

DR. JANJA MIRTič

Dr. Janja Mirtič je že od otroštva naravoslovka in raziskovalka. Vedno jo je zanimalo, kako in zakaj stvari delujejo, pa naj gre za človeško telo ali tekoče stopnice. Navdušenost nad biologijo, kemijo in fiziko jo je iz okolice Trebnjega pripeljala na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani. Po zaključku magistrskega študija farmacije se je na Katedri za farmacevtsko tehnologijo sprva zaposlila kot asistentka, nato pa kot mlada raziskovalka. Tam je izvajala svoje raziskovalno delo v okviru doktorskega študija Biomedicina, smer Farmacija. Zlasti dragocene so bile izkušnje iz laboratorijev v tujini in pri domačih partnerskih ustanovah, kjer je pridobila znanje s širokega interdisciplinarnega področja farmacije. Svoje akademsko znanje, izkušnje in kompetence je prenesla v industrijsko okolje, saj je kot razvojna tehnologinja zaposlena v Krkinem farmacevtskem razvoju.



Naklonjenost interdisciplinarnosti

Za raziskovanje farmacevtske tehnologije me je navdušila mentorica na magistrskem študiju prof. dr. Saša Baumgartner, ki mi je pokazala, da zdravila niso samo učinkovine, ampak je za njihovo delovanje ključna končna farmacevtska oblika. Prek mentorice na doktorskem študiju prof. dr. Julijane Kristl sem spoznala še farmacevtsko nanotehnologijo, ki se ukvarja z dostavo učinkovin, le da so dostavni sistemi na nanometrski ravni. Moje raziskovalno delo je prispevek k znanju o uporabnosti polielektrolitov (polimerov z nabojem), predvsem iz skupine biopolimerov (polimerov naravnega izvora), za izdelavo dostavnih sistemov in tudi širše. Doktorat se dotika še zdravljenja parodontalne bolezni, kjer si raziskovalna skupina prizadeva za vpeljavo dodatne probiotične in regenerativne terapije kot komplementarne standardnemu zdravljenju.

INOVATIVNOST JE KLJUČ DO USPEHA

Pri raziskovanju me navdušuje dejstvo, da ga ni nikoli konec. Vedno znova se pojavljajo nove informacije in zastavljajo nova vprašanja. Najboljše zamisli se mi po navadi porodijo med premlevanjem o problemu ali pa v pogovorih z drugimi raziskovalci, strokovnjaki drugih strok ali operaterji na napravah. Če si pripravljen poslušati in »sintetizirati« znanje, lahko tudi na drugih področjih hitro najdeš rešitve za svoje izzive.

VLOGA MENTORJA JE ZELO POMEMBNA

Mentor z vizijo, sredstvi in povezavami lahko omogoči raziskovanje na visoki ravni. Moja mentorica mi je utrla številne poti, ki bi mi bile sicer nedostopne. Še posebej cenim, da mi je omogočila dodatno strokovno in osebno izpopolnjevanje, tako da sem imela ob zaključku doktorata občutek, da imam v žepu veliko uporabnih kompetenc.

PROFESIONALNO IN ZASEBNO

Med nastajanjem doktorskega dela sem bila še posebej hvaležna za mesto mlade raziskovalke, saj sem se lahko v celoti posvetila raziskovalnemu delu. Res pa je, da raziskovalnega dela težko ne nosiš domov. Ugotovila sem, da mi dejavni odmori v hribih, na smučeh, pri plesu ali drugje najbolj pomagajo premagovati miselne blokade. Možgani potrebujejo malo počitka, da lahko na kakšen problem pogledamo z drugega zornega kota.

OSEBNE LASTNOSTI

V zasebnem in poklicnem okolju me poznajo kot organizatorko oziroma povezovalko. Rada svetujem,

če prepoznam rešitev, ki sem jo morda videla v kakšnem drugem okolju in jo je mogoče vpeljati v problematično nalogo. Moja dobra in včasih slaba lastnost je vztrajnost, ki lahko preraste v trmoglavost. Tako tudi v težkih okoliščinah vztrajam toliko časa, da stvari rešim po svojih najboljših močeh.

DODANA VREDNOST KRKINE NAGRADE

Krkine nagrade so še posebej pomembne za mlajše raziskovalce na začetku poti, saj jim pomenijo dodatno vzpodbudo in zagon za raziskovanje. Vse pohvale je vredno dejstvo, da Krkine nagrade obstajajo že pol stoletja. Zame je nagrada predvsem potrditev kakovosti večletnega raziskovalnega dela, hkrati pa prinaša tudi določeno mero prepoznavnosti. Vesela sem, da sem se pridružila vrsti Krkinih nagrajencev, med katerimi so tudi moji sodelavci.

SPOROČILO RAZISKOVALCEM

Raziskovalci moramo biti vztrajni in potrpežljivi. Sprejeti moramo, da večina stvari ne gre po načrtih in da so negativni rezultati del raziskovanja. Iz vsakega neuspelega eksperimenta se lahko naučimo nekaj novega. To pa je temelj za resnično dobre raziskave.

NAJBOLJŠI NASVET

Nikoli ne veš vsega o okoliščinah, projektu, raziskovalni tematiki ..., zato moraš biti vedno pripravljen poslušati, se učiti ter sprejemati nove informacije in zamisli.

ŽIVLJENJSKO VODILO

Ničesar v življenju se ni treba bati, treba je samo razumeti.

(Marie Curie)

Neizkoriščen potencial polielektrolitov za razvoj naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotike

Polielektroliti so polimeri, katerih monomerne enote nosijo skupine, ki jih je mogoče pri določenem pH ionizirati, zaradi česar imajo naboj. Glavni cilj doktorske disertacije je bil raziskati nove možnosti uporabe polielektrolitov pri razvoju naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotične bakterije. Poudarek je bil na polielektrolitih, ki izvirajo iz narave (na polisaharidih, kot sta alginat in hitosan) in so biokompatibilni ter biorazgradljivi, primarni cilj pa zdravljenje parodontalne bolezni. To je vnetna bolezen, katere primarni vzrok je mikrobno neravnovesje. Trenutni terapevtski pristopi ne vodijo do popolne ozdravitve, zato obstaja potreba po razvoju novih načinov zdravljenja, ki bi zmanjšali bakterijske zobne obloge, v ustih ponovno vzpostavili mikrobno ravnovesje, modulirali imunski odziv in obnovili parodontalna tkiva.

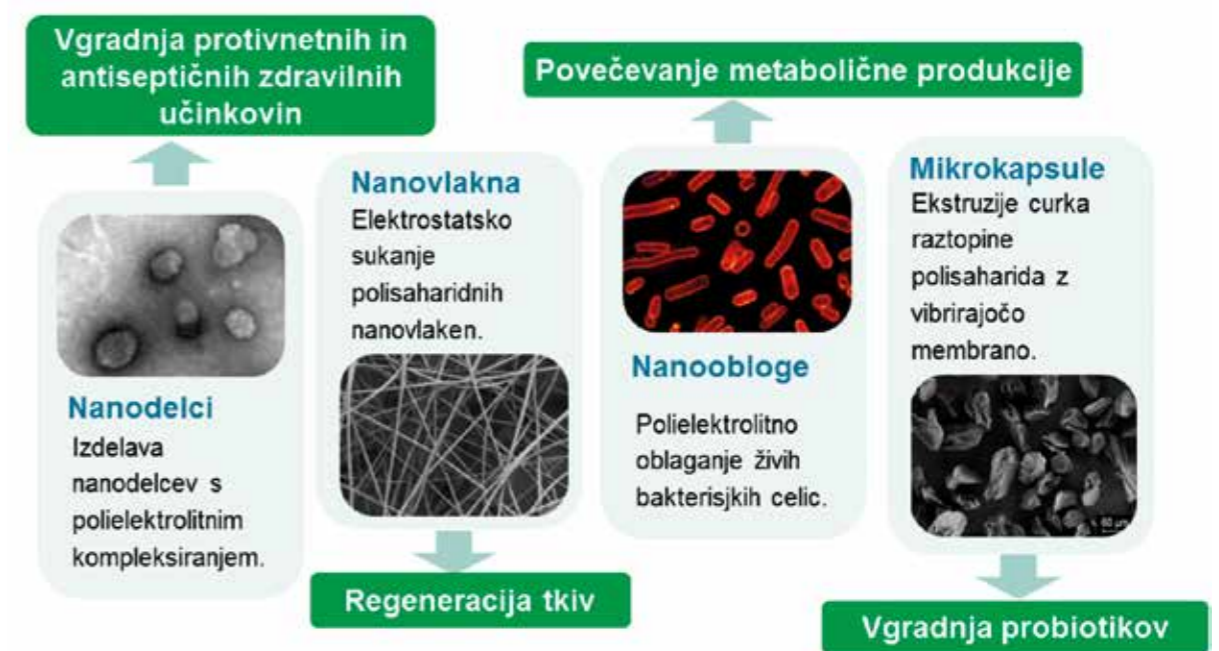
V prvem delu naloge smo raziskali in opisali polielektrolitno kompleksiranje alginata z različnimi vrstami premreževal kot metodo za tvorbo nanodelcev. Ne glede na vrsto premreževala vse polielektrolitne kompleksacije vodijo v nastanek nanodelcev ob upoštevanju ustreznega molarne razmerja med komponentama. Nanodelci pa imajo glede na uporabljeno premreževalo različne lastnosti, kot so hidrodinamska velikost, površinski naboj in stabilnost. S termodinamskega vidika je nastanek nanodelcev s polielektrolitno kompleksacijo vedno spontan, neodvisno od uporabljenega premreževala. Tako smo pokazali, da je polielektrolitno kompleksiranje preprosto in blag postopek za tvorbo nanodelcev, ki je zanimiv za vgrajevanje zdravilnih učinkovin ali celic, od bioloških zdravil in matičnih celic do slabo topnih zdravilnih učinkovin, pri katerih lahko značilnosti strukture kompleksa omogočajo večjo topnost. V nadaljevanju smo razvili inovativne nanodelce, izdelane s kompleksiranjem površinsko aktivne snovi, ki je hkrati antiseptik – cetilpiridinjevega klorida in polielektrolita alginata. Kompleksacija polielektrolitov z nasprotno nabitimi površinsko aktivnimi snovmi je kooperativen proces, saj se molekule površinsko aktivnih snovi najprej samozdružujejo v micelle, ki nato premrežijo verige polielektrolita. Izdelani cetilpiridin-alginatni nanodelci so imeli hidrodinamski premer med 140 nm in 200 nm, negativen zeta potencial in sferično morfologijo. Te nanodelce smo uporabili za povečanje topnosti ibuprofena, nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine, ki je slabo topna v vodi. Zaradi narave nastanka micelov cetilpiridina v prisotnosti alginata smo povečano topnost ibuprofena dosegli pri končni koncentraciji površinsko aktivne snovi, ki je manjša od kritične micelarne koncentracije. Z uporabo transmisijske elektronske mikroskopije smo tudi pokazali, da kljub vgradnji slabo topne učinkovine micelarne strukture, premrežene v alginatu, niso porušene, saj so bili nanodelci videti kot sestavljeni iz manjših podenot (pribl. 17 nm). Tako smo razvili inovativne nanodelce s kombinacijo antiseptične in protivnetne zdravilne učinkovine, ki jih lahko apliciramo v obzobni žep na mestu okužbe in vnetja, kar zagotavlja možnost boljšega lokalnega zdravljenja parodontalne bolezni.

V drugem delu smo z metodo elektrostatskega sukanja uspešno izdelali nanovlakna z visokim deležem alginata (> 85 % m/m). Prevelika prevodnost polimerne raztopine onemogoča elektrostatsko sukanje, kar je eden od glavnih razlogov, da ne moremo izdelati samo alginatnih nanovlaken. Z uporabo fleksibilnega in elektronevtralnega polietilena oksida v polimerni zmesi zmanjšamo prevodnost raztopine alginata in s tem naredimo raztopino dveh polimerov primerno za elektrostatsko sukanje. Z dodajanjem že manjših količin polietilena oksida z visoko molekularno maso smo pripravili mešanice polimernih raztopin z ustreznimi reološkimi in prevodnimi lastnostmi, ki so omogočile elektrostatsko sukanje. Z multivariatno analizo in spreminjanjem parametrov raztopine smo lahko natančno prilagajali premer izdelanih nanovlaken. Tako smo uspešno izdelali nanovlakna z visoko vsebnostjo biorazgradljivega polisaharida alginata, ki predstavljajo učinkovit ogrodni material za uporabo v regenerativni medicini.

Zadnji del je bil usmerjen v vgrajevanje bakterijskih celic. Z metodo nanooblaganja oziroma plastenja smo obložili posamezne žive bakterijske celice. Večje količine probiotičnih bakterij pa smo vgradili v alginatne mikrokapsule. V prvem primeru smo preizkusili različne polielektrolite in proučili njihove učinke na celice. Prvi smo pri preiskovanju polielektrolitnega nanooblaganja uporabili mikroskopijo z vzbujenim praznjenjem emisije ter pokazali njeno

prednost pred običajno fluorescentno mikroskopijo in uporabnost za opazovanje nanooblog na živih bakterijskih celicah. Uspešnost polielektrolitnega oblaganja posameznih bakterijskih celic je bila močno odvisna od uporabljenega celičnega seva. Zdi se, da je *E. coli* odporna proti polielektrolitnemu oblaganju in omogoča nastanek tankega sloja na površini bakterijske celice. Nasprotno pa *P. stutzeri* internalizira polielektrolit (ne glede na njegovo molekularno maso, vrsto ali koncentracijo), kar ima za posledico toksičnost celic te vrste. V nasprotju s pričakovanji smo pokazali, da je učinek polielektrolitnega oblaganja odvisen predvsem od uporabljenega seva bakterijskih celic in ne od lastnosti uporabljenega polielektrolita.

Alginatne mikrokapsule za vgradnjo probiotikov smo pripravili z ekstruzijo curka alginatne disperzije s probiotiki ter razbijanjem v kapljice z membransko vibracijsko tehnologijo. Ta tehnika omogoča vgrajevanje dodatnih pomožnih snovi (tj. krio- in lioprotektantov), potrebnih za naknadno liofilizacijo proizvedenih mikrokapsul, kar omogoča njihovo dolgoročno stabilnost v posušeni obliki. Dodatno smo izdelane mikrokapsule polielektrolitno obložili s hitosanom, kar je vodilo v nastanek bolj nagubane in povečane površine mikrokapsul ter spremembo njihovega površinskega naboja. Na ta način se je povečal tudi mukoadhezijski potencial s hitosanom obloženih mikrokapsul. Razvite mikrokapsule predstavljajo nov dostavni sistem za probiotike, ki omogoča preživetje bakterij med izdelavo in shranjevanjem, zadostno rehidracijo mikrokapsul v stiku z medijem, kar omogoči izmenjavo hranil, kisika in presnovnih produktov, in s tem uspešno oživitev probiotikov, rekolonizacijo okoliških površin in kompeticijo s parodontopatogenimi bakterijami. Izdelane mikrokapsule so učinkovit dostavni sistem za dostavo probiotikov v parodontalne žeppe.



Slika 1. Shema glavnih področij raziskovalnega dela, namenjenega uporabi polielektrolitov za razvoj naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotike.

Rezultati doktorske disertacije prispevajo k boljšemu razumevanju polielektrolitov in njihovih prednosti za razvoj dostavnih sistemov. Alginat kot osrednji polielektrolit je prepoznan kot pomožna snov, ki ima s funkcionalnostjo povezane lastnosti, ki so uporabne za razvoj polielektrolitnih nanodelcev, nanovlaken in mikrokapsul. Takšni dostavni sistemi imajo tudi lastnosti, ki izhajajo iz alginata, kot so biorazgradljivost, biokompatibilnost, mukoadhezivnost ali prirejeno sproščanje, kar vse prispeva k dodani vrednosti izdelanega dostavnega sistema in zdravila kot celote. Doktorska disertacija opredeljuje novo znanje s področja polielektrolitnega kompleksiranja, elektrostatskega sukanja polisaharidov in vgrajevanja bakterij, ki bo omogočilo širšo uporabo polielektrolitov za razvoj naprednih dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine in probiotike.

Unexploited Potential of Polyelectrolytes for Development of Advanced Delivery Systems of Drugs and Probiotics

Polyelectrolytes are polymers whose repeating units carry functional groups that can be ionized at a certain pH, making the polymers charged. The main objective of this doctoral dissertation was to resolve the challenges of utilizing polyelectrolytes in the development of advanced delivery systems for drugs and probiotic bacteria. The focus was on polyelectrolytes that originate from nature (i.e. polysaccharides, such as alginate and chitosan) that are biocompatible and biodegradable, with a primary objective of periodontal disease treatment. Periodontal disease is an inflammatory disease primarily caused by microbial imbalance. Current therapeutic approaches lead only to short-term recovery, thus there is a need for the development of novel treatments that would reduce the periodontal plaques, re-establish oral microbial balance, modulate the immune response, and regenerate the periodontal tissues.

In the first part, polyelectrolyte complexation of alginate with different classes of crosslinkers as a method of nanoparticle formation was thoroughly investigated and described. The formation of nanoparticles was shown over limited ranges of molar ratios that were specific for each crosslinker. Different crosslinkers led to the formation of alginate nanoparticles with different hydrodynamic size, stability and structure. We thermodynamically showed that nanoparticle formation is spontaneous, led by entropy, even when different classes of crosslinkers are used. We proved that polyelectrolyte complexation is a simple and mild procedure for nanoparticle formation, which is of great interest for drug or cell incorporation – from the biopharmaceutical drugs and stem cells where the mildness of the procedure is beneficiary, to the poorly soluble drugs where the characteristics of the complex structure enable increased solubility. Furthermore, completely novel surfactant-polyelectrolyte-complex nanoparticles were developed. We showed that the surfactant and antiseptic cetylpyridinium chloride is bound to the polyelectrolyte – alginate in a cooperative interaction. This cooperativity signifies that cetylpyridinium ions bind to the alginate polyanion in the form of micelle-like aggregates that are threaded on a polymer chain like pearls on a string. Thus, cetylpyridinium-alginate nanoparticles were formed in the water with hydrodynamic diameter from 140 nm to 200 nm, negative zeta potential and spherical morphology. These cetylpyridinium-alginate nanoparticles were further utilised for increasing water solubility of ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, at final surfactant concentration lower than the critical micellar concentration. At first, we showed using transmission electron microscopy that the micellar structures enveloped in alginate still exist, even when ibuprofen is incorporated since the nanoparticles looked like being composed of smaller (~17 nm) subunits. We developed innovative nanoparticles with the combination of an antiseptic and anti-inflammatory drug that could be administered into the periodontal pocket at the site of infection and inflammation, providing a better local treatment option.

In the second part, nanofibers with a high proportion of alginate (> 85% w/w) in composition were successfully electrospun. Too high conductivity of a polymer solution can inhibit nanofiber formation, and this is one of the reasons that alginate alone cannot be electrospun. However, the shielding effect of highly flexible, neutral poly(ethylene oxide) can sufficiently lower the conductivity and make the polymer blend solution electrospinnable. Thus, with the addition of high molecular weight poly(ethylene oxide), blend solutions of appropriate rheological and conductometric properties were made, which enabled electrospinning of alginate. Moreover, using multivariate analysis and by varying different solution parameters the nanofiber diameter could be finely tuned. As such, nanofibers with a high content of a biodegradable ionogenic polysaccharide that can provide an efficient scaffold material for the use in regenerative medicine were successfully made.

The last part focused on bacterial cell entrapment. The bacteria were physically entrapped as single cells using a layer-by-layer deposition method. Microcolonies were inserted into alginate microcapsules as a probiotic delivery system. In the first case, the effects of different polyelectrolytes on living cells were tested. First, we applied the

stimulated emission depletion microscopy to the investigation of polyelectrolyte coating, and we showed its supremacy against conventional fluorescent microscopy and usefulness for observation of nanocoatings on live bacterial cells. The successfulness of the layer-by-layer polyelectrolyte coating of single bacterial cells was mainly dependent on the cell strain used. *E. coli* seems to be resistant to such coating and a thin layer on the surface of the bacterial cell can be formed, whereas *P. stutzeri* engulf the polyelectrolyte (regardless of the molecular weight, type or concentration) that results in cell toxicity. Contrary to the expectation, the effects of polyelectrolyte coating are mainly dependent on the bacterial strain used, and not on the polyelectrolyte properties.

Alginate microcapsules for probiotic incorporation were innovatively prepared by prilling of alginate dispersion with probiotics with membrane vibration technology into a calcium solution followed by lyophilisation to produce dry and thus more stable microcapsules. We also applied additional chitosan coating on alginate microcapsules that led to rougher microcapsule surfaces, their higher surface area, and charge reversal. Consequently, the microcapsules' mucoadhesion potential was increased. Such microcapsules presented a novel probiotic delivery system that enabled their survival during processing and storage, quick and sufficient rehydration of microcapsules that allow an exchange of nutrients, oxygen and metabolic products to support successful probiotic revival, recolonization of surrounding surfaces and competition with periodontopathogenic bacteria. Thus, such microcapsules could serve as an efficient probiotic delivery system into the periodontal pockets.

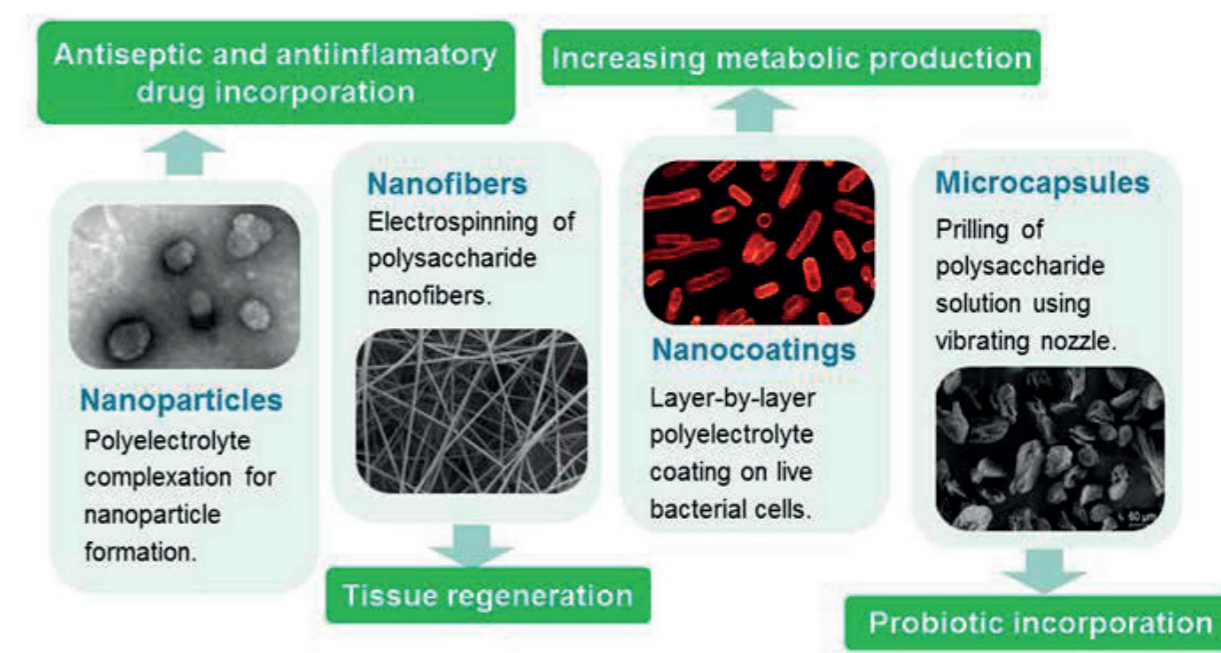


Figure 1: Scheme of the main research topics in the field of utilisation of polyelectrolytes for the development of advanced delivery systems for active pharmaceutical ingredients and probiotics

Overall, these results have contributed to a better understanding of polyelectrolytes and their use in the development of drug delivery systems. Alginate as the main polyelectrolyte of interest was recognized as an excipient with functionality-related characteristics useful in the development of nanoparticles, nanofibers or microcapsules. Such delivery systems also carry characteristics that are brought by alginate in the composition, such as biodegradability, biocompatibility, mucoadhesiveness, or modified release, all of which add value to the delivery system and the final medicine made. This doctoral dissertation defines new knowledge on the topics of polyelectrolyte complexation, electrospinning of polysaccharides and encapsulation of bacterial cells that will enable wider use of polyelectrolytes for the development of advanced delivery systems for drugs and probiotics.