L, Putrinš M, Tenson T, Kristl J, Kocbek P, et al. Impact of PCL nanofiber mat structural properties on hydrophilic drug release and antibacterial activity on periodontal pathogens. *Eur J Pharm Sci.* 2017;122:347-58.
28. Zupančič Š, Potrč T, Baumgartner S, Kocbek P, Kristl J. Formulation and evaluation of chitosan/polyethylene oxide nanofibers loaded with metronidazole for local infections. *Eur J Pharm Sci.* 2016;95:152-60.
29. Zupančič Š, Sinha-Ray S, Sinha-Ray S, Kristl J, Yarin AL. Controlled Release of Ciprofloxacin from Core-Shell Nanofibers with Monolithic or Blended Core. *Mol Pharmaceutics.* 2016;13(4):1393-404.
30. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release.* 2016;224:86-102.
31. Teskač K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm.* 2010;390(1):61-9.
32. Matsubara VH, Bandara HM, Ishikawa KH, Mayer MP, Samaranyake LP. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(7):643-55.
33. Hooper LV, Gordon JL. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001;292(5519):1115-8.
34. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014;35(1):3-11.
35. Laleman I, Teughels W. Probiotics in the dental practice: a review. *Quintessence Int.* 2015;46(3):255-64.
36. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hornansperger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 2010;1(3):164-85.
37. Broeckx G, Vandenheuvel D, Claes JJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm.* 2016;505(1-2):303-18.
38. Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis.* 2007;13(5):443-51.
39. Tsubura S, Mizunuma H, Ishikawa S, Oyake I, Okabayashi M, Katoh K, et al. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(11):1353-6.
40. Cannon ML. A Review of Probiotic Therapy in Preventive Dental Practice. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2011;3(2):63-7.
41. Zvonar A, Gašperlin M. Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. *Farm vest.* 2011;62(3):131-8.
42. Zvonar A, Bolko K, Gašperlin M. Microencapsulation of self-microemulsifying systems: optimization of shell-formation phase and hardening process. *Int J Pharm.* 2012;437(1-2):294-302.
43. Ding WK, Shah NP. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J Food Sci.* 2009;74(2):1750-3841.
44. Mirtič J, Rijačec T, Zupančič S, Zvonar P, Lapanje A, Kristl J. Development of probiotic-loaded microcapsules for local delivery: Physical properties, cell release and growth. *Eur J Pharm Sci.* 2018;121:178-87.
45. Wang C, Wang J, Zeng L, Qiao Z, Liu X, Liu H, et al. Fabrication of Electrospun Polymer Nanofibers with Diverse Morphologies. *Molecules.* 2019;24(5):834.
46. Škrlec K, Zupančič Š, Prpar Mihevc S, Kocbek P, Kristl J, Berlec A. Development of electrospun nanofibers that enable high loading and long-term viability of probiotics. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019.

47. Chen F-M, Sun H-H, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*. 2012;33(27):6320-44.
48. Murugan Ramalingam AV, Paul Sharpe, Songtao Shi. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 1st ed: Academic Press; 2015.
49. Venkataiah VS, Handa K, Njuguna MM, Hasegawa T, Maruyama K, Nemoto E, et al. Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells *in vivo*. *Sci Rep*. 2019;9(1):921.
50. Christman KL. Biomaterials for tissue repair. *Science*. 2019;363(6425):340-1.
51. Pelipenko J, Kocbek P, Govedarica B, Rosic R, Baumgartner S, Kristl J. The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;84(2):401-11.
52. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. *Eur J Pharm Sci*. 2015;66:29-35.
53. Janković B, Pelipenko J, Skarabot M, Musevič I, Kristl J. The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *Int J Pharm*. 2013;455(1-2):338-47.

